

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

Modulierende Effekte von Cladribin (2-Chlor-2'-desoxyadenosin)
auf primäre Rattenmikrogliazellen und primäre Rattenastrozyten
hinsichtlich Multipler Sklerose

Dissertation

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

vorgelegt von
Julia Heike Janocha
2025

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

gez.:

Dekan Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. phil. Patrick Küry

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit unklarer Ätiologie. Es existiert bisher keine kausale Therapie. Durch Inflammation, Demyelinisierung und nachfolgender axonaler Schädigung und gliöser Narbenbildung kommt es zu einer Vielzahl möglicher neurologischer Symptome und fortschreitender Behinderung bei variablem Krankheitsverlauf. Neben Lymphozyten spielen auch ZNS-ansässigen Zellen wie Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Astrozyten eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der MS, wobei sie sowohl zum Entzündungsgeschehen als auch zu einer neurosupportiven Atmosphäre beitragen können. Das liquorgängige Purinanalogon Cladribin ist seit 2017 in der verlaufsmodifizierenden Therapie der hochaktiven, schubförmig remittierenden MS (RRMS) zugelassen. Es reduziert nachweislich die Schubrate sowie die Behinderungszunahme. Neben seiner gut beschriebenen Wirkungsweise auf Lymphozyten liegen Hinweise darauf vor, dass Cladribin auch darüber hinaus in der Lage zu sein scheint, ZNS-ansässige Zellarten, wie Mikrogliazellen und Astrozyten, in ihrem Verhalten zu beeinflussen. Um mögliche, nicht-zytotoxische Cladribin-induzierte Effekte auf Mikrogliazellen und Astrozyten zu untersuchen, erfolgte im Rahmen dieses Dissertationsprojektes die Exposition primärer Mikrogliazellen und Astrozyten neugeborener Wistar-Ratten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cladribin. Die Ergebnisse zeigten, dass Cladribin zeit- und konzentrationsabhängig die mikrogliale und astrozytäre Zellzahl reduziert und zudem die Proliferation von Astrozyten hemmt. Cladribin führte in naiven Mikrogliazellen zur erhöhten Genexpression des neurosupportiv wirkenden IGF-1, jedoch ohne Beeinflussung seiner Sekretion, sowie zur Induktion der mit der Myelinphagozytose assoziierten Gene TREM2, MERTK und P2Y6. Dies lässt vermuten, dass Cladribin in Mikrogliazellen zumindest langfristig einen antiinflammatorischen, restaurativen Phänotyp induzieren könnte. In Astrozyten führte Cladribin in einer hohen Konzentration allerdings zu einer verringerten Genexpression von IGF-1 und TGF- β . Zudem war die Genexpression, aber nicht Sekretion von IL-6, erhöht. Ebenfalls induzierte Cladribin die Genexpression des Chemokins CXCL10. In proinflammatorisch polarisierten Astrozyten erhöhte Cladribin die Genexpression von IL-6, des neuroprotektiven PTX3 sowie des für gliöse Narbenbildung bedeutsamen SOX9. Eine eindeutige Tendenz hinsichtlich pro- oder antiinflammatorischer Modulation war in Astrozyten jedoch noch nicht zu erkennen. Diese Dissertationsarbeit untermauert weiter die Annahme, dass Cladribin in der Lage zu sein scheint, direkten Einfluss auf ZNS-ansässige Zellarten zu nehmen, und so möglicherweise einen Teil seiner Wirkung in der Therapie der RRMS entfaltet.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating autoimmune disease of the central nervous system (CNS) with an unclear aetiology. There is currently no causal therapy. Inflammation, demyelination and subsequent axonal damage and glial scarring lead to a variety of possible neurological symptoms and progressive disability with variable disease progression. In addition to lymphocytes, CNS-derived cells such as oligodendrocytes, microglial cells and astrocytes also play an important role in the pathogenesis of MS, whereby they can contribute both to the inflammatory process and to a neurosupportive atmosphere. The liquid-sensitive purine analogue cladribine has been approved for the course-modifying treatment of highly active relapsing-remitting MS (RRMS) since 2017. It has been shown to reduce the relapse rate and the increase in disability. In addition to its well-described mode of action on lymphocytes, there is evidence that cladribine also appears to be able to influence the behaviour of CNS-derived cell types such as microglial cells and astrocytes. In order to investigate possible non-cytotoxic cladribine-induced effects on microglial cells and astrocytes, primary microglial cells and astrocytes of newborn Wistar rats were exposed to different concentrations of cladribine as part of this dissertation project. The results showed that cladribine reduced the microglial and astrocytic cell number in a time- and concentration-dependent manner and also inhibited the proliferation of astrocytes. In naive microglial cells, cladribine led to increased gene expression of the neurosupportive IGF-1, but without influencing its secretion, and to the induction of the genes TREM2, MERTK and P2Y6, which are associated with myelin phagocytosis. This suggests that cladribine may induce an anti-inflammatory, restorative phenotype in microglial cells, at least in the long term. In astrocytes, however, cladribine at a high concentration led to reduced gene expression of IGF-1 and TGF- β . In addition, gene expression, but not secretion of IL-6, was increased. Cladribine also induced the gene expression of the chemokine CXCL10. In pro-inflammatory polarised astrocytes, cladribine increased the gene expression of IL-6, the neuroprotective PTX3 and SOX9, which is important for glial scarring. However, a clear tendency towards pro- or anti-inflammatory modulation was not yet recognisable in astrocytes. This dissertation further supports the assumption that cladribine appears to be able to exert a direct influence on CNS-resident cell types and thus possibly exerts part of its effect in the treatment of RRMS.

