

Die Lymphozyten-unabhängige Neuroprotektion durch Siponimod in einem toxischen Multiple Sklerose Tiermodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp
Einrichtung: Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Emily Santrau | geb. am 11.12.1997 in Berlin
aus Rostock
Potsdam | 30.07.2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005522

Gutachter:

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

Prof. Dr. med. Timo Kirschstein, Universitätsmedizin Rostock, Institut für
Physiologie

PD Dr. med. Matthias Grothe, Universitätsmedizin Greifswald, Neurologie

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2025

Inhalt

1	Einleitung.....	9
1.1	Klinik und Diagnose	9
1.2	Ätiologie der Multiplen Sklerose	10
1.3	Pathologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose	12
1.4	Therapie und Behandlungsrestriktionen.....	13
1.4.1	Therapie der Symptome	13
1.4.2	Therapie im akuten Schub.....	13
1.4.3	Verlaufsmodifizierende Therapie	14
1.5	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren.....	18
1.6	S1PR-Modulation.....	21
1.7	Siponimod.....	22
1.8	Recombination activating gene.....	23
1.9	Das Cuprizone-Modell als Modell für die progressive MS	25
1.10	Fragestellung	26
1.10.1	Die Lymphozyten-unabhängige Wirkung von Siponimod	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Versuchstiere und Durchführung	28
2.2	Versuchsaufbau und -ablauf.....	28
2.3	Transkardiale Perfusion und Materialgewinn	29
2.4	Entwässerung, Einbettung und Schnitt	29
2.5	Immunhistochemie.....	32
2.5.1	Prinzip einer immunhistochemischen Markierung	32
2.5.2	Durchführung immunhistochemischer Markierungen.....	34
2.6	Histologische Färbungen	38
2.6.1	Prinzip der Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Reaktion	38
2.6.2	Durchführung der Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Reaktion.....	39
2.6.3	Prinzip der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41

2.6.4	Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
2.7	Auswertung	43
2.7.1	Untersuchte Hirnareale	43
2.7.2	Quantifizierung der Zelldichten.....	44
2.7.3	Statistische Auswertung	45
2.7.4	Scoring der Myelindichte.....	45
2.7.5	Quantifizierung der optischen Dichte	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Lymphozyten-unabhängige Wirkung von Siponimod	47
3.1.1	Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber Demyelinisierung.....	47
3.1.2	Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber Mikrogliose	50
3.1.3	Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber Axonschäden	53
3.1.4	Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber dem Untergang von Oligodendrozyten	55
4	Diskussion.....	58
4.1	Diskussion der Methoden	58
4.1.1	Das Cuprizone-Modell	58
4.1.2	Die <i>Rag1</i> ^{-/-} -knockout Mauslinie	62
4.1.3	Immunhistochemie.....	62
4.1.4	Histologische Färbungen	63
4.1.5	Quantifizierung der optischen Dichte und von Zelldichten.....	63
4.2	Diskussion der Ergebnisse	64
4.2.1	Cuprizone-induzierte Schäden in <i>Rag1</i> ^{-/-} -Mäusen	64
4.2.2	Siponimod-vermittelte Neuroprotektion	65
4.3	Abschließende Bemerkung.....	68
5	Abbildungsverzeichnis	69

6	Tabellenverzeichnis	70
7	Material und Chemikalien	70
8	Puffer, Blockseren und Färbelösungen	72
9	Literatur	75
10	Eidesstattliche Versicherung	83
11	Thesen	84

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin Biotin Komplex
Ak	Antikörper
akt	Proteinkinasen B
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
BAF312	Siponimod
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CC	Corpus callosum
CD4	Cluster of differentiation (Transmembranfaktor) 4
CD8	Cluster of differentiation (Transmembranfaktor) 8
CD20	Cluster of differentiation (Transmembranfaktor) 20
CD52	Cluster of differentiation (Transmembranfaktor) 52
CIS	klinisch isoliertes Syndrom (engl. clinically isolated syndrome)
CMC	Carboxymethylcellulose
Cup	Cuprizone
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
Env	envelope protein (Hüllprotein)
et al.	et alia
EU	Europäische Union
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association

Fc	„crystalline“ Antikörperfragment
FTY720	Fingolimod
g	Gramm
gem.	gemäß
GIRK	einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HIER	heat induced antigen retrieval
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	biotinylierte Meerrettichperoxidase
IBA1	ionisiertes Kalium-bindendes Adaptermolekül 1
IFN β	Interferon beta
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ICC	laterales Corpus callosum
IQR	Interquartilabstand
LFB/PAS	Luxol Fast Blue/Perjodsäure-Schiff-Reaktion
MBP	Myelin basisches Protein
mCC	mediales Corpus callosum
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus
mTOR	mammalian target of rapamycin (Zielmolekül von Rapamycin in Säugetieren)
OLIG2	Oligodendrozytentranskriptionsfaktor 2
PBS	Phosphatpufferlösung

PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLP	Myelinproteolipidprotein
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose
Rag	Rekombination aktivierendes Gen
ROI	Region of interest
RRMS	relapsing remitting multiple sclerosis (schubförmige Multiple Sklerose)
RSS	Rekombinations Signal Sequenz
R265	Region 265
SNP	single nucleotide peptide
sog.	sogenannte
SphK1/2	Sphingosinkinase 1/2
SPMS	sekundär progrediente Multiple Sklerose
SPP1/2	Sphingosin-Phosphat-Phosphatase 1/2
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
T _H 2	Typ 2 T-Helferzelle
T _H 4	Typ 4 T-Helferzelle
TLR4	toll like Rezeptor 4
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VDJ	variable, diversifying, joining
VLA-4	very late antigen 4 (Integrin alpha 4)
ZNS	Zentralnervensystem
5WCup	5 Wochen Cuprizone

1 Einleitung

1.1 Klinik und Diagnose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie ist in Europa die häufigste Autoimmunerkrankung des ZNS [1]. Histopathologisch ist die Erkrankung durch entzündliche, demyelinisierende Läsionen mit Untergang von Myelin, Myelinbildenden Zellen und Axonen gekennzeichnet. Diese Läsionen können sowohl in der weißen, als auch in der grauen Substanz auftreten. Prädilektionsstellen sind das *Corpus callosum* (CC), infratentoriale, juxtakortikale und periventrikuläre Regionen [2, 3]. Je nach betroffener Hirnregion unterscheiden sich die Symptome der MS. Das bedingt ein sehr heterogenes Erscheinungsbild. Zu der klinischen Präsentation können Parästhesien und motorische Störungen zählen [4].

Bei 85 % der Patienten mit einer MS Erkrankung tritt vor endgültiger Diagnosestellung ein klinisch isoliertes Syndrom (englisch (eng.): clinically isolated syndrome, CIS) auf. Das CIS zeichnet sich durch erste neurologische Ausfallerscheinungen aus. Diese werden durch die oben beschriebenen Läsionen verursacht [5]. Zu häufigen Erstsymptomen der MS zählen Sehstörungen, durch Entzündung des Sehnerven (Optikusneuritis), Paresen und Sensibilitätsstörungen [4]. Die

international standardisierten Richtlinien, die McDonald Kriterien [6], zählen das CIS noch nicht zum Krankheitsbild der MS. Nach den aktualisierten McDonald Kriterien müssen sich nämlich zeitlich und örtlich disseminierte Läsionen nachweisen lassen, um die Diagnose MS stellen zu können [7]. Das beinhaltet Läsionen in T2-gewichteter Magnetresonanztomographie (MRT) oder oligoklonale Banden im Liquor.

Die MS wird nach dem Krankheitsverlauf in verschiedene Formen unterteilt (Abbildung 1). Die schubförmige MS (engl. relapsing remitting MS, RRMS) betrifft 80 % der MS-Patienten bei der Erstdiagnose der Erkrankung. Die RRMS ist

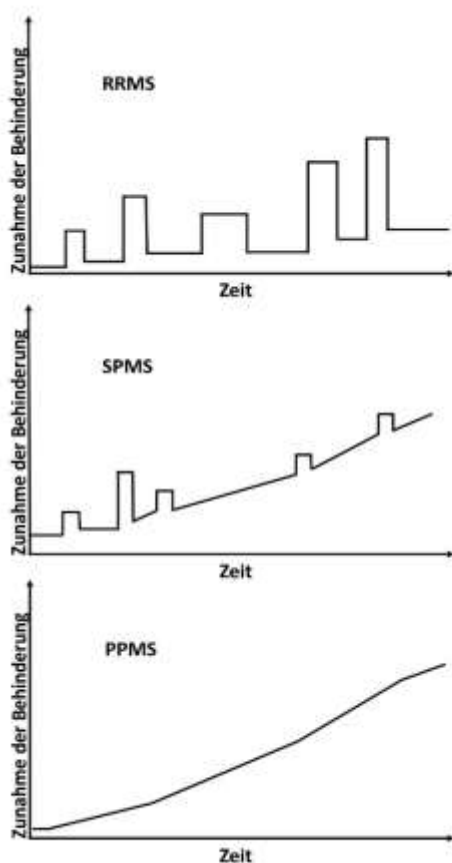


Abbildung 1 MS-Verlaufsformen

Schematische Darstellung der Verlaufsformen der MS

durch schubförmig auftretende Symptome mit einer vollständigen oder nahezu vollständigen Remission charakterisiert. Die Symptome gehen von entzündlichen Läsionen aus. Ein Schub ist definiert als über eine Dauer von mindestens 24 Stunden auftretende neue neurologische Symptome oder eine Verschlechterung bekannter Ausfälle [8]. 30-40 % der RRMS-Patienten entwickeln nach 15 Jahren eine sekundär progrediente MS (engl. secondary progressive MS, SPMS) [9, 10]. Nach 20 Jahren haben bis zu 90 % der RRMS-Patienten eine SPMS entwickelt [11]. Dieser Übergang wird in der Retrospektive klinisch diagnostiziert.

Der Verlauf der SPMS ist durch die stetige Zunahme von Symptomen gekennzeichnet. Schübe können dem progredienten Verlauf aufgesetzt sein, es kommt jedoch zu keiner vollständigen Remission der Symptome. Die entzündlichen Prozesse sind in der SPMS weniger stark ausgeprägt und diffuser als in der RRMS. Histopathologisch steht die Neurodegeneration im Vordergrund [12]. Globale Gehirnatrophie, ausgeprägte kortikale Demyelinisierungsherde [13] und ein kumulativer Axonverlust [14] sind für die SPMS kennzeichnend.

Ein von Beginn an progredienter remissionsloser Krankheitsverlauf ist charakteristisch für die primär progrediente MS (engl. primary progressive MS, PPMS). Von dieser Form sind schätzungsweise 15 % der MS-Patienten betroffen. Vergleichbar mit der SPMS kommt es auch hier zu einer stetigen Progression des neurologischen Funktionsverlustes.

1.2 Ätiologie der Multiplen Sklerose

Die genaue Ätiologie der MS ist unklar. Eine Kombination aus diversen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen wird vermutet. Als Beispiel wäre hier eine mögliche genetische Prädisposition zu nennen.

Es gibt zehn Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) für humane Leukozytenantigen (HLA)-Allele, die signifikant mit der MS assoziiert sind [15]. Darunter ist das *HLA-DR2*-Allel (DRB1*1501-DQB1*0602) [16]. Es wurde festgestellt, dass bei einer Vielzahl von MS-Patienten das *HLA-DR2*-Allel auf Chromosom 6 exprimiert ist [17]. Dieser HLA-Haplotyp konnte jedoch nicht mit klinischen Symptomen, Krankheitsdauer und dem Grad des neurologischen Funktionsverlustes in Verbindung gebracht werden [18, 19]. Eine Assoziation zum HLA-Haplotypen konnte auch bei anderen Autoimmunerkrankungen festgestellt werden. Dazu zählen unter anderem (u.a.) die Sklerodermie mit DR3, DR5 und DR52 [20] und die Myasthenia gravis mit DR3 und DR7 [21]. Die Bestimmung von HLA-Haplotypen könnte zukünftig für die Diagnostik relevant sein [22].

Zu den möglichen Umweltfaktoren, die als Einfluss auf die MS diskutiert werden, gehört die Exposition gegenüber Sonneneinstrahlung und der Vitamin D-Spiegel [23, 24]. Dies beruht darauf, dass die Prävalenz der MS mit größerer Entfernung zum Äquator steigt [25, 26]. Zudem konnte ein Breitengradgradient besonders bei ethnisch homogener Bevölkerung beobachtet werden. Migrationsstudien zeigten, dass Kinder und Jugendliche, die vor ihrem fünfzehnten Lebensjahr von einer Region mit hohem Erkrankungsrisiko in eine Region mit geringerem Erkrankungsrisiko zogen, im Durchschnitt seltener an MS erkrankten [27].

Die Exposition gegenüber verschiedenen Erregern wird ebenfalls als potentieller Risikofaktor der MS angenommen. So wird beispielsweise (bspw.) eine vorangegangene Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) als möglicher Einflussfaktor diskutiert. In einer Studie von Abrahamyan et al. aus 2020 zeigten 100 % der 901 untersuchten MS- beziehungsweise (bzw.) CIS-Patienten eine EBV-Seropositivität [28]. Als seropositiv galt ein Patient, wenn er für mindestens einen der EBV-Marker positiv getestet wurde. Zu den EBV-Markern, welche die unterschiedlichen Phasen der Infektion anzeigen, zählten das Epstein-Barr-nukleäre-Antigen-1 Immunglobulin G (IgG), EBV-Viruskapsid-Antigen IgG und Immunglobulin M (IgM). Dem gegenüber steht allerdings die hohe Durchseuchungsrate der Allgemeinbevölkerung mit EBV von schätzungsweise 95 % [29]. Das relative Risiko nach einer EBV-Infektion im Laufe des Lebens an MS zu erkranken beträgt 2,17 [30]. Als weiterer möglicher Einflussfaktor wird das MS-assoziierte Retrovirus (MSRV) diskutiert. Es besitzt ein Hüllprotein (engl. envelope protein, MSRV-Env), welches agonistisch am Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) wirkt. Dies führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Mikrogliazellen, welche eine verminderte Differenzierung von Oligodendrozyten und eine gesteigerte T-Zell-Diapedese durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins ZNS bewirken [31]. Es wird vermutet, dass eine EBV-Infektion ruhende MSRV aktiviert [32, 33]. Perron et al. 1998 postulierten, dass das MSRV Signalkaskaden initiiert und verstärkt, die zu einer MS führen könnten [34].

Außerdem konnte das Rauchen von Zigaretten in mehreren Studien mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert werden. Das Verhältnis der MS-Erkrankten von Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern betrug 1,5 [35, 36].

1.3 Pathologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose

Neuropathologisch kommt es bei der MS durch Degeneration von Oligodendrozyten zu fokalen, demyelinisierenden Läsionen [37]. Aufgrund des Untergangs der Myelin-bildenden Oligodendrozyten und dem damit einhergehenden Myelinverlust, kommt es im Verlauf zu einer gestörten axonalen Integrität. Dies führt folgend zu einer axonalen Dysfunktion bis hin zu axonalen Schädigungen. Dementsprechend treten neurologische Ausfallerscheinungen auf. Reaktive Astro- und Mikrogliazellen sezernieren Zytokine und andere Entzündungsmediatoren, welche inflammatorische Prozesse im ZNS initiieren und aufrechterhalten. Neben der Demyelinisierung können auch entzündungsinduzierte Ödeme in Gehirn und Rückenmark zu einer Kompression und dadurch zu einem Funktionsausfall der Axone führen. In den Läsionen kommt es des Weiteren zur Einwanderung peripherer Immunzellen. In neu entstandene Läsionen finden sich vor allem Makrophagen, Transmembranfaktor 4⁺- (eng. Cluster of Differentiation, CD4) und Transmembranfaktor 8⁺- (eng. Cluster of Differentiation, CD8) T-Zellen sowie wenige B- und Plasmazellen [38]. Länger bestehende Läsionen hingegen zeigen vordergründig Demyelinisierung, Fasergliose, Axonverlust und relative Zellarmut. Mit wenig reifen Oligodendrozyten oder funktionellen Oligodendrozytenvorläuferzellen bilden sie das Korrelat der klinischen Progression [3, 39]. Sie sind durch einen hyperzellulären Randsaum aus Mikroglia, Makrophagen, aktivierten Astrozyten und T-Zellen sowie Axonverlust gekennzeichnet. Die genauen neuropathologischen Prozesse der SPMS werden bis zum aktuellen Zeitpunkt kontrovers diskutiert. Bisher ist bekannt, dass eine Zytodegeneration der Oligodendrozyten, statt immunvermittelter Entzündungsprozesse, einen wesentlichen Teil der Histopathologie ausmacht [40].

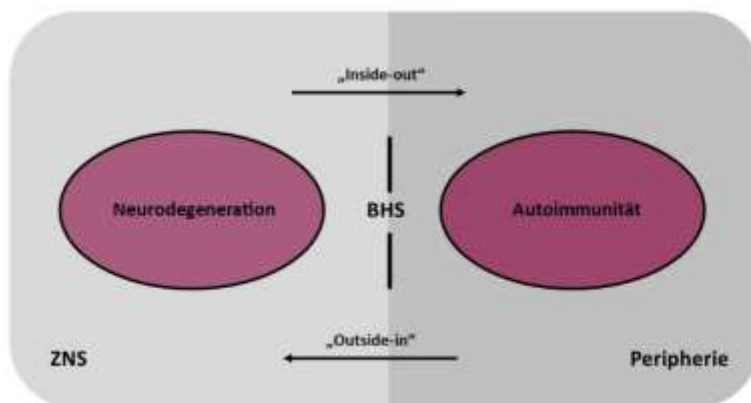


Abbildung 2 Hypothesen zur MS Pathogenese

Darstellung der „Outside-In“-Hypothese: aus der Peripherie (dunkelgrau) in das ZNS (hellgrau), sowie der „Inside-Out“-Hypothese: vom ZNS ausgehend in die Peripherie, die BHS ist als geteilte Linie dargestellt

Zur Pathogenese der MS wurden zwei Hypothesen postuliert. Die sogenannte (sog.) „Outside-In“-Hypothese betrachtet die MS als primär autoimmune, entzündliche Erkrankung. Periphere naive Immunzellen werden zu autoreaktiven Immunzellen aktiviert und migrieren ins ZNS. Dort sezernieren sie autoreaktive Antikörper. Die

autoreaktiven Immunzellen verursachen so eine fokale Inflammation und führen sekundär zur Zytodegeneration [41]. Dem steht die „Inside-Out“-Hypothese gegenüber, die postuliert, dass primär zytodegenerative Prozesse im ZNS ablaufen, welche erst sekundär zur Einwanderung von peripheren Immunzellen in das ZNS führen. Dort verursachen diese dann ebenfalls eine fokale Inflammation, welche zur Entstehung entzündlicher, demyelinisierender Läsionen führt [42–45]. Eine schematische Darstellung der beiden Hypothesen kann Abbildung 2 entnommen werden.

1.4 Therapie und Behandlungsrestriktionen

Die MS kann bis heute nicht kurativ behandelt werden. Eine effiziente Therapie richtet sich nach der Form der MS, dem individuellen Krankheitsverlauf und den Symptomen. Die Therapie der MS kann allgemein in drei Behandlungsansätze unterteilt werden: die Therapie einzelner Symptome, die Therapie des akuten Schubs sowie die verlaufsmodifizierende Langzeittherapie. Alle drei Ansätze werden individuell an die Klinik des Patienten angepasst und in Kombination angewendet. Ein Therapieschema zur Behandlung der MS kann Abbildung 3 am Ende des Abschnitts 1.4.3 entnommen werden. Für ein besseres Verständnis wurden die Behandlungsansätze im genannten Therapieschema den MS-Formen zugeordnet.

1.4.1 Therapie der Symptome

Bei der symptomatischen Behandlung stehen die Verbesserung der Lebensqualität und die Vermeidung von Komplikationen im Vordergrund. Einige der Medikamente werden außerhalb des Indikationsgebietes oder der Personengruppe angewendet, für die sie laut der Arzneimittelbehörde zugelassen sind (engl. „Off-Label-Use“). Das bedeutet, dass Medikamente gegen Symptome der MS wirksam sein können, aber nicht explizit für MS oder MS-Formen zugelassen sind. Als Beispiel ist hier der Einsatz des Antispastikums Baclofen oder des Cannabinoids Sativex bei Spastiken zu nennen [46, 47].

1.4.2 Therapie im akuten Schub

Therapie der Wahl beim akuten Schub ist eine Methylprednisolon-Stoßtherapie [48, 49]. Nach vorherigem Ausschluss eines Infektes wird es hochdosiert über 3-5 Tage intravenös verabreicht. Methylprednisolon ist ein Glukokortikosteroid und wirkt entzündungshemmend, immunsuppressiv und antiödematös. Zu den Kontraindikationen der Glukokortikoidgabe zählen u.a. ein aktives Infektgeschehen, Schwangerschaft oder die Osteoporose. Ist die

Glukokortikosteroid-Stoßtherapie kontraindiziert oder auch nach Eskalation nicht suffizient, kann eine Plasmapherese durchgeführt werden. Zelluläre und flüssige Blutbestandteile werden dabei extrakorporal getrennt. Antikörperhaltiges Plasma, welches auch Autoantikörper enthält, wird anschließend verworfen und durch Humanalbumin ersetzt. Bei 40 % der Patienten, welche eine Plasmapherese erhielten, konnte eine Verbesserung der Schubsymptomatik erreicht werden [9]. Alternativ zur Plasmapherese kann das Verfahren der Immunadsorption angewandt werden. Der Patient erhält dabei sein, im Immunadsorber von Antikörpern gereinigtes, Plasma und die zuvor getrennten zellulären Blutbestandteile zurück. Es wird auf die Zugabe von Humanalbumin verzichtet, was zu einer geringeren Nebenwirkungsrate führt [50].

1.4.3 Verlaufsmodifizierende Therapie

Die verlaufsmodifizierende Therapie hat das Ziel, die Schubrate der RRMS zu reduzieren bzw. das Voranschreiten der progressiven MS zu verlangsamen. Dabei werden unterschiedliche Arzneimittelgruppen eingesetzt. Die Möglichkeiten der RRMS-Behandlung sind dabei reichlich. Einige der für die RRMS zugelassenen Medikamente werden aufgrund eingeschränkter Alternativen auch für die SPMS und PPMS eingesetzt. Wenige Medikamente, wie Ocrelizumab und Siponimod (1.6), sind auch für die SPMS oder PPMS zugelassen. Eine zusammenfassende Übersicht aller folgend aufgeführten Medikamente kann Tabelle 1 entnommen werden.

Eines der ersten Medikamente, welches zur verlaufsmodifizierenden Therapie eingesetzt wurde, ist Betainterferon (IFN β). IFN β oder Typ-I-Interferone sind Zytokine des angeborenen Immunsystems. Aufgrund ihrer immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Wirkung werden sie zur Behandlung der RRMS, SPMS sowie des CIS eingesetzt [51, 52]. IFN β -1a unterscheidet sich von IFN β -1b insofern, dass es glykosyliert vorliegt. Beide werden per Injektion verabreicht [53].

Bei Glatirameracetat handelt es sich um ein synthetisches Polymerisat, welches aus den gleichen Aminosäuren wie das Myelin basische Protein (MBP) im gleichen Verhältnis zusammengesetzt ist: L-Glutamin, L-Lysin, L-Alanin, L-Tyrosin (4,2:1,4:3,4:1). Es dient der Schubratenreduktion bei der RRMS und der Behandlung des CIS [54]. Glatirameracetat zeigt keinen signifikanten Wirksamkeitsunterschied zu IFN β [55]. Subkutan verabreicht bewirkt es eine Verschiebung der T-Helferzellpopulation hin zu protektiven T_H2-Zellen. Der genaue Mechanismus, über den dieser Effekt erzielt wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird diskutiert, dass Glatirameracetat an Antigen-präsentierende Zellen bindet und damit die Verschiebung bewirkt. Glatirameracetat-reaktive T_H2-Zellen werden durch Kreuzreaktion mit MBP reaktiviert und sezernieren dadurch

antientzündliche Zytokine wie Interleukin (IL) 4, 6 und 10. Glatirameracetat-stimulierte T-Zellen sezernieren außerdem den Wachstumsfaktor BDNF (engl. brain-derived neurotrophic factor), welcher neuroprotektiv wirkt [56]. Zu den Nebenwirkungen zählen Reaktionen an der Injektionsstelle sowie Brustschmerz, Palpationen und Dyspnoe [57].

Monoklonale Antikörper werden ebenfalls zur Behandlung der MS eingesetzt. Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen die alpha4-Untereinheit des sehr späten Antigen 4 (engl. very late antigen-4, VLA-4) richtet. VLA-4 ist überwiegend auf T-Zellen und Monozyten exprimiert. Da es für die Zelladhäsion von Bedeutung ist, ist es indirekt an der Transmigration von Lymphozyten durch die BHS beteiligt. Der Einsatz von Natalizumab verhindert somit die Migration von T-Zellen in das ZNS und ist bei der schubförmigen MS wirksam [58, 59]. Das Risiko einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) durch das Polyomavirus JC Virus ist unter Natalizumab-Therapie erhöht. Die progressive multifokale Leukenzephalopathie kann mit Läsionen in der weißen Substanz einhergehen [60].

Alemtuzumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenmolekül Transmembranfaktor 52 (eng. Cluster of Differentiation, CD52). CD52 ist auf fast allen reifen Lymphozyten exprimiert [61]. Durch den Einsatz von Alemtuzumab wird eine komplementvermittelte Lyse der Lymphozyten herbeigeführt. Dieser monoklonale Antikörper wird ebenfalls bei der RRMS eingesetzt. Als Nebenwirkungen können insbesondere Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse auftreten [62].

Als chimärer monoklonaler Antikörper richtet sich Rituximab gegen den Transmembranfaktor 20 (eng. Cluster of Differentiation, CD20), welcher auf B-Zellen, jedoch nicht auf Plasmazellen exprimiert ist. Rituximab ist bei Versagen anderer immunmodulierender Therapien als Off-Label-Medikament bei der PPMS zugelassen [63]. Wegen des hohen Risikos allergischer Reaktionen und der Entwicklung antichimärer Antikörper durch Rituximab, wurde ein humanisierter Antikörper gegen CD20 entwickelt: Ocrelizumab. Ocrelizumab zeigte überwiegend Infusionsreaktionen als Nebenwirkung bei reduzierter Schubrate und reduziertem Progressionsrisiko des neurologischen Funktionsverlustes. Zu Infusionsreaktionen gehören u.a. Fieber, Schüttelfrost und Hypotonie [64]. Ocrelizumab wird bei RRMS, SPMS und PPMS eingesetzt [65–67]. Bei frühem Therapiebeginn und persistierender Therapie mit Ocrelizumab konnte bei PPMS-Patienten ein Vorteil im Vergleich zu anderen Therapieoptionen bezüglich der Krankheitsprogression erreicht werden [68].

