

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktion: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld,
Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

***In vivo* Mechanismen des axonalen Kalziumeinstroms im Tiermodell der Multiplen Sklerose**

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

vorgelegt von
Jan Philipp Bewersdorf
aus Aalen

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Harald Steiner
Prof. Dr. Christian Behrends
Prof. Dr. Benedikt Schoser

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1.) Multiple Sklerose.....	1
1.1.1) Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2) Diagnose, klinischer Verlauf und Behandlungsmöglichkeiten.....	2
1.1.3) Hypothesen zur Entstehung der Multiplen Sklerose.....	6
1.1.4) Pathogenetische Grundlagen der Multiplen Sklerose.....	8
1.1.4.1) Entzündung.....	8
1.1.4.2) Demyelinisierung.....	11
1.1.4.3) Neuronale und axonale Pathologie der Multiplen Sklerose.....	12
1.1.5) Tiermodelle der Multiplen Sklerose.....	13
1.2) Mechanismen axonaler Schädigung im Rahmen der Multiplen Sklerose.....	16
1.3) <i>In-vivo</i> Ca ²⁺ -Mikroskopie.....	20
1.3.1) 2-Photonen Mikroskopie des zentralen Nervensystems.....	20
1.3.2) <i>In-vivo</i> Ca ²⁺ -Mikroskopie und genetisch kodierte Ca ²⁺ -Sensoren.....	23
1.4) Detektion und Mechanismen der Bildung von Membranläsionen.....	26
2.) Zielsetzung.....	30
3.) Material und Methoden.....	31
3.1) Übersicht über die verwendeten Materialien.....	31
3.1.1) Reagenzien.....	31
3.1.2) Werkzeuge und Materialien.....	33
3.1.3) Technische Geräte.....	35
3.2) Versuchstiere.....	36
3.3) Methoden.....	37
3.3.1) Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	37

3.3.2) Operative Prozeduren.....	39
3.3.3) Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen.....	40
3.3.4) <i>In-vivo</i> 2-Photonen-Mikroskopie des Rückenmarks.....	41
3.3.5) Behandlung mit Tocopherol.....	43
3.3.6) Therapie mit ROS- und RNS-Scavengern.....	43
3.3.7) Weitere Gewebeprozessierung und Immunhistochemie.....	44
3.3.8) Konfokalmikroskopie.....	45
3.3.9) Datenauswertung.....	46
3.3.10) Statistische Datenauswertung.....	48
4.) Projektrelevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	49
5.) Ergebnisse.....	52
5.1) Axonale Fluoreszenzfarbstoffaufnahme in akuten EAE-Läsionen.....	52
5.2) <i>In-vivo</i> Mikroskopie zeigt, dass eine Farbstoffaufnahme in Axone mit einer erhöhten axonalen Ca ²⁺ -Konzentration assoziiert ist.....	62
5.3) α-Tocopherol i.p. hat keinen protektiven Effekt auf Axone in der akuten EAE.....	67
6.) Diskussion.....	69
6.1) Stärken und Limitationen einer Detektion von Schäden der axonalen Zellmembran durch intrathekale Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen.....	69
6.1.1) Schlussfolgerungen zur axonalen Farbstoffaufnahme.....	69
6.1.2) Mögliche Mechanismen der Membranschädigung in der EAE.....	71
6.1.3) Dynamik der Entstehung und Reparatur von Membranläsionen.....	73
6.2) Limitationen und weitere Einsatzmöglichkeiten der <i>in-vivo</i> Ca ²⁺ -Mikroskopie.....	75
6.2.1) Simultane Detektion des Ca ²⁺ - und Farbstoffsignals.....	75
6.2.2) Interpretation des Ca ²⁺ -Signals und Limitationen FRET-basierter Ca ²⁺ -Sensoren.....	76
6.2.3) Verbesserungsmöglichkeiten von Ca ²⁺ -Sensoren.....	78
6.3) Potentielle Ursachen und Folgen der gestörten axonalen Ca ²⁺ -Homöostase im Rahmen der akuten EAE.....	79
6.3.1) Mechanismen erhöhter intraaxonaler Ca ²⁺ -Konzentration.....	80
6.3.2) Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies.....	82
6.3.3) Weitere potentielle Erklärungsansätze.....	85
6.3.4) Folgen der axonalen Ca ²⁺ -Überladung.....	86

6.4) Mögliche neue Therapieansätze.....	89
6.5) Zusammenfassende Schlussbemerkungen.....	92
7.) Literaturverzeichnis.....	95
8.) Danksagung.....	109
9.) Eidesstattliche Versicherung.....	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRT-Veränderungen bei MS und liquorspezifische oligoklonale Banden.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Krankheitsverläufe der MS.....	5
Abbildung 3: Mechanismen inflammatorischer Axonschädigung und Demyelinisierung.....	9
Abbildung 4: Axonale Degeneration in der MS und EAE.....	19
Abbildung 5: Vergleich von 2-Photonen- und Konfokalmikroskopie.....	22
Abbildung 6: Illustration von FRET-basierten Ca^{2+} -Indikatoren.....	25
Abbildung 7: Aktive EAE-Induktion in CerTN-L15-Mäusen.....	38
Abbildung 8: Intraoperative Bilder der Laminektomie und intrathekalen Injektion von Dextran Texas Red® 3000.....	41
Abbildung 9: Definition der Regions of Interest (ROIs) und Datenauswertung.....	46
Abbildung 10: Axonales Ca^{2+} in akuten EAE-Läsionen und gesunden Kontrollen.....	49
Abbildung 11: Ca^{2+} als Prädiktor für die weitere Entwicklung von Axonen über Zeit bei akuter EAE.....	50
Abbildung 12: Axonale Farbstoffaufnahme zeigt sich nur in akuten EAE-Läsionen.....	53
Abbildung 13: Quantifizierung des Anteils farbstoffpositiver Axone in den einzelnen Stadien der fokalen axonalen Degeneration für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe.....	55
Abbildung 14: Vergleich der Anteile farbstoffpositiver Axone zwischen ventraler und dorsaler weißer Substanz für Dextran Texas Red® 3000.....	57
Abbildung 15: Interrater- und Interexperimentator-Ratio zwischen Jan Bewersdorf und Maarten Witte für Dextran Texas Red® 3000.....	58
Abbildung 16: Zusammenhang von Durchmesser und Myelinisierungsstatus von Axonen und Farbstoffaufnahme.....	59
Abbildung 17: Dynamik axonaler Membranläsionen anhand der axonalen Farbstoffaufnahme mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe.....	61
Abbildung 18: Ergebnisse der simultanen <i>in-vivo</i> 2-Photonen-Mikroskopie von Ca^{2+} - und Farbstoffsignal in CerTN-L15-Mäusen in akuten EAE-Läsionen.....	64

Abbildung 19: Repräsentative Bilder der simultanen <i>in-vivo</i> 2-Photonen-Mikroskopie von Ca ²⁺ - und Farbstoffsignal in gesunden CerTN-L15-Mäusen und bei akuter EAE.....	65
Abbildung 20: Interrater- und Interexperimentator-Variabilität des Anteils von Axonen mit Farbstoffaufnahme bzw. mit erhöhter Ca ²⁺ -Konzentration.....	66
Abbildung 21: Axonale Morphologie und Farbstoffaufnahme im Vergleich von mit Tocopherol oder Vehikel behandelten CerTN-L15-Mäusen mit akuter EAE.....	68
Abbildung 22: Potentielle Mechanismen intraaxonaler Ca ²⁺ -Konzentrationserhöhung.....	81
Abbildung 23: Effekte von ROS/RNS-Scavengern auf axonale Morphologie und Ca ²⁺ -Haushalt.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tiermodelle der Multiplen Sklerose.....	15
Tabelle 2: Klinisches Scoring-System der EAE.....	39
Tabelle 3: Chemische Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	54

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	artificial cerebrospinal fluid (künstlicher Liquor cerebrospinalis)
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
ASIC	acid-sensing ion channels (pH-Wert-gesteuerte Natrium- und Kalziumkanäle)
ATP	Adenosintriphosphat
BF	Bleed-through-Korrekturfaktor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CD	cluster of differentiation
CerTN-L15	CerTN-L15 Kalziumsensorprotein
CFP	cyan fluorescent protein (cyan fluoreszierendes Protein)
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Da	Dalton
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDSS	extended disability status scale
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	fokale axonale Degeneration
ff.	folgende
FIJI	Fiji is just ImageJ (Fiji ist nur ImageJ)
FITC	Fluoreszein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer (Fluoreszenzresonanzenergietransfer)
fs	Femtosekunden
g	Gramm
GECI	genetically encoded calcium indicators (genetische Kalziumindikatoren)
ggf.	gegebenenfalls
GPx	Glutathionperoxidase
GWAS	genome-wide association studies (genomweite Assoziationsstudien)
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HLA	human leukocyte antigen (humanes Leukozyten-Antigen)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
IFN	Interferon
IL	Interleukin
K ⁺	Kalium
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
LUT	Look-up Tabelle
LWK	Lendenwirbelkörper
MAC	membrane attack complex (Komplement C5b-C9)
MBP	myelin basic protein
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MMF	Midazolam - Medetomidin – Fentanyl
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl der Versuchstiere
Na ⁺	Natrium
NAA	N-acetyl-Aspartat
NaCl	Natriumchlorid
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PMT	Photomultiplier Tube
PPMS	primary progressive multiple sclerosis (primär progrediente Multiple Sklerose)
PRMS	progressive-relapsing multiple sclerosis (progredient schubförmige Multiple Sklerose)
PTP	permeability transition pore (Permeabilitäts-Transitions-Pore)
Ptx	Pertussistoxin

ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RNS	reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis (schubförmig-remittierende Multiple Sklerose)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	Sarco-/Endoplasmatisches Retikulum Kalzium-ATPase
SPMS	secondary progressive multiple sclerosis (sekundär progrediente Multiple Sklerose)
TRP	transient receptor potential (nicht-spannungsgesteuerte Kalziumkanäle)
TRPM4	transient receptor potential melastatin 4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α
Umgeb.	Umgebung
v.a.	vor allem
YFP	yellow fluorescent protein (gelb-fluoreszierendes Protein)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\Delta R/R$	Fraktionelle Änderung der YFP/CFP-Ratio
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, die in Deutschland eine Prävalenz von knapp 300 pro 100.000 Einwohner aufweist und am häufigsten Frauen im Alter von 20-40 Jahren betrifft. Lange Zeit wurde die Demyelinisierung als wichtigster Faktor der Pathophysiologie der MS erachtet. Allerdings haben Forschungsarbeiten in den vergangenen Jahren immer deutlicher gezeigt, dass die irreversible Schädigung von Axonen von entscheidender Bedeutung für das Ausmaß der dauerhaften Behinderung von MS-Patienten ist. Trotz intensiver Bemühungen sind die Prozesse, die zum Verlust von Axonen führen, bislang nur unzureichend verstanden. Besonders in der chronisch progredienten Phase der Erkrankung, die sich bei der Mehrheit der Patienten im Krankheitsverlauf entwickelt, stehen die neurodegenerativen Aspekte im Vordergrund. Während in den vergangenen Jahren mehrere, in erster Linie immunmodulatorisch wirksame Medikamente zur Behandlung der schubförmigen MS zugelassen wurden, sind die Behandlungsmöglichkeiten der chronisch progredienten MS immer noch stark limitiert. Es ist daher von hoher Relevanz, die der axonalen Schädigung zugrundeliegenden Abläufe möglichst detailliert zu verstehen, um daraus in der Zukunft erfolgversprechende neuroprotektive Therapieansätze ableiten zu können.

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist das am weitesten verbreitete Tiermodell der MS in Ratten und Mäusen und hat trotz aller Limitationen wertvolle Erkenntnisse zur Pathogenese der MS geliefert. Aus diesem Modell wurde eine Vielzahl an Hypothesen zur Pathophysiologie der axonalen Degeneration im Kontext autoimmunentzündlicher ZNS-Erkrankungen abgeleitet. In unserem Labor konnte vor einigen Jahren der Prozess der axonalen Schädigung im Rahmen der EAE mittels *in-vivo* Mikroskopie in Echtzeit im intakten Gewebe untersucht werden. Dieser Prozess der sogenannten fokalen axonalen Degeneration (FAD) lässt sich auch durch exogene reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) induzieren und ähnliche Veränderungen finden sich ebenfalls in Hirnautopsien von MS-Patienten. In Vorarbeiten zu der hier vorliegenden Arbeit konnte mittels *in-vivo* 2-Photonen-Kalziummikroskopie weiterhin gezeigt werden, dass Axone in akuten EAE-Läsionen oftmals eine erhöhte intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+})-Konzentration aufweisen und dass diese Störung der Ca^{2+} -Homöostase ein wichtiger Indikator dafür ist, ob ein Axon im weiteren zeitlichen Verlauf einen irreversiblen Degenerationsprozess durchläuft oder ob es der entzündlichen Schädigung widerstehen kann. Zur *in-vivo* 2-Photonen- Ca^{2+} -Mikroskopie werden bei uns im Labor transgene Mäuse verwendet, die unter Kontrolle des neuronenspezifischen Promoters Thy-1 einen FRET-basierten, ratiometrischen Ca^{2+} -Sensor

exprimieren. Nachdem aber bislang kein Auslöser dieser pathophysiologisch relevanten Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration identifiziert werden konnte, befasste ich mich in der hier vorliegenden Arbeit mit der Frage, ob es im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion durch die Produktion von ROS/RNS zu einer oxidativen Schädigung der axonalen Zellmembran kommt und ob diese zu einer nachweisbaren Störung der Membranintegrität führt. Hierzu entwickelte ich einen neuartigen Versuchsaufbau, bei dem ich verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe intrathekal bei gesunden und akut an EAE erkrankten Mäusen injizierte. Dadurch gelang es mir zu zeigen, dass es im Rahmen der akuten EAE zu einer axonalen Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen als Hinweis auf Membranläsionen kommt und dass diese mit dem Ausmaß der morphologischen Schädigung zusammenhängt, aber nicht zwangsläufig eine Demyelinisierung voraussetzt. Durch die Kombination von *in-vivo* 2-Photonen- Ca^{2+} -Mikroskopie und intrathekaler Farbstoffinjektion konnte ich nachweisen, dass Axone mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration signifikant häufiger farbstoffpositiv sind als Axone mit einer physiologisch niedrigen Ca^{2+} -Konzentration. Es liegt also der Schluss nahe, dass die Membranläsionen eine mögliche Ursache für die Störung der axonalen Ca^{2+} -Homöostase sein könnten. Unter Verwendung eines analogen Versuchsaufbaus konnte bei nachfolgenden Experimenten von meinen Kollegen weiterhin gezeigt werden, dass sich eine axonale Farbstoffaufnahme durch den Superoxidanionendonator Pyrogallol induzieren bzw. durch die Applikation von Superoxiddismutase verhindern lässt. Es scheint also möglich, dass die in der EAE von mir beobachtete axonale Farbstoffaufnahme ebenfalls durch ROS/RNS bedingt ist und sich aufgrund dieser Erkenntnisse neue neuroprotektive Behandlungsansätze der EAE und der MS z.B. mit lipophilen Antioxidantien, die ihre Wirkung v.a. an der Zellmembran entfalten, ergeben könnten.

1.) Einleitung

1.1) Multiple Sklerose

Bereits in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts beschrieben Pathologen in Frankreich und England „einen merkwürdigen Erkrankungszustand des Rückenmarks, der von Atrophie begleitet wird“ (Compston, 1988). Der Begriff der Multiplen Sklerose (MS) wurde erstmals im Jahre 1848 von dem französischen Neurologen Jean-Marie Charcot verwendet (Landtblom et al., 2010). Dank intensiver Forschung konnten seit der Erstbeschreibung wichtige Erkenntnisse über die Pathophysiologie der MS gewonnen werden, wobei die genaue Pathogenese der Erkrankung auch heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Die klinischen Symptome und der Krankheitsverlauf des einzelnen MS-Patienten sind äußerst variabel, sodass die richtige Diagnosestellung und die Einleitung einer adäquaten Therapie Ärzte vor große Herausforderungen stellen (Solomon et al., 2016). Diese Unsicherheit ist aber auch eine enorme psychologische Bürde für die betroffenen Patienten, die sich mit einer in ihrem Verlauf unvorhersehbaren und bedrohlichen Erkrankung konfrontiert sehen (Compston und Coles, 2008).

1.1.1) Definition und Epidemiologie

Die MS ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung des Gehirns und Rückenmarks, die zur fokalen Demyelinisierung und Schädigung von Neuronen und deren Fortsätzen führt. Die pathologischen Veränderungen sind hierbei durch die lokale Infiltration vor allem von Lymphozyten bedingt, die in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation zu Episoden diverser neurologischer Symptome führen können (Hohlfeld et al., 2015; Dendrou et al., 2015). Während Remyelinisierung und Rückbildung der neurologischen Symptome besonders zu Beginn der Erkrankung zu einem gewissen Maße möglich sind, sind die neurodegenerativen Folgen der MS irreversibel und nehmen über den bei vielen Patienten über Jahrzehnte andauernden Krankheitsverlauf kontinuierlich zu (Rice et al., 2013). So sind etwa 50% der Patienten 25 Jahre nach der Diagnosestellung auf einen Rollstuhl angewiesen (Dendrou et al., 2015). Entsprechend ist die MS heute auch die häufigste Ursache für eine dauerhafte neurologische Behinderung bei jungen Erwachsenen (Hauser und Oksenberg, 2006). Epidemiologische Daten zeigen, dass die MS bei Menschen weißer Hautfarbe und nordischer Abstammung gehäuft auftritt. Ebenso ist die Prävalenz der Erkrankung in gemäßigten Klimazonen und

volkswirtschaftlich weit entwickelten Ländern überdurchschnittlich hoch (Koch-Henriksen und Sorensen, 2010; Tao et al., 2016). In Deutschland lag die Prävalenz der MS im Jahr 2014 bei 289 pro 100.000 Einwohner, sodass zurzeit knapp 200.000 Menschen mit dieser Diagnose in Deutschland leben. Hervorzuheben ist auch, dass 70% der Patienten Frauen sind und dass die Inzidenz über die vergangenen Jahrzehnte deutlich angestiegen ist (Petersen et al., 2014; Koch-Henriksen und Sorensen, 2010). Angesichts der verhältnismäßig hohen Prävalenz und der erheblichen Kosten für die Langzeitbehandlung der Patienten, die sich z.B. in den USA auf bis zu \$60.000 pro Jahr belaufen können, stellt die MS eine große Herausforderung für die Gesellschaft als Ganzes und das Gesundheitssystem im Speziellen dar (Hartung et al., 2015).

1.1.2) Diagnose, klinischer Verlauf und Behandlungsmöglichkeiten

Die Diagnose einer MS erfolgt primär klinisch und wird durch Befunde der Bildgebung (v.a. Magnetresonanztomographie (MRT)) sowie Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis und der Nervenleitung ergänzt. Da die meisten Krankheitssymptome der MS unspezifisch sind, muss ein breites Spektrum an Differentialdiagnosen wie z.B. Infektionen, zerebrovaskuläre Störungen, Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen in Betracht gezogen werden (Weisfeld-Adams et al., 2015; Solomon et al., 2016; Brownlee et al., 2017). Typische Symptome bei Erstmanifestation können u.a. sensomotorische Defizite, zerebelläre Symptome (Ataxie, Nystagmus, Intentionstremor, skandierende Sprache), Wahrnehmung von Doppelbildern oder ein einseitiger Visusverlust sein. Seltener aber eher MS-spezifisch werden auch das Uhthoff-Phänomen (eine passagere Zunahme der Symptome bei Erhöhung der Körper- oder Umgebungstemperatur) und das Lhermitte-Zeichen (Durch Kopfflexion auslösbare Parästhesien und Dysästhesien, die vom Nacken entlang der Wirbelsäule in die Extremitäten ausstrahlen) beobachtet (Dendrou et al., 2015; Compston und Coles, 2008; Brownlee et al., 2017).

Ungefähr 80-85% der Patienten stellen sich initial mit neurologischen Ausfällen vor, die auf eine bestimmte anatomische Lokalisation wie z.B. den Nervus opticus beschränkt sind und als klinisch isoliertes Syndrom bezeichnet werden (Compston und Coles, 2008; Dendrou et al., 2015). Für die Diagnose einer MS ist aber die Erfüllung der McDonald-Kriterien erforderlich, die letztmals 2010 überarbeitet wurden (Polman et al., 2011). Entsprechend dieser Kriterien ist es für die Diagnosestellung einer schubförmig remittierenden MS (relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS)) erforderlich, dass sowohl das Kriterium der räumlichen als auch der zeitlichen Dissemination erfüllt wird. Dies ist der Fall, wenn im Verlauf entweder ein

zweiter Schub neurologischer Ausfälle, der eine andere Stelle des zentralen Nervensystems (ZNS) betrifft und mindestens 30 Tage nach dem ersten Schub beginnt, hinzukommt oder MS-typische Veränderungen im MRT mit Kontrastmittel vorhanden sind. Während das klinische Bild für die Diagnosestellung prinzipiell ausreicht, können apparative Untersuchungen im Zweifelsfall wichtige weitere Hinweise liefern. Die MRT zeigt beispielsweise bei über 95% der Patienten multiple, asymmetrisch verteilte Läsionen im ZNS und ermöglicht sowohl eine Abschätzung des Gesamtausmaßes der Läsionen als auch deren Alters und entzündlichen Aktivität (**Abbildung 1**). Letzteres basiert auf der Anwendung von Gadolinium als Kontrastmittel, das als Indikator für eine entzündlich bedingte erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke genutzt wird und die Unterscheidung zwischen akuten, Kontrastmittelanreichernden und älteren Läsionen ermöglicht, die Gadolinium nicht mehr aufnehmen. Ähnliche Veränderungen können jedoch auch bei gesunden Probanden beobachtet werden und das Ausmaß der MRT-Veränderungen korreliert nicht immer mit dem klinischen Bild der Patienten. Daher sollte nochmals betont werden, dass die MS primär eine klinische Diagnose ist, aber die MRT eine wertvolle ergänzende Untersuchung darstellt, um den zeitlichen Verlauf der Erkrankung darzustellen und zu dokumentieren (Filippi et al., 2016; Rovira et al., 2015).

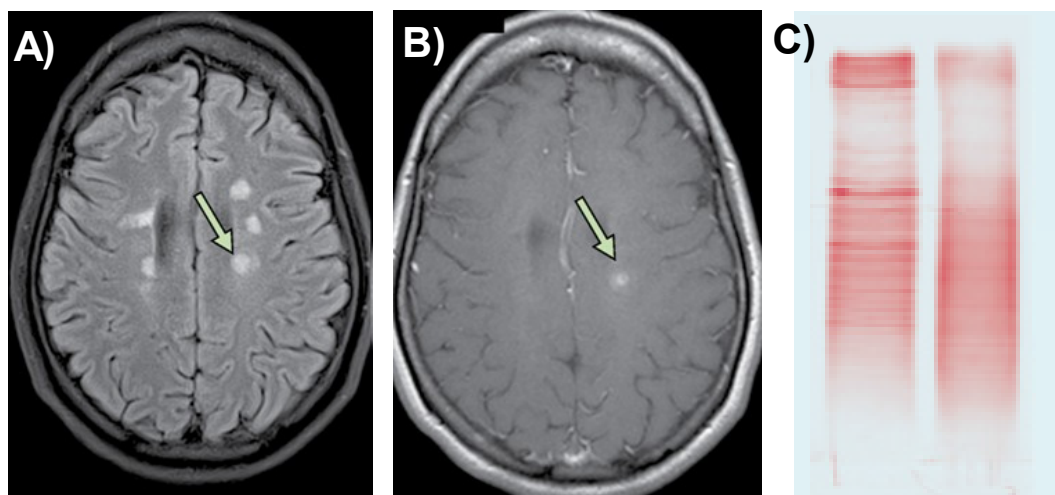


Abbildung 1: MRT-Veränderungen bei MS und liquorspezifische oligoklonale Banden

Axiale, T2- (A) bzw. T1-gewichtete, Kontrastmittel-verstärkte (B) MRT-Bilder; Pfeile weisen auf multiple hyperintense Läsionen in der subkortikalen weißen Substanz in MS-typischer Lokalisation (periventrikulär) und z.T. mit fokaler Kontrastmittelanreicherung als Hinweis auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke und akute entzündliche Aktivität hin. (C) Liquorspezifische oligoklonale Banden in Liquorproteinelektrophorese als Ausdruck einer intrathekalen Antikörperbildung. (A) und (B) übernommen aus (Brownlee et al., 2017); (C) aus (Compston und Coles, 2008)

Die Untersuchung visuell, akustisch oder somatosensorisch evozierter Potenziale bietet eine sehr sensitive, ergänzende Möglichkeit zur Diagnosestellung einer MS. Typisch ist eine verlängerte Latenz der Reizleitung als Korrelat der Demyelinisierung von Axonen und der daraus resultierenden Störung der Signalübertragung (Brownlee et al., 2017). Darüber hinaus ist der Nachweis von liquorspezifischen oligoklonalen Banden in der Proteinelektrophorese des Liquors, die auf eine intrathekale Antikörperproduktion hindeuten, in Kombination mit einer mäßigen lymphomonozytären Pleozytose und einer geringen Erhöhung des Gesamtproteins typisch für die MS (Freedman et al., 2005; Disanto et al., 2012; Stangel et al., 2013).

Der klinische Verlauf der MS ist äußerst variabel und in Bezug auf den einzelnen Patienten nicht sicher vorhersagbar. Das Spektrum reicht von seltenen Schüben mit geringen sensorischen Ausfällen bis hin zu fulminanten Verläufen mit letalem Ausgang innerhalb von wenigen Monaten (Disanto et al., 2010). Eine wichtige Unterscheidung hierbei ist, ob ein Patient unter rezidivierenden Schüben (relapses) leidet, die sich im Verlauf oft ohne Residuen zurückbilden (remission) oder ob sich die Symptome kontinuierlich verschlechtern. Ca. 85% aller MS-Patienten leiden initial an dieser ersten schubförmig remittierenden Form (relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS)), wobei die Schubfrequenz selten mehr als 1 bis 2 Schübe pro Jahr beträgt. Im Verlauf der Erkrankung ist jedoch die Erholung zunehmend unvollständig und es kommt zu einer Anhäufung von bleibenden neurologischen Defiziten. Nach 10-15 Jahren einer RRMS, entwickelt sich bei 70% der Patienten eine sekundär progrediente Form der Erkrankung (secondary progressive multiple sclerosis (SPMS)) (Ontaneda et al., 2017). Ein kleinerer Anteil (15%) der Patienten zeigt einen Krankheitsverlauf, der als primär progrediente MS (primary progressive MS (PPMS)) bezeichnet wird und durch eine kontinuierliche Verschlechterung der neurologischen Symptome von Erkrankungsbeginn an charakterisiert ist. Sofern der Verlauf bei der primär progredienten MS noch durch akute Krankheitschübe kompliziert wird, spricht man von einer progredient schubförmigen MS (progressive-relapsing MS (PRMS)) (Confavreux und Vukusic, 2014). Interessanterweise beginnen sowohl die primär als auch die sekundär progrediente MS im Mittel im Alter von ungefähr 40 Jahren und manifestieren sich meist im Rückenmark, was vermuten lässt, dass hierbei ein anderer, primär neurodegenerativer und weniger ein inflammatorischer Pathomechanismus vorliegen könnte (Ontaneda et al., 2017). Eine schematische Übersicht für die verschiedenen Verlaufsformen der MS ist in **Abbildung 2** dargestellt.

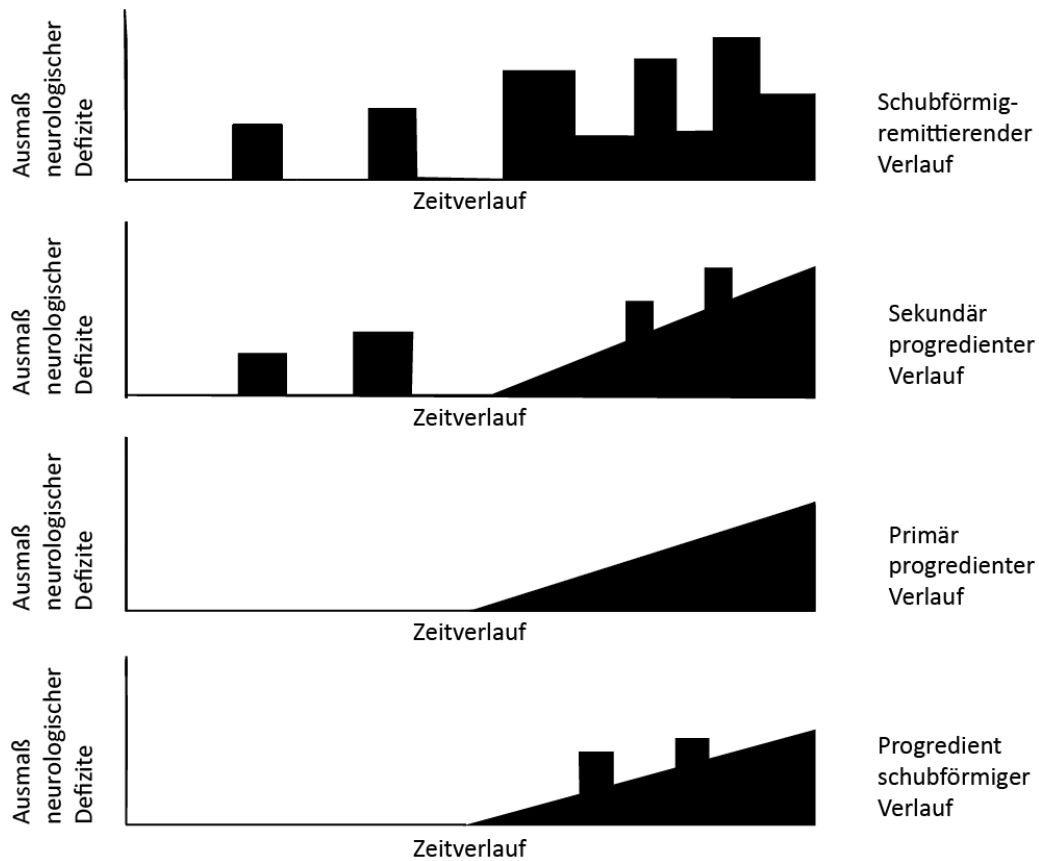


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Krankheitsverläufe der MS

Die RRMS ist definiert als akute Schübe mit kompletter oder teilweiser Symptommrückbildung aber ohne Progression der Erkrankung im Intervall zwischen den Schüben. Sie geht oft nach Jahren in einen sekundär progredienten Verlauf über, der durch akute Schübe, unvollständige Symptommrückbildung und kontinuierliche Krankheitsprogression gekennzeichnet ist. Die PPMS ist charakterisiert durch eine stetige Verschlechterung der neurologischen Symptome. Falls dabei zusätzlich einzelne Schübe mit unvollständiger Symptommrückbildung auftreten, spricht man von einem progredient schubförmigen Verlauf.

Die Lebenserwartung von MS-Patienten ist um ca. 7-14 Jahre gegenüber der Allgemeinbevölkerung reduziert und über 50% der Patienten sterben an den Folgen der Erkrankung. Infolge der stetig zunehmenden Behinderung während der progredienten Krankheitsphase, sind die Patienten anfälliger für Infektionen, sodass diese bzw. deren Komplikationen die häufigste MS-assoziierten Todesursachen darstellen (Scalfari et al., 2013). Von besonderer Bedeutung für die Behandlung und Betreuung von MS-Patienten ist auch die im Verhältnis zur Allgemeinbevölkerung erhöhte Prävalenz von Depressionen (Lebenszeitprävalenz von 50-60% bei MS-Patienten) und eine um bis zu 7,5-fach erhöhte Suizidrate im Verhältnis zu gleichaltrigen gesunden Kontrollen (Scalfari et al., 2013). Entsprechend aufmerksam sollten Ärzte daher auf eventuelle affektive Symptome achten bzw. gezielt auch diese explorieren.

Die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie von 2012 definiert einen Schub als eine akute zentralnervöse Symptomatik, die mindestens 24 Stunden anhält, mit einem Zeitintervall von mindestens 30 Tagen zu einem vorherigen Schub auftritt und sich nicht auf Änderungen der Körpertemperatur oder Infektionen zurückführen lässt (Diener, 2012). Die Behandlung während eines akuten symptomatischen Schubs erfolgt mit Glukokortikoiden oder Plasmapherese (Le Page et al., 2015; Weinshenker et al., 1999). Zur Reduktion bzw. Hinauszögerung bleibender neurologischer Defizite ist zusätzlich die möglichst frühzeitige Einleitung einer, den krankheitsverlaufmodulierenden Dauertherapie erforderlich (Comi et al., 2017). Die meisten der verfügbaren Behandlungsoptionen bewirken eine Modulation oder Suppression des Immunsystems und insbesondere der Lymphozyten, um vorrangig die Schubfrequenz zu reduzieren. Allerdings sind diese immunmodulatorischen Substanzen teuer und die Nebenwirkungen können erheblich und wie im Fall der progredienten multifokalen Leukenzephalopathie sogar tödlich sein, sodass eine engmaschige Kontrolle und ggf. Therapieanpassung erfolgen muss (Havla et al., 2015; Carrithers, 2014). Während verschiedene neue immunmodulatorische Behandlungsmöglichkeiten für die RRMS zugelassen wurden und erfolgreich eingesetzt werden, ist festzuhalten, dass bislang weder eine kausale Therapie noch wirksame Medikamente für die Behandlung der progredienten MS zur Verfügung stehen (Ontaneda et al., 2017). In diesen Krankheitsstadien ist die Behandlung v.a. auf die Kontrolle von alltagsrelevanten Symptomen wie z.B. Mobilitäts- und Gleichgewichtsstörungen, Harninkontinenz, Muskelspastizität und Schmerzen sowie psychologische und soziale Unterstützung ausgerichtet (Feinstein et al., 2015).

1.1.3) Hypothesen zur Entstehung der Multiplen Sklerose

Die Pathogenese der MS ist noch nicht vollständig aufgeklärt und die Erkenntnisse darüber entwickeln sich kontinuierlich weiter. Basierend auf epidemiologischen Beobachtungen wurde vermutet, dass die MS durch einen spezifischen, wenn auch noch unbekanntem, infektiösen Auslöser bedingt sein könnte (Kurtzke, 1993). Jedoch haben epidemiologische Studien gezeigt, dass auch genetische, sozioökonomische und Umweltfaktoren Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, eine MS zu entwickeln, haben (Dendrou et al., 2015; Belbasis et al., 2015).

Hinweise auf einen genetischen Einfluss bei der Pathogenese der MS liefert die Beobachtung einer familiären Häufung der Erkrankung bei 20% der Betroffenen und die höhere Konkordanzrate bei monozygoten (25%) im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (5%)

(Compston und Coles, 2008). Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) konnten fast 200 genetische Varianten identifiziert werden, die oft „human leukocyte antigen“ (HLA)-Gene betreffen, und mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer MS in Verbindung gebracht werden (Axisa und Hafler, 2016; Hemmer et al., 2015; Sawcer et al., 2014). Zwar sind die meisten dieser Suszeptibilitätsloci in Genen lokalisiert, die für die Regulation der Funktion und Differenzierung von T-Helferzellen zuständig sind, aber auch Gene u.a. für Interleukin-2 und Interferone scheinen im Rahmen einer genetischen MS-Prädisposition eine Rolle zu spielen (Dendrou et al., 2015; International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011). Genetische Untersuchungen zeigten auch, dass die MS hinsichtlich möglicher Suszeptibilitätsloci eine Überschneidung mit anderen Autoimmunerkrankungen aufweist, während diese mit klassischen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. M. Alzheimer und M. Parkinson deutlich geringer ist (Dendrou et al., 2015). Insgesamt geht man davon aus, dass ca. 30% des Erkrankungsrisikos durch genetische Faktoren erklärbar sind (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2013). Basierend auf GWAS konnte sogar ein Algorithmus entwickelt werden, der eine Vorhersage des Verteilungsmusters von entzündlichen Läsionen in der MRT ermöglicht (Gourraud et al., 2013). Allerdings ist zu betonen, dass viele der Treffer aus GWAS Genpolymorphismen betreffen, die nicht für Proteine kodieren, sodass auch epigenetische Veränderungen und Unterschiede in der Genregulation einen Einfluss haben könnten, wobei diese komplexen Interaktionen heute noch nicht ausreichend verstanden sind (Farh et al., 2015). Ebenso muss man sich bewusst sein, dass aus einer statistischen Korrelation nicht zwangsläufig auch ein kausaler Zusammenhang folgt (Dendrou et al., 2015).

Die weltweite Verteilung der MS mit Prävalenzraten, die mit der Entfernung vom Äquator zunehmen, und die Beobachtung, dass die Migration von einer Region mit hohem Erkrankungsrisiko in eine mit niedrigerem Risiko während der Kindheit mit einem protektiven Effekt verbunden ist, legt eine Beteiligung von Umweltfaktoren an der MS-Entstehung nahe (Dendrou et al., 2015; Tao et al., 2016). Da in großen epidemiologischen Studien gezeigt werden konnte, dass Individuen, die in früher Kindheit nicht gegenüber Epstein-Barr-Virus (EBV) exponiert waren, ein deutlich geringeres Risiko haben, an MS zu erkranken als EBV-seropositive Individuen, wird immer wieder auch eine infektiöse Komponente bei der Entwicklung einer MS diskutiert (Ascherio und Munger, 2007). Allerdings sind nicht nur Antikörper gegen EBV, sondern auch gegen andere Viren wie z.B. Varicella-Zoster- oder Herpes-Simplex-Virus bei ca. 90% der MS-Patienten im Liquor nachweisbar (Otto et al., 2011). Daher geht man ursächlich nicht von einer spezifisch gegen EBV-gerichteten Immunreaktion, sondern von einer polyspezifischen humoralen Immunantwort innerhalb des ZNS aus, die

durch die Kreuzreaktivität zwischen Proteinen der Myelinscheiden, und viralen Antigenen bedingt ist (Levin et al., 2010; Lang et al., 2002; Otto et al., 2011). Allerdings gibt es widersprüchliche Berichte über die Akkumulation von EBV-infizierten B-Lymphozyten in MS-Läsionen und der zugrunde liegende Mechanismus konnte ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Ascherio et al., 2012; Willis et al., 2009). Weitere Umweltfaktoren, denen in epidemiologischen Studien bei der Entwicklung einer MS eine mögliche Rolle als Triggerfaktoren zugeschrieben werden, sind Zigarettenkonsum, Mangel an Melatonin und Vitamin D, klimatische Einflüsse und die Exposition gegenüber toxischen chemischen und Umweltschadstoffen (Bar-Or, 2016; Belbasis et al., 2015; Farez et al., 2015; Gianfrancesco et al., 2017). Mit Ausnahme einer EBV-Infektion und von Zigarettenkonsum ist die Evidenz aber oft uneinheitlich und zum Teil auch methodisch zweifelhaft (Bebasis et al., 2015).

1.1.4) Pathogenetische Grundlagen der Multiplen Sklerose

Trotz der großen Heterogenität zwischen den Krankheitsverläufen und klinischen Ausprägungen der MS beim einzelnen Patienten, ist die gemeinsame Endstrecke bei allen Betroffenen die Bildung von demyelinisierenden Plaques im ZNS. Diese Veränderungen sind das Resultat eines entzündlichen Prozesses, der nicht nur die weiße Substanz betrifft und zur Demyelinisierung und dem Verlust von Oligodendrozyten führt, sondern sich auch in der grauen Substanz als Verlust von Neuronen und Axonen manifestiert (Lassmann, 2013).

1.1.4.1) Entzündung

Charakteristisch für MS-Läsionen ist ein entzündliches Infiltrat innerhalb des ZNS, das v.a. aus Makrophagen und T-Lymphozyten, aber auch zu einem geringeren Anteil aus B-Lymphozyten und Plasmazellen besteht, die aus der Peripherie über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS einwandern (Lassmann, 2013; Hemmer et al., 2015). Die sklerotischen Plaques und entzündlichen Infiltrate bei der MS sind am stärksten um die Seitenventrikel, das Corpus callosum, den Hirnstamm, den Nervus opticus und die subkortikale weiße Substanz ausgeprägt, was eine Fehlsteuerung lokaler Immunregulationsprozesse nahelegt (Compston und Coles, 2008). Es wurden zwei Hypothesen zur Erklärung der immunologischen Mechanismen der Entwicklung und der ersten Krankheitsphasen der MS proklamiert.

Erstens wird postuliert, dass die MS eine primäre autoimmune Entzündung sei, wobei die Autoreaktivität durch eine Kreuzreaktion zwischen körpereigenen Autoantigenen und Pathogen-assoziierten Antigenen in peripheren Geweben wie z.B. Haut, Gastrointestinaltrakt oder Lunge entsteht. Nach peripherer Aktivierung und Migration ins ZNS produzieren autoreaktiven Lymphozyten lokal Zytokine, reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) sowie Autoantikörper. Dies wiederum führt zu einer lokalen Funktionsstörung von Oligodendrozyten und Astrozyten, einer Schädigung der Myelinscheiden, Aktivierung lokaler Mikroglia und erhöhter Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, wodurch es zu einer noch stärkeren Invasion von autoreaktiven Immunzellen ins ZNS kommt (Hemmer et al., 2015; Bar-Or, 2016). Dieses Konzept der Entstehung von autoreaktiven Lymphozyten primär in peripheren Geweben wie z.B. dem Gastrointestinaltrakt basiert v.a. auf Erkenntnissen aus Tiermodellen wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wobei in diesen Modellen v.a. $CD4^+$ -T-Zellen von zentraler Bedeutung sind (Hemmer et al., 2015; Korn und Kallies, 2017). Für die EAE konnte z.B. gezeigt werden, dass die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen wie der Milz erfolgt und dass deren Aktivierung durch Autoantigen-präsentierende Zellen im leptomeningealen Raum über major histocompatibility complex (MHC)-II vermittelt wird, was ebenfalls die Bedeutung von $CD4^+$ -T-Zellen für dieses Modell unterstreicht (Kyratsous et al., 2017). Zusätzlich scheinen, die fehlende Suppression der Aktivität von T-Effektorzellen durch regulatorische T-Zellen (Correale und Villa, 2010) und die ausbleibende Apoptose dieser autoreaktiven T-Zellen außerhalb des ZNS zur Entstehung der Autoreaktivität bei der MS beizutragen (Shi et al., 2007; Hemmer et al., 2015).

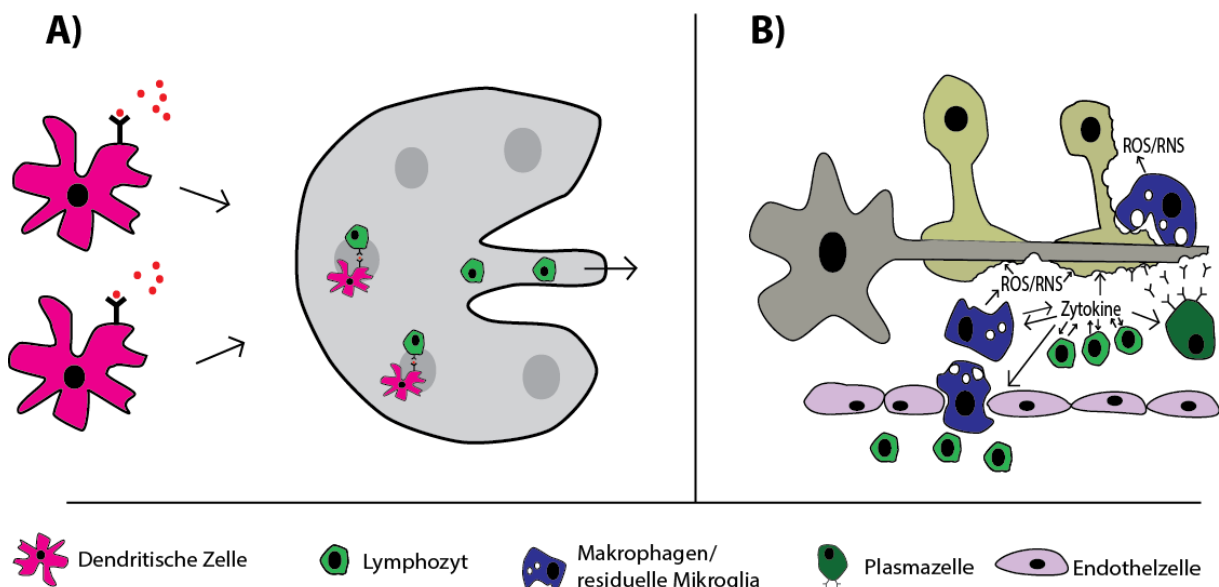


Abbildung 3: Mechanismen der inflammatorischen Axonschädigung und Demyelinisierung

(A) Analog zur EAE werden im extrinsischen Modell Antigene von dendritischen Zellen in peripheren Geweben prozessiert, die dann in regionären Lymphknoten Lymphozyten ($CD4^+$ / $CD8^+$ -T-Lymphozyten und B-Lymphozyten) aktivieren. (B) Nach peripherer Aktivierung wandern autoreaktive Makrophagen, T-Lymphozyten und Plasmazellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS ein. Durch die lokale Produktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Interferon- γ , IL-17 und TNF- α kommt es zur Aktivierung der residuellen Mikroglia und von Makrophagen, die u.a. durch die Bildung von ROS/RNS Oligodendrozyten, Myelinscheiden und neuronale Strukturen schädigen sowie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke weiter erhöhen. Ebenfalls erfolgt eine intrathekale Bildung von Autoantikörpern, die durch Aktivierung des Komplementsystems ebenfalls zur Demyelinisierung beitragen.

