

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

**Halbautomatisierter Algorithmus zur In-Vivo-Analyse von Mikroglia
in Retinae von CX3CR1^{GFP}-Mäuse mittels konfokaler Scanning-Laser-
Opthalmoskopie (cSLO) bei experimenteller Autoimmuner
Encephalomyelitis (EAE)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. theol. Moritz Johannes Frenger BA

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Sandra König

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Philipp Albrecht

Zweitgutachter: PD Dr. Markus Butz

Meinem verstorbenem Großvater Peter Frenger
in Verehrung und Dankbarkeit zugeeignet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

M. J. Frenger, C. Hecker, M. Sindi, A. Issberger, H.-P. Hartung, S. G. Meuth, M. Dietrich and P. Albrecht,

Semi-Automated Live Tracking of Microglial Activation in CX3CR1GFP Mice During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy. Front. Immunol. 12, 761776 (2021)

Zusammenfassung

Die Bedeutung mikroglialer Aktivierung als ein Aspekt in der Pathogenese von Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) ist zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Mehrere präklinische Studien haben gezeigt, dass eine gezielte Bekämpfung der infiltrierenden, von Monozyten stammenden Zellen in der akuten Phase den Schweregrad der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS), erheblich verringert. Dabei werden den ansässigen Mikroglia sowohl schädliche als auch positive Wirkungen zugeschrieben.

Die konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (cSLO) ist eine nicht-invasive Technik zur Echtzeit-bildgebung der Netzhaut. In dieser Arbeit haben wir einen halbautomatischen Algorithmus entwickelt, der cSLO-Bilder verwendet, um myeloische Zellen in CX3C-chemokine-receptor-1-grün-fluoreszierenden-Protein-Mäusen (CX3CR1-GFP-Mäusen) zu bewerten. Die Tiere exprimieren grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter Kontrolle des endogenen CX3C-Chemokinrezeptor-1-Locus. Wir identifizierten cSLO-Parameter, die es uns ermöglichten, Tiere mit experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) von scheinbehandelten und unbehandelten Tieren zu unterscheiden. Die Zellzahl (CC) und die Gesamtfläche der Mikroglia (SuA) erwiesen sich hierfür als zuverlässige Parameter. Beim Vergleich der cSLO-Ergebnisse mit klinischen Parametern fanden wir signifikante Korrelationen zwischen dem klinischen EAE-Score und der SuA. Darüber hinaus zeigten sich Korrelationen zwischen der mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) gemessenen Dicke der inneren Netzhautschicht und der CC sowie der SuA. In einem letzten Schritt führten wir eine immunhistochemische Untersuchung durch, um zu bestätigen, dass die GFP-exprimierenden Zellen, die mit dem cSLO sichtbar gemacht wurden, Iba1-positiv sind, und validierten den Algorithmus durch manuelle Zählung.

Wir präsentieren einen halbautomatischen Algorithmus, der ein Gleichgewicht zwischen schneller Datenauswertung und angemessener Genauigkeit bietet, da der Untersucher die Möglichkeit hat, den Kontrastschwellenwert manuell anzupassen. Dies kann für zahlreiche Forschungsfragen zur Rolle der Mikroglia-Aktivierung in Modellen von entzündlichen und degenerativen ZNS-Erkrankungen mit Beteiligung der Netzhaut nützlich sein.

Summary

The importance of microglial activation as an aspect in the pathogenesis of central nervous system (CNS) diseases has increasingly moved in the focus of interest. Several preclinical studies have demonstrated that targeting the infiltrating monocyte-derived cells during the acute phase substantially reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) while both detrimental and beneficial effects have been attributed to the resident microglia.

Confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO) is a non-invasive technique for real-time imaging of the retina. In this work, we developed a semi-automatic algorithm using cSLO images to evaluate myeloid cells in CX3CR1^{GFP} mice, expressing green fluorescent protein (GFP) under control of the endogenous CX3C chemokine receptor 1 locus. We identified cSLO parameters allowing us to distinguish animals with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) from sham-treated and naïve animals, while particularly cell count (CC) and total microglial area (SuA) turned out to be reliable parameters. Comparing the cSLO results with clinical parameters, we found significant correlations between the clinical EAE score and the SuA and between the inner retinal layer thickness, measured by optical coherence tomography, and the CC as well as SuA. As a final step, we performed immunohistochemistry to confirm that the GFP-expressing cells visualized by the cSLO are Iba1 positive and validated the algorithm by manual counting.

We present a semi-automatic algorithm with a balance between fast data evaluation and adequate accuracy due to the option for manual adaption of the contrast threshold by the observer. This may be useful for numerous research questions on the role of microglial activation in models of inflammatory and degenerating CNS diseases involving the retina.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Klinik	1
1.1.2 Verlaufsformen und Epidemiologie der MS	2
1.1.3 Diagnostik.....	3
1.1.4 Pathologie.....	4
1.1.5 Therapie.....	5
1.1.6 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und Mikroglia in der MS- Forschung	7
1.1.6.1 Mikroglia als Teil des angeborenen Immunsystems des ZNS.....	8
1.1.6.2 Mikroglia im MS-Modell der EAE	8
1.1.6.3 OCT	9
1.1.6.4 cSLO	11
1.2 Tierversuchsanträge	12
1.3 Ziele der Arbeit	12
2. Frenger et al. 2021. <i>Semi-Automated Live Tracking of Microglial Activation in CX3CR1GFP Mice During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy.</i> Front. Immunol. 12, 761776.....	13
3. Diskussion.....	24
3.1 Methodendiskussion	24
3.1.1 Monitoring der funktionellen Beeinträchtigung per Optomotorischer Reaktion (OMR)	24
3.1.2 Semiautomatisch versus vollautomatisch.....	25
3.1.3 Notwendigkeit einer Einbeziehung von weiteren Tierstämmen und MS-Modellen	26
3.2 Ergebnisdiskussion	27
3.2.1 Einfluss von Körperwachstum auf mikrogliale Aktivierung.....	27
3.2.2 Diskontinuierliche Abnahme von TRT und IRL bei MOG-Tieren	27
3.2.3 Residente Mikroglia oder infiltrierende Monozyten?	28
3.3 Schlussfolgerung und Ausblick	29
4. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	30

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsprinzip der OCT	S. 8
Abbildung 2: Generierung eines dreidimensionalen OCT-Bildes	S. 8
Abbildung 3: Funktionsprinzip der cSLO	S. 9

Abkürzungsverzeichnis

BSP: Strahlenteiler

CC: Zellzahl

cSLO: konfokale Scanning-laser-Ophthalmoskopie

CX3CR-1^{GFP}-Mäuse : CX3C-chemokine-receptor-1-grün-fluoreszierenden-Protein-Mäusen

DIS: Dissemination im Raum

DIT: Dissemination in der Zeit

EDSS: Expanded Disability Status Scale

EAE: Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

IRL: inneren Retinenschichtdicke

KIS: klinisch isoliertes Syndrom

MOG: Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein

MS: Multiple Sklerose

OCT: Optische Kohärenztomographie

ON: Opticus Neuritis

PPMS: primär chronisch progredienten MS

RRMS: schubförmig remittierende MS

SPMS: sekundär chronisch progrediente MS

SuA: Mikrogliagesamtfläche

TRT: totale Retinaschichtdicke

ZNS: Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Im Gegensatz zu anderen neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise der Epilepsie finden sich für die Multiple Sklerose (MS), eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) (1), erst relativ spät historische Belege, was unter anderem an dem vielseitigen klinischen Erscheinungsbild der Krankheit liegen könnte. Erst Anfang des 19. Jahrhunderts liegen in den Tagebüchern eines Cousins der Königin Viktoria von England, Augustus D'Este (1794-1848), konkrete autobiographische Quellen als Zeugen für eine MS vor. Relativ zeitgleich aber unabhängig voneinander beschrieben der britische Pathologe Sir Robert Carswell (1793-1857) und sein französischer Kollege Jean Cruveilhier (1791-1874) "graue Degeneration in Hirnstamm, Rückenmark und Kleinhirn", ohne allerdings eine Verbindung zwischen klinischer Präsentation der Betroffenen und pathologischem Korrelat zu ziehen (2). Eine Zusammenschau von Klinik und Pathologie gelang dem französischen Neurologen und Pathologen Jean-Marie Charcot (1825-1893), der unter der Bezeichnung "Sclérose en Plaques" vor Ärzten des Pariser Hospitals "Salpêtrière" 1877 den Symptomkomplex aus skandierender Sprache, Intentionstremor und Nystagmus als Spezifikum des MS beschrieb, der als "Charcot Trias" in die Lehrbücher einging (3, 4).

1.1.1 Klinik

Nur ca. 15 % der an MS-Erkrankten präsentieren allerdings diese klinischen Symptome aus dem Formenkreis des Kleinhirns, weshalb die beschriebene Trias eher auf das Betroffensein von Kleinhirnstrukturen anstatt spezifisch auf die MS hindeutet (5). Da die MS grundsätzlich alle zentralnervösen Strukturen befallen kann, ist ihr klinisches Bild entsprechend vielseitig, worauf ihr Beiname "Krankheit der tausend Gesichter" hindeutet (6, 7). Statistisch oft und damit für die MS typisch zeigen sich Frühsymptome der MS, die auf das Betroffensein des Hirnstamms, des Rückenmarks oder des einseitigen Befalls des Nervus Opticus zurückgehen (8, 9). Neben den bereits thematisierten zerebellaren Symptomen wie Dysarthrie, Ataxie und Intentionstremor können als Erstmanifestationen der MS motorische Störungen wie eine Mono- oder Hemiparese, Sensibilitätsstörungen wie Dys- oder Hypästhesien oder Blasenstörungen auftreten (10). Geistige und körperlich gesteigerte Ermüdbarkeit, die in einem überproportionalen Verhältnis zur geleisteten Arbeit stehen werden unter dem Schlagwort der Fatigue zusammengefasst, die das häufigste Frühsymptom einer MS darstellt und laut Befragungen von MS-Patienten diese am stärksten in ihrem Alltagsleben einschränken (11). Daneben manifestiert sich die MS wie bereits erwähnt häufig beim Sehen: Sowohl Doppeltsehen (12) als auch vorübergehende Sehstörungen auf einem Auge mit begleitendem intraorbitalem Schmerz, wie durch die Opticus Neuritis (ON) beschrieben, sind hier zu nennen. Die ON ist so eng mit der MS verbunden, dass von einer "typischen" ON gesprochen wird, wenn die Sehbeschwerden auf eine MS zurückzuführen sind, wohingegen andere Ursachen wie Neurolmyelitis optica oder vaskulitische Erkrankungen als "atypische" ON deklariert werden (13).

Von den Frühsymptomen der MS ist die spätere Klinik im Krankheitsverlauf zu unterscheiden, bei der Blasenstörungen und Fatigue weiterhin präsenzte Erscheinungsformen darstellen, Spastik, sexuelle Dysfunktion und Einschränkungen der Gehfähigkeit allerdings stärker in den Vordergrund rücken.

Dies spiegelt sich beispielsweise in den Instrumenten zur Beurteilung der Verlaufsform der MS wider. Zwar berücksichtigt der von Kurtzke 1983 etablierte "Expanded Disability Status Scale" (EDSS) (14) mehrere funktionelle neurologische Systeme, setzt jedoch einen klaren Fokus auf die Gehfähigkeit zur Beurteilung des Voranschreitens der MS (15). Dieser Zentrierung des EDSS auf die Gehfähigkeit zur Bewertung des Krankheitsprogresses versuchen zahlreiche alternative Bewertungsskalen zu begegnen. Beispielhaft ist hier der "Multiple Sclerosis Functional Composite" zu nennen, der klinische Symptome der voranschreitenden MS breiter berücksichtigt und dessen genaue Items bis heute Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion sind (16).

1.1.2 Verlaufsformen und Epidemiologie der MS

Die im Vorangegangenen geschilderte Klinik der MS manifestiert sich zeitlich in mehr oder weniger deutlich voneinander abgrenzbaren Verlaufsformen, weshalb die National Multiple Sclerosis Society 1996 die Unterscheidung von vier verschiedene Formen vorschlug, von denen heute überwiegend drei verwendet werden (10, 12, 15, 17–19):

- a) Mit gut 80 % stellt die "schubförmig remittierende MS" (**RRMS**) die häufigste Verlaufsform dar. Sie bricht typischerweise zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr das erste Mal aus und ist gekennzeichnet durch voneinander abgrenzbare *Schüben* mit *vollständiger Remission* der Krankheitsaktivität zwischen den Schüben.
- b) Etwa 10 % der MS-Patienten weisen eine *stetige klinische Progredienz ohne Remission* der Symptome und *ohne schubförmige* Krankheitsepisoden auf. Interessanterweise sind diese Patienten meist älter - die Erstmanifestation einer "primär chronisch progredienten MS" (**PPMS**) liegt um das 40. Lebensjahr.
- c) Deutlich mehr als die Hälfte der RRMS Patienten (ca. 60 %) geht innerhalb von ungefähr 15 Jahren in die "sekundär chronisch progrediente MS" (**SPMS**) über, bei der sich die Krankheitsbetroffenheit nicht mehr zurückbildet.

Von den drei Verlaufsformen, bei denen das Grundleiden der MS bereits diagnostisch gesichert ist, muss das "klinisch isolierte Syndrom" (**KIS**) unterschieden werden. Bei ihm weisen Patienten typische Frühsymptome einer MS auf, ohne allerdings die McDonald-Kriterien in ihrer Gänze zu erfüllen (s. "Diagnostik").

Die klinische Unterscheidung zwischen den beschriebenen Verlaufsformen ist nicht immer einfach. Auch bei SPMS-Patienten können Läsionen wie bei der RRMS via Schädel-MRT nachgewiesen und überlagerte klinische Schübe manifest werden, was für das Ineinandergreifen der verschiedenen Formen anstatt ihrer strengen Trennung spricht (12). Dennoch hat sich die klinische Unterscheidung der Verlaufsformen bewährt. Sie ermöglicht eine Kategorisierung von Forschung und klinischem Alltag und entfaltet Konsequenzen bis auf therapeutische Ebene.

Beispielhaft hierfür ist die SPMS zu nennen, für die eine weitere Untergliederung in eine SPMS-Form aktuell mit und eine Form aktuell ohne Schübe empfohlen wird (19, 20). Während die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie für die SPMS mit Schüben die Indikation für eine therapeutische Intervention stellen, soll laut derselben für die SPMS ohne Schübe keine Basistherapie erfolgen

(19). Dies hat unter anderem den Hintergrund, dass bei Schüben im späteren Verlauf einer MS wahrscheinlich vor allem Mikroglia ursächlich aktiv ist, weshalb insbesondere Basistherapeutika verwendet werden sollen, die einen Einfluss auf Mikroglia entfalten (21–24). Näheres hierzu in den Kapiteln zur Pathologie der MS, Therapie der MS und zur Bedeutung von Mikroglia in EAE und MS (s. 1.1.4, 1.1.5, 1.1.6.1 und 1.1.6.2).

Unberührt davon stellt die MS in Nordamerika und Europa die häufigste Ursache für nichttraumatische Behinderung bei jungen Erwachsenen dar, wodurch sich ihre immense Bedeutung erklärt (4, 12, 25). Mit Ausnahme der sekundär SPMS tritt die MS bei Frauen in einem Verhältnis von 3:1 gegenüber den Männern auf, wohingegen das Verhältnis bei der SPMS mit leichter Überbetonung des männlichen Geschlechts einhergeht (10, 12, 17, 18, 25).

1.1.3 Diagnostik

Um eine spezifische Verlaufsform der MS abgrenzen zu können, muss zuerst die Diagnose der MS an sich gestellt werden. In der Diagnosestellung der MS haben sich die Prinzipien der "Dissemination in der Zeit" (DIT) sowie der "Dissemination im Raum" (DIS) gepaart mit der zusätzlichen Forderung nach einem Ausschluss von Differenzialdiagnosen einer MS seit der ersten Bestimmung von MS-Diagnosekriterien in den Schumacher-Kriterien etabliert und über die Poser- bis hin zu den aktuell geltenden McDonald-Kriterien in der Fassung von 2017 erhalten (6, 8–10, 20, 26). Grundsätzlich kann demnach die Diagnose einer MS gestellt werden, wenn ein Pat. zu *zwei* verschiedenen *Zeitpunkten* Symptome bietet, die mit einer MS vereinbar sind (*DIT*), wenn sich darüber hinaus in der Bildgebung via MRT an *zwei unterschiedlichen aber für die MS typischen Stellen* im Gehirn Läsionen finden (*DIS*) und wenn sich keine klinischen oder diagnostischen Hinweiszeichen auf das Vorliegen einer anderen Erkrankung ergeben, die die aktuelle Klinik eines Patienten besser erklärt als eine MS.