Ein weiterer Immunmodulator, der für die Therapie der RRMS sowie des CIS eingesetzt wird, ist Teriflunomid. Es handelt sich um den aktiven Metaboliten von Leflunomid, welcher die DNS-Replikation beim Zellzyklus inhibiert und somit schnelle Zellteilungen verhindert. Teriflunomid ist

bei sich schnell-teilenden Zellen, wie zum Beispiel T-Zellen, wirksam. Das bedingt eine hohe Nebenwirkungsrate, unter anderem Transaminasenerhöhungen, Erbrechen und Haarausfall [69]. Teriflunomid schützt vor progredienten inflammatorischen Prozessen im ZNS durch eine Verminderung von T-Lymphozyten und die dadurch verringerte Menge durch T-Lymphozyten sezernierter Mediatoren. In der Studie „Study of Teriflunomide in Reducing the Frequency of Relapses and Accumulation of Disability in Patients With Multiple Sclerosis (TEMSO)“ konnte gezeigt werden, dass die jährliche Schubrate unter Teriflunomidbehandlung um 31 % verringert werden konnte. Eine dauerhafte Verlangsamung der Progression um 30 % wurde zusätzlich erreicht [70].

Dimethylfumarat, ein Derivat der Fumarsäure, induziert die Expression von T_H2 -Zytokinen wie IL4 und IL5 und inhibiert die Produktion proinflammatorischer Moleküle wie IL12, Interferon gamma (IFN γ) und Chemokinrezeptoren [71]. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. In einer Placebo-kontrollierten Phase 3 Studie mit Dimethylfumarat oder Glatirameracetat bei MS (COMFIRM-Studie) konnte jedoch eine signifikante Schubreduktion bei RRMS Patienten im Vergleich zum Placebo erreicht werden [72]. Es wird aktuell zur Behandlung der RRMS eingesetzt. Zytostatika werden ebenfalls zur Behandlung der MS eingesetzt. Mitoxantron ist ein interkalierendes Zytostatikum. Es wirkt immunsuppressiv und reduziert die Entwicklung autoreaktiver T-Zellen [73]. Außerdem wird die Produktion von Autoantikörpern in B-Zellen von Mitoxantron unterdrückt. In der europäischen Studie „Mitoxantron bei Multipler Sklerose (MIMS)“ wurde Mitoxantron bei PPMS und SPMS getestet und konnte eine signifikante Wirkung bei den Parametern Krankheitsprogression, Schubrate und im MRT sichtbare Läsionen vorweisen [74, 75]. Mitoxantron wird trotz der Wirksamkeit bei aggressiven MS-Formen als Mittel zweiter Wahl eingesetzt [76, 77]. Es weist gastrointestinale Nebenwirkungen, Kardiotoxizität, Teratogenität sowie ein erhöhtes Malignomrisiko auf. Aufgrund der kardiotoxischen Wirkung von Mitoxantron darf eine kumulative Gesamtdosis nicht überschritten werden. Daher wird es nur noch zurückhaltend eingesetzt. Ein anderes Zytostatikum, welches für die RRMS und SPMS eingesetzt wird, ist Cladribin [78]. Als Purinnukleosidanalogen wird es in die DNS eingebaut und führt zur Apoptose der Zelle. Es ist selektiv in Lymphozyten wirksam. Während Mitoxantron alle ein bis drei Monate intravenös appliziert wird, wird Cladribin lediglich für zwei Wochen pro Jahr in Tablettenform verabreicht [79, 80].

Die Modulation von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PR) bietet eine weitere Therapieoption. Sie wird als vielversprechende Option für die SPMS diskutiert. Als Schwerpunkt

dieser Arbeit werden die Grundlagen der S1PR-Modulation im Folgenden unter 1.6 erläutert und dazugehörige Medikamente anschließend aufgeführt.

In den Abschnitten 1.4.2 und 1.4.3 wurde ein breites Spektrum an Therapiemöglichkeiten für die RRMS erörtert. Es ist jedoch bisher kein vergleichbares Therapieangebot für die progressive MS verfügbar. Zumeist wird die progressive MS mit Therapieoptionen der RRMS behandelt und nur durch wenige SPMS-spezifische Medikamente ergänzt. Für die RRMS zugelassene Medikamente haben häufig eine antiinflammatorische Wirkung. Im Fokus der progressiven MS steht jedoch die Neurodegeneration [81]. Das führt zu einer unzureichenden Behandlung der Patienten mit einer progressiven MS und lässt die Nachfrage nach spezifischen SPMS- und PPMS-Medikamenten offen.

Tabelle 1 MS-Medikamente nach Medikamentenklasse

Zytostatika	Zytokine	Monoklonale Antikörper	Andere Immunmodulatoren
• Mitoxantron • Cladribin	• IFNβ	• Natalizumab • Alemtuzumab • Rituximab • Ocrelizumab	• Glatirameracetat • Dimethylfumarat • Teriflunomid

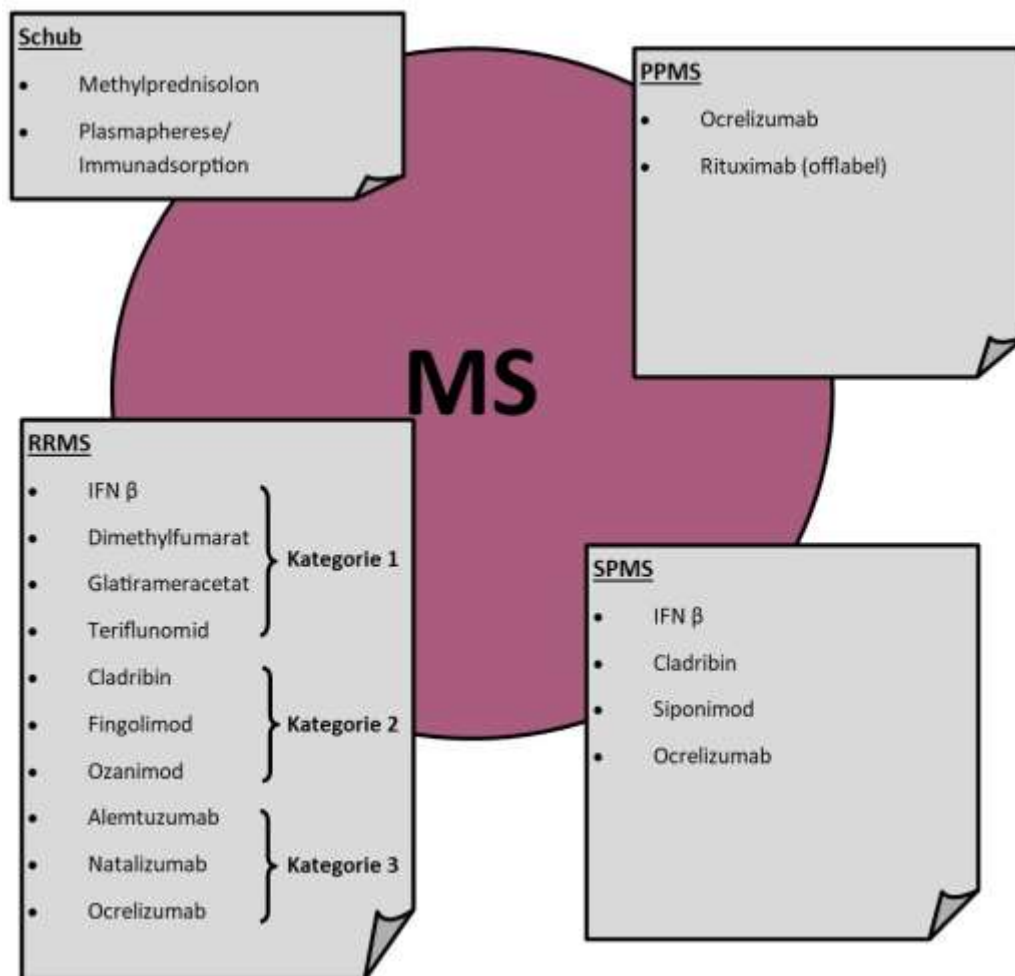


Abbildung 3 Therapieschema der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (MS) nach aktualisierter konsensbasierter(S2k) -Leitlinie Stand März 2022

Die Kategorien 1,2, und 3 beziehen sich dabei auf die Kategorien von Immunmodulatoren die in aufsteigender Reihenfolge mäßig-, stark- oder höchst wirksam sind.

1.5 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren

S1PRs sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche durch Bindung des Liganden Sphingosin-1-Phosphat (S1P) oder durch Autophosphorylierung aktiviert werden [82]. Sie werden ebenfalls durch ligandenunabhängige Phosphorylierung durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Serin/Threonin-Kinase (akt) aktiviert (Abbildung 4). S1PRs werden in fünf Subtypen unterteilt: S1PR1 bis S1PR5 (

Tabelle 2) [83]. S1PR1 und S1PR2 sind ubiquitär auf allen Zellen exprimiert. S1PR1 ist in höherer Konzentration auf Endothelzellen und Lymphozyten vertreten, S1PR2 auf Neuronen und Endothelzellen. S1PR4 ist auf lymphatischen und hämatopoetischen Geweben exprimiert, S1PR5 in der weißen Substanz des ZNS und in der Milz. Im speziellen die Expression von S1PR3 auf

Endothelzellen und Kardiomyozyten kann bei S1PR3-Modulation zu Hypertension, Vasokonstriktion und Bradykardie führen, wie sie bei Fingolimod beobachtet werden konnten (1.6) [84].

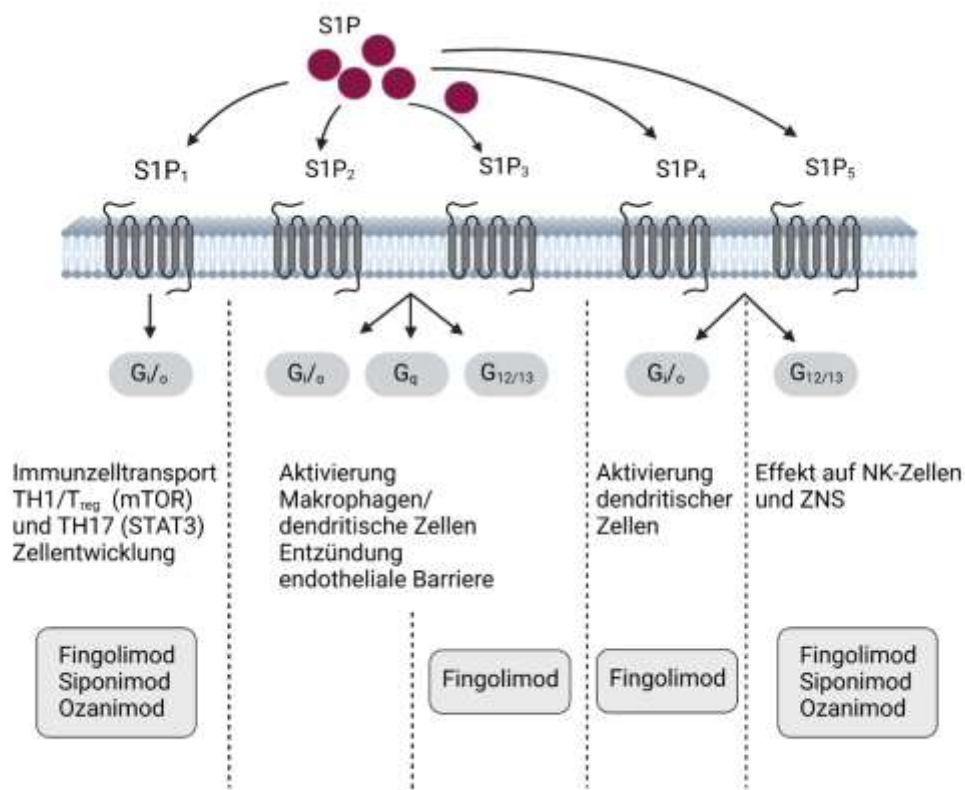


Abbildung 4 Modulation von S1P-Rezeptoren

Darstellung der S1PR1-5 in einer Lipiddoppelmembran. S1P bindet an den jeweils dargestellten Rezeptorsubtyp und löst die dargestellten Reaktionen aus. Unterhalb der spezifischen Reaktionen sind pharmakologische Modulatoren für den jeweiligen Rezeptorsubtyp aufgeführt. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt und ist angelehnt an die Abbildung von Bravo et al. 2022 [85].

Tabelle 2 Übersicht der S1PR Subtypen

Subtyp S1PR	Vorkommen	Ligand
S1PR1	ubiquitär, verstärkt Endothel, Lymphozyten	S1P, Fingolimod, Siponimod, Ozanimod
S1PR2	ubiquitär, verstärkt vaskuläres Endothel, Neurone	S1P, S1PR2 Agonist (CYM5520)
S1PR3	ubiquitär, verstärkt vaskuläres Endothel, Kardiomyozyten	S1P, Fingolimod

S1PR4	lymphatische und hämatopoetische Gewebe	S1P, Fingolimod
S1PR5	weiße Substanz des ZNS (Oligodendrozyten)	S1P, Fingolimod, Siponimod, Ozanimod

Der Phosphorsäureester des Sphingosins agiert als sekundärer Botenstoff und reguliert in Interaktion mit S1PRs viele fundamentale Prozesse im menschlichen Körper. S1P wirkt antiapoptotisch und fördert die Zellproliferation, indem durch vermehrte Bildung von S1P die proapoptotischen Vorläufer Sphingosin und Ceramid deutlich vermindert vorliegen [86]. Es fördert weiterhin die Zellmigration im Sinne einer Chemotaxis. S1PR1 bewirken eine Aktivitätssteigerung der zytoskelettalen Bewegungsfunktion, während S1PR2 innergewebliche Verankerungen, sog. Stressfasern, aktivieren. Dies ist besonders für die Migration von Lymphozyten relevant [87]. Ein proinflammatorischer Effekt ist für S1P ebenfalls bekannt. Die Cyclooxygenase 2 wird durch S1P stimuliert, was zu einer vermehrten Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) führt. Ceramid-1-Phosphat, welches während der S1P-Synthese entsteht, induziert die zytosolische Phospholipase A2, die ebenfalls an der Eicosanoidsynthese beteiligt ist [88]. Beide Vorgänge führen zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Prostaglandine [89]. Die Expression von S1PRs auf Zellen wie Kardiomyozyten, Endothelzellen und Lymphozyten erklärt die Beteiligung an Funktionen wie Puls, Muskeltonus, endothelialer Barrieren, sowie der Funktion des Immunsystems. Die Expression der verschiedenen S1PRs auf unterschiedlichen Geweben und die damit verbundenen Funktionen sind bei der medikamentösen Modulation essenziell und mit Hinblick auf Nebenwirkungen zu beachten.

Die Lokalisation und Funktionsweise der S1PRs konnte bereits für die Medizin genutzt werden. Der Wirkmechanismus von Fingolimod beruht auf der Antagonisierung von S1PR (1.6). Fingolimod bindet, mit Ausnahme von S1PR2, unselektiv an alle S1PRs. Ozanimod ist ein selektiver S1PR1- und S1PR5-Modulator. Beide werden im Folgenden unter 1.6 genauer erörtert.

S1P, der Agonist der S1PRs, ist ein aktives Lysophosphatid und somit ein Sphingolipid. Die Biosynthese des S1P erfolgt aus Sphingomyelin. Mittels Sphingomyelinase entsteht aus Sphingomyelin unter Abspaltung eines Phosphocholinrests Ceramid. Dieses wird dann durch die Ceramidase zu Sphingosin hydrolisiert. Die Sphingosinkinase überträgt unter Verbrauch eines Adenosintriphosphat (ATP)-Moleküls einen Phosphatrest auf die Hydroxygruppe [89].

Der Abbau des S1P erfolgt über mehrere Wege. Der letzte Syntheseschritt kann umgekehrt werden, sodass S1P zu Sphingosin und Phosphat hydrolysiert wird. Die Spaltung von S1P zu 2-Hexadecenal und Phosphoethanolamin wird von der S1P-Lyase katalysiert. Mehrere Phosphatidat-Phosphatasen bauen ebenfalls S1P ab. Diese sind in der Lage Phosphatreste von Phospholipiden abzuspalten (Abbildung 5).

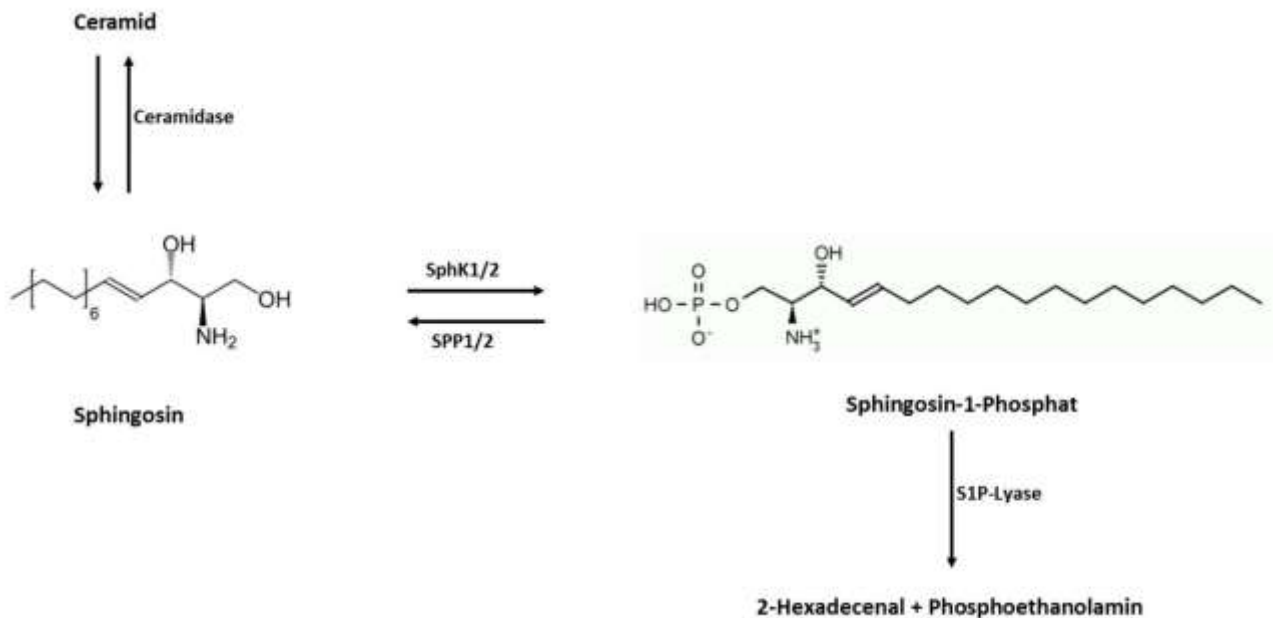


Abbildung 5 Synthese und Abbau von Sphingosin-1-Phosphat

Darstellung der Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Synthese aus Ceramid mittels Sphingosinkinase 1/2 (SphK1/2), sowie Abbau zu Sphingosin mittels Sphingosin-Phosphat-Phosphatase 1/2 (SPP1/2) und anschließend zu Ceramid mittels Ceramidase bzw. Abbau zu 2-Hexadecanal und Phosphoethanolamin mittels Sphingosin-1-Phosphat-Lyase (S1P-Lyase)

1.6 S1PR-Modulation

Mit Fingolimod (FTY720) kam 2011 der erste S1PR-Modulator auf den Markt [90]. Es handelt sich um ein synthetisches Myriocin-Derivat, einem Inhibitor in der Sphingosin-Biosynthese. Myriocin ist ein potenter Immunsuppressor [91]. Fingolimod ist ein Prodrug, also eine chemische Vorstufe des aktiven Medikaments, dessen aktiver Metabolit Fingolimod-Phosphat ist. Es bewirkt als funktioneller Antagonist eine Rezeptorinternalisierung des S1PR. Über den Abbau des S1PR hemmt Fingolimod die Auswanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten ins Blut und verhindert so im Verlauf deren Migration ins ZNS. Die jährliche Schubrate bei RRMS Patienten konnte damit signifikant verringert werden [92]. Die Wirkung ist reversibel und lässt nach Absetzen des Medikaments nach [93]. Es konnte ein „Phänomen der ersten Dosis“, eine unerwünschte Wirkung nach der ersten Applikation, beobachtet werden. In den ersten sechs Stunden der Medikamenteneinnahme treten Bradykardien auf. Auch Blutdruckerhöhungen wurden beobachtet. Die kardialen Nebenwirkungen sind auf die unselektive Bindung von Fingolimod an weitere S1PR zu erklären. Auf Kardiomyozyten wird insbesondere S1PR3 exprimiert.

Ein weiterer S1P-Rezeptormodulator ist Ozanimod. Es wurde 2018 für die Behandlung der RRMS zugelassen. Ozanimod wirkt agonistisch vorwiegend an den Rezeptorsubtypen S1PR1 und S1PR5. Die Zahl der zirkulierenden Lymphozyten wird verringert und damit eine Entzündungshemmung bewirkt [94]. Im Vergleich zu IFN β 1a ist Ozanimod bei RRMS-Patienten signifikant wirksamer [95, 96]. Nebenwirkungen sind hier vor allem (v.a.) eine Lymphopenie und vermehrte Nasopharyngitiden. Beides ist auf die Reduzierung zirkulierender Lymphozyten durch die S1PR-Modulation zurückzuführen [96, 97].

1.7 Siponimod

Bei Siponimod (BAF312), ein 2020 in der Europäischen Union (EU) zugelassenes Medikament, handelt sich um einen selektiven S1PR1- und S1PR5-Modulator der zweiten Generation [98]. Dieses Medikament wird bei der SPMS eingesetzt. Siponimod konnte im Mausmodell antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte vermitteln [99]. Es hat im Vergleich zu Fingolimod ein deutlich geringeres Nebenwirkungsprofil, da die S1PR3 und S1PR4 nicht moduliert werden und es darüber hinaus eine deutlich kürzere Eliminationszeit aufweist [100]. Es handelt sich um ein CYP2C9/3A4-Substrat [101, 102]. Über den gleichen Mechanismus wie Fingolimod bewirkt auch Siponimod eine Reduktion zirkulierender Lymphozyten (Abbildung 6). Innerhalb von 4-6 Stunden sind davon besonders CD4⁺-, naive- und Gedächtnis-T-Zellen, sowie B-Zellen betroffen. Durch die kürzere Eliminationszeit ist dieser Effekt von Siponimod innerhalb einer Woche reversibel [103]. Mechanismen, welche eine Neuroprotektion bewirken, werden diskutiert. Gentile et al. konnten eine signifikante Dämpfung der Astro- und Mikroglia in Gehirnen von Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) finden. Diese Siponimod-vermittelten Effekte verliefen unabhängig von einer peripheren Lymphozytenmodulation [104]. In der doppelverblindeten, randomisierten Phase 3 Studie „Siponimod versus Placebo“ (EXPAND Studie) mit Teilnehmern mit SPMS konnte gezeigt werden, dass das Voranschreiten des neurologischen Funktionsverlustes signifikant verzögert werden konnte. Nach drei Monaten war das Voranschreiten um 31 % verringert, nach sechs Monaten um 37 %. Das jährliche Schubrisiko, der Verlust an Hirnvolumen und die Anzahl an im MRT sichtbaren Läsionen konnten ebenfalls reduziert werden [105]. In einer Phase 2 Studie konnte im Verlauf der Siponimodeinnahme eine niedrigere Krankheitsaktivität bei Patienten mit RRMS erzielt werden [106]. Mögliche Nebenwirkungen sind Bradykardien und Arrhythmien. Vermittelt werden sie nicht durch die Modulation von S1PR3, wie bei Fingolimod, sondern durch eine Aktivierung von G-Protein-

gekoppelten, einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen (GIRK Kanäle) in Vorhofmyozyten, welche einen KaliumEinstrom in die Zelle bewirken [103]. Diese Nebenwirkungen können durch sorgsame Dosistitration vermieden werden [107].

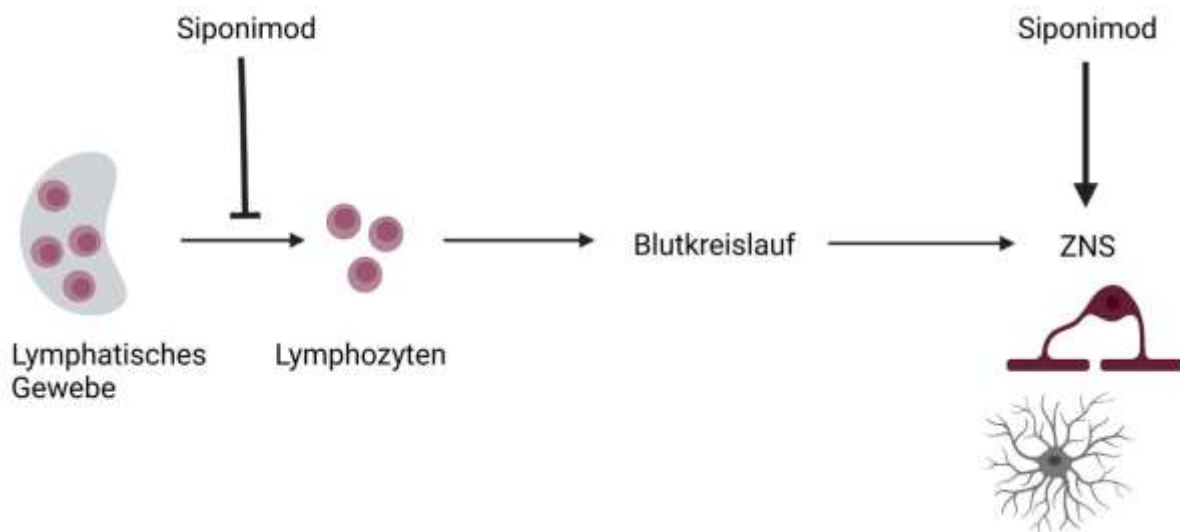


Abbildung 6 Wirkmechanismus von Siponimod

Vereinfachte schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Siponimod an lymphatischem Gewebe sowie im ZNS. Als mögliche Angriffsstellen im ZNS sind hier je ein Astrozyt und ein Oligodendrozyt abgebildet. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Durch unsere Arbeitsgruppe erfolgten bereits Tierversuche mit Wildtyp-Mäusen und Siponimod. In dem toxischen MS-Tiermodell, dem Cuprizone-Modell, wurde dabei die Dosisabhängigkeit von Siponimod untersucht. Die in diesem Versuch induzierten Schäden (Demyelinisierung, Mikrogliose und Axonschäden) wurden protektiv mit Siponimod behandelt. Der Schutz gegenüber diesen Schäden wurde für die Arbeit als Neuroprotektion definiert [108]. Diese Definition wird in dieser Arbeit weiterverwendet. Die Protektion gegenüber einem Oligodendrozytenuntergang ist ebenfalls in dieser Definition inbegriffen.