Eine alternative Hypothese beschreibt hingegen, dass das auslösende Ereignis nicht die periphere Aktivierung des adaptiven Immunsystems ist, sondern ein neurodegenerativer oder infektiöser Prozess, der erst sekundär über die Aktivierung der residuellen Mikroglia, die Teil des angeborenen Immunsystems des ZNS ist, zur Entzündung führt (Dendrou et al., 2015; Hemmer et al., 2015). Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems im ZNS führt durch die dauerhafte Aktivierung proinflammatorischer Signalwege zu einer chronischen Entzündungsreaktion, die bereits mit diversen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. M. Alzheimer in Verbindung gebracht wurden (Heneka et al., 2014). Für die MS wurde beobachtet, dass bereits in makroskopisch normal erscheinender weißer Substanz und in präphagozytären Läsionen die Mikroglia aktiviert ist und Oligodendrozyten verloren gehen, obwohl noch kein lymphozytäres Infiltrat zu beobachten ist (Henderson et al., 2009). Es wird vermutet, dass die initiale Mikrogliaaktivierung durch die Schädigung von Oligodendrozyten bedingt ist und es so zur Freisetzung von ZNS-spezifischen Antigenen kommt. Diese Antigene verlassen dann das ZNS über den Liquor cerebrospinalis oder werden über die Lymphe in zervikale Lymphknoten drainiert. Dort erfolgt dann die periphere Aktivierung von Lymphozyten und deren Migration in das ZNS. Auch Lymphabflusswege entlang der duralen Hirnsinus könnten aufgrund der Nähe zu den Meningen und den bei der MS häufig vorhandenen perimeningealen Infiltraten hierbei eine Rolle spielen (Louveau et al., 2015; Korn und Kallies, 2017). Der Mechanismus der initialen Oligodendrozytenschädigung ist allerdings nicht bekannt (Dendrou et al., 2015). Außerdem konnten keine primären genetischen Defekte von Oligodendrozyten im Rahmen von genetischen Studien bei MS-Patienten identifiziert werden. Da bislang auch kein infektiöser Auslöser nachgewiesen werden konnte, ist diese Hypothese zurückhaltend zu bewerten (Hemmer et al., 2015).

Neben T-Lymphozyten rücken seit einigen Jahren auch B-Lymphozyten als antikörperproduzierende und antigenpräsentierende Zellen in den Fokus (Wekerle, 2017). Einerseits sind liquorspezifische oligoklonale Banden in der Liquorproteinelektrophorese als Ausdruck einer intrathekalen Immunreaktion schon lange als diagnostischer und prognostischer Marker in klinischer Anwendung (Hohlfeld et al., 2016), andererseits zeigen B-Zell-depletierende monoklonale Antikörper wie z.B. der CD20-Antikörper Rituximab Erfolge in der Behandlung der MS (Hauser et al., 2008). In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Antigene wie z.B. Myelinproteine, α -B-Crystallin, das eine Rolle bei der Suppression von Autoreaktivität spielt, und Neurofascin, das am Aufbau der Ranvier'schen Schnürringe beteiligt ist, als Zielstrukturen für die Autoantikörper bei der MS postuliert (Compston und Coles, 2008; Mathey et al., 2007; Hohlfeld et al., 2016). Hervorzuheben sind an dieser Stelle anti-MOG-Antikörper, die zum Teil bei Patienten mit diversen autoentzündlichen demyelinsierenden ZNS-Erkrankungen einschließlich der MS nachweisbar sind (Hohlfeld et al., 2016; Reindl et al., 2013). Die Histopathologie der MS ist zwar sehr variabel, aber es konnte gezeigt werden, dass es durch die Bildung von spezifischen Antikörpern, die sich gegen Strukturen der Myelinscheiden richten, zu einer durch das Komplementsystem mediierten Demyelinisierung kommen kann (Lucchinetti et al., 2000). Auch eine Rolle bei den pathologischen Veränderungen des Kortex ist denkbar, da kortikale Läsionen sich oftmals entlang der subpialen Oberfläche ausbreiten und mit entzündlichen Veränderungen der Meningen assoziiert sind, was die Beteiligung eines löslichen Faktors als Trigger für die Läsionsentstehung nahelegt (Hemmer et al., 2015).

1.1.4.2) Demyelinisierung

Ein weiteres Charakteristikum der MS sind die verschiedenen demyelinisierten Läsionen, die prinzipiell das gesamte ZNS betreffen können. Die MS wurde ursprünglich als eine Erkrankung angesehen, die sich in erster Linie durch eine Autoimmunreaktion gegen die Myelinscheiden und eine daraus resultierende Störung der axonalen Übertragung von Aktionspotentialen auszeichnet, wodurch die neurologischen Ausfälle der Patienten bedingt seien. In den vergangenen Jahren konnte allerdings immer deutlicher gezeigt werden, dass es verschiedene Formen der Oligodendrozytenschädigung gibt, die sich auch bezüglich der zugrunde liegenden Pathophysiologie unterscheiden. Einen Vorschlag zur histopathologischen Klassifikation verschiedener Grundmuster der Demyelinisierung und den ursächlichen Mechanismen publizierte die Arbeitsgruppe um Hans Lassmann (Lucchinetti et al., 2000). Demnach kann die Demyelinisierung im Rahmen der MS durch autoreaktive T-Zellen bedingt sein, die Makro-

phagen oder Mikroglia aktivieren, was entweder direkt zur Demyelinisierung führen kann (Typ I) oder durch die Bildung von toxischen Substanzen wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α oder ROS/RNS eine Schädigung der Oligodendrozyten bewirkt (Typ IV). Alternativ kann es durch die Bildung von Autoantikörpern, die sich gegen Strukturen der Myelinscheiden richten, zu einer durch das Komplementsystem medierten Demyelinisierung kommen (Typ II). Die distale Oligodendropathie (Typ III) wird in Fällen einer virusinduzierten Schädigung der weißen Substanz beobachtet, wobei es zu einer T-Zell vermittelten Vaskulitis kommt, die v.a. kleine Gefäße betrifft und über eine ischämische Schädigung der Oligodendrozyten zur Demyelinisierung führt. Autopsiebefunde an MS-Patienten zeigen allerdings, dass v.a. die Demyelinisierungsmuster I und II vorherrschen (Lassmann et al., 2001).

Die Demyelinisierung stellt aber kein irreversibles Faktum dar, sondern selbst im ausgereiften ZNS existiert ein gewisser Pool an Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, die sich oftmals in der Umgebung von akuten entzündlichen Läsionen befinden (Scolding et al., 1998; Rice et al., 2013). Diese Vorläuferzellen ermöglichen eine Remyelinisierung, die bei ca. 20% der Patienten erfolgreich verläuft (Patrikios et al., 2006) und sich in Gewebebiopsien als sogenannte „shadow plaques“ nachweisen lässt. Bedauerlicherweise ist diese Regenerationsfähigkeit zwischen Patienten sehr heterogen ausgeprägt (Bodini et al., 2016) und insgesamt limitiert, was aber eher nicht durch einen Mangel an Oligodendrozytenvorläuferzellen, sondern eine lokale Inhibition der Remyelinisierung bedingt zu sein scheint (Ontaneda et al., 2017)

1.1.4.3) Neuronale und axonale Pathologie der Multiplen Sklerose

Während bereits Jean-Marie Charcot axonale Schäden im Rahmen der MS beschrieb, rückte in den darauffolgenden Jahren die Grundvorstellung von der MS als einer autoimmunvermittelten demyelinisierenden Erkrankung in den Mittelpunkt. Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der Entzündungsprozess auch eine erhebliche Schädigung der Neurone und ihrer Axone bewirkt (Wilkins und Scolding, 2008). Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass es in akuten entzündlichen Läsionen zu einer Durchtrennung von Axonen kommt und dass diese Veränderungen eng mit einer Infiltration durch T-Zellen und einer lokalen Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia assoziiert sind (Trapp et al., 1998). Autopsiebefunde von MS-Patienten zeigten, dass bis zu 80% der Axone in einzelnen Bahnen im Verlauf geschädigt werden (Hemmer et al., 2015). Außerdem lässt sich eine axonale Schädigung bereits in sehr frühen Läsionsstadien und sogar in noch normal erscheinender weißer

Substanz nachweisen (Lassmann, 2013). Es bleibt daher unklar, ob bei der MS die entzündliche Demyelinisierung oder die neurodegenerativen Veränderungen die initialen Veränderungen im Rahmen der Erkrankung darstellen.

Interessanterweise sind einzelne axonale Bahnen des ZNS unterschiedlich anfällig für Schädigungen, wobei Axone mit einem geringeren Durchmesser empfindlicher erscheinen als Axone mit größerem Kaliber (Wilkins und Scolding, 2008). Sowohl Demyelinisierung als auch axonale Schädigung laufen in jeder sich neu bildenden Läsion ab. Aber während das ZNS eine – zwar begrenzte – Fähigkeit zur Remyelinisierung hat, ist die axonale Schädigung irreversibel und über den Krankheitsverlauf progredient, sodass über die Zeit in einzelnen Bahnen im ZNS bis zu 80% der Axone verloren gehen können (Hemmer et al., 2015). Die axonale Schädigung ist auch wesentlich verantwortlich für die progredienten und irreversiblen neurologischen Defizite von MS-Patienten (Criste et al., 2014; Ontaneda et al., 2017). Insbesondere MRT-Untersuchungen ermöglichen die Beobachtung und Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der pathologischen Veränderungen im Rahmen der MS. Bei Patienten mit langjährigem MS-Verlauf lassen sich z.B. neben der globalen Atrophie v.a. der weißen Substanz auch Atrophien einzelner kortikaler Areale beobachten, was mit dem Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung korreliert (Filippi, 2015; Gass et al., 2015; Steenwijk et al., 2016). Besonders T1-hypointense Läsionen werden als Ausdruck der Neurodegeneration und des Verlustes von Axonen interpretiert und korrelieren in ihrem Ausmaß mit dem Grad der Behinderung von MS-Patienten (Filippi et al., 2016). Außerdem zeigten experimentelle Ansätze zur funktionellen Bildgebung wie z.B. die MR-Spektroskopie die Reduktion von N-acetyl-Aspartat, einem Marker für Neurone und Axone, die mit dem Ausmaß neurologischer Defizite korreliert und im Krankheitsverlauf zunimmt (Ciccarelli et al., 2014).

1.1.5 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Bereits 1935 beschrieben Rivers et al. einen Versuch, bei dem sie durch die wiederholte Injektion von Gehirnextrakten und -emulgaten in Rhesusaffen eine sterile Entzündungsreaktion induzieren konnten, die zu einer Demyelinisierung im ZNS führte (Rivers und Schwentker, 1935). Seither sind diverse Tiermodelle entwickelt worden, die der Heterogenität der MS bezüglich Krankheitsverlauf und –schwere zumindest teilweise Rechnung tragen. Das am weitesten verbreitete Tiermodell der MS ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Die EAE stellt jedoch keine eindeutig definierte Krankheitsentität dar, sondern es be-

stehen in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Spezies und Tierlinie erhebliche Unterschiede. So reicht etwa das Spektrum der autoimmunvermittelten neurologischen Störungen von einem monophasischen paralytischen Verlauf hin zu chronisch schubförmigen und progredienten neurologischen Defiziten (Lassmann und Bradl, 2017). Trotz aller Limitationen spiegeln diese Modelle viele klinische und histopathologische Aspekte der MS wie z.B. die fokale Demyelinisierung im ZNS oder das entzündliche Infiltrat aus Lymphozyten und Makrophagen wieder. Die Induktion der EAE kann entweder durch aktive Immunisierung der Tiere mit Myelinantigenen wie z.B. „Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)“, die in einem Adjuvans (meist eine Emulsion aus inaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* Bakterien und Paraffinöl) gelöst werden, oder durch passiven Transfer von aktivierten Myelin-spezifischen T-Zellen erfolgen (Stromnes und Goverman, 2006).

Eine wesentliche Limitation dieses klassischen EAE-Modells ist, dass die Entzündung v.a. im Rückenmark und nur zu einem deutlich geringeren Teil auch im Gehirn lokalisiert ist, was einen erheblichen Unterschied zur MS darstellt. Daher wurden zusätzliche, sogenannte atypische EAE-Modelle entwickelt, die besser zur Untersuchung lokalisationspezifischer Fragestellungen z.B. nach pathologischen Veränderungen des Kortex oder des Hirnstamms geeignet sind. Vom klassischen EAE-Modell unterscheiden sich diese durch ihre Induktionsprotokolle oder durch die Verwendung von Mauslinien mit einem anderen genetischen Hintergrund. Um z.B. eine kortikale Demyelinisierung in Ratten zu induzieren, werden lokale Injektionen von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ verwendet (Merkler et al., 2006), während man für Fragestellungen zur Beteiligung von Kleinhirn und Hirnstamm auf IFN- γ -defiziente Mäuse (Abromson-Leeman et al., 2004) oder ein anderes Myelinantigen („myelin proteolipid protein“) zur Immunisation zurückgreifen kann (Muller et al., 2000). Weitere Einschränkungen des klassischen EAE-Modells ergeben sich aus der Tatsache, dass hier v.a. eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunreaktion generiert wird, während für die MS auch eine Infiltration von CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen pathophysiologisch relevant ist (Lassmann und Bradl, 2017). Darüber hinaus wird die EAE im Gegensatz zur MS artifiziell durch die Immunisation mit Myelinantigenen getriggert und ist daher nur eingeschränkt für die Untersuchung der MS-auslösenden Prozesse geeignet, die noch weitgehend unbekannt sind. Um diese Fragestellung gezielt zu beantworten, wurden spontane EAE-Modelle entwickelt, die in der Regel auf genetisch veränderten Mäusen beruhen, die je nach Modell modifizierte T-Zell-Rezeptoren auf CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen exprimieren, die spezifisch für Myelinantigene sind. Auch Mauslinien mit entsprechend genetisch modifizierten B-Zell- und humanisierten T-Zell-Rezeptoren stehen mittlerweile zur Ver-

fügung (Goverman et al., 1993; Ben-Nun et al., 2014; Pollinger et al., 2009). Vorteile bzw. Limitationen der verschiedenen Tiermodelle der MS sind in **Tabelle 1** dargestellt.

EAE-Modell	Mechanismus	Bewertung	Referenz
Aktive Immunisierung	Aktive Immunisierung mit antigenen Epitopen (z.B. MOG, MBP) + Adjuvans (z.B. komplettes Freund'sches Adjuvans)	- Vorteile: Ausmaß neurodegenerativer und demyelinisierender Prozesse sowie Krankheitsverläufe (chronisch progredient, monophasisch, schubförmig) je nach Mauslinie modellierbar - Nachteile: Pathologie v.a. im Rückenmark lokalisiert, aber Anpassung für kortikale Modelle (z.B. lokale Injektion von IFN- γ und TNF- α); v.a. CD4 ⁺ -T-Zell-Antwort; unphysiologischer Immunisationsstimulus	(Baker et al., 2011; Merkler et al., 2006; Stromnes und Goverman, 2006)
Passiver T-Zell-Transfer	Erzeugung autoreaktiver, myelinspezifischer T-Zellen durch aktive Immunisation von Mäusen; Isolation T-Zellen, <i>in-vitro</i> -Stimulation und passiver Transfer in Empfängermaus	- Vorteile: Markierung transferierter T-Zellen und Verfolgung von deren Migration ins ZNS sowie Manipulation der Effektorfunktion der T-Zellen <i>in-vitro</i> vor Transfer möglich - Nachteile: v.a. CD4 ⁺ -T-Zell-Antwort; höherer methodischer Aufwand; artifiziel-ler Beginn; Immunogenität abhängig vom Spendertier	(Stromnes und Goverman, 2006; McCarthy et al., 2012)
Theiler's murine Enzephalomyelitis	Persistierende Virusinfektion in Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten im ZNS führt zu Demyelinisierung	- Vorteile: Immunreaktion gegen verschiedene Myelinepitope; Analogie zu Virusinfektionen als MS-Risikofaktor; Gehirn regelhaft mit betroffen - Nachteile: nur chronisch progredienter Verlauf; nicht in C57BL/6-Mauslinien möglich	(Mecha et al., 2013; McCarthy et al., 2012)
Spontane EAE-Modelle	Überexpression genetisch modifizierter, myelinspezifischer T- und B-Zell-Rezeptoren	- Vorteile: Spontaner Beginn analog zur MS; verschiedene neurologische Defizite modellierbar; auch Modelle zum Einfluss von CD8 ⁺ -T-Zellen und B-Zellen beschrieben - Nachteile: Große Variabilität	(Goverman et al., 1993; Ben-Nun et al., 2014; Pollinger et al., 2009)

Tabelle 1: Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Es wird oft kritisiert, dass „alles EAE stoppt, aber nichts die MS heilt“ (Baker et al., 2011). Da bislang nur vier Wirkstoffe, die einen positiven Effekt in der EAE zeigten, zur Behandlung der MS zugelassen wurden, ist diese Kritik auch nicht vorschnell von der Hand zu wei-

sen. Es sollte hingegen noch nachdenklicher stimmen, dass einige aus EAE-Modellen abgeleitete Interventionen zu erheblichen Komplikationen bei MS-Patienten geführt haben (Baker et al., 2011; Baxter, 2007). Daher ist es wichtig, sich bewusst zu machen, dass die EAE primär darauf abzielt, die zur Entstehung der Immunantwort führenden Prozesse aufzuklären, und dass 70% der Therapieexperimente im Rahmen der EAE bereits vor oder direkt zu Beginn der Krankheitsmanifestation ansetzen und daher nur eingeschränkt auf MS-Patienten übertragbar sind, da sich bei diesen ja bereits Symptome entwickelt haben (Vesterinen et al., 2010).

Trotz dieser Einschränkungen haben sich Tiermodelle der MS und v.a. die EAE als wertvolle Ansätze zur Erforschung der ursächlichen Pathomechanismen erwiesen. Ebenso stellen sie ein wichtiges Testumfeld für mögliche neue Therapien dar, die v.a. mit Blick auf die RRMS zum Teil auch schon fester Bestandteil des klinischen Alltags geworden sind (Yednock et al., 1992; Polman et al., 2006; Lovett-Racke, 2017). Durch die Entwicklung neuer Varianten des EAE-Modells können einzelne Aspekte der MS immer präziser nachgebildet werden und ermöglichen somit ein zunehmend umfassenderes Verständnis der ursächlichen Pathophysiologie. Jedoch ist es wichtig zu akzeptieren, dass die Übertragung von Erkenntnissen aus der EAE in den klinischen Alltag schwierig ist und dass diese Tiermodelle nur der erste Schritt auf dem langen Weg, das Leben von Menschen mit MS zu verbessern, sein können.

1.2) Mechanismen axonaler Schädigung im Rahmen der Multiplen Sklerose

Neben der Demyelinisierung ist der Verlust von Axonen ein wesentliches Charakteristikum der MS und diese axonale Schädigung lässt sich bereits in frühen Läsionsstadien und sogar in makroskopisch noch unauffällig erscheinender weißer Substanz nachweisen (Lassmann, 2013). Auf Grundlage von histologischen und MRT-Untersuchungen wird vermutet, dass der Verlust von Axonen ein wesentlicher Faktor für das Ausmaß der klinischen Behinderung und der Entstehung der progredienten Krankheitsform ist (Ontaneda et al., 2017). Obwohl die Pathogenese des Verlusts von Axonen noch nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es zunehmende Hinweise dafür, dass die akute axonale Schädigung durch die Infiltration von Immunzellen und insbesondere Makrophagen bedingt ist (Trapp et al., 1998), während Demyelinisierung und die daraus resultierende trophische Störung eher bei chronischen Läsionen für die Schädigung von Axonen verantwortlich sind (Nave und Trapp, 2008).

Tiermodelle wie die virusinduzierte Theiler's murine Enzephalomyelitis legen nahe, dass die Reaktion von Axonen auf die Entzündung und Demyelinisierung unter anderem davon ab-

hängt, ob sich das entzündliche Infiltrat aus $CD8^+$ - oder $CD4^+$ -T-Lymphozyten zusammensetzt. So waren z.B. Mäuse, die defizient für MHC-I sind und damit eine von $CD4^+$ - aber nicht von $CD8^+$ -T-Lymphozyten vermittelte Immunreaktion zeigten, trotz Demyelinisierung in der Lage, die Integrität ihrer Axone zu bewahren. Hingegen zeigten MHC-II defiziente Mäuse, die eine von $CD8^+$ -T-Lymphozyten getragene Immunreaktion generierten, eine massive und irreversible axonale Degeneration mit den entsprechenden neurologischen Ausfallsymptomen (Njenga et al., 1999). Neben den durch das Immunsystem vermittelten Prozessen, die eine Degeneration von Axonen auslösen, konnten auch Veränderungen in Genen mit neuroprotektiver Bedeutung sowohl mit MS als auch mit EAE in Verbindung gebracht werden. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) ist ein wichtiger Faktor für die trophische Unterstützung von Neuronen und Oligodendrozyten und es konnte beobachtet werden, dass Transkriptionsprodukte dieses Gens in den Kortexen von MS-Patienten vermindert vorhanden sind. In Übereinstimmung damit zeigen CNTF-defiziente Mäuse einen besonders schweren EAE-Verlauf mit einer verlängerten Erholungszeit (Linker et al., 2002; Dutta et al., 2007).

Dennoch sind die inflammatorischen Prozesse wahrscheinlich von größerer Bedeutung für die axonale Pathologie der MS als genetische Einflussfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit einer axonalen Schädigung mit dem Ausmaß der Entzündung und insbesondere mit der Infiltration von Makrophagen, die sich gehäuft in unmittelbarer Nähe von degenerierenden Axonen nachweisen lassen, korreliert ist (Nikic et al., 2011; Trapp et al., 1998). Erstaunlicherweise ist die Demyelinisierung von Axonen keine notwendige Bedingung für deren Degeneration, sondern diese wird eher durch die Freisetzung von proteolytischen Enzymen wie z.B. Calpain sowie von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoff-Spezies (RNS) durch Immunzellen im Mikroumfeld von akuten Läsionen vermittelt (Kapoor et al., 2003; Nikic et al., 2011). Beispielhaft sollen diese Mechanismen an einem in der EAE erstmalig beschriebenen, potentiell reversiblen axonalen Degenerationsprozess, der sogenannten „fokalen axonalen Degeneration“ (FAD), erläutert werden, wobei sich ähnliche Veränderungen auch in akuten Läsionen von MS-Patienten finden. Die FAD beginnt mit der fokalen Schwellung von Axonen, die oft in der Nähe der Ranvier'schen Schnürringe auftritt und auch in noch vollständig myelinisierten Axonen beobachtet werden kann. Diese fokalen Schwellungen scheinen über mehrere Tage hinweg stabil zu sein und Axone können in der Folge entweder fragmentieren oder sich spontan erholen. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass die FAD durch die Applikation von exogenen ROS und RNS artifiziell induziert bzw. durch die Gabe von ROS/RNS-Scavengern verhindert werden kann, liefert zusätzliche Hinweise auf die Bedeutung des entzündlichen Mikroumfelds für die Schädigung von Axonen (Nikic et al., 2011).

Entsprechend wird vermutet, dass sowohl die FAD als auch die axonale Degeneration bei der MS durch die lokale ROS/RNS-Produktion aktivierter Immunzellen bedingt sind, die durch eine oxidative Schädigung von Mitochondrien zu einer Störung der mitochondrialen ATP-Produktion führt. Im Rahmen dieses als „virtual hypoxia pathway“ bezeichneten Prozesses führt die mitochondriale Dysfunktion durch einen ATP-Mangel zu einer Störung der intrazellulären Elektrolythomöostase, da nicht mehr ausreichend Energie für eine adäquate Funktion der Natrium (Na^+)-Kalium (K^+)-ATPase zur Verfügung steht. Infolgedessen kommt es über die Depolarisation der Zellmembran zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Dies wiederum bewirkt über eine Umkehr der Transportrichtung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX) und die Aktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Gemeinsam mit der Freisetzung von proapoptotischen Signalen aus Mitochondrien bewirkt die hieraus resultierende Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Proteasen wie z.B. Calpain eine irreversible Schädigung der Axone (Nikic et al., 2011; Haider et al., 2011; Witte et al., 2014; Court und Coleman, 2012; Trapp und Stys, 2009; Shields et al., 1999). Weitere Hinweise für die Beteiligung von durch T-Zellen, Makrophagen und Mikroglia produzierte ROS und RNS an der Degeneration von Axonen liefert auch der immunhistochemische Nachweis von oxidiertem DNA und Phospholipiden in Autopsien von MS-Patienten (Haider et al., 2011).

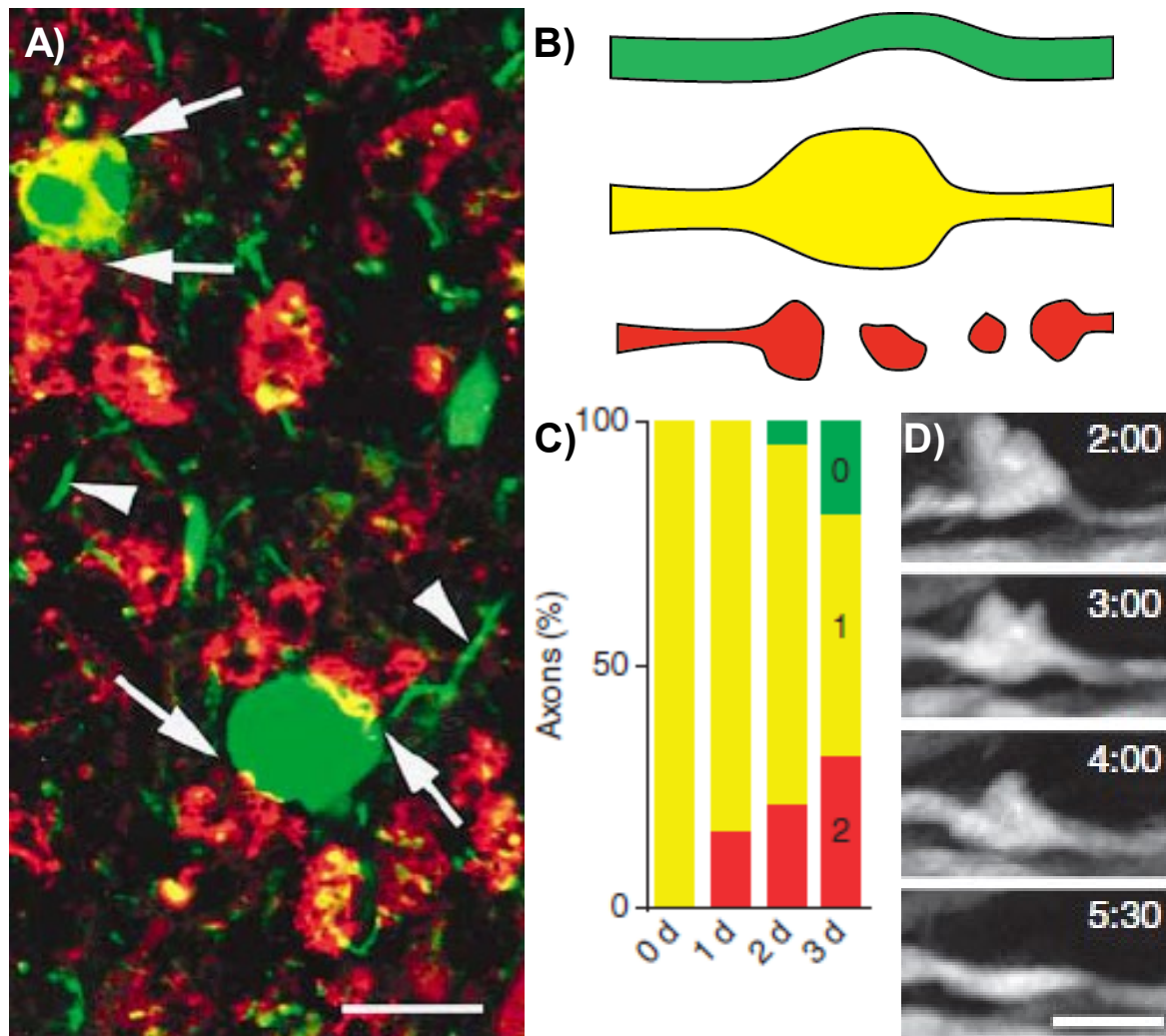


Abbildung 4: Degeneration von Axonen in MS und EAE

(A) Darstellung von Axonen (grün; Anfärbung nichtphosphorylierter Neurofilamente) und Makrophagen (rot) mittels Konfokalmikroskopie von humanem MS-Gewebe; Pfeile weisen auf engen Kontakt zwischen Makrophagen und degenerierenden Axonen hin, während Pfeilspitzen morphologisch unauffällige Axone ohne Kontakt zu Makrophagen zeigen. (B) illustriert die verschiedenen Stadien der FAD mit Stadium 0 (grün) als morphologisch unauffällige Axone, Stadium 1 (gelb) mit fokalen Schwellungen und Stadium 2 (rot) als komplette Fragmentation. (C) zeigt, dass Axone im Stadium 1 im Zeitverlauf entweder fragmentieren (Stadium 2; rot) oder regenerieren können (Stadium 0; grün). (D) stellt *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopieaufnahmen im zeitlichen Verlauf eines Axons im Stadium 1 und dessen Erholung über die Zeit dar. Maßstäbe: 45 μm in Panel (A) und 10 μm in Panel (D). (A) aus (Trapp et al., 1998); (C) und (D) aus (Nikic et al., 2011)

Ein wesentlicher Faktor bei der axonalen Degeneration ist der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Ca^{2+} -Homöostase in Zellen ist streng reguliert und wird durch den aktiven Transport von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher wie z.B. Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum sowie den Transport in den Extrazellulärraum aufrechterhalten

(Krebs et al., 2015). Im Rahmen des axonalen Degenerationsprozesses kommt es zu einer Schädigung des Zytoskeletts, die wahrscheinlich auf die Aktivierung von Calpain, einer Ca^{2+} -abhängigen Protease, durch die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen ist und die auch mit der axonalen Schädigung im Rahmen der MS in Verbindung gebracht wird (Shields et al., 1999). Weitere Hinweise auf die zentrale Rolle von Ca^{2+} bei der axonalen Degeneration liefern Studien, die zeigen konnten, dass die Behandlung mit Calpaininhibitoren Axone bei traumatischen ZNS-Schädigungen schützt und dass persistierende Regulationsstörungen der Ca^{2+} -Homöostase das weitere Schicksal von Axonen im zeitlichen Verlauf vorherzusagen (Williams et al., 2014; Kerschensteiner et al., 2005). Interessanterweise wird der beobachtete Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von einer Zunahme der intrazellulären Na^+ -Konzentration begleitet und die pharmakologische Blockade von Na^+ -Kanälen z.B. mit Tetrodotoxin, Phenytoin oder Flecainid wirkt sowohl in der EAE als auch in Modellen ischämischer oder traumatischer ZNS-Schädigung protektiv auf Axone (LoPachin und Lehning, 1997; Bechtold et al., 2004; Lo et al., 2003). Diese Verbindung zwischen Na^+ und Ca^{2+} lässt sich anhand des oben beschriebenen „virtual hypoxia pathways“ erklären. Gut vereinbar hiermit sind auch Untersuchungen, die zeigen, dass Bepridil, ein Inhibitor des NCX, in Modellen traumatischer ZNS-Schädigungen protektiv auf Axone wirkt und dass sich in entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie MS und EAE eine veränderte Expression von Ca^{2+} -Kanälen und dem NCX nachweisen lässt (Trapp und Stys, 2009; Stirling und Stys, 2010; Kapoor et al., 2003). Auch Untersuchungen in unserem Labor konnten zeigen, dass die Dysregulation des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts in EAE-Läsionen das weitere Schicksal von Axonen über die Zeit vorhersagen kann (siehe S. 50). Jedoch sind sowohl der Auslöser der beobachteten Ca^{2+} -Regulationsstörung als auch die dadurch ausgelösten Prozesse bislang unbekannt und die Beantwortung dieser Fragen ist ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.3) In-vivo Ca^{2+} -Mikroskopie

1.3.1) 2-Photonen-Mikroskopie des zentralen Nervensystems

Die Entwicklung nichtlinearer optischer Mikroskope und insbesondere der 2-Photonen-Mikroskopie haben Wissenschaftlern neue Möglichkeiten zum Studium zellulärer und subzellulärer Strukturen im ZNS eröffnet. Im Unterschied zu traditionellen Mikroskopietechniken wie z.B. der Konfokalmikroskopie, ist die nichtlineare optische Mikroskopie weniger anfällig

für die Streuung von Licht im Gewebe und ermöglicht die hochauflösende Darstellung intakten Gewebes bis zu einer Tiefe von 1 mm, während bei der Verwendung von 1-Photonen-Anregung die Eindringtiefe oft schon bei 100 μm begrenzt ist (Helmchen und Denk, 2005).

Die Signale bei dieser Form der biomedizinischen Bildgebung werden durch Fluoreszenz erzeugt. Ein Prozess bei welchem Photonen von einem einzelnen Molekül absorbiert und anschließend wieder emittiert werden. Dies erfordert jedoch, dass das anregende Photon eine bestimmte Wellenlänge besitzt und so eine definierte Menge an Energie auf das Fluorophor übertragen kann. Wird ein Photon von einem Molekül absorbiert, erfolgt eine Energieübertragung vom Photon auf das Molekül, dessen Elektronen dadurch in einen angeregten, energiereichen Zustand versetzt werden. Dieser angeregte Zustand ist allerdings instabil, sodass nach einer kurzen Zeit die Elektronen in ihren energieärmeren Grundzustand zurückkehren und dabei Energie in Form eines Photons emittieren. Da dieser Absorptions-Emissions-Prozess aber in einem Energieverlust resultiert, ist die Wellenlänge des emittierten Photons grundsätzlich länger als die Wellenlänge des anregenden Photons. Während bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ein einzelnes Photon zur Anregung eines Fluorophors verwendet wird, werden bei der nichtlinearen Mikroskopie wie z.B. der 2-Photonen-Mikroskopie mehrere Photonen mit größerer Wellenlänge und entsprechend geringerer Energie verwendet. Hierbei ist es erforderlich, dass mehrere Photonen beinahe zeitgleich (innerhalb von 10^{-18} s) von demselben Molekül absorbiert werden. Da dies mit normalen Lichtquellen ein äußerst seltenes Ereignis ist, ist es für die Erzeugung von nichtlinearen Interaktionen erforderlich, Lichtquellen mit einer sehr hohen Flussrate an Photonen zu verwenden. Um diese hohen Flussraten zu erzielen ohne gleichzeitig die Probe durch eine zu hohe Energie zu beschädigen, wurden sogenannte "mode-locked" Laser entwickelt, die ultrakurze Lichtimpulse (Dauer ≈ 100 fs) bei einer hohen Wiederholungsrate erzeugen (≈ 100 MHz), sodass während der Impulse eine ausreichend hohe Photonenflussdichte erzielt werden kann, aber gleichzeitig der Laser während der meisten Zeit ausgeschaltet ist und so eine Schädigung der Gewebeprobe vermieden werden kann (Denk et al., 1990; Ustione und Piston, 2011).

Bei der Konfokalmikroskopie interagieren die Photonen mit diversen Fluorophoren entlang ihres gesamten Weges durch die Probe und erzeugen dabei jeweils ein Fluoreszenzsignal. Daher ist eine Lochblende, die sogenannte „pinhole“, erforderlich, um die Menge des nicht aus der Fokusebene stammenden Signals zu reduzieren, da dies den Kontrast und die räumliche Auflösung des Bildes erheblich reduzieren würde. Die 2-Photonen-Mikroskopie ist hingegen deutlich weniger anfällig für nicht aus der Fokusebene stammende Störungen, da jedes

einzelne der beiden Photonen nur jeweils die Hälfte der für die Anregung erforderlichen Energie besitzt, sodass die Absorption der Photonen und die Signalerzeugung auf ein sehr viel kleineres Fokusvolumen begrenzt sind, da nur hier zwei Photonen beinahe gleichzeitig mit dem Fluorophor interagieren. Wie in **Abbildung 5** dargestellt erfolgt also bei der 2-Photonen-Mikroskopie im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie keine Anregung von Fluorophoren entlang des gesamten Lichtwegs durch die Probe, sondern nur lokal begrenzt in der Fokusebene. Die Tatsache, dass keine Photonen durch Streuung verloren gehen oder durch eine Lochblende herausgefiltert werden, ist eine wesentliche Ursache für die bessere Tiefenauflösung der 2-Photonen-Mikroskopie (Ustione und Piston, 2011).

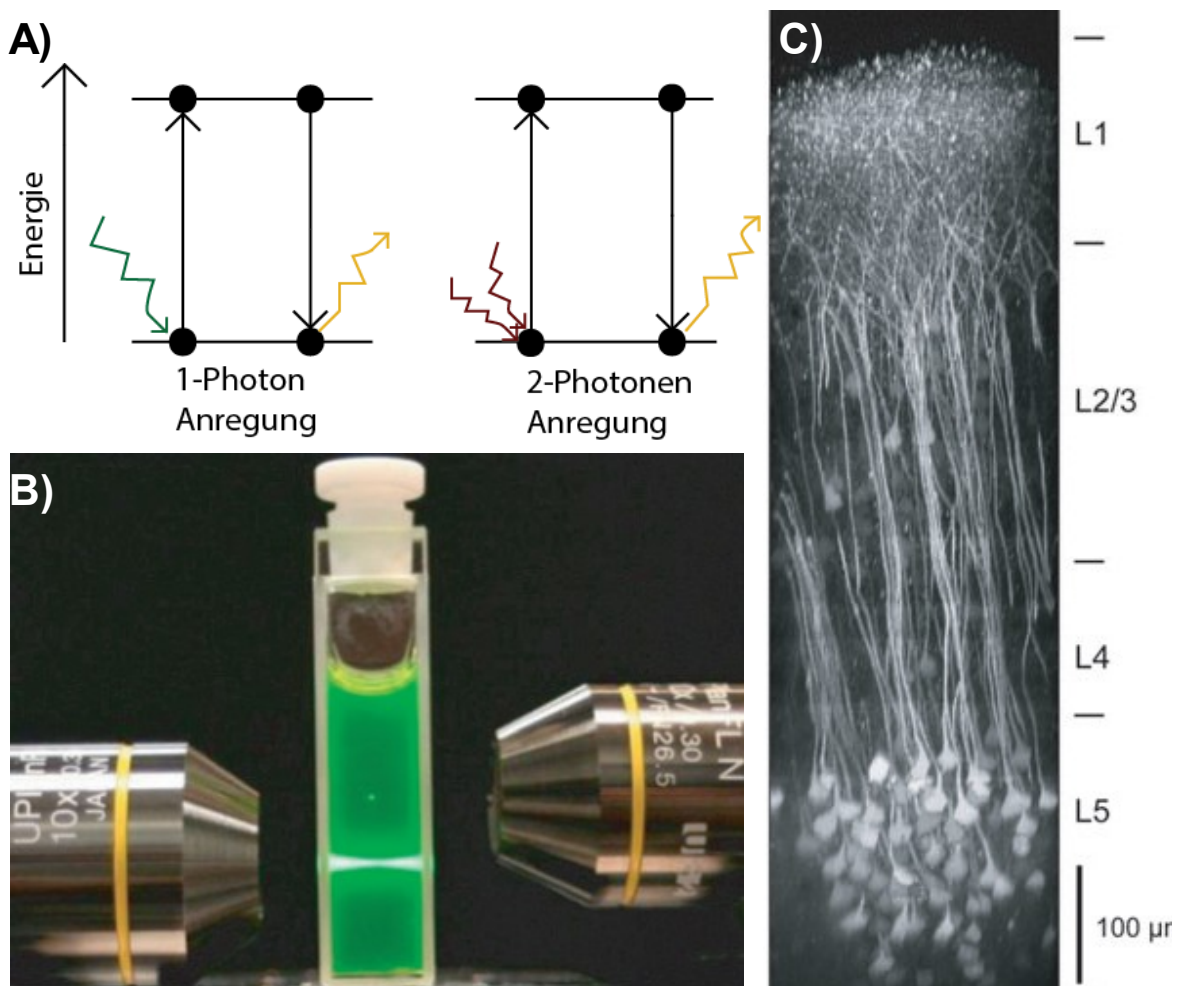


Abbildung 5: Vergleich von 2-Photonen- und Konfokalmikroskopie

(A) zeigt ein Jablonski-Diagramm für 1-Photon- und 2-Photonen-Anregung eines Fluorophors und die folgende Emission des Fluoreszenzsignals. (B) Darstellung der Unterschiede zwischen konfokal (380 nm; unterer Strahlengang) und 2-Photonen (760 nm; oberer Strahlengang) Anregung einer 50 µM Fluorescein-Lösung. Während 2-Photonen-Anregung auf ein sehr kleines Fokusvolumen begrenzt ist, erfolgt 1-Photonen-Anregung auf dem gesamten Lichtweg durch die Probe. (C) Maximum intensity Projektion einer 2-Photonen-Aufnahme des Neokortex einer transgenen Maus, die einen genetisch kodierten Chloridsensor exprimiert. (B) übernommen aus (Ustione und Piston, 2011) und (C) aus (Helmchen und Denk, 2005).

Ein weiterer Vorteil der 2-Photonen-Anregung mit Bedeutung für die *in-vivo* Mikroskopie ist die Verwendung von Wellenlängen im Infrarotbereich, da jedes Photon nur die halbe Energie im Vergleich zur 1-Photon-Anregung benötigt. Dies reduziert einerseits die Fototoxizität des Lasers auf die Gewebeprobe und begrenzt das Ausbleichen des Fluorophors auf die Fokusebene, da nur hier die 2-Photonen-Absorption erfolgt. Außerdem interagiert Infrarotlicht weniger mit natürlichen Chromophoren in der Gewebeprobe als Licht im sichtbaren Spektrum, sodass Infrarotlicht weniger anfällig für Streuung ist, was die Eindringtiefe ins Gewebe zusätzlich deutlich erhöht (Grienberger und Konnerth, 2012). Entsprechend ist die 2-Photonen-Mikroskopie heute die für die *in-vivo*-Mikroskopie bevorzugte Methode (Wang et al., 2010).

Vor der Entwicklung der nichtlinearen Mikroskopie war es oftmals erforderlich, Organe wie das ZNS an Gewebeexplantaten oder in der Zellkultur zu untersuchen. Durch nichtlineare Mikroskopietechniken in Kombination mit der Entwicklung von verschiedenen Spektralvarianten von fluoreszierenden Proteinen und deren Anwendung zur spezifischen Anfärbung von bestimmten Zellen in transgenen Mäusen ist es nun aber möglich, komplexe Organe auch *in-vivo* und in viel größerem Detail zu erforschen als zuvor (Misgeld und Kerschensteiner, 2006). Beispielsweise können im ZNS Neurone und deren Fortsätze durch die Expression von Fluoreszenzproteinen in Mäusen, die der Kontrolle durch ein neuronenspezifisches Thy1-Promoter-Element unterliegt, sehr detailliert untersucht werden (Feng et al., 2000). Ähnliche Methoden wurden auch für die spezifische Darstellung von Immun-, Glia- und Endothelzellen entwickelt und ermöglichen neue Erkenntnisse zur Pathogenese eines großen Spektrums von Erkrankungen, das von Trauma über Schlaganfall bis hin zu neurodegenerativen Prozessen reicht (Misgeld und Kerschensteiner, 2006). Aber nicht nur ganze Zellen sind bislang transgen markiert worden, auch subzelluläre Strukturen wie Mitochondrien (Misgeld et al., 2007a) und Komponenten des Zytoskeletts (Kleele et al., 2014) sind nun der *in-vivo*-Mikroskopie zugänglich geworden. Auf der Suche nach einem besseren Verständnis der grundlegenden pathophysiologischen Prozesse diverser Krankheiten, ist auch die *in-vivo*-Mikroskopie von Indikatoren der zellulären Funktion wie z.B. des ATP-Spiegels oder des Redox-Status von Zellen eine äußerst hilfreiche Methode (Tantama et al., 2013; Breckwoldt et al., 2014).

1.3.2) *In-vivo* Ca²⁺-Mikroskopie und genetisch kodierte Ca²⁺-Indikatoren

Ca²⁺ spielt eine entscheidende Rolle in allen Zelltypen z.B. bei der Exozytose von neurotransmitterhaltigen Vesikeln aus den präsynaptischen Axonterminalen, der Kontraktion

von Muskelzellen und der Regulation des Zellzyklus (Grienberger und Konnerth, 2012). Schon die genannten Beispiele zeigen, dass Ca^{2+} Signale einerseits über ein weites zeitliches Spektrum wirken, das von Millisekunden bei der synaptischen Transmission bis hin zu Stunden bei der Transkription von Genen reicht, und dass andererseits die verschiedenen Funktionen von Ca^{2+} vom jeweiligen subzellulären Kompartiment abhängen, auf welches sie wirken. Ca^{2+} ist folglich entscheidend für die integrative Funktion von komplexen Organsystemen und ein besseres Verständnis der genauen räumlichen und zeitlichen Eigenschaften dieser Ca^{2+} -Signale ist angesichts der hohen Anzahl an Verbindungen zwischen einzelnen Zellen besonders im ZNS von großer Bedeutung (Grienberger und Konnerth, 2012; Russell, 2011).

Die ersten Experimente mit organischen Ca^{2+} -Indikatoren wurden in Zellkulturen oder präparierten Gewebeschnitten durchgeführt. Jedoch sind diese Experimente für komplexe Zellnetzwerke wie das ZNS zu ungenau und Möglichkeiten zur *in-vivo*-Mikroskopie daher äußerst wünschenswert. Dies führte zur Entwicklung von transgenen Organismen, die z.B. das Ca^{2+} -sensitive, biolumineszente Protein Aequorin exprimieren oder zur Beladung einzelner Zellen mit fluoreszierenden organischen Ca^{2+} -Sensoren wie z.B. Fura-2 und Fluo-3 (Stosiek et al., 2003; Creton et al., 1997). Organische Ca^{2+} -Indikatoren können entweder als “single wavelength“ Indikatoren, deren Fluoreszenzintensität aber nicht das Exzitations- und Emissionsspektrum in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise variieren, oder als ratiometrische Indikatoren, deren Exzitations- oder Emissionsspektrum abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration ist, klassifiziert werden. Da ratiometrische Ca^{2+} -Sensoren weniger anfällig für Störungen durch Indikatorleckagen oder eine ungleichmäßige Beladung der Zellen sind und entsprechend genauere und robustere Messungen erlauben, stellen sie die häufigste Form von organischen Ca^{2+} -Indikatoren dar (Russell, 2011). Derartige Ca^{2+} -Indikatoren haben den Vorteil eines günstigen Signal-Rausch-Verhältnisses, einer schnellen Kinetik und der gezielten Injektion in einzelne Zellen. Limitiert ist ihre Anwendung hingegen bei der Darstellung von Ca^{2+} -Signalen über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen (Grienberger und Konnerth, 2012).