Aus der aktuellsten von Thompson et al. überarbeiteten Version der McDonald-Kriterien 2017 ergeben sich Möglichkeiten, eine MS-Diagnose auch dann zu stellen, wenn entweder nur zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ms-typische Symptome objektivierbar (*DIT*) oder nur in der Bildgebung zwei typische MS-Läsionen an verschiedenen MS-typischen Orten detektierbar sind (*DIS*) (9, 20):

a) Ist die *DIT* gegeben, kann die Erfüllung der *DIS* erreicht werden, wenn sich in der Schädel-MRT Läsionen in der T2-Sequenz an mindestens 2 der 4 typischen MS-Läsionsorten zeigen, also entweder (juxta-)kortikal, periventrikulär, infratentoriell oder spinal. Alternativ dazu können die 2 verschiedenen Läsionsorte auch ohne Bildgebung indirekt über die Klinik erschlossen werden, wenn beispielsweise ein Patient eine intranukleäre Ophthalmoplegie und eine unilaterale Visusminderung bietet.

b) Ist die *DIS* gegeben, kann die Erfüllung der *DIT* erreicht werden, wenn sich in der Schädel MRT in der T1-Sequenz hypointense ältere Läsionen und hyperintense frische kontrastmittelaufnehmende Läsionen an den oben benannten typischen Lokalisationen zeigen oder in einem zweiten Schädel-MRT in der T2-Sequenz eine im Vergleich zur ersten MRT neue Läsion zu sehen ist. Wieder kann über die klinische Präsentation allein ohne Bildgebung die *DIT* indirekt erfüllt werden, beispielhaft durch ein zweites ms-typisches klinisches Ereignis, welches mindestens 30 Tage Abstand zu einer vorangegangenen Präsentation zeigt. Alternativ reicht ergänzend zu einer Schädel-MRT mit ms-typischem Befund der Nachweis von im Liquor isoliert vorliegenden oligoklonalen Banden aus.

c) Sind DIS und DIT erfüllt, muss allerdings noch das Vorliegen von *Differentialdiagnosen* ausgeschlossen werden, welche die klinische Symptomatik und Bildgebung eines möglichen MS-Patienten besser erklären könnten. So wird von vielen Autoren darauf hingewiesen, dass beispielsweise das Krankheitsbild der akuten disseminierten Enzephalomyelitis ebenso entzündliche Läsionen in der magnetographischen Bildgebung hervorbringen kann wie auch Erkrankungen aus dem neuromyelitis-optica-Spektrum, weshalb bei entzündlichen Läsionen in der Bildgebung nicht automatisch auf die Diagnose einer MS verfallen werden darf. Auch Migräne, die noch dazu eine im Vergleich zur Normalbevölkerung höhere Prävalenz im Kollektiv der MS-Patienten aufweist, kann T2-Hyperintensitäten in der Schädel-Bildgebung bewirken (26–28). Diesen Herausforderungen versuchen die Diagnosekriterien nach McDonald 2017 auf zweifache Weise zu begegnen. Einerseits wird empfohlen, die McDonald-Kriterien nur auf typisch-klinische Präsentationen der MS anzuwenden und auf eine Anwendung bei atypischer Klinik wie z. B. episodischem Erblinden auf beiden Augen, Kopfschmerz und Areflexie zu verzichten (20, 27). Andererseits wird der Wert paraklinischer Untersuchung wie durch motorisch -, sensorisch - und visuell evozierte Potenziale, Liquorpunktion, Labor-diagnostik und optischer Kohärenztomographie betont. Durch sie können anamnestische Angaben des Patienten bzgl. potenzieller MS-Manifestationen in der Vergangenheit teilweise bestätigt und damit in ihrer Aussagekraft gestärkt werden. Darüber hinaus ermöglicht es die Umfelddiagnostik, mögliche differenzialdiagnostische Hinweiszeichen wahrzunehmen und in die Überlegungen einzubeziehen. (20)

Neben der Beschränkung der McDonald Kriterien auf typisch klinische Präsentationen der MS ist auch ihr Adressatenkreis beschränkt. Unter 11 Jahren gelingt es den Kriterien nicht suffizient, eine Unterscheidung der MS zu eher pädiatrischen Erkrankungen wie der akuten demyelinisierenden Enzephalomyelitis zu leisten, über 60 Jahre sorgen vor allem mit vasosklerotischen Veränderungen einhergehende Veränderungen der MRT-Bildgebung zu einer erschwerten Anwendbarkeit der McDonald-Kriterien. Erschwerend kommt der Umstand hinzu, dass die Kriterien vor allem aus Daten eines nordamerikanisch-europäischen Kollektivs heraus entwickelt wurden, sodass MS-Erscheinungen in nicht kaukasischen Bevölkerungen nicht adäquat reflektiert werden (20, 26, 29).

1.1.4 Pathologie

Bis heute ist die Pathogenese der MS nicht bis ins Detail verstanden. Es herrscht jedoch ein weitgehender Konsens über immunologische Aspekte vor, die zur Entstehung der MS beitragen. Sie sollen im Folgenden skizziert werden:

Ausgelöst durch ein aktuell noch nicht aufgeklärtes Zusammenspiel multipler intrinsischer (z. B. genetische Varianten) und extrinsischer (z. B. EBV-Infektionen, Vitamin D-Mangel etc.) Ursachen kommt es im menschlichen Körper zu einer autoreaktiven Aktivierung peripherer Immunzellen wie CD8⁺-T-Zellen, TH-17-Zellen und CD4⁺-T-Zellen. Diese immigrieren über meningeale Gefäße oder Plexus-choroideus-Strukturen über die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke und greifen körpereigene Strukturen des ZNS an (7, 12, 18, 30–33). Flankiert wird der Prozess der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen von einem Untergewicht immunhemmender Komponenten des Immunsystems, wobei sowohl ein quantitativer Mangel an T-Reg-Zellen als auch deren Missfunktion aufgrund einer neu entwickelten Resistenz von autoreaktiven T-Zellen diskutiert wird (7, 18). In den Prozess der Entstehung von Auto-

reaktivität sind essentiell auch B-Zellen eingebunden, welche durch Antigenpräsentation erst die Ausgangslage für T-Zell-Proliferation bieten und darüber hinaus durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine einen autoreaktiven Prozess unterhalten und verstärken (34). Jenseits der Blut-Hirn-Schranke spielt im ZNS darüber hinaus angeborene Mikroglia eine wichtige wenn auch in ihrem Detail nicht vollständig verstandene Rolle für den Progress der MS. So wirkt Mikroglia kontextabhängig einerseits ZNS-protectiv, indem Neuronenerholung über Phagozytose abgestorbener Zellen oder Modulation von synaptischen Verbindungen gefördert wird, andererseits ZNS-destruktiv über die Regulation von Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung zugunsten zusätzlicher Rekrutierung von Makrophagen und Lymphozyten, die einen vorhandenen autoimmunen Entzündungsprozess des ZNS verstärken (21, 22, 30, 35–37). Insbesondere im späteren Verlauf der MS wird Mikroglia ein entscheidender Beitrag zu klinischem Progress oder auch schubfreiem Voranschreiten der Erkrankung zugeschrieben (21, 23), wobei der genaue Beitrag bisher nicht im Detail verstanden ist. Unter anderem deswegen setzten wir uns in dieser Arbeit das Ziel, durch die Etablierung einer Methodik zum Live-Tracking von Mikroglia in der EAE einen Beitrag zu leisten, um die differenzierte Rolle von mikroglialer Aktivierung im Prozess der MS besser zu verstehen.

Alles in allem kommt es durch die beschriebenen Prozesse zu einer Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die über eine Schädigung von Mitochondrien zu Proteinfehlfaltungen im Endoplasmatischen Reticulum und einem allgemein herabgesetzten Energielevel von neuronalen Zellen führen (7, 38–40). Weiterhin wirken Makrophagen und T-Zellen destruktiv über Antikörper und die Aktivierung des Komplementsystems an der Oberfläche von Neuronen (18). Somit kommt es im Laufe der MS zuerst zu einem temporären Verlust von Oligodendrozyten, der als Plaquesbildung mikroskopisch imponiert und konsekutiv zu einem axonalen Verlust mit anschließender Hirnatrophie (7).

1.1.5 Therapie

Bei der medikamentösen Therapie der MS muss grundlegend zwischen zwei Interventionsszenarien unterschieden werden: Auf der einen Seite gilt es, das akute Schubereignis einer MS zu behandeln, auf der anderen Seite ihren chronischen Verlauf mittels Immunmodulation günstig zu beeinflussen (6, 10, 13, 17–19). Im Folgenden sollen beide Strategien skizziert werden.

In der Schubtherapie muss zuerst ein MS-Schub von möglich alternativen Ereignissen wie beispielsweise einem Pseudoschub abgegrenzt werden. Ein Schub liegt demnach vor, wenn eine neu aufgetretene MS-typische Klinik 24 Stunden am Stück besteht, 30 Tage Abstand zu einer davon differenten ms-verdächtigen körperlichen Manifestation aufweist und nicht durch eine Erhöhung der Körpertemperatur erklärt werden kann, wie sie beispielsweise durch Sport, warme Bäder oder einen Infekt bewirkt wird ("Uhthoff-Phänomen"). Sind die Bedingungen erfüllt, kommt als Erstlinientherapie die Behandlung mit 1 g Methylprednisolon über 3-5 Tagen unter Beachtung kortisontypischer Nebenwirkungen wie Schlafstörungen, Stimmungsschwankungen, erhöhte Blutzucker-, Thrombozyten- und Blutdruckwerte sowie Ödembildung zum Einsatz (41). Bei Erfolglosigkeit im Sinne einer mangelnden Regression der initialen Symptomatik kann die Erhöhung der Cortisonstoßdosis oder die Anwendung weiterer Verfahren wie die Plasmapherese bzw. Immunabsorption erwogen werden (6, 10, 17, 19, 41). Durch die Schubtherapie können akute Verschlechterungen des Zustandes eines MS-Patienten abgemindert oder sogar vollständig regredient gestaltet werden. Verbesserungen von Langzeitbe-

hinderung, die pathologisch weniger durch akute Entzündungsprozesse als durch axonale Degeneration bewirkt wird, ist von der geschilderten Schubtherapie allerdings nicht in signifikantem Maß zu erwarten (19).

Auf dem Feld der Modulation insbesondere des adaptiven Immunsystems steht mittlerweile dank der intensiven Forschungsarbeiten des letzten Jahrzehnts eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen zur Verfügung, wobei sich ihre Anwendung an der konkreten klinischen Verlaufsform der MS orientiert (6, 17, 19, 42, 43). Im Weiteren sollen kurz die Therapiestrategien für die jeweiligen Verlaufsformen kurz erläutert werden. Für detaillierte Informationen zu den einzelnen immunmodulatorischen Medikamenten sei auf entsprechende Fachliteratur verwiesen (6, 14, 17, 19, 41–45).

Bei der Behandlung der *RRMS* und des *KIS* kann entsprechend der deutschen Leitlinien zur Therapie der Multiplen Sklerose auf ein dreistufiges Konzept von immunmodulatorischen Substanzen zurückgegriffen werden, wobei der jeweils höheren Stufe ein größerer Effekt auf die Reduktion einer Schubrate zugeschrieben wird. Stufe 1 (Beta-Interferone, Dimethylfumarat, Glatimeracetat, Teriflunomid) wird eine 30-50 %ige Reduktion der MS-Schubrate im Vergleich zu einem Placebo zugesprochen, Stufe 2 (Cladrigin, Fingolimod, Ozanimod) eine 50-60 %ige Reduktionsrate, Stufe 3 (Ocrelizumab, Natalizumab, Alemtuzumab) eine größer 60 %ige Rate (19). Ist eine *RRMS* nach den McDonald-Kriterien bestätigt, herrscht Einigkeit über die Empfehlung, eine immunmodulatorische Therapie zu beginnen. Ob diese allerdings mit vergleichsweise schwachen aber dafür nebenwirkungsärmeren Substanzen aus Stufe 1 gestartet und bei neu auftretendem Schub im Sinne eines Wechsels zu einer höheren Stufe modifiziert werden soll ("Eskalationsansatz") oder ob sofort in einer höheren Medikamentenstufe begonnen werden soll ("Hit-hard-and-early-Ansatz") ist bisher noch nicht abschließend beantwortet. Grund für die Differenz in den Therapieansätzen ist das Dilemma, dass es zwar retrospektive Studien gibt, die für einen langfristigen Nutzen einer frühen verschärften Immunmodulation sprechen, dass aber ebenso verlässliche Daten vorliegen, welche auf das lebenslange Vorhandensein von nur leichten Verlaufsformen der MS hinweisen (19, 45). Während eine Tendenz zu einem Hit-hard-and-early-Ansatz an spezialisierten MS-Zentren zu beobachten ist, hängt die endgültige Klärung von den Ergebnissen zukünftiger prospektiver Studien zu der strittigen Fragestellung ab. Bei Hinweiszeichen auf einen zukünftig hochaktiven Verlauf einer MS, wie z. B. unvollständiger Rückbildung von Schubsymptomen nach Stoßtherapie, hoher Schubfrequenz oder Beteiligung von Pyramidenbahnen empfiehlt die Leitlinie allerdings heute schon den Beginn einer immunmodulatorischen Therapie mit Substanzen aus Stufe 2 und 3 (19).

Eine Dreigliederung von Medikamenten findet sich bei den Behandlungsschemata für die *SPMS* nicht. Vielmehr stellt sich die Frage nach einer *SPMS* mit oder ohne Schüben als essentielles Kriterium für die Entscheidung über eine medikamentöse Intervention (19). Bei einem *SPMS*-Verlauf mit Schüben können mehrere Medikamente (Beta-Interferon, Siponimod, Ocrelizumab) zulassungsgerecht zur Anwendung kommen. Es fällt auf, dass gerade in der späten Phase der MS Medikamente stärker in den Fokus rücken, die mindestens einen indirekten Einfluss auf Mikroglia haben (23). Dies hängt mit der essentiellen Bedeutung von Mikroglia vor allem für den späten Krankheitsverlauf der MS ab, bei dem die Bedeutung von T-Zell- oder Monozyteninvasion an Bedeutung verliert. Am deutlichsten zeigt sich dieser Fokus für Siponimod, das über die Blockade des Sphingosin1-P-Rezeptors direkt auf Mikroglia Einfluss nehmen kann, die diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Neuerdings werden darüber hinaus Brutokinase-Inhibitoren in den späten Krankheitsverläufen der MS als therapeutische Option erprobt, die B-Zell-Aktivierung blockieren, darüber hinaus aber auch Mikrogliaaktivierung beeinflussen (22–24).

Fehlt eine Krankheitsaktivität hingegen, existiert zum aktuellen Zeitpunkt keine zugelassenen medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten für die SPMS, was den dringenden Forschungsbedarf in diesem Bereich offenbart. Darüber hinaus entwickelt sich die SPMS aus der RRMS, sodass der Fall gegeben ist, dass meistens schon eine immunologische Basistherapie eingenommen wird. Bei einer Modifizierung der vorbestehenden Medikation gilt es dabei besonders, spezifische Eigenschaften von Substanzen unter Abwägung der klinischen Konstellation zu berücksichtigen. So wären Natalizumab beispielsweise beim Übergang in die SPMS zu ersetzen. Da sein Absetzen allerdings mit einer erhöhten Reboundwahrscheinlichkeit der Krankheitsaktivität einhergeht, muss dieser Schritt sorgfältig evaluiert werden (19, 45).

Auch für einen Auslassversuch einer medikamentösen Behandlung gilt die Notwendigkeit des Abwägens von Nutzen und Risiken. Laut Leitlinie kann er erwogen werden, wenn der Patient schon vor der medikamentösen Therapie eine geringe Krankheitsaktivität aufwies und unter Behandlung mit Immunmodulatoren der Kategorie 1 mindestens fünf Jahre schubfrei ist. Zu anderen Konstellationen äußert sich die deutsche Leitlinie hingegen nicht (19).