1.8 Recombination activating gene

In der Forschung kommen verschiedene Tier- und Krankheitsmodelle zum Einsatz, um unterschiedliche Krankheitsaspekte zu untersuchen. Dazu zählen Tiermodelle mit Zellfehlbildungen, wie im Folgenden für die Fehlbildung von reifen Lymphozyten erklärt.

Bei der Bildung von Antikörpern und Lymphozytenrezeptoren kommt ein Schlüsselmechanismus zum Einsatz, die somatische Rekombination oder VDJ-Rekombination (engl. variable, diversifying, joining). Sie ermöglicht die Generierung einer besonders großen Menge an unterschiedlichen Antikörpern und Rezeptoren in Lymphozyten und damit das Erkennen einer Vielzahl verschiedener

Antigene (Abbildung 7). Antikörper bestehen aus einer schweren und einer leichten Kette. Beide weisen eine konstante (engl. constant, C) und eine variable (V) Region auf. Die variable Region wird nochmals in ein V-Gen-Segment und ein D-Gen-Segment unterteilt, welches sich zwischen der C- und V-Region befindet.

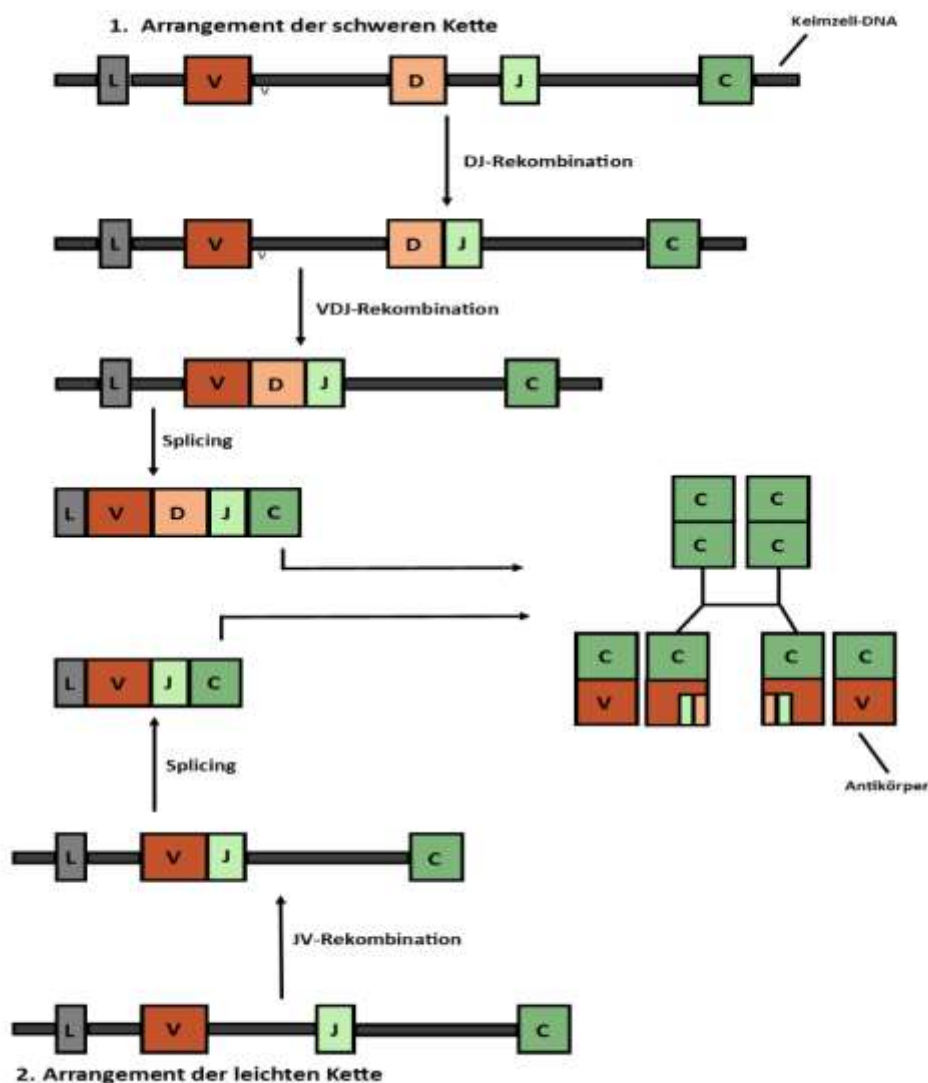


Abbildung 7 Stark vereinfachte Darstellung der V(D)J-Rekombination

Vereinfachte schematische Darstellung der V(D)J-Rekombination, 1. Arrangement der schweren Kette, 2. Arrangement der leichten Kette, leichte und schwere Kette werden zu einem Antikörper zusammengesetzt

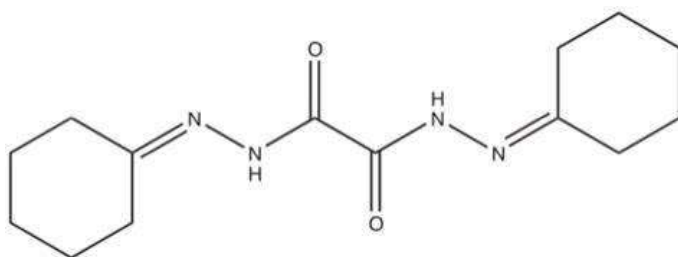
In der schweren Kette existiert zusätzlich noch ein D-Gen-Segment [109]. Während der somatischen Rekombination im Rahmen der Entwicklung eines Lymphozyten kommt es in den Genen sowohl der leichten als auch der schweren Kette zu Umlagerungen auf Ebene der Desoxyribonukleinsäure. Dafür ist der Proteinkomplex „Recombination activating gene“-Komplex verantwortlich, kurz der Rag-Komplex [110]. Beim Menschen wird der Rag-Komplex durch die

Gene *Rag1* und *Rag2* kodiert. Während *Rag1* aus vier Exons besteht, besteht *Rag2* lediglich aus zwei Exons. Auf *Rag1* liegen die katalytischen Domänen, die Bindung an die DNS wird durch *Rag2* vermittelt. Gensegmente der leichten und schweren Kette, die rekombiniert werden können, weisen „Rekombination-Signal-Sequenzen“ (RSS) auf, also die Rekombination induzierende Signalsequenzen. *Rag1* und *Rag2* erkennen diese RSS und binden daran. Es gibt zwei Signalsequenzen, 12-RSS und 23-RSS. Die Unterscheidung erfolgt durch einen entweder 12 Basenpaare-langen oder 23 Basenpaare-langen Abstandshalter in der Signalsequenz. Die 12/23-Regel besagt, dass ein Gensegment mit 12-RSS nur durch ein Gensegment mit 23-RSS verbunden werden kann und umgekehrt. Der 12/23-Regel folgend können zwei Rag-Komplexe zwei Regionen miteinander verbinden. Aufgrund einer spezifischen Verteilung von 12-RSS und 23-RSS unter den V-, D- und J-Gen-Segmenten wird durch die 12/23-Regel eine korrekte Bindung von Gen-Segmenten gewährleistet.

Bei dem Omenn-Syndrom bspw. fehlt der Rag-Proteinkomplex [111]. Ist eine Restaktivität eines der *Rag*-Gene noch vorhanden, kann diese einen Teil der Rekombinationsaktivität aufrechterhalten. Bei völligem *Rag1/2*-Verlust resultiert dies in einer ausgeprägten Immunschwäche, es werden keine reifen B- und T-Zellen produziert [112]. Diese Entwicklungsstörung der B- und T-Zellen nutzt man in der Forschung mit Tiermodellen. Mäuse mit einer *Rag1/2*-Deletion, sog. *Rag1/2*-knockout-Mäuse, werden verwendet, um verschiedene immunologische Erkrankungen zu simulieren [113, 114].

1.9 Das Cuprizone-Modell als Modell für die progressive MS

Bei dem Cuprizone-Maus-Modell handelt es sich um ein zytotoxisches Tiermodell. Erstmals wurde Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon) im Kontext eines Tierversuchs von Carlton et al. 1969 beschrieben [115]. Als Mausmodell wurde es parallel in den 1970er Jahren von Blakemore, Ludwin und Suzuki weiterentwickelt [116]. Bei Cuprizone (Abbildung 8) handelt es sich um einen Kupferchelator. Kupfer ist für einige Metalloproteasen essentiell und wird für einen intakten



Zellstoffwechsel benötigt [117].

Oligodendrozyten sind gegenüber Cuprizoneintoxikation besonders vulnerabel [118], womöglich wegen des hohen oxidativen Metabolismus der

Oligodendrozyten [119]. Der oral verabreichte Kupferchelator induziert eine Oligodendrozytendegeneration, welche folgend zur Demyelinisierung führt [120]. Dies ist

Abbildung 8 Strukturformel von Cuprizone
(Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)

besonders im *Corpus callosum* ausgeprägt, kann aber auch im *Cerebellum*, *Cortex*, *Thalamus* und *Hippocampus* beobachtet werden [121] (Abbildung 9). Durch die Demyelinisierung kommt es zu Axonschäden [122], sowie zu einer Mikrogliose [123] und Astrogliose [124]. Von unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass weiterhin ortsständige Immunzellen und Transmembranfaktor 3⁺-Zellen rekrutiert werden. Das Verhältnis der rekrutierten T-Lymphozyten von CD8⁺ zu CD4⁺ T-Zellen ist dem von MS-Läsionen ähnlich [125]. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob und zu welchem Anteil Immunzellen an der Cuprizone-induzierten Pathologie beteiligt sind.

Das Modell eignet sich gut, um zytodegenerative Prozesse im Sinne einer Demyelinisierung und Axonverlust, wie sie v.a. in progressiven MS Verlaufsformen zu beobachten sind, abzubilden und zu untersuchen. Wenn das Cuprizone-Maus-Model mit anderen Tiermodellen, wie der EAE, kombiniert wird, können Aspekte der RRMS betrachtet werden [126, 127]. Wird im Anschluss an die Cuprizone-Intoxikation wieder normales Haltungsfutter gegeben, können auch Remyelinisierungsprozesse untersucht werden [128]. Dabei werden Oligodendrozytenvorläuferzellen angeregt sich zu reifen Oligodendrozyten zu differenzieren und eine neue Myelinscheide um das demyelinisierte Axon zu bilden. Diese Prozesse können bereits in den ersten 10 Tagen nach Absetzen des Cuprizones beobachtet werden [128].

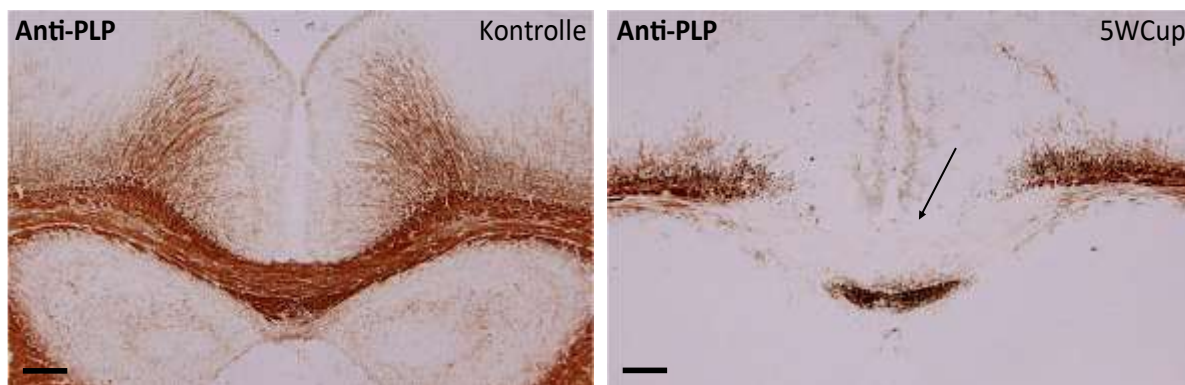


Abbildung 9 Darstellung der Demyelinisierung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation durch eine Markierung mit Anti-Proteolipidprotein (PLP)

links: Grad der Myelinisierung eines Kontrolltiers
rechts: Grad der Demyelinisierung nach fünfwöchiger Gabe von Cuprizone (5WCup), der Pfeil deutet auf das *Corpus callosum* mit nahezu vollständiger Demyelinisierung, Maßstäbe 100 µm.
 Mit freundlicher Genehmigung von Hannes Kaddatz, Institut für Anatomie Rostock.

1.10 Fragestellung

Die Verlaufsmodulation ist ein Grundpfeiler in der Behandlung der MS. Noch immer ist die Verfügbarkeit von verlaufsmodifizierenden Medikamenten für die SPMS unzureichend und basiert häufig auf der Modulation von Lymphozyten. Die Zytodegeneration ist im Vergleich zur

Inflammation erst spät im Verlauf klinisch evident. Es wird dementsprechend angenommen, dass die Zytodegeneration im Verhältnis zur Inflammation in der SPMS zunimmt und überwiegt. Eine reine Modulation der Lymphozyten wäre daher nicht ausreichend. Daher ist ein Verständnis über die Wirkung bisheriger Medikamente und die Erforschung alternativer Ansatzpunkte von Bedeutung.

1.10.1 Die Lymphozyten-unabhängige Wirkung von Siponimod

Dass die Modulation von S1PR auf Lymphozyten für die MS-Therapie genutzt werden kann, wurde bereits mehrfach gezeigt. Siponimod zeigte jedoch auch neuroprotektive Effekte in der progressiven MS. Es ist bisher nicht geklärt über welchen Mechanismus oder über welche Effektorzellen dieser Effekt vermittelt wird. Im Verlauf der progressiven MS stehen weniger die Autoimmunität und mehr die Demyelinisierung, der Untergang von Oligodendrozyten und die axonalen Schädigungen im Vordergrund. Lymphozyten spielen folglich eine wahrscheinlich untergeordnete Rolle. Zellen des ZNS, wie Oligodendrozyten und Astrozyten, exprimieren ebenfalls S1PR. Diese Zellen könnten auch von Siponimod moduliert werden und zur Neuroprotektion beitragen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher folgende Frage beantwortet werden:

Wirkt Siponimod auch in Abwesenheit von reifen Lymphozyten protektiv gegenüber Demyelinisierung, Axonschäden, Mikrogliaaktivierung und Oligodendrozytenuntergang?

In einem Versuch von Behrangi konnte gezeigt werden, dass Siponimod hochsignifikant neuroprotektiv wirkt [108]. In diesem Versuch wurden Wildtyp-Mäuse im Cuprizone-Modell eingesetzt. Durch einen Versuch von Kaddatz ist bekannt, dass auch im Cuprizone-Modell T-Zellen in das Gehirn einwandern [125]. Es ist also nicht klar auszuschließen, ob der neuroprotektive Effekt von Siponimod auf die Modulation von Lymphozyten zurückzuführen ist. Für die Klärung der Fragestellung dieser Arbeit wurden daher die in 2.1 erwähnten *Rag1*^{-/-} Mäuse eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Durchführung

Für die Tierversuche wurden 19-21 g schwere, zehn Wochen alte Mäuse verwendet, die homozygot für die *Rag1^{tm1Mom}* Mutation (C57BL/6J *Rag1*^{-/-}) waren. Diese wurden von Sven G. Meuth von der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden nach den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association's (FELASA)“ in belüfteten Käfigen gehalten, die wöchentlich gewechselt wurden. Bei einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils zwölf Stunden, einer Raumtemperatur von 23°C ± 2°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % ± 10 % wurden die Tiere gehalten.

Eine Genehmigung für die Durchführung des Tierversuches gemäß (gem.) § 8 Tierschutzgesetz lag von den Landesbehörden vor (Regierung Mecklenburg-Vorpommern, Tierversuchsnummer 7221.3-1-001/19). Die Durchführung erfolgte unter Anleitung und Supervision von Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp sowie Dr. rer. biol. hum. Newshan Behrangi.

Jeder Käfig war standardmäßig mit Einstreu, Versteckmöglichkeit, Nestlet, einer Trinkflasche und 140 g des jeweiligen Futters ausgestattet. Das Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde auf zwei getrennte Petrischalen im Käfig aufgeteilt.

Der Tierhygienestatus nach FELASA wurde jährlich anhand von Sentineltieren bestimmt. Zum Versuchszeitpunkt waren die Sentineltiere positiv auf *Helicobacter*, Murines Norovirus und Oxyuren (*Syphacia* spp.).

2.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen unterteilt: eine Kontrollgruppe, eine Siponimod-Behandlungsgruppe und eine Vehikelgruppe. Die Versuchstiere der Behandlungs- und Vehikelgruppe wurden für drei Wochen mit Cuprizone intoxikiert. Gemahlenes Standardfutter (Futtermehl) wurde mit 0,25 % Cuprizone versetzt. Dieses Cuprizone-Futtermehl-Gemisch wurde jeden Tag frisch mit einer handelsüblichen Küchenmaschine (WMF, Kult X) hergestellt. Die Siponimod-Behandlungsgruppe erhielt zusätzlich täglich 3,1 mg/kg Siponimod welches in Carboxymethylcellulose (CMC) gelöst war. Die Vehikelgruppe erhielt zusätzlich täglich ein Placebo, folgend als Vehikellösung bezeichnet. Dabei handelte es sich um CMC. Sowohl die Siponimodlösung als auch die Vehikellösung wurden per Spritze mit einer Knopfkanüle oral appliziert. Über den gesamten Zeitraum des Tierversuches wurde die Kontrollgruppe mit

normalem Haltungsfutter gefüttert und zusammen mit den Tieren der anderen Versuchsgruppen perfundiert. Im Versuchsverlauf wurden alle Tiere wöchentlich gewogen. Es wurde außerdem täglich ein Gesundheitscheck der Versuchstiere durchgeführt. Dabei wurden das Fell, der Hydratationszustand sowie das Verhalten der Mäuse beurteilt. In den Versuch wurde dreizehn versuchstiere eingeschlossen.

2.3 Transkardiale Perfusion und Materialgewinn

Nach der dreiwöchigen Cuprizoneintoxikation wurde eine terminale Narkose eingeleitet. Dafür wurde den Mäusen ein Ketamin/Xylazin-Gemisch (drei Volumenanteile Ketamin (10 %), ein Volumenanteil Xylazin (2 %)) in einer Dosis von 0,1 ml/10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Reflexprüfung erfolgte vom Schwanz aufsteigend bis zum Kornealreflex und durch Aufsprühen von 70 %igem Ethanol auf das Auge. Fiel die Reflexprüfung negativ aus, konnte mit der transkardialen Perfusion fortgefahren werden.

Hierzu wurden Haut und Peritoneum der Maus von kaudal nach kranial eröffnet, das Peritoneum bis zum Diaphragma durchtrennt und anschließend das gesamte Zwerchfell entfernt. Der Brustkorb wurde seitlich abgesetzt, am nun frei zugänglichen Herz ein kleiner Schnitt am rechten Vorhof gesetzt und eine stumpfe Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Über diese wurden manuell zunächst 20 ml Phosphatpuffer (PBS 1x) und anschließend 30 ml Fixierlösung (3,7 % Paraformaldehyd, PFA) zum Fixieren des Gewebes appliziert. Anschließend wurde die Maus an einer Schlauchpumpe (IsmaTec, IPC-4) mit einer Geschwindigkeitseinstellung von 40 (circa 22 ml/min) weitere sieben Minuten mit Fixierlösung perfundiert. Danach wurde der Kopf mit einer scharfen Schere abgetrennt und die Schädelkalotte vorsichtig sagittal eröffnet. Der gesamte Kopf mit eröffneter Kalotte und Hirn wurde über Nacht bei 4°C in frischer Fixierlösung immersionsfixiert. Am Folgetag wurde das Hirn herauspräpariert und in Gewebekassetten überführt.

2.4 Entwässerung, Einbettung und Schnitt

Die Gewebekassetten wurden für mindestens sechs Stunden unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend über Nacht bei 4°C in 50 % Ethanol inkubiert. Die Dehydrierung erfolgte manuell in einer aufsteigenden Alkoholreihe unter konstanter Bewegung (Tabelle 3), endend mit drei Inkubationszyklen in Paraffin bei 60°C. Abschließend wurden die Hirne in flüssigem Paraffin eingebettet.

Tabelle 3 Manuelle Entwässerung und Einbettung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	70 % Ethanol	40 Minuten
2	70 % Ethanol	40 Minuten
3	96 % Ethanol	40 Minuten
4	96 % Ethanol	40 Minuten
5	96 % Ethanol	40 Minuten
6	100 % Ethanol	40 Minuten
7	100 % Ethanol	40 Minuten
8	100 % Ethanol	60 Minuten
9	Xylol 1	40 Minuten
10	Xylol 2	40 Minuten
11	Xylol 3	40 Minuten
12	Paraffin 1	60 Minuten
13	Paraffin 2	60 Minuten
14	Paraffin 3	zwei Tage

Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica, RM 2255) angefertigt. Auf Superfrost Plus Objektträgern wurden zwei Paraffinschnitte direkt aus dem warmen Wasserbad (45-47°C) auf einen Objektträger aufgenommen und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Prinzip einer immunhistochemischen Markierung

Zur Darstellung unterschiedlicher Proteine wurde die immunhistochemische Markierung nach der ABC-Methode angewandt. Dabei handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren von Antigenen, welches über schrittweises Binden zweier Antikörper erfolgt (Abbildung 10). Der Ablauf lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Der Primärantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Antigen im untersuchten Gewebe.
- Der biotinylierte Sekundärantikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und bindet an diesen.
- Aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin bindet der zugesetzte Avidin-Biotin-Enzym-Komplex (ABC-Komplex) an den biotinylierten Sekundärantikörper. Der ABC-Komplex besteht aus Avidin (Reagenz A) und einer an Biotin gekoppelten Meerrettichperoxidase (Reagenz B).
- In Anwesenheit von H_2O_2 katalysiert die Meerrettichperoxidase (HRP) die Umwandlung des phenolischen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substrates in dessen unlösliche Form. Bei dieser Umwandlung entsteht das als bräunlicher Niederschlag ausfallende Präzipitat.

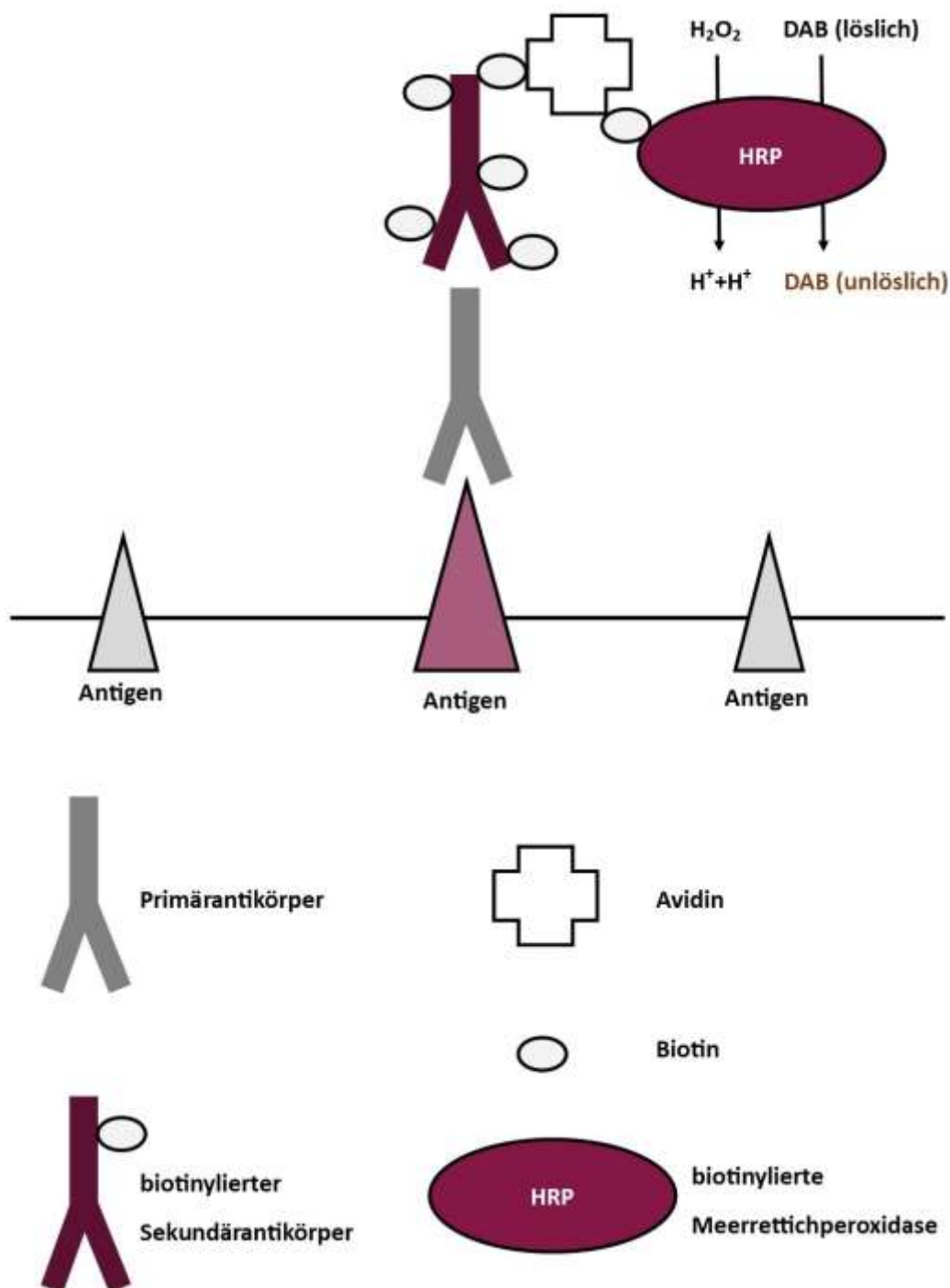


Abbildung 10 Prinzip der immunhistochemischen Markierung nach der ABC Methode

Im Rahmen der immunhistochemischen Markierung kann es zu unspezifischen Bindungen der Antikörper kommen, weil der Sekundärantikörper endogene Igs bindet, Sekundärantikörper durch endogene Fc-Rezeptoren gebunden werden oder aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen Gewebsbestandteilen und Antikörpern. So kann schlussendlich ein unspezifisches Signal entstehen. Um diesem Phänomen vorzubeugen, wird vor dem Auftragen der Primär- und Sekundärantikörper auf die Schnitte das sog. „Blocken“ durchgeführt. Dazu wird 5 % Normalserum

aus der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, appliziert. Die Bindungsstellen an Ig-ähnliche Proteine werden so von Antikörpern aus dem Normalserum maskiert und der Sekundärantikörper kann im weiteren Verlauf nicht mehr daran binden. Somit wird das unspezifische Signal reduziert.