Ein Durchbruch in der Ca^{2+} -Bildgebung gelang durch die Entdeckung von natürlichen Fluoreszenzproteinen und die Herstellung von chimären Ca^{2+} -sensitiven Konstrukten, die verschiedene spektrale Varianten dieser Fluoreszenzproteine nutzen. Gewebe- oder zellspezifische Promotersequenzen ermöglichten eine gezielte Expression dieser Konstrukte in einer bestimmten Zellpopulation und so die Beobachtung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinweg. Da diese Konstrukte aus Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionsspektren bestehen, war es nun möglich die zelluläre Ca^{2+} -

Konzentration durch den sogenannten Ca^{2+} -induzierten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET; auch bekannt als Fluoreszenzresonanzenergietransfer) quantitativ zu untersuchen (Miyawaki et al., 1997, Heim and Griesbeck, 2004). Bei diesen FRET-basierten Ca^{2+} -Indikatoren kommt es zu einem Energietransfer zwischen dem angeregten Donor- und einem Akzeptorfluorophor, wofür ein räumlicher Abstand zwischen den beiden von maximal 10 nm erforderlich ist (Grienberger und Konnerth, 2012). Am häufigsten werden Varianten des cyan fluoreszierenden Proteins (CFP) als Donor- und des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) als Akzeptorfluorophor verwendet, wobei diese über ein Ca^{2+} -bindendes Protein wie z.B. Calmodulin oder Troponin C verbunden sind (Miyawaki et al., 1997; Heim und Griesbeck, 2004). Die Bindung von Ca^{2+} an das Ca^{2+} -bindende Protein des Sensors induziert eine Konformationsänderung des gesamten Moleküls, sodass sich der räumliche Abstand zwischen den beiden Fluorophoren verringert und der Energietransfer vom Donor- zum Akzeptorfluorophor erfolgen kann. Vereinfachend kann man also sagen, dass sofern die Ca^{2+} -bindende Domäne kein Ca^{2+} gebunden hat, das CFP-Signal stärker ist, während es nach Bindung von Ca^{2+} zu einer Intensitätsabnahme des CFP-Signals und einer Zunahme des YFP-Signals kommt (**Abbildung 6**). Diese Änderung im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen den beiden Fluorophoren ist reversibel und kann genutzt werden, um dynamische Veränderungen von Ca^{2+} -Konzentrationen quantitativ zu untersuchen und zu visualisieren.

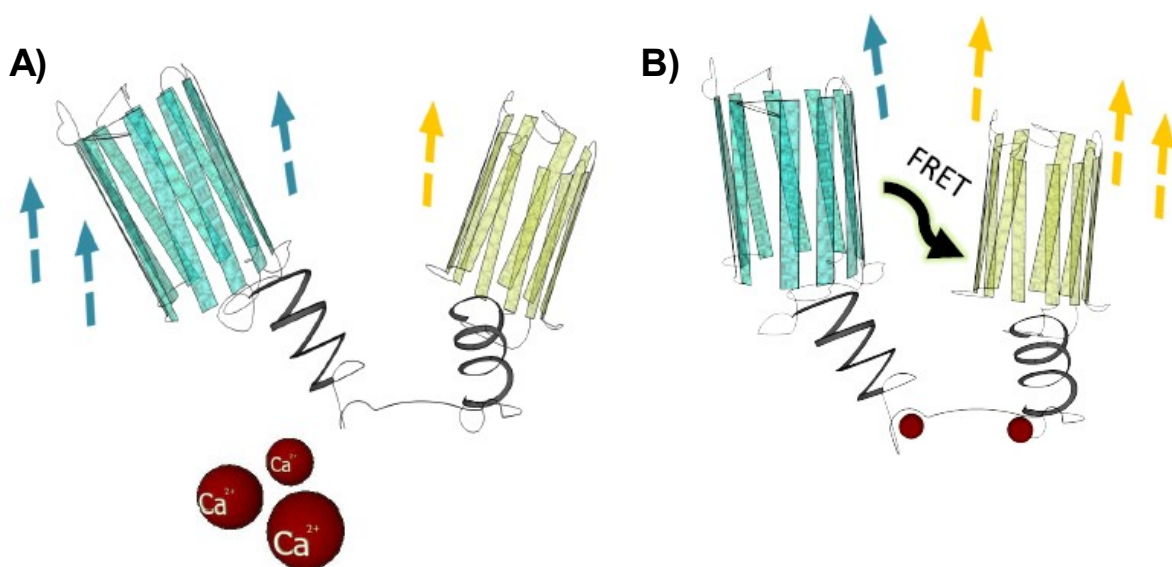


Abbildung 6: Illustration von FRET-basierten Ca^{2+} -Indikatoren

FRET-basierte Ca^{2+} -Indikatoren bestehen aus einem Donor- (meist ein CFP-Derivat) und einem Akzeptorfluorophor (meist ein YFP-Derivat), die durch ein Ca^{2+} -bindendes Protein wie z.B. Calmodulin oder Troponin C verbunden sind. (A) stellt einen Zustand dar, in dem kein Ca^{2+} an das Molekül gebunden ist und entsprechend das CFP-Signal stärker als das YFP-Signal ist. Durch Bindung von Ca^{2+} kommt es zu einer

Konformationsänderung des gesamten Moleküls und es erfolgt ein Energietransfer vom Donor- zum Akzeptorfluorophor (B). Dies bewirkt eine Abnahme der Intensität des CFP-Signals und eine Zunahme des YFP-Signals, sodass die Ratio der YFP:CFP-Fluoreszenzintensitäten als quantitativer Marker für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verwendet werden kann. Darstellung von Adrian Minh Schumacher adaptiert.

Die Herstellung von transgenen Mäusen, die diese genetisch kodierten Ca^{2+} -Indikatoren (genetically encoded Ca^{2+} indicators (GECI)) exprimieren, ist äußerst kompliziert und die Indikatorproteine waren oft deutlich weniger funktionell als in *in-vitro* Experimenten (Heim und Griesbeck, 2004; Hasan et al., 2004). Mittlerweile ist aber eine Vielzahl an transgenen Mäusen verfügbar, die verschiedene GECIs exprimieren und sich hinsichtlich der Ca^{2+} -bindenden Domänen und der verwendeten Fluorophore unterscheiden. Dadurch ergeben sich je nach Fragestellung verschiedene Möglichkeiten für die Ca^{2+} -Bindungsaffinität und Kinetik des Sensors sowie für die Intensität und den dynamischen Bereich des Fluoreszenzsignals. Eine dieser transgenen Mauslinien exprimiert unter Kontrolle des neuronenspezifischen Promoters Thy-1 einen als CerTN-L15 bezeichneten Ca^{2+} -Sensor, der sich vom TN-L15-Sensor ableitet (Heim et al., 2007). Dieser Sensor nutzt Cerulean, ein CFP-Derivat, als Donor- und Citrine, ein YFP-Derivat, als Akzeptorfluorophor, die über Troponin C als Ca^{2+} -bindende Domäne verbunden sind. Durch die Verwendung von Troponin C ist der Sensor weniger anfällig für Interaktionen mit endogenen Proteinen als Calmodulin-basierte Sensoren (Garaschuk et al., 2007). Durch die stabile Expression in neuronalen Strukturen im gesamten ZNS ermöglicht dieser Sensor die *in-vivo*-Bildgebung der Ca^{2+} -Dynamik in Axonen und wurde für alle Experimente in der vorliegenden Arbeit verwendet.

1.4) Detektion und Mechanismen der Bildung von Membranläsionen

Die Zellmembran ist mehr als eine Lipiddoppelschicht mit darin verankerten Proteinen zur anatomischen Begrenzung von Zellen. Sie ist vielmehr von zentraler Bedeutung für die Zellteilung, die Zell-Zell-Kommunikation, die Migration von Zellen und die Aufrechterhaltung der Konzentrationsgradienten verschiedener Ionen (Yeagle, 1989; Sens und Plastino, 2015; Aureli et al., 2015). Die Variabilität in der genauen Zusammensetzung der Zellmembranen verschiedener Zellen ist bemerkenswert und der Umsatz von Membranlipiden und -proteinen ist ein wesentlicher Mechanismus der Modulation von Zellfunktionen (Quinn und Chapman, 1980). Besonders im ZNS ist die Zellmembran von entscheidender Bedeutung für die Funktion von Neuronen und Gliazellen und unterliegt entsprechend diversen streng regulierten Mo-

difikationen z.B. bei der Bildung und Stabilisation der Myelinscheide, der Modulation von membranassoziierten Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen sowie der Exozytose von synaptischen Vesikeln (Aureli et al., 2015; Shin, 2014). Angesichts der zentralen Rolle bei der Funktion von Zellen und der Tatsache, dass die Zellmembran die erste Struktur einer Zelle ist, die toxischen oder traumatischen Stimuli ausgesetzt ist, ist es nicht überraschend, dass erworbene oder genetische Veränderungen in ihrer Struktur mit verschiedenen Erkrankungen wie z.B. M. Alzheimer, MS und der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnten (Ferretti und Bacchetti, 2011; Butterfield et al., 2010; Hubner und Kurth, 2014).

Ein wichtiger Mechanismus bei der Schädigung von Zellmembranen ist die Oxidation von Membranlipiden durch ROS/RNS. Besonders die Oxidation gesättigter Fettsäuren verändert die Fluidität von Membranen und die dabei entstehenden Oxidationsprodukte führen entweder zur Entstehung weiterer noch toxischerer Radikale oder sie können ihrerseits als Radikale wirken und Membranen direkt schädigen (de la Haba et al., 2013; Haider et al., 2011). Mehrere Studien an EAE-Modellen sowie histopathologische Untersuchungen der Gehirne von MS-Patienten konnten zeigen, dass ROS/RNS in entzündlichen Läsionen durch T-Zellen und Makrophagen bzw. Mikrogliazellen generiert werden und die Oxidation von Membranlipiden als Marker für eine akute Schädigung von Neuronen und Gliazellen aufgefasst werden kann (Haider et al., 2011; van Horssen et al., 2011; Newcombe et al., 1994). Auch eine möglicherweise durch oxidative Schädigung bedingte erhöhte Permeabilität der axonalen Membran in der EAE konnte gezeigt werden (Leung et al., 2017). Allerdings werden freie Radikale in geringeren Konzentrationen auch unter physiologischen Bedingungen gebildet und spielen eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und der Immunabwehr (Valko et al., 2007). Um eine überschießende Produktion von ROS/RNS und die daraus resultierenden Folgen für die Zelle zu verhindern, existieren verschiedene antioxidative Enzymsysteme wie z.B. die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase (GPx) oder die Katalase (Ferretti und Bacchetti, 2011). Mit Blick auf die Membranoxidation ist die GPx4, eine Isoform der Glutathionperoxidase, von besonderer Bedeutung, da sie als antioxidatives Enzym v.a. an der Zellmembran wirkt und Neurone vor der Oxidation von Membranlipiden und dem durch oxidativen Stress induzierten Zelltod schützt (Seiler et al., 2008). Da besonders bei entzündlichen Erkrankungen wie der EAE oder der MS vermehrt ROS/RNS gebildet werden, scheint es ein erfolgsversprechender Ansatz zu sein, Neurone und ihre Fortsätze durch die Behandlung mit Antioxidantien und ROS/RNS-Scavengern vor den Folgen der Lipidoxidation zu schützen. So gibt es bereits Studien, die einen protektiven Effekt einer Behandlung mit Tocopherol (Vitamin E), einem lipophilen Antioxidans (Blanchard et al., 2013), und

Scavengern von toxischen Lipidoxidationsprodukten wie z.B. Acrolein in EAE-Experimenten an Mäusen zeigen konnten (Leung et al., 2011). Jedoch muss einschränkend angemerkt werden, dass in diesen Studien die Mäuse entweder mit intraperitonealen Injektionen oder bereits vor Krankheitsbeginn behandelt wurden. Es ist daher einerseits fraglich, ob die applizierten Wirkstoffe wirklich das ZNS erreicht haben und ob es sich andererseits tatsächlich um einen neuroprotektiven Effekt handelt oder ob die protektive Wirkung eher durch Immunmodulation zustande gekommen ist, da ROS/RNS auch eine wesentliche immunregulatorische Rolle spielen (Valko et al., 2007). Insofern sind die wichtigen Fragen, ob und wie es in entzündlichen Läsionen zu einer oxidativen Schädigung der Zellmembran kommt und welche pathophysiologischen Konsequenzen sich daraus ergeben, nicht abschließend geklärt. Die Untersuchung dieser Fragestellungen war eine zentrale Zielsetzung dieser Arbeit.

Abgesehen von oxidativer Schädigung wurden auch Perforin (Howe et al., 2007) und die Bildung des „membrane attack complex“ (MAC) als Endstrecke der Aktivierung des Komplementsystems als mögliche Mechanismen axonaler Schädigung im Rahmen der EAE postuliert. Perforin ist ein porenbildendes Protein, das von $CD8^+$ -T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) genutzt wird, um Granzyme (Serin-Proteasen, die in der Zielzelle die Apoptose auslösen) in virusinfizierte und maligne transformierte Zellen einzuschleusen (Thiery et al., 2011). Von besonderem Interesse für die Bildung von Poren der Plasmamembran ist die Rolle von NK-Zellen bei der Lyse von virusinfizierten Zellen. Da bereits sublytische Konzentrationen von Perforin die Aufnahme von Dextran-konjugierten Farbstoffen in HeLa-Zellen induzieren können, wird angenommen, dass Perforin durch die Bildung von kleinen Membranporen einen transienten Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen bewirkt und dadurch einen Membranreparaturmechanismus auslöst. Dieser Reparaturmechanismus bewirkt allerdings auch die Endozytose von Perforin und Granzymen in die Zelle, was letztendlich zur Initiation der Apoptose und der Freisetzung von Granzymen ins Zytoplasma führt (Thiery et al., 2011; Keefe et al., 2005). Die Bedeutung von Perforin bei der EAE ist hingegen deutlich schlechter untersucht und es gibt nur einige wenige Studien, die einen protektiven Effekt von Perforin-defizienten Mäusen zeigen, wobei dieser Effekt hauptsächlich auf einer Suppression von zytotoxischen T-Zellen beruht (Howe et al., 2007; Beeston et al., 2010).

Das Komplementsystem bildet eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem (Ricklin et al., 2010). Zusätzlich zu seiner Effektorfunktion bei der Elimination von invasiven Pathogenen durch die Bildung des MAC, die zur Bildung von Poren in der Plasmamembran und zur Lyse der Zielzellen führt, wirken aktivierte Faktoren des

Komplementsystems auch als proinflammatorische Signale, opsonieren Pathogene für die Phagozytose, aktivieren das Gerinnungssystem und regulieren die Funktion von T-Zellen (Ricklin et al., 2010; Dunkelberger und Song, 2010; Markiewski et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der MS als auch bei der EAE eine Aktivierung des Komplementsystems erfolgt und dass diese durch die Bildung des MACs an der Schädigung von Oligodendrozyten und Myelinscheiden beteiligt ist (Nataf et al., 2000; Brink et al., 2005). Entsprechend gibt es auch zahlreiche Studien, die einen milderen Verlauf der EAE bei Mäusen zeigen konnten, die für verschiedene Komponenten des Komplementsystems defizient sind (Nataf et al., 2000; Hu et al., 2012; Hu et al., 2013). Da das Komplementsystem aber auch bei der Modulation des Immunsystems von zentraler Bedeutung ist, ist es sehr schwierig einzuschätzen, ob der beobachtete Effekt auf einer neuroprotektiven Wirkung durch die Beeinflussung der Bildung des MACs oder auf der immunmodulatorischen Funktion beruht. Außerdem scheint die Aktivierung des Komplementsystems kein universelles Phänomen in MS-Läsionen zu sein, sondern ist sowohl je nach Lokalisation der entzündlichen Läsion als auch zwischen einzelnen Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt (Brink et al., 2005). Daher ist bis heute die Rolle von sowohl Perforin als auch des Komplementsystems bei der Pathogenese der MS bzw. der EAE bei weitem noch nicht vollkommen verstanden.

Abgesehen von oxidativen Schädigungen im Rahmen der Entzündung, von Perforin und dem Komplementsystem, kann die Zellmembran auch traumatisch geschädigt werden. Um Membrandefekte visualisieren zu können, wurden Fluoreszenzfarbstoffe an kleine membranimpermeable Moleküle wie Dextrane und Aminosäurederivate konjugiert und es konnte gezeigt werden, dass es bei einer traumatischen Störung der Integrität der Zellmembran zu einer Aufnahme dieser Farbstoffkonjugate in die Zellen kommt (Williams et al., 2014; Simon et al., 2009). Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden schon lange für diverse Anwendungen wie z.B. die Rekonstruktion von Neuronen und ihren Fortsätzen (Schofield et al., 2007), die Überprüfung der Integrität von Membranen wie der Blut-Hirn-Schranke (Schwabe et al., 2005) und zur Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten verwendet (Heyman und Burt, 2008). Sie sind in einer großen Vielzahl an Molekülgrößen, chemischen Eigenschaften und gekoppelt an unterschiedliche Fluorophore verfügbar. Jedoch wurden bislang noch keine Studien veröffentlicht, die solche Fluoreszenzfarbstoffe in Bezug zur EAE oder anderen Modellen von entzündlichen ZNS-Erkrankungen verwenden. Somit stellt die Verwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe zur Beurteilung der Integrität der axonalen Zellmembran einen methodisch neuartigen Ansatz dar und ist wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit.

2.) Zielsetzung

Die irreversible Schädigung von Axonen ist eine der Hauptursachen für die dauerhafte Behinderung von MS-Patienten (Ontaneda et al., 2017). Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnten aber die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse dieser axonalen Degeneration bislang noch nicht vollkommen aufgeklärt werden. Von zentraler Bedeutung scheint allerdings eine Störung der axonalen Ca^{2+} -Homöostase zu sein, wobei das Ausmaß der axonalen Ca^{2+} -Regulationsstörung, deren Ursachen und die daraus resultierenden Folgen bisher nur unzureichend verstanden sind. Nachdem in Vorarbeiten in unserem Labor das Ausmaß der axonalen Ca^{2+} -Regulationsstörung mittels FRET-basierter 2-Photonen- Ca^{2+} -Mikroskopie quantifiziert und gezeigt werden konnte, dass diese ein wichtiger Prädiktor für das weitere Schicksal von Axonen in entzündlichen Läsionen ist, stellte ich mir in der hier vorliegenden Arbeit die folgenden Fragen:

- Welche pathophysiologischen Prozesse liegen der axonalen Ca^{2+} -Regulationsstörung zugrunde?
- Können Läsionen der axonalen Zellmembran ursächlich für die Veränderungen der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration sein und wie lassen sich diese experimentell im EAE-Modell nachweisen?
- Falls sich derartige Membranläsionen nachweisen lassen, welche Subpopulation von Axonen mit Blick auf Axondurchmesser und Myelinisierungsstatus ist dann besonders anfällig?
- Ist es möglich, die Entstehung und Reparatur von etwaigen Membranläsionen im zeitlichen Verlauf zu beobachten?
- Lassen sich Schäden der Axonmembran auch in der *in-vivo*-Mikroskopie nachweisen und besteht ein Zusammenhang mit der axonalen Ca^{2+} -Regulationsstörung?
- Falls sich Membranläsionen nachweisen lassen, welche pathophysiologischen Prozesse sind hierfür ursächlich und gibt es ggf. Möglichkeiten diese therapeutisch zu beeinflussen?

3.) Material und Methoden

3.1) Übersicht über die verwendeten Materialien

3.1.1) Reagenzien

Immunisation	
Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (IFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37 RA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)	Rekombinant hergestellt im Labor von Doron Merkler (Universität Göttingen, University of Geneva) und im Labor von Martin Kerschensteiner (Ludwig-Maximilians-Universität München)
Inaktiviertes Pertussistoxin (Ptx) von <i>Bordetella pertussis</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland

Gewebeprozessierung und Immunhistochemie	
Alexa Fluor® 647 Goat anti-rabbit secondary antibody	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gibco Goat Serum	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
NeuroTrace® 435/455 Blue Fluorescent Nissl Stain	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
NeuroTrace® 640/660 Deep-Red Fluorescent Nissl Stain	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA)	8% PFA (Sigma-Aldrich) in dH ₂ O, erwärmt auf bis zu 55°C und umrühren für weitere 10 min, Zugabe von NaOH zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2-7,8; Filtration und Mischung mit 0,2 M Phosphatpuffer (PB) im Verhältnis 1:1
Phosphatpuffer (PB) 0,2 M	27,598 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 35,598 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O Zugabe von 1l dH ₂ O
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), 10x	103,23 mg Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O 26,52 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 40 g NaCl Zugabe von 1l dH ₂ O
Polyclonal Rabbit Anti-Human Myelin Basic Protein antibody	Dako/Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA

Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Tissue Tek optimal cutting temperature (O.C.T.)	Skura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Vectashield Mounting Medium, Fluorescence H-1000	Vector Labs, Burlingame, CA 94010, USA

<i>In-vivo</i>-Mikroskopie Experimente	
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Alexa Fluor® 594 cadaverine	Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Alexa Fluor® 647 cadaverine disodium salt	Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Bepanthen Augen und Nasensalbe 5g	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany
Cutasept F Lösung 250 ml (Desinfektionsspray)	Bode Chemie GmbH & Co., Hamburg, Deutschland
Dextran, Fluorescein, 3000 MW, Anionic, Lysine Fixable	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Dextran, Texas Red®, 3000 MW, Lysine Fixable	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Dextran, Texas Red®, 10000 MW, Lysine Fixable	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 70%	CLN GmbH, 85416 Niederhummel, Deutschland
EUK 134 (Katalase und Superoxiddismutase Analogon)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Fentanyl B. Braun 0.1mg	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
FeTPPS (5,10,15,20 (4 Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato Eisen (III) Chlorid (Peroxynitrat-Scavenger)	EMD Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA
Forene® (Isofluran)	Abbott AG, Baar, Schweiz
50%ige Wasserstoffperoxidlösung (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Ketaminhydrochloride 10%	Bremer Pharma GmbH, Warburg, Deutschland
Domitor® (Medetomidin) 1mg/ml	Orion Pharma Corporation, Espoo, Finnland

Midazolam B. Braun 5mg/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PBN (N-tert-Butyl- α -phenylnitron; Superoxid- und Hydroxylradikal-Scavenger)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Ringerlösung Fresenius KabiPac	Fresenius KaBI Deutschland, Bad Homburg, Deutschland
Steriler künstlicher Maus Liquor cerebrospinalis (aCSF)	Lösung A: 8,66 g NaCl (Merck) 0,224 g KCl (Merck) 0,206 g CaCl ₂ · 2H ₂ O (Sigma-Aldrich) 0,163 g MgCl ₂ · 6 H ₂ O (Sigma-Aldrich) Zugabe von 500ml dH ₂ O Lösung B: 0,142 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Merck) 0,027 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Merck) Zugabe von 500ml dH ₂ O Mischung von Lösung A und B im Verhältnis 1:1
Synthetisches (\pm)- α -Tocopherol, \geq 96% (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Xylariem 20 mg (Xylazin)	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald – Insel Riems, Deutschland

3.1.2) Werkzeuge und Materialien

Operationswerkzeuge und Materialien	
BD Hypodermic Needles Microlance 3 23 Gauge (0,6 mm, blau) für sukutane Injektion der Immunisationsemulsion	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD Hypodermic Needles Microlance 3 30 Gauge (0,3 mm, gelb) für subkutane Injektion von Ringer-Lösung sowie für i.p.-Gabe von Ptx, Anästhetika und der Tocopherol-Therapie	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD Plastipak Hypodermic luer slip syringe 1 ml (Spritze für Injektionen von Ketamin/Xylazin, MMF und Ptx)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Cast Alnico Magnete	Eclipse Magnetics Ltd., Sheffield, UK
Discofix® 3SC	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Dumont Mini Pinzetten – Inox Style 3	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dumont Mini Pinzetten – Inox Style 5	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethicon Ethilon monofil 6-0, 667H (Faden für Hautnähte)	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Feather stainless steel blade (Skalpell)	Pfm medical AG, Köln, Deutschland
Metallplatte	Eigene Spezialanfertigung
Noyes Spring Scissors (große Federschere)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
P-30 Vertikales Mikropipettenziehgerät	Sutter Instrument, Novato, California, USA
Gummibänder	
Safety-Multifly-Set 21Gx3/4" TW (0,8 x 19 mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spongostan special (absorbierender hämostatischer Gelatineschwamm)	Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, USA
Sugi (Absorbierende Zelluloseputzer)	Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland
Vannas-Tübingen Spring Scissors (spitzwinklige Federschere)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wella contura W 7807 (Rasierer)	Wella, Darmstadt, Deutschland
6 Inch Borosil GL W/FIL 1.0mm (Glaskapillaren für Farbstoffinjektionen)	World Precision Instruments Inc., Sarasota, Florida, USA
Osmotische Minipumpe (Modell 1007B)	Alzet, Cupertino, Kalifornien, USA
Intrathekaler Katheter (Modell 7743)	Alzet, Cupertino, Kalifornien, USA

Werkzeuge und Materialien für Histologie:	
Deckgläser (24x60 mm) für Mikroskopie	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Objektträger (26x76 mm) für Mikroskopie	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Papierfilter (kreisförmig mit 185 mm Durchmesser)	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten, Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße (2 ml und 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tissue Tek Cryomold Biopsy, 10x10x5 mm (Form für Gewebeeinbettung)	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande

Tissue Tek Cryomold Standard, 25x20x5 mm (Form für Gewebeeinbettung)	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
12-Well Mikrotiterplatte	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
15ml und 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen (Falcon tubes)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3) Technische Geräte

Operationen	
FST 250 Hot Bead Sterilizer (Sterilisator für OP-Instrumente)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ismatec IP high precision multichannel pump (Pumpe für H ₂ O ₂ Superfusion)	ISMATEC SA, Labortechnik – Analytik, Glattbrugg, Schweiz
Olympus KL 1500 LCD (Lichtquelle für Stereooptionsmikroskope)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Olympus Stereo Microscope SZ51 (Stereo-Mikroskop für Operationen)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
STS-A Compact Spinal Cord Clamps (Klemmen für Rückenmark)	Narishige International Ltd., London, UK
T/Pump (Wärmekissen)	Gaymar Industries, Orchard Park, New York, USA
100 W Infrarotlampe	Beurer GmbH, Ulm, Deutschland

Histologie	
Ismatec IP high precision multichannel pump (Pumpe für Perfusionen)	ISMATEC SA, Labortechnik – Analytik, Glattbrugg, Schweiz
KERN EW 150-3M (Waage)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Labor pH-Meter inoLAB	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Leica CM1850 Kryostat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetische, beheizbare Rührplatte MR 3001K und Rührfische	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Olympus IX71 inverses Fluoreszenzmikroskop (initiale Untersuchung immunhistochemischer Färbungen)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA

Mikroskopie	
FV 1000 Konfokalsystem montiert auf einem vertikalen BX61 Mikroskop und ausgerüstet mit x10/0.3 trocken, x20/0.85 Öl- und x60/1.42 Ölimmersionsobjektiven	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
MaiTai Deep See® Titanium:sapphire Laser	Newport/Spectraphysics, Irvine, California, USA
380FM-U shifting table und Bridge 500/InVivo	Luigs & Neumann Feinmechanik & Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland
Olympus FV1200 MPE Multiphotonmikroskop ausgestattet mit x25/1.05 Wasserimmersionsobjektiv	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Datenauswertung und Software	
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA
Graphpad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ/Fiji	Frei zugänglich unter: http://fiji.sc/Downloads
Microsoft Office (Powerpoint, Excel, Word) 2007	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

3.2) Versuchstiere

Alle *in situ* und *in vivo* Experimente zur Mikroskopie axonaler Ca^{2+} -Signale und zur axonalen Farbstoffaufnahme wurden in transgenen Mäusen der Linie Thy1-CerTN-L15 durchgeführt, die freundlicherweise von Oliver Griesbeck (Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Mauslinie basiert auf einem FVB:C57BL/6 genetischen Hintergrund und exprimiert unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Promoters Thy1 das CFP-Derivat Cerulean als Donor- und Citrine, ein YFP-Derivat, als Akzeptorfluorophor, die durch Fragmente des Ca^{2+} -bindenden Proteins Troponin C miteinander verbunden sind (Heim et al., 2007). Durch Bindung von Ca^{2+} an Troponin C kommt es zu einer Konformationsänderung dieses Konstruktes und es erfolgt entsprechend des FRET-Mechanismus ein Energietransfer vom Donor- zum Akzeptorfluorophor. Dies bewirkt eine Abnahme der Intensität des CFP-Signals und eine Zunahme des YFP-Signals im Verhältnis zum nicht- Ca^{2+} -gebundenen Zustand, sodass die Ratio der YFP:CFP-Fluoreszenzintensitäten als quantitativer Marker für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verwendet werden kann.

Für Experimente bei denen mehrere Farbstoffe injiziert wurden, wurden Thy1-CFP-5-Mäuse verwendet. Alle Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des Instituts für klinische Neuroimmunologie unter standardisierten Bedingungen mit einem 12h Tag-/12h Nacht-Rhythmus gehalten und aufgezogen. Dabei hatten die Tiere Zugang zu autoklaviertem Futter (Standardfutter "Maus" von Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden in Käfigen des Eurostandard Typs II 365x207x140mm (Techniplast, Hohenpreißenberg, Deutschland) mit maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten, die Teil eines einzelbelüfteten IVC-Käfigsystem waren. Bis zu 21 Tage nach der Geburt wurden die Tiere im Zuchtraum gemeinsam mit dem Muttertier gehalten, bevor eine Entwöhnung und die Aufteilung nach Geschlecht erfolgten. Alle Tierexperimente erfolgten nach den gültigen rechtlichen Vorgaben und wurden von der Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.3) Methoden

3.3.1) Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Zur Induktion der EAE wurde ein gut etabliertes Versuchsprotokoll verwendet, das zur Erhöhung der Erfolgsrate der Immunisationen geringfügig abgewandelt wurde (Abdul-Majid et al., 2000). Alle für Experimente verwendeten Mäuse waren 6-12 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 20-30 g. Die Mäuse wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen von Ketamin (87 µg/g Körpergewicht) und Xylazin (13µg/g Körpergewicht) anästhesiert, bevor sie 250µl einer Immunisationsemulsion bestehend aus einer 1:1-Mischung aus 350-400 µg gereinigtem, rekombinant hergestelltem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG₁₋₁₂₅, hergestellt in E.coli) in Natriumacetatpuffer (pH 3,0) und komplettem Freund'schen Adjuvans, das 625 µg *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra enthält, erhielten. Diese Immunisationsemulsion wurde als drei subkutane Injektionen verabreicht, wobei je 100 µl in jede Flanke und 50 µl an der Schwanzbasis injiziert wurden. Um die Erfolgsrate der EAE-Induktion zu erhöhen, erfolgten am Tag der Immunisation sowie 2 Tage später jeweils i.p.-Injektionen von 400 ng Pertussistoxin in 100 µl sterilem PBS. Die Injektion der Immunisationsemulsion und der zeitliche Ablauf bis zur Verwendung der Tiere für Experimente sind in **Abbildung 7** dargestellt.

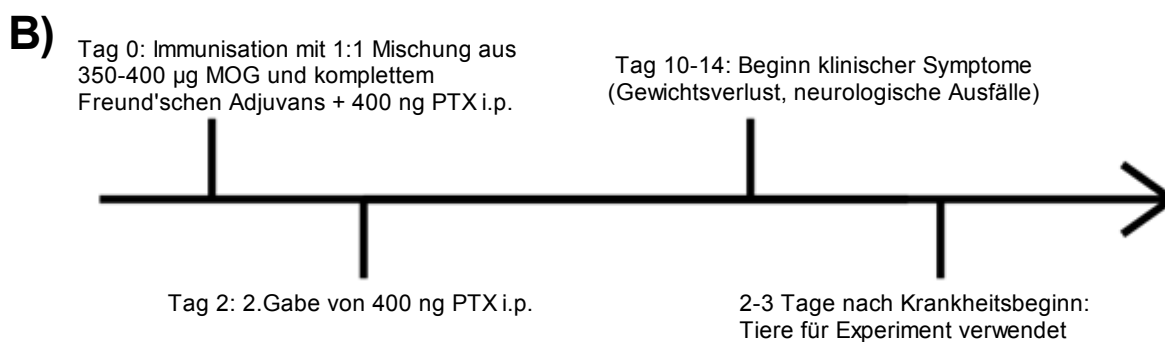
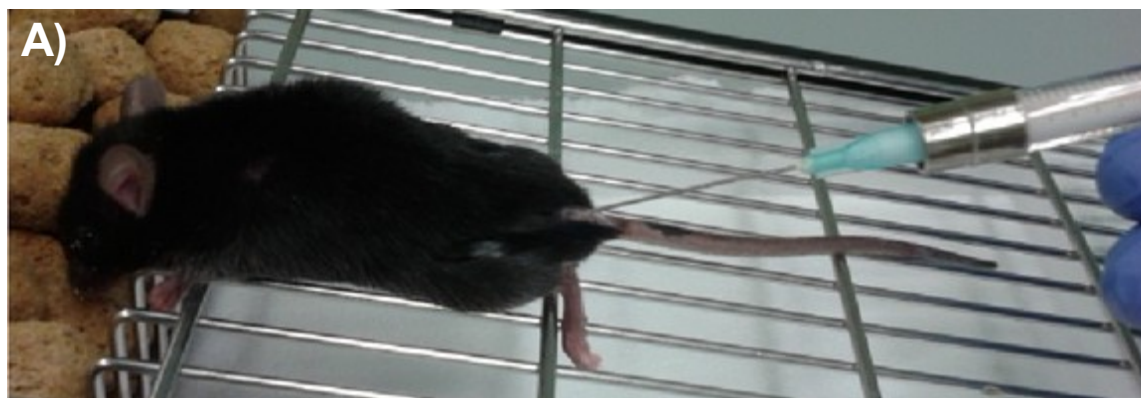


Abbildung 7: Aktive EAE-Induktion in CerTN-L15-Mäusen:

(A) 6-12 Wochen alte CerTN-L15-Mäuse wurden mit 250 μl einer Immunisationsemulsion bestehend aus einer 1:1-Mischung aus 350-400 μg MOG₁₋₁₂₅ und komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. (B) stellt den zeitlichen Ablauf von der Immunisation bis zur Verwendung der Tiere für Experimente dar.

Nach der Immunisation wurde täglich das Körpergewicht der Tiere erfasst und die Mäuse wurden auf klinische Symptome der EAE untersucht. Die klinischen Symptome wurden anhand des in **Tabelle 2** dargestellten und gut etablierten Scoring-Systems erhoben (Sorbara et al., 2014). Der Beginn der EAE wurde definiert als ein Gewichtsverlust von $>10\%$ ausgehend vom Gewicht vor der Immunisation und dem Auftreten erster klinischer Symptome. 2-3 Tage nach Auftreten klinischer Symptome kann man vom Höhepunkt der akuten EAE ausgehen und sofern die Tiere einen klinischen Score ≥ 2 erreichten, wurden sie für Experimente verwendet.

Score	Klinische Symptome
0	Keine Krankheitszeichen
0,5	Partielle Schwanzschwäche
1	Komplette Lähmung des Schwanzes
1,5	Geringe Schwäche der Hinterläufe, Gangunsicherheit
2	Parese der Hinterläufe
2,5	Parese der Hinterläufe mit teilweisem Nachziehen der Füße
3	Komplette Lähmung der Hinterläufe
3,5	Komplette Lähmung der Hinterläufe mit Parese der Vorderläufe
4	Komplette Lähmung der Hinter- und Vorderläufe
5	Moribund

Tabelle 2: Klinisches Scoring-System der EAE

3.3.2) Operative Prozeduren

Die Mäuse wurden durch i.p.-Injektionen von entweder Ketamin (87 µg/g Körpergewicht (KG)) und Xylazin (13µg/g KG) oder MMF (Fentanyl (0.05mg/kg KG), Midazolam (5.0mg/kg KG) und Medetomidin (0.5mg/kg KG)) anästhesiert und für 15-20 min auf ein Wärmekissen gelegt, um den Wirkungseintritt der Anästhetika abzuwarten. Bevor die Operationen begonnen wurden, wurden Abwehrreflexe (Pfoten-, Zehen- und Ohrkneifen) getestet, um eine ausreichende Anästhesietiefe zu gewährleisten. Das Fell über dem Laminektomiebereich wurde mit einem elektrischen Rasierer entfernt und die Haut mit 70% Ethanol gereinigt und desinfiziert. Die Tiere wurden dann in Bauchlage auf einer Metallplatte gelagert, wobei die Extremitäten durch Gummibänder in eine abduzierte Position gebracht wurden, um einen besseren Zugang zum Operationsbereich zu erreichen. Ein medianer Hautschnitt von den oberen thorakalen Wirbelkörpern bis zum Beckenring wurde mit einem Skalpell durchgeführt und das subkutane Gewebe mit der kleinen Federschere entfernt. Um einen größeren Zugang zum Operationsgebiet zu ermöglichen wurde die Haut mit auf Magneten befestigten Operationshacken aufgespannt. Bei Mäusen befindet sich die Crista iliaca auf Höhe des Zwischenwirbelraums zwischen den Wirbelkörpern LWK 5 und 6 (Rao et al., 2007) und wurde als anatomische Orientierungsmarke zum Auffinden des LWK 3 genutzt. Der Zwischenwirbelraum zwischen LWK 2 und 3 wurde durch einen kleinen Hautschnitt markiert. Die paravertebrale Muskulatur wurde sorgfältig mit der kleinen Federschere durchtrennt und jede eventuell auftretende Blutung wurde mit sterilen Zelluloseputfern gestillt. Der Processus spinosus von LWK 3 wurde mit der Pinzette angehoben, was zu einem Ausgleich der natürlichen Lendenlordose und einer Erweiterung des Raums zwischen LWK 2 und 3 führte und so

die vorsichtige Entfernung des das Rückenmark überlagernden Gewebes in diesem Bereich mit der großen Federschere ermöglichte. Nachdem das Rückenmark sichtbar wurde, erfolgte eine Laminektomie der beiden kranial angrenzenden Wirbelkörper, wozu eine 14 mm gewinkelte Federschere verwendet wurde. Blutungen, die während der Operation auftraten, wurden durch sterile Zellulosestopfen gestillt und entfernt. Der Laminektomiebereich wurde mit künstlichem Liquor cerebrospinalis (aCSF) getränktem Spongostan™ abgedeckt, um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern.

3.3.3) Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen

Eines der wesentlichen Ziele meines Projektes war die Beantwortung der Frage, ob es im Rahmen der akuten EAE zu einer Schädigung der Plasmamembran von Axonen kommt und ob diese eine mögliche Erklärung für die beobachteten Störungen der axonalen Ca^{2+} -Regulation sein könnten. Dazu entwickelte ich eine neue Methode der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen in den Subarachnoidalraum des lumbalen Rückenmarks von Mäusen. Es wurden 2,5% Lösungen der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe in aCSF hergestellt: Dextran Texas Red® 3000 MW, Dextran Texas Red® 10000 MW, Dextran Fluorescein (FITC) 3000 MW. Alexa Fluor® 647 Cadaverine und Alexa Fluor® 594 Cadaverine wurden als 5 mM-Lösung in aCSF verwendet. Glaskapillaren wurden mit einem speziellen Pipettenziehgerät fein gezogen und mit 2 µl Fluoreszenzfarbstoff gefüllt, der dann in den Subarachnoidalraum im lumbalen Rückenmarksbereich der Versuchstiere streng einseitig injiziert wurde. Trotz aller Bemühungen traumatische Schädigungen durch die Farbstoffinjektion so gering wie möglich zu halten, sind diese nicht sicher auszuschließen, sodass vorsichtshalber nur die zur Injektionsseite kontralaterale Hälfte des Rückenmarks für die Auswertung verwendet wurde, um die Möglichkeit einer traumatisch induzierten Farbstoffaufnahme auszuschließen. Der Laminektomiebereich wurde chirurgisch verschlossen und die Mäuse für die anschließende Farbstoffinkubationszeit von 2 Stunden auf einem Wärmekissen gelagert. Nach 2 Stunden Farbstoffinkubation wurden die Tiere mit Isofluran tödlich anästhesiert und mit 4% PFA transkardial perfundiert, um das Gewebe für die spätere Auswertung zu fixieren. Alternativ wurden die Tiere nach ebenfalls 2 Stunden Farbstoffinkubation für *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopieexperimente verwendet. Intraoperative Bilder zur Illustration des chirurgischen Vorgehens und der Farbstoffinjektion sind in **Abbildung 8** dargestellt.

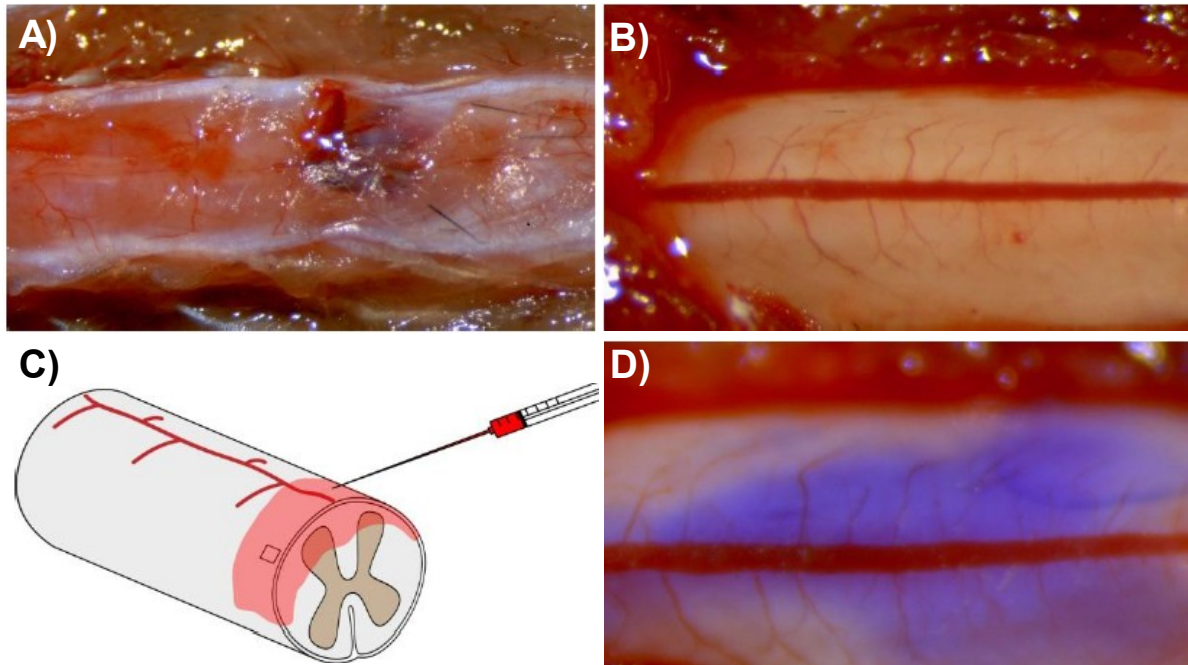


Abbildung 8: Intraoperative Bilder der Laminektomie und intrathekalen Injektion von Dextran Texas Red® 3000

(A) Blick auf die Wirbelsäule nach chirurgischer Präparation der paravertebralen Muskulatur. (B) zeigt das freigelegte Rückenmark nach Laminektomie vor bzw. 5 Minuten nach Farbstoffinjektion (D; Farbstoffinjektion oberhalb der Zentralvene) bei Blick durch das OP-Mikroskop. (C) Schematische Darstellung der Farbstoffinjektion und Verteilung des Farbstoffs entlang des Rückenmarks ((C) adaptiert von Maarten Witte)

Für die Untersuchung der Dynamik der Entstehung bzw. der Reparatur der Membranläsionen wurden zu Beginn des Experiments 2 μ l Dextran Texas Red® 3000 in den Subarachnoidalraum von CFP-5-Mäusen am klinischen Höhepunkt der akuten EAE injiziert und 4 Stunden später erfolgte eine weitere Injektion von 2 μ l Dextran FITC 3000, bevor die Mäuse nach einer nochmaligen Farbstoffinkubationszeit von 1 Stunde tödlich anästhesiert und mit 4% PFA fixiert wurden. Während der Farbstoffinkubationszeit wurde ein Austrocknen des Rückenmarks durch kontinuierliche Bedeckung mit aCSF verhindert und die Körpertemperatur der Tiere durch eine Infrarotlampe aufrechterhalten.

3.3.4 *In-vivo* 2-Photonen-Mikroskopie des Rückenmarks

Der grundsätzliche experimentelle Aufbau ist bereits beschrieben worden (Misgeld et al., 2007b) und wurde für die hier vorliegende Arbeit entsprechend angepasst. Im Anschluss an die Laminektomie bzw. nach 2 Stunden Farbstoffinkubation wurde die Wirbelsäule der Maus

durch Klemmen an den kaudal und kranial angrenzenden Wirbelkörpern sowie dem Schwanzansatz mit einer spezifisch angefertigten Aufspannvorrichtung stabilisiert. Bei allen Experimenten blieb die Dura mater intakt, um ein Auswaschen des Fluoreszenzfarbstoffes aus dem Gewebe zu verhindern. Da für die Mikroskopie ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet wurde und ein Austrocknen des Gewebes während des Experiments unbedingt zu vermeiden ist, wurde eine Wanne aus 2,5% Agarose in aCSF um die Klemmen herum errichtet. Diese wurde mit aCSF gefüllt und nahm das Objektiv auf. Die Mäuse wurden auf die Mikroskopieplattform transferiert und während der gesamten Experimentdauer – mit Ausnahme der eigentlichen Mikroskopieaufnahmen - wurde die Körpertemperatur der Tiere durch Bestrahlung mit einer Infrarotwärmelampe aufrechterhalten.

Ein Olympus FV1200 MPE Multiphotonmikroskop wurde für alle *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopieexperimente verwendet. Dieses war mit einem Titanium:Sapphire Laser (Newport/Spectraphysics) ausgerüstet, dessen Wellenlänge in einem Bereich von 690 nm bis 1040 nm frei wählbar ist und der im Bereich dieses Spektrums Laserimpulse kürzer als 100 fs und mit einer Energie von $>2,5$ W generieren kann. Ein akustisch-optischer Modulator wurde verwendet, um einerseits eine konstante Frequenz der Laserimpulse zu erreichen und um andererseits die benötigte Laserstärke und die daraus resultierende Fototoxizität für das Gewebe soweit wie möglich zu reduzieren. Der Laserstrahl wurde durch einen Strahlteiler nach Kepler an die Größe der hinteren Apertur der Objektivlinse angepasst. Für alle Experimente mit CerTN-L15 Mäusen wurde der Laser auf eine Wellenlänge von 840 nm eingestellt, um eine simultane Anregung von Citrine, Cerulean und dem injizierten Farbstoff zu erreichen. Unter der Verwendung von spezifischen wellenlängenabhängigen Emissionsfiltern für Cerulean (455-490 nm), Citrine (526-557 nm) und den injizierten Farbstoff (660-740 nm) wurden die emittierten Fluoreszenzsignale gesammelt, bevor sie anschließend entweder durch ein „photo multiplier tube“ (PMT; verwendet zur Detektion des Farbstoffsignals) oder durch einen Galliumarsenidphosphid-Detektor (GaAsP; verwendet für Citrine- und Cerulean-Signale) detektiert wurden. Hochaufgelöste (1024 x 1024 Pixel) dreidimensionale Bildstapel mit einer Schichtdicke von 1 μ m in der Z-Ebene wurden von der Oberfläche des Rückenmarks bis zur grauen Substanz mit einem, in aCSF eingetauchten 25x/1.05 Wasserimmersionsobjektiv (Olympus) aufgenommen. Hierbei betrug die Pixelgröße ca. 250 nm. Die Stärke des Lasers wurde für die Mikroskopie so gering wie möglich gehalten, um einerseits fototoxische Effekte sowie andererseits „Bleed-through“-Artefakte zwischen den verschiedenen Detektorkanälen zu minimieren. Während des Experiments wurden alle 30 Minuten die Abwehrreflexe

des Versuchstieres getestet, um eine adäquate Anästhesietiefe zu gewährleisten. Falls erforderlich wurde eine entsprechende Dosis an Ketamin-Xylazin oder MMF verabreicht.