1.1.6 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und Mikroglia in der MS-Forschung

Der oben genannte Fortschritt in der Therapie der MS durch Immunmodulation wurde durch intensive Forschung erreicht, die neben in-vitro nicht zuletzt auch das Feld tierexperimenteller Forschung einbezog und weiterhin einbezieht. Von besonderem Interesse ist hierbei die EAE, die als autoimmun entzündliches Modell pathologische Prozesse, wie sie sich auch in der MS ereignen, im Tiermodell greifbar macht. Zurecht wurde darauf hingewiesen, dass die Tier-EAE als monophasischer Krankheitsverlauf mit einem Schwerpunkt auf der Entzündung des Rückenmarks vornehmlich verursacht durch CD4⁺-T-Zellen entscheidende Unterschiede zu dem Verlauf der MS beim Menschen aufweist, der schubförmig vor allem mit Schwerpunkt von CD8⁺-T-Zellen das ZNS befällt (7, 30, 46). Ebenso unbestritten sind allerdings auch die praktischen Erfolge in der Entwicklung von Medikamenten wie Natalizumab und Glatirameracetat, die in der EAE erprobt und evaluiert wurden, sodass der Erfolg der Methode ihre Rechtmäßigkeit in der MS-Forschung bestätigt. Am Ende bildet die EAE bestimmte ausgewählte pathogenetische Aspekte der MS ab (47). Weitere Aspekte kommen in alternativen MS-Tiermodelle zur Darstellung (s. 3.1.3). In Übereinstimmung mit bereits etablierten Zugängen in der MS-Forschung nutzt auch diese Arbeit die durch Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein Fragment 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) induzierte ON als Zugangsfenster zu dem Prozess von Entzündung, Demyelinisierung und Neurodegeneration des gesamten ZNS (48). Dafür kommen nach der EAE-Induktion per MOG die Methoden der optischen Kohärenztomographie (OCT) und der konfokale Scanning-laser-Ophthalmoskopie (cSLO) zum Einsatz, um den zeitlichen Verlauf der EAE über die Veränderung der Retina eines EAE-Versuchstier zu monitoren. Beide Techniken werden im Weiteren knapp erläutert. Vorher soll die Bedeutung von Mikroglia im ZNS im Allgemeinen und in der EAE im Speziellen thematisiert werden, zumal wir in dieser Arbeit speziell die Möglichkeit untersuchten, mikrogliale Aktivierung in der EAE in Echtzeit zu monitoren und in ihrer Dynamik zu quantifizieren.

1.1.6.1 Mikroglia als Teil des angeborenen Immunsystems des ZNS

Mikroglia als Teil des angeborenen Immunsystems des Menschen bezeichnet spezifische im ZNS ansässige Immunzellen, die während der Embryogenese aus dem embryonalen Dottersack hervorgehen und von dort in den Neuronenschlauch einwandern (21, 23, 30, 36, 37, 49). Histologisch imponieren diese Zellen durch ihre verzweigte Struktur, wobei beispielsweise bei Eindringen von Bakterien oder anderen körperfremden Entitäten ihre Transformation zu einer amöbenartigen Struktur mit konsekutiver Polarisierung hin zu dem entsprechenden Fremdkörper zu beobachten ist (30, 50–52). Allerdings besteht die Funktion von Mikroglia nicht allein in der Protektion gegen äußere Fremdkörper. Vielmehr kommt Mikroglia eine komplexe Bedeutung zu, die sie über Regulation von Zytokinmilieus einerseits und Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies andererseits sowohl in pro- und antiinflammatorischer aber auch regulatorischer Weise in der Entwicklung und Homöostase des ZNS erfüllt (21, 35, 53).

Für die homöostatische Funktion ist exemplarisch die Sekretion von Insulin-like growth factors durch Mikroglia zu nennen, durch die unter anderem die fünfte kortikale Schicht des ZNS erhalten wird. Ein Beispiel für eine antiinflammatorische Funktion ist der Prozess der Phagozytose abgestorbener Zellen beispielsweise nach einem inflammatorischen Prozess oder im Rahmen von Wachstum des ZNS. Neuronales Wachstum erfährt durch mikrogliale Aktivität darüber hinaus Unterstützung, indem Mikroglia über Sekretion von Proteinen Synapsenbildung und -modulierung unterstützen (36, 37).

Auf der anderen Seite nimmt Mikroglia eine wichtige immunologisch-inflammatorische Funktion im ZNS wahr. Durch Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid-Radikalen werden als fremd erkannte Entitäten bekämpft (21, 38, 40), über die Regulation von Zytokinleveln Makrophagen aus dem peripheren Blutsystem rekrutiert (54, 55) und darüber hinaus T-Zellen über Antigenpräsentation in ihrer Transformation unterstützt (21, 37).

Zusammenfassend kommt Mikroglia als Teil des gesamten Immunsystems eine ausdifferenzierte Bedeutung innerhalb des ZNS zu. Dies zeigt sich unter anderem im Verlauf der EAE, in der Mikroglia ganz unterschiedliche Effekte zugeschrieben werden.

1.1.6.2 Mikroglia im MS-Modell der EAE

Durch cSLO-Echtzeitbildgebung flankierte Transkriptionsanalysen während eines EAE-Verlaufs zeigen zwei Anstiege von mikroglialen Clustern: Ein erster zu Beginn der klinischen Symptome der EAE und später im Verlauf ca. 60 Tage nach MOG-Immunisierung bei bereits nachlassender klinischer Symptomatik (22, 53). Über die Analyse von Zytokinprofilen kann gezeigt werden, dass die Mikroglia des ersten Peaks proinflammatorisch wirkt wohingegen die zweite mikrogliale Aktivierung eher antiinflammatorisch in den EAE-Prozess einzuordnen ist. Auch wenn die Zuordnung nicht streng dichotom sondern eher als vorübergehende Manifestationsformen von Mikroglia zu verstehen ist, hat sich in der wissenschaftlichen Debatte das Bild etabliert von einer proinflammatorischen M1-Antwort der Mikroglia zu Beginn und von einer antiinflammatorischen M2-Antwort im späteren Verlauf (21–23, 30, 56).

Aus diesen Erkenntnissen heraus wird der Verlauf der EAE wie folgt charakterisiert: Im Anschluss an eine MOG-Immunisierung kommt es in der Peripherie zu einer Aktivierung von T-Zellen wohingegen sich im ZNS eine M1-Antwort residenter Mikroglia auf den MOG-Stimulus im Sinne einer proinflam-

matorischen Reaktion ausbildet. Auch wenn das genaue Zusammenspiel von peripherem und zentralem Reagieren auf die Immunisierung noch nicht hinreichend geklärt ist, kommt es im weiteren Verlauf der EAE zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und zu einer konsekutiven Invasion von T-Zellen aber auch peripherer Monozyten in das ZNS. Letztere werden vor allem von einem veränderten Zytokinniveau angezogen, auf das Mikroglia einen entscheidenden Einfluss hat. Im Laufe der Zeit vollzieht sich nach einer ausgeprägten autoimmunologischen Reaktion seitens T-Zellen, Mikroglia und Makrophagen, die beispielsweise über die Freisetzung von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmonoxid-Spezies zu einer Zellschädigung des ZNS führen, ein Wandel innerhalb des Profils mikroglialer Zellen hin zu einer M2-Antwort. Bei dieser übt Mikroglia wiederum über die Beeinflussung von Zytokinleveln antiinflammatorische Funktionen aus und trägt über Phagozytose zur Regeneration des ZNS bei. Während Mikroglia ständig im Gehirn präsent sind, lässt die Zahl der aus der Blutbahn immigrierten Makrophagen mit der Zeit nach (22, 36, 39, 53–55, 57). Auch wenn eine Echtzeitunterscheidung von Makrophagen und Mikroglia nicht ohne weiteres möglich ist (s. 3.2.3), lässt sich die Dynamik myeloider Zellen im EAE-Prozess per konfokaler Scanning-laser-Ophthalmoskopie (cSLO) nachvollziehen und ihre Auswirkungen auf die Schichten der Retina in der optischen Kohärenztomographie (OCT) studieren. Im Folgenden sollen beider Verfahren näher erläutert werden.

1.1.6.3OCT

Die OCT nutzt prinzipiell den Sachverhalt, dass biologisches Gewebe einfallendes Licht auf eine für das Gewebe einmalige Weise an seiner Oberfläche bricht und reflektiert. Diese somit spezielle Reflektion wird mit einer genormten Referenzreflektion überlagert, wodurch ihre Spezifität quantifizierbar und in ein zweidimensionales Bild übertragbar wird. Aus diesem zweidimensionalen Bild lassen sich beispielsweise einzelne Retinaschichten einer Mausabgrenzen und ihre spezielle Dicke bestimmen.

Die für den skizzierten Vorgang benötigte Referenzgröße wird in der technischen Anordnung des Michelson-Interferometers realisiert: Hier wird das von einer Diode ausgestrahlte infrarote Licht kurzer Kohärenz (s. "Broad bandwidth source" in Abbildung 1) durch einen Spiegel zu 50 % in einen Referenz- (s. "A" in Abbildung 1) und zu 50 % in einen Messarm (s. "B" in Abbildung 1) geteilt. Während das Licht des Referenzarmes auf einen genormten Referenzspiegel trifft, wird das Licht des Messarms auf das zu untersuchende Objekt (z. B. eine Mausretina) gegeben. Beide Lichtstrahlen werden jeweils reflektiert. Wie jedoch oben erwähnt bricht das zu untersuchende Objekt das Licht des Messarms aufgrund seiner mikrobiologischen Beschaffenheit auf spezifische Weise und es kommt zu einer Wellenlängendifferenz und damit zu einem Unterschied zwischen dem reflektierten Licht von Referenz- und Messarm. Werden beide Lichtarme anschließend wieder zusammengeführt und in einer Interferenz überlagert (s. "C" in Abbildung 1), hat sich das ursprüngliche von der Diode ausgesandte Lichtfeld aufgrund Verstärkung oder Auslöschung bestimmter Bereiche des Feldes verändert. Aus der Veränderung können Amplitude und Zeitverzögerung des Lichtes detektiert und mit diesen Parametern auf die Beschaffenheit des Probegewebes des Messarmes zurückgeschlossen werden (58–60).

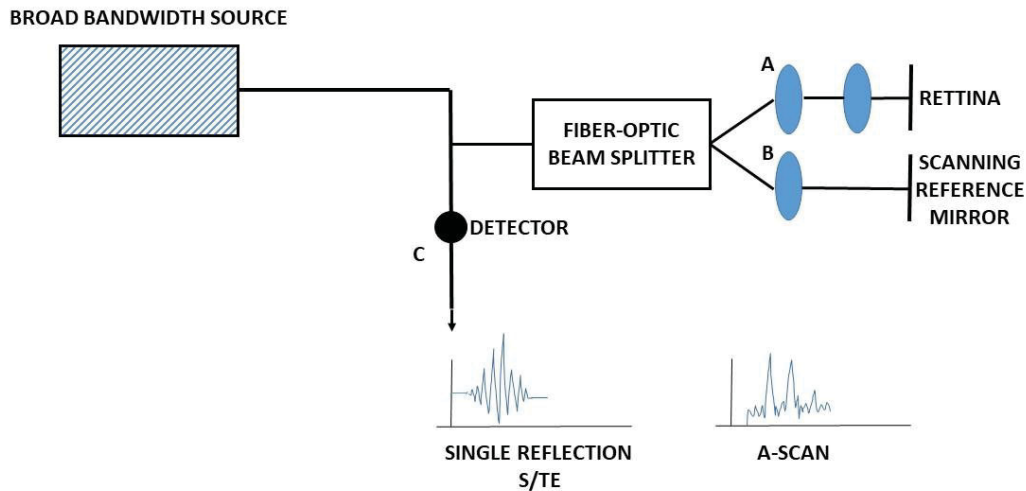


Abbildung 1.: Funktionsprinzip der OCT (vgl. Hogg et al. 2006 - modifiziert durch M. J. Frenger). Das von einer Diode ausgestrahlte infrarote Licht wird über einen Spiegel in einen Mess- (A) und einen Referenzarm (B) aufgeteilt. Nachdem beide Strahlen aufgrund der spezifischen Beschaffenheit ihrer Zielobjekte unterschiedliche Wellenlängen aufweisen, werden sie über einen Detektor zusammengeführt und überlagert (C).

Die Ergebnisse hieraus werden in Bilder transformiert: Drückt der axiale Scan (A-Scan) die spezifische Reflektion des Lichts des Probearms aus, so bilden eine Reihe von A-Scans mit unterschiedlichen transversalen Positionen einen zweidimensionalen B-Scan. Mehrere zweidimensionale B-Scans nach Art einer Rasterabtastung aneinandergefügt ergeben dann letztendlich ein dreidimensionales OCT-Bild. (58)

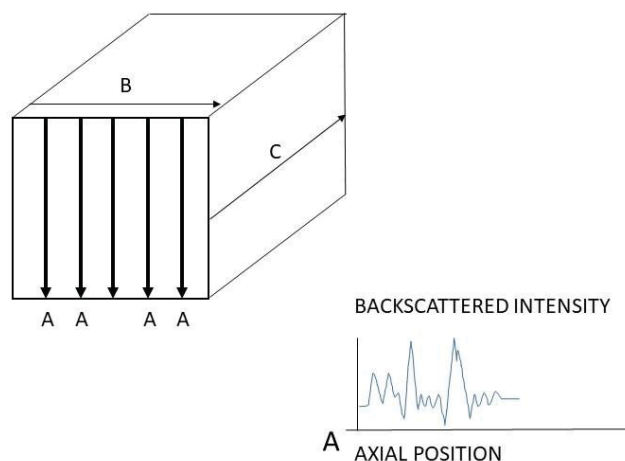


Abbildung 2: Generierung eines dreidimensionalen OCT-Bildes. Durch transversale Ausrichtung von A-Scans wird aus eindimensionalen Bildern in ein zweidimensionales Bild erschaffen (B). Durch Zusammenfügung der zweidimensionalen Bilder nach Art einer Rasterabtastung eines Objekts entsteht schließlich ein dreidimensionales Bild (C).

1.1.6.4 cSLO

Weiterhin leiteten wir neben Retinaeschichtdicken Auflichtbilder von denselben Retinae per cSLO ab. Zum besseren Verständnis der cSLO wird im Folgenden zuerst deren Prinzip anhand des Wegs des Lasers in der cSLO von seiner Quelle bis zum Detektor als Endpunkt der Bilderzeugung nachverfolgt.

Von einer Laserquelle(s. "A" in Abbildung 3) tritt der Laser durch einen Strahlenteiler (BSP) in eine Scannereinheit, die zwei synchronisierte oszillierende Spiegel enthält (s. "B" in Abbildung 3), welche die Oberfläche eines zu untersuchenden Objektes (s. "C" in Abbildung 3) systematisch abtasten. Ein Spiegel realisiert die horizontale schnelle Ablenkung des Lasers (x-Achse) auf dem zu untersuchenden Objekt, der andere die vertikale Zeilenverschiebung (y-Achse). Die Eindringtiefe in das Untersuchungsobjekt kann darüber hinaus in gewissem Umfang durch ein Teleskop bestimmt werden, das zwischen das Objekt und den beschriebenen Scanspiegel eingebracht ist.

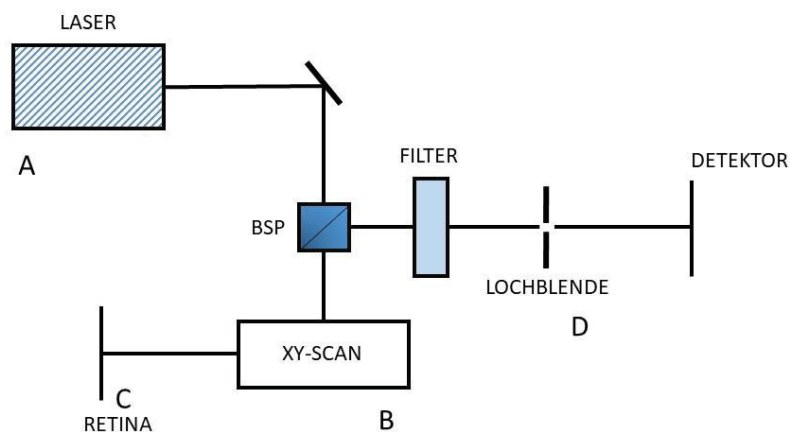


Abbildung 3: Funktionsprinzip der cSLO (vgl. Dithmar et al. 2008 - modifiziert durch M. J. Frenger). Von einer Laserquelle (A) tritt der Laser durch einen Strahlenteiler (BSP) in eine Scannereinheit, die zwei synchronisierte oszillierende Spiegel enthält (B), die die Oberfläche eines zu untersuchenden Objektes (C) systematisch abtasten. Ein Spiegel realisiert die horizontale schnelle Ablenkung des Lasers (x-Achse) auf dem zu untersuchenden Objekt, der andere die vertikale Zeilenverschiebung (y-Achse). Das emittierte Licht wird zurück über den BSP und die Lochblende (D) rotgefiltert dem Detektor zugeführt.

Trifft der Laser nun beim Abtasten der Mausretina auf ein Fluoreszenzmolekül, wie es von der Mikroglia der CX3C-chemokine-receptor-1-grün-fluoreszierenden-Protein-Mäusen (CX3CR-1^{GFP}) exprimiert wird, wird dieses durch Photonen in einen höheren elektronischen Zustand gebracht und emittiert beim Rückgang in seinen elektronischen Grundzustand Lichtquanten, deren Wellenlänge grünverschoben ist.

Das emittierte Licht wird zurück über den BSP durch einen Filter, der nur rotverschobene Wellenlängen passieren lässt, in den Detektionsarm der cSLO überführt. In diesem ist die Kombination von Fokuslinse und Lochblende entscheidend, die der Scanning-Laser-Ophthalmologie den Namen "konfokal" verleiht: Die Lochblende kurz vor dem Detektor (s. "D" in Abbildung 3) befindet sich genau in der Brennweite der Fokuslinse und lässt damit nur einen speziellen abgebildeten Punkt innerhalb der fokalen Objektebene zum Detektor durch. Licht aus tieferen oder höheren Ebenen als der Fokalebene können hingegen die Lochblende nicht passieren, wodurch es zu einer Kontrastverbesserung des Bildes kommt (61–63).