Die endogene Peroxidase ist ein weiterer möglicher Verursacher eines unspezifischen Signals. Dieses gewebstintrinsische Enzym ist in der Lage, die Umwandlung von farblosem DAB-Substrat in das unlösliche braune Präzipitat zu katalysieren und so zu einem unspezifischen Hintergrundsignal zu führen. Um dies zu verhindern, werden die Schnitte in 0,35 % Wasserstoffperoxid in PBS (1x) für 30 Minuten in einer Glasküvette unter minimalem Lichteinfall inkubiert. So wird die endogene Peroxidase gesättigt, die Aktivität des Enzyms reduziert und das unspezifische Hintergrundsignal gesenkt.

Um ein bestmögliches Signal-Rausch-Verhältnis für jeden eingesetzten Primärantikörper zu erhalten, wird dieser in einem zweistufigen Verfahren etabliert. Die Etablierung beginnt in der vom Antikörper-Hersteller empfohlenen Verdünnung und an den empfohlenen Positivkontrollen. In einem ersten Schritt wird getestet, ob eine Demaskierung durch Kochen in Citrat- oder Tris/EDTA-Puffer notwendig ist und welche Option das beste Resultat liefert. Ausgehend von dem Ergebnis des ersten Schrittes der Etablierung wird nun anhand einer Verdünnungsreihe die Verdünnung des Primärantikörpers ermittelt, die wiederum das beste Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Auf diese Weise wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper, mit Ausnahme des anti-PLP und anti-Iba1 Antikörpers, etabliert. Um die Wahrscheinlichkeit eines unspezifischen Signals noch weiter zu senken, wurden Negativkontrollen mitgeführt. Diese wurden nach dem gleichen Vorgehen behandelt mit dem Unterschied, dass kein Primärantikörper appliziert wurde.

2.5.2 Durchführung immunhistochemischer Markierungen

Um ein einheitliches, qualitativ vergleichbares Ergebnis zu erhalten, wurden alle Objektträger einer immunhistochemischen Markierung zur selben Zeit und nach dem gleichen Arbeitsprotokoll bearbeitet.

Zu Beginn erfolgte die Deparaffinierung, beginnend in Xylol, sowie eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 4).

Tabelle 4 Deparaffinierung und Rehydrierung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol 1	zehn Minuten
2	Xylol 2	zehn Minuten
3	Xylol 3	zehn Minuten
4	50 % Xylol / 50 % Ethanol	fünf Minuten
5	100 % Ethanol	drei Minuten
6	100 % Ethanol	drei Minuten
7	96 % Ethanol	drei Minuten
8	96 % Ethanol	drei Minuten
9	70 % Ethanol	drei Minuten
10	50 % Ethanol	drei Minuten
11	Destilliertes Wasser	drei Minuten

Das Einbetten in Paraffin sowie das Fixieren des Gewebes führt zu sog. Maskierungen („crosslinks“). Diese Maskierungen blockieren freie Antigene und verschlechtern das Ergebnis der immunhistochemischen Markierung. Um die Antigene wieder zu demaskieren, wurde nach der Deparaffinierung und Rehydrierung das „HIER“ („heat induced epitope retrieval“) angewandt. Dazu wurden die Schnitte für zehn Minuten in Citrat- oder Tris/EDTA-Puffer in einer handelsüblichen Mikrowelle gekocht. Im Anschluss wurden die Objektträger für 15 Minuten in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter leichtem Schütteln wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in mit PBS (1x) gefüllten Glasküvetten gewaschen. Das Waschen wurde zwischen allen Inkubationsschritten, außer nach dem „Blocken“, wiederholt. Das „Blocken“ wurde anschließend mit 5 % normalem Ziegenerum durchgeführt. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer überführt, das Blockserum auf die Schnitte aufgetragen und so für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für alle auf die Schnitte zu pipettierenden Lösungen wurden circa 100µl Lösung pro Objektträger pipettiert.

Das Blockserum wurde dann von den Schnitten abgekippt und der in 5% normalem Ziegenserum verdünnten Primärantikörper (Tabelle 5) appliziert. Die Negativkontrollen wurden dabei ausgespart. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Tabelle 5 Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Markierungen

Antigen	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Demaskierung
PLP	BioRad	MCA839G	1:5000	Maus	keine
Iba1	Wako	019-19741	1:5000	Kaninchen	Tris/EDTA
APP A4	Millipore	MAB348	1:5000	Maus	Tris/EDTA
OLIG2	Millipore	MABN50	1:100	Maus	Tris/EDTA

Am Folgetag wurden die Schnitte in 0,35%igem H₂O₂ für 30min. bei wenig Lichteinfall und unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde anschließend in 5 % normalem Ziegenserum verdünnt (Tabelle 6) und auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Tabelle 6 Verwendete Sekundärantikörper in immunhistochemischen Markierungen

Antikörper	Firma	Bestellnummer	Verdünnung	Wirt	Kopplung
Anti-Ratte IgG	VECTOR	BA9400	1:200	Ziege	Biotin
Anti-Kaninchen IgG	VECTOR	BA1000	1:200	Ziege	Biotin
Anti-Maus IgG	VECTOR	BA9200	1:200	Ziege	Biotin

Der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex muss mindestens 30 Minuten vor dem Verwenden aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte HRP) angesetzt und mit PBS (1x) auf 1:50 verdünnt werden. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde der DAB-Komplex auf die Objektträger pipettiert und nach zehn Minuten Inkubation für zehn Sekunden in Leitungswasser und anschließend für fünf Minuten in destilliertem Wasser abgewaschen.

Um das Abgrenzen der anatomischen Strukturen im Hirnschnitt zu erleichtern, wurde nach einigen immunhistochemischen Markierungen mit sehr geringem Hintergrundsignal eine Hämatoxylin-

Gegenfärbung (H-Färbung) durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte drei Minuten in destilliertem Wasser gespült und anschließend für 15 Sekunden in die Hämatoxylin-Lösung gestellt. Anschließend wurden die Objektträger für circa drei Sekunden in HCl-Alkohol getaucht und letztlich in einer Glasküvette für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nachfolgend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 7) dehydriert und mit dem Eindeckmedium Depex unter einem Deckglas eingedeckt. Alle Schritte der IHC können zusammengefasst der Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 7 Dehydrierung

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Destilliertes Wasser	drei Minuten
2	50 % Ethanol	drei Minuten
3	70 % Ethanol	drei Minuten
4	96 % Ethanol	drei Minuten
5	96 % Ethanol	drei Minuten
6	100 % Ethanol	drei Minuten
7	100 % Ethanol	drei Minuten
8	50 % Xylol / 50 % Ethanol	fünf Minuten
9	Xylol 1	zehn Minuten
10	Xylol 2	zehn Minuten
11	Xylol 3	zehn Minuten

Tabelle 8 Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung (17.1 und 17.2 fakultative Arbeitsschritte)

Fakultative Arbeitsschritte	
Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (gem. Tabelle 3)
2	Demaskierung („HIER“): zehnminütiges Kochen der Schnitte in Citrat- oder Tris/EDTA-Puffer
3	Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in einem Wasserbad
4	drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln

5	„Blocken“ mit 5 % Normalserum für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
6	Normalserum abkippen
7	Primärantikörper applizieren und über Nacht bei 4°C inkubieren
8	drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
9	Inkubation für 30 Minuten in 0,35 % H ₂ O ₂ unter leichtem Schütteln im Dunkeln
10	drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
11	Sekundärantikörper applizieren und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
12	drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
13	Applikation des Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
14	drei Mal fünfminütiges Spülen in PBS (1x) unter leichtem Schütteln
15	Applikation des DAB-Komplexes zur Visualisierung für zehn Minuten unter einem Abzug
16	Zehn Sekunden spülen in Leitungswasser
17	Fünf Minuten in destilliertem Wasser spülen
17.1	Je nach Hintergrundsignal: H-Färbung, 15 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung und anschließend fünf Sekunden in HCl-Alkohol eintauchen
17.2	Zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser inkubieren (bläuen)
18	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (gem. Tabelle 6)
19	Eindecken der Objektträger mit Depex und Deckgläsern unter dem Abzug
20	Trocknen der eingebetteten Schnitte unter dem Abzug

2.6 Histologische Färbungen

2.6.1 Prinzip der Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Luxol-Fast-Blue (LFB), ein Kupferphthalocyanine, wird verwendet um den Myelinisierungsgrad im ZNS darzustellen. Das Myelin im peripheren Nervensystem wird von LFB hingegen nicht angefärbt. LFB ist in Alkohol löslich und bindet an die Lipoproteine des Myelins. Als Ergebnis erscheinen

Myelin blau, Neuropil pink und Nervenzellen violett. Das Färbeprinzip beruht darauf, dass die Aminogruppen von LFB in sauren (Ethanol)Lösungen an die Ketogruppen des Gewebes binden und sich zu großen, schwer löslichen Polymerisationsaggregaten zusammenlagern. Lithiumcarbonat findet hier als Differenzierungsmittel Verwendung und der aufgelöste Farbstoff wird schließlich von 70-80 %igem Ethanol ausgewaschen.

Die LFB Färbung kann mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) kombiniert werden, da LFB die weiße Substanz und PAS die graue Substanz anfärbt.

Bei der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) werden kohlenhydrathaltige Komponenten (Glykogen, Glykoproteine) nachgewiesen. So können Strukturen wie Bindegewebe und Basalmembranen dargestellt werden. Während der PAS werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide durch Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Sie bilden daraufhin mit dem schwefelsauren Fuchsin aus dem Schiff-Reagenz rot-violette Komplexe. Anschließend kann eine kontrastreiche Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt werden.

2.6.2 Durchführung der Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Alle Schnitte wurden zur selben Zeit und nach demselben Protokoll gefärbt. Vor Beginn der LFB/PAS-Reaktion wurden die Schnitte (gem. Tabelle 4) deparaffiniert und bis zu einer 96%igen EthanolLösung rehydriert. Da LFB in Ethanol gelöst ist, mussten die Schnitte nicht vollständig rehydriert werden. Sie wurden nun über Nacht in einem mit Paraffin und Aluminiumfolie abgedeckten Container bei 63°C in der LFB Lösung inkubiert. Der zweite Färbetag begann mit der Vorbereitung einer 0,5 %igen PerjodsäureLösung und einer 0,05 %igen Lithiumcarbonatlösung. Die Lithiumcarbonatlösung wurde für den späteren Differenzierungsschritt in einer 1:5 und 1:10 Verdünnung angesetzt. Mit einer 1:5 Verdünnung kann der gewünschte Farbton schneller erreicht werden. Anschließend konnte sich mit der schwächeren 1:10 Verdünnung in kleineren Schritten an die gewünschte Intensität herangetastet werden. Nach der Inkubation in der LFB-Lösung wurden die Schnitte in Aqua dest. gestellt, um anschließend in Lithiumcarbonatlösung differenziert zu werden und die gewünschte Farbintensität zu erhalten. Dafür wurden die Schnitte für circa zehn Sekunden in die verschieden verdünnten Lithiumcarbonatlösungen getaucht, anschließend für zehn Minuten in 70 %igen Ethanol gestellt und dann in Aqua dest. transferiert. Nach Erreichen der richtigen Farbintensität (offensichtlicher Kontrast zwischen Myelin und restlichem Gewebe) wurden die Schnitte für zwei Minuten in eine 0,5%ige PerjodsäureLösung gehalten und nach einem Zwischenschritt in Aqua dest. für 45 Sekunden in das Schiff-Reagenz

gehalten. Folgend wurden die Schnitte für fünf Minuten unter fließendes Wasser gehalten und wieder in Aqua dest. überführt. Die Schnitte wurden nun mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend gem. Tabelle 7 dehydriert beginnend mit einer 80%igen EthanolLösung und mit Depex eingedeckt. Die Arbeitsschritte können Tabelle 9 zusammengefasst entnommen werden.

Tabelle 9 Arbeitsprotokoll der histochemischen Färbung mit LFB/PAS

Schritt	Ablauf
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe bis 96% Ethanol (gem. Tabelle 3)
2	Transfer der Schnitte in die LFB Lösung, Inkubation bei 63°C über Nacht
3	Vorbereiten des Lithiumcarbonats und der Perjodsäure, Lithiumcarbonatlösung 1:5 und 1:10 vorbereiten
4	Transfer der Schnitte in Aqua dest.
5	Schnitte für zehn Sekunden in 1:5 Lithiumcarbonatlösung eintauchen, anschließend für zehn Minuten in 70 % Ethanol, Transfer in Aqua dest.
6	Überprüfen der Intensität der blauen Farbe, ggf. letzten Schritt wiederholen
7	Schnitte für 10 Sekunden in Lithiumcarbonatlösung 1:10 eintauchen, anschließend zehn Minuten in 70 % Ethanol, Transfer in Aqua dest.
8	Letzten Schritt bis zur gewünschten Farbintensität wiederholen
9	Transfer der Schnitte in 0,5%ige Perjodsäurelösung für zwei Minuten, danach in Aqua dest.
10	Transfer der Schnitte in Schiff-Reagenz für 45 Sekunden, danach für fünf Minuten unter fließend Wasser halten, anschließend in Aqua dest.
11	Schnitte für 15 Sekunden in Hämatoxylin halten, dann für 2 Sekunden in HCl-Ethanol, dann 5min unter fließendes Wasser halten, anschließend in Aqua dest.
18	Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe ab Ethanol 80% (gem. Tabelle 6)
19	Eindecken der Objektträger mit Depex und Deckgläsern unter dem Abzug, dann Trocknen

Prinzip der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Sukzedanfärbung und besteht aus einer basophilen Färbung durch Hämatoxylin und einer azidophilen Färbung durch Eosin. Die Färbung beruht auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption. Hämatoxylin ist eine Farbvorstufe, die durch Oxidation zu Hämatein umgewandelt wird. Hämatein bildet mit Aluminiumionen den positiv geladenen Farbstoff Hämalaun. Dieser färbt aufgrund seiner basischen Eigenschaften v.a. negativ geladene Zellbestandteile, wie Nukleinsäuren und raues Endoplasmatisches Retikulum, indem er sich an deren negativ geladene Phosphatgruppen anlagert. Durch den hohen Gehalt an Desoxyribonukleinsäure im Zellkern wird dieser angefärbt. Da Hämalaun in saurer Lösung vorliegt werden negativ geladene Carboxylgruppen im Cytoplasma abgesättigt und es kommt zu einer nahezu selektiven Kernfärbung. Nach kurzem Eintauchen in Chlorwasserstoffsäure-Ethanol (HCl-Ethanol) folgen 15 Minuten Spülen unter fließendem Leitungswasser. Die pH-Wert-Steigerung durch den Wechsel von saurer Lösung zu neutralem Leitungswasser bewirkt ein „Bläuen“ und eine Stabilisierung des Farbstoffes.

Eosin färbt positiv geladene Proteine des Zytoplasmas und der extrazellulären Matrix (eosinophile Strukturen) rot. Die saure Lösung des EosinG bewirkt eine Positivierung des Zytoplasmas und fördert das Anlagern von EosinG. Da die folgende Ethanolreihe Eosin entzieht, wurden die Schnitte leicht überfärbt. Im Ergebnis sind Zellkerne, Kalk, Bakterien und Knorpelgrundsubstanz blau und Zytoplasma, Kollagenfasern sowie Erythrozyten rot gefärbt.

2.6.3 Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Alle Schnitte wurden zur selben Zeit und nach demselben Protokoll gefärbt. Zu Beginn des Protokolls (Tabelle 10) erfolgte die Deparaffinierung, beginnend in Xylol, sowie eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 4). Als nächstes wurden die Schnitte für zehn Minuten in Mayers Hämalaun Lösung gestellt und danach kurz in Chlorwasserstoffsäure-Ethanol getaucht, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und in Aqua dest. überführt. Folgend wurden die Schnitte für eine Minute in die Eosin Lösung gehalten, um dann kurz in Aqua dest. getaucht zu werden. In 70 %igem Ethanol wurden die Schnitte bis zur gewünschten Farbintensität differenziert und dann in einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe dehydriert. Als letztes erfolgte das Eindecken mit Depex und Deckgläsern.

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (gem. Tabelle 3)	Circa eine Stunde
2	Mayers Hämalalaun Lösung	zehn Minuten
3	HCl-Ethanol	kurz eintauchen
4	Leitungswasser (fließend)	zehn Minuten
5	Aqua dest.	Minuten
6	Eosin Lösung	eine Minuten
7	Aqua dest.	0,5 Minuten
8	Ethanol 70 %	bis zur gewünschten Intensität
9	Ethanol 80 %	kurz eintauchen
10	Ethanol 90 %	kurz eintauchen
11	Ethanol 96 %	kurz eintauchen
12	Ethanol 100 %	1-2 Minuten
13	Ethanol 100 %	1-2 Minuten
14	Ethanol 100 %/Xylol 1:1	fünf Minuten
15	Xylol I	zehn Minuten
16	Xylol II	zehn Minuten
17	Eindecken der Objektträger mit Depex und Deckgläsern unter dem Abzug	/
18	Trocknen der eingebetteten Schnitte unter dem Abzug	über Nacht

Auswertung

2.6.4 Untersuchte Hirnareale

Um die verschiedenen Anteile des *Corpus callosum* selektiv beurteilen zu können, wurden verschiedene ROIs („regions of interest“) definiert. Von dem höchsten Punkt des Cingulums wurde ein Lot gefällt, welches das CC in eine mediale (mCC) und eine laterale Region (ICC) unterteilt (Abbildung 11). Es wurde die Hirnregion 265 untersucht. Die Hirnregion 265 ist, nach dem Allen mouse brain Atlas [129], okzipital auf Höhe des dorsalen *Hippocampus* lokalisiert. Primär von Interesse bei Hirnregion 265 war das mCC.

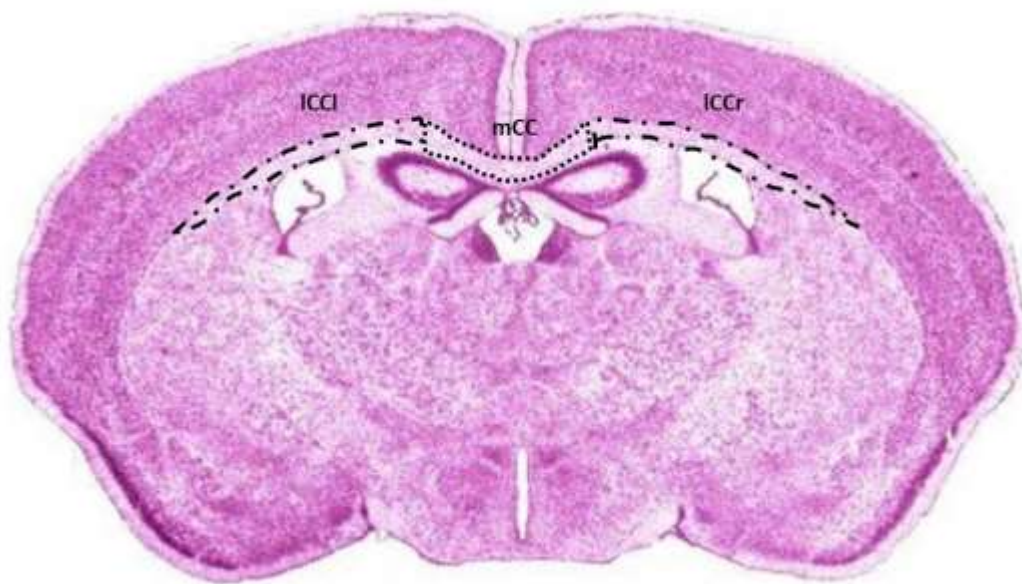


Abbildung 11 Regions of interest (ROIs) in Region 265

ICCl = laterales *Corpus callosum* links

ICCr = laterales *Corpus callosum* rechts

mCC = mediales *Corpus callosum*

Quelle: modifiziert nach Sidman, R., J. Angevine, and E. Pierce, 1971

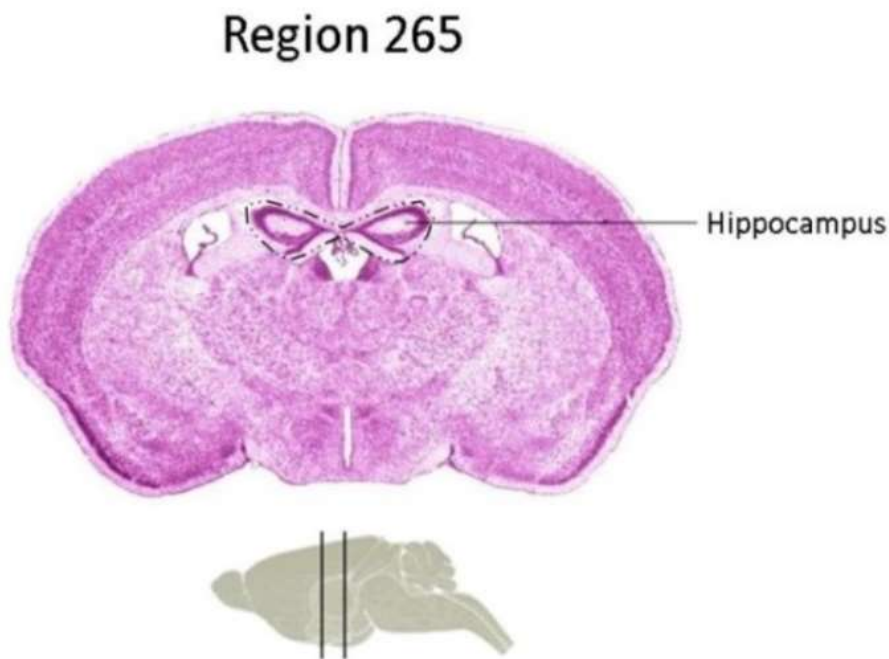


Abbildung 12 Einordnung der Region 265

Region 265 liegt auf Höhe des rostralen Endes des *Hippocampus*, Quelle: modifiziert nach Sidman, R., J. Angevine, and E. Pierce, 1971

2.6.5 Quantifizierung der Zelldichten

Nach der (immun)histochemischen Färbung wurden von jedem Hirnschnitt Bilder an einem manuellen Scanning-Mikroskop aufgenommen (Mikroskop: Nikon Eclipse E200, Kamera: Basler acA1920-40uc). Anhand eines Bildes wurden die Bildeinstellungen optimiert und für alle weiteren Bilder beibehalten, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Hierzu wurde die ROI des jeweiligen Gewebeschnittes am Mikroskop in mehreren Teilen gescannt und mit der Software „Manual-WS-Imaging 2019“ (Version 2019b) von Microvisioneedigital ein zusammenhängendes Bild erstellt. Das Zählen der spezifisch markierten Zellen wurde mit der Software „ViewPoint Light“ (Version 1.0.0.9628) von PreciPoint durchgeführt. Die jeweiligen Bilder wurden verblindet importiert, die ROI manuell umrandet und unter Zuhilfenahme eines Markierungs-Tools wurden die spezifisch markierten Zellen innerhalb der ROI gezählt. Anschließend konnten die Zellzahl und die Fläche der ROI exportiert und eine Zelldichte pro mm² errechnet werden. Beide Hirnschnitte eines Tieres auf dem Objektträger wurden auf diese Weise verblindet quantifiziert. Nach Auflösung der

Verblindung wurde aus den Zelldichten beider Hirnschnitte eines Tieres der Mittelwert gebildet. Die Bildung dieses Mittelwertes erfolgte für jedes Tier der Versuchsgruppen. Letztlich wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen errechnet und untereinander verglichen. Alle Mittelwerte einer Versuchsgruppe wurden dafür addiert und durch die Summer der Anzahl aller Werte dividiert.

2.6.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism (Version 8.0.2) durchgeführt. Aufgrund der kleinen Versuchsgruppengröße wurde von nicht normalverteilten Werten ausgegangen. Die Auswertung erfolgte daher mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Test. Alle Daten werden als Median + Interquartilabstand (engl. interquartile range, IQR) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als Sterne gekennzeichnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

2.6.7 Scoring der Myelindichte

Nach der histochemischen Aufbereitung wurde jeder Hirnschnitt manuell verblindet, unter dem Mikroskop systematisch begutachtet und anhand einer Fotoübersicht einem von vier Punktzahlen (engl. Score) zugeordnet. Im Fokus standen hierbei das CC und der laterale *Thalamus*. Je höher der Wert des Scores, desto geringer der Grad der Demyelinisierung. Score 1 entspricht einem hohen Grad an Demyelinisierung, während Score 4 keinen bis einen geringen Grad an Demyelinisierung aufweist. Beide Hirnschnitte eines Tieres auf dem Objektträger wurden auf diese Weise verblindet quantifiziert. Nach Auflösung der Verblindung wurde aus den Scores beider Hirnschnitte eines Tieres der Mittelwert gebildet. Letztlich wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen, wie in 2.6.5 beschrieben, errechnet und untereinander verglichen.

2.6.8 Quantifizierung der optischen Dichte

Wenn das Zählen einzelner Partikel oder Zellen nicht möglich war, wurde mittels Densitometrie die optische Dichte ermittelt. Dies betraf die immunhistochemischen Markierungen mit anti-PLP und anti-IBA1. Wie in 2.6.5 beschrieben, wurden Aufnahmen von den Schnitten angefertigt. Mit der Software „Image J“ (Version 1.52a für Windows) wurde dann die optische Dichte bestimmt. Die Aufnahmen wurden verblindet, in Image J importiert und für jede Aufnahme wurde die ROI manuell mit der Funktion „Polygon Auswahl“ festgelegt. Jedes Bild wurde anschließend in ein „8-Bit-Graustufenbild“ umgewandelt. Um eine einheitliche Auswertung der Bilder zu ermöglichen,

wurde ein sog. „Threshold“ ausgewählt. Dieser ordnet jeden Pixel entweder weiß oder schwarz zu, wodurch ein binärer Bildtyp entsteht. Der Threshold wurde so gewählt, dass er der ursprünglichen immunhistochemischen Markierung am nächsten kam. Daher erfolgte die Auswertung der anti-PLP-Markierung mit dem Threshold „mean“ und die der anti-IBA1-Markierung mit dem Threshold „max entropy“. Mit der Funktion „Area fraction“ wurde anschließend das prozentuale Verhältnis von schwarzen zu weißen Pixeln berechnet und in „[%] Area“ angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Lymphozyten-unabhängige Wirkung von Siponimod

3.1.1 Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber Demyelinisierung

Der Myelingegehalt der Gehirnschnitte wurde mittels einer histochemischen LFB-PAS-Färbung sowie einer immunhistochemischen anti-PLP-Markierung überprüft.