Um die Effekte von H₂O₂ auf Axone und deren Ca²⁺-Signal sowie eine mögliche Farbstoffaufnahme zu untersuchen, wurde das Rückenmark mit einer 100 mM H₂O₂-Lösung und einer Flussrate von 1 ml/min über eine Mehrkanalpumpe superfundiert. Nach 90 Minuten H₂O₂-Applikation wurden 0,5 µl Alexa Fluor® 594 Cadaverine intrathekal injiziert. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wurden *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopiebilder aufgenommen.

3.3.5) Behandlung mit Tocopherol

α-Tocopherol, eine Form von Vitamin E, ist im Körper als lipophiles Antioxidans unverzichtbar. Um potentielle Effekte von Tocopherol auf die axonale Farbstoffaufnahme zu untersuchen, wurden die Mäuse gemäß dem oben beschriebenen Protokoll mit MOG-Emulsion immunisiert und erhielten einmal täglich i.p.-Injektionen von entweder 10 IE/kg α-Tocopherol (entspricht 9 mg DL-all-*rac*-α-Tocopherol/kg) oder Vehikellösung (3% DMSO in 0,9% NaCl-Lösung). Die Injektionen begannen ab dem Tag des Gewichtsverlustes und wurden fortgesetzt bis die Tiere 2-3 Tage nach dem Beginn klinischer Symptome für Experimente verwendet wurden. Dabei wurden eine Laminektomie entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens durchgeführt und 2µl Dextran 3000 Texas Red® in den Subarachnoidalraum injiziert. Nach 2 Stunden Farbstoffinkubation wurden die Tiere tödlich anästhesiert und mit 4% PFA transkardial perfundiert, um das Gewebe für spätere Auswertungen zu konservieren.

3.3.6) Therapie mit ROS- und RNS-Scavengern

In unserem Labor ist bereits zuvor eine Mischung verschiedener molekularer Scavenger und ROS/RNS-abbauender Enzyme etabliert worden (Nikic et al., 2011), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit von mir ebenfalls angewandt wurde, um zu untersuchen, ob die beobachteten axonalen Ca²⁺-Veränderungen und die Farbstoffaufnahme durch ROS/RNS bedingt sein könnten. Diese bestand aus EUK 134, einem Analogon der Katalase und Superoxiddismutase, FeTPPS (5, 10, 15, 20 (4 Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato Eisen (III) Chlorid), einem Peroxynitrat-Scavenger, und PBN (N-tert-Butyl-α-phenylnitron), einem Superoxid- und Hydroxylradikal-Scavenger. Die genannten Wirkstoffe wurden in 3% DMSO in 0,9% NaCl-Lösung gelöst und in den folgenden Dosierungen verwendet: EUK 134 15mg/kg KG, FeTPPS

20mg/kg KG und PBN 50mg/kg KG. Die EAE wurde in CerTN-L15 Mäusen entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll induziert und ab dem Tag des Gewichtsverlustes erhielten die Tiere zweimal täglich i.p.-Injektionen von entweder der ROS/RNS-Scavenger-Wirkstoffkombination oder Vehikellösung (3% DMSO in 0,9% NaCl). 2-3 Tage nach Beginn klinischer Symptome wurden die Tiere für *in-vivo* Ca²⁺-Mikroskopieexperimente verwendet.

3.3.7) Weitere Gewebeprozessierung und Immunhistochemie

Nach der *in-vivo* Mikroskopie und/oder Farbstoffinjektion wurden die Tiere tödlich mit Isofluran anästhesiert und mit 4% PFA transkardial perfundiert. Sofort nach der Perfusion wurde die Wirbelsäule aus dem toten Tier herausgetrennt und für 24-48 Stunden bei 4°C in 4% PFA aufbewahrt, um eine ausreichende Fixierung des Gewebes sicherzustellen. Anschließend wurde das gesamte Rückenmark unter einem Mikroskop aus der Wirbelsäule freipräpariert und für mindestens 48 h zur Kryoprotektion in 30% Saccharoselösung bei 4°C gelagert. Vor dem Schneiden des Gewebes am Kryostat wurde das Gewebe in „Tissue Tek optimal cutting temperature“ (O.C.T.) eingebettet und bei -20°C gefroren.

Für den immunhistochemischen Nachweis von Myelin Basic Protein (MBP) wurden 20 µm dicke Längsschnitte des lumbalen Rückenmarks am Kryostat angefertigt und dann auf eine 12-Well Mikrotiterplatte mit PBS transferiert. Die immunhistochemische Färbung von MBP erfolgte nach folgendem Protokoll: Die Schnitte wurden dreimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen, bevor sie zur Antigendemaskierung für 20 Minuten in -20°C kalten Methanol verbracht wurden. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte erneut dreimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen, bevor unspezifische Antigenbindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10% goat serum in 0,5% Triton X-100-PBS geblockt wurden. Die Schnitte wurden dann bei 4°C über Nacht mit rabbit anti-human MBP-antibody (Dako) als Primärantikörper in einer 1:200 Verdünnung in 0,1% NaN₃, 1% goat serum und 0,5% Triton X-100-PBS inkubiert. Am nächsten Morgen wurden nicht gebundene Reste des Primärantikörpers mit 0,5% Triton X-100-PBS ausgewaschen (3 Waschschrte á 10 Minuten) und ein goat anti-rabbit Alexa Fluor® 647 antibody (Invitrogen) als Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 1% goat serum und 0,5% Triton X-100-PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei diesem Schritt erfolgte außerdem eine Gegenfärbung von Zellen mit Neurotrace® 435/455, der in einer 1:1000 Verdünnung zum Sekundärantikörper hinzugegeben wurde. Be-

vor die Schnitte mit Vectashield auf Objektträger aufgebracht werden konnten, wurden sie noch dreimal für jeweils 30 Minuten mit PBS gewaschen.

Zur Analyse der axonalen Morphologie und Farbstoffaufnahme in PFA-fixiertem Gewebe, wurden 50 µm dicke Längsschnitte direkt nach dem Schneiden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden getrocknet. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese dreimal mit PBS bei Raumtemperatur für jeweils 10 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Neurotrace® 435/455 als Gegenfärbung für Zellen in einer 1:1000 Verdünnung und die Inkubation bei 4°C über Nacht. Abschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, bevor das Gewebe mit Vectashield fixiert wurde.

3.3.8) Konfokalmikroskopie

Nach der oben beschriebenen Fixierung und Färbung des Gewebes wurden mittels eines FV1000 Konfokalsystems, das auf einem senkrecht stehenden BX61 Mikroskop montiert ist (Olympus), Konfokalmikroskopiebilder aufgenommen. Die Neurotrace®-Färbung diente zur Identifikation von entzündlichen Läsionen und Bilder dieser Regionen wurden mit einem 60x/1.42 Ölimmersionsobjektiv akquiriert. Als Zusatzkriterium wurden entzündliche Läsionen auch anhand der auffälligen axonalen Morphologie identifiziert.

Sofern Proben mit mehr als drei Fluorophoren mikroskopiert wurden, erfolgte die Aufnahme derselben Läsionsstelle zweimal mit Lasern verschiedener Wellenlängen, die jeweils so ausgewählt wurden, um „Bleed-through“-Artefakte zwischen den einzelnen Kanälen möglichst zu reduzieren. Außerdem wurden die einzelnen Laserlinien grundsätzlich sequentiell ausgewählt, was ebenfalls zur Vermeidung von Artefakten diente. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Tiere im Rahmen eines Experiments zu gewährleisten, wurden für alle Mikroskopieaufnahmen innerhalb eines Versuchs identische Detektoreinstellungen verwendet, wobei die Stärke des Lasers an die variable Stärke des Farbstoffsignals angepasst wurde. Bildstapel mit hochaufgelösten 16 bit Bildern (1024 x 1024 Pixel) mit einer Pixelgröße von ca. 200 nm und einer Schichtdicke in der Z-Ebene von 1 µm wurden aufgenommen und mit der frei verfügbaren Fiji-Software weiterbearbeitet. Fiji ist eine Version der open-source Plattform ImageJ, die besonders für die Anwendung im Bereich der biomedizinischen Forschung modifiziert wurde (<http://imagej.net/Fiji/Downloads>; (Schindelin et al., 2012)).

3.3.9) Datenauswertung

Konfokalmikroskopieaufnahmen von fixierten Gewebeproben wurden mit Fiji weiterbearbeitet. Der entzündliche Läsionsbereich wurde anhand der Infiltration durch Immunzellen definiert, die durch die Neurotrace®-Färbung visualisiert wurden. Um die Intensität des Fluoreszenzsignals innerhalb des Axons und in dessen unmittelbarer Umgebung in allen Detektorkanälen zu messen, wurden sogenannte “regions of interest“ (ROIs) anhand des YFP-Kanals definiert. Dieser Kanal stellt die axonale Morphologie am deutlichsten dar und entspricht dem Citrine Fluorophor der CerTN-L15-Mäuse. **Abbildung 9** stellt exemplarisch diese ROIs und die Messung der Fluoreszenzintensität dar.

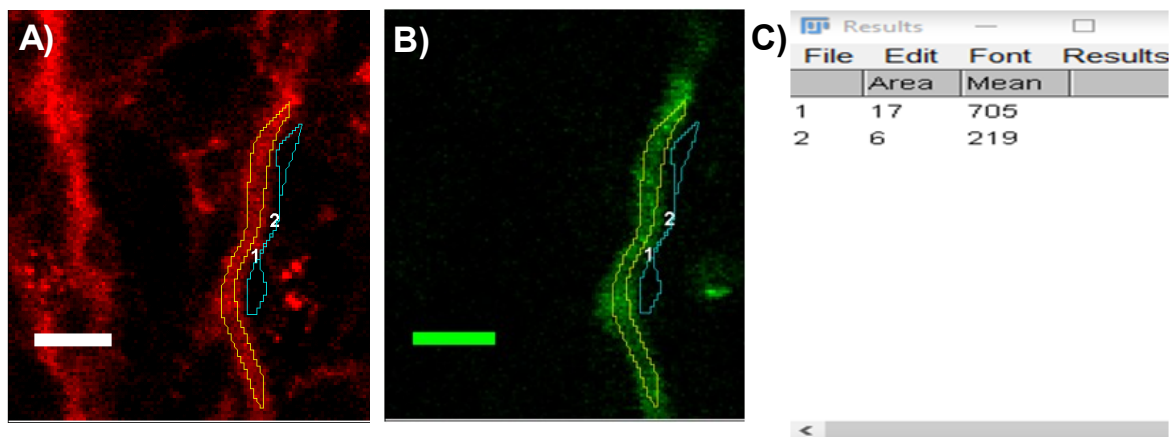


Abbildung 9: Definition der ROIs und Datenauswertung

Definition einer ROI (gelbe und blaue Markierungen) innerhalb und in der unmittelbaren Umgebung eines Axons im Farbstoffkanal (A; hier Dextran Texas Red® 3000) und YFP-Kanal (B). (C) zeigt die Messung der Fluoreszenzintensität im Farbstoffkanal für ROI 1 (gelb) und 2 (blau), wobei der Wertebereich von 0 bis 4096 in arbiträren Einheiten reicht. Maßstab 5 µm

Um ein objektives Kriterium für die Definition eines farbstoffpositiven Axons zu etablieren, wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensität innerhalb des Axons zu dessen unmittelbarer Umgebung in gesunden Kontrollen gemessen und der Quotient daraus berechnet. Für jeden der verwendeten Farbstoffe wurde getrennt ein Schwellenwert berechnet ab dessen Überschreiten ein Axon als farbstoffpositiv definiert wurde. Dieser Schwellenwert wurde als der Mittelwert des Fluoreszenzintensitätsquotienten zwischen Axon und unmittelbarer Umgebung der gesunden Kontrollpopulation + 3 Standardabweichungen (SD) festgelegt. Da die Qualität der Farbstoffinjektion und der Gewebefixierung leider eine gewisse Variabilität aufwiesen, wurden nur solche Bilder für die Auswertung verwendet, die von der visuellen Einschätzung

her eine Fluoreszenzintensität deutlich über dem Detektorhintergrundsignal aufwiesen. Da die ROIs für die unmittelbar an das Axon angrenzende Umgebung im YFP-Kanal definiert wurden, aber besonders in akuten EAE-Läsionen sich zum Teil auch Immunzellen und meningeale Strukturen mit Farbstoff anfärbten und dadurch ein falsch-hohes Umgebungssignal erzeugt hätten, war es in einer geringen Anzahl von Fällen erforderlich, die entsprechenden ROIs anzupassen, um die Messung derartiger Strukturen als Umgebungssignal zu vermeiden. Diese Anpassung wurde allerdings nur bei Axonen vorgenommen, die vom visuellen Eindruck her als eindeutig farbstoffpositiv erschienen, aber aufgrund des starken Umgebungssignals bei der mathematischen Auswertung nicht als solche erfasst wurden. Außerdem wurde für jedes Axon der Durchmesser gemessen.

Ähnliche ROIs innerhalb eines Axons und in dessen unmittelbar angrenzender Umgebung wurden auch für *in-vivo* Mikroskopiebilder definiert und die Fluoreszenzintensität wurde in diesen Bereichen getrennt für die einzelnen Kanäle gemessen. Für alle *in-vivo* Experimente wurde für Farbstoffinjektionen ausschließlich Alexa Fluor® 594 Cadaverine verwendet, da sich dieser Farbstoff ausreichend gut mit einer Wellenlänge von 840 nm anregen lässt und dabei verhältnismäßig wenig mit der FRET-basierten Messung des axonalen Ca^{2+} -Signals interferiert. Die folgenden Gleichungen wurden für die Berechnung der YFP/CFP-Ratio als Indikator für den axonalen Ca^{2+} -Spiegel bzw. des Verhältnisses des Farbstoffsignals zwischen Axon und angrenzender Umgebung (Umgeb.) verwendet:

$$\text{YFP/CFP-Ratio} = (\text{YFP}_{\text{Axon}} - \text{YFP}_{\text{Umgeb}}) / (\text{CFP}_{\text{Axon}} - \text{CFP}_{\text{Umgeb}})$$

$$\text{Farbstoffratio} = \text{Alexa Fluor® 594 Cadaverine}_{\text{Axon}} / \text{Alexa Fluor® 594 Cadaverine}_{\text{Umgeb}}$$

Da jedoch bis zu 3 Fluorophore simultan mit demselben Laser angeregt wurden, stellte das „Bleed-through“-Signal zwischen den einzelnen Kanälen ein relevantes Problem dar, sodass hierfür mathematisch korrigiert werden musste. Erstens bestand ein signifikanter „Bleed-through“ des CFP-Signals in den YFP-Kanal, sodass hierfür experimentell ein Korrekturfaktor (CF_{CFP}) bestimmt werden musste. Außerdem wurde ein „Bleed-through“ des Farbstoffsignals sowohl in den YFP- als auch in den CFP-Kanal beobachtet, sodass zwei weitere Korrekturfaktoren (CF_{FY} bzw. CF_{FC}) experimentell bestimmt und in die Gleichungen eingeführt werden mussten. In den folgenden Gleichungen entspricht CF_{FY} dem „Bleed-through“-Korrekturfaktor des Farbstoffsignals in den YFP-Kanal und CF_{FC} dem „Bleed-through“-Korrekturfaktor des Farbstoffs in den CFP-Kanal. Schlussendlich wurden folgende Gleichungen für die Berechnung des YFP- bzw. CFP-Signals verwendet:

$$CFP_{Axon} = CFP_{Axon, gemessen} - CF_{FC} * Alexa\ Fluor\textcircled{R}\ 594\ Cadaverine_{Axon}$$

$$CFP_{Umgeb} = CFP_{Umgeb, gemessen} - CF_{FC} * Alexa\ Fluor\textcircled{R}\ 594\ Cadaverine_{Umgeb}$$

$$YFP_{Axon} = YFP_{Axon, gemessen} - CF_{FY} * Alexa\ Fluor\textcircled{R}\ 594\ Cadaverine_{Axon} - CF_{CFP} * CFP_{Axon}$$

$$YFP_{Umgeb} = YFP_{Umgeb, gemessen} - CF_{FY} * Alexa\ Fluor\textcircled{R}\ 594\ Cadaverine_{Umgeb} - CF_{CFP} * CFP_{Umgeb}$$

Angesichts der Tatsache, dass bei *in-vivo* Experimenten keine Neurotrace®-Färbung zur Definition entzündlicher Läsionen anhand der Zellinfiltration zur Verfügung stand, wurden die Läsionen basierend auf der axonalen Morphologie und einer visuellen Einschätzung des axonalen Ca^{2+} -Signals definiert. Um diese Näherung des Ca^{2+} -Signals vorzunehmen, wurde das CFP-Signal anhand einer roten Lookup-Tabelle (LUT) mit einem Wertebereich von 0 bis 4096 in arbiträren Einheiten dargestellt und mit dem YFP-Signal fusioniert, das durch eine grüne LUT mit der gleichen Skalierung repräsentiert wurde. Mit den über alle Experimente konstant gehaltenen Detektoreinstellungen für das CFP- und YFP-Signal erscheinen Axone mit einer physiologischen Ca^{2+} -Konzentration in einem orangen Farbton, während Axone mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} grünlich erscheinen. Da diese Veränderungen des Ca^{2+} -Signals sehr charakteristisch für EAE-Läsionen sind, konnten diese genutzt werden, um aktive Läsionen für die Mikroskopie aufzufinden.

3.3.10) Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Experimente ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test verwendet und das Signifikanzniveau mit $* = p < 0,05$ festgelegt. Es wurde angenommen, dass die Daten normalverteilt sind, wobei aufgrund der kleinen Stichprobengröße keine explizite Testung hierfür erfolgte. Sollten die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) gefolgt von einer Tukey post-Test-Korrektur für multiple Vergleiche verwendet.

4.) Projektrelevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die ersten Experimente in unserem Labor zur *in-vivo* Mikroskopie axonaler Ca^{2+} -Signale im Kontext der EAE wurden von Adrian-Minh Schumacher und Christoph Mahler durchgeführt. Da deren Ergebnisse den Ausgangspunkt meiner Arbeit darstellen, sollen die wichtigsten Aspekte deren Arbeiten mit Bezug zu meinem eigenen Projekt hier kurz skizziert werden.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Kerschensteiner wurde ein dreistufiger Prozess erstbeschrieben, der als Fokale Axonale Degeneration (FAD) bezeichnet wird und beschreibt, welche morphologischen Veränderungen eines Axons auftreten, wenn dieses im Rahmen der EAE geschädigt wird (Nikic et al., 2011). Mittels *in-vivo* Ca^{2+} -Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese morphologischen Veränderungen auch mit Störungen der axonalen Ca^{2+} -Homöostase korreliert sind (**Abbildung 10**).

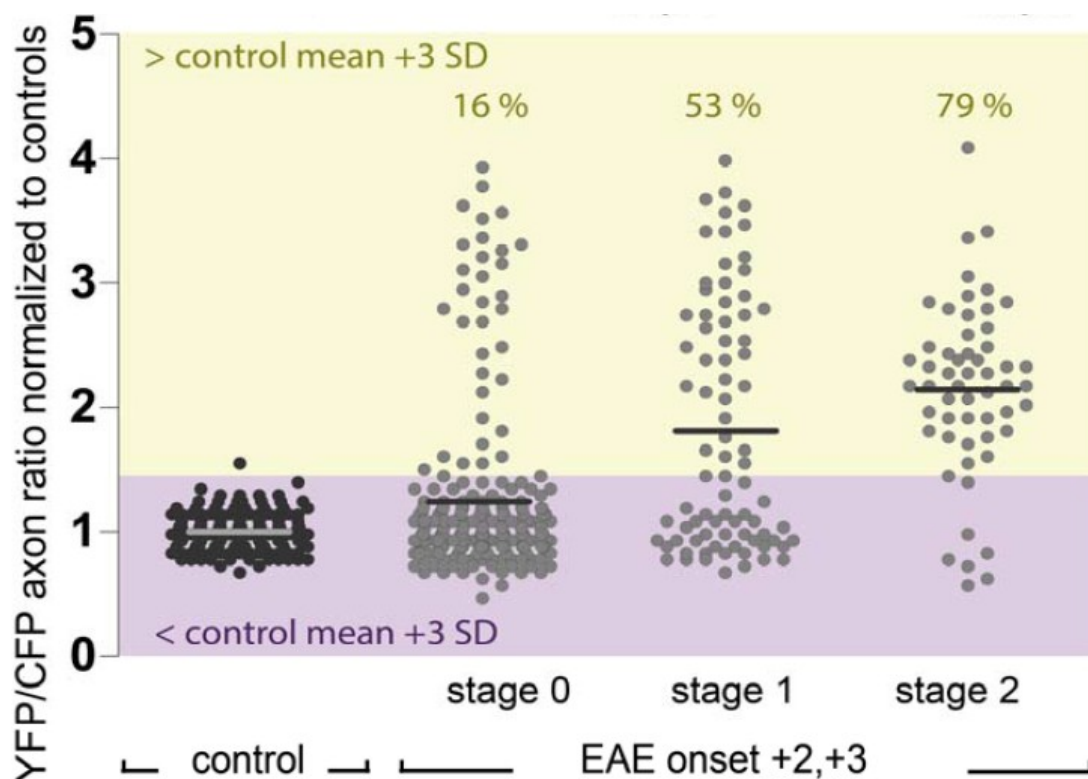


Abbildung 10: Axonale Ca^{2+} -Konzentration in akuten EAE-Läsionen und gesunden Kontrollen

Axonale Ca^{2+} -Konzentrationen anhand der zu den Kontrollen normalisierten YFP/CFP-Ratio in akuten EAE-Läsionen in den verschiedenen Stadien der FAD sowie in gesunder Kontrollpopulation. Anhand der Kontrollpopulation wurde ein Schwellenwert für Axone mit erhöhtem Ca^{2+} definiert (Mittelwert der YFP/CFP-Ratio der Kontrollen + 3 Standardabweichungen). Violetter Bereich entspricht physiologisch niedriger Ca^{2+} -Konzentration. Prozentzahlen stellen den Anteil an Axonen mit erhöhtem intrazellulärem Ca^{2+} dar, Balken jeweils den Mittelwert der YFP/CFP-Ratio. Abbildung von Adrian-Minh Schumacher, adaptierte Version.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Abweichungen der axonalen Ca^{2+} -Regulation das weitere Schicksal von Axonen im zeitlichen Verlauf bestimmen. Durch Zeitreihenaufnahmen konnte die Dynamik der Veränderungen der axonalen Ca^{2+} -Konzentration beschrieben werden und es zeigte sich, dass Axone mit einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine höhere Wahrscheinlichkeit hatten, im zeitlichen Verlauf den Prozess der FAD zu durchlaufen und irreversibel geschädigt zu werden als Axone mit einer physiologisch niedrigen Ca^{2+} -Konzentration (**Abbildung 11**).

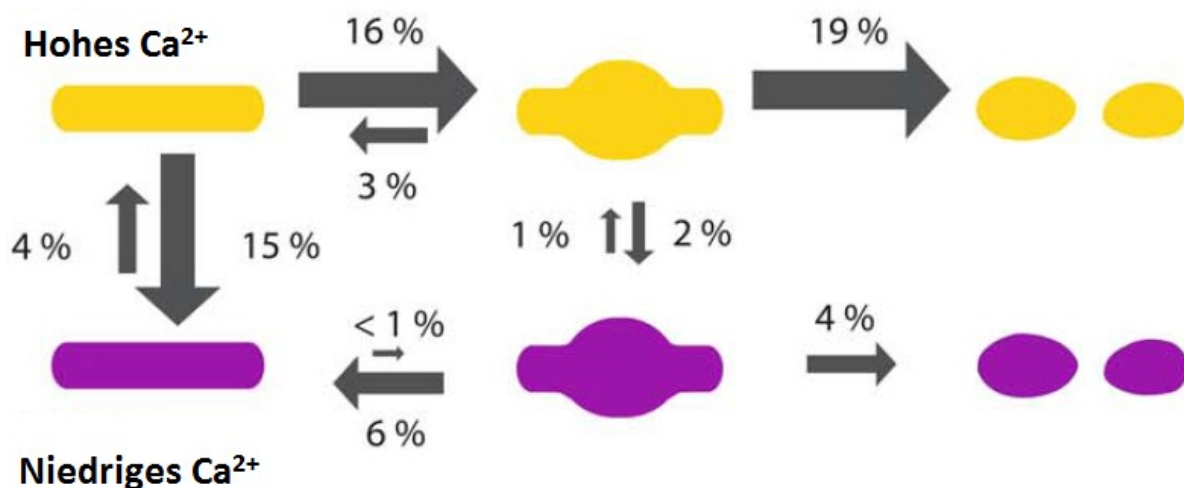


Abbildung 11: Ca^{2+} als Prädiktor für weitere Entwicklung von Axonen über Zeit bei akuter EAE

Darstellung der Wahrscheinlichkeiten pro Stunde, dass ein Axon in Abhängigkeit von seiner intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die einzelnen Stadien der FAD durchläuft, wobei links Stadium 0, in der Mitte Stadium 1 und rechts Stadium 2 der FAD dargestellt sind. Abbildung von Adrian-Minh Schumacher, adaptierte Version.

Es wurden verschiedene mögliche Mechanismen der axonalen Degeneration im Rahmen der EAE postuliert. Diese beinhalten unter anderem Effekte der Glutamatexzitotoxizität (Pitt et al., 2000) und lokale azidotische pH-Wertveränderungen im Rahmen der Entzündungsreaktion (Friese et al., 2007). Allerdings konnten in unserem Labor die oben beschriebenen Veränderungen des axonalen Ca^{2+} -Haushaltes bislang weder durch die exogene Applikation von Glutamat noch durch azidotische pH-Wertveränderungen induziert werden. Ein weiterer häufig postulierter Mechanismus der axonalen Schädigung im Kontext der EAE ist der sogenannte "virtual hypoxia pathway". Dieser besagt, dass es durch die Bildung von reaktiven Sauer-

stoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) zu einer Schädigung von Mitochondrien und in der Folge zu einer Reduktion der ATP-Produktion in den Zellen kommt. Da ATP die notwendige Energiequelle für die Na^+ - K^+ -ATPase ist, führt ein Mangel an ATP zur Depolarisation der Zelle und zum Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Dies wiederum bewirkt eine Umkehr der Transportrichtung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX), sodass Ca^{2+} nun nach intrazellulär transportiert wird. Außerdem kommt es zur Aktivierung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen der Plasmamembran. Durch den daraus resultierenden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden diverse zellschädigende Prozesse ausgelöst (Trapp und Stys, 2009). Mittels direkter Applikation von Stickstoffmonoxid (NO) auf das Rückenmark von Mäusen konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass durch RNS ein axonaler Degenerationsprozess vergleichbar der FAD und Störungen der axonalen Ca^{2+} -Regulation ausgelöst werden können. In Übereinstimmung mit der Hypothese des “virtual hypoxia pathways” konnte die NO-induzierte axonale Schädigung durch eine Vorbehandlung des Rückenmarks mit dem NCX-Antagonisten Bepridil fast vollkommen verhindert werden. Allerdings zeigte eine Behandlung mit Bepridil keinen protektiven Effekt weder auf die axonale Degeneration noch auf die axonale Ca^{2+} -Konzentration im Kontext der EAE, sodass diese Befunde nahelegen, dass NO wahrscheinlich keinen entscheidenden Faktor in der Pathophysiologie der EAE darstellt.

5.) Ergebnisse

5.1) Axonale Fluoreszenzfarbstoffaufnahme in akuten EAE-Läsionen

Fluoreszenzfarbstoffe wie etwa Texas Red® oder Alexa Fluor®, die an kleine Moleküle wie beispielsweise Dextrane oder Aminosäuren gekoppelt sind, wurden bereits als Indikator für Läsionen der Zellmembran in Tiermodellen traumatischer ZNS-Schädigung verwendet (Williams et al., 2014; Simon et al., 2009). Ein wesentliches Ziel meiner Promotion war die Beantwortung der Frage, ob derartige Membranläsionen auch im Kontext der akuten EAE (2-3 Tage nach dem Beginn klinischer Symptome) zu beobachten sind und ob diese eine mögliche Erklärung für die in vorherigen Experimenten beobachteten Störungen der Ca^{2+} -Regulation sein könnten. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung injizierte ich kleine Mengen (2 μ l) verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in den Subarachnoidalraum des lumbalen Rückenmarks von CerTN-L15-Mäusen. In Konfokalmikroskopieaufnahmen von Längsschnitten des Rückenmarks zeigte sich in gesunden Kontrolltieren praktisch keine Farbstoffaufnahme in Axone. Hingegen stellte sich ein relevanter Anteil der Axone, die durch eine akute EAE-Läsion verliefen, als farbstoffpositiv dar. Dabei wurden entzündliche Läsionen anhand der Neurotrace®-Färbung des Immunzellinfiltrats identifiziert. Um diesen subjektiv-visuellen Eindruck zu objektivieren und quantifizierbar zu machen, wurde basierend auf einer gesunden Kontrollpopulation ein Schwellenwert festgelegt, ab dessen Überschreitung ein Axon als farbstoffpositiv definiert wurde. Dieser Schwellenwert wurde als Mittelwert der Farbstoffintensitätsratio von Axon zu unmittelbar angrenzender Umgebung + 3 Standardabweichungen (SD) anhand der Kontrollen berechnet und lieferte Ergebnisse, die mit dem visuellen Eindruck sehr gut vereinbar waren. Auch mit dieser objektiven Auswertung ließen sich farbstoffpositive Axone nachweisen. Es zeigte sich, dass die axonale Farbstoffaufnahme auf den entzündlichen Läsionsbereich begrenzt war, wodurch unterstrichen wird, dass es sich hierbei in der Tat um einen EAE-vermittelten Effekt und nicht um ein durch Injektionstrauma verursachtes Artefakt handelt. Repräsentative Konfokalmikroskopieaufnahmen von gesunden Kontroll- und akut kranken EAE-Tieren sind in **Abbildung 12** dargestellt.

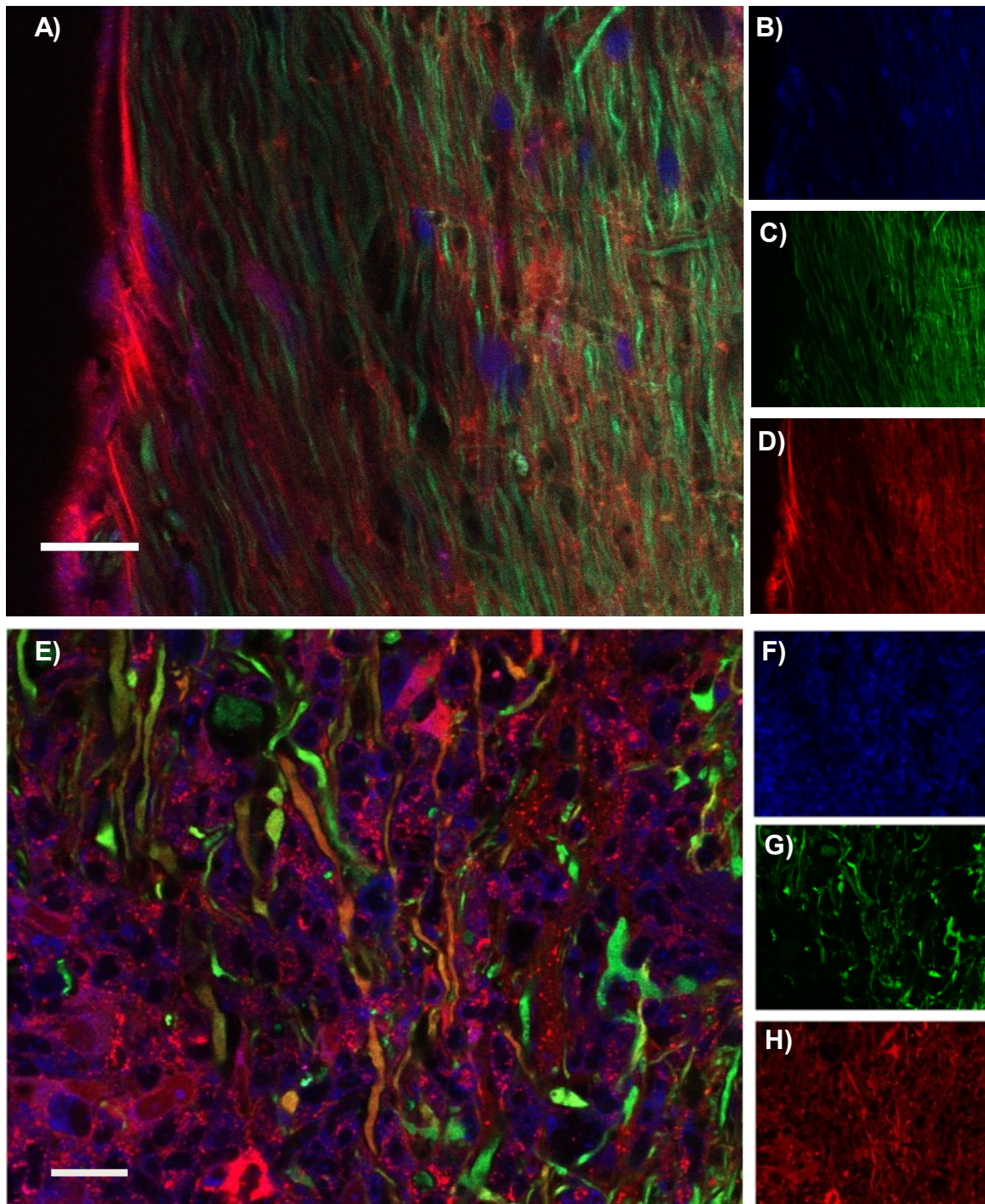


Abbildung 12: Axonale Farbstoffaufnahme zeigt sich nur in akuten EAE-Läsionen

Konfokalmikroskopieaufnahmen von fixiertem Rückenmarksgewebe von CerTN-L15 Mäusen nach Injektion von 2 μ l Dextran Texas Red® 3000 und 2 Stunden Farbstoffinkubationszeit. (A) zeigt eine Fusion der Signale für Neurotrace® 435/455 (B), die endogen mit YFP-angefärbten neuronalen Strukturen (C) und das Texas Red® Signal (D) in einem gesunden Kontrolltier. In der akuten EAE wurde Neurotrace® 435/455 verwendet, um entzündliche Läsionen anhand des Ausmaßes der Immuzellinfiltration zu identifizieren (F). Aufnahme von Texas Red® in Axone ist weitgehend auf Axone beschränkt (H), die durch entzündliche Läsionen verlaufen, wobei der YFP-Kanal (G) verwendet wurde, um die morphologischen Stadien der FAD zu erfassen. Panel (E) stellt eine Fusion der Bilder (F) – (H) dar. Größenmaßstab: 20 μ m

Nachdem ich zeigen konnte, dass es in der akuten EAE zu einer Aufnahme von Farbstoff in Axone kommt, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Farbstoffaufnahme auch mit der axonalen Morphologie - definiert anhand der bereits beschriebenen FAD-Stadien (Nikic et al., 2011) - in einem Zusammenhang steht. Außerdem untersuchte ich, ob die basierend auf der Farbstoffaufnahme vermuteten Membranläsionen, sich durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Molekülgröße bezüglich ihrer Dimension näher charakterisieren ließen (**Abbildung 13**). **Tabelle 3** stellt weitere Details zu Größe und chemischen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe dar, wobei der Molekülradius näherungsweise entsprechend früherer Publikationen berechnet wurde (Oliver et al., 1992). Es ist allerdings zu beachten, dass vom Hersteller für die Dextran-konjugierten Farbstoffe lediglich eine maximale Molekülgröße angegeben wird und sich die exakte Größe eines einzelnen Farbstoffmoleküls daher nicht bestimmen lässt. So ist es z.B. im Falle des Dextran Texas Red® 3000-Farbstoffes möglich, dass auch Farbstoffmoleküle mit einer Molekülgröße <3000 Da vorhanden sein können. Daher ist die Definition einer exakten Obergrenze der Größe der Membranläsionen mit diesem Ansatz nicht möglich.

Fluoreszenzfarbstoff	Chemische Struktur	Molekulgewicht	Molekülradius
Alexa Fluor® 647 cadaverine disodium salt	Decarboxyliertes Lysin; fixierbar	807 Da	1 nm
Dextran, Texas Red®, 3000 MW	Zwitterionisches hydrophiles Polysaccharid; Lysinfixierbar	3000 Da	1,6 nm
Dextran, Texas Red®, 10000 MW	Zwitterionisches hydrophiles Polysaccharid; Lysinfixierbar	10000 Da	2,7 nm
Dextran, Texas Red®, 70000 MW	Zwitterionisches hydrophiles Polysaccharid; Lysinfixierbar	70000 Da	6,4 nm

Tabelle 3: Chemische Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff

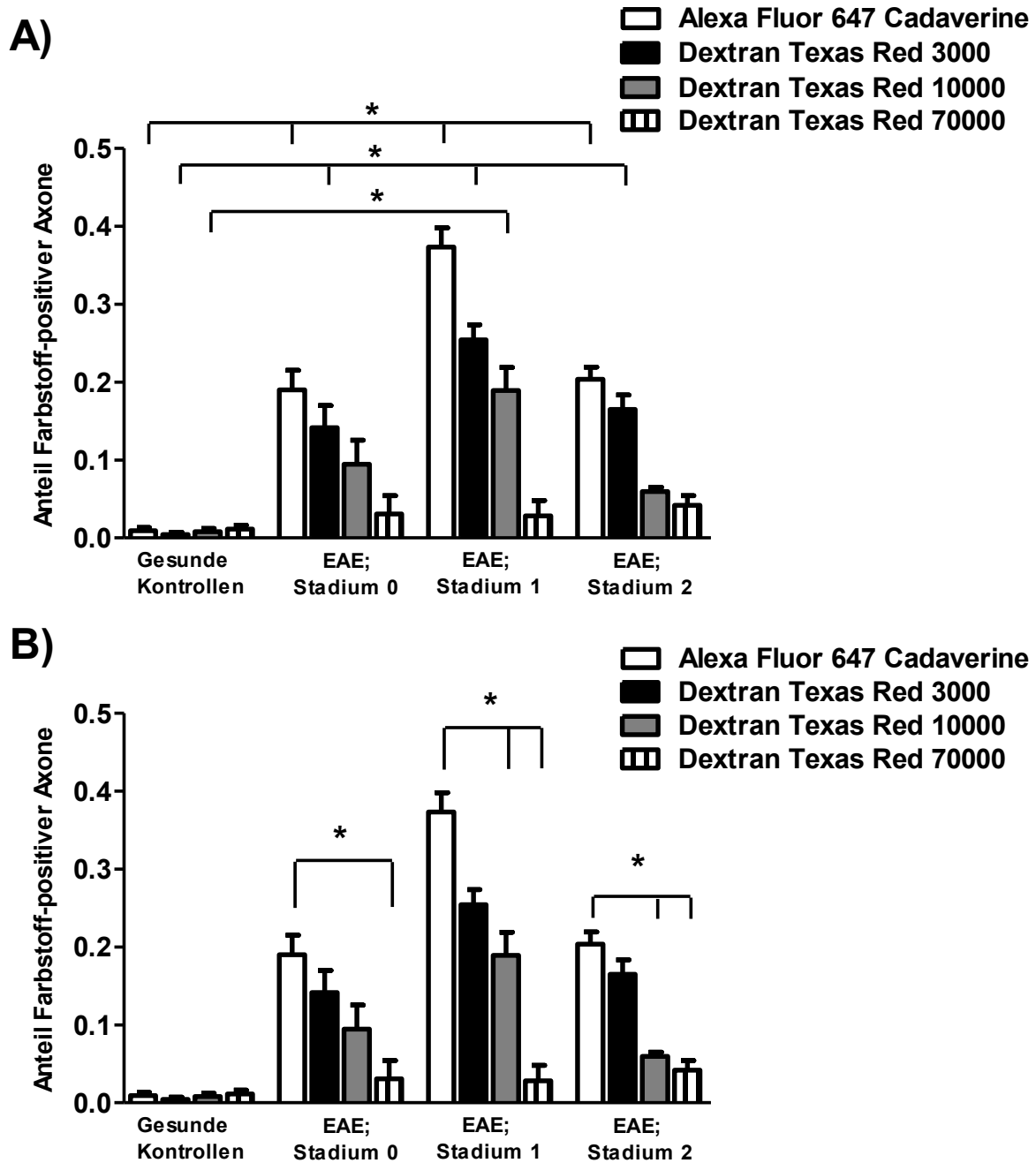


Abbildung 13: Quantifizierung des Anteils farbstoffpositiver Axone in den einzelnen FAD-Stadien für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe

Bei gesunden Kontrollen und Tieren mit akuter EAE (klinischer Symptombeginn + 2-3 Tage) wurden 2 µl der aufgelisteten Fluoreszenzfarbstoffe intrathekal injiziert und nach 2 Stunden Farbstoffinkubation erfolgte die transkardiale Perfusion mit 4% PFA. 3 Konfokalmikroskopiebilder je Tier wurden aufgenommen und alle Axone innerhalb der entzündlichen Läsion (definiert anhand der Immuzellinfiltration) bzw. im Fall der gesunden Kontrollen aus einem repräsentativen Bildausschnitt wurden ausgewertet (n = 5 Tiere für akute EAE für Alexa Fluor® 647 Cadaverine (512 Axone im Stadium 0, 147 Axone im Stadium 1 und 252 Axone im Stadium 2), Texas Red® 10000 (397 Axone im Stadium 0, 122 Axone im Stadium 1 und 203 Axone im Stadium 2), Texas Red® 70000 (316 Axone im Stadium 0, 103 Axone im Stadium 1 und 185 Axone im Stadium 2) sowie gesunde Kon-

trollen Alexa Fluor® 647 Cadaverine (658 Axone) und Texas Red® 10000 (650 Axone); n = 6 Tiere für gesunde Kontrollen für Texas Red® 70000 (612 Axone)). Farbstoffinjektionen und Mikroskopie für Dextran Texas Red® 70000 sowie 2 von 7 gesunden Kontrollen (336 von 1029 Axonen) und 5 von 9 EAE-Tieren für Dextran Texas Red® 3000 (852 von 1592 Axone im Stadium 0, 257 von 533 Axone im Stadium 1 und 467 von 925 Axone im Stadium 2) erfolgten durch Maarten Witte. Die Axonpopulation aus den gesunden Kontrolltieren wurde verwendet, um für jeden Farbstoff einen spezifischen Schwellenwert festzusetzen (Farbstoffintensität Axon/Umgebung + 3 SD), ab dessen Überschreitung ein Axon als farbstoffpositiv gewertet wurde. Dargestellt sind die Anteile der farbstoffpositiven Axonen an allen Axonen im jeweiligen FAD-Stadium. Es zeigte sich, dass für alle verwendeten Farbstoffe mit Ausnahme von Texas Red® 70000 eine signifikante Farbstoffaufnahme gegenüber der Kontrolle bestand (A; einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-Test-Korrektur) sowie dass es zum Teil signifikante Unterschiede in der axonalen Farbstoffaufnahme zwischen den einzelnen Farbstoffen innerhalb eines FAD-Stadiums gab (B, einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-Test-Korrektur).

In Übereinstimmung mit dem visuellen Eindruck ergab sich auch bei der mathematischen Auswertung, dass nur ein sehr geringer Anteil (<1%) der Axone in gesunden Kontrolltieren Farbstoff aufnahm. Hingegen ließ sich bei einem im Vergleich dazu statistisch signifikanten Anteil von Axonen (einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey post-Test-Korrektur; $p < 0,05$) in allen FAD-Stadien eine Farbstoffaufnahme für Alexa Fluor® 647 Cadaverine und Dextran Texas Red® 3000 sowie in Stadium 1 für Dextran Texas Red® 10000 nachweisen. Für Dextran Texas Red® 70000 ergab sich in keinem FAD-Stadium eine signifikante axonale Farbstoffaufnahme im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Es zeigte sich außerdem, dass für Alexa Fluor® 647 Cadaverine, Dextran Texas Red® 3000 und Dextran Texas Red® 10000, Axone im Stadium 1 eine höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen, farbstoffpositiv zu sein als Axone im Stadium 0. Überraschenderweise besteht dieser Zusammenhang für Axone im Stadium 2 nicht. Es zeigte sich hingegen für diese eher eine geringere Farbstoffaufnahme als für Stadium 1-Axone. Innerhalb eines FAD-Stadiums zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Anteil der farbstoffpositiven Axone zwischen Alexa Fluor® 647 Cadaverine und Texas Red® 3000 nur für das FAD-Stadium 1, wohingegen ein solcher Unterschied zwischen Alexa Fluor® 647 Cadaverine und Texas Red® 10000 für die FAD-Stadien 1 und 2 bzw. für alle FAD-Stadien zwischen Alexa Fluor® 647 Cadaverine und Texas Red® 70000 bestand (einfaktorielle Varianzanalyse (one-sided ANOVA) mit Tukey post-Test-Korrektur, $p < 0,05$).

Zum Ausschluss, dass die axonale Farbstoffaufnahme durch eine traumatische Schädigung im Rahmen der Farbstoffinjektion bedingt ist, wurden Schnitte aus der ventralen und dorsalen weißen Substanz hinsichtlich des Anteils der farbstoffpositiven Axone für Dextran Texas Red® 3000 miteinander verglichen (**Abbildung 14**). Da die Ergebnisse sich nicht statistisch

signifikant voneinander unterschieden und ohnehin als Vorsichtsmaßnahme nur die zur Injektionsseite kontralaterale Hälfte des Rückenmarks für die Auswertung verwendet wurde, ist es unwahrscheinlich, dass sich die in akuten EAE-Läsionen beobachtete Farbstoffaufnahme ausschließlich durch das Injektionstrauma erklären lässt. Da die Anteile der farbstoffpositiven Axone für die ventrale und dorsale weiße Substanz vergleichbar waren, wurde diese Unterscheidung für die anderen Farbstoffe und die folgenden Experimente nicht weiter beibehalten.