1.2 Tierversuchsanträge

Für die in dieser Arbeit vollzogenen Tierexperimente lag vor deren Beginn die benötigte Tierversuchsgenehmigung (Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW: AZ 84-02.04.2016A137) vor. Sämtliche Handlungen geschahen in Übereinstimmung mit der Europäischen Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.

1.3 Ziele der Arbeit

Nach dieser einleitenden Darstellung kann die Zielsetzung der Arbeit dargestellt werden. Sie beabsichtigt, die Dynamik von Mikrogliaaktivierung als wichtigen pathogenetischen Teilaspekt der MS im MOG induzierten EAE-CX3CR-1^{GFP}-Mausmodell per nicht invasiver cSLO in Echtzeit zu untersuchen. Spezifische Zwischenziele hierzu sind

- I.) die Charakterisierung der makroskopischen Dynamik von Mikroglia bei EAE in der cSLO
- II.) die Entwicklung eines halbautomatischen Algorithmus für das In-vivo-Tracking per cSLO und
- III.) die Etablierung geeigneter cSLO-Tracking-Parameter und die Beschreibung der Beziehung derselben zu anderen Messwerten wie derjenigen der OCT und des klinischen Scorings.

2. Frenger et al. 2021. *Semi-Automated Live Tracking of Microglial Activation in CX3CR1GFP Mice During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy*. Front. Immunol. 12, 761776



Semi-Automated Live Tracking of Microglial Activation in CX3CR1^{GFP} Mice During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy

Moritz J. Frenger¹, Christina Hecker¹, Mustafa Sindi¹, Andrea Issberger¹, Hans-Peter Hartung^{1,2,3}, Sven G. Meuth¹, Michael Dietrich^{1*} and Philipp Albrecht^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Narendra Prasad Singh,
University of South Carolina,
United States

Reviewed by:

Ebrahim Alharbi,
University of Al-Qadisiyah, Iraq
Kumareswamy Naidu Chitrak,
Temple University, United States

*Correspondence:

Michael Dietrich
dietrich87m@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 August 2021

Accepted: 07 October 2021

Published: 21 October 2021

Citation:

Frenger MJ, Hecker C, Sindi M,
Issberger A, Hartung H-P, Meuth SG,
Dietrich M and Albrecht P (2021) Semi-
Automated Live Tracking of Microglial
Activation in CX3CR1^{GFP} Mice During
Experimental Autoimmune
Encephalomyelitis by Confocal
Scanning Laser Ophthalmoscopy.
Front. Immunol. 12:761776.
doi: 10.3389/fimmu.2021.761776

¹ Department of Neurology, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Medical Faculty, Düsseldorf, Germany, ² Brain and Mind
Center, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia, ³ Department of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO) is a non-invasive technique for real-time imaging of the retina. We developed a step-by-step protocol for the semi-automatic evaluation of myeloid cells in cSLO images from CX3CR1^{GFP} mice, expressing green fluorescent protein (GFP) under control of the endogenous CX3C chemokine receptor 1 locus. We identified cSLO parameters allowing us to distinguish animals with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) from sham-treated/naïve animals. Especially cell count (CC) and the total microglial area (SuA) turned out to be reliable parameters. Comparing the cSLO results with clinical parameters, we found significant correlations between the clinical EAE score and the SuA and of the inner retinal layer thickness, measured by optical coherence tomography, with the CC as well as the SuA. As a final step, we performed immunohistochemistry to confirm that the GFP-expressing cells visualized by the cSLO are Iba1 positive and validated the step-by-step protocol against manual counting. We present a semi-automatic step-by-step protocol with a balance between fast data evaluation and adequate accuracy, which is optimized by the option to manually adapt the contrast threshold. This protocol may be useful for numerous research questions on the role of microglial polarization in models of inflammatory and degenerating CNS diseases involving the retina.

Keywords: confocal scanning laser ophthalmoscopy, microglia, CX3CR1-GFP, experimental autoimmune encephalomyelitis, live-tracking

Abbreviations: AUC, Area under the curve; AvA, Average cell area; BAF, Blue auto fluorescence; CC, Cell count; CFA, complete Freund's adjuvant; CNS, Central nervous system; cSLO, confocal scanning laser ophthalmoscopy; CX3CR1, CX3C chemokine receptor 1; EAE, Experimental autoimmune encephalomyelitis; (E)GFP, (Enhanced) green fluorescent protein; IBA1, Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IRL, Inner retinal layers; MCB, Maximal cell brightness; MOG, Myelin oligodendrocyte glycoprotein; MS, Multiple sclerosis; MVI, Average cell brightness; OMR, Optomotor response; PTX, Pertussis toxin; SuA, Total microglial area; TRT, Total retinal thickness.

INTRODUCTION

The chemokine receptor and chemokine ligand axis mediates chemotaxis of immune cells. These mechanisms apply to immune but also non-immune cells throughout the whole body, but the exact expression pattern is cell type specific for the particular organ (1). In the central nervous system (CNS), the CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) is mainly expressed on the developmentally yolk sac-derived microglial cells or, in pathological conditions, on infiltrating monocytes and macrophages, whereas chemokine ligands are predominantly expressed on neurons (2, 3). The higher the concentration of C-X3-C motif chemokine ligand 1 on cells, the more pronounced the chemotaxis of CX3CR1-bearing myeloid cells (4, 5). The importance of microglial polarization as an aspect in the pathogenesis of CNS diseases has increasingly moved in the focus of interest and has been studied specifically in *ex vivo* models (6). Several preclinical studies have demonstrated that targeting the infiltrating monocyte-derived cells during the acute phase substantially reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (7–9), an animal model of multiple sclerosis (MS), while both detrimental (10) and beneficial (3) effects have been attributed to the resident microglia. In the remission phase, microglia may play an important role in regulating immune functions and restoring function by facilitating repair and remyelination, ultimately preventing chronic neurodegeneration. At the same time, chronic microglial activation may very well drive demyelination and neuroaxonal loss during progressive phases (11). Transcriptome analyses of single microglial cells from different regions of the CNS from demyelination models in mice have led to the identification of specific microglial clusters that appear to be associated with certain CNS diseases. Furthermore, it was possible to extract microglial clusters from human tissue of MS patients that display similarities with the clusters of the demyelinating mouse models (12). Overall, microglial activity, with its reactive oxygen species-mediated phagocytosis, but also with its cytokine- and chemokine-modulating function presents itself as a crucial aspect of the MS pathogenesis. It has been associated with blood-brain barrier permeability, dysregulated T-cell activation and modulating effects on B-cells (13–19). Using non-invasive, *in vivo* confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO), microglial activation can also be assessed in the retina of CX3CR1^{GFP} mice in the context of EAE (20).

We therefore aimed to develop a protocol to facilitate the investigation of the dynamics of microglial activation in the myelin oligodendrocyte glycoprotein, fragment 35–55 (MOG_{35–55}) EAE model, using cSLO as a non-invasive tool for live cell tracking in CX3CR1^{GFP} mice (21, 22). The specific aims of the study were to I.) further characterize the macroscopic dynamics of microglial activity in EAE; II.) develop a semi-automated method for *in vivo* tracking and III.) correlate the cSLO-based parameters with one another and against other readouts, such as the retinal thickness measured by optical coherence tomography (OCT) and histology.

We developed a detailed instruction to simplify and standardize the tracking of myeloid cell changes *in vivo*.

MATERIAL AND METHODS

Mouse Strain and Animal Housing

All experiments were performed in 6-week-old female and male heterozygous mice of strain B6.129P2(Cg)-Cx3cr1^{tm1lat1}/J (The Jackson Laboratory, Stock No: 005582), hereafter referred to as CX3CR1^{GFP}. Mice were bred in-house under standard conditions in temperature-controlled rooms under a 12/12 light/dark schedule, with lights on at 06:00 h until 18:00 h. In this strain, an enhanced green fluorescent protein (EGFP) sequence replaces the first 390 base pairs of the second CX3CR1 exon, which encodes the N-terminus of the seven G-coupled transmembrane receptors of the family (1, 4). Animal experiments were performed in compliance with the experimental guidelines approved by the regional authorities (State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection; AZ 84-02.04.2014.A059, AZ 84-02.04.2016.A137, AZ 81-02.04.2019.A063) and conform to the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Experimental Groups and EAE Immunization

The animals were divided in three experimental groups. In the first experimental group, we induced EAE by subcutaneous injection of 200 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein, fragment 35–55 (MOG_{35–55}, Biotrend) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) in CX3CR1^{GFP} mice as previously described (23). Two intraperitoneal injections of 200 ng of pertussis toxin (PTX, Sigma-Aldrich) followed on the same day and two days after immunization. For the second group, CX3CR1^{GFP} mice only received CFA and PTX serving as control group, hereafter called Sham-treated. The third group consisted of untreated CX3CR1^{GFP} mice (naïve group). To rate the EAE severity of the mice, we determined the clinical EAE score daily using the following criteria: (0) no disease; (0.5) mild tail paresis; (1) obvious tail paresis or plegia; (1.5) tail plegia and no righting reflex; (2) mild signs of hind limb paresis with clumsy gait; (2.5) obvious signs of hind limb paresis; (3) hind limb plegia, mouse drags one leg behind; (3.5) hind limb plegia, mouse drags both legs behind; (4) mild signs of quadriplegia; (4.5) quadriplegia; and (5) death or moribund (23, 24).

Optical Coherence Tomography and Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy Acquisition

For *in vivo* imaging, we anesthetized the mice with isoflurane (Piramal critical care, Mumbai, India; 3% at 2L 02/min) using a vaporizer. We then wrapped the anesthetized animal in paper tissue to protect it from cooling and positioned it on the custom-made device. Eye drops with phenylephrine (2.5%)-tropicamide (0.5%) were administered to dilate the mouse pupils and were

replaced after approximately one minute by Visc-Ophtal eye gel (Dr. Winzer, Berlin, Germany) to prevent corneal desiccation. Finally, we applied a custom-made contact lens (+4 diopters) to the eye before OCT and cSLO measurement for better image resolution as previously described (24–26).

OCT methodology is reported according to the updated APOSTEL recommendations (27, 28). Like in previous OCT studies (23, 24, 29, 30), we performed volume scans (25 x 25°) to determine retinal layer thicknesses using a Spectralis™ HRA+OCT device (Heidelberg Engineering, Germany) under ambient light conditions and excluded images with a quality below 20 decibels. We determined the thickness of the total retinal layer thickness (TRT) and of the inner retinal layer (IRL), which is composed of the retinal nerve fiber layer (RNFL), ganglion cell layer (GCL), and inner plexiform layer (IPL), using the automatic segmentation of the Heidelberg Eye Explorer™ software (version 1.9.10.0). Segmentation errors were corrected by a blinded examiner. Previous studies have demonstrated the usefulness of combining the three layers into the IRL (25, 30).

The Spectralis™ HRA+OCT device (Heidelberg Engineering, Germany) includes the option for cSLO (31–33), and measurement of the CX3CR1^{GFP} mice was performed as described above following the OCT imaging. The HRA+OCT device was set to blue autofluorescence (BAF) mode ($\lambda = 488$ nm, barrier filter to capture fundus emissions above $\lambda = 500$ nm) (34), manually maximizing the image saturation while the reflected light image of the retina was averaged from 30 real-time reflected light images.

Image Analysis and Semi-Automatic Step-By-Step Protocol

We developed a step-by-step instruction on how to semi-automatically analyze microglial dynamics *in vivo* using the open source Java image processing software ImageJ (version: 1.53g; provided in the public domain at <https://imagej.nih.gov/ij/index.html> by the National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). This two-part step-by-step instruction

enables the transition of a mouse retina cSLO image (Figure 1A) into quantifiable parameters by ImageJ.

In the first step, we created a mask from the original image by increasing the contrast using ImageJ, which delineated the GFP expressing microglia cells from the darker background of the mouse retina. This was achieved by harmonizing the background using the ImageJ command “Subtract Background” setting the “rolling ball radius” to 500 pixels and then filtered the resulting image *via* a Fast Fourier Transform (ImageJ command: “FFT bandpass filter”), setting the limits for large structures at 30 pixels and for small structures at 3 pixels. We then manually adjusted the threshold (ImageJ command: “Threshold”) to delineate the microglial cells from the background (Figure 1B). As this is a step-wise process, the procedure requires an evaluator who is blinded for the experimental groups, especially to determine the separation threshold for microglia and the background. The threshold then serves as a verifiable criterion for the transformation of the qualitative picture into quantitative data.

In the second step, the mask obtained in step 1 is superimposed on the original image and the parameters area, maximum and minimum brightness, diameter of the area separated by the template and its Feret diameter can be obtained from the original image, using the mask (Figure 1C). A detailed step-by-step description with the standardized threshold values can be found in the **Supplementary Data**.

Immunohistochemical Staining of Retinal Cross-Sections

In addition to the GFP signal from CX3CR1^{GFP} retinæ, immunohistochemical Iba1 (ionized calcium binding adapter molecule 1) staining of retinal sections was used for histological detection of myeloid cells. After the mice were sacrificed, we confirmed that the GFP signal indeed indicates activated myeloid cells by additional Iba1 staining. A detailed protocol can be found in the **Supplementary Material**. In brief, the eyes were dissected from 6 representative animals per group 12 weeks after immunization and processed as previously described (35). After paraffin embedding, eyes were

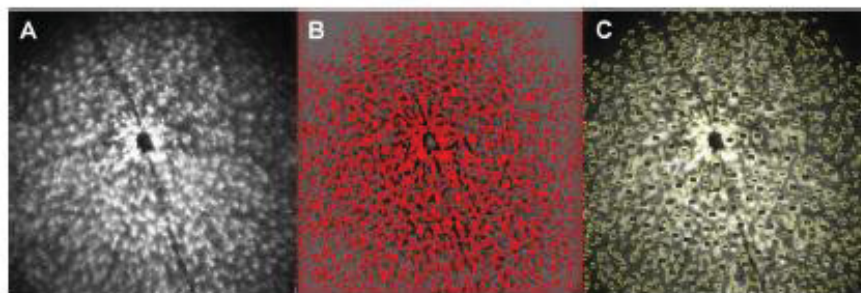


FIGURE 1 | Step-by-step protocol for image analysis via ImageJ. Original image of a MOG-immunized mouse after 6 weeks (A), semi-automatic generation of a mask for the corresponding image by enhancing the light-dark contrast and establishing a threshold of the coloration (B). Color coded mapping of the mask to the original image to obtain quantitative values within the yellow colored areas (C), numbered in the ImageJ application by structures here recognizable as black dots). The size of the cells, as well as different brightness parameters are considered by the step-by-step protocol to create the mask.

longitudinally sectioned at 5 μ m and stained with Iba1 (1:500, Wako chemicals) and Cy5 anti-rabbit (1:500, Millipore) as secondary antibody. 40 retinal sections per mouse were analyzed.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 (Graphpad, San Diego, USA) and SPSS Statistics 20 (IBM, Endicott, USA). P-values were considered significant with $p < 0.025$ resulting from a Bonferroni correction for multiple testing.

Linear Regression (Prism) was used to analyze the following correlations: I.) The correlation between manual and automated counting of cells by ImageJ, II.) the correlation between Iba1 histology and cSLO data at 12 weeks, III.) the correlation between the cSLO parameters total microglial area (SuA) and cell count (CC) and the clinical score, and IV.) the correlation between cSLO parameters [SuA, CC, Average cell brightness (MVI), Maximal cell brightness (MCB), Average cell area (AvA)] and the retinal thickness parameters (TRT, IRL) measured by OCT.

The area under the curve (AUC) was applied to assess the predictive power of the individual cSLO parameters (SuA, CC, MVI, MCB, AvA) with regard to the presence and severity of an active EAE. Each cSLO parameter was subsequently transformed into a Z-score, allowing the combination of individual parameters into a composite score from multiple parameters.

Differences of the cSLO and OCT parameters between means of the EAE, sham and naïve groups were analyzed using generalized estimating equations (GEE) with an exchangeable correlation matrix, considering the specification of the mouse eye (right or left) as a within-subject variable. The number of weeks after immunization was included as an additional within-subject variable when analyzing the association between OCT and cSLO parameters.

The differences between the microglial cell counts of the three treatment groups in Iba1 histology at the 12-week time point were investigated by one-factor ANOVA, followed by Bonferroni correction.

RESULTS

The cSLO Parameters Separate EAE and Sham-Treated Animals

To establish a quantitative image analysis using the ImageJ step-by-step protocol described above, we evaluated 130 cSLO-CX3CR1^{GFP} retinal images manually determining the cell number for each image by a blinded investigator (gold standard) and by a second investigator using the new step-by-step protocol. A Pearson correlation of the cell counts obtained by both approaches revealed an excellent correlation coefficient of $R^2 = 0.997$ ($p < 0.001$, Figure 2A), with results ranging from 22 to 660 cells across all images.