In der LFB-PAS-Färbung zeigte die Kontrollgruppe im CC eine homogene und kräftige Blaufärbung des Myelins. Da keine bis wenig Demyelinisierung erkennbar war, wurde im Mittel ein LFB-Score von 3,41 ($\pm 0,52$) vergeben. Das CC der mit Cuprizone intoxikierten Vehikelgruppe zeigte in Region 265 ein inhomogenes, weniger kräftiges Färbemuster. Die Demyelinisierung zeichnete sich verstärkt im mCC ab. Daher wurde im Mittel ein LFB-Score von 2,10 ($\pm 1,14$) vergeben. Die Siponimod-Behandlungsgruppe zeigte im CC ein ähnliches histologisches Erscheinungsbild wie die Kontrollgruppe. Es gab Anzeichen leichter Myelinauflockerungen, weshalb im Mittel ein LFB-Score von 3,25 ($\pm 0,5$) vergeben wurde (Abbildung 13) und (Abbildung 14).

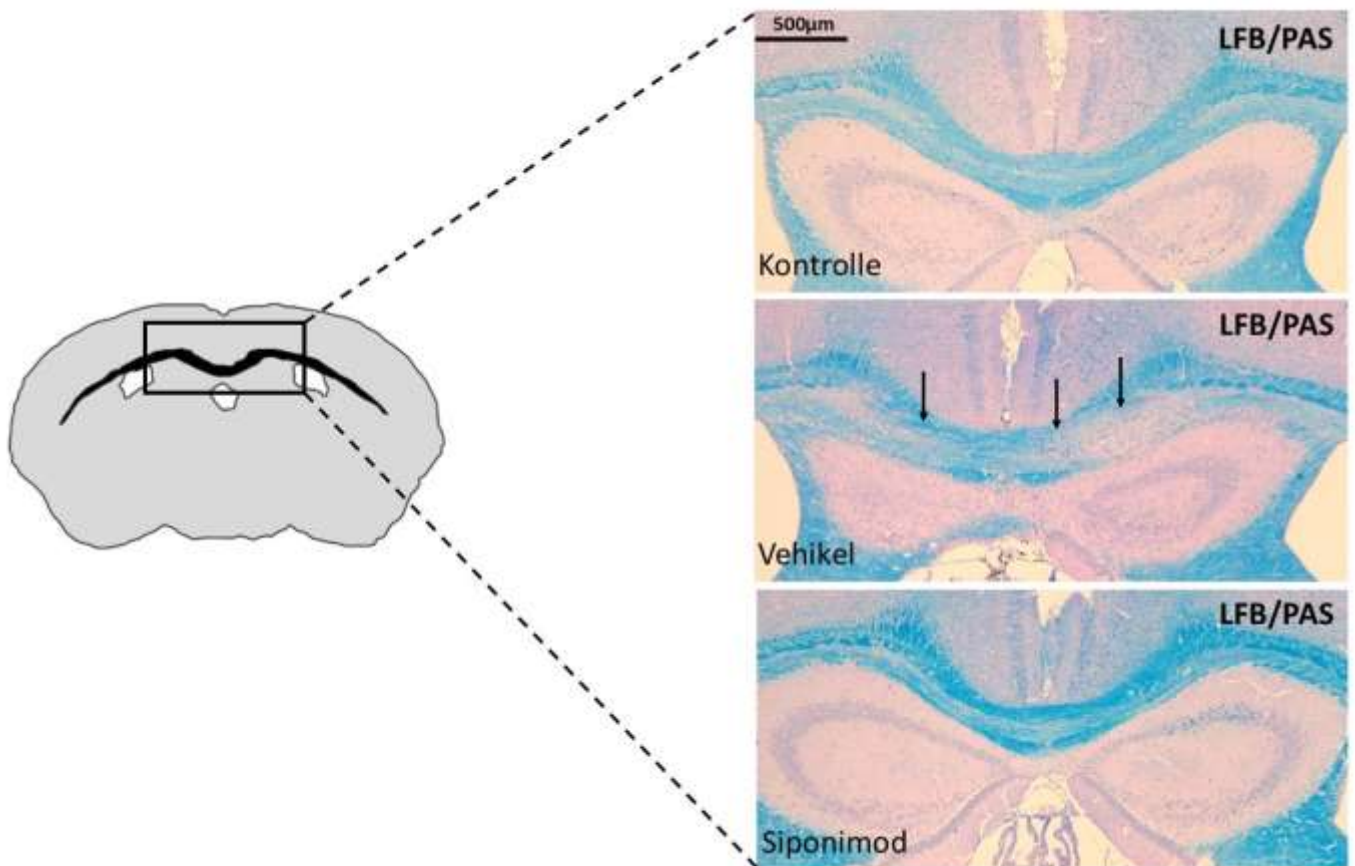


Abbildung 13 LFB/PAS Färbung an Hirnschnitten aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch

Dargestellt sind Hirnschnitte von Mäusen aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch, jeweils aus der Kontroll-, Vehikel- und Siponimod-Behandlungsgruppe. Die Hirnschnitte stammen aus Region 265. Die Pfeile markieren gut sichtbare, fokale Demyelinisierungen.

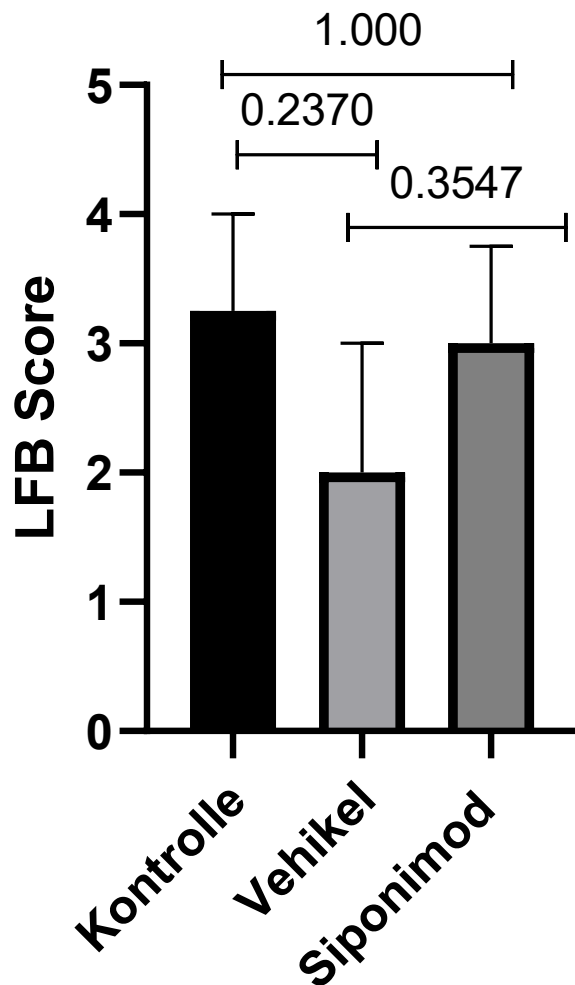


Abbildung 14 Graphische Darstellung der LFB-Scores

Die densitometrische Dichte der anti-PLP-Markierung ist abhängig von der noch vorhandenen Menge an Myelin. Mit zunehmendem Grad der Demyelinisierung nehmen die Signalstärke der anti-PLP-Markierung und damit auch die optische Dichte ab. Wenn *Rag1*^{-/-}-knockout-Mäuse mit Siponimod behandelt werden, sollte die densitometrische Dichte der anti-PLP-Markierung, laut meiner Hypothese, mit der von Kontrolltieren vergleichbar sein.

Dies zeigt sich in Abbildung 16. Die Kontrollgruppe wies ein kräftiges, homogenes Markierungsmuster auf. Die Siponimod-Behandlungsgruppe wies ein ähnlich homogenes Markierungsmuster auf. Die Kontrolltiere wiesen mit 92,37 % ($\pm 5,01$) die höchste optische Dichte auf, gefolgt von der Siponimod-Behandlungsgruppe mit einer optischen Dichte von 89,44 % ($\pm 5,45$). Die Vehikelgruppe zeigte die geringste optische Dichte mit einem Wert von 88,49 % ($\pm 5,91$) (Abbildung 15). Das zeigte sich auch in dem inhomogenen weniger kräftigen Markierungsmuster des CC.

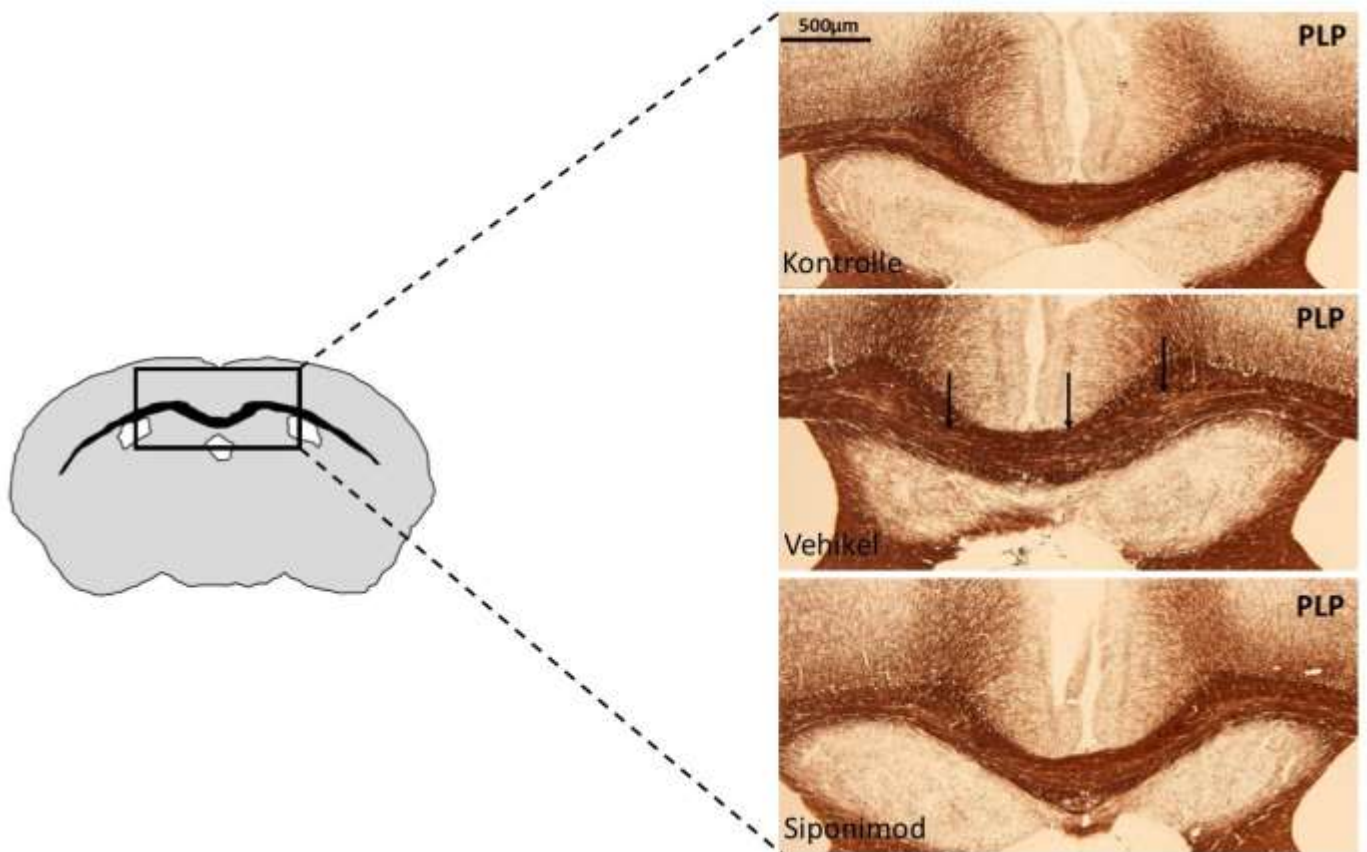


Abbildung 15 Immunhistochemische Markierung mit PLP an Hirnschnitten aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch

Dargestellt sind Hirnschnitte von Mäusen aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch, jeweils aus der Kontroll-, Vehikel- und Siponimod-Behandlungsgruppe. Die Hirnschnitte stammen aus Region 265. Die Pfeile markieren fokale Demyelinisierungen im CC.

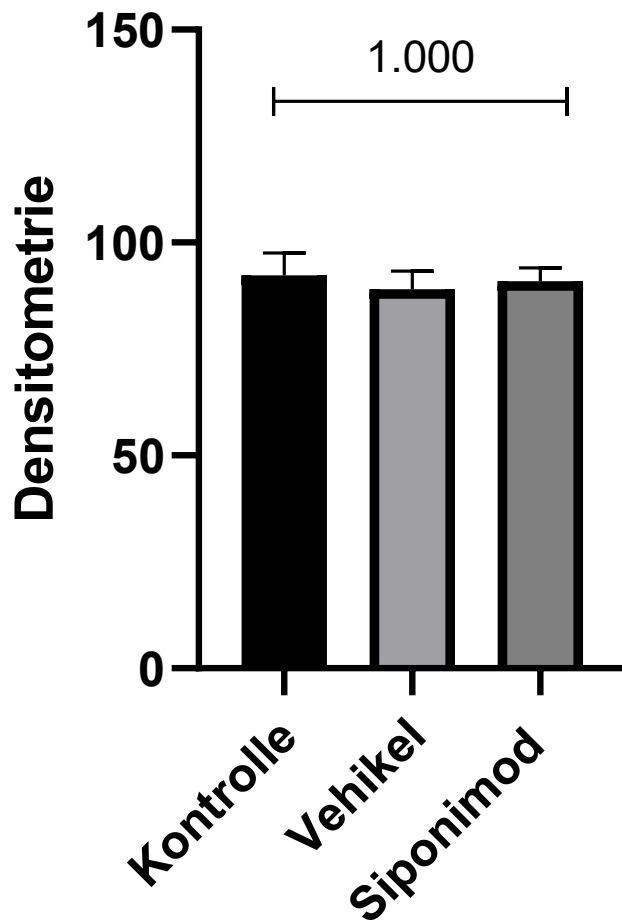


Abbildung 16 Graphische Darstellung der optischen Dichte der anti-PLP-Markierung

Der Myelingeht der Kontrollgruppe war sowohl in der LFB-PAS-Färbung als auch in der anti-PLP-Markierung am höchsten. Der LFB-Score der Vehikelgruppe unterschied sich mit 2,10 deutlich, wohingegen sich die PLP-Dichte der Vehikelgruppe mit 88,49 % ($\pm 5,91$) nur wenig von der Kontrollgruppe unterschied.

3.1.2 Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber Mikrogliose

Bisher wurde die Protektion durch Siponimod gegenüber einer Demyelinisierung untersucht. Eine Aktivierung von Mikrogliazellen wäre im Rahmen einer Cuprizone-Intoxikation zusätzlich zu erwarten. Das Ausmaß der Mikrogliose wurde mittels einer immunhistochemischen anti-IBA1-Markierung untersucht. In Hirnschnitten von fünf Wochen mit Cuprizone intoxikierten Mäusen konnte ein hoher Grad an aktivierten Mikrogliazellen nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 17). Meiner Hypothese folgend, sollte der Grad der Mikrogliaaktivierung in mit Siponimod

behandelten Mäusen geringer sein. Die optische Dichte der anti-IBA1-Markierung der Siponimod-Behandlungsgruppe lag bei 21,69 % ($\pm 9,77$) und war am ehesten mit der Kontrollgruppe, welche eine optische Dichte von 14,81 % ($\pm 1,17$) zeigte, vergleichbar. Das Markierungsmuster dieser beiden Gruppen war schwach ausgeprägt. Die Vehikelgruppe wies eine optische Dichte von 46,00 % ($\pm 12,63$) auf. Dazu war ein kräftiges ausgeprägtes Markierungsmuster im CC erkennbar. Es konnte durch diese Werte bestätigt werden, dass die Mikrogliaaktivierung in Abwesenheit von reifen Lymphozyten unter Siponimodbehandlung verringert werden konnte (Abbildung 18 und Abbildung 19). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der Kontroll- und der Vehikelgruppe.

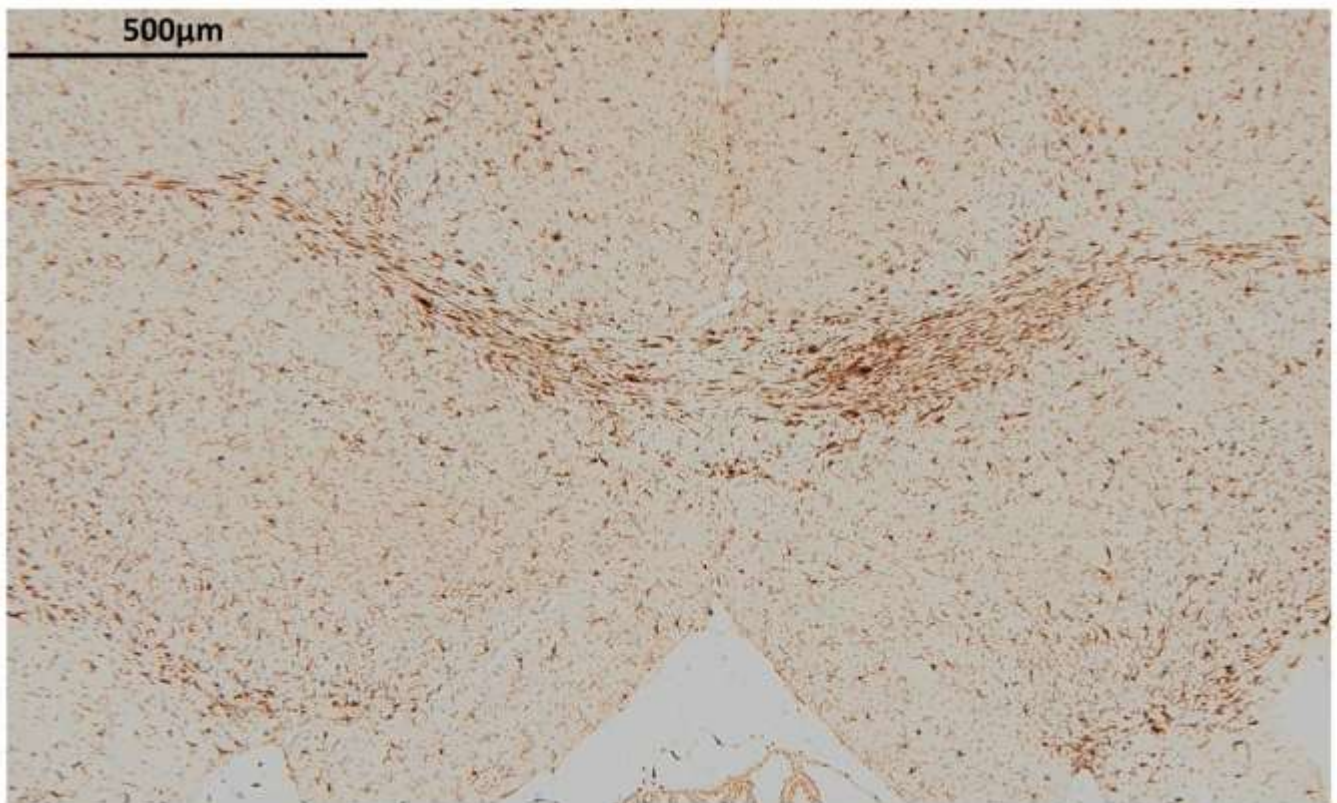


Abbildung 17 Anti-IBA1 Markierung an Hirnschnitten von C57BL/6J –Mäusen

Es handelt sich um einen Hirnschnitt einer mit Cuprizone behandelten Wildtyp-Maus, Region 265, Maßstab 500 μ m. Zu erkennen ist eine deutliche Vermehrung von Mikrogliazellen im CC.

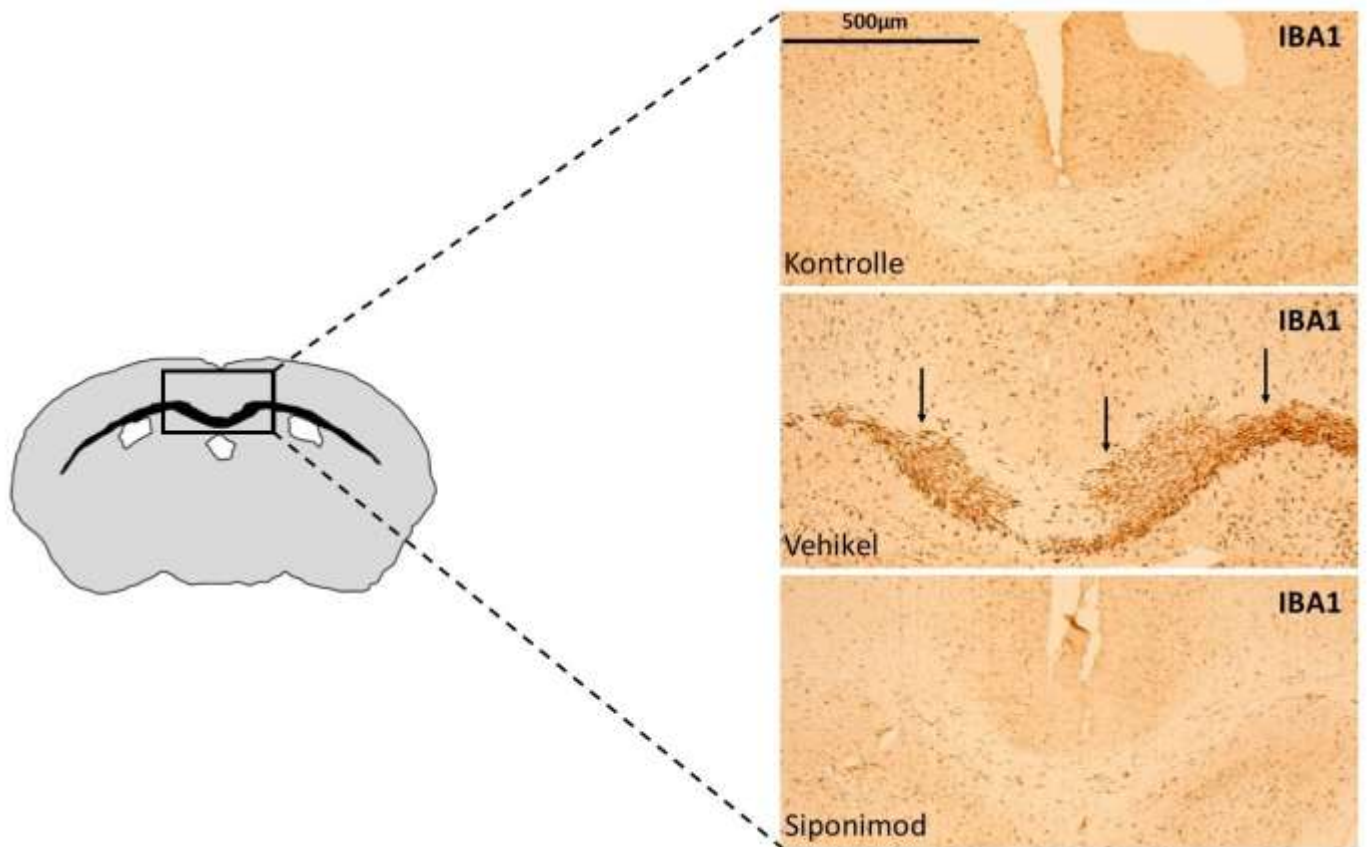


Abbildung 18 Immunhistochemische Markierung mit IBA1 an Hirnschnitten aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch

Dargestellt sind Hirnschnitte von Mäusen aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch, jeweils aus der Kontroll-, Vehikel- und Siponimod-Behandlungsgruppe. Die Hirnschnitte stammen aus Region 265. Die Pfeile markieren eine gut sichtbare Vermehrung von Mikrogliazellen im CC.

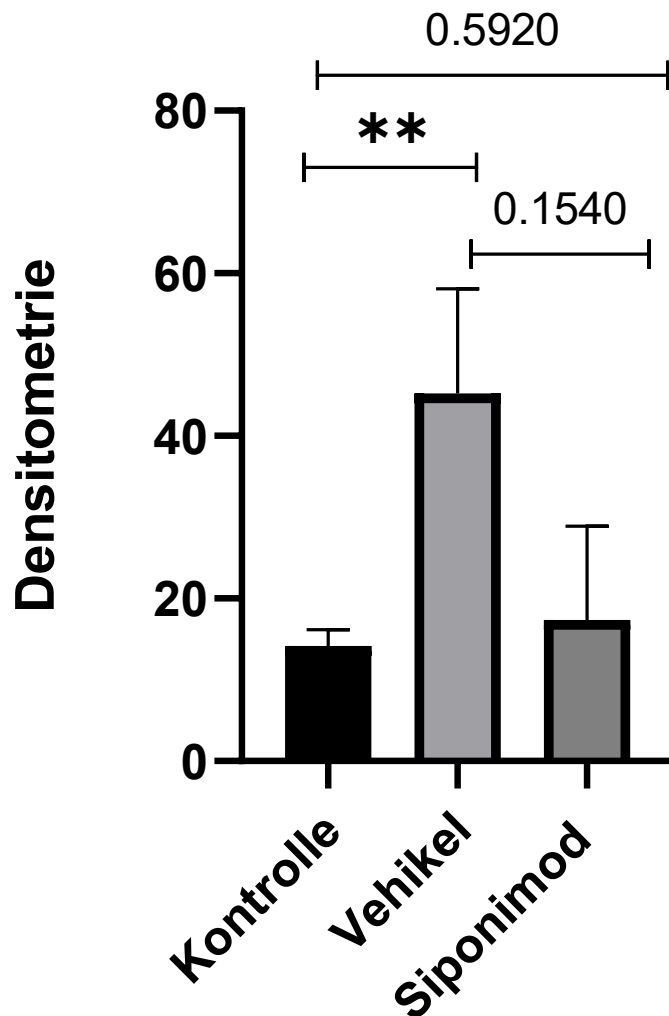


Abbildung 19 Graphische Darstellung der optischen Dichte von IBA1

3.1.3 Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber Axonschäden

Zu den bisher untersuchten Effekten von Siponimod zählen die Protektion gegenüber Demyelinisierung und Mikrogliose. Eine Schädigung von Axonen wäre nach Cuprizone-Intoxikation zusätzlich zu erwarten.

Das Amyloidvorläuferprotein (engl. amyloid precursor protein, APP) ist ein Protein, welches axonal transportiert wird. Bei Axonschädigungen akkumuliert es in Form von Sphäroiden und eignet sich daher als Marker für Axonschäden [130, 131].