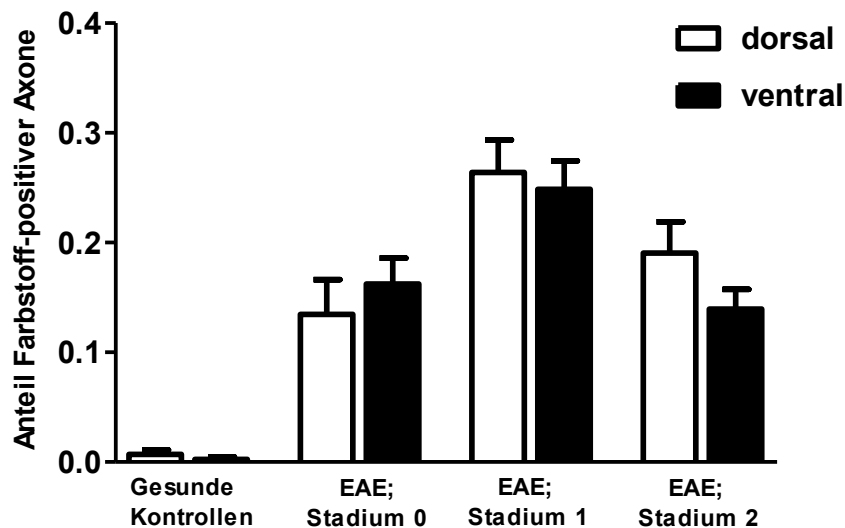


Abbildung 14: Vergleich der Anteile farbstoffpositiver Axone zwischen ventraler und dorsaler weißer Substanz für Dextran Texas Red® 3000

Intrathekale Injektion von 2 µl Dextran Texas Red® 3000 am klinischen Höhepunkt der akuten EAE. Vergleich des Anteils farbstoffpositiver Axone in der dorsalen und ventralen weißen Substanz (gesunde Kontrollen 7 Tiere für dorsal (1029 Axone) bzw. 6 Tiere für ventral (953 Axone) sowie 9 Tiere für akute EAE dorsal (831 Axone im Stadium 0, 274 Axone im Stadium 1 und 463 Axone im Stadium 2) bzw. 8 Tiere für ventral (761 Axone im Stadium 0, 259 Axone im Stadium 1 und 462 Axone im Stadium 2)), wobei sich kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte. Bei 2 von 7 Kontrollen und 5 von 9 EAE-Tieren Farbstoffinjektion durch Maarten Witte.

Um weitergehend zu zeigen, dass die oben beschriebenen Ergebnisse nicht von mir als Experimentator und als Auswerter abhängig sind, wurden bei fünf der neun EAE-Tiere aus der Dextran Texas Red® 3000-Gruppe die Farbstoffinjektionen und die Konfokalmikroskopie von Maarten Witte, einem Postdoktoranden im Labor von Prof. Kerschensteiner, durchgeführt. Außerdem wurde eine Stichprobe, der von mir ausgewerteten Aufnahmen auch von Maarten Witte nach den gleichen Kriterien analysiert. Die daraus berechneten Interrater- und Interexperimentator-Variabilität zeigten eine gute Übereinstimmung, was zusätzlich die Validität der Ergebnisse unterstreicht (**Abbildung 15**).

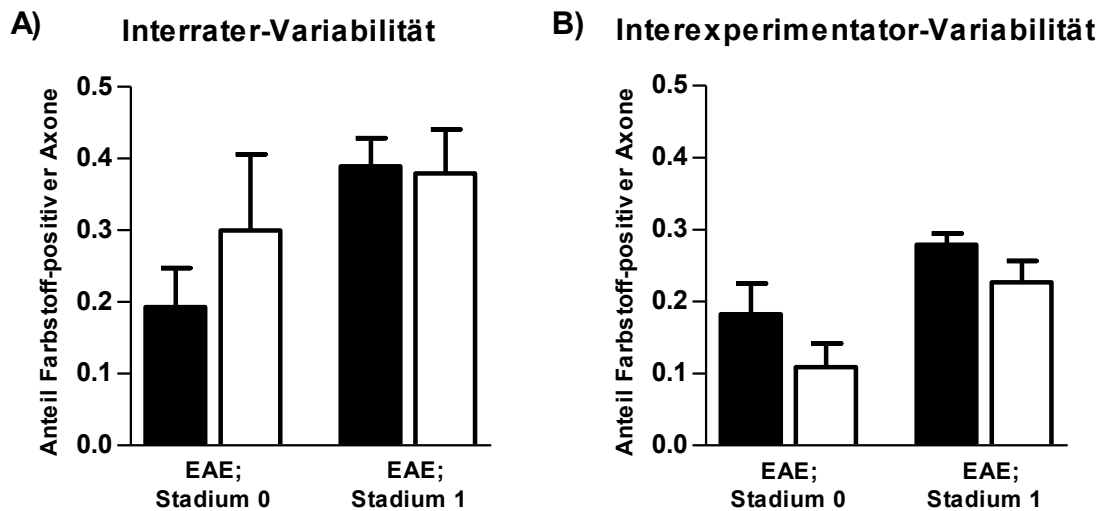


Abbildung 15: Interrater- und Interexperimentator-Variabilität zwischen Jan Bewersdorf (schwarz) und Maarten Witte (weiß) für Dextran Texas Red® 3000

(A) zeigt den Vergleich der Auswertung der gleichen Konfokalmikroskopieaufnahmen von 5 Tieren aus dem Dextran Texas Red® 3000-Datensatz durch Maarten Witte (weiß; 124 Axone im Stadium 0; 71 Axone im Stadium 1) und Jan Bewersdorf (schwarz; 172 Axone im Stadium 0; 53 Axone im Stadium 1). Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Auswertern. (B) stellt die Interexperimentator-Variabilität für Axone im Stadium 0 und 1 von 9 Experimenten dar, die entweder komplett von Maarten Witte (weiß, 5 Tiere; 852 Axone im Stadium 0; 257 Axone im Stadium 1) oder Jan Bewersdorf (schwarz, 4 Tiere; 740 Axone im Stadium 0; 272 Axone im Stadium 1) durchgeführt, aber ausschließlich von Jan Bewersdorf ausgewertet wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Experimentatoren bestand nicht.

Zur genaueren Charakterisierung der farbstoffpositiven Axone wurden auch der axonale Durchmesser und der Myelinisierungsstatus von Axonen aus Tieren, bei welchen Dextran Texas Red® 3000 injiziert wurde, untersucht. Die in **Abbildung 16** dargestellten Ergebnisse zeigen in Bezug auf den Axondurchmesser, dass es keine bestimmte Axonsubpopulation gibt, die präferentiell den Farbstoff aufnimmt, sondern dass diese zu ungefähr gleichen Anteilen über alle Axondurchmesser hinweg erfolgt. Bezüglich einer Beziehung zwischen dem Myelinisierungsstatus eines Axons und der Wahrscheinlichkeit, dass dieses Axon farbstoffpositiv ist, konnte festgestellt werden, dass eine Schädigung der Myelinscheiden keine notwendige Bedingung für eine Farbstoffaufnahme ist. So lässt sich eine Farbstoffaufnahme auch bei Axonen mit noch vollkommen intakt erscheinender Myelinscheide nachweisen. Zwar zeigten Axone mit einer geschädigten Myelinscheide im Allgemeinen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Farbstoffaufnahme, doch nur für Axone im Stadium 2 erreichte dieser Unterschied statistische Signifikanz. Es muss allerdings einschränkend angemerkt werden, dass das

verwendete EAE-Modell nur eingeschränkt für Untersuchungen zur Demyelinisierung geeignet ist, da dieses zwar eine deutliche axonale Pathologie aufweist, der allgemeine Grad der Myelinschädigung hingegen im Vergleich zur MS geringer ausgeprägt ist. So wiesen insgesamt nur ca. 20% der Axone im Stadium 0 sowie etwas mehr als 30% der Axone in den Stadien 1 und 2 überhaupt eine Myelinschädigung auf. Außerdem ist es besonders für Axone mit geringem Durchmesser nicht sicher feststellbar, ob ein Axon primär unmyelinisiert war oder erst im Rahmen der entzündlichen Läsion demyelinisiert wurde.

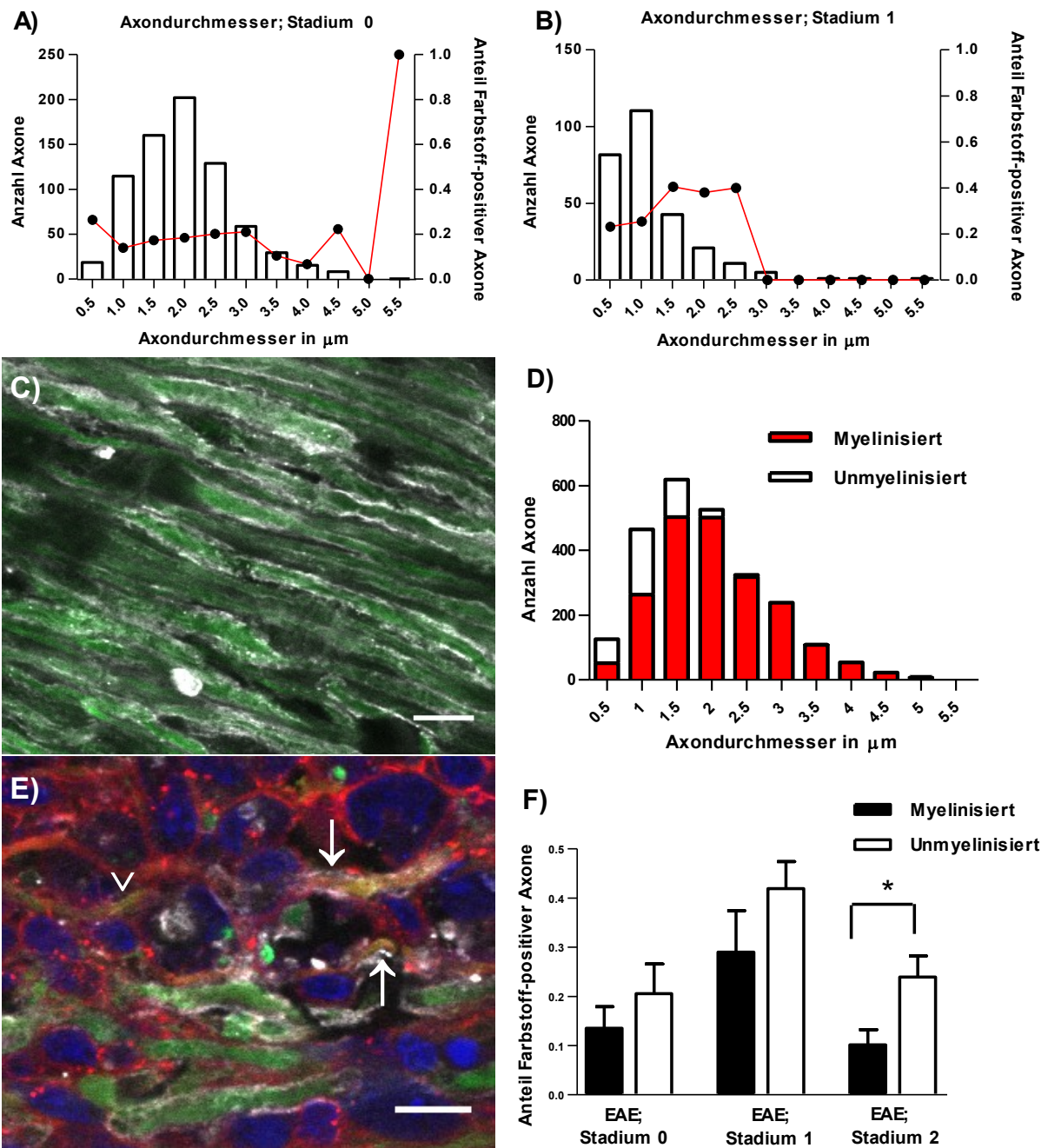


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Durchmesser und Myelinierungsstatus von Axonen und der Farbstoffaufnahme

(A) und (B) stellen den Zusammenhang zwischen Axondurchmesser und dem Anteil der farbstoffpositiven Axone für die FAD-Stadien 0 und 1 dar. Es wurden 4 akut kranke EAE-Tiere mit 2 µl Dextran Texas Red® 3000 injiziert und 6 Läsionen (3 dorsal + 3 ventral) pro Tier ausgewertet (740 Axone für Stadium 0 und 276 Axone für Stadium 1). (C) zeigt eine repräsentative Konfokalmikroskopieaufnahme der MBP-Färbung einer gesunden CerTN-L15-Maus. Hierbei sind die Axone anhand der endogenen YFP-Expression grün dargestellt und die Myelinisierung mittels immunhistochemischer MBP-Färbung grau. Die Anteile der myelinisierten Axone in Abhängigkeit vom Axondurchmesser werden in (D) dargestellt (je 5 Bilder á 100 Axone für 5 Tiere ausgewertet). (E) zeigt eine akute EAE-Läsion nach Injektion von 2 µl Dextran Texas Red® 3000 (rot) und MBP-Färbung (grau) in einer CerTN-L15-Maus (Axone grün entsprechend endogener YFP-Expression) mit Anfärbung des entzündlichen Infiltrates mit Neurotrace® 435/455 (blau). Pfeile weisen auf farbstoffpositive, myelinisierte Axone; Pfeilspitze auf farbstoffpositives, demyelinisiertes Axon hin. (F) zeigt, dass auch myelinisierte Axone Farbstoff aufnehmen und dass nur im Stadium 2 demyelinisierte Axone signifikant häufiger farbstoffpositiv sind als myelinisierte Axone (5 Tiere (401 Axone im Stadium 0, 87 Axone im Stadium 1 und 129 Axone im Stadium 2), wobei bei 3 Tieren Farbstoffinjektion durch Maarten Witte erfolgte. MBP-Färbung, Mikroskopie und Auswertung erfolgte bei allen Tieren durch Jan Bewersdorf). Maßstab in (C) und (E) je 10 µm.

Nachdem in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass die Veränderungen der axonalen Ca^{2+} -Konzentration und der Axonmorphologie im Rahmen der EAE einer großen zeitlichen Dynamik unterliegen, stellte sich die Frage, ob sich auch bei der Farbstoffaufnahme derartige Veränderungen im Zeitverlauf nachweisen lassen. Hierzu wurden zu Beginn des Experiments 2 µl Dextran Texas Red® 3000 in den Subarachnoidalraum von CFP-5-Mäusen am klinischen Höhepunkt der akuten EAE injiziert und 4 Stunden später erfolgte eine weitere Injektion von 2 µl Dextran FITC 3000, bevor die Mäuse nach einer nochmaligen Farbstoffinkubationszeit von 1 Stunde euthanasiert und mit 4% PFA fixiert wurden. Für dieses Experiment wurden CFP-5-Mäuse verwendet, da diese im Gegensatz zu CerTNL-15-Mäusen kein endogenes YFP-Signal haben und dadurch die Auswirkungen von „Bleed-through“-Artefakten zwischen dem endogenen YFP-Signal von CerTNL-15-Mäusen und dem injizierten Dextran FITC 3000 vermieden und eine validere Aussage über das Ausmaß der axonalen Farbstoffaufnahme getroffen werden kann. In der anschließenden Konfokalmikroskopie der Gewebeschnitte ließen sich anhand des Anteils der Axone, die ausschließlich den ersten Farbstoff (Dextran Texas Red® 3000) bzw. ausschließlich den zweiten Farbstoff (Dextran FITC 3000) oder beide Farbstoffe aufgenommen hatten, Rückschlüsse über die Dynamik der Entstehung bzw. der Reparatur von Membranläsionen anhand der damit assoziierten Farbstoffaufnahme ziehen. Wie in **Abbildung 17** dargestellt zeigte sich, dass bei einem gewissen Anteil von Axonen Membranläsionen über mehrere Stunden persistieren. Ebenso ergab sich aufgrund des Anteils der ausschließlich Texas Red®-positiven Axone, dass bei Axonen in allen Stadien noch die Mög-

lichkeit eines Wiederverschlusses der Membranläsionen und damit die theoretische Chance zur Regeneration und Wiederherstellung der Ca^{2+} -Homöostase besteht. Jedoch muss einschränkend angemerkt werden, dass für Axone im Stadium 2 keine vollständige Regeneration mehr möglich ist, selbst wenn diese keinen Farbstoff mehr aufnehmen sollten. Außerdem kommt es zeitgleich auch zur Entstehung von neuen Membranschäden, was sich angesichts des Anteils von ausschließlich FITC-3000-positiven Axonen zeigen lässt. Insgesamt zeigte sich zwischen den einzelnen Experimenten eine sehr hohe Variabilität, so dass die Ergebnisse zurückhaltend bewertet werden müssen (siehe Diskussion, S. 73ff).

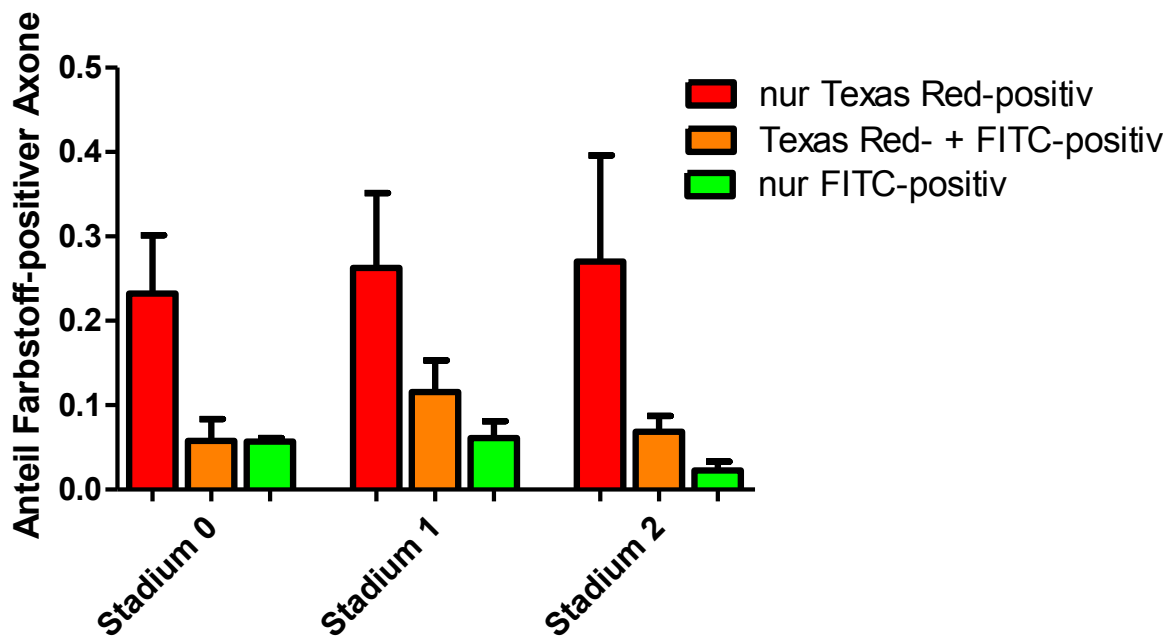


Abbildung 17: Dynamik axonaler Membranläsionen anhand der axonalen Farbstoffaufnahme mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe

Intrathekale Injektionen von 2 μl Dextran Texas Red® 3000 und 4 Stunden später von 2 μl Dextran FITC 3000 in CFP-5-Mäusen. Akute EAE-Läsionen wurden anhand der Immunezellinfiltration (Neurotrace® 640/660 nm) identifiziert und bei 5 Tieren wurden in jeweils 2 Läsionen alle durch die Läsion verlaufenden Axone ausgewertet (insgesamt 325 Axone im Stadium 0, 81 Axone im Stadium 1 und 154 im Stadium 2). Die Schwellenwerte für farbstoffpositive Axone wurden anhand einer Population gesunder Kontrolltiere (4 Tiere, 535 Axone; Farbstoffintensität Axon/Umgebung + 3 SD) für die beiden verwendeten Farbstoffe getrennt ermittelt.

5.2) *In-vivo*-Mikroskopie zeigt, dass eine Farbstoffaufnahme in Axone mit einem erhöhten axonalen Ca^{2+} -Konzentration assoziiert ist

Nachdem am fixierten Gewebe eine Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen in Axone im Rahmen der akuten EAE beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage nach der pathophysiologischen Relevanz dieser Beobachtung. Aus der Literatur (Stirling und Stys, 2010) ist die zentrale Bedeutung einer Ca^{2+} -Dysregulation für die Pathophysiologie axonaler Schädigungsprozesse bekannt und auch Vorexperimente in unserem Labor unterstreichen die Relevanz der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für axonale Degenerationsprozesse im Kontext der EAE. Da physiologisch ein hoher Gradient der Ca^{2+} -Konzentration zwischen extra- und intrazellulär besteht und Zellen über diverse Mechanismen kontinuierlich aktiv eine geringe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aufrechterhalten (Verkhratsky und Petersen, 1998), erscheint es möglich, dass dieser streng regulierte Ca^{2+} -Haushalt durch die - aufgrund der im fixierten Gewebe beobachteten axonalen Farbstoffaufnahme vermuteten - Membranläsionen gestört sein könnte. Dazu entwickelte ich einen Versuchsansatz, bei dem mittels *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopie gleichzeitig sowohl die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bestimmt als auch eine axonale Farbstoffaufnahme beobachtet werden können. Analog zum fixierten Gewebe wurden 2 μl Alexa Fluor® 594 Cadaverine in den Subarachnoidalraum von CerTN-L15-Mäusen injiziert und nach 2 Stunden Farbstoffinkubationszeit erfolgte die *in-vivo* Ca^{2+} -Mikroskopie am lumbalen Rückenmark der Tiere.

Die quantitative Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mithilfe der Messung der YFP/CFP-Ratio des im Methodenteil beschriebenen FRET-basierten Ca^{2+} -Sensors der CerTN-L15-Mäuse. Bevor jedoch eine valide Auswertung der *in-vivo*-Experimente mit gleichzeitiger Farbstoffinjektion möglich war, musste aufgrund des relevanten „Bleed-throughs“ des Farbstoffsignals sowohl in den YFP- als auch in den CFP-Kanal ein Korrekturfaktor experimentell mithilfe einer nicht genetisch fluoreszenzmarkierten C57/Bl6-Maus bestimmt werden. Da gleichzeitig auch ein „Bleed-through“ des CFP-Signals in den YFP-Kanal beobachtet wurde, wurde auch hierfür experimentell durch die Verwendung einer CFP-5-markierten Maus ein Korrekturfaktor bestimmt, der in die im Methodenteil (siehe Seite 48) beschriebenen Gleichungen einfließt.

Nach diesen Anpassungen zeigte sich bei den *in-vivo* Experimenten, dass es sich bei der am fixierten Gewebe beobachteten axonalen Farbstoffaufnahme nicht um ein postmortales fixationsbedingtes Artefakt handelt, sondern dass diese auch im vitalen Gewebe zu beobachten ist. Der Anteil farbstoffpositiver Axone in den einzelnen FAD-Stadien lag für die *in-vivo* Expe-

rimente mit 10,6% im Stadium 0 bzw. 31,8% im Stadium 1 etwas unter den prozentualen Anteilen im fixierten Gewebe (18,6% farbstoffpositive Axone im Stadium 0 bzw. 37,4% im Stadium 1). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass in den Stadien 0 und 1 Axone mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen, farbstoffpositiv zu sein, als Axone mit physiologisch niedriger Ca^{2+} -Konzentration. Auch der Anteil der Axone mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration in den einzelnen Stadien der EAE ist gut mit den Ergebnissen aus anderen Vorarbeiten in unserem Labor zur axonalen *in-vivo* Ca^{2+} -Mikroskopie vergleichbar, sodass man davon ausgehen kann, dass trotz Farbstoffinjektion eine valide Bestimmung der axonalen Ca^{2+} -Konzentration weiterhin möglich ist.

In meinen Experimenten zeigten 0,4% der Axone in gesunden Kontrolltieren eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration, während in akut kranken EAE-Tieren für die FAD-Stadien 0, 1 und 2 10,9%, 37,9% und 54,4% der Axone eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration aufwiesen. Weitere Ergebnisse dieses Experiments und repräsentative *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopiebilder sind in **Abbildung 18 bzw. 19** dargestellt.

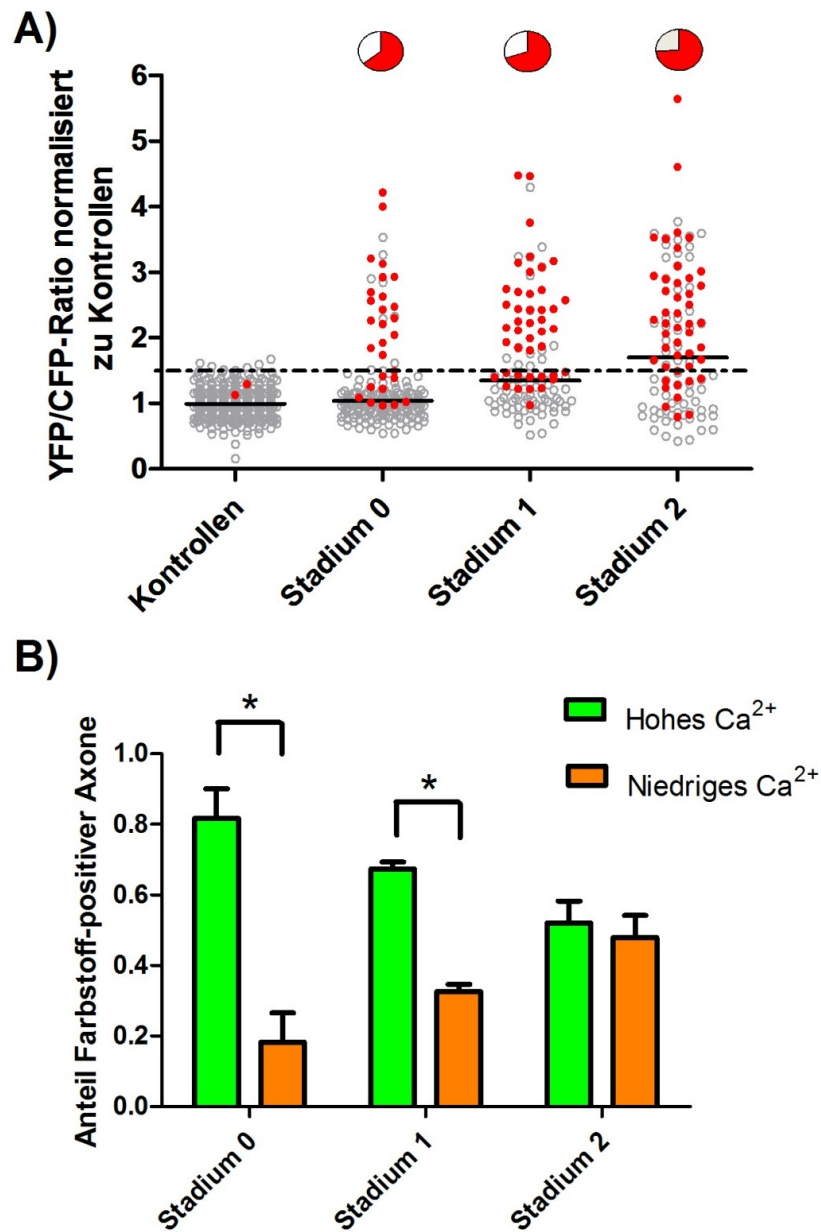


Abbildung 18: Ergebnisse der simultanen *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopie von Ca²⁺- und Farbstoffsignal in CerTN-L15-Mäusen zum Höhepunkt der akuten EAE

(A) zeigt die zur gesunden Kontrollpopulation normalisierte YFP/CFP-Ratio als quantitativer Indikator für die axonale Ca²⁺-Konzentration in akuten EAE-Läsionen. Farbstoffnegative Axone sind als graue, farbstoffpositive Axone als rote Punkte für die 3 FAD-Stadien dargestellt. Die Kuchendiagramme oberhalb des Diagramms repräsentieren den Anteil der Axone mit erhöhtem Ca²⁺, die auch farbstoffpositiv sind (dargestellt in rot). Der Schwellenwert für Axone mit erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration wurde definiert anhand der YFP/CFP-Ratio + 3 SD der Kontrollpopulation und als gestrichelte Linie im Diagramm dargestellt (Kontrollen: n = 5 Tiere, 550 Axone; EAE: n = 6 Tiere; 229 Axone im Stadium 0, 116 Axone im Stadium 1 und 114 Axone im Stadium 2). (B) stellt die Anteile der farbstoffpositiven Axone (Schwellenwert definiert als Farbstoffintensität Axon/Umgebung + 3 SD aus Kontrollpopulation) getrennt für Axone mit hohem und niedrigem intrazellulären Ca²⁺ dar. In den FAD-Stadien 0 und 1 haben farbstoffpositive Axone auch signifikant häufiger eine hohe Ca²⁺-Konzentration als farbstoffnegative Axone.

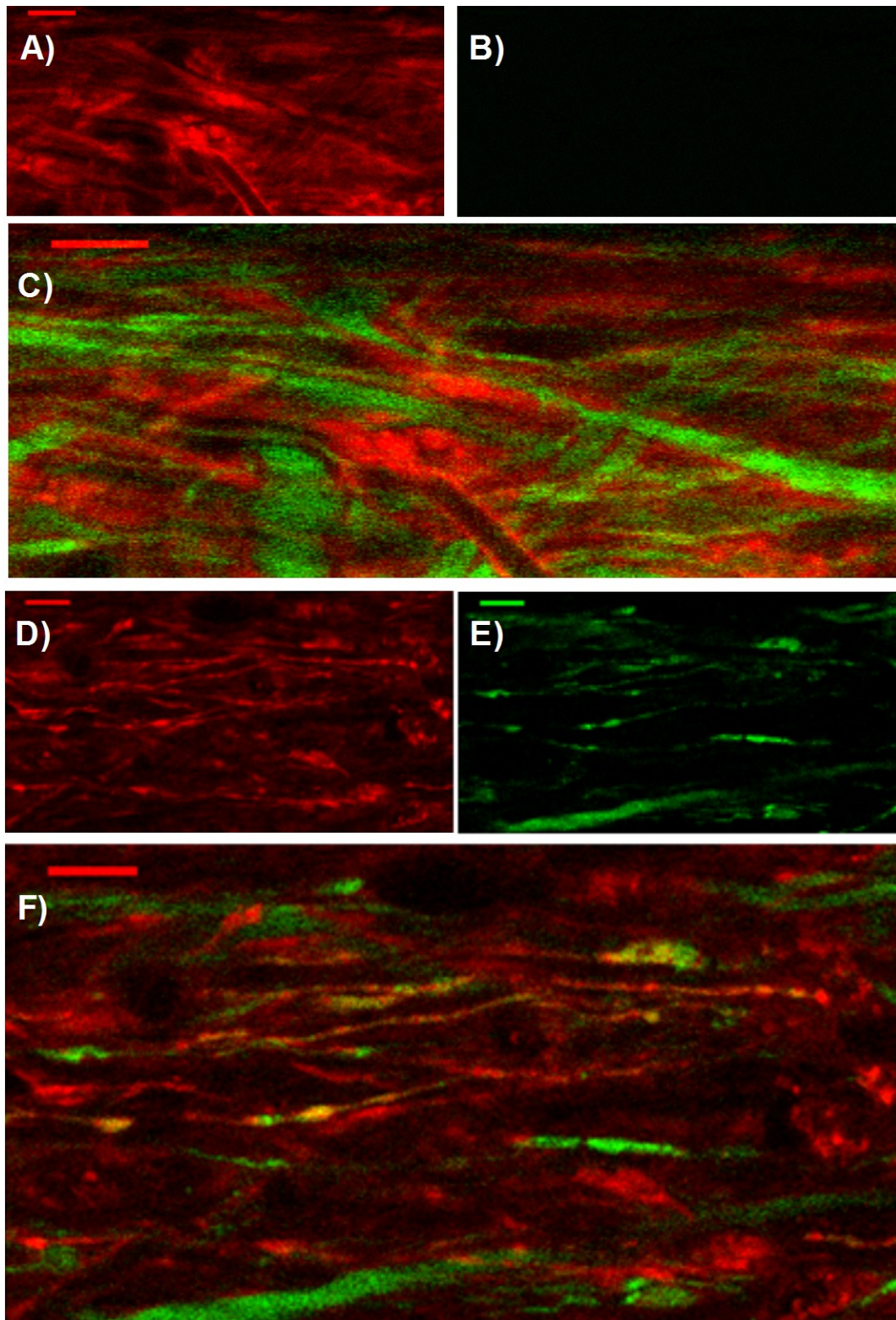


Abbildung 19: Repräsentative Bilder der simultanen *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopie von Ca^{2+} - und Farbstoffsignal in gesunden CerTN-L15-Mäusen und bei akuter EAE

(A)-(C): Gesundes CerTN-L15-Kontrolltier, wobei (A) das Alexa Fluor® 594 Cadaverine-Signal, (B) das YFP-Signal und (C) die Fusion aus (A) und (B) darstellt. Es zeigt sich keine axonale Farbstoffaufnahme. (D)-(F): CerTN-L15-Maus zum Höhepunkt der akuten EAE. (D) zeigt Alexa Fluor® 594 Cadaverine-Signal, (E) YFP-Signal und (F) die Fusion aus (D) und (E). Maßstab jeweils 10 μm .

Da es sich bei dem beschriebenen Versuchsaufbau um einen neuartigen Ansatz handelt, auf welchem weitere Experimente aufbauen sollten, entschlossen wir uns, die Reliabilität meiner Ergebnisse durch einen weiteren Experimentator (Maarten Witte) überprüfen zu lassen. Erfreulicherweise zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede sowohl in der Interrater- als auch in der Interexperimentator-Variabilität bezüglich des Anteils der Axone mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration sowie der farbstoffpositiven Axone, was die Reproduzierbarkeit sowohl der Auswertung als auch des Versuchsaufbaus selbst unterstreicht (**Abbildung 20**).

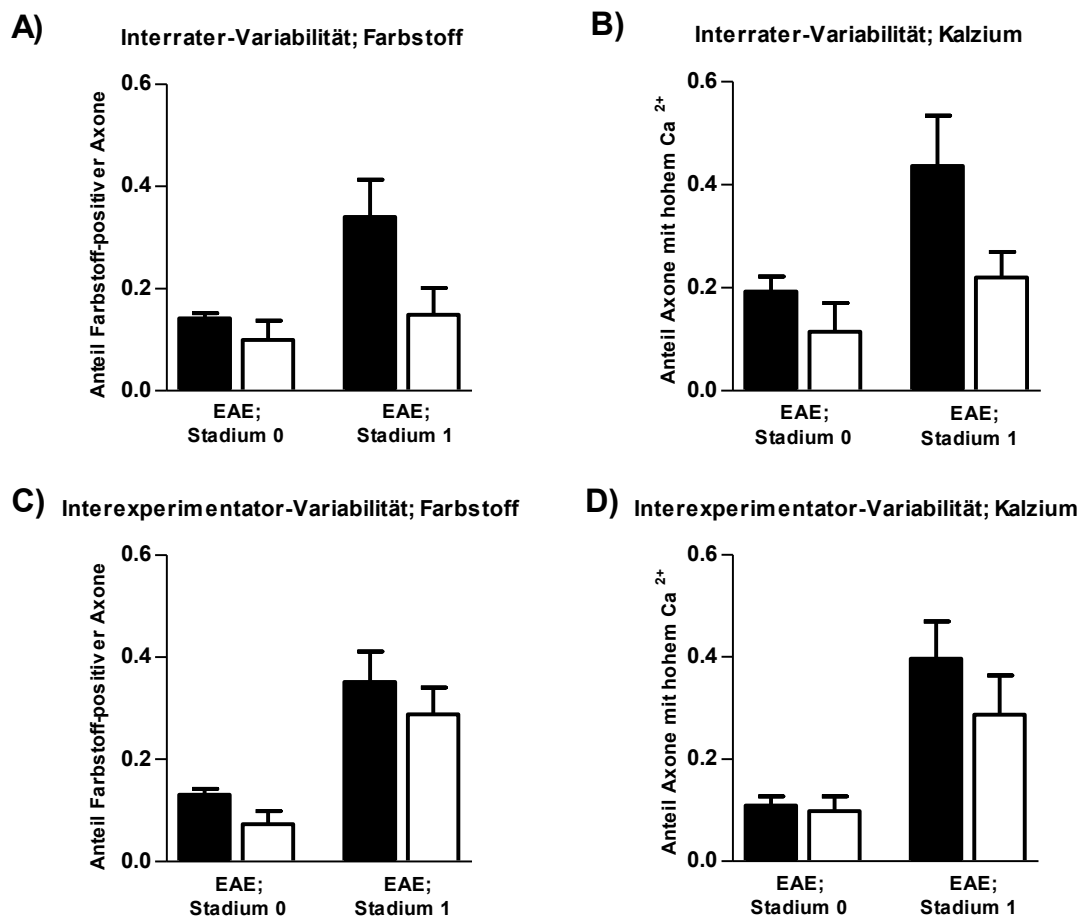


Abbildung 20: Interrater- und Interexperimentator-Variabilität bezüglich des Anteils von Axonen mit Farbstoffaufnahme bzw. mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration

Vergleich der Auswertung der gleichen *in-vivo* 2-Photonenmikroskopieaufnahmen von 5 akut kranken EAE-Tieren nach Injektion von 2 μl Alexa Fluor® 594 Cadaverine durch Maarten Witte (weiß; 109 Axone im Stadium 0; 71 Axone im Stadium 1) und Jan Bewersdorf (schwarz; 106 Axone im Stadium 0; 63 Axone im Stadium 1) für axonale Farbstoffaufnahme (A) bzw. Ca^{2+} -Konzentration (B). Farbstoffinjektion und *in-vivo* Mikroskopie bei 3 Tieren durch Jan Bewersdorf bzw. bei 2 Tieren durch Maarten Witte. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Auswertern. (C) und (D) stellen die Interexperimentator-Variabilität von jeweils 6 Experimenten bezüglich des Anteils der Axone mit Farbstoffaufnahme bzw. erhöhter Ca^{2+} -Konzentration für die FAD-Stadien 0 und 1 dar, die entweder komplett von Maarten Witte (weiß; 175 Axone im Stadium

0; 116 Axone im Stadium 1) oder Jan Bewersdorf (schwarz; 221 Axone im Stadium 0; 116 Axone im Stadium 1) durchgeführt, aber ausschließlich von Jan Bewersdorf ausgewertet wurden. Dabei ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Experimentatoren.

5.3) α -Tocopherol i.p. hat keinen protektiven Effekt auf Axone in der akuten EAE

In der Literatur sind diverse mögliche Mechanismen der axonalen Ca^{2+} -mediierten Schädigung im Rahmen der akuten EAE beschrieben wie z.B. Glutamat-Exzitotoxizität (Pitt et al., 2000), azidotische pH-Wertveränderungen (Frieze et al., 2007) und Dysfunktion des NCX (Rossi et al., 2010). In Vorversuchen in unserem Labor lieferte aber keiner der genannten Mechanismen eine ausreichende Erklärung für die beobachteten Alterationen der axonalen Ca^{2+} -Konzentration. Daher formulierten wir die Hypothese, dass durch die Produktion von ROS/RNS im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion eine oxidative Schädigung der axonalen Zellmembran erfolgt, die sowohl die anhand der Farbstoffaufnahme vermuteten Membranläsionen als auch die Störungen des axonalen Ca^{2+} -Haushalts erklären würde. Entsprechend vermuteten wir, dass der gezielte Einsatz von lipophilen Antioxidantien, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften ihre antioxidative Wirkung besonders an der Zellmembran entfalten, therapeutische Effekte auf die EAE haben könnte. Ein mögliches lipophiles Antioxidans ist α -Tocopherol, die in Europa wichtigste Form des mit der Nahrung aufgenommenen Vitamin E, bei dessen Mangel es bei Patienten zu neurodegenerativen Ausfallerscheinungen wie z.B. zerebellärer Ataxie und peripherer Neuropathie kommen kann (El Euch-Fayache et al., 2014; Wagner et al., 2004). Auch ein therapeutischer Effekt einer Vitamin E-Supplementation in einem Modell oxidativer Schädigung von Neuronen in Zellkultur ist beschrieben (Seiler et al., 2008). Daran anknüpfend untersuchte ich, ob eine Behandlung von Mäusen ab dem Beginn des Gewichtsverlustes im Rahmen der akuten EAE mit 10 IU/kg i.p. einmal täglich (entspricht 9 mg/kg DL-all-*rac*- α -Tocopherol) einen protektiven Effekt auf den klinischen Verlauf, die axonale Morphologie oder die axonale Aufnahme von Dextran Texas Red® 3000 im Vergleich zu Vehikel (3% DMSO in 0,9% NaCl) haben könnte. Diese Tocopheroldosis wurde gewählt, da sie als gut verträglich und in anderen Kontexten als therapeutisch wirksam beschrieben ist (Berg et al., 2004). Außerdem ist eine höhere Dosierung durch die schlechte Löslichkeit des lipophilen Tocopherols in wässriger Lösung und mögliche toxische Effekte der verfügbaren Lösungsmittel limitiert.

Wie in **Abbildung 21** dargestellt, zeigte sich bei der verwendeten Dosis kein therapeutischer Effekt von α -Tocopherol weder auf die axonale Morphologie noch auf das Ausmaß der axonalen Farbstoffaufnahme. Allerdings muss betont werden, dass es unklar ist, ob eine therapeutisch prinzipiell wirksame Dosis von Tocopherol überhaupt das ZNS nach einer i.p.-Injektion erreicht und ob die gewählte Dosis grundsätzlich ausreichend war. Da allerdings nicht mal eine Tendenz zu einem protektiven Effekt festgestellt werden konnte, sondern sich sogar ein tendenziell schwererer Verlauf anhand der axonalen Morphologie ergab, wurde dieser Versuchsansatz nicht mehr weiterverfolgt. Daher ist keine Aussage möglich, ob Tocopherol bei einer anderen Dosis bzw. anderen Applikationsform nicht doch einen therapeutischen Effekt im Rahmen der EAE entfalten könnte.

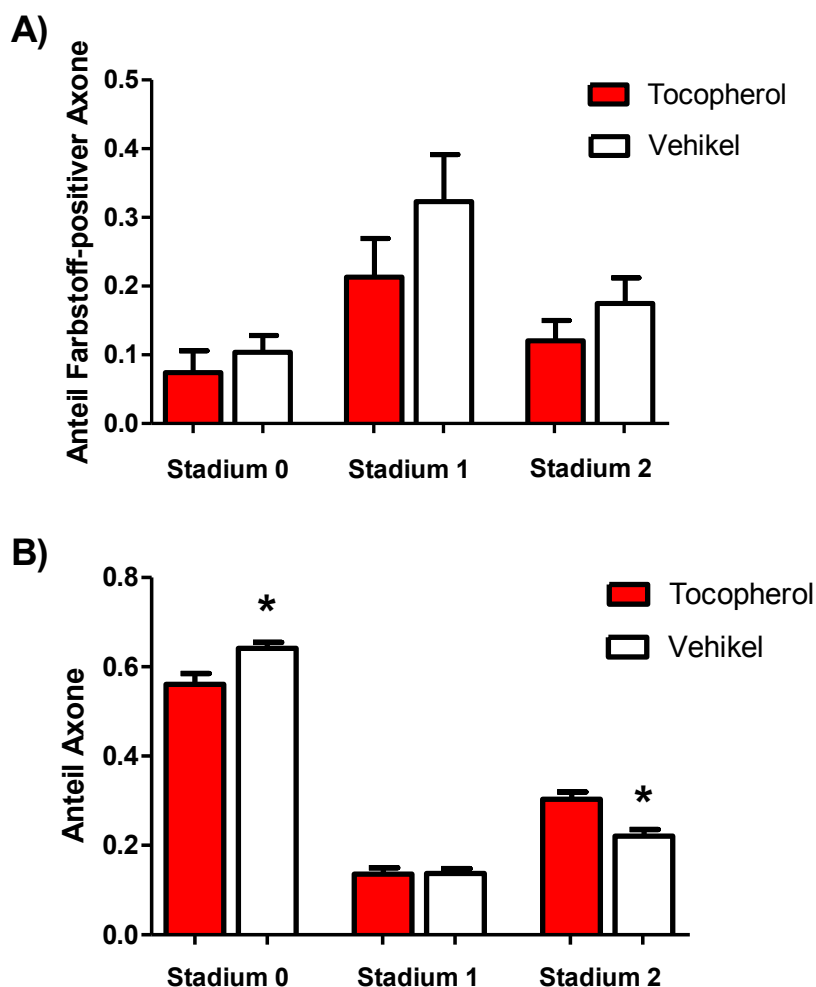


Abbildung 21: Axonale Morphologie und Farbstoffaufnahme im Vergleich von mit α -Tocopherol oder Vehikel behandelten CerTN-L15-Mäusen mit akuter EAE

(A) zeigt den Anteil der farbstoffpositiven Axone, (B) die Verteilung der Axone auf die einzelnen Stadien der FAD. Es wurden 2 Läsionen (definiert anhand Neurotrace® 435/455-Färbung) pro Tier ausgewertet. Jeweils n = 7 Tiere in Vehikel- (364 Axone in Stadium 0, 77 Axone in Stadium 1 und 125 Axone im Stadium 2) und Tocopherol-Gruppe (348 Axone in Stadium 0, 84 Axone in Stadium 1 und 190 Axone in Stadium 2).

6.) Diskussion

Zusammenfassend konnte ich in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es im Rahmen der akuten EAE zu einer axonalen Farbstoffaufnahme kommt, die auf die entzündliche Läsion begrenzt ist und dass diese mit dem Ausmaß der axonalen Degeneration - definiert anhand der FAD-Stadien - zusammenhängt. Neben dem Grad der axonalen Schädigung hing die Wahrscheinlichkeit einer axonalen Farbstoffaufnahme auch mit der molekularen Größe der verwendeten Farbstoffe zusammen. Außerdem konnte ich zeigen, dass die Farbstoffaufnahme auch in noch myelinisierte Axone und unabhängig vom Axondurchmesser erfolgt. Dass diese Beobachtung am fixierten Gewebe auch eine pathophysiologische Relevanz haben könnte, lässt sich aus den *in-vivo* 2-Photonen Ca^{2+} -Mikroskopieexperimenten folgern. Diese zeigten, dass farbstoffpositive Axone auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase aufweisen als farbstoffnegative Axone. Diese Beobachtung bildet die Grundlage für die Vermutung eines neuartigen Mechanismus der axonalen Degeneration im Kontext entzündlicher ZNS-Schädigung. Den der axonalen Farbstoffaufnahme zugrundeliegenden Pathomechanismus konnte ich zwar nicht aufklären, in der nachfolgenden Diskussion sollen aber mögliche Pathomechanismen, eine kritische Bewertung der Methodik und potentielle therapeutische Ansätze dargestellt werden.