We then analyzed the cSLO images of the EAE ($n = 34$), sham ($n = 21$), and naïve ($n = 20$) CX3CR1^{GFP} mice to capture the cSLO parameters at weeks 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 after immunization.

The most profound changes for these measurements were observed in weeks 4, 6, and 8, the peak of each cSLO parameter was reached in week 6 (Figures 2B–F). While the parameter values did not differ significantly between the three treatment groups at the beginning and at the end of the observational period, significant differences were observed in weeks 4 to 8, especially for the CC and SuA. EAE mice showed the highest total values, while sham-treated and naïve animals presented similar results with a significant difference to EAE mice ($p < 0.025$) (Figures 2D, E). The brightness parameters MVI and MCB did not reveal a significant difference between the experimental groups with the exception of the baseline measurements of the sham-treated compared to the MOG_{35–55} immunized mice (Figures 2B, C). The AvA reflected the results of the CC and SuA, however, without reaching significant levels for naïve/sham-treated mice compared to EAE mice for the different timepoints (Figure 2F).

While the IRL thickness and TRT of sham-treated and naïve mice remained almost constant, the retinal thickness of EAE mice slightly decreased initially, followed by retinal swelling at week 2 and then continuously progressing degeneration over the course of the experiment. The thickness change of the EAE animals differed significantly compared to the baseline measurement and differed significantly ($p < 0.025$) compared to the two other groups from week 4 onwards. (Figures 2G, H).

Starting at week 2, EAE mice presented progressive EAE disability scores, reaching a peak at week 6, and a slow recovery with a rather chronic progression until the end of the experiment. Sham-treated and naïve mice did not develop a clinical score throughout the experiment, while the MOG-immunized group presented significantly higher clinical EAE scores ($p < 0.025$; Figure 2I).

The Cell Count and the Sum of Area Reflect Microglial Activation

Since microglial activation has been associated with retinal degeneration in inflammatory CNS disorders (11, 36) we addressed the question to what extent the cSLO parameters CC and SuA can differentiate MOG- from sham-treated or naïve mice. For this purpose, we calculated receiver operating characteristics (ROCs) of the test variables CC and SuA for the variable MOG immunization (Figures 3A, B). Based on the AUC for each week the CC (AUC week (W) 4: 77.85%, W6: 85.95%, W8: 73.05%, W12: 75.85% - for all values $p < 0.025$) proved to be slightly better suited to separate the groups than the SuA (AUC W4: 77.8%, W6: 79.2%, W8: 68.45%, W12: 64.5% - for all values $p < 0.025$). However, the combination of both parameters to a composite score resulted in an increase of the diagnostic discriminatory power compared to each of the criteria alone (AUC W6: 88.2% > W4: 81.4% > W8: 77.0% > W12: 75.0% - for all values $p < 0.025$), explaining 88.2% (W6) of all cases in the best case and 75% (W12) in the worst case (Figure 3C). In summary, depending on the requirements for sensitivity or specificity, a cut-off of 0.6547 for week 6 (sensitivity 77.6%, specificity 81.9%, see also Table S2) can be determined using the composite score combining the CC and SuA, which allows the

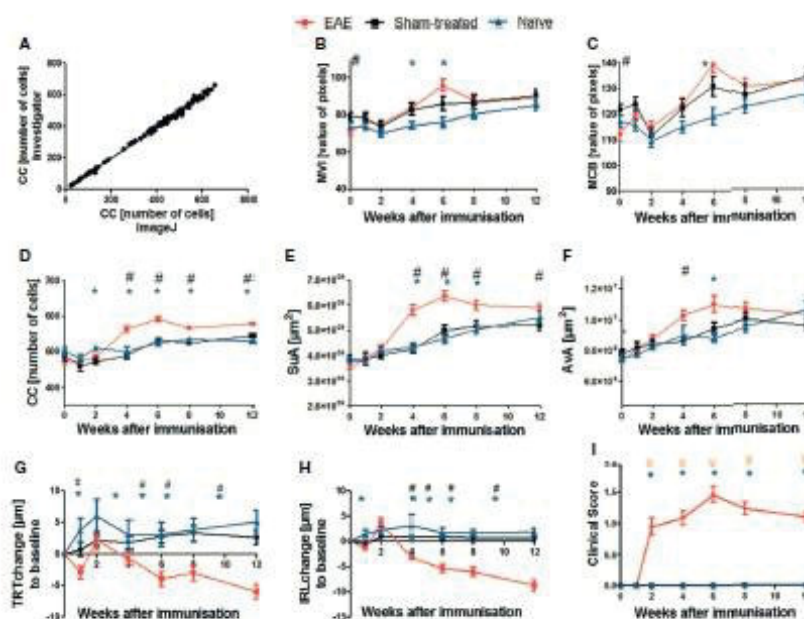


FIGURE 2 | Validation of the step-by-step semi-automated ImageJ protocol and results of cSLO, OCT, and EAE clinical score parameters within the EAE, sham-treated, and naive groups over 12 weeks. Correlation between cell count (CC) determined by retinal images from a blinded examiner and from the ImageJ step-by-step protocol (A): $n = 130$, $R^2 = 0.997$, $p < 0.0001$. Confocal-SLO parameters mean value intensity MWI (B), maximum cell brightness MCB (C), cell count CC (D), sum of area SuA (E) and average cell area AvA (F). OCT parameters change of total retinal thickness TRT (G) and inner retinal layer thickness IRL (H). EAE clinical score (I). (B–I) represent the pooled mean $\pm$ SEM; $n = 75$ (EAE $n = 34$, sham-treated $n = 21$, naive $n = 20$); * $p < 0.025$ for EAE vs naive, # $p < 0.025$ for EAE vs sham-treated and ¥ $p < 0.025$ for sham-treated vs naive by GEE with Bonferroni correction.

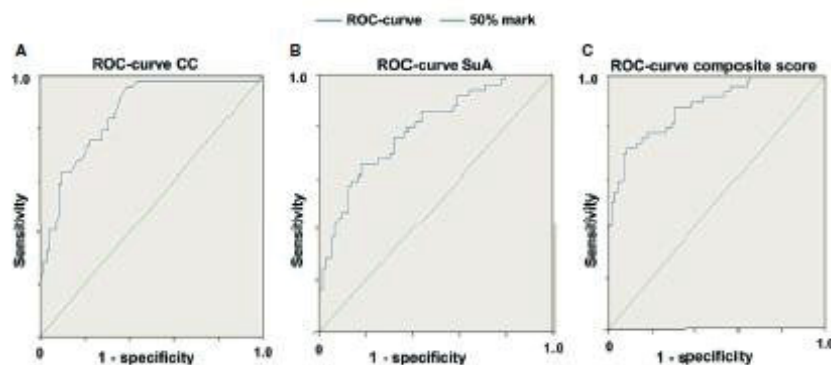


FIGURE 3 | Receiver operating characteristic curves for the different cSLO parameters. ROC for CC (A), for SuA (B) and for the composite score combined from the two parameters (C), 6 weeks after immunization; $n = 75$, $p < 0.025$, with Bonferroni correction. The composite score (C) achieves a higher diagnostic discrimination, as shown by the larger area under the curve (AUC) indicating higher sensitivity and specificity.

separation of EAE immunization against sham-treated/naive mice based on a retinal fundus image with fluorescence-labeled cells. For week 8 and 12 we determined a cut-off value of 0.439 (week 8, sensitivity 71.6%, specificity 69.5%) and 0.5704 (week

12, sensitivity 72.3%, specificity 67.1%) respectively in order to achieve a balanced ratio of sensitivity and specificity. By modifying the cut-off values, the ratio of sensitivity and specificity can be adapted, depending on the requirements of

the individual researchers (see **Tables S2, S4, S6** for cut-off values with corresponding sensitivities and specificities in the **Supplementary Material**).

Retinal Degeneration Correlates With cSLO Readouts

We then investigated the correlations between the cSLO parameters and the clinical score as well as the OCT readouts. For both correlations, only the cSLO parameters SuA and CC were taken into account, as only these two revealed significant differences between the treatment groups. The correlation analysis of cSLO with the clinical score for the period of maximum microglial activation from week 4 to 8, only revealed a positive correlation with the clinical EAE score for the parameter SuA (R^2 between 0.2 and 0.4, $p < 0.025$, **Figures 4A–C**). Only immunized EAE mice were included, as the other groups presented no clinical score (**Figure 2I**). Investigating the retinal layer thickness measured by OCT, SuA and CC revealed significant negative correlations over all weeks: When the CC increased, the IRL thickness decreased ($R^2 = 0.1$, $p < 0.025$; **Figure 4D**); when the SuA increased, the TRT also decreased ($R^2 = 0.11$, $p < 0.025$; **Figure 4E**). In summary, the SuA correlated positively with the clinical scoring of the mice and negatively with the TRT, while the CC correlated negatively with the inner retinal layer thickness (**Figure 4**).

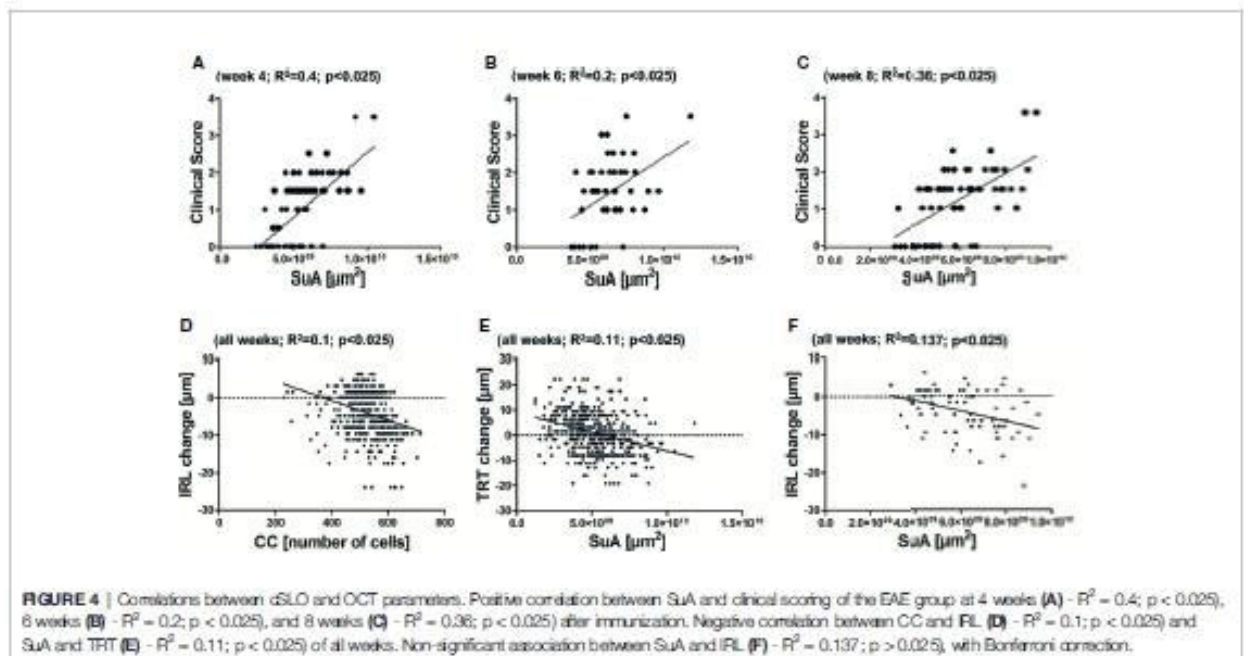
The Semi-Automated Step-By-Step Protocol Can Be Validated by Histological Analysis

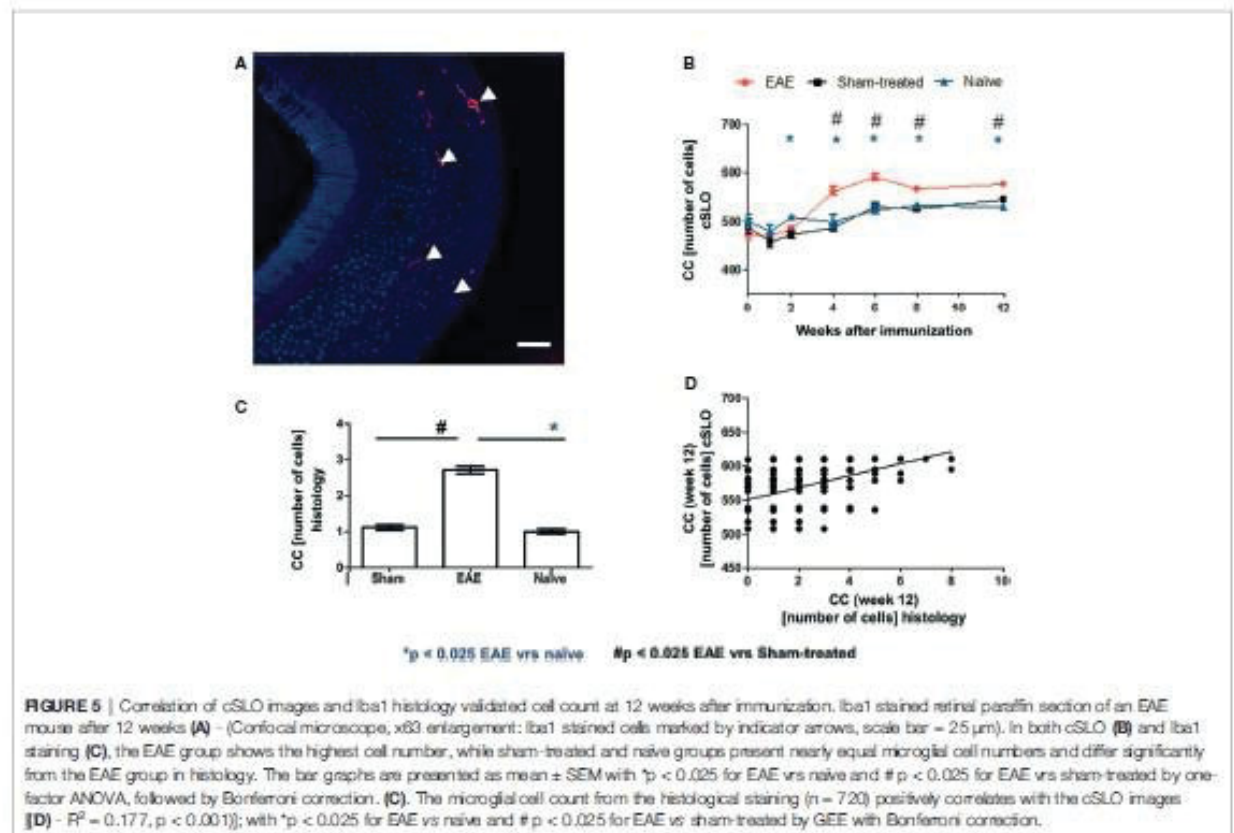
As a final confirmatory step, we validated the microglial cSLO readouts by a histological assessment. For this purpose, retinæ of

18 representative mice (6 EAE, 6 sham-treated, 6 naïve mice) were immunohistochemically stained with Iba1 12 weeks after immunization and evaluated by a blinded observer (**Figure 5A**). Differences in microglial cell number at 12 weeks were analyzed by ANOVA. The cSLO imaging revealed significantly higher cell numbers in the EAE group compared to the other two groups (**Figure 5B**). In line with these findings, the histological assessment revealed higher microglial cell numbers in the EAE animals compared to the sham-treated and naïve mice, which did not differ between each other, confirming the results of the cSLO measurement (**Figure 5C**). A positive correlation between the cell count in the cSLO image and the histological analysis was demonstrated at 12 weeks after immunization ($R^2 = 0.177$, $p < 0.025$, **Figure 5D**).

DISCUSSION

The retina represents an easily accessible compartment of the CNS for *in vivo* imaging by OCT as well as fundus imaging and live-cell tracking by cSLO (26, 37). Longitudinally tracking the microglial cSLO outcomes revealed a steadily increasing CC and SuA of all experimental groups over the period of 12 weeks, although the sham-treated and naïve mice were not MOG_{35–55} immunized. Of note, the CC and SuA were significantly lower in naïve and sham mice compared to EAE animals in the period of maximum microglial activation (4–8 weeks post immunization). It seems reasonable to assume that the increase in microglial cell numbers and cell area in non-immunized animals can be explained by the maturation of the animals (38). This should be taken into account when planning experiments focusing on





retinal microglia dynamics in mice of this age. In addition, the genetic background of the animal strain has to be considered when performing experiments on brain myeloid cells, as it was demonstrated that genetic diversity significantly alters features and dynamics of microglia, already in baseline neuroimmune functions (39, 40). Therefore, these results obtained in mice with a C57BL/6J background may not be transferable and will have to be confirmed in other mouse strains.