Die Kontrollgruppe wies 0 Sphäroide/mm² (± 0) und folglich keine Axonschäden auf. Die Anzahl der Sphäroide der Vehikelgruppe lag bei 214,99 Sphäroiden/mm² ($\pm 143,3$). Die Siponimod-Behandlungsgruppe wies mit 33,44 Sphäroiden/mm² ($\pm 60,77$) eine deutlich geringere Anzahl von

APP-Sphäroiden als die Vehikelgruppe auf. (Abbildung 20 und Abbildung 21). Es ließ sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Vehikelgruppe feststellen.

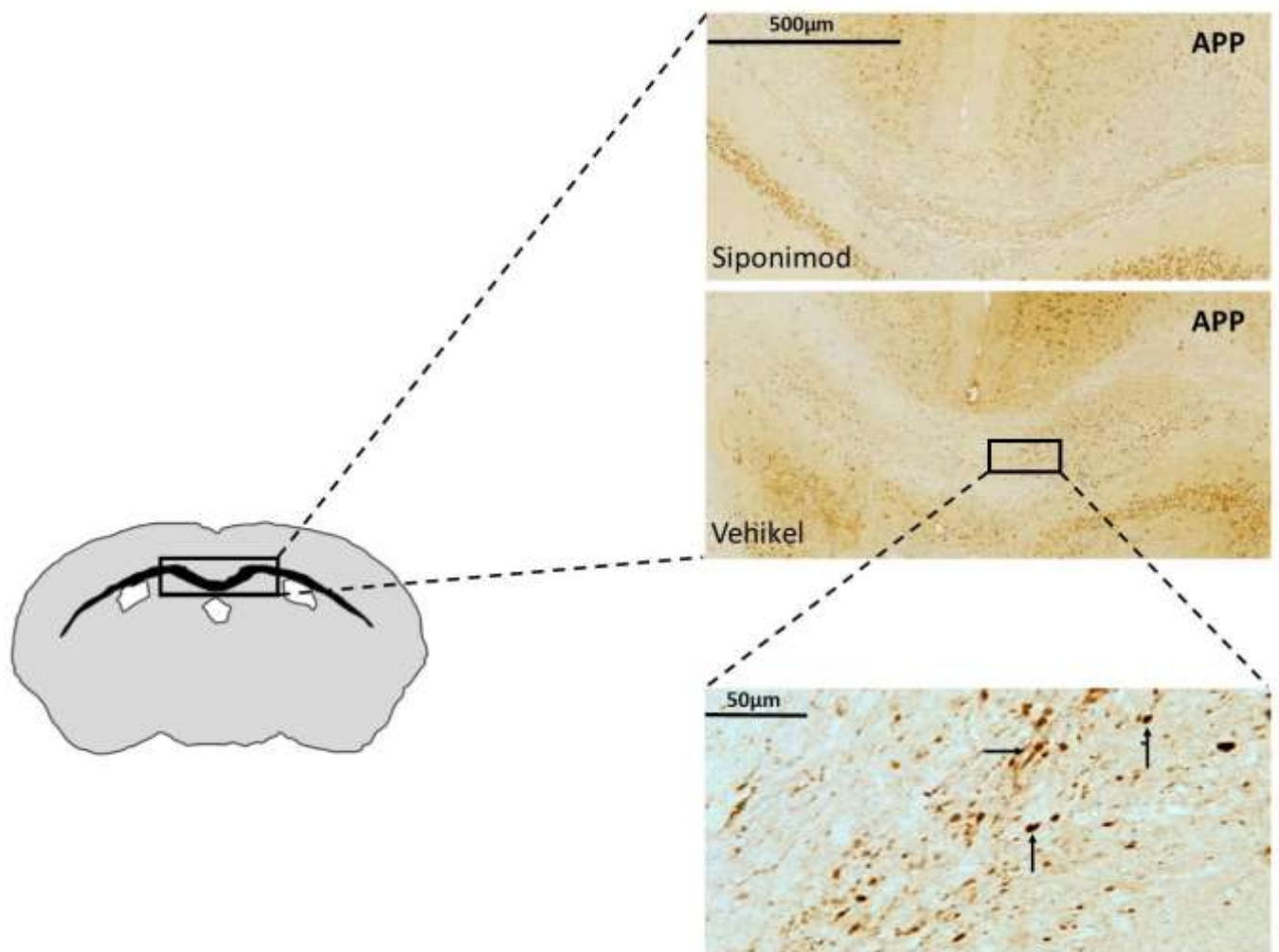


Abbildung 20 Immunhistochemische Markierung mit APP an Hirnschnitten aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch

Oben: Hirnschnitt aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch aus der Siponimod-Behandlungsgruppe, Region 265.

Mitte: Hirnschnitt aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch aus der Vehikel-Behandlungsgruppe, Region 265.

Unten: Vergrößerung eines Bildabschnittes des mittleren Bildes, mCC, Region 265, die Pfeile markieren APP-Sphäroide.

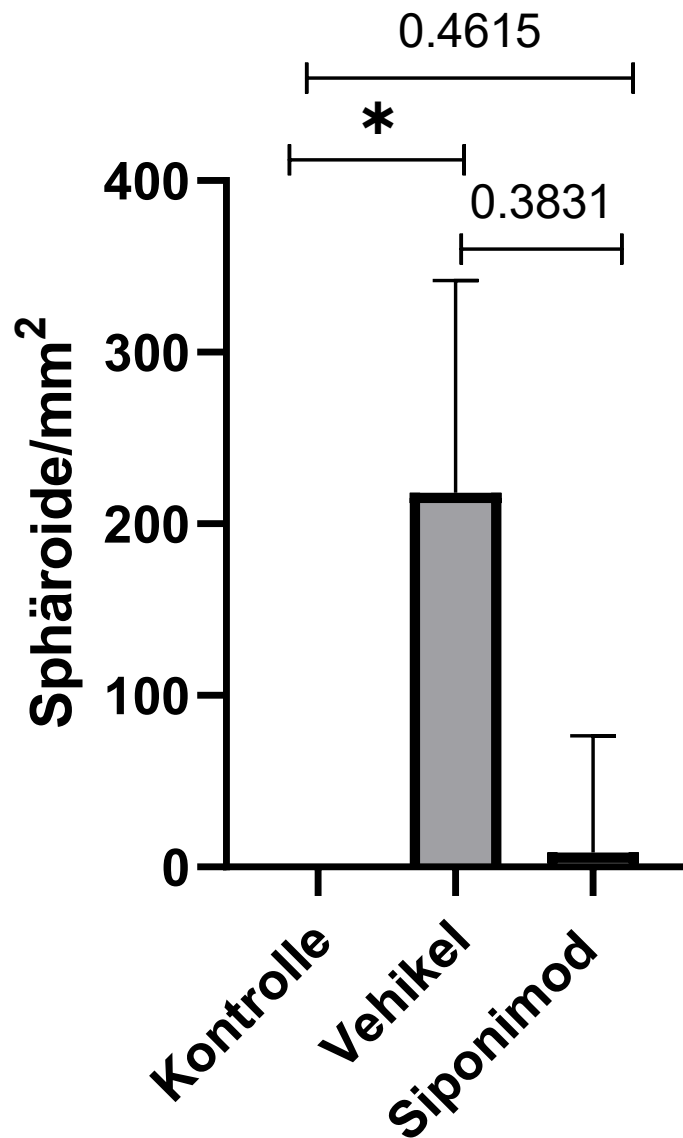


Abbildung 21 Graphische Darstellung der Anzahl an APP-Sphäroiden pro mm²

3.1.4 Lymphozyten-unabhängige protektive Wirkung von Siponimod gegenüber dem Untergang von Oligodendrozyten

Zusätzlich zu einer Demyelinisierung, Mikrogliose und axonalen Schädigung wäre nach Cuprizone-Intoxikation ein Untergang von Oligodendrozyten zu erwarten.

Der Oligodendrozytentranskriptionsfaktor 2 (OLIG2) ist nukleär lokalisiert und dient als Marker für Oligodendrozyten aller Reifegrade [121].

Die Kontrollgruppe wies im Durchschnitt mit 594,67 OLIG2+ Zellen/mm² ($\pm 67,82$) die höchste Dichte an Oligodendrozyten auf. Dem folgte die Siponimod-Behandlungsgruppe mit 579,12 OLIG2+ Zellen/mm² ($\pm 166,6$). Beide Gruppen wiesen ein ausgeprägtes Markierungsmuster auf. Die

Vehikelgruppe wies hingegen nur 320,06 OLIG2+ Zellen/mm² auf ($\pm 28,47$) (Abbildung 22 und Abbildung 23) und ließ ein schwächeres inhomogenes Markierungsmuster erkennen. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Vehikel- und Siponimod-Behandlungsgruppe feststellen.

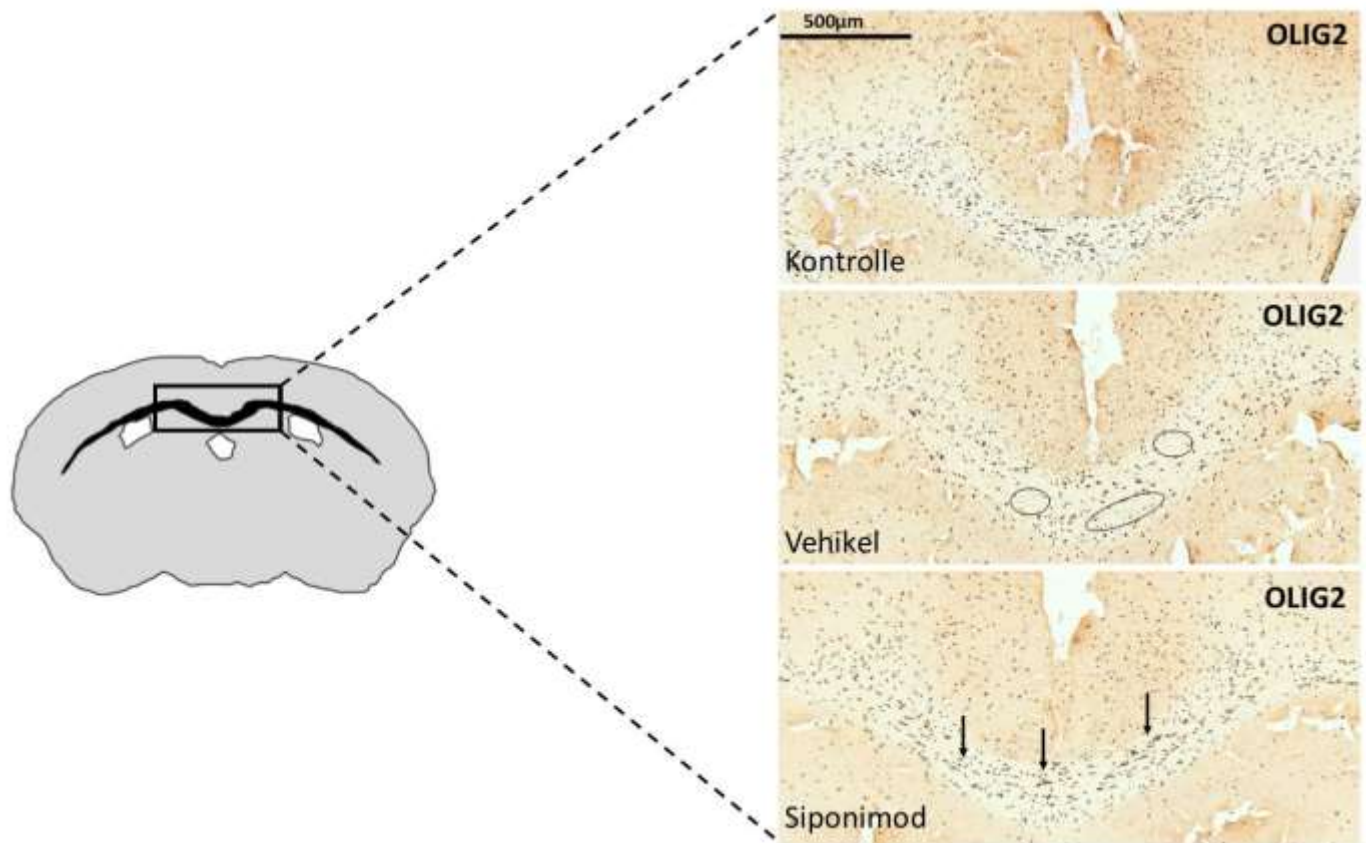


Abbildung 22 Immunhistochemische Markierung von OLIG2 an Hirnschnitten aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch

Dargestellt sind Hirnschnitte von Mäusen aus dem *Rag1*^{-/-}-Versuch, jeweils aus der Kontroll-, Vehikel- und Siponimod-Behandlungsgruppe. Die Hirnschnitte stammen aus Region 265. Eingekreist dargestellt sind Areale im CC, in denen keine Oligodendrozyten markiert wurden. Die Pfeile markieren Ansammlungen von Oligodendrozyten.

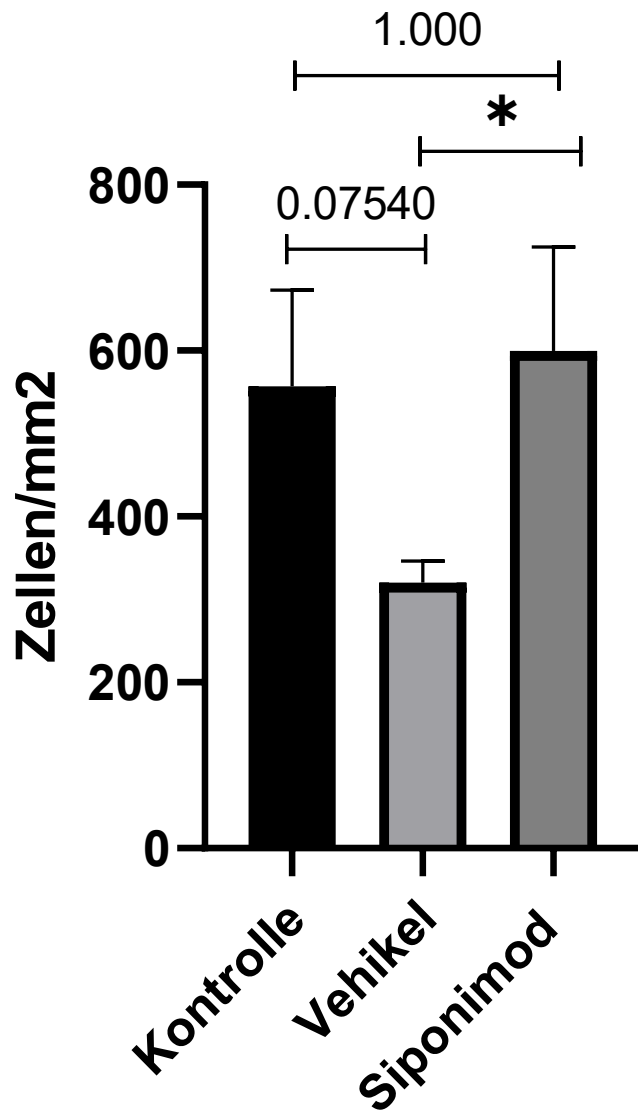


Abbildung 23 Graphische Darstellung der Dichte von OLIG2+ Zellen

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Die MS ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des ZNS im jungen Alter in Europa. Sie ist nach jetzigem Stand nicht kurativ behandelbar. Wie 1.4.3 zu entnehmen ist, sind die Behandlungsmöglichkeiten der MS begrenzt. Dies betrifft besonders die progressiven Verlaufsformen der MS. Lediglich verlaufsmodifizierende, symptomatische und Schubtherapien sind verfügbar. Da viele Prozesse in der Krankheitsentstehung bis heute ungeklärt sind, ergibt sich ein großer Forschungsbedarf. Tiermodelle und –versuche sind in der Forschung, unter Abwägung ethischer und moralischer Aspekte, eine gängig eingesetzte Methode zur Untersuchung vieler Forschungsaspekte. So auch in der Erforschung der MS.

In den folgenden Abschnitten dieser Dissertation werden die Methoden und das verwendete Tiermodell der vorliegenden Arbeit bezüglich der Vor- und Nachteile sowie ihrer Grenzen unter Berücksichtigung des aktuellen Standes der Literatur diskutiert.

4.1.1 Das Cuprizone-Modell

Tiermodelle sind im Allgemeinen gute Verfahren, um Krankheiten zu erforschen.

Neben der reinen Untersuchung von Erkrankungen und deren Pathogenese bieten Tiermodelle die Möglichkeit, Medikamente zu entwickeln bzw. den Wirkmechanismus von bestehenden Medikamenten weiter zu erforschen. So zum Beispiel der Versuch von Selkirk et al. 2021, mit dem herausgefunden werden sollte, welcher Effekt aus einer S1PR1- und S1PR5-Modulation durch Ozanimod resultiert [132]. Trotz dessen sind weiterführende Versuche und anschließende kontrollierte Studien an Menschen unerlässlich. Besonders, wenn es um die Entwicklung neuer Medikamente geht. Die Möglichkeit bestehende Therapieoptionen im Tiermodell weiter zu untersuchen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit genutzt.

Das Cuprizone-Modell ist ein etabliertes und viel genutztes zytotoxisches Tiermodell. Bei genauer Durchführung ist es gut reproduzierbar und leicht durchzuführen.

Es werden v.a. Zellen mit hoher Stoffwechselleistung, wie zum Beispiel Oligodendrozyten [126], geschädigt. Daher kann besonders der Untergang von Oligodendrozyten und als Folge dessen eine zentrale Demyelinisierung beobachtet werden. Außerdem gehen mit einer Cuprizone-Intoxikation Axonschäden sowie eine Aktivierung von Mikrogliazellen einher.

Durch vergangene Versuche lassen sich Schädigungen bestimmter Hirnregionen im Cuprizone-Modell reproduzieren. Dazu zählen v.a. das *Corpus callosum* sowie *Cerebellum*, *Cortex*, *Thalamus* und *Hippocampus* [121].

Mit dem Cuprizone-Modell lassen sich daher De- und Remyelinisierungsprozesse untersuchen [128]. Remyelinisierungsprozesse sind dabei zum Beispiel bei Fragestellungen nach Signalkaskaden in Myelinreparaturmechanismen von Interesse [39].

Das Cuprizone-Modell weist außerdem Ähnlichkeiten mit progressiven Verlaufsformen der MS auf. In der SPMS konnten folgende Pathologien nachgewiesen werden: kortikale Demyelinisierung [13], oxidativer Stress [133], kumulativer Axonverlust [14, 134], eine kaum geschädigte BHS [135], und eine geringe Immunzellinfiltration [136]. Dies deckt sich mit einigen Pathologien des Cuprizone-Modells. Dazu zählen akute kortikale Demyelinisierung [120], oxidativer Stress [137], axonaler Schaden [122], geringe Schäden an der BHS [138] und keine bis geringe Immunzellinfiltration [125].

Für die vorliegende Arbeit stand Siponimod als mögliche Behandlungsoption der SPMS im Fokus. Da sich einige ausgewählte Pathologien der SPMS mit dem Cuprizone-Modell darstellen lassen, war dieses Tiermodell für die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden Fragestellungen am besten geeignet.

Trotz der Ähnlichkeiten zu progressiven Verlaufsformen der MS sollte beachtet werden, dass sich bei Tiermodellen nicht alle Merkmale einer Krankheit, sondern nur Teilaspekte abbilden lassen. Einige Erkrankungen, wie zum Beispiel die MS, kommen bei Tieren nicht vor und müssen daher in Form von spezifischen Symptomen nachgeahmt werden. Diesbezüglich ist zum Beispiel das Medikamenten-induzierte Parkinson-Maus-Modell zu nennen. Durch die Gabe von L-Dopa und Carbidopa werden Parkinson-ähnliche Symptome verursacht. Auf dieser Basis konnten Medikamente zur Symptombehandlung bei Parkinson-Patienten entwickelt werden. Da die Symptome jedoch nur nachgeahmt wurden, ist eine Erforschung der auslösenden Faktoren der Erkrankung und die Entwicklung krankheitsmodifizierender Therapien nicht möglich [139].

Wie im Medikamenten-induzierten-Parkinson-Maus-Modell ist der Schaden-auslösende Faktor im Cuprizone-Modell bekannt. Der genaue Pathomechanismus dahinter ist hingegen unklar. Avşar et al. 2021 untersuchten dazu erste Ansätze, wie zum Beispiel die Signalkaskade pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Verlauf einer Cuprizone-Intoxikation [140]. Des Weiteren lassen sich die Symptome im Cuprizone-Modell allein durch ein toxisches Agens, das Cuprizone, über bereits kurze Zeit auslösen, wohingegen die Pathogenese der MS ,wie in 1.3 beschrieben, deutlich komplexer ist und vermutlich bereits Jahre vor dem Auftreten erster Symptome beginnt.

Ähnlich verhält es sich mit dem Rückgang von Symptomen im Cuprizone-Modell durch eine Remyelinisierung. Zwar tritt auch bei der MS zeitweilen ein teilweiser oder vollständiger Rückgang der Symptome auf, wird jedoch der gesamte Verlauf der Krankheit betrachtet, sind die Symptome progredient.

Wenngleich sich das Cuprizone-Modell für die Untersuchung progressiver MS-Verlaufsformen anbietet, können autoimmune Aspekte der Erkrankung weniger gut untersucht werden. Das liegt an der kaum ausgeprägten Einwanderung von Immunzellen in das ZNS im Cuprizone-Modell. Soll dieser Aspekt untersucht werden, bietet es sich an, das Cuprizone-Modell mit einem anderen Tiermodell, wie dem EAE-Modell, zu kombinieren [126]. Hier sollte klar abgewogen werden, ob das Modell einen Nutzen bietet. Da Immunzellen für die Arbeitshypothese dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle spielten, war das Cuprizone-Modell für diesen Aspekt gut geeignet.

Wie alle anderen Tiermodelle auch, lässt sich das Cuprizone-Modell außerdem nicht direkt auf den Menschen übertragen, da sich Mensch und Maus physisch, zum Beispiel durch die Herzfrequenz, Körpertemperatur und Lebenserwartung, sowie genetisch stark unterscheiden [141]. Sog. humanisierte Mausmodelle, welche humane Gene, Zellen oder Gewebe aufweisen, wurden bereits für Studien zur Untersuchung von Autoimmunerkrankungen, darunter auch die MS, genutzt [142]. Solche Modelle könnten alternativ für folgende Versuche angewendet werden.

Rein methodisch sind die Ergebnisse des Cuprizone-Modells abhängig von Alter, Geschlecht, Gewicht und Tierlinie der Versuchstiere, den Versuchsprotokollen der Arbeitsgruppe (beinhaltet Dosis und Dauer der Cuprizone-Applikation) sowie den Umgebungsbedingungen, wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit [143]. Unterschiede, die durch Dosis und Gewicht der Tiere hervorgerufen wurden, konnten beispielsweise von Blakemore 1974 [144] und Ludwin 1978 [145] festgestellt werden. Dies führt dazu, dass Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen schwerer miteinander zu vergleichen sind.

Die Vorteile des Cuprizone-Modells überwogen die potentiellen Nachteile für die Fragestellung dieser Arbeit. Es erfolgte bereits ein Tierversuch mit Wildtyp-Mäusen mit Cuprizone und Siponimod durch unsere Arbeitsgruppe (1.7). Dadurch lag ein Arbeitsprotokoll vor, welches potentiell auf *Rag1*^{-/-}-knockout-Mäuse übertragen werden konnte und eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich der Methodik bot. So konnten die Ergebnisse der Tierversuche innerhalb der Arbeitsgruppe verglichen werden. V.a. die Möglichkeit, Symptome der progressiven MS mit dem Cuprizone-Modell zu untersuchen, bot einen besonderen Vorteil. Dass die MS-Symptome lediglich nachgeahmt werden, war für diesen Versuch kein Nachteil, da folgende Frage untersucht werden sollte: „Wirkt Siponimod auch in Abwesenheit von reifen

Lymphozyten protektiv gegenüber Demyelinisierung, Axonschäden, Mikrogliaaktivierung und Oligodendrozytenuntergang?“. Um dieser Frage nachzugehen, war es nicht relevant, durch welchen Pathomechanismus die Symptome generiert wurden.

4.1.2 Die *Rag1*^{-/-}-knockout Mauslinie

Die *Rag1*^{-/-}-knockout-Mauslinie ist eine vielseitig genutzte Mauslinie, um Pathologien im Rahmen von Immundefekten zu untersuchen [146].

Dazu zählt das Modell des Omenn-Syndroms, in welchem die *Rag1*^{-/-}-knockout-Mauslinie verwendet wird [147]. Auch andere Erkrankungen können mit der *Rag1*^{-/-}-knockout-Mauslinie untersucht werden. Als Beispiele sind hier mitochondriale Erkrankungen [148] und Tumorerkrankungen, wie das orale Plattenepithelkarzinom [149], zu nennen [114]. Untersuchungen zu diesen Erkrankungen konnten zeigen, dass ein *Rag1*^{-/-}-knockout das Fehlen von reifen Lymphozyten zur Folge hat. Dies lässt sich, wie in Kapitel 1.8 erwähnt, auf die gestörte VDJ-Rekombination zurückführen. Zur Überprüfung meiner Arbeitshypothese war es essenziell, dass auch in Abwesenheit reifer Lymphozyten Cuprizone-induzierte Schäden ausgelöst werden können.

Demyelinisierung, Axonschäden, gliale Schäden sowie Inflammation konnten bereits in *Rag1*^{-/-}-knockout-Mäusen durch Cuprizone induziert werden [150]. Auch Hiremath et al. 2008 zeigten dies [151]. Daher war anzunehmen, dass das Cuprizone-Modell in Kombination mit der *Rag1*^{-/-}-knockout-Mauslinie zur Beantwortung meiner Fragestellungen geeignet ist. Darüber hinaus mangelt es an vergleichbaren Studien, die die Wirkung von Siponimod in der *Rag1*^{-/-}-knockout-Mauslinie bei gleichzeitiger Intoxikation mit Cuprizone untersuchen. Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit lautete: „Wirkt Siponimod auch in Abwesenheit von reifen Lymphozyten protektiv gegenüber Demyelinisierung, Axonschäden, Mikrogliaaktivierung und Oligodendrozytenuntergang?“. 4.1.1 kann entnommen werden, dass Immunzellen im Cuprizone-Modell eine untergeordnete Rolle spielen.

Im Vergleich zu anderen Mauslinien spielen durch Lymphozyten vermittelte immunologische Prozesse in *Rag1*^{-/-}-knockout-Mäusen ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Die *Rag1*^{-/-}-knockout-Mauslinie war deshalb mit der Fragestellung und dem geplanten Versuch kompatibel und wurde zur Untersuchung meiner Fragestellung verwendet.