6.1) Stärken und Limitationen einer Detektion von Schäden der axonalen Zellmembran durch intrathekale Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen

6.1.1) Schlussfolgerungen aus der beobachteten axonalen Farbstoffaufnahme

Durch die Experimente am fixierten Gewebe konnte ich zeigen, dass die beobachtete Farbstoffaufnahme auf den Bereich entzündlicher Läsionen begrenzt und sowohl in der ventral als auch dorsal gelegenen weißen Substanz des Rückenmarks nachweisbar ist, was eine rein durch die Injektion bedingte traumatische Farbstoffaufnahme in Axone sehr unwahrscheinlich macht. Allerdings ist es nicht möglich den genauen Ort der Farbstoffaufnahme und damit der Membranläsion zu identifizieren. So ist es beispielsweise denkbar, dass Axone die durch eine entzündliche Läsion verlaufen, obwohl sie farbstoffpositiv erscheinen an dieser Stelle überhaupt nicht geschädigt sind, sondern die zur Farbstoffaufnahme führende Membranschädigung an einer anderen Stelle erfolgt und der Farbstoff entlang des Axons diffundiert ist. Entsprechend besteht die Möglichkeit, dass ein im ausgewerteten Bildausschnitt

als morphologisch unauffällig erscheinendes Axon im weiteren Verlauf bereits fragmentiert ist und dabei den Farbstoff aufgenommen hat, sodass diesem dann ein falsches FAD-Stadium zugeordnet hätte werden können. Ein theoretisch denkbarer Ansatz, diese Option auszuschließen ist die Verwendung von sogenannten anti-Tubulin Nanobodies. Dabei handelt es sich um kleine (≈ 15 kDa) Antikörperfragmente, die mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Alexa Fluor® konjugiert werden können und dann spezifisch an Mikrotubuli binden (Mikhaylova et al., 2015). Mikrotubuli kommen ubiquitär in Neuronen und deren Fortsätzen vor und sind für deren Funktion z.B. im Rahmen axonaler Transportprozesse von entscheidender Bedeutung (Sorbara et al., 2014; van den Berg et al., 2017). Durch den Einsatz derartiger anti-Tubulin Nanobodies wäre es theoretisch möglich, die Lokalisation der Membranläsionen zu identifizieren, da diese Antikörper direkt an der Eintrittsstelle ins Axon an Mikrotubuli binden würden und sich dort fluoreszenzmikroskopisch nachweisen ließen. Allerdings sind derartige Nanobodies noch nicht kommerziell erhältlich und trotz der geringen Größe von ca. 15 kDa sind sie immer noch deutlich größer als die von mir verwendeten an Cadaverine oder Dextran 3000 konjugierten Farbstoffe, sodass die Aussagekraft solcher Experimente beschränkt wäre.

Alternativ zur Farbstoffaufnahme durch Läsionen der Zellmembran ist prinzipiell auch ein endozytotischer Prozess denkbar. Die axonale Zellmembran unterliegt kontinuierlichen Veränderungs- und Anpassungsprozessen im Rahmen derer z.B. Membranproteine wie Ionenkanäle durch Endozytose von der Zellmembran entfernt bzw. durch Exozytose von Vesikeln in diese eingebaut werden. Allerdings erfolgen diese Prozesse unter physiologischen Bedingungen v.a. an der Synapse bzw. im Rahmen von Regenerationsprozessen nach traumatischer Schädigung und finden sich im Allgemeinen nicht im Verlauf eines Axons (Hausott und Klimaschewski, 2016). Außerdem konnte ich bei einer Farbstoffinkubationszeit von 2 h keine nennenswerte Phagozytose des Farbstoffes durch Immunzellen wie z.B. Makrophagen oder Mikrogliazellen beobachten. Da auch in der Literatur im Rahmen der EAE keine verstärkte endozytotische Aktivität von neuronalen Strukturen beschrieben ist, erscheint eine rein durch Endozytose bedingte axonale Farbstoffaufnahme als alleinige Erklärung unwahrscheinlich. In einem weiteren Versuch implantierte ich osmotische Minipumpen, die über mehrere Tage hinweg Farbstoff intrathekal applizierten. Hier bestand eine starke Farbstoffaufnahme durch Immunzellen, während der Anteil farbstoffpositiver Axone vergleichbar mit dem nach 2 h Inkubationszeit war, was ebenso gegen eine rein endozytotische Farbstoffaufnahme spricht.

In unserem Labor wurde ein für die EAE charakteristischer axonaler Degenerationsprozess beschrieben, der von einem morphologisch unauffällig erscheinenden Zustand (Stadium 0)

über ein Stadium fokaler Schwellungen (Stadium 1) zu einer vollkommenen Fragmentierung des Axons (Stadium 2) reicht und als fokale axonale Degeneration (FAD) bezeichnet wird (Nikic et al., 2011). Interessanterweise waren Axone im Fragmentationsstadium in meinen Experimenten in vielen Fällen farbstoffnegativ, obwohl man annehmen kann, dass gerade diese Axone während ihres Degenerationsprozesses einer gewissen Membranschädigung ausgesetzt waren. Es ist allerdings unmöglich festzustellen, wann im Rahmen des Krankheitsverlaufes ein einzelnes Axon fragmentiert ist. Daher besteht die Möglichkeit, dass ein Axon bereits deutlich vor der Farbstoffinjektion geschädigt wurde und die dabei entstandenen Membranläsionen mittlerweile wieder repariert wurden. Eine alternative Erklärung für die geringere Rate an farbstoffpositiven Axonen im Stadium 2 ergibt sich aus der Definition des Schwellenwertes. Nach dieser ist es erforderlich, dass ein Axon Farbstoff im Verhältnis zum Umgebungssignal anreichert, um als farbstoffpositiv identifiziert werden zu können. Unter der Annahme, dass der Farbstoff passiv über Membranschäden in Axone hinein diffundiert, begünstigt die angewandte Definition des Schwellenwertes die Klassifikation von solchen Axonen als farbstoffpositiv, die in der Lage waren, ihre Membranläsionen zu reparieren. Hingegen würde sich bei persistierenden Membranläsionen tendenziell ein Gleichgewicht zwischen der Signalintensität im Axon und der Umgebung ergeben, was die Detektion dieser Axone als farbstoffpositiv verhindern würde. Da es plausibel erscheint, dass Axone im Stadium 2 eine geringere Regenerationsfähigkeit haben als Axone im Stadium 1 und Membranläsionen daher in fragmentierten Axonen länger persistieren, stellt dies eine weitere mögliche Erklärung dar.

6.1.2) Mögliche Mechanismen der Membranschädigung in der akuten EAE

Prinzipiell sind verschiedene Mechanismen der Schädigung der Axonmembran im Rahmen der akuten EAE denkbar. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Molekülgrößen versuchte ich die Frage zu beantworten, wie groß die vermuteten Membranläsionen sind und ob dies Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus ermöglichen würde. Angesichts der Tatsache, dass auch die größeren Farbstoffe wie z.B. Dextran Texas Red® 10000 - wenn auch zu einem geringeren Anteil - in Axone aufgenommen wurden, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Membranläsionen durch einen definierten porenbildenden Prozess wie z.B. Perforin oder den MAC des Komplementsystems bedingt sind. In diesem Fall, würde man eine annähernd gleich starke Aufnahme von Farbstoffen, die kleiner als ein bestimmter Schwellenwert sind und ab Überschreitung desselben keine Farbstoffaufnahme mehr erwarten. Einschränkend muss aber angemerkt werden, dass vom Hersteller für

die Dextran-konjugierten Farbstoffe nur die maximale Molekülgröße angegeben wird und sich die exakte Größe eines einzelnen Farbstoffmoleküls daher nicht bestimmen lässt. So ist es z.B. im Falle des Dextran Texas Red® 3000-Farbstoffes möglich, dass auch Farbstoffmoleküle mit einer Molekülgröße <3000 Da vorhanden sein können. Daher ist die Definition einer exakten Obergrenze der Größe der Membranläsionen mit diesem Ansatz nicht möglich. Als wahrscheinlicher erscheint daher, dass die Membranschädigung durch eine ROS/RNS-induzierte oxidative Schädigung von Membranlipiden bedingt ist, die zur Bildung von freien Radikalen wie z.B. 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) und Acrolein führen. Von HNE ist beispielsweise bekannt, dass es zu verstärkter Glutamatexzitotoxizität, Membranschäden, Störungen der Ca^{2+} -Homöostase und schließlich zum Zelltod von Neuronen führen kann (Butterfield et al., 2006; Choi et al., 2013). Für Acrolein konnte eine mögliche Rolle auch bei der EAE gezeigt werden und es wird als möglicher Mechanismus für eine erhöhte Permeabilität der axonalen Membran im Kontext der EAE diskutiert (Leung et al., 2011; Leung et al., 2017). Ebenso konnte gezeigt werden, dass es auch in MS-Läsionen zur Oxidation von Membranlipiden kommt und dass dies mit dem Ausmaß der axonalen Degeneration und Entzündungsreaktion korreliert (Haider et al., 2011). Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson ist eine Beteiligung von Lipidperoxidationsprodukten wie z.B. 4-HNE und Acrolein beschrieben (Citron et al., 2016).

Um die möglichen Effekte einer exogenen Applikation von ROS auf die axonale Farbstoffaufnahme zu untersuchen, superfundierte ich in *in-vivo* Experimenten das Rückenmark mit 100 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in aCSF und injizierte nach 90 Minuten H_2O_2 -Applikation 0,5 μl Alexa Fluor® 594 Cadaverine intrathekal. Hierdurch konnte allerdings nur inkonstant und in Einzelfällen eine axonale Farbstoffaufnahme induziert werden, sodass auf eine ausführliche quantitative Auswertung dieses Experimentes verzichtet wurde. Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Morphologie von Axonen konnten analog zu vorherigen Experimenten in unserem Labor (Nikic et al., 2011) aber auch von mir nachgewiesen werden. Zu diesem Experiment ist allerdings anzumerken, dass H_2O_2 ein verhältnismäßig wenig reaktives Molekül darstellt, dessen oxidatives Schädigungspotenzial vielleicht nicht ausreichend ist, um die Axonmembran derartig schwer zu schädigen, dass eine Farbstoffaufnahme induziert werden kann. Anknüpfend an meine Experimente konnte aber in unserem Labor gezeigt werden, dass durch die direkte Applikation von Pyrogallol (1, 2, 3-Trihydroxybenzol), einem starken Oxidationsmittel, das als Donor von Superoxidanionen wirkt (Park et al., 2007), auf das Rückenmark von gesunden CerTN-L15-Mäusen sowohl ein Anstieg der axonalen Ca^{2+} -Konzentration und morphologische Veränderungen analog zur

FAD als auch eine Aufnahme von Alexa Fluor® 594 Cadaverine in Axone induziert werden konnte. Außerdem konnten diese durch Pyrogallol induzierten Effekte durch die Gabe von Superoxiddismutase zumindest teilweise blockiert werden (Experimente durchgeführt von Maarten Witte). Dies unterstützt zusätzlich unsere Vermutung, dass die axonale Farbstoffaufnahme durch eine oxidative Schädigung bedingt sein könnte.

Wie bereits angedeutet kommen auch andere Mechanismen wie z.B. Perforin oder der MAC des Komplementsystems infrage, die potentiell zur Bildung von Membranläsionen führen können. Sowohl Perforin (Howe et al., 2007; Beeston et al., 2010) als auch dem Komplementsystem (Nataf et al., 2000; Hu et al., 2012) werden gelegentlich eine Beteiligung an der EAE zugeschrieben, auch wenn die Evidenz hierfür deutlich geringer ist als für die Rolle von ROS/RNS. Obwohl es angesichts der Beobachtung aus meinen Experimenten am fixierten Gewebe, dass Farbstoffe verschiedener Größen in unterschiedlichem Ausmaß und nicht wie bei einer Membranpore definierter Größe zu erwarten gleich stark in Axone aufgenommen wurden, unwahrscheinlich erschien, dass Perforin oder der MAC dieses Ergebnis erklären könnten, kreuzten wir Perforin- bzw. C5-Komplement-defiziente Mäuse mit unseren CerTN-L15-Mäusen. In einem analogen Versuchsaufbau wurde den Tieren 2 µl Dextran Texas Red® 3000 intrathekal injiziert. Bei der Auswertung zeigte sich kein Unterschied zwischen Perforin- bzw. C5-defizienten CerTN-L15-Mäusen und Wildtyp CerTN-L15-Mäusen weder in Bezug auf den Anteil der farbstoffpositiven Axone noch hinsichtlich der Verteilung der Axone auf die einzelnen FAD-Stadien (Experimente durchgeführt von Maarten Witte). Es bleibt also festzuhalten, dass die von mir beobachtete axonale Farbstoffaufnahme am ehesten durch eine oxidative Schädigung und nicht durch Perforin oder das Komplementsystem bedingt ist.

6.1.3) Dynamik der Entstehung und Reparatur von Membranläsionen

In Vorarbeiten zu meinem Projekt konnte durch *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopie die ausgeprägte zeitliche Dynamik der axonalen Ca^{2+} -Konzentration und dessen Bedeutung für das weitere Schicksal der Axone über Zeit gezeigt werden. Um ähnliche Rückschlüsse über die zeitliche Dynamik der Entstehung und Reparatur von Membranläsionen ziehen zu können, entwickelte ich einen Versuchsaufbau mit einer sequentiellen intrathekalen Injektion von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen identischer Molekülgröße in vierstündigem Abstand bei CFP-5-Mäusen. Hierbei zeigte sich, dass es durchaus ein gewisses Reparaturpotential von Membranschäden gibt, diese aber auch über mehrere Stunden hinweg persistieren können.

Aus diesem Experiment kann man aber lediglich folgern, dass Axone, die positiv für den ersten Farbstoff (Dextran Texas Red® 3000) sind, diesen zu einem nicht näher bestimmbar Zeitpunkt innerhalb des fünfstündigen Beobachtungszeitraums aufgenommen haben und somit schon aufgrund der längeren Inkubationszeit ein höherer Anteil Dextran Texas Red® 3000-positiver Axone im Vergleich zum zweiten Farbstoff (Dextran FITC 3000) zu erwarten ist. Eine weitere Limitation war, dass die zweite Farbstoffinjektion wahrscheinlich traumatischer war als die erste, da der Subarachnoidalraum bereits durch die erste Injektion eröffnet wurde und die Dura mater dem Rückenmark in der Folge direkt auflag, sodass eine gewisse Schädigung des Rückenmarks bei der zweiten Farbstoffinjektion nicht vermeidbar war. Außerdem ist zu bedenken, dass bei der Konfokalmikroskopie neben den beiden injizierten Fluoreszenzfarbstoffen auch die endogene CFP-Färbung sowie die Darstellung der Immunzellinfiltration mittels Neurotrace® 640/660 vorlagen, sodass „Bleed-through“-Artefakte zwischen den einzelnen Detektorkanälen trotz sorgfältiger Mikroskopeinstellungen nicht zu vermeiden waren und diese die Auswertung des Experiments erschwerten. Trotz all dieser Einschränkungen legen unsere Daten aber ein gewissen Reparaturpotenzials von Membranläsionen im Kontext der EAE zumindest nahe.

Mit Ausnahme einer anderen Arbeit, die Schädigungen der Axonmembran im Rahmen entzündlicher ZNS-Erkrankungen nachweisen konnte, ist in diesem Kontext wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen und die dadurch bedingten Folgen bekannt (Leung et al., 2017). Daher werden im Folgenden Beobachtungen aus Modellen traumatischer ZNS-Läsionen beschrieben, deren Übertragbarkeit auf entzündliche Prozesse aber nicht vorausgesetzt werden kann. In Modellen traumatischer ZNS-Schädigung konnte gezeigt werden, dass Axone ein gewisses Potenzial zur Reparatur von Membranschäden besitzen. Bemerkenswerterweise hängt dieses Regenerationspotenzial auch vom Ausmaß der durch die initiale Schädigung induzierten Erhöhung der axonalen Ca^{2+} -Konzentration ab und davon wie schnell die Zelle es schafft, diese wieder auf ein physiologisches Niveau zu reduzieren (Williams et al., 2014). Die initiale Reparatur von Membranläsionen erfolgt durch die Fusion von Vesikeln, die entlang von Mikrotubuli in Axonen transportiert werden, mit der geschädigten Zellmembran, wobei dieser Prozess durch den plötzlichen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst wird (Tuck und Cavalli, 2010). Es ist für die Regeneration eines Axons aber entscheidend diese initiale Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zeitlich zu begrenzen, da es sonst u.a. zur Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain kommt, die eine Degradation des Zytoskeletts bewirkt. Entsprechend konnte auch die Inhibition von Calpain die Degeneration von Axonen nach traumatischer Schädigung positiv beein-

flussen (Williams et al., 2014; Kerschensteiner et al., 2005). Da auch in MS-Läsionen die Transsektion von Axonen gezeigt werden konnte, erscheint es denkbar, dass sich die Erkenntnisse zur Pathophysiologie traumatischer Axonschädigung zumindest teilweise auch auf die EAE bzw. die MS übertragen lassen (Trapp et al., 1998; Dziedzic et al., 2010).

Da die Schädigung von Axonen ein wesentlicher Faktor für das Ausmaß der Behinderung im Rahmen der MS ist und diese im ZNS oft irreversibel ist, ist es von hoher therapeutischer Relevanz diesen Degenerationsprozess möglichst frühzeitig zu stoppen (Dutta und Trapp, 2007). Eine mögliche therapeutische Option zur Reparatur von Membranläsionen bietet die Anwendung von Polyethylenglykol, was in erster Linie bei traumatischen Rückenmarksläsionen aber zuletzt auch in der EAE erfolgreich eingesetzt wurde (Shi und Borgens, 2000; Leung et al., 2017). Auch im Kontext einer ischämischen Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke konnte durch den Einsatz von Poloxamer 188, einem Surfactant-Copolymer, eine Reduktion neurologischer Folgeerscheinungen gezeigt werden, die u.a. den Wirkungen dieser Verbindungen auf die Reparatur von Membranläsionen zugeschrieben wurden (Gu et al., 2013).

6.2) Limitationen und weitere Einsatzmöglichkeiten der *in-vivo* Ca²⁺-Mikroskopie

6.2.1) Simultane Detektion des Ca²⁺- und Farbstoffsignals

Eine technische Schwierigkeit bei den *in-vivo* Experimenten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit war die Anforderung, zeitgleich sowohl mithilfe eines FRET-basierten Sensors quantitativ die Ca²⁺-Konzentration in einem Axon zu bestimmen als auch das Farbstoffsignal zu detektieren. Hierzu waren verschiedene Anpassungen des Versuchsaufbaus erforderlich. Erstens mussten speziell angefertigte wellenlängenabhängige Emissionsfilter für Cerulean (455-490 nm), Citrine (526-557 nm) und den injizierten Farbstoff (660-740 nm) verwendet werden. Außerdem musste der injizierte Farbstoff von seinem Exzitationsspektrum so gewählt werden, dass er sich auch noch mit einer Wellenlänge von 840 nm, welche zur FRET-basierten Messung der Ca²⁺-Konzentration besonders gut geeignet ist, ausreichend stark anregen lässt, ohne zugleich einen zu starken „Bleed-through“-Effekt in die anderen Kanäle zu verursachen. Aufgrund dieser Anforderungen wurde Alexa Fluor® 594 Cadaverine als Farbstoff gewählt, da er sowohl die kleinste Molekülgröße aufwies und so die höchste Sensitivität für die Detektion möglicher axonaler Membranläsionen erwarten ließ als auch bei 840 nm

über eine 1-Photonen-Anregung ein ausreichend starkes Signal lieferte. Jedoch ist diese deutlich schwächer als bei der Konfokalmikroskopie, bei der eine Anregung im Optimum des Exzitationsspektrums möglich ist, sodass bei den *in-vivo* Experimenten eine geringere Sensitivität zu erwarten war. Entsprechend ergab sich im Vergleich zum fixierten Gewebe auch nur ein um ca. 1/3 geringerer Anteil farbstoffpositiver Axone. Dennoch konnte ich zeigen, dass Axone mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Farbstoff aufnehmen als Axone mit einer physiologisch niedrigen Ca^{2+} -Konzentration. Für eine Diskussion der Ursachen und Effekte dieser Ca^{2+} -Dysregulation sei auf Seite 79 verwiesen.

Zur validen Interpretation des Ca^{2+} - sowie des Farbstoffsignals waren mathematische Korrekturen für „Bleed-through“-Artefakte und Hintergrundsignale erforderlich, die experimentell bestimmt werden mussten und zu den auf Seite 48 dargestellten Gleichungen führten. Außerdem ist es denkbar, dass das Ca^{2+} -Sensorprotein selber durch die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes beeinflusst wird. Jedoch zeigten sich sowohl in gesunden Kontroll- als auch in EAE-Tieren YFP/CFP-Ratios, die vergleichbar mit Experimenten ohne Farbstoffinjektion waren, sodass trotz Farbstoffinjektion eine valide Auswertung des Ca^{2+} -Signals möglich ist.

6.2.2) Interpretation des Ca^{2+} -Signals und Limitationen FRET-basierter Ca^{2+} -Sensoren

Um die Messergebnisse richtig interpretieren zu können, ist ein Verständnis der Funktionsweise und Eigenschaften des CerTN-L15-Sensors erforderlich. Die Erstbeschreibung dieses Sensors erfolgte in Zellkultur von Hippocampusneuronen und es konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass es bei der Depolarisation der Zellen durch Applikation einer 10 mM Kaliumlösung entsprechend des FRET-Effektes zu einer Abnahme der Emission des Donorfluorophores bei gleichzeitiger Zunahme der Emission des Akzeptorfluorophores kam. Der umgekehrte Effekt zeigte sich nach Bindung des freien extrazellulären Ca^{2+} durch EGTA (Heim et al., 2007). Auch in unserem Labor konnten wir zeigen, dass durch die Gabe von H_2O_2 morphologische Schädigungen von Axonen und ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auch *in-vivo* induzierbar sind und dass sich das CerTN-L15-Signal durch die Verwendung eines Ca^{2+} -freien aCSF entsprechend beeinflussen lässt (Experimente von Adrian-Minh Schumacher und Christoph Mahler). Nachdem Heim et al. zusätzlich nachweisen konnten, dass die Expression des Sensors in Neuronen über viele Monate hinweg stabil bleibt und die Expression durch den neuronenspezifischen Promoter Thyl reguliert wird, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem gemessenen Signal wirklich um ein Korrelat der axonalen Ca^{2+} -Konzentration handelt.

Die Eigenschaften von FRET-basierten Sensoren werden im Wesentlichen durch die Dissoziationskonstante K_d und die fraktionelle Änderung der YFP/CFP-Ratio ($\Delta R/R$) charakterisiert. Hierbei stellt K_d ein Maß für die Affinität des Sensors für Ca^{2+} dar und entspricht der Ca^{2+} -Konzentration, bei der die Hälfte der Sensormoleküle mit Ca^{2+} beladen ist. Der K_d für den CerTN-L15-Sensor beträgt ca. $1,2 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Heim et al., 2007). Prinzipiell kann man sagen, dass je niedriger der K_d -Wert eines Sensors ist, desto höher ist dessen Sensitivität, aber desto länger ist auch die Zeitdauer bis zum Abklingen des Signals, sodass kleine schnelle Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration besser mit Sensoren mit einem hohen K_d -Wert und entsprechend niedriger Affinität zu detektieren sind (Grienberger und Konnerth, 2012). Es ist allerdings wichtig festzuhalten, dass jeder Ca^{2+} -Indikator auch als exogener Ca^{2+} -Puffer wirkt und dadurch die Ca^{2+} -Dynamik in der Zelle selber beeinflusst, wobei dieser Effekt für Sensoren mit niedrigem K_d -Wert stärker ausgeprägt ist (Neher und Augustine, 1992). Mit seinem K_d -Wert liegt der CerTN-L15-Sensor zwar deutlich höher als manche organische Ca^{2+} -Indikatoren, ist aber für die vorliegende Arbeit ausreichend sensitiv und beeinflusst die Ca^{2+} -Pufferkapazität der Zellen weniger. Die $\Delta R/R$ entspricht der Amplitude des Ca^{2+} -Signals und ergibt sich als Quotient der maximalen Änderung der YFP/CFP-Ratio zur YFP/CFP-Ratio im Ruhezustand. Prinzipiell ist eine große $\Delta R/R$ wünschenswert, da so auch geringere Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration mit einer detektierbaren Signaländerung einhergehen. In der Erstbeschreibung ist der $\Delta R/R$ -Wert mit 70-95% im Verhältnis zu anderen Sensoren zwar relativ gering (Heim et al., 2007), zeigte aber in meinen Versuchen deutlich stärkere Veränderungen des FRET-Signals (bis zum vierfachen), sodass diese für die Fragestellung dieser Arbeit ausreichend war. Dieser hohe $\Delta R/R$ -Wert konnte aber auch in anderen Experimenten in unserem Labor gemessen werden und ist möglicherweise dadurch bedingt, dass bei Heim et al. die Messung am Kortex und bei uns am Rückenmark erfolgte und somit ein unterschiedliches Signal-Rausch-Verhältnis vorgelegen haben könnte (Heim et al., 2007).

Man kann sich die Frage stellen, ob durch die bekannten Eigenschaften des verwendeten FRET-Sensors nicht auch eine exakte Quantifizierung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration möglich ist. Hierzu muss allerdings einschränkend angemerkt werden, dass sich die Eigenschaften des Sensors zwischen *in-vitro* und *in-vivo* Anwendung unterscheiden, da diese u.a. vom pH-Wert, der Temperatur oder der Magnesiumkonzentration abhängen (Grienberger und Konnerth, 2012). Daher wurde keine exakt bestimmbare Ca^{2+} -Konzentration als Schwellenwert für Axone mit erhöhtem Ca^{2+} festgelegt, sondern dieser Schwellenwert als Mittelwert der Kontrollpopulation + 3 SD definiert. Diese robustere Definition ermöglicht zwar eine sichere Differenzierung zwischen Axonen mit deutlich unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. Al-

lerdings ist es auch möglich, dass Axone mit nur geringfügig erhöhtem Ca^{2+} fälschlicherweise der Gruppe von Axonen mit physiologisch niedriger Ca^{2+} -Konzentration zugeordnet werden.

Mit zunehmender Verbreitung genetisch kodierter Ca^{2+} -Sensoren sind auch Fälle beschrieben worden, bei denen die konstitutive Expression dieser Moleküle mit der normalen Funktion von Zellen interferierte. So führte z.B. die dauerhafte Expression von G-CaMP2 in Kardiomyozyten zur Entwicklung einer Kardiomyopathie (Direnberger et al., 2012). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression des Sensorproteins TN-XXL, von dem sich auch der CerTN-L15-Sensor ableitet, auch langfristig Anatomie, Physiologie und das genetische Expressionsmuster in diversen Organen einschließlich des ZNS nicht wesentlich beeinflusst (Direnberger et al., 2012).

6.2.3) Verbesserungsmöglichkeiten und Weiterentwicklungen von Ca^{2+} -Sensoren

Obwohl es in meiner Arbeit primär darum ging zu zeigen, dass eine axonale Farbstoffaufnahme oft auch mit einer Störung der Ca^{2+} -Regulation einhergeht, ist gerade mit Blick auf die Frage, woher das für die Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration verantwortliche Ca^{2+} stammt, eine bessere räumliche und zeitliche Auflösung des FRET-Signals wünschenswert. Durch eine verbesserte räumliche Auflösung wäre es vielleicht möglich Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten innerhalb eines Axons darzustellen und so lokale Störungen der Ca^{2+} -Homöostase auf ein bestimmtes subzelluläres Kompartiment oder Läsionen der Zellmembran zurückzuführen. Bei meinen Versuchen mikroskopierte ich Läsionen im Rückenmark nur zu einem einzelnen Zeitpunkt und nicht im Zeitverlauf. Durch die kontinuierliche Mikroskopie einer einzelnen Läsion wäre es eventuell möglich, die Entstehung von Membranläsionen anhand der Farbstoffaufnahme direkt zu beobachten und somit die Frage zu beantworten, ob deren Entstehung Folge oder Auslöser der beobachteten Ca^{2+} -Dysregulation ist. Auch weitere Erkenntnisse darüber, wo genau diese Läsionen – z.B. im Bereich fokaler Schwellungen oder der Ranvier'schen Schnürringe - entstehen, wären dadurch vielleicht ebenfalls zu gewinnen. Allerdings würde dies zu einer relevanten Exposition des Gewebes gegenüber dem energiereichen Laser führen, sodass fototoxische Effekte denkbar wären.

Kurzzeitige und lokalisierte Veränderungen der Ca^{2+} -Leitfähigkeit in Neuronen und Astrozyten sind die Grundlage von synaptischer Plastizität, neuronalen Aktionspotenzialen und der Regulation des zerebralen Blutflusses (Bazargani und Attwell, 2016; Novkovic et al., 2015). Auch für neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer, fragiles X-Syndrom

oder Erkrankungen des autistischen Spektrums sind Störungen neuronaler Ca^{2+} -Signale bekannt, die zu kognitiven Defiziten durch die gestörte synaptische Plastizität und zu subklinischer neuronaler Hyperexzitabilität führen können (Hall et al., 2015; Siskova et al., 2014; Zhang et al., 2014). Auch bei MS-Patienten bestehen in bis zu 70% der Fälle kognitive Defizite, die v.a. das Kurzzeitgedächtnis, Aufmerksamkeit und die Bildung neuer deklarativer Gedächtnisinhalte betreffen (Cotter et al., 2016). Diese Beobachtung lässt sich auch mit einer veränderten synaptischen Plastizität im Hippocampus bei EAE-Tieren in Verbindung bringen (Novkovic et al., 2015). Allerdings erfolgen z.B. die an der Gedächtnisbildung beteiligten Ca^{2+} -Signale derartig schnell, dass sie aufgrund der langsamen Kinetik bislang nicht mit FRET-basierten Ca^{2+} -Indikatoren aufgelöst werden konnten. So beträgt beispielsweise die Zeitkonstante für den Abfall eines Glutamat-induzierten Ca^{2+} -Signals für den CerTN-L15-Sensor in Dendriten ca. 0,7 s bzw. am Soma sogar ca. 1,6 s, was viel zu langsam ist, um einzelne Aktionspotentiale auflösen zu können (Heim et al., 2007). Allerdings wurden mittlerweile sogenannte „Twitch“-Sensoren entwickelt, die auf dem FRET-basierten TN-XXL-Sensor basieren, aber Zeitkonstanten von nur 160 ms bei einer optimierten $\Delta R/R$ aufweisen und auch bereits in der EAE angewendet wurden (Thestrup et al., 2014; Kyratsous et al., 2017). Diese könnten hilfreich sein, um kurzzeitige Fluktuationen in der axonalen Ca^{2+} -Konzentration zu detektieren und deren Relevanz für die EAE bzw. die MS zu untersuchen.

6.3) Potentielle Ursachen und Folgen der gestörten axonalen Ca^{2+} -Homöostase im Rahmen der akuten EAE

Der Ca^{2+} -Haushalt einer Zelle wird streng reguliert und der steile Konzentrationsgradient von ca. 1:10.000 zwischen Intra- und Extrazellularraum wird durch den aktiven Transport von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher wie z.B. Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum sowie den Transport in den Extrazellularraum aufrechterhalten (Krebs et al., 2015). Dieser steile Konzentrationsgradient ist von essentieller Bedeutung für die Funktion von Zellen, da eine schnelle Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine entscheidende Rolle in allen Zelltypen wie z.B. bei der Auslösung der Kontraktion von Herz- und Skelettmuskelzellen, der Regulation des Zellzyklus und der Exozytose von neurotransmitterhaltigen Vesikeln aus den präsynaptischen Axonterminalen spielt (Grienberger und Konnerth, 2012).

6.3.1) Mögliche Ursachen der erhöhten intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration

Über die vergangenen Jahre hinweg ist eine große Vielzahl an Studien veröffentlicht worden, die eine zentrale Rolle einer gestörten Ca^{2+} -Regulation im Rahmen der pathophysiologischen Veränderungen der EAE nachweisen konnten (Stirling und Stys, 2010). Durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann es zur irreversiblen Schädigung von Axonen kommen, die einerseits durch die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Phospholipasen und Proteasen wie z.B. Calpain und andererseits durch Störungen der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien und die Bildung von freien Radikalen bedingt sein kann (Williams et al., 2014; Stirling und Stys, 2010). Diese axonale Schädigung ist im Krankheitsverlauf progredient und ist eine der Hauptursachen für das Ausmaß der Behinderung von MS-Patienten (Ontaneda et al., 2017). Ob das für die Zellschädigung ursächliche Ca^{2+} aber aus intrazellulären Speichern stammt oder aus dem Extrazellulärraum in das Axon gelangt, ist bislang noch ebenso wenig bekannt wie die Ursachen für die beschriebenen Störungen der Ca^{2+} -Homöostase. Neben einem Einstrom von Ca^{2+} entsprechend des Konzentrationsgradienten von extra- nach intrazellulär über Ionenkanäle oder im pathologischen Kontext über Membranläsionen verfügen Neurone auch über diverse intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher wie z.B. Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER), die als potentielle Ca^{2+} -Quellen infrage kommen. Versuche aus unserem Labor zur Komplexion von extrazellulärem Ca^{2+} mit EGTA sowie mit Ca^{2+} -Sensoren am ER legen jedoch einen extrazellulären Ursprung nahe (Experimente von Christoph Mahler und Alexander Scheiter). Neben dem durch meine Experimente vermuteten, möglicherweise durch oxidative Schädigung bedingten Membranläsionen, stellt **Abbildung 22** eine Auswahl weiterer möglicher Mechanismen der Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration dar. Von den dargestellten Ca^{2+} -leitfähigen Strukturen werden insbesondere ASIC-Kanäle, Glutamatrezeptoren und der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) mit der EAE in Verbindung gebracht (Friese et al., 2007; Pitt et al., 2000; Trapp und Stys, 2009).

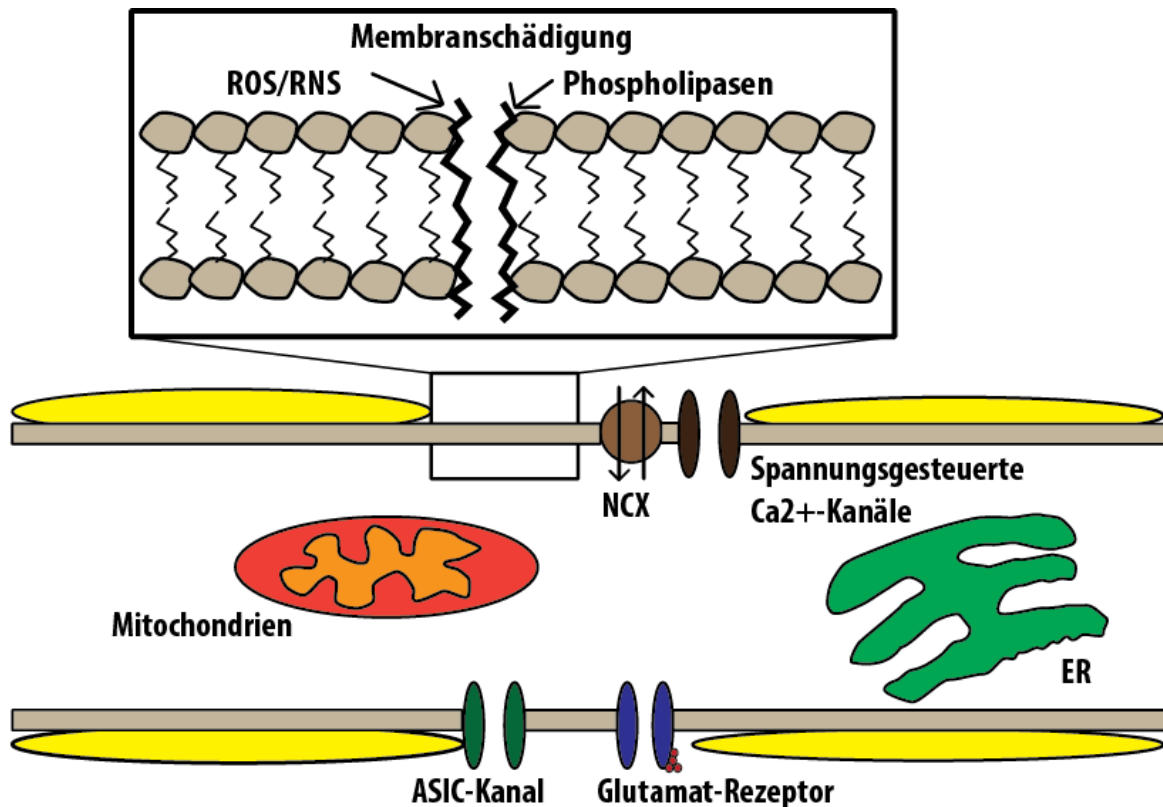


Abbildung 22: Potentielle Mechanismen der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung

In Axonen sind eine Vielzahl von Strukturen mit Leitfähigkeit für Ca^{2+} beschrieben, die auch potentiell für die beobachteten Störungen der Ca^{2+} -Konzentration im Rahmen der EAE verantwortlich sein könnten wie z.B. ASIC-Kanäle (acid-sensing ion channels (pH-Wert-gesteuerte Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle)), Glutamat-Rezeptoren, NCX und spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle. Außerdem ist ein Ca^{2+} -Einstrom von extra- nach intrazellulär über durch ROS/RNS- oder Phospholipasen-bedingte Membranläsionen denkbar. Auch Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER) kommen als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher als potentielle Mechanismen der intraaxonalen Ca^{2+} Konzentrationserhöhung infrage.

Zu den wichtigsten Mechanismen, denen eine Beteiligung bei der inflammatorischen Schädigung von Axonen zugeschrieben wird, gehören die Bildung von ROS/RNS sowie die Dysfunktion von Mitochondrien, die über einen intrazellulären ATP-Mangel zu einem Zusammenbruch des Membranpotenzials sowie zur Aktivierung bzw. gestörten Funktion von Ionenkanälen führen können (Trapp und Stys, 2009; Nikic et al., 2011). Diese Mechanismen sollen im Weiteren näher erläutert und bezüglich ihrer Relevanz für die Störungen des axonalen Ca^{2+} -Haushalts hin bewertet werden.

6.3.2) Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

ROS/RNS werden im Rahmen akuter Entzündungsreaktion durch Immunzellen wie Makrophagen oder Mikrogliazellen produziert (Nikic et al., 2011). So konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass durch die exogene Applikation von reaktiven Verbindungen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) oder H_2O_2 ein der EAE analoger axonaler Degenerationsprozess auslösbar ist. Entsprechend führte auch die Behandlung mit einer Kombination verschiedener ROS-/RNS-Scavengern zu einer deutlichen Reduktion der H_2O_2 - und NO-induzierten axonalen Schädigung und hatte auch in der EAE einen protektiven Einfluss auf Axone (Nikic et al., 2011).

In einem ersten Experiment konnte ich durch H_2O_2 -Applikation auf das Rückenmark lediglich die von Nikic et al. beschriebenen Veränderungen der axonalen Morphologie und bei einem großen Anteil der Axone eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aber keine axonale Farbstoffaufnahme induzieren. Daraufhin untersuchte ich in einem weiteren Versuch, ob sich durch die Behandlung der Tiere mit der beschriebenen ROS-/RNS-Scavenger-Kombination ein positiver Effekt auf die Störungen des axonalen Ca^{2+} -Haushalts im Rahmen der akuten EAE erzielen lässt. Dabei erfolgten analog zur Originalpublikation ab dem Tag des Gewichtsverlustes zu Beginn der klinischen EAE-Symptome zweimal täglich i.p. Injektionen der ROS-/RNS-Scavenger bzw. des Vehikels und die Tiere wurden 2-3 Tage nach Erstmanifestation klinischer Symptome für *in-vivo* Ca^{2+} -Mikroskopieexperimente verwendet. In diesem Vorexperiment erfolgte keine Farbstoffinjektion. Es zeigte sich aber erstaunlicherweise weder für die axonale Morphologie noch für die axonale Ca^{2+} -Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen Vehikel- und Therapiegruppe. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in **Abbildung 23** dargestellt.

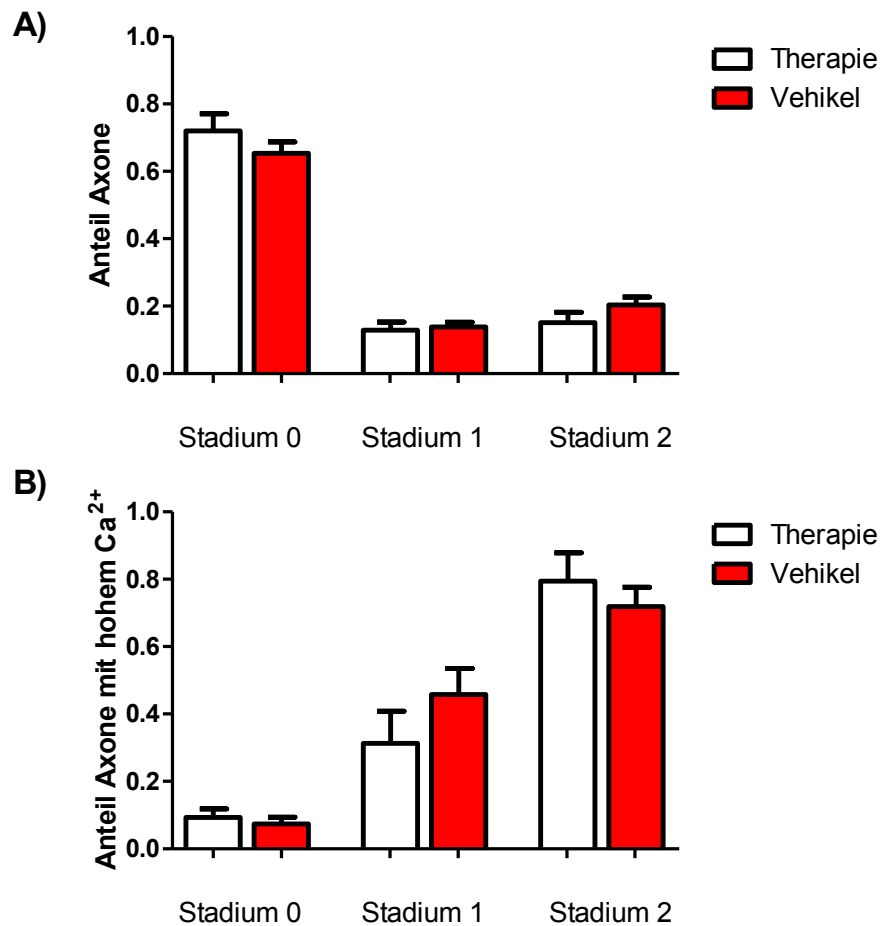


Abbildung 23: Effekte einer Behandlung mit ROS/RNS-Scavengern auf die axonale Morphologie und den axonalen Ca²⁺-Haushalt

(A) zeigt den Anteil an Axonen in den einzelnen FAD-Stadien für die ROS/RNS-Scavenger- und Vehikelgruppe. (B) zeigt den Anteil der Axone mit erhöhter Ca²⁺-Konzentration für die Therapie- und Vehikelgruppe. n = 5 Tiere für Therapie- (324 Axone im Stadium 0, 58 Axone im Stadium 1 und 68 Axone im Stadium 2) bzw. n = 6 Tiere für Vehikelgruppe (353 Axone im Stadium 0, 75 Axone im Stadium 1 und 110 Axone im Stadium 2).

Eine mögliche Erklärung für dieses überraschende Ergebnis könnte sein, dass in meinen Versuchen nur solche Läsionen für die Mikroskopie ausgewählt wurden, die Auffälligkeiten der Axonmorphologie aufwiesen. Daher ist es vorstellbar, dass durch die Behandlung mit ROS/RNS-Scavengern zwar die Aktivität und damit einhergehend die Dysregulation der axonalen Ca²⁺-Konzentration einer einzelnen, akuten Läsion nicht beeinflusst wird, aber die gesamte Läsionslast im Rückenmark rückläufig ist und so dennoch ein therapeutischer Effekt besteht. So konnten Nikic et. al. im fixierten Gewebe u.a. zeigen, dass durch die Behandlung mit ROS/RNS-Scavengern die Infiltration mit Immunzellen reduziert wird und die Größe der Läsionen abnimmt (Nikic et al., 2011). Dies liegt darin begründet, dass ROS/RNS zusätzlich

auch immunmodulatorische Wirkungen haben (Valko et al., 2007). Allerdings war es bei meinen *in-vivo* Experimenten nicht möglich, die Größe der entzündlichen Läsionen ohne eine zeitgleiche Anfärbung der Immunzellen zu erfassen. Außerdem handelt es sich bei ROS/RNS um eine sehr heterogene Familie diverser reaktiver Verbindungen und es ist bislang nicht bekannt, welche von diesen die höchste pathophysiologische Relevanz für entzündliche ZNS-Erkrankungen besitzen. Wie bereits beschrieben konnte durch H_2O_2 keine axonale Farbstoffaufnahme induziert werden, während dies durch die Applikation des Superoxidanionendonors Pyrogallol reproduzierbar möglich ist. So ist es vorstellbar, dass durch die Behandlung mit dem von mir verwendeten ROS/RNS-Scavengern nur ein Teil der pathophysiologisch relevanten Radikale neutralisiert werden konnte, während eine axonale Schädigung durch andere reaktive Verbindungen nach wie vor möglich war. Insbesondere die Experimente mit Pyrogallol lassen die Vermutung zu, dass ROS/RNS trotz des nicht erfolgreichen Therapieexperiments durchaus eine Rolle bei der Störung der axonalen Ca^{2+} -Homöostase und der Entstehung von Membranläsionen im Rahmen der EAE haben könnten.