While the cSLO measurements presented a constant increase in almost all parameters, the time courses of the retinal thickness change measured by OCT showed an initial thickness loss one week after immunization in EAE mice suggesting retinal damage by early inflammatory processes. The thickness increase at week 2 can be explained by edema linked to early microglial activation and astrogliosis. The following decrease of the total retinal thickness and IRL reflects the chronic neurodegeneration after axonal demyelination and the acute inflammatory insult (30, 41).

Technically, the challenge of keeping the optic nerve head focused and light saturation exactly identical during the measurement and across the different time points of the mice arose during the optimization process of the study (36). The image evaluation using cSLO is strongly influenced by parameters such as image illumination and the laser angle on the retina of the examined animal, even leading to significant differences between the baseline brightness values of the sham-treated and EAE mice. In laboratory practice, it proved to be

extremely difficult to keep these parameters exactly identical over repeated measurement sessions spanning several weeks. Therefore, we decided to include an adaptable threshold for evaluation of the images. After the sub-step of contrasting the microglia from the background, a threshold was manually set to separate the microglial cell area from the background by means of the mask (see Figure 1B). This approach of semi-automated segmentation allowed the evaluator to compensate for variations in illumination or focus. At the same time, it is a potential source of bias. This is why it is of the utmost importance, that the investigator is blinded for the experimental groups. The step-by-step protocol was validated by histological retinal sections stained with Iba1, which were manually counted and showed a significant correlation with the results obtained by the cSLO.

Other approaches opted for a fully automated segmentation using constant thresholds at this point of data acquisition (36, 42, 43). To delineate the microglia by a constant threshold, a fixed algorithm is applied based on parameters such as the cell morphology to decide whether a microglial cell is "activated" or not (36, 43). However, inaccurate and inconsistent saturation and focus settings can lead to artefacts in the GFP detection when evaluating the images by a fully automatic algorithm without the possibility of correction. The semi-automatic step-by-step protocol presented here retains the possibility of correction by the blinded observer, but it is more time-consuming than a fully automatic algorithm. In order to make it more time-efficient,

future research should focus on developing a software tool for automating the microglia masking process.

The main challenges for the design of an automatic step-by-step protocol to evaluate the cSLO-CX3CR1^{GFP} images also arose from the morphological changes of microglial cells during activation. Upon activation, the cells shift from small cell somata with long, ramified branches to an amoeba-like structure with short cell processes (40, 42–44). This morphology can easily be identified in histological sections, but may be challenging to detect in cSLO images depending on the image focus and overlay of other microglial cells during massive infiltration in the context of EAE (42). However, compared to histology, the cSLO-method allows to investigate the retinal microglial activation non-invasively and longitudinally, reducing the number of animals required, avoiding the inter-subject variability and opening up opportunities to react promptly to the dynamics of an experiment.

Other researchers used cSLO to investigate the morphological changes of microglial cells in non-inflammatory models (45). Different and possibly fully automated algorithms may be applicable to such models where microglial activation and myeloid cell infiltration is less intense than it is in MOG EAE where the huge number of microglia cells per image with overlapping somata make the differentiation of individual shapes extremely difficult. Therefore, in inflammatory models, semi-automatic tracking by cSLO still requires histological supplementation for morphological conclusions.

Optomotor response (OMR) is a method for investigating clinical changes of the visual system which uses the optokinetic nystagmus of the animals (24, 42). This could provide a closer link between clinical and microglial readouts in future studies than is achieved with the clinical score and its focus on locomotor change.

In summary, we identified cSLO parameters, which can help to discriminate EAE animals from sham-treated/naïve mice based on retinal fundus images with CX3CR1-GFP fluorescence-labeled cells. CC and SuA were increased in EAE and revealed correlations with the retinal thickness changes measured by OCT and with the clinical score. Our semi-automated step-by-step protocol can be helpful for numerous research questions and may contribute to further decipher the role of microglial polarization in models of inflammatory and degenerating CNS diseases involving the retina.

REFERENCES

1. Lee M, Lee Y, Song J, Lee J, Chang S-Y. Tissue-Specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships With Human Disease. *Immune New* (2018) 18:1–19. doi: 10.4110/in.2018.18.e5
2. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia Development and Function. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:367–402. doi: 10.1146/annurev-immunol.032713.120240
3. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential Roles of Microglia and Monocytes in the Inflamed Central Nervous System. *J Exp Med* (2014) 211:3533–49. doi: 10.1084/jem.20132477
4. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, et al. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by State Agency for Nature, Environment and Consumer Protection; AZ 84-02.04.2014.A059, AZ 84-02.04.2016.A137, AZ 81-02.04.2019.A063.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF, CH, AI, and MD performed the experiments and analyzed the data. MF, MD, and PA wrote the manuscript. H-PH, SM, and MS were involved in revising the manuscript critically for important intellectual content and made substantial contributions to interpretation of data. PA and MD conceived the study and supervised experiments. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the charitable Ilselore-Lückow Stiftung and the charitable Dr.-Robert-Pfleger Stiftung to PA.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support by the Heinrich-Heine University Düsseldorf.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.761776/full#supplementary-material>

5. Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol* (2000) 20:4106–14. doi: 10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000
6. Limatola C, Ransohoff RM. Modulating Neurotoxicity Through CX3CL1/CX3CR1 Signaling. *Front Cell Neurosci* (2014) 8:229. doi: 10.3389/fncel.2014.00229
7. Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN, et al. Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2009) 50:4444–51. doi: 10.1167/jovs.08.3357
8. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* (2000) 192:899–905. doi: 10.1084/jem.192.6.899
9. Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD, et al. CCR2⁺Ly6Chi Monocytes are Crucial for the Effector Phase of Autoimmunity in

- the Central Nervous System. *Brain* (2009) 132:2487–500. doi: 10.1093/brain/awp144
9. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating Monocytes Trigger EAE Progression, But do Not Contribute to the Resident Microglia Pool. *Nat Neurosci* (2011) 14:1142–9. doi: 10.1038/nn.2887
 10. Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Ravich G, Hövelmeyer N, et al. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Repressed by Microglial Paralysis. *Nat Med* (2005) 11:146–52. doi: 10.1038/nm1177
 11. Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, et al. The Roles of Macrophages and Microglia in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (2018) 318:1–7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.02.015
 12. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Sagar, et al. Spatial and Temporal Heterogeneity of Mouse and Human Microglia at Single-Cell Resolution. *Nature* (2019) 566:388–92. doi: 10.1038/s41586-019-0924-x
 13. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* (2008) 372:1502–17. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
 14. Toosy AT, Mason DF, Miller DH. Optic Neuritis. *Lancet Neurol* (2014) 13:83–99. doi: 10.1016/S1473-4422(13)70259-X
 15. Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung HP, Montalban X, et al. The Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol* (2020) 89:13–23. doi: 10.1002/ana.25927
 16. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkmeier M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, et al. A Reversible Form of Axon Damage in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Nat Med* (2011) 17:495–9. doi: 10.1038/nm.2324
 17. Witherick J, Wilkins A, Soiding N, Kemp K. Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and a Cell Therapy Approach to Treatment. *Autoimmune Dis* (2010) 2011:1–12. doi: 10.4061/2011/164608
 18. Goldmann T, Prinz M. Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clin Dev Immunol* (2013) 2013:1–8. doi: 10.1155/2013/208093
 19. Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F. Neuronal Damage in Brain Inflammation. *Arch Neurol* (2007) 64:185–9. doi: 10.1001/archneur.64.2.185
 20. Cruz-Herranz A, Oertel FG, Kim K, Cantó E, Timmons G, Sin JH, et al. Distinctive Waves of Innate Immune Response in the Retina in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *JCI Insight* (2021) 6:e149228. doi: 10.1172/jci.insight.149228
 21. Hell H-M, Charbel Issa P, Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Scholl HP, Meyer CH, et al. Clinical Evaluation of Simultaneous Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy Imaging Combined With High-Resolution, Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Acta Ophthalmol* (2010) 88:842–9. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01602.x
 22. Steinman L, Zamvil SS. How to Successfully Apply Animal Studies in Experimental Allergic Encephalomyelitis to Research on Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* (2006) 60:12–21. doi: 10.1002/ana.20913
 23. Dietrich M, Koska V, Hedeker C, Göttsche P, Hilla AM, Heskamp A, et al. Protective Effects of 4-Aminopyridine in Experimental Optic Neuritis and Multiple Sclerosis. *Brain* (2020) 143:1127–42. doi: 10.1093/brain/awaa062
 24. Hedeker C, Dietrich M, Isenberger A, Hartung H-P, Albrecht P. Comparison of Different Optomotor Response Readouts for Visual Testing in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-Optic Neuritis. *J Neuroinflamm* (2020) 17:216. doi: 10.1186/s12974-020-01889-z
 25. Dietrich M, Cruz-Herranz A, Yiu H, Aktas O, Brandt AU, Hartung H-P, et al. Whole-Body Positional Manipulators for Ocular Imaging of Anaesthetized Mice and Rats: A Do-It-Yourself Guide. *BMJ Open Ophthalmol* (2017) 1:1–6. doi: 10.1136/bmjophth-2016-000008
 26. Dietrich M, Hedeker C, Hilla A, Cruz-Herranz A, Hartung H-P, Fischer D, et al. Using Optical Coherence Tomography and Optokinetic Response as Structural and Functional Visual System Readouts in Mice and Rats. *J Vis Exp* (2019) 143:1–7. doi: 10.3791/58571
 27. Cruz-Herranz A, Balk LJ, Oberwahrenbrock T, Sridha S, Martinez-Lapiscina EH, Lagreze WA, et al. The APOSTEL Recommendations for Reporting Quantitative Optical Coherence Tomography Studies. *Neurology* (2016) 86:2303–9. doi: 10.1212/WNL.0000000000002774
 28. Aythya A, Cruz-Herranz A, Aktas O, Balcer LJ, Balk L, Barboni P, et al. The APOSTEL 2.0 Recommendations for Reporting Quantitative Optical Coherence Tomography Studies. *Neurology* (2021) 97:1–49. doi: 10.1212/WNL.0000000000001215
 29. Dietrich M, Helling N, Hilla A, Heskamp A, Isenberger A, Hildebrandt T, et al. Early Alpha-Lipoic Acid Therapy Protects From Degeneration of the Inner Retinal Layers and Vision Loss in an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-Optic Neuritis Model. *J Neuroinflamm* (2018) 15:71. doi: 10.1186/s12974-018-1111-y
 30. Cruz-Herranz A, Dietrich M, Hilla AM, Yiu HH, Levin MH, Hedeker C, et al. Monitoring Retinal Changes With Optical Coherence Tomography Predicts Neuronal Loss in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroinflamm* (2019) 16:1273. doi: 10.1186/s12974-019-1583-4
 31. Dittmar S, Holz FG. *Fluoreszenzangiographie in Der Augenheilkunde*. Vol. 1. Berlin: Springer (2008). p. 32.
 32. Woon WH, Pitke FW, Bird AC, Marshall J. Confocal Imaging of the Fundus Using a Scanning Laser Ophthalmoscope. *Br J Ophthalmol* (1992) 76:470–4. doi: 10.1136/bjo.76.8.470
 33. Vohnsen B, Iglesias I, Artal P. Confocal Scanning Laser Ophthalmoscope With Adaptive Optical Wavefront Correction. *SPIE* (2003) 24–32. doi: 10.1117/12.477979
 34. Bittencourt MG, Hassan M, Halim MS, Afridi R, Nguyen NV, Plaza C, et al. Blue Light Versus Green Light Fundus Autofluorescence in Normal Subjects and in Patients With Retinohistopathology Secondary to Retinal and Uveitic Diseases. *J Ophthalmic Inflamm Infect* (2019) 9:1–9. doi: 10.1186/s12348-018-0167-2
 35. Dietrich M, Hedeker C, Nasiri M, Samsam S, Isenberger A, Kohne Z, et al. Neuroprotective Properties of Dimethyl Fumarate Measured by Optical Coherence Tomography in Non-Inflammatory Animal Models. *Front Neurol* (2020) 11:601628. doi: 10.3389/fneur.2020.601628
 36. Bosco A, Romero CO, Ambati BK, Vetter ML. In Vivo Dynamics of Retinal Microglial Activation During Neurodegeneration: Confocal Ophthalmoscopic Imaging and Cell Morphometry in Mouse Glaucoma. *J Vis Exp* (2015) 99:1–14. doi: 10.3791/52731
 37. Kokona D, Jovanovic J, Ebner A, Zinkernagel MS. In Vivo Imaging of Cx3cr1gfp/gfp Reporter Mice With Spectral-Domain Optical Coherence Tomography and Scanning Laser Ophthalmoscopy. *J Vis Exp* (2017) 129:1–8. doi: 10.3791/55984
 38. Silverman SM, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci* (2018) 4:45–77. doi: 10.1146/annurev-vision-091517-034425
 39. Yang HS, Onos KD, Choi K, Keener KJ, Skelly DA, Carter GW, et al. Natural Genetic Variation Determines Microglia Heterogeneity in Wild-Derived Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Cell Rep* (2021) 34:108739. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108739
 40. Kim JW, Nam SM, Yoo DY, Jung HY, Hwang IK, Seong JK, et al. Strain-Specific Differential Expression of Astrocytes and Microglia in the Mouse Hippocampus. *Brain Behav* (2018) 8:1–13. doi: 10.1002/brb3.961
 41. Manogaran P, Samardzija M, Schad AN, Wicki CA, Walker-Egger C, Rudin M, et al. Retinal Pathology in Experimental Optic Neuritis Is Characterized by Retrograde Degeneration and Gliosis. *Acta Neuropathol Commun* (2019) 7:116. doi: 10.1186/s40478-019-0768-5
 42. Kozłowski C, Weimer RM. An Automated Method to Quantify Microglia Morphology and Application to Monitor Activation State Longitudinally In Vivo. *PLoS One* (2012) 7:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0031814
 43. Chun BY, Kim J-H, Nam Y, Huh M-L, Han S, Suk K. Pathological Involvement of Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in the Demyelinating Optic Neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2015) 56:3691–8. doi: 10.1167/iov.15-16851
 44. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukunishi Y. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rat Brain. *Stroke* (2001) 32:1208–15. doi: 10.1161/01.STR.32.5.1208
 45. Liu S, Li Z, Weinreb RN, Xu G, Lindsey JD, Ye C, et al. Tracking Retinal Microglial In Models of Retinal Ganglion Cell Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2012) 53:6254–62. doi: 10.1167/iov.12-9450

Conflict of Interest: The following financial disclosures are unrelated to the work: H PH has received fees for serving on steering and data monitoring committees from Bayer Healthcare, Biogen, Celgene BMS, CSL Behring, Genzyme, MedImmune, Merck, Novartis, Octapharma, Roche, Sanofi Genzyme, TG Therapeutic and Vial Bio; fees for serving on advisory boards from Biogen, Sanofi Genzyme, Merck, Novartis, Octapharma, and Roche; and lecture fees from

Biogen, Celgene BMS, Merck, Novartis, Roche, Sanofi Genzyme. SM received honoraria for lecturing and travel expenses for attending meetings from Almirall, Amicus Therapeutics Germany, Bayer Health Care, Biogen, Celgene, Diamed, Genzyme, MedDay Pharmaceuticals, Merck Serono, Novartis, Novo Nordisk, ONO Pharma, Roche, Sanofi-Aventis, Chugai Pharma, QuintilesIMS, and Teva. His research is funded by the German Ministry for Education and Research (BMBF), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Else Kröner Presenius Foundation, German Academic Exchange Service, Hertie Foundation, Interdisciplinary Center for Clinical Studies (IZKF) Muenster, German Foundation Neurology, and by Almirall, Amicus Therapeutics Germany, Biogen, Diamed, Presenius Medical Care, Genzyme, Merck Serono, Novartis, ONO Pharma, Roche, and Teva. MD received speaker honoraria from Merck. PA received compensation for serving on Scientific Advisory Boards for Ipsen, Novartis, Biogen; he received speaker honoraria and travel support from Novartis, Teva, Biogen, Merz Pharmaceuticals, Ipsen, Allergan, Bayer Healthcare, Eisai, UCB and Glaxo Smith Kline; he received research support from Novartis, Biogen, Teva, Merz Pharmaceuticals, Ipsen, and Roche.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Frenger, Hecker, Sindi, Isberner, Hartung, Meuth, Dietrich and Albrecht. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Diskussion

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert, wobei zur besseren Übersicht eine Unterteilung in einen methodischen und einen inhaltlichen Diskussionsschwerpunkt vorgenommen wird. Um die Anknüpfungspunkte der Vertiefung leichter nachvollziehen zu können werden vorher knapp die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit anhand der in Kapitel 1.3 formulierten Zielfragen rekapituliert:

I.) Charakterisierung der makroskopischen Dynamik von Mikroglia bei EAE in der cSLO

Im MS-Modell der EAE hat sich ein Zeitraum von 12 Wochen als Beobachtungszeitpunkt für mikrogliale Aktivierung als geeignet herausgestellt, da sich vor allem in den Versuchswochen 4 bis 8 signifikante Unterschiede in der Aktivität von Mikroglia zeigen, die durch die MOG₃₅₋₅₅Immunisierung besonders stark getriggert werden. Darüber hinaus fiel auf, dass auch die Kontrollgruppen (Naïve, Sham) eine konstant zunehmende Mikrogliaktivierung über die Zeit von 12 Wochen zeigten, die allerdings signifikant hinter derjenigen der Versuchsgruppe (EAE) zurückblieb.