4.1.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine der am häufigsten genutzten Methoden, um Strukturen sichtbar zu machen und anschließend zu quantifizieren. Sie bietet die Möglichkeit eine Zielstruktur, also Antigene, zu markieren. Die Immunhistochemie ist daher ein einfaches Hilfsmittel für die Untersuchung und Auswertung von Versuchen.

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine indirekte Nachweismethode. Mittels Primärantikörper lassen sich die zu untersuchenden Strukturen gut darstellen. Die Primärantikörper selbst können das Ergebnis durch unspezifische Bindungen verfälschen. Daher wurden für jede Markierung Maßnahmen ergriffen, um Verfälschungen so gering wie möglich zu halten. Dazu gehörte das Mitführen von Negativkontrollen und das sog. Blocken. Alle Maßnahmen können 2.5.1 entnommen werden.

Die Qualität und das Alter der Schnitte können das Ergebnis beeinflussen. Aus diesem Grund wurden alle Schnitte unter gleichen Bedingungen markiert.

4.1.4 Histologische Färbungen

Bei histologischen Färbungen handelt es sich um direkte Nachweismethoden. Mittels spezieller Färbetechniken lassen sich die zu untersuchenden Strukturen anfärben. Auch diese Methode ist weit verbreitet und wird eingesetzt, um Zielstrukturen farblich darzustellen und anschließend auszuwerten. Histologische Färbungen sind einfach in der Anwendung und lassen sich bei genauer Durchführung gut reproduzieren. Die Färbeintensität hängt u.a. davon ab, wie gut die Qualität der Schnitte bzw. des Gewebes ist. Diese wird von Alter, Lagerung und Anfertigung der Schnitte beeinflusst. Um Abweichungen so gering wie möglich zu halten, wurden für jede Färbung stets alle Schnitte eines Versuchs zur gleichen Zeit und nach dem gleichen Protokoll bearbeitet. Das Alter und die Lagerung der Färbelösungen beeinflussen ebenfalls die Färbeintensität, sodass diese vorschriftsmäßig gelagert und bei Bedarf ersetzt wurden.

4.1.5 Quantifizierung der optischen Dichte und von Zelldichten

Im Allgemeinen handelt es sich bei der Quantifizierung der optischen Dichte bzw. von Zelldichten um eine gute Methode, um Ergebnisse von Gewebeuntersuchungen übersichtlich und vergleichbar zu machen. Damit eine einheitliche und vergleichbare Auswertung der Versuche sichergestellt werden konnte, wurde die Quantifizierung mithilfe der Computerprogramme „Image J“ und „View Point“ vorgenommen. Es sollten jedoch einige Aspekte beachtet werden, die die Ergebnisse beeinflussen können. Da sich die Schnitte untereinander unterscheiden können, ist es durchaus möglich, dass nicht jeder Schnitt mit derselben Belichtung und Einstellung gleich aussieht. Die ROI aller Schnitte ist ebenso eine potentielle Quelle von Abweichungen, da die ROI für jeden Schnitt individuell durch den Begutachter bestimmt werden musste. Unterschiedlich starke Intensitäten der immunmarkierten Zellen beeinflussen ebenfalls das Ergebnis. Mehrere Methoden wurden genutzt, um diese Abweichungen möglichst gering zu halten. Die individuellen ROIs wurden berücksichtigt, indem aus der Fläche der markierten ROI und der Anzahl der

gezählten Zellen bzw. Partikel der Quotient bestimmt und im weiteren Verlauf verwendet wurde. Alle Aufnahmen einer Versuchsreihe wurden zudem am selben Tag unter gleichen Bedingungen angefertigt. Durch immer gleiche Mikroskopeinstellungen für die Schnitte einer Versuchsreihe sollte die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

Die optische Dichte ist u.a. abhängig von dem ausgewählten Computerprogramm und Threshold. Ein schlecht gewählter Threshold könnte einen unpassenden Schwellenwert nutzen. Für zu vergleichende Hirnschnitte wurde daher immer der gleiche Threshold verwendet.

Die Auswertung von Zelldichten und Vergabe von Scores durch den Begutachter ist nicht vollständig objektiv möglich, da dieser zum Beispiel eine gewisse Erwartungshaltung oder andere Zählkriterien als der Zweitbegutachter hat. Um dem entgegenzuwirken, wurden alle Schnitte vor der Auswertung verblindet und anschließend durch zwei Begutachter ausgewertet. Pro Versuchstier wurden außerdem je zwei Schnitte ausgewertet und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Siponimod eine Lymphozyten-unabhängige Neuroprotektion vermittelt. Es ist also davon auszugehen, dass Siponimod auf Zellen des ZNS Einfluss nimmt.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cuprizone-induzierte Schäden auch im *Rag1*^{-/-}-knockout-Mausmodell auslösbar sind. Nachfolgend werden die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

4.2.1 Cuprizone-induzierte Schäden in *Rag1*^{-/-}-Mäusen

In 3.1 wurden die Cuprizone-induzierten Schäden in *Rag1*^{-/-}-Mäusen beleuchtet und dargelegt, wie diese durch Siponimod moduliert wurden. Dazu zählten: Untergang von Oligodendrozyten und Myelin, Störung der axonalen Integrität und Aktivierung von Mikrogliazellen. Die Gegenüberstellung der Kontrollgruppen mit den Vehikel-Behandlungsgruppen macht einen deutlichen Unterschied in den genannten Aspekten mit einer Schädigung auf Seiten der Vehikel-Behandlungsgruppe ersichtlich. Das lässt darauf schließen, dass das Cuprizone-Modell mit der *Rag1*^{-/-}-Mauslinie kompatibel ist und ähnliche Schäden induziert wie es bei dem Cuprizone-Modell mit

Wildtyp-Mäusen der Fall ist. Zu erwähnen ist, dass das Ausmaß der Schädigungen nicht mit Wildtyp-Mäusen eines Cuprizone-Versuches verglichen wurde. Eine direkte Gegenüberstellung Cuprizone-induzierter Schäden von *Rag*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen könnte ein genaueres Maß für die Stärke bzw. den Grad der Schädigungen geben. Darüber hinaus wurden nur vorher festgelegte Pathologien des Cuprizone-Modells untersucht. Es ist denkbar, dass durch Cuprizone auch andere Schäden in *Rag*^{-/-}-Mäusen induziert werden können.

4.2.2 Siponimod-vermittelte Neuroprotektion

Die Neuroprotektion ist ein wichtiger Ansatzpunkt für die Behandlung der progressiven Formen der MS. Da insbesondere das Behandlungsspektrum, im Gegensatz zu dem der RRMS, wenig Optionen bietet. Bei der geringen Anzahl an Behandlungsoptionen für die progressive MS ist es umso wichtiger zu verstehen, wie diese funktionieren und wie sie effizienter genutzt werden können. Da die Rolle der Lymphozyten in der progressiven MS, wie bereits eruiert, wohl eine untergeordnete Rolle spielt, ist deren, bereits gut belegte, Modulation weniger von Interesse für die vorliegende Arbeit. Wichtiger war es, zu untersuchen, ob eine Lymphozyten-unabhängige Neuroprotektion möglich ist, um in Zukunft an dieses Wissen ansetzen zu können.

Der Begriff der Neuroprotektion ist außerdem nicht einheitlich definiert und umfasst verschiedene Faktoren innerhalb verschiedener Arbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit war Neuroprotektion wie folgt definiert: Protektion gegenüber Demyelinisierung, Axonschäden, Mikrogliose und Untergang von Oligodendrozyten. Buonvicino et al. 2021 bspw. definieren Neuroprotektion im Sinne einer Protektion gegenüber dem Verlust der Neurofilamentintegrität im CC [128].

Cohan und Kollegen zeigten, dass es starke Hinweise auf eine duale Wirkung von Siponimod gibt [152]: die Unterdrückung inflammatorischer Autoimmunprozesse durch die Modulation von Lymphozyten sowie die Neuroprotektion durch Modulation von Zellen des ZNS. Diese Hinweise stützen meine Arbeitshypothese. Meine Ergebnisse deuten ebenfalls auf neuroprotektive Effekte durch Modulation von Zellen des ZNS hin. Dazu zählten die Reduzierung der Demyelinisierung, der Mikrogliose, der Axonschäden und des Oligodendrozytenuntergangs. Aufgrund des von mir genutzten Mausmodells (siehe 1.8) können diese Effekte nicht auf die Modulation von Lymphozyten zurückgeführt werden [153]. Zu erwähnen ist, dass die immunhistochemischen Markierung gegen PLP keine signifikanten Ergebnisse zeigte und in die Markierung gegen APP lediglich eine Signifikanz der Ergebnisse zwischen der Kontroll- und Vehikelgruppe gezeigt werden konnte. Der Unterschied der Ergebnisse zwischen der LFB/PAS Färbung und der

immunhistochemischen Markierung mit anti-PLP lässt sich folgendermaßen erklären. Mit der LFB/PAS Färbung lässt sich die chemische Beschaffenheit von Myelin und deren Veränderungen darstellen. Die chemische Beschaffenheit ändert sich schneller als zum Beispiel Myelinproteine abgebaut werden. Das wiederum ist ein Prozess der sich durch die immunhistochemische Markierung mit anti-PLP darstellen lässt. Durch die LFB/PAS Färbung lassen sich also früher Veränderungen nachweisen. Mit einer längeren Versuchsdauer bzw. Cuprizone-Intoxikation wären womöglich auch die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in der anti-PLP Markierung stärker ausgefallen.

Der Untergang von Oligodendrozyten wurde in dieser Arbeit mit einer anti-OLIG2-Markierung untersucht. OLIG2 ist ein sehr etablierter Marker für Oligodendrozyten [154]. Dabei exprimieren alle Reifestufen von Oligodendrozyten OLIG2, sodass durch diesen Versuch nicht klar ist welchen Reifegrad die nachgewiesenen Oligodendrozyten aufwiesen. Es könnte sich also um reife Oligodendrozyten im Sinne einer Protektion handeln. Eine vermehrte Rekrutierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen unter Siponimod wäre jedoch auch denkbar. Diese Unterscheidung lässt sich mit OLIG2 als alleinigen Marker nicht bestimmen, könnte aber Gegenstand folgender Versuche sein. Besonders im Hinblick auf die Untersuchung von Remyelinisierungsprozessen.

Der Schutz vor einer Aktivierung von Mikrogliazellen war ebenfalls Bestandteil der Definition der Neuroprotektion für diese Arbeit. Aus diversen Studien geht hervor, dass Mikrogliazellen in allen Phasen der MS eine Rolle spielen. Sie spielen wohl aber eine duale Rolle, sodass sie je nach reaktivem Phänotyp protektiv oder schädigend agieren können. Voet et al. postulieren, dass Mikrogliazellen in frühen Phasen der MS noch protektive Funktionen erfüllen und erst durch eine chronische Aktivierung zur Neurodegeneration beitragen [155]. Es gilt also zu diskutieren, ob eine generelle Unterdrückung von Mikrogliazellen sinnvoll ist. Im Rahmen dieses Versuchs, welcher progressive MS-Formen in den Vordergrund stellt, scheint die Neuroprotektion zu überwiegen.

Fehlende Signifikanzen in einigen Aspekten der Arbeit könnten auf relativ kleine Gruppengrößen zurückzuführen sein, sodass die Ergebnisse kritisch betrachtet werden sollten. Zukünftig sollten daher Versuche mit größeren Gruppen angeschlossen werden [156].

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse meine in 1.10 formulierte Arbeitshypothese.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen aber lediglich, dass die Neuroprotektion durch Siponimod Lymphozyten-unabhängig ist. Welche Zellen konkret moduliert werden und welche Signalkaskaden von Siponimod möglicherweise induziert werden, konnte durch diese Studie nicht identifiziert werden. Auf dieser Grundlage lassen sich nur Vermutungen anstellen, welche Strukturen im ZNS von Siponimod direkt oder indirekt beeinflusst werden. Dazu zählen vermutlich Zellen und Gewebe, welche S1PR exprimieren, beispielsweise Astrozyten und Oligodendrozyten. Herauszufinden, um welche Zellen es sich dabei genau handelt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.3 Abschließende Bemerkung

Die Modulation von S1PR durch Siponimod bietet eine vielversprechende Behandlungsoption für die SPMS. Ein möglicher Wirkmechanismus von Siponimod wurde in dieser Arbeit an einem toxischen MS-Tiermodell untersucht.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass Siponimod eine Neuroprotektion unabhängig von einer Lymphozytenmodulation vermittelt. Auf dem Boden dieser Erkenntnisse könnten weiterführend spezielle Mauslinien oder Zellkulturen eingesetzt werden, welche sich auf die Expressierung von S1PR1 und S1PR5 fokussieren. Dazu sind bereits Versuche von meiner Arbeitsgruppe durchgeführt worden [108].

Das detailliertere Wissen über die Modulation von S1PR ist von klinischer Relevanz, um eine gezieltere Behandlung der SPMS zu gewährleisten und den Wirkmechanismus bereits genutzter Medikamente besser verstehen zu können. Darüber hinaus könnte dieses Wissen zu einem besseren Verständnis der Krankheitsentstehung von MS verhelfen und damit die Prävention und Heilungschancen verbessern.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 MS-Verlaufsformen	9
Abbildung 2 Hypothesen zur MS Pathogenese	12
Abbildung 3 Therapieschema der verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (MS) nach aktualisierter konsensbasierter(S2k) -Leitlinie Stand März 2022	18
Abbildung 4 Modulation von S1P-Rezeptoren	19
Abbildung 5 Synthese und Abbau von Sphingosin-1-Phosphat	21
Abbildung 6 Wirkmechanismus von Siponimod	23
Abbildung 7 Stark vereinfachte Darstellung der V(D)J-Rekombination	24
Abbildung 8 Strukturformel von Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	25
Abbildung 9 Darstellung der Demyelinisierung nach 5 Wochen Cuprizone-Intoxikation durch eine Markierung mit Anti-Proteolipidprotein (PLP)	26
Abbildung 10 Prinzip der immunhistochemischen Markierung nach der ABC Methode	33
Abbildung 11 Regions of interest (ROIs) in Region 265	43
Abbildung 12 Einordnung der Region 265	44
Abbildung 13 LFB/PAS Färbung an Hirnschnitten aus dem Rag1 ^{-/-} -Versuch	47
Abbildung 14 Graphische Darstellung der LFB-Scores	48
Abbildung 15 Immunhistochemische Markierung mit PLP an Hirnschnitten aus dem Rag1 ^{-/-} - Versuch	49
Abbildung 16 Graphische Darstellung der optischen Dichte der anti-PLP-Markierung	50
Abbildung 17 Anti-IBA1 Markierung an Hirnschnitten von C57BL/6J –Mäusen	51
Abbildung 18 Immunhistochemische Markierung mit IBA1 an Hirnschnitten aus dem Rag1 ^{-/-} - Versuch	52
Abbildung 19 Graphische Darstellung der optischen Dichte von IBA1	53
Abbildung 20 Immunhistochemische Markierung mit APP an Hirnschnitten aus dem Rag1 ^{-/-} - Versuch	54
Abbildung 21 Graphische Darstellung der Anzahl an APP-Sphäroiden pro mm ²	55
Abbildung 22 Immunhistochemische Markierung von OLIG2 an Hirnschnitten aus dem Rag1 ^{-/-} - Versuch	56
Abbildung 23 Graphische Darstellung der Dichte von OLIG2+ Zellen	57

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 MS-Medikamente nach Medikamentenklasse	17
Tabelle 2 Übersicht der S1PR Subtypen.....	19
Tabelle 3 Manuelle Entwässerung und Einbettung	31
Tabelle 4 Deparaffinierung und Rehydrierung	35
Tabelle 5 Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Markierungen	36
Tabelle 6 Verwendete Sekundärantikörper in immunhistochemischen Markierungen	36
Tabelle 7 Dehydrierung.....	37
Tabelle 8 Arbeitsprotokoll der immunhistochemischen Markierung (17.1 und 17.2 fakultative Arbeitsschritte)	37
Tabelle 9 Arbeitsprotokoll der histochemischen Färbung mit LFB/PAS.....	40
Tabelle 10 Arbeitsprotokoll der histochemischen HE-Färbung.....	41
Tabelle 11 Material und Chemikalien	70

7 Material und Chemikalien

Tabelle 11 Material und Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Firma	Bestellnummer
5X First Strand Puffer	Invitrogen	1843648
10X PCR Puffer		1928063 (1952345)
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Chromogen	Dako	K3468
3,3-Diaminobenzidin (DAB) + Substrat	Dako	K3468
Agarose (Standart)	Roth	448275977
Brom Phenol Blau	Roth	06894061
Chloroform/Trichlormethan	Roth	428254651
Citronensäure-Monohydrat	Merck	5949-29-1
Cuprizone (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon)	Alfa Aesar	A10628
Deckgläser (24x50mm)	Menzel-Gläser	19 00 02450
Depex	Serva	18243.02

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	T877.1
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1.06580.1000
DNTP mix	peqlab	DM1-818107A
DTT	Invitrogen	1790765
Easy Ladder I	Bioline	HTS1-516111
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth	X986.2
Elite ABC-Kit	VECTASTAIN	PK-6100
Eosin Y/G (gelblich)	Merck	1,159,350,025
Essigsäure (Eisessig)	J.T.Baker	6052
Ethanol 100 %	Walter-CMP	WAL642 6025
Ethanol 50 %, 70 %, 90 %, 96 %	Walter-CMP	WAL641 6025
Formaldehydlösung 37 %	Merck	1.03999. 1000
Formaldehydlösung 37 %	Roth	7398.4
Futtermehl	Ssniff	V1530-000
Glycerol 87 %	Roth	055223902
Immu-Mount™ – Shandon	Thermo Scientific	9990402
Kaliumchlorid	Roth	6781.3
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	P018.2
Ketamin 10 %	HFW	Zul.-Nr. 27015.00.00
Kresylviolett (Acetat)	Sigma	C5042-10G
Lithiumcarbonat	Merck	1.05680.0250
Magnesiumchlorid	Bioline	1959416 (18067-017)
Mayers Häkalaunlösung	Merck	1.09249.0500
Midori Green	Nippon Genetics Europe GmbH	495MG29118
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen	1823696

My Taq DNS Polymerase	Bioline	PL307-B065950
MY TAq Red Reaction Buffer	Bioline	PL307-B065950
Natriumacetat, wasserfrei	Merck	1.06268.0250
Natriumchlorid	Roth	0962.2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	1.06346.1000
Natronlauge (NaOH)	Merck	1.06469.1000
Normales Ziegen Serum	Vector	S-1000
Paraffin, 57-60°C	Merck	1.07158.9025
Perjodsäure	Merck	1.00524.0100
PeqGold TriFast	VWR Life Science	011419-3
Propanol	Roth	488277842
Random Primer	Invitrogen	2000065
Salzsäure (HCl), 37 %	Merck	1.00317.1000
Solvent Blue 38	Sigma	S3382-25G
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific	J1800AMNZ
Taq Polymerase	VWR Life Science	BT-51203
Tris (PUFFERAN®)	Roth	AE15.2
UltraPure DNase/RNase freies destilliertes Wasser (UP Wasser)		
Wasserstoffperoxid 35 % (H ₂ O ₂)	Merck	1.08600.1000
Xylazin (Rompun® 2 %)	Bayer	Zul.-Nr. 6293841.00.00
Xylol	J.T.Baker	8118.25

8 Puffer, Blockseren und Färbelösungen

- **PBS-Puffer (10x Lösung):** 400 g Natriumchlorid

-
- 10 g Kaliumchlorid
 - 84 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
 - 13,5 g Kaliumdihydrogenphosphat
 - 5000 ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 7,4 eingestellt
 - **PBS-Puffer (1x Lösung):** 500 ml PBS (10x Lösung)
 - 4500 ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 7,4 eingestellt
 - **Tris-EDTA-Puffer:** 6,05 g Tris
 - 1,85 g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat
 - 5000 ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 9,0 eingestellt
 - **Citratpuffer:** 11,5 g Citronensäure-Monohydrat
 - 5000 ml destilliertes Wasser
 - pH-Wert auf 6,0 eingestellt
 - **1X TAE-Puffer:** 200 ml 10X TAE-Puffer
 - Mit Aqua dest auf 2 l auffüllen
 - **10X TAE-Puffer:** 96,88 g Tris Pufferan
 - 22,854 ml 100% Essigsäure
 - 40 ml 0,5M EDTA
 - Mit Aqua dest. auf 1,8 l auffüllen
 - pH auf 8 einstellen und mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen
 - **5X DNS loading Puffer:** 57,4 µl 87 % Glycerol
 - 42,6 µl Aqua dest.
 - eine Pipettenspitze Phenolblau
 - circa sechs Tropfen NaOH 1-2M
 - **Blockserum (1):** Verdünnung 1:20
 - 2,5 ml Normales Eselserum
 - 47,5 ml PBS (1x)
 - **Blockserum (2):** Verdünnung 1:20
 - 2,5 ml Normales Ziegenserum
 - 47,5 ml PBS (1x)
 - **0,35 % H₂O₂:** Verdünnung 1:100

-
- 1 ml H₂O₂ (35%)
 - 99 ml PBS
 - **DAB-Komplex:**
 - Verdünnung 1:50
 - 20 µl DAB-Chromogen
 - 980 µl DAB-Substrat
 - **Fixierlösung:**
 - 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat
 - 8,0 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
 - 100 ml Formaldehydlösung 37 %
 - 900 ml destilliertes Wasser
 - filtriert und pH-Wert auf 7,4 eingestellt
 - **Hämatoxylin-Farblösung:**
 - 250 ml Mayers Hämaunlösung filtriert
 - **Eosin-Farblösung:**
 - 0,2 % Lösung (Eosin Y)
 - Aqua dest.
 - ein Tropfen Essigsäure
 - /100 ml
 - **Natriumacetat-Puffer**
 - 1,088 g Natriumacetat
 - 200 ml destilliertes Wasser
 - **LFB-PAS-Farblösung:**
 - 0,1 g Solvent Blue 38
 - 100 ml 96 % Ethanol
 - 0,5 ml 100 % Essigsäure
 - **0,05 % Lithiumcarbonatlösung:**
 - 0,05 g Lithiumcarbonat
 - 100 ml Aqua dest
 - **0,5 % Perjodsäure:**
 - 1,5 g Perjodsäure
 - 300 ml Aqua dest
 - **Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC-Komplex):**
 - 2400 µl PBS
 - 50 µl Reagenz A
 - 50 µl Reagenz B

9 Literatur

- [1] Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 2013; 13: 128. doi:10.1186/1471-2377-13-128
- [2] Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, et al. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain* 2019; 142: 1858–1875. doi:10.1093/brain/awz144
- [3] Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol* 2015; 78: 710–721. doi:10.1002/ana.24497
- [4] Cavenaghi VB, Dobrianskyj FM, Olival GSd, et al. Characterization of the first symptoms of multiple sclerosis in a Brazilian center: cross-sectional study. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina* 2017; 135: 222–225. doi:10.1590/1516-3180.2016.0200270117
- [5] Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018; 17: 162–173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- [6] Wiendl H, Kieseier BC, Gold R, et al. Multiple Sklerose--Revision der neuen McDonald-Diagnosekriterien. *Nervenarzt* 2006; 77: 1235, 1237-45. doi:10.1007/s00115-006-2127-6
- [7] Tsang BK-T, Macdonell R. Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis. *Aust Fam Physician* 2011; 40: 948–955
- [8] Saleem S, Anwar A, Fayyaz M, et al. An Overview of Therapeutic Options in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Cureus* 2019; 11: e5246. doi:10.7759/cureus.5246
- [9] Weinshenker BG. Therapeutic plasma exchange for acute inflammatory demyelinating syndromes of the central nervous system. *J. Clin. Apheresis* 1999; 14: 144–148. doi:10.1002/(SICI)1098-1101(1999)14:3<144::AID-JCA7>3.0.CO;2-R
- [10] Lorscheider J, Buzzard K, Jokubaitis V, et al. Defining secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 2016; 139: 2395–2405. doi:10.1093/brain/aww173
- [11] Trojano M, Paolicelli D, Bellacosa A, et al. The transition from relapsing-remitting MS to irreversible disability: clinical evaluation. *Neurological Sciences* 2003; 24 Suppl 5: S268-70. doi:10.1007/s10072-003-0171-6
- [12] Trapp BD, Nave K-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu. Rev. Neurosci.* 2008; 31: 247–269. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313
- [13] Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 2705–2712. doi:10.1093/brain/awh641
- [14] Schirmer L, Antel JP, Brück W, et al. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2011; 21: 428–440. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00466.x
- [15] Dankowski T, Buck D, Andlauer TFM, et al. Successful Replication of GWAS Hits for Multiple Sclerosis in 10,000 Germans Using the Exome Array. *Genet. Epidemiol.* 2015; 39: 601–608. doi:10.1002/gepi.21933
- [16] Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, et al. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 710–716. doi:10.1086/367781
- [17] Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* 2015; 64: 13–25. doi:10.1016/j.jaut.2015.06.010
- [18] Villoslada P, Barcellos LF, Rio J, et al. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon- β . *Journal of neuroimmunology* 2002; 130: 194–201. doi:10.1016/s0165-5728(02)00215-1
- [19] Ghabaee M, Bayati A, Amri Saroukolaei S, et al. Analysis of HLA DR2&DQ6 (DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602) haplotypes in Iranian patients with multiple sclerosis. *Cellular and molecular neurobiology* 2009; 29: 109–114. doi:10.1007/s10571-008-9302-1
- [20] Arnett FC. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol* 1995; 12: 107–128. doi:10.3109/08830189509056707