Der Pathomechanismus über den ROS/RNS zu einer Schädigung von Axonen führen ist noch nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Erklärung stellt die oxidative Schädigung von Membranlipiden durch diese Radikale dar. Besonders durch die Oxidation von gesättigten Fettsäuren kommt es zu Veränderungen der Membranfluidität und die dabei entstehenden Oxidationsprodukte wirken entweder selber als Radikale oder führen zur Bildung weiterer noch toxischerer Radikale (de la Haba et al., 2013). Auch in MS-Läsionen konnte eine Oxidation von Membranlipiden nachgewiesen werden, die auf die Bildung von ROS/RNS durch T-Lymphozyten und Makrophagen bzw. Mikrogliazellen im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion zurückgeführt wird (Haider et al., 2011; van Horssen et al., 2011). Zusätzlich wurde in der EAE eine erhöhte axonale Membranpermeabilität gezeigt, die von den Autoren mit einer oxidativen Membranschädigung in Zusammenhang gebracht wird (Leung et al., 2017)

Superoxidanionen zählen zu den reaktiven Verbindungen, die im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion von Immunzellen wie z.B. aktivierten Mikrogliazellen gebildet werden (Wu et al., 2012). Da sich durch den Superoxidanionendonator Pyrogallol sowohl eine axonale Farbstoffaufnahme als auch eine axonale Degeneration analog der FAD induzieren ließ und sich dieser Effekt durch die Behandlung mit Superoxiddismutase teilweise blockieren lässt, erscheint es möglich, dass die beobachtete axonale Farbstoffaufnahme durch eine oxidative Membranschädigung bedingt sein könnte. Ebenso konnten Veränderungen in der Aktivität der Superoxiddismutase auch mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B.

Morbus Alzheimer oder amyotropher Lateralsklerose in Verbindung gebracht werden (Kirby et al., 2011; Flynn und Melov, 2013).

In engem inhaltlichen Zusammenhang mit der schädigenden Wirkung von ROS/RNS auf Axone in der akuten EAE steht deren Effekt auf Mitochondrien. Mitochondrien sind durch die oxidative Phosphorylierung von ATP entscheidend für die Energieversorgung von Zellen. Dabei kommt es jedoch zu einer konstanten Bildung von ROS, die bei einer die antioxidativen Kapazitäten der Zelle übersteigenden Bildung zu oxidativem Stress und Störungen der Zellfunktion führen können (Witte et al., 2014). In einem histopathologischen Subtyp von akuten MS-Läsionen (Typ III oder „hypoxia-like“ Läsionen) konnten Dysfunktionen von Mitochondrien in Axonen, Oligodendrozyten und Astrozyten gezeigt werden, wobei diese auf die Produktion von ROS durch aktivierte Immunzellen wie Makrophagen oder Mikroglia zurückgeführt werden konnte (Lassmann et al., 2001; Nikic et al., 2011; Fischer et al., 2012).

6.3.3) Weitere potentielle Erklärungsansätze:

Eine gestörte Funktion von Mitochondrien konnte schon in mehreren Publikationen mit neurodegenerativen Veränderungen im Rahmen der EAE bzw. MS in Verbindung gebracht werden (Friese et al., 2014; Witte et al., 2014). Langfristig kommt es zu einem intrazellulären Energiemangel, da die ATP-Produktion durch die geschädigten Mitochondrien nicht mehr ausreicht, um den durch die Demyelinisierung erforderlichen erhöhten Energiebedarf decken zu können. Dieser relative Energiemangelzustand wird auch als „virtual hypoxia“ bezeichnet und führt über eine reduzierte Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase und einen Anstieg der intraaxonalen Na^+ -Konzentration zu einer Umkehr der Transportrichtung des NCX, sodass Ca^{2+} nicht mehr nach extrazellulär, sondern im Austausch gegen Na^+ nach intrazellulär transportiert wird (Stys et al., 2012). Durch die Depolarisation können auch Glutamatrezeptoren und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden, die die Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration weiter verstärken. Diese wiederum induziert die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Proteasen, verstärkt die mitochondriale Dysfunktion zusätzlich, behindert axonale Transportprozesse und bewirkt einem weiteren Anstieg der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration, der im Verlauf zur Degeneration des Axons führt (Trapp und Stys, 2009; Witte et al., 2014).

Ein therapeutischer Ansatz zur Reduktion des Anstiegs der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration ist die Blockade des NCX mit Bepriidil, einem selektiven Inhibitor des Ca^{2+} -Imports über den NCX, der bereits in einigen Publikationen einen protektiven Effekt auf Axone im Rahmen der

EAE zeigte (Rossi et al., 2010; Brand-Schieber und Werner, 2004). In unserem Labor konnten wir zwar zeigen, dass Bepiridil einen NO-induzierten Anstieg der axonalen Ca^{2+} -Konzentration und die Degeneration von Axonen fast vollständig verhindern kann. Jedoch konnten wir durch die Behandlung mit Bepiridil im Rahmen der akuten EAE in unseren Experimenten weder einen Effekt auf die Ca^{2+} -Dysregulation noch auf das Ausmaß der axonalen Schädigung beobachten (Experimente durchgeführt von Christoph Mahler).

Im Rahmen der EAE kommt es auch zu einem verstärkten anaeroben Energiemetabolismus, was zu einer lokalen Azidose führt. Neurone exprimieren auf ihrer Zellmembran den pH-Wert gesteuerten Ionenkanal ASIC-1 (acid sensing ion channel-1), der bei einem azidotischen pH-Wert eine Leitfähigkeit für Na^+ und Ca^{2+} aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass es im Gewebe von an akuter EAE erkrankten Mäusen zu einer Azidose kommt, die ausreichend für eine Aktivierung dieses Kanals ist und dass entsprechend ASIC-1-defiziente Mäuse einen milderen EAE-Verlauf aufweisen. Auch die pharmakologische Blockade von ASIC-1 mit Amilorid führte zu einem protektiven Effekt (Friese et al., 2007). Ebenso ist bekannt, dass in akuten MS-Läsionen Axone vermehrt ASIC-1-Kanäle exprimieren und dass dies mit dem Ausmaß der axonalen Schädigung und der Demyelinisierung zusammenhängt (Vergo et al., 2011). Allerdings konnten wir in unseren Versuchen mit kommerziell erhältlichen ASIC-1-defizienten-Mäusen keinen Effekt auf die intraaxonale Ca^{2+} -Konzentration und die Degeneration von Axonen beobachten (Experimente durchgeführt von Christoph Mahler). Da auch andere der in **Abbildung 22** dargestellten Mechanismen wie z.B. Glutamat-Exzitotoxizität (Pitt et al., 2000) in unseren Versuchen keinen Effekt auf den Anstieg der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration und die Degeneration von Axonen hatten (Experimente durchgeführt von Christoph Mahler), erscheint eine direkte oxidative Schädigung von Axonen durch ROS/RNS als die wahrscheinlichste Ursache der axonalen Degeneration im Rahmen der MS bzw. EAE.

6.3.4) Folgen der axonalen Ca^{2+} -Überladung

Bereits in den meiner Arbeit vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration ein wichtiger Indikator dafür ist, ob sich ein im Rahmen der akuten EAE geschädigtes Axon im weiteren zeitlichen Verlauf erholt oder degeneriert. Aus therapeutischer Sicht wäre es erstrebenswert, diesen Ca^{2+} -vermittelten Schädigungsmechanismus bereits auf der Ebene des kausalen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu unterbinden. Da sich dies in unseren bisherigen Experimenten aber als

schwierig erwiesen hat bzw. eine zu unspezifische Blockade von z.B. spannungsgesteuerten Na^+ -Kanälen oder Glutamatrezeptoren mit erheblichen Nebenwirkungen einherginge, kann es durchaus sinnvoll sein, auch erst auf Ebene, der durch die Ca^{2+} -Dysregulation bedingten Prozesse, therapeutisch einzugreifen. Hierfür ist allerdings ein detailliertes Verständnis der durch die Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration ausgelösten Veränderungen erforderlich.

Ein wesentlicher Mechanismus der Ca^{2+} -vermittelten Schädigung von Axonen ist die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Proteasen wie z.B. Calpain, die u.a. immunmodulatorische Funktionen haben, aber auch zur Schädigung des Zytoskeletts und zur Apoptose bzw. Nekrose von Zellen führen können (Trager et al., 2014; Williams et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl im peripheren Blut als auch in der grauen und weißen Substanz von Autopsien von MS-Patienten eine erhöhte Aktivität bzw. Expression von Calpain nachweisbar ist (Shields et al., 1999; Imam et al., 2007). Auch durch die Behandlung von Mäusen mit Calpaininhibitoren konnten sowohl die klinisch-neurologischen Folgen als auch histopathologische Zeichen axonaler Degeneration im Rahmen der akuten EAE reduziert werden (Trager et al., 2014; Hassen et al., 2008). Aufgrund der immunmodulatorischen Einflüsse von Calpain z.B. auf die Zytokinproduktion durch T-Lymphozyten ist es aber unklar, ob diese therapeutischen Effekte auf einen Schutz von Axonen vor der proteolytischen Aktivität von Calpain zurückzuführen sind oder ob die Beeinflussung des Immunsystems im Vordergrund steht (Hendry und John, 2004). So konnte in der akuten EAE gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Calpaininhibitoren die Immunzellinfiltration und Mikrogliaaktivierung reduziert, was ein eindeutiges Indiz für immunmodulatorische Effekte einer solchen Therapie ist und weniger Rückschlüsse auf die Bedeutung von Calpain für die Degeneration von Axonen zulässt (Trager et al., 2014). Allerdings wurde in Modellen einer traumatischen Schädigung von Axonen im Rückenmark Calpain als ein wesentlicher Mediator der axonalen Degeneration identifiziert und die Behandlung mit Calpaininhibitoren zeigte deutliche protektive Effekte (Williams et al., 2014; Kerschensteiner et al., 2005). Da in diesem Kontext die proteolytische Aktivität von Calpain sicherlich im Vordergrund steht, erscheint die Wirkung von Calpain im Rahmen der akuten EAE auf verschiedenen Ebenen vermittelt zu sein.

Einen wichtigen intrazellulären Ca^{2+} -Speicher stellen Mitochondrien dar. Im Rahmen der akuten EAE ist publiziert worden, dass es in Folge der Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Überladung von Mitochondrien mit Ca^{2+} kommt und dass dies sekundär eine Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol über die sogenannte „permeability transition pore“ (PTP) bewirkt. Die genaue Position dieses Mechanismus in der durch die Ca^{2+} -Dysregulation

ausgelösten Signalkaskade ist aber nicht eindeutig definiert (Forte et al., 2007). Der wichtigste Regulator der Funktion der PTP ist Cyclophilin D und es konnte gezeigt werden, dass Cyclophilin D-defiziente Mäuse deutlich widerstandsfähiger gegenüber einer oxidativen Schädigung und erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen sind als Wildtypmäuse, indem sie vermehrt Ca^{2+} in ihre Mitochondrien sequestrierten. Entsprechend zeigten Cyclophilin D-defiziente Mäuse auch einen milderen EAE-Verlauf und ein geringeres Ausmaß axonaler Schädigung als Wildtypmäuse. Da das Ausmaß der Immunzellinfiltration zwischen beiden Gruppen vergleichbar war, kann man davon ausgehen, dass die Ausschaltung von Cyclophilin D primär einen neuroprotektiven Effekt hat und dieser nicht durch immunmodulatorische Wirkungen bedingt ist (Forte et al., 2007). Ein theoretisch denkbarer therapeutischer Ansatz zur Blockade der Cyclophilin D-vermittelten Ca^{2+} -Dysregulation stellt eine Behandlung mit dem schon lange in klinischer Anwendung befindlichen Immunsuppressivum Cyclosporin A dar (Malouitre et al., 2010). Eine erste große Therapiestudie mit Cyclosporin A zur Behandlung der MS fand bereits im Jahr 1990 statt, zeigte allerdings nur einen mäßiggradigen therapeutischen Effekt gegenüber Placebo bei erheblichen Nebenwirkungen, die eine Langzeitanwendung einschränken (Multiple-Sclerosis-Study-Group, 1990). Vielleicht ist in Zukunft durch die Entwicklung von weniger toxischen Derivaten von Cyclosporin A eine Langzeitbehandlung von MS-Patienten mit einem derartigen Ansatz möglich. Allerdings könnte der beobachtete therapeutische Effekt von Cyclosporin A auch immunmodulatorisch begründet und nicht durch den Schutz von Axonen vor einer Ca^{2+} -vermittelten Degeneration bedingt sein.

Darüber hinaus ist bekannt, dass Neurone auch Ca^{2+} -aktivierte Ionenkanäle auf ihrer Zellmembran exprimieren, wozu auch der „transient receptor potential melastatin 4“ (TRPM4)-Kationenkanal gehört, der u.a. für Na^+ und K^+ , aber nicht für Ca^{2+} , leitfähig ist (Launay et al., 2002). Dieser Ionenkanal ist insofern interessant, da er durch den initialen Anstieg der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration bzw. einen intrazellulären ATP-Mangel aktiviert wird und so die Depolarisation des Axons weiter verstärkt, was u.a. zur Aktivierung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen führt, die ebenfalls an der Degeneration von Axonen im Rahmen der EAE beteiligt sein sollen (Kornek et al., 2001). TRPM4-Kanäle sind also zwar nicht ursächlich für die initiale Störung der axonalen Ca^{2+} -Homöostase, könnten aber eine wichtige Verstärkerfunktion haben. Es konnte nachgewiesen werden, dass in akuten entzündlichen Läsionen sowohl in der EAE als auch bei MS-Patienten eine vermehrte Expression von TRPM4-Kanälen in Axonen besteht (Schattling et al., 2012). Sowohl durch die pharmakologische Blockade von TRPM4-Kanälen mit dem oralen Antidiabetikum Glibenclamid als auch in Experimenten mit TRPM4-defizienten Mäusen konnte ein milderer klinischer Verlauf der EAE und eine

Reduktion neurodegenerativer Veränderungen erzielt werden (Schattling et al., 2012). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die durch die Aktivierung von ionotropen Glutamaterezeptoren vermittelten Flüsse von Na^+ und Ca^{2+} nach intrazellulär ebenfalls von TRPM4-Kanälen abhängig sind. Da auch im Rahmen der EAE eine Beteiligung von Glutamatexzitotoxizität diskutiert wird, könnte dies einen möglichen Erklärungsansatz darstellen (Schattling et al., 2012; Pitt et al., 2000). Obwohl auch bekannt ist, dass TRPM4-Kanäle bei der Aktivierung von T-Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (Launay et al., 2004), zeigen TRPM4-defiziente Mäuse eine Immunreaktion und Immunzellinfiltration im Rahmen der akuten EAE, die mit Wildtypmäusen vergleichbar ist (Schattling et al., 2012). Es scheint sich daher also wirklich um einen neuroprotektiven und nicht um einen immunmodulatorischen Effekt zu handeln, der durch die weite Verbreitung und gute Verträglichkeit von Glibenclamid auch das Potenzial für eine klinische Anwendung bietet.

6.4) Mögliche neue Therapieansätze

In den vergangenen Jahren ist eine Vielzahl an neuen immunmodulatorischen Medikamenten zur Behandlung der RRMS zugelassen worden, die beachtliche Erfolge bei der Reduktion der Schubfrequenz und des Ausmaßes der ZNS-Läsionen in der MRT zeigten (Comi et al., 2017). So reduzierte z.B. der anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab die Schubfrequenz innerhalb eines zweijährigen Beobachtungszeitraums um ca. 50% gegenüber IFN- β , dem über viele Jahre am häufigsten eingesetzten Medikament bei der RRMS (Cohen et al., 2012). Aber auch andere Wirkstoffe wie z.B. Natalizumab, Fingolimod, Dimethylfumarat oder Rituximab zeigen ähnlich gute therapeutische Ergebnisse (Miller et al., 2003; Hauser et al., 2008; Fox et al., 2012; Cohen et al., 2010; Kalincik et al., 2017). Allerdings sind neben den hohen Therapiekosten auch zwar seltene, jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen wie z.B. die progressive multifokale Leukenzephalopathie unter Behandlung mit Natalizumab zu berücksichtigen (Bloomgren et al., 2012; Havla et al., 2016). Die genannten Medikamente wirken primär immunmodulatorisch und zeigen leider kaum Wirksamkeit während der progredienten Phase der MS, bei der neurodegenerative Schäden und die daraus resultierenden neurologischen Defizite im Vordergrund stehen (Ontaneda et al., 2017). Da es bislang kein zugelassenes neuroprotektives Medikament für die progrediente MS gibt, ist in diesem Stadium die Therapie oft nur symptomatisch (Feinstein et al., 2015). So zeigte erst kürzlich eine Studie zu Fingolimod keine Verlangsamung der Krankheitsprogression bei PPMS (Lublin et al., 2016). Hoffnungsvolle Ergebnisse in Phase-3-Studien sowohl bei der PPMS als auch bei der RRMS

liefert aber der B-Zell-depletierende anti-CD20-Antikörper Ocrelizumab, der sowohl die Progression der Behinderung bzw. die Schubfrequenz als auch in MRT-Verlaufsuntersuchungen die Hirnvolumenminderung und das Auftreten neuer T2-hyperintenser Läsionen im Vergleich zu Placebo bzw. IFN- β reduzierte (Hauser et al., 2017; Montalban et al., 2017).

Wesentlich für die neurologische Behinderung bei Patienten mit progredienter MS ist die Degeneration von Axonen und ein detailliertes Verständnis der ursächlichen Pathophysiologie könnte neue Therapieansätze auch für diese Patienten aufzeigen (Ontaneda et al., 2017). Eine der Herausforderungen bei der Entwicklung neuroprotektiver Therapieansätze, für die progrediente Phase der MS ist das Fehlen valider Biomarker für die Schwere der Erkrankung, sodass meist der „expanded disability status scale“ (EDSS) als klinischer Indikator für das Therapieansprechen verwendet wird, der aber durch weitere Kriterien wie z.B. MRT-und Liquor-Untersuchungen ergänzt werden sollte (Ontaneda et al., 2015). So wird in Studien oft die globale und kortikale Hirnatrophie in der MRT als Surrogatparameter für das Ausmaß neurodegenerativer Veränderungen im Rahmen der MS bestimmt (Ontaneda et al., 2017). Es wird aber kritisiert, dass das Ausmaß struktureller Veränderungen in der MRT nicht immer mit dem klinischen Befund korreliert (Filippi et al., 2012). Außerdem muss man sich angesichts der zahlreichen ernüchternden Ergebnisse von in EAE-Modellen als neuroprotektiv beschriebenen Wirkstoffen in der klinischen Anwendung fragen, inwieweit sich die Erkenntnisse aus Tiermodellen wie z.B. der EAE auf den Menschen übertragen lassen (Baker et al., 2011).

Ein neuroprotektiver Therapieansatz, der sich aus EAE-Modellen ergab und sich mittlerweile in einer klinischen Phase 2-Studie befindet, ist die Blockade von ASIC-1-Kanälen durch das K^+ -sparende Diuretikum Amilorid. Nachdem in Autopsien von chronischen ZNS-Läsionen von MS-Patienten eine vermehrte Expression des ASIC-1-Kanals nachgewiesen werden konnte und die Blockade dieses Kanals in der EAE einen protektiven Effekt zeigt, wurde dieser Ansatz in einer kleinen Kohorte von 14 Patienten mit PPMS getestet (Friese et al., 2007; Arun et al., 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass während einer dreijährigen Behandlung mit Amilorid die in der MRT bestimmte jährliche Atrophierate des Gehirnvolumens im Vergleich zur Rate vor Amiloridtherapie signifikant reduziert werden konnte. Auch in diffusionsgewichteten MRT-Bildern zeigten sich unter Amiloridtherapie sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz weniger Anzeichen für neurodegenerative Veränderungen (Arun et al., 2013), wobei eine Bestätigung der Ergebnisse durch weitere Studien noch aussteht.

Im Rahmen des „virtual hypoxia pathways“ wurde bereits die mögliche Relevanz von Na^+ -Kanälen für die Degeneration von Axonen beschrieben. So gibt es diverse Studien, die einen

neuroprotektiven Effekt durch die Blockade von Na⁺-Kanälen z.B. mit Lamotrigin, Phenytoin oder Flecainid in EAE-Modellen beschreiben (Black et al., 2006; Morsali et al., 2013; Bechtold et al., 2006). Allerdings liegt bislang nur eine Phase 2-Studie zu Lamotrigin vor, die aber keinen neuroprotektiven Effekt bei der Behandlung der SPMS im Vergleich zu Placebo nachweisen konnte (Kapoor et al., 2010). Zu Phenytoin existiert lediglich eine Phase 2-Studie zur Behandlung der Neuritis nervi optici, einer pathogenetisch eng mit der MS verwandten Erkrankung, die einen neuroprotektiven Effekt gegenüber Placebo zeigte. Als primäre Messgröße wurde in dieser Studie die Dicke der Nervenfaserschicht der Retina untersucht, die als Teil des ZNS sowohl bei der Neuritis nervi optici als auch bei der MS neurodegenerative Veränderungen aufweist. Durch Phenytoin konnte das Ausmaß der Abnahme der Dicke der retinalen Nervenfaserschicht um 30% gegenüber Placebo reduziert werden (Raftopoulos et al., 2016). Ob sich diese Ergebnisse aber auch auf die MS und insbesondere auch auf die klinisch-neurologische Funktion von Patienten übertragen lassen, muss abgewartet werden.

Ein weiterer interessanter Kandidat mit neuroprotektiven Eigenschaften ist Simvastatin, das als Inhibitor der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, zur Behandlung der primären Hypercholesterinämie und zur Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt wird (Chataway et al., 2014). Außerdem konnten für Statine immunmodulatorische und neuroprotektive Effekte u.a. durch die Verbesserung der zentralnervösen Hämodynamik und die Reduktion oxidativer Schädigung nachgewiesen werden (van der Most et al., 2009; Greenwood et al., 2006). In der Behandlung der RRMS zeigten Statine aber in der Kombination mit IFN- β in mehreren Studien keinen zusätzlichen Nutzen (Wang et al., 2011). In einer Phase 2-Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die tägliche Gabe von 80 mg Simvastatin eine Verbesserung klinisch-neurologischer Befunde gemessen am EDSS und eine Reduktion der jährlichen Atrophierate des Gehirns um über 40% gegenüber Placebo bei Patienten mit SPMS erreicht werden kann (Chataway et al., 2014). Auch neurokognitive Funktionen und die Lebensqualität von Patienten mit SPMS verbesserten sich unter Simvastatin im Vergleich zu Placebo (Chan et al., 2017). Da Marker für die Aktivierung von T-Zellen wie z.B. IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-17 durch die Gabe von Simvastatin nicht beeinflusst wurden und auch die Schubfrequenz und die Entstehung neuer ZNS-Läsionen in der MRT sich gegenüber Placebo nicht unterschied, kann man von einem primär neuroprotektiven und weniger von einem immunmodulatorischen Effekt durch Simvastatin ausgehen (Chataway et al., 2014). Wodurch die therapeutische Wirkung von Simvastatin bedingt ist, ist jedoch unklar. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Statine die Oxidation von Lipiden günstig beeinflussen, die schädigenden

Auswirkungen der Glutamatexzitotoxizität reduzieren und durch eine Verbesserung der zerebralen Hämodynamik über die endotheliale NO-Synthase hypoxischen Schäden vorbeugen (Schmeer et al., 2006; Chataway et al., 2014). Diese Hypothesen fügen sich auch sehr gut in die in der vorliegenden Arbeit beschriebene durch ROS/RNS-vermittelte oxidative Membranschädigung von Axonen ein. Insbesondere aufgrund der langjährigen Erfahrung, der weiten Verbreitung und der niedrigen Therapiekosten, könnte Simvastatin in Zukunft eine effektive Therapieoption zur Behandlung der PPMS und SPMS sein.

Weitere Evidenz für die Beteiligung von ROS/RNS an der Neurodegeneration im Rahmen der MS ergibt sich aus der erfolgreichen Anwendung von Dimethylfumarat bei der RRMS (Fox et al., 2012). Neben immunmodulatorischen Effekten von Dimethylfumarat z.B. durch die Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappa B“, konnten auch neuroprotektive Wirkungen v.a. durch eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativer Schädigung und mitochondrialer Dysfunktion gezeigt werden (Albrecht et al., 2012). Diese werden u.a. durch eine vermehrte Synthese des antioxidativwirksamen Glutathions vermittelt. Es ist auch bekannt, dass ein Glutathionmangel zu Störungen der Funktion der Mitochondrien, zur vermehrten Oxidation von Membranlipiden und schließlich zur Degeneration von Neuronen führen kann (Hajieva et al., 2015; Seiler et al., 2008). Entsprechend könnte die Erhöhung der antioxidativen Kapazitäten der Neurone z.B. durch eine vermehrte Bildung oder die verstärkte Regeneration von oxidiertem Glutathion zu einem protektiven Effekt gegenüber schädigenden Einflüssen, der im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion produzierten ROS/RNS führen. Für Neurone ist v.a. die Glutathionperoxidase 4 als Schutz vor oxidativer Schädigung überlebenswichtig (Seiler et al., 2008). Ein möglicher zukünftiger Therapieansatz zumindest auf Ebene der EAE könnte daher die Überexpression von Glutathionperoxidase 4 in Neuronen sein, was diese widerstandsfähiger gegenüber einer oxidativen Schädigung v.a. der Zellmembran machen könnte.

6.5) Zusammenfassende Schlussbemerkungen

Die Multiple Sklerose ist in Teilen ihrer Pathogenese nach wie vor nicht ausreichend verstanden, obwohl in den letzten Jahren und Jahrzehnten enorme Fortschritte in der Aufklärung der ursächlichen Pathophysiologie gemacht werden konnten, die mittlerweile auch schon teilweise in den klinischen Alltag umgesetzt wurden. Allerdings ist die MS immer noch nicht heilbar und die klinischen Verläufe bilden ein weites Spektrum, das von einigen wenigen Schüben bis

zu schwersten neurologischen Defiziten reicht, die binnen weniger Monate zum Tod führen können (Disanto et al., 2010). Während bei dieser Erkrankung in der Vergangenheit oft die Demyelinisierung im Fokus der Forschung stand, rückt nun die Bedeutung der Neurodegeneration ins Zentrum der Aufmerksamkeit. Während sich durch immunmodulatorische Therapien die Behandlung der RRMS sehr positiv weiterentwickelt hat, ist die Behandlung der progredienten MS trotz intensiver Forschungsanstrengungen oft stark limitiert. In diesen Stadien wird das klinisch-neurologische Bild v.a. durch die irreversible Schädigung von Axonen und Neuronen bedingt, zu deren Pathophysiologie diverse Hypothesen formuliert wurden. Jedoch ist bei all diesen vorgeschlagenen Mechanismen die zentrale Bedeutung einer intrazellulären Ca^{2+} -Regulationsstörung akzeptiert. Zur Entwicklung wirksamer neuroprotektiver Therapieoptionen v.a. für die progrediente MS ist ein besseres Verständnis der intraaxonalen Ca^{2+} -Homöostase daher erforderlich.

Bereits in Vorarbeiten zu der hier vorgestellten Arbeit konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass es bei der akuten entzündlichen Schädigung von Axonen im Rahmen der EAE, dem am weitesten verbreiteten Tiermodell der MS, zu einer deutlichen Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration kommt und dass diese ein Indikator dafür ist, ob sich ein Axon im weiteren zeitlichen Verlauf von der initialen Schädigung erholen kann oder einen irreversiblen Degenerationsprozess durchläuft. Nachdem auch in unseren Experimenten die zentrale Bedeutung der intraaxonalen Ca^{2+} -Regulationsstörung bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage nach der Ursache für die beobachtete Erhöhung der intraaxonalen Ca^{2+} -Konzentration. Während sich mehrere der am häufigsten postulierten Mechanismen in unseren Versuchen nicht bestätigen ließen, vermuteten wir aufgrund der Erfahrung aus Modellen traumatischer ZNS-Schädigung (Williams et al., 2014), dass es durch die im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion produzierten reaktiven Verbindungen zu einer oxidativen Schädigung der Zellmembran kommen könnte, die auch bereits in der MS nachgewiesen werden konnte (Haider et al., 2011). Mit der Hypothese, dass diese Schädigung die Integrität der Axonmembran beeinträchtigen könnte, injizierte ich Fluoreszenzfarbstoffe, die an kleine, nicht-zellmembranpermeable Moleküle konjugiert waren, in den lumbalen Subarachnoidalraum von Mäusen. Während diese Farbstoffe in gesunden Kontrolltieren nicht in Axone aufgenommen wurden, ergab sich in akuten EAE-Läsionen eine deutliche Farbstoffaufnahme bereits in morphologisch (noch) unauffällig erscheinende Axone sowie in Axone, die bereits Zeichen der Degeneration aufwiesen. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher molekularer Größe konnte ich zeigen, dass wahrscheinlich kein Prozess mit der Bildung von Poren einer definierten Größe in der Zellmembran wie z.B. Perforin oder der MAC des Komplementsystems ur-

sächlich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ich aber noch nicht abschließend beantworten, welcher Mechanismus der Entstehung dieser Membranläsionen zugrunde liegt. Anhand der durch den Superoxidanionendonator Pyrogallol induzierbaren axonalen Farbstoffaufnahme, die sich auch durch die Behandlung mit Superoxiddismutase verhindern lässt, kann man aber vermuteten, dass diese durch eine oxidative Schädigung bedingt sein könnte.

Bei der beschriebenen axonalen Farbstoffaufnahme handelt es sich primär nur um ein Werkzeug zur Detektion von Störungen der Integrität der axonalen Zellmembran, ohne dass dieser a priori eine pathophysiologische Relevanz zugeschrieben werden kann. In einem nächsten Schritt untersuchte ich daher, ob die axonale Farbstoffaufnahme auch mit Dysregulationen des Ca^{2+} -Haushalts in den betroffenen Axonen zusammenhängt. Da ich zeigen konnte, dass Axone mit einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auch häufiger farbstoffpositiv waren als Axone mit physiologisch niedriger Ca^{2+} -Konzentration, könnten die durch die Farbstoffaufnahme nachgewiesenen Schäden der Axonmembran eine mögliche Erklärung für die Überladung von Axonen mit Ca^{2+} im Rahmen der akuten EAE darstellen. Aus diesem Zusammenhang ergeben sich möglicherweise auch neue Therapieansätze, die entweder bereits die Entstehung der Membranläsionen verhindern oder deren Reparatur beschleunigen und dadurch den Einstrom von Ca^{2+} vom Extra- in den Intrazellularraum reduzieren könnten.

Auf der Suche nach neuen neuroprotektiven Wirkstoffen für die Behandlung der MS könnte die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen in Zellkultur einen ersten Screeningtest darstellen und möglicherweise sogar einige teure und frustrane Tierexperimente überflüssig machen. So wäre es denkbar in Zellkultur von Neuronen z.B. durch oxidative Schädigung eine Farbstoffaufnahme in Zellen zu induzieren und dann mögliche Wirkstoffkandidaten auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, eine solche Farbstoffaufnahme und die aufgrund dieser vermutete Entstehung von Membranläsionen zu verhindern. In einem solchen Modell wäre es möglich, bereits frühzeitig und kostengünstig die Wirksamkeit von Substanzen zu untersuchen.

Trotz der zahlreichen Rückschläge in der MS-Forschung in den vergangenen Jahren bei der Entwicklung von neuroprotektiven Therapieansätzen gibt es immer wieder kleine Hoffnungen wie sich z.B. an der erheblichen Verbesserung der Therapieoptionen der RRMS zeigt. Allein schon mit Blick auf die knapp 200.000 an MS erkrankten Menschen in Deutschland, die sich mit einer unheilbaren, oft über mehrere Jahre dauernden, die Lebensqualität erheblich einschränkenden und in ihrem Verlauf nicht vorhersagbaren Krankheit konfrontiert sehen, ist weitere Forschung dringend geboten, um diesen Menschen vielleicht in der Zukunft ein (fast) normales Leben zu ermöglichen und ihre Lebensqualität zu verbessern.

7.) Literaturverzeichnis

- ABDUL-MAJID, K. B., JIRHOLT, J., STADELMANN, C., STEFFERL, A., KJELLEN, P., WALLSTROM, E., HOLMDAHL, R., LASSMANN, H., OLSSON, T. & HARRIS, R. A. 2000. Screening of several H-2 congenic mouse strains identified H-2(q) mice as highly susceptible to MOG-induced EAE with minimal adjuvant requirement. *J Neuroimmunol*, 111, 23-33.
- ABROMSON-LEEMAN, S., BRONSON, R., LUO, Y., BERMAN, M., LEEMAN, R., LEEMAN, J. & DORF, M. 2004. T-cell properties determine disease site, clinical presentation, and cellular pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 165, 1519-33.
- ALBRECHT, P., BOUCHACHIA, I., GOEBELS, N., HENKE, N., HOFSTETTER, H. H., ISSBERNER, A., KOVACS, Z., LEWERENZ, J., LISAK, D., MAHER, P., MAUSBERG, A. K., QUASTHOFF, K., ZIMMERMANN, C., HARTUNG, H. P. & METHNER, A. 2012. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation*, 9, 163.
- ARUN, T., TOMASSINI, V., SBARDELLA, E., DE RUITER, M. B., MATTHEWS, L., LEITE, M. I., GELINEAU-MOREL, R., CAVEY, A., VERGO, S., CRANER, M., FUGGER, L., ROVIRA, A., JENKINSON, M. & PALACE, J. 2013. Targeting ASIC1 in primary progressive multiple sclerosis: evidence of neuroprotection with amiloride. *Brain*, 136, 106-15.
- ASCHERIO, A. & MUNGER, K. L. 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, 61, 288-99.
- ASCHERIO, A., MUNGER, K. L. & LUNEMANN, J. D. 2012. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 8, 602-12.
- AURELI, M., GRASSI, S., PRIONI, S., SONNINO, S. & PRINETTI, A. 2015. Lipid membrane domains in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 1006-16.
- AXISA, P. P. & HAFLER, D. A. 2016. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. *Curr Opin Neurol*, 29, 345-53.
- BAKER, D., GERRITSEN, W., RUNDLE, J. & AMOR, S. 2011. Critical appraisal of animal models of multiple sclerosis. *Mult Scler*, 17, 647-57.
- BAR-OR, A. 2016. Multiple sclerosis and related disorders: evolving pathophysiologic insights. *Lancet Neurol*, 15, 9-11.
- BAXTER, A. G. 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*, 7, 904-12.
- BAZARGANI, N. & ATTWELL, D. 2016. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci*, 19, 182-9.
- BECHTOLD, D. A., KAPOOR, R. & SMITH, K. J. 2004. Axonal protection using flecainide in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 55, 607-16.
- BECHTOLD, D. A., MILLER, S. J., DAWSON, A. C., SUN, Y., KAPOOR, R., BERRY, D. & SMITH, K. J. 2006. Axonal protection achieved in a model of multiple sclerosis using lamotrigine. *J Neurol*, 253, 1542-51.
- BEESTON, T., SMITH, T. R., MARICIC, I., TANG, X. & KUMAR, V. 2010. Involvement of IFN-gamma and perforin, but not Fas/FasL interactions in regulatory T cell-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 229, 91-7.
- BELBASIS, L., BELLOU, V., EVANGELOU, E., IOANNIDIS, J. P. & TZOULAKI, I. 2015. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*, 14, 263-73.
- BEN-NUN, A., KAUSHANSKY, N., KAWAKAMI, N., KRISHNAMOORTHY, G., BERER, K., LIBLAU, R., HOHLFELD, R. & WEKERLE, H. 2014. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun*, 54, 33-50.
- BERG, B. M., GODBOUT, J. P., KELLEY, K. W. & JOHNSON, R. W. 2004. Alpha-tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain Behav Immun*, 18, 149-57.
- BLACK, J. A., LIU, S., HAINS, B. C., SAAB, C. Y. & WAXMAN, S. G. 2006. Long-term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE. *Brain*, 129, 3196-208.

- BLANCHARD, B., HEURTAUX, T., GARCIA, C., MOLL, N. M., CAILLAVA, C., GRANDBARBE, L., KLOSPTEIN, A., KERNINON, C., FRAH, M., COOWAR, D., BARON-VAN EVERCOOREN, A., MORGA, E., HEUSCHLING, P. & NAIT OUMESMAR, B. 2013. Tocopherol derivative TFA-12 promotes myelin repair in experimental models of multiple sclerosis. *J Neurosci*, 33, 11633-42.
- BLOOMGREN, G., RICHMAN, S., HOTERMANS, C., SUBRAMANYAM, M., GOELZ, S., NATARAJAN, A., LEE, S., PLAVINA, T., SCANLON, J. V., SANDROCK, A. & BOZIC, C. 2012. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, 366, 1870-80.
- BODINI, B., VERONESE, M., GARCIA-LORENZO, D., BATTAGLINI, M., POIRION, E., CHARDAIN, A., FREEMAN, L., LOUAPRE, C., TCHIKVILADZE, M., PAPEIX, C., DOLLE, F., ZALC, B., LUBETZKI, C., BOTTLAENDER, M., TURKHEIMER, F. & STANKOFF, B. 2016. Dynamic imaging of individual remyelination profiles in multiple sclerosis. *Ann Neurol*.
- BRAND-SCHIEBER, E. & WERNER, P. 2004. Calcium channel blockers ameliorate disease in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 189, 5-9.
- BRECKWOLDT, M. O., PFISTER, F. M., BRADLEY, P. M., MARINKOVIC, P., WILLIAMS, P. R., BRILL, M. S., PLOMER, B., SCHMALZ, A., ST CLAIR, D. K., NAUMANN, R., GRIESBECK, O., SCHWARZLANDER, M., GODINHO, L., BAREYRE, F. M., DICK, T. P., KERSCHENSTEINER, M. & MISGELD, T. 2014. Multiparametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology in vivo. *Nat Med*, 20, 555-60.
- BRINK, B. P., VEERHUIS, R., BREIJ, E. C., VAN DER VALK, P., DIJKSTRA, C. D. & BO, L. 2005. The pathology of multiple sclerosis is location-dependent: no significant complement activation is detected in purely cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64, 147-55.
- BROWNLEE, W. J., HARDY, T. A., FAZEKAS, F. & MILLER, D. H. 2017. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*, 389, 1336-1346.
- BUTTERFIELD, D. A., BADER LANGE, M. L. & SULTANA, R. 2010. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 924-9.
- BUTTERFIELD, D. A., REED, T., PERLUIGI, M., DE MARCO, C., COCCIA, R., CINI, C. & SULTANA, R. 2006. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett*, 397, 170-3.
- CARRITHERS, M. D. 2014. Update on disease-modifying treatments for multiple sclerosis. *Clin Ther*, 36, 1938-45.
- CHAN, D., BINKS, S., NICHOLAS, J. M., FROST, C., CARDOSO, M. J., OURSELIN, S., WILKIE, D., NICHOLAS, R. & CHATAWAY, J. 2017. Effect of high-dose simvastatin on cognitive, neuropsychiatric, and health-related quality-of-life measures in secondary progressive multiple sclerosis: secondary analyses from the MS-STAT randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 16, 591-600.
- CHATAWAY, J., SCHUERER, N., ALSANOUSI, A., CHAN, D., MACMANUS, D., HUNTER, K., ANDERSON, V., BANGHAM, C. R., CLEGG, S., NIELSEN, C., FOX, N. C., WILKIE, D., NICHOLAS, J. M., CALDER, V. L., GREENWOOD, J., FROST, C. & NICHOLAS, R. 2014. Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*, 383, 2213-21.
- CHOI, I. Y., LIM, J. H., KIM, C., SONG, H. Y., JU, C. & KIM, W. K. 2013. 4-hydroxy-2(E)-Nonenal facilitates NMDA-Induced Neurotoxicity via Triggering Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening and Mitochondrial Calcium Overload. *Exp Neurobiol*, 22, 200-7.
- CICCARELLI, O., BARKHOF, F., BODINI, B., DE STEFANO, N., GOLAY, X., NICOLAY, K., PELLETIER, D., POWWELS, P. J., SMITH, S. A., WHEELER-KINGSHOTT, C. A., STANKOFF, B., YOUSRY, T. & MILLER, D. H. 2014. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *Lancet Neurol*, 13, 807-22.
- CITRON, B. A., AMEENUDDIN, S., UCHIDA, K., SUO, W. Z., SANTACRUZ, K. & FESTOFF, B. W. 2016. Membrane lipid peroxidation in neurodegeneration: Role of thrombin and proteinase-activated receptor-1. *Brain Res*.
- COHEN, J. A., BARKHOF, F., COMI, G., HARTUNG, H. P., KHATRI, B. O., MONTALBAN, X., PELLETIER, J., CAPRA, R., GALLO, P., IZQUIERDO, G., TIEL-WILCK, K., DE VERA, A., JIN, J., STITES, T., WU, S.,

- ARADHYE, S., KAPPOS, L. & GROUP, T. S. 2010. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362, 402-15.
- COHEN, J. A., COLES, A. J., ARNOLD, D. L., CONFAVREUX, C., FOX, E. J., HARTUNG, H. P., HAVRDOVA, E., SELMAJ, K. W., WEINER, H. L., FISHER, E., BRINAR, V. V., GIOVANNONI, G., STOJANOVIC, M., ERTIK, B. I., LAKE, S. L., MARGOLIN, D. H., PANZARA, M. A., COMPSTON, D. A. & INVESTIGATORS, C.-M. I. 2012. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 380, 1819-28.
- COMI, G., RADAELLI, M. & SOELBERG SORENSEN, P. 2017. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Lancet*, 389, 1347-1356.
- COMPSTON, A. 1988. The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51, 1249-52.
- COMPSTON, A. & COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-17.
- CONFAVREUX, C. & VUKUSIC, S. 2014. The clinical course of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*, 122, 343-69.
- CORREALE, J. & VILLA, A. 2010. Role of CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 67, 625-38.
- COTTER, J., FIRTH, J., ENZINGER, C., KONTOPANTELIS, E., YUNG, A. R., ELLIOTT, R. & DRAKE, R. J. 2016. Social cognition in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 87, 1727-1736.
- COURT, F. A. & COLEMAN, M. P. 2012. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli. *Trends Neurosci*, 35, 364-72.
- CRETON, R., STEELE, M. E. & JAFFE, L. F. 1997. Expression of apo-aequorin during embryonic development; how much is needed for calcium imaging? *Cell Calcium*, 22, 439-46.
- CRISTE, G., TRAPP, B. & DUTTA, R. 2014. Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms. *Handb Clin Neurol*, 122, 101-13.
- DE LA HABA, C., PALACIO, J. R., MARTINEZ, P. & MORROS, A. 2013. Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 357-64.
- DENDROU, C. A., FUGGER, L. & FRIESE, M. A. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, 15, 545-58.
- DENK, W., STRICKLER, J. H. & WEBB, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 73-6.
- DIENER, H.-C. W., CHRISTIAN (HRSG.) 2012. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- DIRENBERGER, S., MUES, M., MICALE, V., WOTJAK, C. T., DIETZEL, S., SCHUBERT, M., SCHARR, A., HASSAN, S., WAHL-SCHOTT, C., BIEL, M., KRISHNAMOORTHY, G. & GRIESBECK, O. 2012. Biocompatibility of a genetically encoded calcium indicator in a transgenic mouse model. *Nat Commun*, 3, 1031.
- DISANTO, G., BERLANGA, A. J., HANDEL, A. E., PARA, A. E., BURRELL, A. M., FRIES, A., HANDUNNETHI, L., DE LUCA, G. C. & MORAHAN, J. M. 2010. Heterogeneity in multiple sclerosis: scratching the surface of a complex disease. *Autoimmune Dis*, 2011, 932351.
- DISANTO, G., MORAHAN, J. M., BARNETT, M. H., GIOVANNONI, G. & RAMAGOPALAN, S. V. 2012. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*, 78, 823-32.
- DUNKELBERGER, J. R. & SONG, W. C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20, 34-50.
- DUTTA, R., MCDONOUGH, J., CHANG, A., SWAMY, L., SIU, A., KIDD, G. J., RUDICK, R., MIRNICS, K. & TRAPP, B. D. 2007. Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients. *Brain*, 130, 2566-76.
- DUTTA, R. & TRAPP, B. D. 2007. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*, 68, S22-31; discussion S43-54.

- DZIEDZIC, T., METZ, I., DALLENGA, T., KONIG, F. B., MULLER, S., STADELMANN, C. & BRUCK, W. 2010. Wallerian degeneration: a major component of early axonal pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 20, 976-85.
- EL EUCH-FAYACHE, G., BOUHLAL, Y., AMOURI, R., FEKI, M. & HENTATI, F. 2014. Molecular, clinical and peripheral neuropathy study of Tunisian patients with ataxia with vitamin E deficiency. *Brain*, 137, 402-10.
- FAREZ, M. F., MASCANFRONI, I. D., MENDEZ-HUERGO, S. P., YESTE, A., MURUGAIYAN, G., GARO, L. P., BALBUENA AGUIRRE, M. E., PATEL, B., YSRRAELIT, M. C., ZHU, C., KUCHROO, V. K., RABINOVICH, G. A., QUINTANA, F. J. & CORREALE, J. 2015. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. *Cell*, 162, 1338-52.
- FARH, K. K., MARSON, A., ZHU, J., KLEINWIEFELD, M., HOUSLEY, W. J., BEIK, S., SHORESH, N., WHITTON, H., RYAN, R. J., SHISHKIN, A. A., HATAN, M., CARRASCO-ALFONSO, M. J., MAYER, D., LUCKEY, C. J., PATSOPOULOS, N. A., DE JAGER, P. L., KUCHROO, V. K., EPSTEIN, C. B., DALY, M. J., HAFLER, D. A. & BERNSTEIN, B. E. 2015. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, 518, 337-43.
- FEINSTEIN, A., FREEMAN, J. & LO, A. C. 2015. Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. *Lancet Neurol*, 14, 194-207.
- FENG, G., MELLOR, R. H., BERNSTEIN, M., KELLER-PECK, C., NGUYEN, Q. T., WALLACE, M., NERBONNE, J. M., LICHTMAN, J. W. & SANES, J. R. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, 28, 41-51.
- FERRETTI, G. & BACCHETTI, T. 2011. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 311, 92-7.
- FILIPPI, M. 2015. MRI measures of neurodegeneration in multiple sclerosis: implications for disability, disease monitoring, and treatment. *J Neurol*, 262, 1-6.
- FILIPPI, M., ROCCA, M. A., BARKHOF, F., BRUCK, W., CHEN, J. T., COMI, G., DELUCA, G., DE STEFANO, N., ERICKSON, B. J., EVANGELOU, N., FAZEKAS, F., GEURTS, J. J., LUCCHINETTI, C., MILLER, D. H., PELLETIER, D., POPESCU, B. F., LASSMANN, H. & ATTENDEES OF THE CORRELATION BETWEEN PATHOLOGICAL, M. R. I. F. I. M. S. W. 2012. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 11, 349-60.
- FILIPPI, M., ROCCA, M. A., CICCARELLI, O., DE STEFANO, N., EVANGELOU, N., KAPPOS, L., ROVIRA, A., SASTRE-GARRIGA, J., TINTORE, M., FREDERIKSEN, J. L., GASPERINI, C., PALACE, J., REICH, D. S., BANWELL, B., MONTALBAN, X., BARKHOF, F. & GROUP, M. S. 2016. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol*, 15, 292-303.
- FISCHER, M. T., SHARMA, R., LIM, J. L., HAIDER, L., FRISCHER, J. M., DREXHAGE, J., MAHAD, D., BRADL, M., VAN HORSSSEN, J. & LASSMANN, H. 2012. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, 135, 886-99.
- FLYNN, J. M. & MELOV, S. 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*, 62, 4-12.
- FORTE, M., GOLD, B. G., MARRACCI, G., CHAUDHARY, P., BASSO, E., JOHNSEN, D., YU, X., FOWLKES, J., RAHDER, M., STEM, K., BERNARDI, P. & BOURDETTE, D. 2007. Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7558-63.
- FOX, R. J., MILLER, D. H., PHILLIPS, J. T., HUTCHINSON, M., HAVRDOVA, E., KITA, M., YANG, M., RAGHUPATHI, K., NOVAS, M., SWEETSER, M. T., VIGLIETTA, V., DAWSON, K. T. & INVESTIGATORS, C. S. 2012. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 367, 1087-97.
- FREEDMAN, M. S., THOMPSON, E. J., DEISENHAMMER, F., GIOVANNONI, G., GRIMSLEY, G., KEIR, G., OHMAN, S., RACKE, M. K., SHARIEF, M., SINDIC, C. J., SELLEBJERG, F. & TOURTELLOTTE, W. W. 2005. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*, 62, 865-70.