II.) Entwicklung eines halbautomatischen Algorithmus für das In-vivo-Tracking per cSLO

Aufgrund der histologischen Bestätigung der Relation der drei Versuchsgruppen zueinander, wie sie durch die cSLO im Hinblick auf die mikrogliale Aktivierung vorgegeben war, stellt sich das In-vivo-Tracking von Mikrogliaktivität über die Methode der cSLO in Verbindung zum halbautomatischen ImageJ-Algorithmus als adäquater und praktikabler Zugang dar, der im Gegensatz zur histologischen Herangehensweise die Beobachtung eines Versuchstieres über die Zeit hinweg ermöglicht und weniger zeitintensiv ist.

III.) Etablierung geeigneter cSLO-Tracking-Parameter und die Beschreibung der Beziehung derselben zu anderen Messwerten wie derjenigen der OCT und des klinischen Scorings.

Als geeignetste Tracking-Parameter für mikrogliale Aktivierung in der cSLO erwiesen sich Zellzahl (CC) und Gesamtfläche der Mikroglia (SuA). Helligkeitsparameter präsentierten sich hingegen als nicht zielführend. In einem total Score kombiniert kann die Trennschärfe in der Unterscheidung von MOG-Tieren und deren Kontrollgruppen deutlich im Vergleich zu der separierten Verwendung von SuA und CC erhöht und somit mikrogliale Aktivierung genauer bestimmt werden. Korreliert man die für die cSLO geeigneten Parameter mit Parametern von in der EAE etablierten Untersuchungsmethoden so zeigen SuA und CC eine negative Korrelation zu den Parametern der OCT repräsentiert durch die totale Retinaschichtdicke (TRT) und die innere Retinenschichtdicke (IRL). Eine positive Korrelation ergibt sich zum klinischen Scoring der Versuchstiere.

3.1 Methodendiskussion

3.1.1 Monitoring der funktionellen Beeinträchtigung per Optomotorischer Reaktion (OMR)

Das klinische Scoring der CX3CR-1^{GFP}-Mäuse während der 12 Versuchswochen ist wichtig, um das tatsächliche funktionelle Outcome der auf Gewebeebene nachvollzogenen Entzündungsreaktion

einschätzen zu können. Es zeigt sich, dass die Mäuse mit zunehmender Entzündungsaktivität stärker in ihrer lokomotorischen Aktivität eingeschränkt werden.

Der genuine Zugangspunkt dieser Arbeit besteht darin, durch intensives Monitoring der Retinae der Versuchstiere auf pathologische Prozesse des Ganzen ZNS zurückzuschließen (48, 64, 65). Um eine möglichst enge Nähe zwischen den Bewertungsebenen für funktionelle Betroffenheit einerseits und für pathologischen Prozess andererseits zu realisieren, bietet es sich für zukünftige Studien an, das in dieser Arbeit verwendete klinische Scoring mit seinem Fokus auf dem Bewegungsapparat der Versuchstiere um das Verfahren der OMR zu ergänzen. In dieser wird der optokinetische Nystagmus eines Versuchstieres verwendet, um die Beeinträchtigung seines visuellen Systems zu erfassen (66, 67). Somit wäre der visuelle Pfad zugleich Zielobjekt für die funktionelle und pathologische Bewertung.

3.1.2 Semiautomatisch versus vollautomatisch

In dieser Untersuchung benutzen wir einen halbautomatischen Algorithmus für das Echtzeit in-vivo-Tracking mikroglialer Aktivierung, was im Vergleich zu einem vollautomatischen Vorgehen mit einem höheren Zeitaufwand verbunden ist. Der halbautomatische Ansatz resultiert aus der Notwendigkeit der manuellen Setzung eines Thresholds zur Eingrenzung der zuvor durch Kontrastverstärkung geschaffenen Maske auf mikrogliale Fläche. Er kann zwischen unterschiedlichen cSLO-Bildern variieren.

Andere Ansätze entscheiden sich für eine vollautomatische Segmentierung mit konstantem Threshold. Sie wenden einen festen Algorithmus auf Grundlage von Parametern wie der Zellmorphologie und -helligkeit an, der jeder Zelle einen bestimmten Wert zuordnet. Überschreitet dieser Wert den festgelegten konstanten Threshold, gilt die Zelle als "aktiviert" und geht in die Detektion ein (66, 68, 69).

Den intrinsischen Schwierigkeiten bei der Erfassung mikroglialer Aktivierung können beide Ansätze begegnen. So wandeln sich Mikrogliazellen bei ihrer Aktivierung von kleinen Zellsomata mit langen, verzweigten Ästen zu einer amöbenartigen Struktur mit kurzen Zellfortsätzen (50, 66, 69, 70).

Bei der Anfertigung von cSLO-Bildern begegnen jedoch auch extrinsische Herausforderungen. In der Praxis hat sich gezeigt, dass es nicht realisierbar ist, den Kamerawinkel auf den Sehnervenkopf über die verschiedenen Messzeitpunkte hinweg exakt identisch zu halten. Gleiches gilt für die Lichtsättigung während der Messung, die auf die Qualität der cSLO-Bilder ebenfalls Einfluss nimmt (68). Somit können inkonsistente Sättigungs- und Fokuseinstellungen über die Versuchszeit zu Artefakten bei der Mikroglia-detektion führen. Ein vollautomatisches Vorgehen, welches ungefiltert Parameter wie Zellmorphologie und Helligkeit heranzieht, um über die Detektion einer Zelle zu entscheiden, kann auf die Herausforderungen der Bildakquisition nicht gesondert reagieren. Der hier verwendete halbautomatisierte Algorithmus lässt durch die manuelle Festsetzung eines Thresholds Raum für Korrekturen. Dem Nachteil des höheren Zeitaufwandes steht der Vorteil einer besseren Adaption der Bildauswertungssoftware auf die Qualität der cSLO-Bilder gegenüber. Damit das manuelle Setzen des Thresholds allerdings nicht Einfallstor für einen Untersucherbias wird, muss auf eine Untersucher-verbildung beim Auswerten der Daten ebenso geachtet werden, ebenso wie auf die explizite Anga-

be des gewählten Threshold bei der Datenauswertung, die eine intersubjektive Überprüfbarkeit ermöglicht.

Nichtsdestotrotz wäre es lohnenswert, in Zukunft halbautomatische und vollautomatische Algorithmen anhand gleicher Bilder gegen einen Goldstandard zu vergleichen, um die Tragweite des geschilderten Problems besser einschätzen und entsprechende Konsequenzen ziehen zu können.

3.1.3 Notwendigkeit einer Einbeziehung von weiteren Tierstämmen und MS-Modellen

Grundlage unserer Untersuchung war ein MOG₃₅₋₅₅ induziertes EAE-Modell in B6.129P2(Cg)-Cx3cr1^{GFP}-Mäusen. Wie bereits erwähnt zeichnet sich das spezifische Krankheitsprofil dieses auf Black6-Mäuse gestützten EAE-Modells durch einen monophasischen Verlauf mit Entzündung des Rückenmarks und einem Schwerpunkt von CD4⁺-T-Zellen aus (7, 30, 46). Hierdurch entsteht ein Unterschied zu dem Verlauf der RRMS im Menschen.

Andere tierexperimentellen MS-Forschungsarbeiten zeigen eine Vielzahl alternativer Zugänge im Hinblick auf Versuchstierstamm und krankheitstauslösendes Antigen auf: So können basisches Myelinprotein, myelinspezifisches Proteolipid-Protein und der Transfer spezifischer T-Zellen verwendet werden, um entzündliche MS-Modelle zu induzieren. Ebenso herrscht eine Variabilität bzgl. der Versuchstiere, bei denen auch Ratten wie beispielsweise Lewis- oder Brown-Norweger-Rattenstämme zum Einsatz kommen können (31, 48). Mit differenten Antigenen und Stämmen lassen sich unterschiedlich geartete entzündliche Krankheitsverläufe nachahmen, beispielsweise auch solche, die dem Verlauf der PPMS sehr nahe kommen (71). Somit liegt eine Fülle unterschiedlicher MS-Tiermodelle vor, die bestimmte Aspekte menschlicher MS-Verlaufsformen besser abbilden als andere.

Es wurde von verschiedener Seite darauf hingewiesen, dass die Unterschiedlichkeit von Tiermodellen und Induktionsmethoden sich bis auf die Ebene mikroglialer und astrozytärer Beschaffenheit niederschlägt und hier zu Unterschieden in quantitativer Ausstattung und qualitativem Verhalten von Mikroglia führt (70, 72). Sogar verschiedene Mikrobiome rufen bei Tieren des gleichen Stamms unterschiedliche Verläufe eines entzündlichen Modells hervor (32).

Aus diesen Überlegungen ergeben sich mehrere Schlussfolgerungen: Wenn sich die Wahl von Tierstamm, Induktionsmethode und Mikrobiom auf mikrogliale Aktivität auswirkt, gilt es, für weitere Forschung auf dem Feld der Mikrogliaaktivität in der MS die wichtigsten Mausstämme und Induktionsmethoden unter der Fragestellung ihrer mikroglialen Bedeutung hin zu charakterisieren. Da jeder Zugang eine spezielle Facette des MS-Verlaufs besonders gut nachahmt, kann durch die Kombination verschiedener MS-Modelle die Rolle von Mikroglia im Gesamtverlauf der MS umfassender betrachtet werden.

Auch aus dem Nachweis des Mikrobiomeinflusses eines Tieres auf seinen Krankheitsverlauf ergeben sich Implikationen: Einerseits muss zwecks einer besseren Vergleichbarkeit unterschiedlicher Forschungsprojekte versucht werden, die Vereinheitlichung der tierexperimentellen Versuchsbedingungen bis auf die Ebene des Futters und der umgebenden mikrobiologischen Flora zu treiben. Auf der anderen Seite eröffnen die Erkenntnisse den umgekehrten Weg, indem durch gezielte Beeinflussung

der umgebenden Umweltfaktoren ihr Einfluss auf den Verlauf mikroglialer Aktivierung in einem MS-Modell untersucht wird.

3.2 Ergebnisdiskussion

Wurden im ersten Teil der Diskussion die methodischen Zugänge des Experiments reflektiert, geraten nun die Ergebnisse desselben zwecks kritischer Einordnung in den Blick.

3.2.1 Einfluss von Körperwachstum auf mikrogliale Aktivierung

Wie zu erwarten unterscheiden sich die EAE-Gruppe in der cSLO-Bildgebung im Zeitraum größter Entzündungsaktivität zwischen Woche 4 bis 8 besonders stark von der Naïve- und Sham-Gruppe, was sich in den Parametern der Zellzahl (CC) und der Mikroglialesamtfläche (SuA) signifikant widerspiegelt. Überraschend ist der Umstand, dass sich in allen drei Versuchsgruppen über die Gesamtheit des Experiments eine kontinuierliche Zunahme von SuA und CC zeigt, obwohl nur die EAE-Gruppe mit MOG behandelt wurde. Für die Sham-Gruppe ließe sich diese Zunahme erklären, indem wir dem verwendeten Freundschem Adjuvanz und Pertussistoxin einen entzündungstreibenden Einfluss zuschreiben, der sich in einer gesteigerten myeloiden Aktivität niederschlägt. Allerdings zeigt sich auch bei den unbehandelten Mäusen ein Anstieg in SuA und CC über die Zeit, sodass die Erklärung abseits hiervon zu suchen ist.

Während der Anstieg in der cSLO-Parameterstärke bei den EAE-Tieren besonders stark mit der Entzündungsstärke zu korrelieren scheint, gestaltet sich die Zunahme von SuA und CC bei Sham- und Naïve-Gruppe beinahe kontinuierlich. Dies legt den Verdacht nahe, die Entwicklung myeloider Aktivität mit dem kontinuierlichen Wachstum der Versuchstiere zu verbinden (37). Trifft diese Erklärung zu, so müssen für zukünftige Experimente zu Mikrogliaaktivität feste Alterszeiträume der Versuchstiere definiert werden, um einerseits eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Experimenten zu gewährleisten und andererseits bei gewissen Altersstufen der Tiere mit bestimmten Ausgangswerten von Mikrogliaaktivität zu rechnen.

3.2.2 Diskontinuierliche Abnahme von TRT und IRL bei MOG-Tieren

Bei der Zusammenschau der Entwicklung von OCT- und cSLO-Daten über 12 Wochen imponiert darüber hinaus ein auffälliger Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Zugänge: Während die Parameter der cSLO weitestgehend konstant über die Zeit hinweg steigen zeigen sich in der OCT eine Unterbrechung der TRT- und IRL-Abnahme in Woche zwei, in der die Schichtdicken der Retina sogar wieder zunehmen, um danach allerdings wieder kontinuierlich abzunehmen. Wie lässt sich diese episodische Zunahme der Schichtdicke bei mit Blick auf die cSLO-Daten offensichtlich konstant zunehmender Entzündungsaktivität erklären?

Wir gehen davon aus, dass die Schichtendickenabnahme der ersten Woche aus frühen Netzhautschäden aufgrund eines initialen Entzündungsprozesses resultiert. Die vorübergehende Schichtdickenzunahme der Retina erklären wir durch die Annahme einer Ödembildung, wie sie beispielsweise durch Mikrogliaaktivierung und Astrogliose erklärbar ist (73, 74). Konsekutive Neurodegeneration mit axonaler Demyelinisierung könnte der Grund für die wieder kontinuierlich Retinaeschichtdickenabnahme ab Woche 4 in der OCT bei weiter bestehender mikroglialer Aktivierung sein.

3.2.3 Residente Mikroglia oder infiltrierende Monozyten?

Immunzellbewegung im Ganzen wird über komplexe Achsen von Chemokinrezeptoren und ihren Chemokinliganden vermittelt. Dabei gestaltet sich das genaue Expressionsmuster der Achsen zell- und organspezifisch (35, 75). Der in dieser Arbeit untersuchte CX3C-Rezeptor 1 findet sich in Bezug auf das zentralnervöse Immunsystem sowohl auf Mikrogliazellen mit ihrer entwicklungsgeschichtlichen Herkunft aus dem Dottersack als auch auf infiltrierenden Makrophagen bzw. Monozyten, die in ihrer Genese dem hämatopoetischen System zuzuordnen sind. CX3C-Liganden sind dagegen ubiquitär auf Neuronen des ZNS ausgeprägt (30, 35–37, 52, 70, 76).

Von besonderem Interesse in der Erforschung autoimmuner entzündlicher ZNS-Prozesse ist unter anderem die Interaktion myeloischer Zellen. Dabei stellt sich auch immer die Frage nach der genauen Beziehung von aus der Peripherie infiltrierenden Monozyten und der im ZNS residenten Mikroglia. Während einige Autoren bei autoimmunen Prozessen des Nervensystems initial eine Interaktion von T-Zellen und residenter Mikroglia annehmen, der eine Phase von Monozyteninfiltration ins Gehirn folgt (30, 36, 54), priorisieren andere eine Monozyteninfiltration über die Blut-Hirn-Schranke als anfängliches Ereignis eines autoimmunen Entzündungsprozesses, an das sich erst sekundär eine Mikrogliaaktivierung bzw. -interaktion anreicht (39, 49, 77). Wie bereits erwähnt prägen sowohl Monozyten als auch Mikroglia CX3C-1-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aus, weshalb eine Unterscheidung beider Zelltypen per cSLO, die das in den Rezeptor eingebrachte grün fluoreszierende Protein detektiert, in vivo mit den Mitteln der hier angestrebten Untersuchung nicht möglich ist (49, 52). Zwar wurde darauf hingewiesen, dass beispielsweise zu Beginn einer EAE Mikroglia vornehmlich CX3C-R-1 ausprägen während Monozyten CC-R2 aufweisen, doch kommt es im Laufe des Entzündungsprozesses zu einer zügigen Angleichung im Sinne einer Ausprägung von CX3C-R-1 auch auf Monozyten/Makrophagen (49). Mit den vorliegenden Mitteln ist demnach beim Echtzeit-Tracking von myeloischen Zellen per cSLO keine Unterscheidung von Mikroglia und peripher eingewanderten Immunzellen möglich. Soll das Verhältnis der beschriebenen Zellen näher charakterisiert werden, muss das Setting für die Untersuchung modifiziert werden. Beispielhaft ist hier ein Ansatz von Heppner et al. zu nennen, bei dem über Bestrahlung von Versuchstieren und anschließender Knochenmarkstransplantation die Koexistenz von aciclovirresistenten Monozyten und aciclovirsensibler Mikroglia in einem Versuchstier erreicht wurde, was Raum für die Modifikation und Erforschung des Zusammenspiels beider Komponenten des Immunsystems lässt (77). Alternativ ist ebenfalls die Kombination von cSLO- mit Transkriptionsanalysen zur Unterscheidung von Mikroglia und Monozyten denkbar, wie Cruz-Herranz et al. aufzeigen (22).