-
- [21] Giraud M, Beaurain G, Yamamoto AM, et al. Linkage of HLA to myasthenia gravis and genetic heterogeneity depending on anti-titin antibodies. *Neurology* 2001; 57: 1555–1560. doi:10.1212/wnl.57.9.1555
 - [22] Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, et al. CSF levels of soluble HLA-G and Fas molecules are inversely associated to MRI evidence of disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: 446–454. doi:10.1177/1352458507085137
 - [23] Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord* 2017; 14: 35–45. doi:10.1016/j.msard.2017.03.014
 - [24] Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017; 13: 25–36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
 - [25] Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. *Semin Neurol* 2008; 28: 17–28. doi:10.1055/s-2007-1019126
 - [26] Tremlett H, Zhu F, Ascherio A, et al. Sun exposure over the life course and associations with multiple sclerosis. *Neurology* 2018; 90: e1191–e1199. doi:10.1212/WNL.0000000000005257
 - [27] Winkelmann A, Löbermann M, Reisinger E, et al. Multiple Sklerose und Infektionskrankheiten. *Akt Neurol* 2011; 38: 339–350. doi:10.1055/s-0031-1291296
 - [28] Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi M-M, et al. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020; 91: 681–686. doi:10.1136/jnnp-2020-322941
 - [29] Hoover K, Higginbotham K. StatPearls. Epstein Barr Virus. Treasure Island (FL); 2021
 - [30] Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, et al. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 2010; 5. doi:10.1371/journal.pone.0012496
 - [31] Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, et al. Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* 2015; 45: 1043–1058. doi:10.1002/eji.201445125
 - [32] Guan Y, Jakimovski D, Ramanathan M, et al. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to in vivo imaging. *Neural regeneration research* 2019; 14: 373–386. doi:10.4103/1673-5374.245462
 - [33] Madeira A, Burgelin I, Perron H, et al. MSRV envelope protein is a potent, endogenous and pathogenic agonist of human toll-like receptor 4: Relevance of GNbAC1 in multiple sclerosis treatment. *Journal of neuroimmunology* 2016; 291: 29–38. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.12.006
 - [34] Perron H. Rétrovirus MSRV et protéine gliotoxique: marqueurs biologiques potentiels dans la sclérose en plaques? *Ann Biol Clin (Paris)* 1998; 56: 427–438
 - [35] Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord* 2012; 5: 13–22. doi:10.1177/1756285611425694
 - [36] Fragoso YD. Modifiable environmental factors in multiple sclerosis. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2014; 72: 889–894. doi:10.1590/0004-282X20140159
 - [37] Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2018; 8. doi:10.1101/cshperspect.a028936
 - [38] Barrantes-Freer A, Engel AS, Rodríguez-Villagra OA, et al. Diagnostic red flags: steroid-treated malignant CNS lymphoma mimicking autoimmune inflammatory demyelination. *Brain Pathol* 2018; 28: 225–233. doi:10.1111/bpa.12496
 - [39] Wegener A, Deboux C, Bachelin C, et al. Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain* 2015; 138: 120–135. doi:10.1093/brain/awu375
 - [40] Stys PK. Multiple sclerosis: autoimmune disease or autoimmune reaction? *Can J Neurol Sci* 2010; 37 Suppl 2: S16–23. doi:10.1017/s0317167100022393
 - [41] Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7: 115–121. doi:10.1016/s1471-4914(00)01909-2

-
- [42] Scheld M, R  ther BJ, Gro  e-Veldmann R, et al. Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain. *J Neurosci* 2016; 36: 1410–1415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2456-15.2016
 - [43] Luchicchi A, Hart B, Frigerio I, et al. Axon-Myelin Unit Blistering as Early Event in MS Normal Appearing White Matter. *Ann Neurol* 2021; 89: 711–725. doi:10.1002/ana.26014
 - [44] Wilkin T. Autoimmunity: attack, or defence? (The case for a primary lesion theory). *Autoimmunity* 1989; 3: 57–73. doi:10.3109/08916938909043614
 - [45] Hart BA 't, Luchicchi A, Schenk GJ, et al. Mechanistic underpinning of an inside-out concept for autoimmunity in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2021; 8: 1709–1719. doi:10.1002/acn3.51401
 - [46] Freidel M, Tiel-Wilck K, Schreiber H, et al. Drug-resistant MS spasticity treatment with Sativex( ) add-on and driving ability. *Acta Neurol Scand* 2015; 131: 9–16. doi:10.1111/ane.12287
 - [47] Otero-Romero S, Sastre-Garriga J, Comi G, et al. Pharmacological management of spasticity in multiple sclerosis: Systematic review and consensus paper. *Mult Scler* 2016; 22: 1386–1396. doi:10.1177/1352458516643600
 - [48] Grauer O, Offenh  usser M, Schmidt J, et al. Glukokortikosteroid-Therapie bei Optikusneuritis und Multipler Sklerose. Evidenz aus klinischen Studien und praktische Empfehlungen. *Nervenarzt* 2001; 72: 577–589. doi:10.1007/s001150170057
 - [49] Wiendl H, Toyka KV, Rieckmann P, et al. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J Neurol* 2008; 255: 1449–1463. doi:10.1007/s00415-008-0061-1
 - [50] Schimrigk S, Faiss J, K  hler W, et al. Escalation Therapy of Steroid Refractory Multiple Sclerosis Relapse with Tryptophan Immunoabsorption - Observational Multicenter Study with 147 Patients. *Eur Neurol* 2016; 75: 300–306. doi:10.1159/000447059
 - [51] Kappos L, Edan G, Freedman MS, et al. The 11-year long-term follow-up study from the randomized BENEFIT CIS trial. *Neurology* 2016; 87: 978–987. doi:10.1212/WNL.0000000000003078
 - [52] Plosker GL. Interferon- -1b: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011; 25: 67–88. doi:10.2165/11206430-000000000-00000
 - [53] Kinkel RP. Interferon-beta1a: a once-weekly immunomodulatory treatment for patients with multiple sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol* 2006; 2: 691–704. doi:10.1586/1744666X.2.5.691
 - [54] Bornstein MB, Miller A, Slagle S, et al. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1987; 317: 408–414. doi:10.1056/NEJM198708133170703
 - [55] Khan O, Rieckmann P, Boyko A, et al. Three times weekly glatiramer acetate in relapsing-relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2013; 73: 705–713. doi:10.1002/ana.23938
 - [56] Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs* 2011; 25: 401–414. doi:10.2165/11588120-000000000-00000
 - [57] Wolinsky JS, Borresen TE, Dietrich DW, et al. GLACIER: An open-label, randomized, multicenter study to assess the safety and tolerability of glatiramer acetate 40 mg three-times weekly versus 20 mg daily in patients with relapsing-relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2015; 4: 370–376. doi:10.1016/j.msard.2015.06.005
 - [58] Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003; 348: 15–23. doi:10.1056/NEJMoa020696
 - [59] Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, et al. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology* 1999; 53: 466–472. doi:10.1212/WNL.53.3.466
 - [60] Fayyaz M, Jaffery SS. Natalizumab-associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients with Multiple Sclerosis: A Mini Review. *Cureus* 2018; 10: e3093. doi:10.7759/cureus.3093
 - [61] Zhao Y, Su H, Shen X, et al. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflamm Res* 2017; 66: 571–578. doi:10.1007/s00011-017-1032-8

-
- [62] Jones JL, Thompson SAJ, Loh P, et al. Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: 20200–20205. doi:10.1073/pnas.1313654110
 - [63] Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 676–688. doi:10.1056/NEJMoa0706383
 - [64] Vogel WH. Infusion reactions: diagnosis, assessment, and management. *Clin J Oncol Nurs* 2010; 14: E10-21. doi:10.1188/10.CJON.E10-E21
 - [65] Faissner S, Gold R. Progressive multiple sclerosis: latest therapeutic developments and future directions. *Therapeutic advances in neurological disorders* 2019; 12: 1756286419878323. doi:10.1177/1756286419878323
 - [66] Fox EJ, Markowitz C, Applebee A, et al. Ocrelizumab reduces progression of upper extremity impairment in patients with primary progressive multiple sclerosis: Findings from the phase III randomized ORATORIO trial. *Mult Scler* 2018; 24: 1862–1870. doi:10.1177/1352458518808189
 - [67] Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017; 376: 221–234. doi:10.1056/NEJMoa1601277
 - [68] Wolinsky JS, Arnold DL, Brochet B, et al. Long-term follow-up from the ORATORIO trial of ocrelizumab for primary progressive multiple sclerosis: a post-hoc analysis from the ongoing open-label extension of the randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 2020; 19: 998–1009. doi:10.1016/S1474-4422(20)30342-2
 - [69] Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband e.V. Teriflunomide (04.08.2021). Im Internet: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln/medikamente-versteckt/teriflunomid-aubagior>; Stand: 29.12.2021
 - [70] O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1293–1303. doi:10.1056/NEJMoa1014656
 - [71] Papadopoulou A, D'Souza M, Kappos L, et al. Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2010; 19: 1603–1612. doi:10.1517/13543784.2010.534778
 - [72] Schimrigk S, Brune N, Hellwig K, et al. Oral fumaric acid esters for the treatment of active multiple sclerosis: an open-label, baseline-controlled pilot study. *Eur J Neurol* 2006; 13: 604–610. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01292.x
 - [73] Pericot I, Montalban X. Mitoxantrone. *Neurologia* 2003; 18: 318–323
 - [74] Hartung H-P, Gonsette R, König N, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *The Lancet* 2002; 360: 2018–2025. doi:10.1016/S0140-6736(02)12023-X
 - [75] Krapf H, Morrissey SP, Zenker O, et al. Effect of mitoxantrone on MRI in progressive MS: results of the MIMS trial. *Neurology* 2005; 65: 690–695. doi:10.1212/01.wnl.0000174439.70369.7a
 - [76] Prof. Dr. Bernhard Hemmer. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen; 17. Februar (17. Februar)
 - [77] Multiple Sklerose Forschungsförderung e.V. Mitoxantron | Multiple Sklerose Forschungsförderung e.V (03.06.2023). Im Internet: <https://www.ms-ev.de/multiple-sklerose/behandlung/medikamente/glatirameracetat-3/#:~:text=Mitoxantron%20hemmt%20die%20Aussch%C3%BCttung%20von%20Entz%C3%BCndungsbotenstoffen%20und%20das,Erkrankte%20mit%20sekund%C3%A4r%20chronisch-progredienter%20MS%20ohne%20%C3%BCberlagerte%20Krankheitssch%C3%BCbe.>; Stand: 03.06.2023
 - [78] Cook S, Vermersch P, Comi G, et al. Safety and tolerability of cladribine tablets in multiple sclerosis: the CLARITY (CLAdRiBine Tablets treating multiple sclerosis orally) study. *Mult Scler* 2011; 17: 578–593. doi:10.1177/1352458510391344
 - [79] Hexal AG. Mitoxantron Leitfaden für verschreibende Ärzte 2019

-
- [80] Merck Healthcare Germany GmbH. Leitfaden zur Verringerung von Arzneimittel- und Anwendungsrisiken Cladribin (Ärzte) 2022
 - [81] Prof. Dr. Bernhard Hemmer. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-opticaSpektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen. Entwicklungsstufe: S2k. Im Internet: <https://dgn.org/leitlinien>
 - [82] Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science* 2019; 366. doi:10.1126/science.aar5551
 - [83] Chun J, Hla T, Lynch KR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 579–587. doi:10.1124/pr.110.003111
 - [84] Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest* 2015; 125: 1379–1387. doi:10.1172/JCI76369
 - [85] Bravo GÁ, Cedeño RR, Casadevall MP, et al. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway Modulators, from Current Insights to Future Perspectives. *Cells* 2022; 11. doi:10.3390/cells11132058
 - [86] Jessup CF, Bonder CS, Pitson SM, et al. The sphingolipid rheostat: a potential target for improving pancreatic islet survival and function. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011; 11: 262–272. doi:10.2174/187153011797881201
 - [87] Vuononvirta J, Marelli-Berg FM, Poobalasingam T. Metabolic regulation of T lymphocyte motility and migration. *Mol Aspects Med* 2021; 77: 100888. doi:10.1016/j.mam.2020.100888
 - [88] Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G-I, et al. Regulatory Functions of Phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 2017; 37: 127–195. doi:10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20
 - [89] Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 25851–25854. doi:10.1074/jbc.R200007200
 - [90] Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband e.V. Fingolimod Gilenya 2019
 - [91] Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, et al. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 211: 396–403. doi:10.1006/bbrc.1995.1827
 - [92] Khatir B, Barkhof F, Comi G, et al. Comparison of fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised extension of the TRANSFORMS study. *The Lancet Neurology* 2011; 10: 520–529. doi:10.1016/S1474-4422(11)70099-0
 - [93] Tedesco-Silva H, Pescovitz MD, Cibrik D, et al. Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 1689–1697. doi:10.1097/01.tp.0000251718.95622.b3
 - [94] Cohen JA, Arnold DL, Comi G, et al. Safety and efficacy of the selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator ozanimod in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology* 2016; 15: 373–381. doi:10.1016/S1474-4422(16)00018-1
 - [95] Cohen JA, Comi G, Selmaj KW, et al. Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a multicentre, randomised, 24-month, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 2019; 18: 1021–1033. doi:10.1016/S1474-4422(19)30238-8
 - [96] Comi G, Kappos L, Selmaj KW, et al. Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (SUNBEAM): a multicentre, randomised, minimum 12-month, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 2019; 18: 1009–1020. doi:10.1016/S1474-4422(19)30239-X
 - [97] Cohen JA, Comi G, Arnold DL, et al. Efficacy and safety of ozanimod in multiple sclerosis: Dose-blinded extension of a randomized phase II study. *Mult Scler* 2019; 25: 1255–1262. doi:10.1177/1352458518789884
 - [98] European Medicines Agency. Mayzent (23.01.2020). Im Internet: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mayzent>; Stand: 29.12.2021

-
- [99] Behrangi N, Fischbach F, Kipp M. Mechanism of Siponimod: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Mode of Action. *Cells* 2019; 8: 24. doi:10.3390/cells8010024
 - [100] Song Y, Lao Y, Liang F, et al. Efficacy and safety of siponimod for multiple sclerosis: Protocol for a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98: e15415. doi:10.1097/MD.00000000000015415
 - [101] Gardin A, Shakeri-Nejad K, Feller A, et al. Siponimod pharmacokinetics, safety, and tolerability in combination with the potent CYP3A4 inhibitor itraconazole in healthy subjects with different CYP2C9 genotypes. *Eur J Clin Pharmacol* 2019; 75: 1565–1574. doi:10.1007/s00228-019-02729-7
 - [102] Díaz-Villamarín X, Piñar-Morales R, Barrero-Hernández FJ, et al. Pharmacogenetics of siponimod: A systematic review. *Biomed Pharmacother* 2022; 153: 113536. doi:10.1016/j.biopha.2022.113536
 - [103] Gergely P, Nuesslein-Hildesheim B, Guerini D, et al. 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
 - [104] Gentile A, Musella A, Bullitta S, et al. Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 207. doi:10.1186/s12974-016-0686-4
 - [105] Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet* 2018; 391: 1263–1273. doi:10.1016/S0140-6736(18)30475-6
 - [106] Kappos L, Li DKB, Stüve O, et al. Safety and Efficacy of Siponimod (BAF312) in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Dose-Blinded, Randomized Extension of the Phase 2 BOLD Study. *JAMA neurology* 2016; 73: 1089–1098. doi:10.1001/jamaneurol.2016.1451
 - [107] 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
 - [108] Behrangi N, Heinig L, Frintrop L, et al. Siponimod ameliorates metabolic oligodendrocyte injury via the sphingosine-1 phosphate receptor 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2022; 119: e2204509119. doi:10.1073/pnas.2204509119
 - [109] Ma H, O'Kennedy R. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol* 2015; 1348: 7–11. doi:10.1007/978-1-4939-2999-3_2
 - [110] Matthews AGW, Oettinger MA. RAG: a recombinase diversified. *Nat Immunol* 2009; 10: 817–821. doi:10.1038/ni.1776
 - [111] Notarangelo LD, Kim M-S, Walter JE, et al. Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 234–246. doi:10.1038/nri.2016.28
 - [112] Bosticardo M, Pala F, Notarangelo LD. RAG deficiencies: Recent advances in disease pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Eur J Immunol* 2021; 51: 1028–1038. doi:10.1002/eji.202048880
 - [113] Shinkai Y. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992; 68: 855–867. doi:10.1016/0092-8674(92)90029-C
 - [114] Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; 68: 869–877. doi:10.1016/0092-8674(92)90030-G
 - [115] Carlton WW. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life Sci* 1967; 6: 11–19. doi:10.1016/0024-3205(67)90356-6
 - [116] Blakemore WF. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol* 1972; 1: 413–426. doi:10.1007/BF01102943
 - [117] Suzuki K, Kikkawa Y. Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am J Pathol* 1969; 54: 307–325
 - [118] Fischbach F, Nedelcu J, Leopold P, et al. Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3. *Glia* 2019; 67: 263–276. doi:10.1002/glia.23538

-
- [119] Kuhn S, Gritti L, Crooks D, et al. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 2019; 8. doi:10.3390/cells8111424
 - [120] Torkildsen O, Brunborg LA, Myhr K-M, et al. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl* 2008; 188: 72–76. doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01036.x
 - [121] Doucette JR, Jiao R, Nazarali AJ. Age-related and cuprizone-induced changes in myelin and transcription factor gene expression and in oligodendrocyte cell densities in the rostral corpus callosum of mice. *Cellular and molecular neurobiology* 2010; 30: 607–629. doi:10.1007/s10571-009-9486-z
 - [122] Sun S-W, Liang H-F, Trinkaus K, et al. Noninvasive detection of cuprizone induced axonal damage and demyelination in the mouse corpus callosum. *Magn Reson Med* 2006; 55: 302–308. doi:10.1002/mrm.20774
 - [123] Le Blon D, Guglielmetti C, Hoornaert C, et al. Intracerebral transplantation of interleukin 13-producing mesenchymal stem cells limits microgliosis, oligodendrocyte loss and demyelination in the cuprizone mouse model. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 288. doi:10.1186/s12974-016-0756-7
 - [124] Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, et al. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology* 2017; 27: 123–137. doi:10.1111/bpa.12454
 - [125] Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, et al. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia* 2021; 69: 925–942. doi:10.1002/glia.23937
 - [126] Zhan J, Mann T, Joost S, et al. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells* 2020; 9. doi:10.3390/cells9040843
 - [127] Yakimov V, Schweiger F, Zhan J, et al. 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
 - [128] Buonvicino D, Ranieri G, Chiarugi A. Cuprizone-Dependent De/Remyelination Responses and Functional Correlates in Mouse Strains Adopted to Model Relapsing, Chronic and Progressive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurotox Res* 2021; 39: 658–666. doi:10.1007/s12640-021-00331-3
 - [129] Atlas Thumbnails :: Allen Brain Atlas: Mouse Brain (16.01.2024). Im Internet: https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas; Stand: 16.01.2024
 - [130] Brunholz S, Sisodia S, Lorenzo A, et al. Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells. *Exp Brain Res* 2012; 217: 353–364. doi:10.1007/s00221-011-2870-1
 - [131] Reinhard C, Hébert SS, Strooper B de. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 2005; 24: 3996–4006. doi:10.1038/sj.emboj.7600860
 - [132] Selkirk JV, Dines KC, Yan YG, et al. Deconstructing the Pharmacological Contribution of Sphingosine-1 Phosphate Receptors to Mouse Models of Multiple Sclerosis Using the Species Selectivity of Ozanimod, a Dual Modulator of Human Sphingosine 1-Phosphate Receptor Subtypes 1 and 5. *J Pharmacol Exp Ther* 2021; 379: 386–399. doi:10.1124/jpet.121.000741
 - [133] Ohl K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol* 2016; 277: 58–67. doi:10.1016/j.expneurol.2015.11.010
 - [134] Höflich KM, Beyer C, Clarner T, et al. Acute axonal damage in three different murine models of multiple sclerosis: A comparative approach. *Brain Res* 2016; 1650: 125–133. doi:10.1016/j.brainres.2016.08.048
 - [135] Leech S, Kirk J, Plumb J, et al. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33: 86–98. doi:10.1111/j.1365-2990.2006.00781.x
 - [136] Machado-Santos J, Saji E, Tröschner AR, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain* 2018; 141: 2066–2082. doi:10.1093/brain/awy151

-
- [137] Draheim T, Liessem A, Scheld M, et al. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia* 2016; 64: 2219–2230. doi:10.1002/glia.23058
 - [138] 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. doi:10.1016/0022-510x(87)90055-4
 - [139] Dawson TM, Golde TE, Lagier-Tourenne C. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 2018; 21: 1370–1379. doi:10.1038/s41593-018-0236-8
 - [140] Avşar T, Çelikyapi Erdem G, Terzioğlu G, et al. Investigation of neuro-inflammatory parameters in a cuprizone induced mouse model of multiple sclerosis. *Turk J Biol* 2021; 45: 644–655. doi:10.3906/biy-2104-88
 - [141] Nair RR, Corrochano S, Gasco S, et al. Uses for humanised mouse models in precision medicine for neurodegenerative disease. *Mamm Genome* 2019; 30: 173–191. doi:10.1007/s00335-019-09807-2
 - [142] Wekerle H, Flügel A, Fugger L, et al. Autoimmunity's next top models. *Nat Med* 2012; 18: 66–70. doi:10.1038/nm.2635
 - [143] Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathology* 2001; 11: 107–116. doi:10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x
 - [144] Blakemore WF. Remyelination of the superior cerebellar peduncle in old mice following demyelination induced by cuprizone. *J Neurol Sci* 1974; 22: 121–126. doi:10.1016/0022-510x(74)90059-8
 - [145] Ludwin SK. Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest* 1978; 39: 597–612
 - [146] Chen X, Gellert M, Yang W. Inner workings of RAG recombinase and its specialization for adaptive immunity. *Curr Opin Struct Biol* 2021; 71: 79–86. doi:10.1016/j.sbi.2021.05.014
 - [147] Khiong K, Murakami M, Kitabayashi C, et al. Homeostatically proliferating CD4 T cells are involved in the pathogenesis of an Omenn syndrome murine model. *J Clin Invest* 2007; 117: 1270–1281. doi:10.1172/JCI30513
 - [148] Pye D, Watt DJ, Walker C, et al. Identification of the RAG-1 as a suitable mouse model for mitochondrial DNA disease. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 329–336. doi:10.1016/j.nmd.2004.02.010
 - [149] Reuther T, Kübler AC, Staff CJ, et al. The RAG 2 mouse model for xenografted human oral squamous cell carcinoma. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002; 41: 31–35
 - [150] Brück W, Pförtner R, Pham T, et al. Reduced astrocytic NF-κB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 411–424. doi:10.1007/s00401-012-1009-1
 - [151] Hiremath MM, Chen VS, Suzuki K, et al. MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *Journal of neuroimmunology* 2008; 203: 23–32. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.034
 - [152] Cohan SL, Benedict RHB, Cree BAC, et al. The Two Sides of Siponimod: Evidence for Brain and Immune Mechanisms in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 2022; 36: 703–719. doi:10.1007/s40263-022-00927-z
 - [153] Teng G, Maman Y, Resch W, et al. RAG Represents a Widespread Threat to the Lymphocyte Genome. *Cell* 2015; 162: 751–765. doi:10.1016/j.cell.2015.07.009
 - [154] Sock E, Wegner M. Transcriptional control of myelination and remyelination. *Glia* 2019; 67: 2153–2165. doi:10.1002/glia.23636
 - [155] 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
 - [156] Ulrich Dirnagl. Prolog: Translationale neurologische Forschung – From Bench to Bedside. 4. Aufl. Urban & Fischer; 2021

10 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.

Potsdam

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

11 Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), bei der es zur Infiltration peripherer Immunzellen in das ZNS, zur Aktivierung von Immunzellen des ZNS und dem Untergang von Myelin und Oligodendrozyten kommt.
2. Nach der konsensbasierten S2k-Leitlinie existieren elf Medikamente zur Therapie der schubförmigen MS, für die sekundär progressive MS (SPMS) nur vier Medikamente.
3. Die Wirkweise von Siponimod beruht auf einer selektiven Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1PR)-Blockade, welche zu einer Modulation von Lymphozyten führt. Der bisher vorherrschende Therapieansatz in der Medikamentenentwicklung der SPMS fokussiert sich auf die Modulation von Lymphozyten.
4. Im *Rag1*^{-/-}-knockout-Mausmodell lassen sich Cuprizone-induzierte Schäden, wie Demyelinisierung, Mikrogliose und axonale Schädigungen, auslösen.
5. In dem Cuprizone-Tiermodell, einem toxischen Multiple Sklerose Tiermodell, lässt sich mittels Siponimod eine Zytoprotektion im Sinne von folgenden Faktoren vermitteln: Protektion gegenüber Demyelinisierung, Mikrogliose, axonaler Schädigung und dem Untergang von Oligodendrozyten.
6. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cuprizone-induzierte Schäden auch im *Rag1*^{-/-}-knockout-Mausmodell auslösbar sind.
7. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Siponimod unabhängig von einer Lymphozytenmodulation Einfluss auf Zellen des ZNS nimmt.
8. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Siponimod nicht nur immunmodulatorische sondern auch zytoprotektive Effekte vermittelt.
9. Die Kenntnisse über die Funktionsweise von Siponimod sind essentiell zur Weiterentwicklung der Therapieoptionen der SPMS sowie dem tieferen Verständnis der Pathogenese.
10. Zukünftige Untersuchungen sollten sich mit der Verteilung von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (S1PRs) auf verschiedenen Zelltypen und deren Modulation unter Nutzung von z.B. Zellkulturen und speziellen Mauslinien beschäftigen.

Lebenslauf

Allgemeines

Name Emily Santrau

Email emily.santrau@uni-rostock.de

Geburtsdatum 11.12.1997

Staatsbürgerschaft deutsch

Geburtsort Berlin

Akademischer Werdegang

10/2019 – 11/2024 **Humanmedizin**

Universität Rostock

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 10/2023

10/2017 – 09/2019 **Humanmedizin**

AFM Krakowska, Polen

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2010 - 07/2026 **Allgemeine Hochschulreife**

Gymnasium Wandlitz

Publikationen

Behrangi N, Heinig L, Frintrop L, Santrau E, Kurth J, Krause B, Atanasova D, Clarner T, Fragoulis A, Joks M, Rudolf H, Meuth SG, Joost S, Kipp M. Siponimod ameliorates metabolic oligodendrocyte injury via the sphingosine-1 phosphate receptor 5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Oct 4;119(40):e2204509119. doi: 10.1073/pnas.2204509119

Kaddatz H, Joost S, Nedelcu J, Chrzanowski U, Schmitz C, Gingele S, Gudi V, Stangel M, Zhan J, Santrau E, Greiner T, Frenz J, Müller-Hilke B, Müller M, Amor S, van der Valk P, Kipp M. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. Glia. 2021 Apr;69(4):925-942. doi: 10.1002/glia.23937

Klinische Erfahrungen

04/2025 Assistenzärztin für Anästhesie Oberlinklinik Potsdam

07/2024 **PJ Tertial Innere Medizin**

St. Josefs Krankenhaus Potsdam

- 03/2024 **PJ Tertial Chirurgie**
 Martin Luther Krankenhaus Berlin
- 11/2023 **PJ Tertial Gynäkologie**
 St. Josefs Krankenhaus Potsdam
- 08/2022 **Famulatur Allgemeinmedizin**
- 09/2021 **Famulatur Gastroenterologie**
- 08/2021 **Famulatur Gynäkologie**
- 07/2020 **Famulatur Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie**

Sprachen

Deutsch Muttersprache

Englisch C1

Französisch B1