- FRIESE, M. A., CRANER, M. J., ETZENSPERGER, R., VERGO, S., WEMMIE, J. A., WELSH, M. J., VINCENT, A. & FUGGER, L. 2007. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med*, 13, 1483-9.
- FRIESE, M. A., SCHATTLING, B. & FUGGER, L. 2014. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 10, 225-38.
- GARASCHUK, O., GRIESBECK, O. & KONNERTH, A. 2007. Troponin C-based biosensors: a new family of genetically encoded indicators for in vivo calcium imaging in the nervous system. *Cell Calcium*, 42, 351-61.
- GASS, A., ROCCA, M. A., AGOSTA, F., CICCARELLI, O., CHARD, D., VALSASINA, P., BROOKS, J. C., BISCHOF, A., EISELE, P., KAPPOS, L., BARKHOF, F., FILIPPI, M. & GROUP, M. S. 2015. MRI monitoring of pathological changes in the spinal cord in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 14, 443-54.
- GIANFRANCESCO, M. A., STRIDH, P., RHEAD, B., SHAO, X., XU, E., GRAVES, J. S., CHITNIS, T., WALDMAN, A., LOTZE, T., SCHREINER, T., BELMAN, A., GREENBERG, B., WEINSTOCK-GUTTMAN, B., AAEN, G., TILLEMA, J. M., HART, J., CAILLIER, S., NESS, J., HARRIS, Y., RUBIN, J., CANDEE, M., KRUPP, L., GORMAN, M., BENSON, L., RODRIGUEZ, M., MAR, S., KAHN, I., ROSE, J., ROALSTAD, S., CASPER, T. C., SHEN, L., QUACH, H., QUACH, D., HILLERT, J., BAARNHIELM, M., HEDSTROM, A., OLSSON, T., KOCKUM, I., ALFREDSSON, L., METAYER, C., SCHAEFER, C., BARCELLOS, L. F., WAUBANT, E. & NETWORK OF PEDIATRIC MULTIPLE SCLEROSIS, C. 2017. Evidence for a causal relationship between low vitamin D, high BMI, and pediatric-onset MS. *Neurology*, 88, 1623-1629.
- GOURRAUD, P. A., SDIKA, M., KHANKHANIAN, P., HENRY, R. G., BEHESHTIAN, A., MATTHEWS, P. M., HAUSER, S. L., OKSENBURG, J. R., PELLETIER, D. & BARANZINI, S. E. 2013. A genome-wide association study of brain lesion distribution in multiple sclerosis. *Brain*, 136, 1012-24.
- GOVERMAN, J., WOODS, A., LARSON, L., WEINER, L. P., HOOD, L. & ZALLER, D. M. 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, 72, 551-60.
- GREENWOOD, J., STEINMAN, L. & ZAMVIL, S. S. 2006. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*, 6, 358-70.
- GRIENBERGER, C. & KONNERTH, A. 2012. Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 73, 862-85.
- GU, J. H., GE, J. B., LI, M., XU, H. D., WU, F. & QIN, Z. H. 2013. Poloxamer 188 protects neurons against ischemia/reperfusion injury through preserving integrity of cell membranes and blood brain barrier. *PLoS One*, 8, e61641.
- HAIDER, L., FISCHER, M. T., FRISCHER, J. M., BAUER, J., HOFTBERGER, R., BOTOND, G., ESTERBAUER, H., BINDER, C. J., WITZTUM, J. L. & LASSMANN, H. 2011. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, 134, 1914-24.
- HAIJEVA, P., BAYATTI, N., GRANOLD, M., BEHL, C. & MOOSMANN, B. 2015. Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *J Neurochem*, 133, 352-67.
- HALL, A. M., THROESCH, B. T., BUCKINGHAM, S. C., MARKWARDT, S. J., PENG, Y., WANG, Q., HOFFMAN, D. A. & ROBERSON, E. D. 2015. Tau-dependent Kv4.2 depletion and dendritic hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 35, 6221-30.
- HARTUNG, D. M., BOURDETTE, D. N., AHMED, S. M. & WHITHAM, R. H. 2015. The cost of multiple sclerosis drugs in the US and the pharmaceutical industry: Too big to fail? *Neurology*, 84, 2185-92.
- HASAN, M. T., FRIEDRICH, R. W., EULER, T., LARKUM, M. E., GIESE, G., BOTH, M., DUEBEL, J., WATERS, J., BUJARD, H., GRIESBECK, O., TSIEN, R. Y., NAGAI, T., MIYAWAKI, A. & DENK, W. 2004. Functional fluorescent Ca²⁺ indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLoS Biol*, 2, e163.
- HASSEN, G. W., FELIBERTI, J., KESNER, L., STRACHER, A. & MOKHTARIAN, F. 2008. Prevention of axonal injury using calpain inhibitor in chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*, 1236, 206-15.
- HAUSER, S. L., BAR-OR, A., COMI, G., GIOVANNONI, G., HARTUNG, H. P., HEMMER, B., LUBLIN, F., MONTALBAN, X., RAMMOHAN, K. W., SELMAJ, K., TRABOULSEE, A., WOLINSKY, J. S.,

- ARNOLD, D. L., KLINGELSCMITT, G., MASTERMAN, D., FONTOURA, P., BELACHEW, S., CHIN, P., MAIRON, N., GARREN, H., KAPPOS, L., OPERA, I. & INVESTIGATORS, O. I. C. 2017. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 376, 221-234.
- HAUSER, S. L. & OKSENBURG, J. R. 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*, 52, 61-76.
- HAUSER, S. L., WAUBANT, E., ARNOLD, D. L., VOLLMER, T., ANTEL, J., FOX, R. J., BAR-OR, A., PANZARA, M., SARKAR, N., AGARWAL, S., LANGER-GOULD, A., SMITH, C. H. & GROUP, H. T. 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 358, 676-88.
- HAUSOTT, B. & KLIMASCHEWSKI, L. 2016. Membrane turnover and receptor trafficking in regenerating axons. *Eur J Neurosci*, 43, 309-17.
- HAVLA, J., KUMPFEL, T. & HOHLFELD, R. 2015. [Immunotherapies for multiple sclerosis : review and update]. *Internist (Berl)*, 56, 432-45.
- HAVLA, J., WARNKE, C., DERFUSS, T., KAPPOS, L., HARTUNG, H. P. & HOHLFELD, R. 2016. Interdisciplinary Risk Management in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Dtsch Arztebl Int*, 113, 879-886.
- HEIM, N., GARASCHUK, O., FRIEDRICH, M. W., MANK, M., MILOS, R. I., KOVALCHUK, Y., KONNERTH, A. & GRIESBECK, O. 2007. Improved calcium imaging in transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. *Nat Methods*, 4, 127-9.
- HEIM, N. & GRIESBECK, O. 2004. Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *J Biol Chem*, 279, 14280-6.
- HELMCHEN, F. & DENK, W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2, 932-40.
- HEMMER, B., KERSCHENSTEINER, M. & KORN, T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 14, 406-19.
- HENDERSON, A. P., BARNETT, M. H., PARRATT, J. D. & PRINEAS, J. W. 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*, 66, 739-53.
- HENDRY, L. & JOHN, S. 2004. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem*, 271, 4613-20.
- HENEKA, M. T., KUMMER, M. P. & LATZ, E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, 14, 463-77.
- HEYMAN, N. S. & BURT, J. M. 2008. Hindered diffusion through an aqueous pore describes invariant dye selectivity of Cx43 junctions. *Biophys J*, 94, 840-54.
- HOHLFELD, R., DORNMAIR, K., MEINL, E. & WEKERLE, H. 2015. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol*.
- HOHLFELD, R., DORNMAIR, K., MEINL, E. & WEKERLE, H. 2016. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol*, 15, 317-31.
- HOWE, C. L., ADELSON, J. D. & RODRIGUEZ, M. 2007. Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis*, 25, 354-9.
- HU, X., HOLERS, V. M., THURMAN, J. M., SCHOEB, T. R., RAMOS, T. N. & BARNUM, S. R. 2013. Therapeutic inhibition of the alternative complement pathway attenuates chronic EAE. *Mol Immunol*, 54, 302-8.
- HU, X., TOMLINSON, S. & BARNUM, S. R. 2012. Targeted inhibition of complement using complement receptor 2-conjugated inhibitors attenuates EAE. *Neurosci Lett*, 531, 35-9.
- HUBNER, C. A. & KURTH, I. 2014. Membrane-shaping disorders: a common pathway in axon degeneration. *Brain*, 137, 3109-21.
- IMAM, S. A., GUYTON, M. K., HAQUE, A., VANDENBARK, A., TYOR, W. R., RAY, S. K. & BANIK, N. L. 2007. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol*, 190, 139-45.
- INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS, C., BEECHAM, A. H., PATSOPOULOS, N. A., XIFARA, D. K., DAVIS, M. F., KEMPPINEN, A., COTSAPAS, C., SHAH, T. S., SPENCER, C., BOOTH, D., GORIS, A., OTURAI, A., SAARELA, J., FONTAINE, B., HEMMER, B., MARTIN, C., ZIPP, F.,

- D'ALFONSO, S., MARTINELLI-BONESCHI, F., TAYLOR, B., HARBO, H. F., KOCKUM, I., HILLERT, J., OLSSON, T., BAN, M., OKSENBERG, J. R., HINTZEN, R., BARCELLOS, L. F., WELLCOME TRUST CASE CONTROL, C., INTERNATIONAL, I. B. D. G. C., AGLIARDI, C., ALFREDSSON, L., ALIZADEH, M., ANDERSON, C., ANDREWS, R., SONDERGAARD, H. B., BAKER, A., BAND, G., BARANZINI, S. E., BARIZZONE, N., BARRETT, J., BELLENGUEZ, C., BERGAMASCHI, L., BERNARDINELLI, L., BERTHELE, A., BIBERACHER, V., BINDER, T. M., BLACKBURN, H., BOMFIM, I. L., BRAMBILLA, P., BROADLEY, S., BROCHET, B., BRUNDIN, L., BUCK, D., BUTZKUEVEN, H., CAILLIER, S. J., CAMU, W., CARPENTIER, W., CAVALLA, P., CELIUS, E. G., COMAN, I., COMI, G., CORRADO, L., COSEMANS, L., COURNU-REBEIX, I., CREE, B. A., CUSI, D., DAMOTTE, V., DEFER, G., DELGADO, S. R., DELOUKAS, P., DI SAPIO, A., DILTHEY, A. T., DONNELLY, P., DUBOIS, B., DUDDY, M., EDKINS, S., ELOVAARA, I., ESPOSITO, F., EVANGELOU, N., FIDDES, B., FIELD, J., FRANKE, A., FREEMAN, C., FROHLICH, I. Y., GALIMBERTI, D., GIEGER, C., GOURRAUD, P. A., GRAETZ, C., GRAHAM, A., GRUMMEL, V., GUASCHINO, C., HADJIXENOFONTOS, A., HAKONARSON, H., HALFPENNY, C., HALL, G., HALL, P., HAMSTEN, A., HARLEY, J., HARROWER, T., et al. 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*, 45, 1353-60.
- INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS, C., WELLCOME TRUST CASE CONTROL, C., SAWCER, S., HELLENTHAL, G., PIRINEN, M., SPENCER, C. C., PATSOPOULOS, N. A., MOUTSIANAS, L., DILTHEY, A., SU, Z., FREEMAN, C., HUNT, S. E., EDKINS, S., GRAY, E., BOOTH, D. R., POTTER, S. C., GORIS, A., BAND, G., OTURAI, A. B., STRANGE, A., SAARELA, J., BELLENGUEZ, C., FONTAINE, B., GILLMAN, M., HEMMER, B., GWILLIAM, R., ZIPP, F., JAYAKUMAR, A., MARTIN, R., LESLIE, S., HAWKINS, S., GIANNOULATOU, E., D'ALFONSO, S., BLACKBURN, H., MARTINELLI BONESCHI, F., LIDDLE, J., HARBO, H. F., PEREZ, M. L., SPURKLAND, A., WALLER, M. J., MYCKO, M. P., RICKETTS, M., COMABELLA, M., HAMMOND, N., KOCKUM, I., MCCANN, O. T., BAN, M., WHITTAKER, P., KEMPPINEN, A., WESTON, P., HAWKINS, C., WIDAA, S., ZAJICEK, J., DRONOV, S., ROBERTSON, N., BUMPSTEAD, S. J., BARCELLOS, L. F., RAVINDRARAJAH, R., ABRAHAM, R., ALFREDSSON, L., ARDLIE, K., AUBIN, C., BAKER, A., BAKER, K., BARANZINI, S. E., BERGAMASCHI, L., BERGAMASCHI, R., BERNSTEIN, A., BERTHELE, A., BOGGILD, M., BRADFIELD, J. P., BRASSAT, D., BROADLEY, S. A., BUCK, D., BUTZKUEVEN, H., CAPRA, R., CARROLL, W. M., CAVALLA, P., CELIUS, E. G., CEPOK, S., CHIAVACCI, R., CLERGET-DARPOUX, F., CLYSTERS, K., COMI, G., COSSBURN, M., COURNU-REBEIX, I., COX, M. B., COZEN, W., CREE, B. A., CROSS, A. H., CUSI, D., DALY, M. J., DAVIS, E., DE BAKKER, P. I., DEBOUVERIE, M., D'HOOGE M, B., DIXON, K., DOBOSI, R., DUBOIS, B., ELLINGHAUS, D., et al. 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476, 214-9.
- KALINCIK, T., BROWN, J. W. L., ROBERTSON, N., WILLIS, M., SCOLDING, N., RICE, C. M., WILKINS, A., PEARSON, O., ZIEMSEN, T., HUTCHINSON, M., MCGUIGAN, C., JOKUBAITIS, V., SPELMAN, T., HORAKOVA, D., HAVRDOVA, E., TROJANO, M., IZQUIERDO, G., LUGARES, A., PRAT, A., GIRARD, M., DUQUETTE, P., GRAMMOND, P., ALROUGHANI, R., PUCCI, E., SOLA, P., HUPPERTS, R., LECHNER-SCOTT, J., TERZI, M., VAN PESCH, V., ROZSA, C., GRAND'MAISON, F., BOZ, C., GRANELLA, F., SLEE, M., SPITALERI, D., OLASCOAGA, J., BERGAMASCHI, R., VERHEUL, F., VUCIC, S., MCCOMBE, P., HODGKINSON, S., SANCHEZ-MENOYO, J. L., AMPAPA, R., SIMO, M., CSEpany, T., RAMO, C., CRISTIANO, E., BARNETT, M., BUTZKUEVEN, H., COLES, A. & GROUP, M. S. S. 2017. Treatment effectiveness of alemtuzumab compared with natalizumab, fingolimod, and interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol*, 16, 271-281.
- KAPOOR, R., DAVIES, M., BLAKER, P. A., HALL, S. M. & SMITH, K. J. 2003. Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration. *Ann Neurol*, 53, 174-80.
- KAPOOR, R., FURBY, J., HAYTON, T., SMITH, K. J., ALTMANN, D. R., BRENNER, R., CHATAWAY, J., HUGHES, R. A. & MILLER, D. H. 2010. Lamotrigine for neuroprotection in secondary progressive multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Lancet Neurol*, 9, 681-8.

- KEEFE, D., SHI, L., FESKE, S., MASSOL, R., NAVARRO, F., KIRCHHAUSEN, T. & LIEBERMAN, J. 2005. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 23, 249-62.
- KERSCHENSTEINER, M., SCHWAB, M. E., LICHTMAN, J. W. & MISGELD, T. 2005. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med*, 11, 572-7.
- KIRBY, J., NING, K., FERRAIUOLO, L., HEATH, P. R., ISMAIL, A., KUO, S. W., VALORI, C. F., COX, L., SHARRACK, B., WHARTON, S. B., INCE, P. G., SHAW, P. J. & AZZOUZ, M. 2011. Phosphatase and tensin homologue/protein kinase B pathway linked to motor neuron survival in human superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 134, 506-17.
- KLEELE, T., MARINKOVIC, P., WILLIAMS, P. R., STERN, S., WEIGAND, E. E., ENGERER, P., NAUMANN, R., HARTMANN, J., KARL, R. M., BRADKE, F., BISHOP, D., HERMS, J., KONNERTH, A., KERSCHENSTEINER, M., GODINHO, L. & MISGELD, T. 2014. An assay to image neuronal microtubule dynamics in mice. *Nat Commun*, 5, 4827.
- KOCH-HENRIKSEN, N. & SORENSEN, P. S. 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*, 9, 520-32.
- KORN, T. & KALLIES, A. 2017. T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 17, 179-194.
- KORNEK, B., STORCH, M. K., BAUER, J., DJAMSHIDIAN, A., WEISSERT, R., WALLSTROEM, E., STEFFERL, A., ZIMPRICH, F., OLSSON, T., LININGTON, C., SCHMIDBAUER, M. & LASSMANN, H. 2001. Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 124, 1114-24.
- KREBS, J., AGELLON, L. B. & MICHALAK, M. 2015. Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 114-21.
- KURTZKE, J. F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*, 6, 382-427.
- KYRATSOS, N. I., BAUER, I. J., ZHANG, G., PESIC, M., BARTHOLOMAUS, I., MUES, M., FANG, P., WORNER, M., EVERTS, S., ELLWART, J. W., WATT, J. M., POTTER, B. V. L., HOHLFELD, R., WEKERLE, H. & KAWAKAMI, N. 2017. Visualizing context-dependent calcium signaling in encephalitogenic T cells in vivo by two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E6381-E6389.
- LANDTBLOM, A. M., FAZIO, P., FREDRIKSON, S. & GRANIERI, E. 2010. The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Este (1794-1848). *Neurol Sci*, 31, 29-33.
- LANG, H. L., JACOBSEN, H., IKEMIZU, S., ANDERSSON, C., HARLOS, K., MADSEN, L., HJORTH, P., SONDERGAARD, L., SVEJGAARD, A., WUCHERPFENNIG, K., STUART, D. I., BELL, J. I., JONES, E. Y. & FUGGER, L. 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*, 3, 940-3.
- LASSMANN, H. 2013. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 333, 1-4.
- LASSMANN, H. & BRADL, M. 2017. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133, 223-244.
- LASSMANN, H., BRUCK, W. & LUCCHINETTI, C. 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, 7, 115-21.
- LAUNAY, P., CHENG, H., SRIVATSAN, S., PENNER, R., FLEIG, A. & KINET, J. P. 2004. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*, 306, 1374-7.
- LAUNAY, P., FLEIG, A., PERRAUD, A. L., SCHARENBERG, A. M., PENNER, R. & KINET, J. P. 2002. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109, 397-407.
- LE PAGE, E., VEILLARD, D., LAPLAUD, D. A., HAMONIC, S., WARDI, R., LEBRUN, C., ZAGNOLI, F., WIERTLEWSKI, S., DEBURGHGRAEVE, V., COUSTANS, M., EDAN, G., INVESTIGATORS, C. & WEST NETWORK FOR EXCELLENCE IN, N. 2015. Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): a randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet*, 386, 974-81.

- LEUNG, G., SUN, W., ZHENG, L., BROOKES, S., TULLY, M. & SHI, R. 2011. Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. *Neuroscience*, 173, 150-5.
- LEUNG, G., TULLY, M., TANG, J., WU, S. & SHI, R. 2017. Elevated axonal membrane permeability and its correlation with motor deficits in an animal model of multiple sclerosis. *Transl Neurodegener*, 6, 5.
- LEVIN, L. I., MUNGER, K. L., O'REILLY, E. J., FALK, K. I. & ASCHERIO, A. 2010. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 67, 824-30.
- LINKER, R. A., MAURER, M., GAUPP, S., MARTINI, R., HOLTMANN, B., GIESS, R., RIECKMANN, P., LASSMANN, H., TOYKA, K. V., SENDTNER, M. & GOLD, R. 2002. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med*, 8, 620-4.
- LO, A. C., SAAB, C. Y., BLACK, J. A. & WAXMAN, S. G. 2003. Phenytoin protects spinal cord axons and preserves axonal conduction and neurological function in a model of neuroinflammation in vivo. *J Neurophysiol*, 90, 3566-71.
- LOPACHIN, R. M. & LEHNING, E. J. 1997. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*, 143, 233-44.
- LOUVEAU, A., SMIRNOV, I., KEYES, T. J., ECCLES, J. D., ROUHANI, S. J., PESKE, J. D., DERECKI, N. C., CASTLE, D., MANDELL, J. W., LEE, K. S., HARRIS, T. H. & KIPNIS, J. 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523, 337-41.
- LOVETT-RACKE, A. E. 2017. Contribution of EAE to understanding and treating multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 304, 40-42.
- LUBLIN, F., MILLER, D. H., FREEDMAN, M. S., CREE, B. A., WOLINSKY, J. S., WEINER, H., LUBETZKI, C., HARTUNG, H. P., MONTALBAN, X., UITDEHAAG, B. M., MERSCHHEMKE, M., LI, B., PUTZKI, N., LIU, F. C., HARING, D. A., KAPPOS, L. & INVESTIGATORS, I. S. 2016. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 387, 1075-84.
- LUCCHINETTI, C., BRUCK, W., PARISI, J., SCHEITHAUER, B., RODRIGUEZ, M. & LASSMANN, H. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 47, 707-17.
- MALOUITRE, S., DUBE, H., SELWOOD, D. & CROMPTON, M. 2010. Mitochondrial targeting of cyclosporin A enables selective inhibition of cyclophilin-D and enhanced cytoprotection after glucose and oxygen deprivation. *Biochem J*, 425, 137-48.
- MARKIEWSKI, M. M., NILSSON, B., EKDAHL, K. N., MOLLNES, T. E. & LAMBRIS, J. D. 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol*, 28, 184-92.
- MATHEY, E. K., DERFUSS, T., STORCH, M. K., WILLIAMS, K. R., HALES, K., WOOLLEY, D. R., AL-HAYANI, A., DAVIES, S. N., RASBAND, M. N., OLSSON, T., MOLDENHAUER, A., VELHIN, S., HOHLFELD, R., MEINL, E. & LININGTON, C. 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med*, 204, 2363-72.
- MCCARTHY, D. P., RICHARDS, M. H. & MILLER, S. D. 2012. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol*, 900, 381-401.
- MECHA, M., CARRILLO-SALINAS, F. J., MESTRE, L., FELIU, A. & GUAZA, C. 2013. Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Prog Neurobiol*, 101-102, 46-64.
- MERKLER, D., ERNSTING, T., KERSCHENSTEINER, M., BRUCK, W. & STADELMANN, C. 2006. A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain*, 129, 1972-83.
- MIKHAYLOVA, M., CLOIN, B. M., FINAN, K., VAN DEN BERG, R., TEEUW, J., KIJANKA, M. M., SOKOLOWSKI, M., KATRUKHA, E. A., MAIDORN, M., OPAZO, F., MOUTEL, S., VANTARD, M., PEREZ, F., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M., HOOGENRAAD, C. C., EWERS, H. & KAPITEIN, L. C. 2015. Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nat Commun*, 6, 7933.

- MILLER, D. H., KHAN, O. A., SHEREMATA, W. A., BLUMHARDT, L. D., RICE, G. P., LIBONATI, M. A., WILLMER-HULME, A. J., DALTON, C. M., MISZKIEL, K. A., O'CONNOR, P. W. & INTERNATIONAL NATALIZUMAB MULTIPLE SCLEROSIS TRIAL, G. 2003. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 348, 15-23.
- MISGELD, T. & KERSCHENSTEINER, M. 2006. In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 7, 449-63.
- MISGELD, T., KERSCHENSTEINER, M., BAREYRE, F. M., BURGESS, R. W. & LICHTMAN, J. W. 2007a. Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat Methods*, 4, 559-61.
- MISGELD, T., NIKIC, I. & KERSCHENSTEINER, M. 2007b. In vivo imaging of single axons in the mouse spinal cord. *Nat Protoc*, 2, 263-8.
- MIYAWAKI, A., LLOPIS, J., HEIM, R., MCCAFFERY, J. M., ADAMS, J. A., IKURA, M. & TSIEN, R. Y. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388, 882-7.
- MONTALBAN, X., HAUSER, S. L., KAPPOS, L., ARNOLD, D. L., BAR-OR, A., COMI, G., DE SEZE, J., GIOVANNONI, G., HARTUNG, H. P., HEMMER, B., LUBLIN, F., RAMMOHAN, K. W., SELMAJ, K., TRABOULSEE, A., SAUTER, A., MASTERMAN, D., FONTOURA, P., BELACHEW, S., GARREN, H., MAIRON, N., CHIN, P., WOLINSKY, J. S. & INVESTIGATORS, O. C. 2017. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 376, 209-220.
- MORSALI, D., BECHTOLD, D., LEE, W., CHAUHDURY, S., PALCHAUDHURI, U., HASSOON, P., SNELL, D. M., MALPASS, K., PIERS, T., POCOCK, J., ROACH, A. & SMITH, K. J. 2013. Safinamide and flecainide protect axons and reduce microglial activation in models of multiple sclerosis. *Brain*, 136, 1067-82.
- MULLER, D. M., PENDER, M. P. & GREER, J. M. 2000. A neuropathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant brain stem and cerebellar involvement and differences between active and passive induction. *Acta Neuropathol*, 100, 174-82.
- MULTIPLE-SCLEROSIS-STUDY-GROUP, T. 1990. Efficacy and toxicity of cyclosporine in chronic progressive multiple sclerosis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. The Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol*, 27, 591-605.
- NATAF, S., CARROLL, S. L., WETSEL, R. A., SZALAI, A. J. & BARNUM, S. R. 2000. Attenuation of experimental autoimmune demyelination in complement-deficient mice. *J Immunol*, 165, 5867-73.
- NAVE, K. A. & TRAPP, B. D. 2008. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci*, 31, 535-61.
- NEHER, E. & AUGUSTINE, G. J. 1992. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 450, 273-301.
- NEWCOMBE, J., LI, H. & CUZNER, M. L. 1994. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 20, 152-62.
- NIKIC, I., MERKLER, D., SORBARA, C., BRINKOETTER, M., KREUTZFELDT, M., BAREYRE, F. M., BRUCK, W., BISHOP, D., MISGELD, T. & KERSCHENSTEINER, M. 2011. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med*, 17, 495-9.
- NJENGA, M. K., MURRAY, P. D., MCGAVERN, D., LIN, X., DRESCHER, K. M. & RODRIGUEZ, M. 1999. Absence of spontaneous central nervous system remyelination in class II-deficient mice infected with Theiler's virus. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 78-91.
- NOVKOVIC, T., SHCHYGLO, O., GOLD, R. & MANAHAN-VAUGHAN, D. 2015. Hippocampal function is compromised in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience*, 309, 100-12.
- OLIVER, J. D., 3RD, ANDERSON, S., TROY, J. L., BRENNER, B. M. & DEEN, W. H. 1992. Determination of glomerular size-selectivity in the normal rat with Ficoll. *J Am Soc Nephrol*, 3, 214-28.
- ONTANEDA, D., FOX, R. J. & CHATAWAY, J. 2015. Clinical trials in progressive multiple sclerosis: lessons learned and future perspectives. *Lancet Neurol*, 14, 208-23.
- ONTANEDA, D., THOMPSON, A. J., FOX, R. J. & COHEN, J. A. 2017. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet*, 389, 1357-1366.

- OTTO, C., OLTMANN, A., STEIN, A., FRENZEL, K., SCHROETER, J., HABEL, P., GARTNER, B., HOFMANN, J. & RUPRECHT, K. 2011. Intrathecal EBV antibodies are part of the polyspecific immune response in multiple sclerosis. *Neurology*, 76, 1316-21.
- PARK, W. H., HAN, Y. H., KIM, S. H. & KIM, S. Z. 2007. Pyrogallol, ROS generator inhibits As4.1 juxtaglomerular cells via cell cycle arrest of G2 phase and apoptosis. *Toxicology*, 235, 130-9.
- PATRIKIOS, P., STADELMANN, C., KUTZELNIGG, A., RAUSCHKA, H., SCHMIDBAUER, M., LAURSEN, H., SORENSEN, P. S., BRUCK, W., LUCCHINETTI, C. & LASSMANN, H. 2006. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*, 129, 3165-72.
- PETERSEN, G., WITTMANN, R., ARNDT, V. & GOPFFARTH, D. 2014. [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Nervenarzt*, 85, 990-8.
- PITT, D., WERNER, P. & RAINE, C. S. 2000. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 6, 67-70.
- POLLINGER, B., KRISHNAMOORTHY, G., BERER, K., LASSMANN, H., BOSL, M. R., DUNN, R., DOMINGUES, H. S., HOLZ, A., KURSCHUS, F. C. & WEKERLE, H. 2009. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med*, 206, 1303-16.
- POLMAN, C. H., O'CONNOR, P. W., HAVRDOVA, E., HUTCHINSON, M., KAPPOS, L., MILLER, D. H., PHILLIPS, J. T., LUBLIN, F. D., GIOVANNONI, G., WAJGT, A., TOAL, M., LYNN, F., PANZARA, M. A., SANDROCK, A. W. & INVESTIGATORS, A. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354, 899-910.
- POLMAN, C. H., REINGOLD, S. C., BANWELL, B., CLANET, M., COHEN, J. A., FILIPPI, M., FUJIHARA, K., HAVRDOVA, E., HUTCHINSON, M., KAPPOS, L., LUBLIN, F. D., MONTALBAN, X., O'CONNOR, P., SANDBERG-WOLLHEIM, M., THOMPSON, A. J., WAUBANT, E., WEINSHENKER, B. & WOLINSKY, J. S. 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69, 292-302.
- QUINN, P. J. & CHAPMAN, D. 1980. The dynamics of membrane structure. *CRC Crit Rev Biochem*, 8, 1-117.
- RAFTOPOULOS, R., HICKMAN, S. J., TOOSY, A., SHARRACK, B., MALLIK, S., PALING, D., ALTMANN, D. R., YIANNAKAS, M. C., MALLADI, P., SHERIDAN, R., SARRIGIANNIS, P. G., HOGGARD, N., KOLTZENBURG, M., GANDINI WHEELER-KINGSHOTT, C. A., SCHMIERER, K., GIOVANNONI, G., MILLER, D. H. & KAPOOR, R. 2016. Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*, 15, 259-69.
- RAO, R. D., BAGARIA, V. B. & COOLEY, B. C. 2007. Posterolateral intertransverse lumbar fusion in a mouse model: surgical anatomy and operative technique. *Spine J*, 7, 61-7.
- REINDL, M., DI PAULI, F., ROSTASY, K. & BERGER, T. 2013. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat Rev Neurol*, 9, 455-61.
- RICE, C. M., KEMP, K., WILKINS, A. & SCOLDING, N. J. 2013. Cell therapy for multiple sclerosis: an evolving concept with implications for other neurodegenerative diseases. *Lancet*, 382, 1204-13.
- RICKLIN, D., HAJISHENGALLIS, G., YANG, K. & LAMBRIS, J. D. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11, 785-97.
- RIVERS, T. M. & SCHWENTKER, F. F. 1935. Encephalomyelitis Accompanied by Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. *J Exp Med*, 61, 689-702.
- ROSSI, S., DE CHIARA, V., FURLAN, R., MUSELLA, A., CAVASINNI, F., MUZIO, L., BERNARDI, G., MARTINO, G. & CENTONZE, D. 2010. Abnormal activity of the Na/Ca exchanger enhances glutamate transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, 24, 1379-85.
- ROVIRA, A., WATTJES, M. P., TINTORE, M., TUR, C., YOUSRY, T. A., SORMANI, M. P., DE STEFANO, N., FILIPPI, M., AUGER, C., ROCCA, M. A., BARKHOF, F., FAZEKAS, F., KAPPOS, L., POLMAN, C., MILLER, D., MONTALBAN, X. & GROUP, M. S. 2015. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol*, 11, 471-82.

- RUSSELL, J. T. 2011. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 163, 1605-25.
- SAWCER, S., FRANKLIN, R. J. & BAN, M. 2014. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol*, 13, 700-9.
- SCALFARI, A., KNAPPERTZ, V., CUTTER, G., GOODIN, D. S., ASHTON, R. & EBERS, G. C. 2013. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 81, 184-92.
- SCHATTLING, B., STEINBACH, K., THIES, E., KRUSE, M., MENIGOZ, A., UFER, F., FLOCKERZI, V., BRUCK, W., PONGS, O., VENNEKENS, R., KNEUSSEL, M., FREICHEL, M., MERKLER, D. & FRIESE, M. A. 2012. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med*, 18, 1805-11.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. & CARDONA, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
- SCHMEER, C., KRETZ, A. & ISENMANN, S. 2006. Statin-mediated protective effects in the central nervous system: general mechanisms and putative role of stress proteins. *Restor Neurol Neurosci*, 24, 79-95.
- SCHOFIELD, B. R., SCHOFIELD, R. M., SORENSEN, K. A. & MOTTS, S. D. 2007. On the use of retrograde tracers for identification of axon collaterals with multiple fluorescent retrograde tracers. *Neuroscience*, 146, 773-83.
- SCHWABE, T., BAINTON, R. J., FETTER, R. D., HEBERLEIN, U. & GAUL, U. 2005. GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in drosophila. *Cell*, 123, 133-44.
- SCOLDING, N., FRANKLIN, R., STEVENS, S., HELDIN, C. H., COMPSTON, A. & NEWCOMBE, J. 1998. Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain*, 121 (Pt 12), 2221-8.
- SEILER, A., SCHNEIDER, M., FORSTER, H., ROTH, S., WIRTH, E. K., CULMSEE, C., PLESNILA, N., KREMMER, E., RADMARK, O., WURST, W., BORNKAMM, G. W., SCHWEIZER, U. & CONRAD, M. 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 8, 237-48.
- SENS, P. & PLASTINO, J. 2015. Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. *J Phys Condens Matter*, 27, 273103.
- SHI, R. & BORGES, R. B. 2000. Anatomical repair of nerve membranes in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol. *J Neurocytol*, 29, 633-43.
- SHI, Y., FENG, Y., KANG, J., LIU, C., LI, Z., LI, D., CAO, W., QIU, J., GUO, Z., BI, E., ZANG, L., LU, C., ZHANG, J. Z. & PEI, G. 2007. Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol*, 8, 817-24.
- SHIELDS, D. C., SCHAECHER, K. E., SAIDO, T. C. & BANIK, N. L. 1999. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11486-91.
- SHIN, O. H. 2014. Exocytosis and synaptic vesicle function. *Compr Physiol*, 4, 149-75.
- SIMON, C. M., SHARIF, S., TAN, R. P. & LAPLACA, M. C. 2009. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma*, 26, 563-74.
- SISKOVA, Z., JUSTUS, D., KANEKO, H., FRIEDRICH, D., HENNEBERG, N., BEUTEL, T., PITSCH, J., SCHOCH, S., BECKER, A., VON DER KAMMER, H. & REMY, S. 2014. Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 84, 1023-33.
- SOLOMON, A. J., BOURDETTE, D. N., CROSS, A. H., APPLEBEE, A., SKIDD, P. M., HOWARD, D. B., SPAIN, R. I., CAMERON, M. H., KIM, E., MASS, M. K., YADAV, V., WHITHAM, R. H., LONGBRAKE, E. E., NAISMITH, R. T., WU, G. F., PARKS, B. J., WINGERCHUK, D. M., RABIN, B. L., TOLEDANO, M., TOBIN, W. O., KANTARCI, O. H., CARTER, J. L., KEEGAN, B. M. & WEINSHENKER, B. G. 2016. The contemporary spectrum of multiple sclerosis misdiagnosis: A multicenter study. *Neurology*, 87, 1393-9.
- SORBARA, C. D., WAGNER, N. E., LADWIG, A., NIKIC, I., MERKLER, D., KLEELE, T., MARINKOVIC, P., NAUMANN, R., GODINHO, L., BAREYRE, F. M., BISHOP, D., MISGELD, T. & KERSCHENSTEINER,

- M. 2014. Pervasive axonal transport deficits in multiple sclerosis models. *Neuron*, 84, 1183-90.
- STANGEL, M., FREDRIKSON, S., MEINL, E., PETZOLD, A., STUVE, O. & TUMANI, H. 2013. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 9, 267-76.
- STEENWIJK, M. D., GEURTS, J. J., DAAMS, M., TIJMS, B. M., WINK, A. M., BALK, L. J., TEWARIE, P. K., UITDEHAAG, B. M., BARKHOF, F., VRENKEN, H. & POUWELS, P. J. 2016. Cortical atrophy patterns in multiple sclerosis are non-random and clinically relevant. *Brain*, 139, 115-26.
- STIRLING, D. P. & STYS, P. K. 2010. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol Med*, 16, 160-70.
- STOSIEK, C., GARASCHUK, O., HOLTTHOFF, K. & KONNERTH, A. 2003. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7319-24.
- STROMNES, I. M. & GOVERMAN, J. M. 2006. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1, 1952-60.
- STYS, P. K., ZAMPONI, G. W., VAN MINNEN, J. & GEURTS, J. J. 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*, 13, 507-14.
- TANTAMA, M., MARTINEZ-FRANCOIS, J. R., MONGEON, R. & YELLEN, G. 2013. Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat Commun*, 4, 2550.
- TAO, C., SIMPSON, S., JR., VAN DER MEI, I., BLIZZARD, L., HAVRDOVA, E., HORAKOVA, D., SHAYGANNEJAD, V., LUGARESI, A., IZQUIERDO, G., TROJANO, M., DUQUETTE, P., GIRARD, M., GRAND'MAISON, F., GRAMMOND, P., ALROUGHANI, R., TERZI, M., OREJA-GUEVARA, C., SAJEDI, S. A., IULIANO, G., SOLA, P., LECHNER-SCOTT, J., PESCH, V. V., PUCCI, E., BERGAMASCHI, R., BARNETT, M., RAMO, C., SINGHAL, B., D, L. A. S., SLEE, M., VERHEUL, F., FERNANDEZ BOLANOS, R., AMATO, M. P., CRISTIANO, E., GRANELLA, F., HODGKINSON, S., FIOLE, M., GRAY, O., MCCOMBE, P., SALADINO, M. L., SANCHEZ MENOYO, J. L., SHUEY, N., VUCIC, S., SHAW, C., DERI, N., ARRUDA, W. O., BUTZKUEVEN, H., SPELMAN, T., TAYLOR, B. V. & GROUP, M. S. S. 2016. Higher latitude is significantly associated with an earlier age of disease onset in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 87, 1343-1349.
- THESTRUP, T., LITZLBAUER, J., BARTHOLOMAUS, I., MUES, M., RUSSO, L., DANA, H., KOVALCHUK, Y., LIANG, Y., KALAMAKIS, G., LAUKAT, Y., BECKER, S., WITTE, G., GEIGER, A., ALLEN, T., ROME, L. C., CHEN, T. W., KIM, D. S., GARASCHUK, O., GRIESINGER, C. & GRIESBECK, O. 2014. Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods*, 11, 175-82.
- THIERY, J., KEEFE, D., BOULANT, S., BOUCROT, E., WALCH, M., MARTINVALET, D., GOPING, I. S., BLEACKLEY, R. C., KIRCHHAUSEN, T. & LIEBERMAN, J. 2011. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol*, 12, 770-7.
- TRAGER, N., SMITH, A., WALLACE IV, G., AZUMA, M., INOUE, J., BEESON, C., HAQUE, A. & BANIK, N. L. 2014. Effects of a novel orally administered calpain inhibitor SNJ-1945 on immunomodulation and neurodegeneration in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurochem*, 130, 268-79.
- TRAPP, B. D., PETERSON, J., RANSOHOFF, R. M., RUDICK, R., MORK, S. & BO, L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 338, 278-85.
- TRAPP, B. D. & STYS, P. K. 2009. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 8, 280-91.
- TUCK, E. & CAVALLI, V. 2010. Roles of membrane trafficking in nerve repair and regeneration. *Commun Integr Biol*, 3, 209-14.
- USTIONE, A. & PISTON, D. W. 2011. A simple introduction to multiphoton microscopy. *J Microsc*, 243, 221-6.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.

- VAN DEN BERG, R., HOOGENRAAD, C. C. & HINTZEN, R. Q. 2017. Axonal transport deficits in multiple sclerosis: spiraling into the abyss. *Acta Neuropathol*, 134, 1-14.
- VAN DER MOST, P. J., DOLGA, A. M., NIJHOLT, I. M., LUITEN, P. G. & EISEL, U. L. 2009. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol*, 88, 64-75.
- VAN HORSSSEN, J., WITTE, M. E., SCHREIBELT, G. & DE VRIES, H. E. 2011. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 141-50.
- VERGO, S., CRANER, M. J., ETZENSPERGER, R., ATTFIELD, K., FRIESE, M. A., NEWCOMBE, J., ESIRI, M. & FUGGER, L. 2011. Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain*, 134, 571-84.
- VERKHRATSKY, A. J. & PETERSEN, O. H. 1998. Neuronal calcium stores. *Cell Calcium*, 24, 333-43.
- VESTERINEN, H. M., SENA, E. S., FFRENCH-CONSTANT, C., WILLIAMS, A., CHANDRAN, S. & MACLEOD, M. R. 2010. Improving the translational hit of experimental treatments in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 16, 1044-55.
- WAGNER, K. H., KAMAL-ELDIN, A. & ELMADFA, I. 2004. Gamma-tocopherol--an underestimated vitamin? *Ann Nutr Metab*, 48, 169-88.
- WANG, B. G., KONIG, K. & HALBHUBER, K. J. 2010. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *J Microsc*, 238, 1-20.
- WANG, J., XIAO, Y., LUO, M. & LUO, H. 2011. Statins for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008386.
- WEINSHENKER, B. G., O'BRIEN, P. C., PETTERSON, T. M., NOSEWORTHY, J. H., LUCCHINETTI, C. F., DODICK, D. W., PINEDA, A. A., STEVENS, L. N. & RODRIGUEZ, M. 1999. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol*, 46, 878-86.
- WEISFELD-ADAMS, J. D., KATZ SAND, I. B., HONCE, J. M. & LUBLIN, F. D. 2015. Differential diagnosis of Mendelian and mitochondrial disorders in patients with suspected multiple sclerosis. *Brain*, 138, 517-39.
- WEKERLE, H. 2017. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 50, 57-60.
- WILKINS, A. & SCOLDING, N. 2008. Protecting axons in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 14, 1013-25.
- WILLIAMS, P. R., MARINCU, B. N., SORBARA, C. D., MAHLER, C. F., SCHUMACHER, A. M., GRIESBECK, O., KERSCHENSTEINER, M. & MISGELD, T. 2014. A recoverable state of axon injury persists for hours after spinal cord contusion in vivo. *Nat Commun*, 5, 5683.
- WILLIS, S. N., STADELMANN, C., RODIG, S. J., CARON, T., GATTENLOEHNER, S., MALLOZZI, S. S., ROUGHAN, J. E., ALMENDINGER, S. E., BLEWETT, M. M., BRUCK, W., HAFLER, D. A. & O'CONNOR, K. C. 2009. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain*, 132, 3318-28.
- WITTE, M. E., MAHAD, D. J., LASSMANN, H. & VAN HORSSSEN, J. 2014. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Trends Mol Med*, 20, 179-87.
- WU, K. L., CHAN, S. H. & CHAN, J. Y. 2012. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. *J Neuroinflammation*, 9, 212.
- YEAGLE, P. L. 1989. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J*, 3, 1833-42.
- YEDNOCK, T. A., CANNON, C., FRITZ, L. C., SANCHEZ-MADRID, F., STEINMAN, L. & KARIN, N. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356, 63-6.
- ZHANG, Y., BONNAN, A., BONY, G., FERZOU, I., PIETROPAOLO, S., GINGER, M., SANS, N., ROSSIER, J., OOSTRA, B., LEMASSON, G. & FRICK, A. 2014. Dendritic channelopathies contribute to neocortical and sensory hyperexcitability in Fmr1(-/y) mice. *Nat Neurosci*, 17, 1701-9.

8.) Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem gesamten bisherigen Lebensweg mit Rat und mentaler Unterstützung begleitet, unterstützt und optimal gefördert haben.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner für die exzellente Betreuung bedanken. Neben den zahlreichen inhaltlichen Hilfestellungen war v.a. seine großartige zwischenmenschliche Art ein großer Ansporn für mich. Seine Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen habe ich während der gesamten Arbeit als große Motivation empfunden.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitgliedern des Labors von Prof. Kerschensteiner für die gute und angenehme Zusammenarbeit bedanken; insbesondere aber bei Christoph Mahler für seine hilfreichen inhaltlichen Anregungen sowohl in der täglichen Laborarbeit und beim Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit als auch für seinen freundschaftlichen Umgang. Hervorheben möchte ich außerdem Maarten Witte und Adrian-Minh Schumacher für die enge, offene und anregende Zusammenarbeit an diesem Projekt.

Abschließend gilt mein Dank auch der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mich finanziell und ideell im Rahmen des FÖFOLE-Programms bei der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt hat.

9.) Eidesstattliche Versicherung:

Bewersdorf, Jan Philipp

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Disseratation mit dem Thema

„*In vivo* Mechanismen des axonalen Kalziueinstroms im Tiermodell der Multiplen Sklerose“

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

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

München, 03.09.2017

Ort, Datum

Jan Philipp Bewersdorf

Unterschrift Doktorand