3.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend ist es uns in der vorliegenden Arbeit gelungen, einen halbautomatischen Algorithmus zu präsentieren, der ein Gleichgewicht zwischen schneller Datenauswertung und angemessener Genauigkeit bietet, indem der Untersucher die Möglichkeit erhält, den Kontrastschwellenwert manuell anzupassen. Dieser Algorithmus kann den Forschungsprozess zur Rolle der Mikroglia-Aktivierung in Modellen von entzündlichen und degenerativen ZNS-Erkrankungen mit Beteiligung der Netzhaut unterstützen.

Auf die MS bezogen trägt die Arbeit dazu bei, einen Aspekt der komplexen Pathologie der Krankheit näher zu erforschen und dadurch sowohl die Entstehung der MS als Ganzes besser zu verstehen als auch mögliche therapeutische Angriffspunkte zu eruieren. Mit den sich zur Zeit in Zulassungsstudien befindlichen Brutonkinase-Inhibitoren stehen eventuell erfolgversprechende Substanzen zur Verfügung, die sowohl auf B- als auch auf myeloische Zellen wirken und somit die MS-Therapie mit ihrem bisherigen Schwerpunkt auf T- als auch B-Zellen ergänzen (24, 78).

Weiterhin könnte genauere Kenntnis über die vielfältige Rolle von Mikroglia im ZNS dabei helfen, nicht nur die MS, sondern allgemeiner degenerative Prozesse des Gehirns besser zu verstehen. Hieraus ergäben sich dann möglicherweise Anknüpfungspunkte für die Frage, wie nicht nur Degeneration vermieden werden, sondern sogar Regeneration unterstützt werden könnte, ein Gebiet, auf dem trotz immenser Forschungsarbeit leider bisher nur rudimentäre Erfolge erzielt werden konnten.

4. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Aktas, O., Ullrich, O., Infante-Duarte, C., Nitsch, R., Zipp, F. (2007). Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol* 64, 185–9. doi:10.1001/archneur.64.2.185
2. Pearce, J.M. (2005). Historical descriptions of multiple sclerosis. *Eur Neurol* 54. doi:10.1159/000087387
3. Krämer G, Besser R. *Multiple Sklerose: Antworten auf die 111 wichtigsten Fragen ; Expertenwissen verständlich gemacht: Hilfen für einen sicheren Umgang mit der Erkrankung*. Stuttgart: TRIAS (2006). 231 p.
4. Makhoul, K., Ahdab, R., Riachi, N., Chalah, M.A., Ayache, S.S. (2020). Tremor in Multiple Sclerosis-An Overview and Future Perspectives. *Brain Sci* 10, 1–13. doi:10.3390/brainsci10100722
5. Klingelhöfer J, editor. *Klinikleitfaden Neurologie, Psychiatrie*. München, Jena: Urban & Fischer (2003). 954 p.
6. Diener H-C, Gerloff C, Dieterich M, Ackermann H, Arendt G, Bach J-P, editors. *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*. Stuttgart: Kohlhammer (2018).
7. Dendrou, C.A., Fugger, L., Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15, 545–58. doi:10.1038/nri3871
8. Aktas, O., Wattjes, M.P., Stangel, M., Hartung, H.-P. (2018). Diagnose der Multiplen Sklerose: Revision der McDonald-Kriterien 2017. *Nervenarzt* 89, 1344–54. doi:10.1007/s00115-018-0550-0
9. Lukas, C., Sailer, M. (2015). Magnetresonanztomografie bei Patienten mit Multipler Sklerose: Relevanz in der Diagnose und Verlaufsbeurteilung. *Fortschr Neurol Psychiatr* 83, 522-32; quiz 533-4. doi:10.1055/s-0035-1553712
10. Amtage F. *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme (2020).
11. Bakshi, R. (2003). Fatigue associated with multiple sclerosis: diagnosis, impact and management. *Mult Scler* 9, 219–27. doi:10.1191/1352458503ms904oa
12. Klineova, S., Lublin, F.D. (2018). Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8. doi:10.1101/cshperspect.a028928
13. Toosy, A.T., Mason, D.F., Miller, D.H. (2014). Optic neuritis. *The Lancet Neurology* 13, 83–99. doi:10.1016/S1474-4422(13)70259-X
14. Kurtzke, J.F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33. doi:10.1212/wnl.33.11.1444
15. Meyer-Moock, S., Feng, Y.-S., Maeurer, M., Dippel, F.-W., Kohlmann, T. (2014). Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol* 14, 1–10. doi:10.1186/1471-2377-14-58
16. Cutter, G.R., Baier, M.L., Rudick, R.A., Cookfair, D.L., Fischer, J.S., Petkau, J., et al. (1999). Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* 122 (Pt 5), 871–82. doi:10.1093/brain/122.5.871
17. Zettl UK, Sieb JP, editors. *Diagnostik und Therapie neurologischer Erkrankungen: State of the Art 2021*. München: Elsevier (2021). 685 p.
18. Alastair Compston, Alasdair Coles (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet* 372, 1502–17.
19. Berthele, A., Hemmer, B. (2021). S2k-Leitlinie: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen. *DGNeurologie* 4, 251–75. doi:10.1007/s42451-021-00334-6

20. Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., et al. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 17, 162–73. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
21. Luo, C., Jian, C., Liao, Y., Huang, Q., Wu, Y., Liu, X., et al. (2017). The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 1661–7. doi:10.2147/NDT.S140634
22. Cruz-Herranz, A., Oertel, F.C., Kim, K., Cantó, E., Timmons, G., Sin, J.H., et al. (2021). Distinctive waves of innate immune response in the retina in experimental autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight* 6. doi:10.1172/jci.insight.149228
23. Guerrero, B.L., Sicotte, N.L. (2020). Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00374
24. Montalban, X., Arnold, D.L., Weber, M.S., Staikov, I., Piasecka-Stryczynska, K., Willmer, J., et al. (2019). Placebo-Controlled Trial of an Oral BTK Inhibitor in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 380, 2406–17. doi:10.1056/NEJMoa1901981
25. Petersen, G., Wittmann, R., Arndt, V., Göppfarth, D. (2014). Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung. *Nervenarzt* 85, 990–8. doi:10.1007/s00115-014-4097-4
26. Solomon, A.J., Naismith, R.T., Cross, A.H. (2019). Misdiagnosis of multiple sclerosis: Impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology* 92, 26–33. doi:10.1212/WNL.0000000000006583
27. Miller, D.H., Weinshenker, B.G., Filippi, M., Banwell, B.L., Cohen, J.A., Freedman, M.S., et al. (2008). Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 14, 1157–74. doi:10.1177/1352458508096878
28. Pravata, E., Riccitelli, G.C., Sestieri, C., Sacco, R., Cianfoni, A., Gobbi, C., et al. (2021). Migraine in Multiple Sclerosis Patients Affects Functional Connectivity of the Brain Circuitry Involved in Pain Processing. *Front Neurol* 12. doi:10.3389/fneur.2021.690300
29. Marrie, R.A., Cohen, J., Stuve, O., Trojano, M., Sørensen, P.S., Reingold, S., et al. (2015). A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: overview. *Mult Scler* 21, 263–81. doi:10.1177/1352458514564491
30. Goldmann, T., Prinz, M. (2013). Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2013, 1–8. doi:10.1155/2013/208093
31. Kezuka, T., Usui, Y., Goto, H. (2011). Analysis of the pathogenesis of experimental autoimmune optic neuritis. *J Biomed Biotechnol* 2011, 294046. doi:10.1155/2011/294046
32. Berer, K., Gerdes, L.A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., et al. (2017). Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 10719–24. doi:10.1073/pnas.1711233114
33. Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., Calabresi, P.A. (2018). Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378, 169–80. doi:10.1056/NEJMr1401483
34. Comi, G., Bar-Or, A., Lassmann, H., Uccelli, A., Hartung, H.P., Montalban, X., et al. (2020). The role of B cells in Multiple Sclerosis and related disorders. *Ann Neurol*, 1–11. doi:10.1002/ana.25927
35. Lee, M., Lee, Y., Song, J., Lee, J., Chang, S.-Y. (2018). Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. *Immune Netw* 18, 1-19. doi:10.4110/in.2018.18.e5
36. Nayak, D., Roth, T.L., McGavern, D.B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32, 367–402. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240

37. Silverman, S.M., Wong, W.T. (2018). Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. Annual review of vision science 4. doi:10.1146/annurev-vision-091517-034425
38. Witherick, J., Wilkins, A., Scolding, N., Kemp, K. (2010). Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. Autoimmune Dis 2011, 1–12. doi:10.4061/2011/164608
39. Nikić, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F.M., et al. (2011). A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Nat Med 17, 495–9. doi:10.1038/nm.2324
40. Wang, P., Xie, K., Wang, C., Bi, J. (2014). Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. Eur Neurol 72, 249–54. doi:10.1159/000363515
41. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2022*. Köln: Thomas Karow (2021).
42. Kremer, D., Küry, P., Hartung, H.-P. (2018).ECTRIMS/ACTRIMS 2017: Closing in on neurorepair in progressive multiple sclerosis. Mult Scler 24, 696–700. doi:10.1177/1352458518768770
43. Kremer, D., Förster, M., Warnke, C., Havla, J., Hohlfeld, R. (2018). Therapie der Multiplen Sklerose: Management der Nebenwirkungen. Deutsches Aerzteblatt Online. doi:10.3238/PersNeuro.2018.09.14.01
44. Jalkh, G., Abi Nahed, R., Macaron, G., Rensel, M. (2020). Safety of Newer Disease Modifying Therapies in Multiple Sclerosis. Vaccines (Basel) 9, 1–30. doi:10.3390/vaccines9010012
45. Sorensen, P.S., Sellebjerg, F. (2019). Pulsed immune reconstitution therapy in multiple sclerosis. Ther Adv Neurol Disord 12, 1756286419836913. doi:10.1177/1756286419836913
46. Kremer, D., Akkermann, R., Küry, P., Dutta, R. (2018). Current advancements in promoting remyelination in multiple sclerosis. Mult Scler, 1-8. doi:10.1177/1352458518800827
47. Steinman, L., Zamvil, S.S. (2006). How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. Ann Neurol 60, 12–21. doi:10.1002/ana.20913
48. Dietrich, M., Aktas, O., Hartung, H.-P., Albrecht, P. (2019). Assessing the anterior visual pathway in optic neuritis: recent experimental and clinical aspects. Curr Opin Neurol, 1–12. doi:10.1097/WCO.0000000000000675
49. Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A.M., Cialic, R., et al. (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. J Exp Med 211, 1533–49. doi:10.1084/jem.20132477
50. Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. Molecular Brain Research 57, 1–9. doi:10.1016/S0169-328X(98)00040-0
51. Liang, K.J., Lee, J.E., Wang, Y.D., Ma, W., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., et al. (2009). Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. Invest Ophthalmol Vis Sci 50, 4444–51. doi:10.1167/iovs.08-3357
52. Liu, S., Li, Z.-w., WEINREB, R.N., Xu, G., Lindsey, J.D., Ye, C., et al. (2012). Tracking retinal microgliosis in models of retinal ganglion cell damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 53, 6254–62. doi:10.1167/iovs.12-9450
53. Horstmann, L., Kuehn, S., Pedreiturria, X., Haak, K., Pfarrer, C., Dick, H.B., et al. (2016). Microglia response in retina and optic nerve in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 298, 32–41. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.06.008

54. Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M., Rossi, F.M. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14, 1142–9. doi:10.1038/nn.2887
55. Chu, F., Shi, M., Zheng, C., Shen, D., Zhu, J., Zheng, X., et al. (2018). The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 318, 1–7. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.02.015
56. Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Sagar, et al. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–92. doi:10.1038/s41586-019-0924-x
57. Vainchtein, I.D., Vinet, J., Brouwer, N., Brendecke, S., Biagini, G., Biber, K., et al. (2014). In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia* 62, 1724–35. doi:10.1002/glia.22711
58. Fujimoto, J., Drexler, W. “Introduction to Optical Coherence Tomography,”. In: Drexler W, Fujimoto JG, editors. *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (2008). p. 1–45.
59. Huang, D., Swanson, E.A., Lin, C.P., Schuman, J.S., Stinson, W.G., Chang, W., et al. (1991). Optical coherence tomography. *Science* 254, 1178–81.
60. Hogg, R. (2006). Quantum-dot diodes provide sources for optical coherence tomography. *SPIE Newsroom*. doi:10.1117/2.1200602.0094
61. Vohnsen, B., Iglesias, I., Artal, P. “Confocal scanning laser ophthalmoscope with adaptive optical wavefront correction,”. In: Conchello J-A, Cogswell CJ, Wilson T, editors. *SPIE* (2003). p. 24–32.
62. Woon, W.H., Fitzke, F.W., Bird, A.C., Marshall, J. (1992). Confocal imaging of the fundus using a scanning laser ophthalmoscope. *The British journal of ophthalmology* 76. doi:10.1136/bjo.76.8.470
63. Dithmar S, Holz FG. *Fluoreszenzangiographie in der Augenheilkunde*. Berlin: Springer (2008).
64. Kokona, D., Jovanovic, J., Ebner, A., Zinkernagel, M.S. (2017). In Vivo Imaging of Cx3cr1gfp/gfp Reporter Mice with Spectral-domain Optical Coherence Tomography and Scanning Laser Ophthalmoscopy. *J Vis Exp*, 1–8. doi:10.3791/55984
65. Dietrich, M., Hecker, C., Hilla, A., Cruz-Herranz, A., Hartung, H.-P., Fischer, D., et al. (2019). Using Optical Coherence Tomography and Optokinetic Response As Structural and Functional Visual System Readouts in Mice and Rats. *J Vis Exp*, 1–7. doi:10.3791/58571
66. Kozłowski, C., Weimer, R.M. (2012). An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS ONE* 7, 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0031814
67. Hecker, C., Dietrich, M., Issberner, A., Hartung, H.-P., Albrecht, P. (2020). Comparison of different optomotor response readouts for visual testing in experimental autoimmune encephalomyelitis-optic neuritis. *J Neuroinflammation* 17, 216. doi:10.1186/s12974-020-01889-z
68. Bosco, A., Romero, C.O., Ambati, B.K., Vetter, M.L. (2015). In vivo dynamics of retinal microglial activation during neurodegeneration: confocal ophthalmoscopic imaging and cell morphometry in mouse glaucoma. *J Vis Exp*, 1-14. doi:10.3791/52731
69. Chun, B.Y., Kim, J.-H., Nam, Y., Huh, M.-I., Han, S., Suk, K. (2015). Pathological Involvement of Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in the Demyelinating Optic Neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56, 3691–8. doi:10.1167/iops.15-16851
70. Kim, J.W., Nam, S.M., Yoo, D.Y., Jung, H.Y., Hwang, I.K., Seong, J.K., et al. (2018). Strain-specific differential expression of astrocytes and microglia in the mouse hippocampus. *Brain Behav* 8, 1-13. doi:10.1002/brb3.961

71. Groh, J., Klein, D., Berve, K., West, B.L., Martini, R. (2019). Targeting microglia attenuates neuroinflammation-related neural damage in mice carrying human PLP1 mutations. *Glia* 67, 277–90. doi:10.1002/glia.23539
72. Yang, H.S., Onos, K.D., Choi, K., Keezer, K.J., Skelly, D.A., Carter, G.W., et al. (2021). Natural genetic variation determines microglia heterogeneity in wild-derived mouse models of Alzheimer's disease. *Cell Rep* 34, 108739. doi:10.1016/j.celrep.2021.108739
73. Cruz-Herranz, A., Dietrich, M., Hilla, A.M., Yiu, H.H., Levin, M.H., Hecker, C., et al. (2019). Monitoring retinal changes with optical coherence tomography predicts neuronal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 16, 1273. doi:10.1186/s12974-019-1583-4
74. Manogaran, P., Samardzija, M., Schad, A.N., Wicki, C.A., Walker-Egger, C., Rudin, M., et al. (2019). Retinal pathology in experimental optic neuritis is characterized by retrograde degeneration and gliosis. *Acta Neuropathol Commun* 7, 116. doi:10.1186/s40478-019-0768-5
75. Limatola, C., Ransohoff, R.M. (2014). Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Front Cell Neurosci* 8, 1–8. doi:10.3389/fncel.2014.00229
76. Mildner, A., Mack, M., Schmidt, H., Brück, W., Djukic, M., Zabel, M.D., et al. (2009). CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 132, 2487–500. doi:10.1093/brain/awp144
77. Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., et al. (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 11, 146–52. doi:10.1038/nm1177
78. Weber, M.S., Nicholas, J.A., Yeaman, M.R. (2021). Balancing Potential Benefits and Risks of Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Therapies in Multiple Sclerosis During the COVID-19 Pandemic. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 8. doi:10.1212/NXI.0000000000001067