Abkürzungsverzeichnis

2-CdA	2-Chlor-2'-desoxyadenosin	DCK	Desoxycytidinkinase
2-Cd-ADP	2-Chlor-2'-desoxyadenosindiphosphat	ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
2-Cd-AMP	2-Chlor-2'-desoxyadenosinmonophosphat	DHOD	Dihydroorotat Dehydrogenase
2-Cd-ATP	2-Chlor-2'-desoxyadenosintriphosphat	DMT	Krankheitsmodifizierende Therapie, <i>disease-modifying therapy</i>
5'NT	5'-Nukleotidase	DMD	Krankheitsmodifizierende Medikamente, <i>disease-modifying drugs</i>
µg	Mikrogramm	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
µl	Mikroliter	DMSO	Dimethylsulfoxid
µM	Mikromolar	DNS	Desoxyribonukleinsäure
Abb.	Abbildung	dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
ADA-Defizienz	Adenosin-Desaminase-Defizienz	EBV	Ebstein-Barr-Virus
ADORA3A	Adenosin-A ₃ -Rezeptor	EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ACAN	Aggrecan	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis	ELISA	Enzymgekoppeltes immunologisches Nachweisverfahren, <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ANOVA	Varianzanalyse, <i>Analysis of variance</i>	ENT	<i>Equilibrative nucleosid transporter</i>
ARG1	Arginase-1	Env	Hüllprotein, <i>Envelope protein</i>
AQP4	Aquaporin-4	FCS	Fetales Kälberserum
bC	<i>Buffer</i> Cladribin	GFAP	Saures Gliafaserprotein, <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
BCAN	Brevican	GKS	Glukokortikosteroid
BHS	Blut-Hirn-Schranke	GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>	h	Stunde, <i>Hour</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	HERVs	Humane endogene Retroviren
C	Cladribin	HERV-W	humanes endogenes Retrovirus der Familie W
C1q	Komplementfaktor C1q	HHV6	Humanes Herpesvirus 6
CCL5	CC-Chemokin-Ligand-5	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
CD20	<i>Cluster of Differentiation 20</i>	HLA-System	Humanes Leukozytenantigen-System
CNT	<i>Concentrative nucleosid transporter</i>	HPRT-1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
CDH2	Cadherin-2	HSV1	Herpes-simplex-Virus 1
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	IFN-γ	Interferon-γ
CHST11	Kohlenhydrat-Sulfotransferase 11	IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1, <i>Insulin-like growth factor 1</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie		
cm	Zentimeter		
cm²	Quadratzentimeter		
CO₂	Kohlenstoffdioxid		
CSGALNACT	Chondroitin-N-Acetylgalactosaminyltransferase 1		
CSG	Chondroitinsulfat-Proteoglykane		
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>		
d	Tag, <i>Day</i>		
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol		

IL	Interleukin	PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase	PRMS	Progressiv rezidivierende Multiple Sklerose
kg	Kilogramm	PS	Phosphatidylserin
Ki67	Kiel-Antigen Nr. 67	qRT-PCR	Quantitative <i>Real Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom	PTX3	Pentraxin 3
K.O.	<i>Knockout</i>	RNS	Ribonukleinsäure
LCN2	Lipocalin-2	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
LPS	Lipopolysaccharid	RR	Relatives Risiko
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung, <i>magnetic-activated cell sorting</i>	RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>	RT	Raumtemperatur
MERTK	Proto-Onkogen-Tyrosin-Proteinkinase MER	s	Sekunde
MG	Mikrogliazellen	S1P1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1
mg	Milligramm	SDS	Sequenz-Detektionssystem
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex, <i>Major Histocompatibility Complex</i>	SEM	Standardfehler, <i>standard error of the mean</i>
min	Minute	SOX9	<i>SRY-box transcription factor 9</i>
ml	Milliliter	SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
mm	Millimeter	SR	<i>Scavenger</i> -Rezeptoren
mM	Millimolar	SIRT	Selektive Immunrekonstitutions-Therapie
mmol	Millimol	TC	Triethoxycaprylylsilane
MOGAD	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antikörper-assoziierte Erkrankung	TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
MRT	Magnetresonanztomographie	TH-Zelle	T-Helferzelle
MS	Multiple Sklerose	TLR	Toll-like-Rezeptoren
NCAN	Neurocan	TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
NDS	Normales Eselserum, <i>normal donkey serum</i>	TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
NEDA	Kein Nachweis von Krankheitsaktivität, <i>No evidence of disease activity</i>	U	Einheiten, <i>Units</i>
NGS	Normales Ziegenserum, <i>Normal goat serum</i>	UpM	Umdrehungen pro Minute
ng	Nanogram	UK	<i>United Kingdom</i>
nm	Nanometer	USA	<i>United States of America</i>
NMOSD	Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen	VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
NO	Stickstoffmonoxid	VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
NOD	<i>NOD-like</i> -Rezeptoren	VZV	Varizella-Zoster-Virus
NTs	Nukleosidtransporter	XYLT1	Xylosyltransferase-1
OCT	Optische Kohärenztomographie	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
ODC	Ornithindecaboxylase	ZNS	Zentrales Nervensystem
OL	Oligodendrozyt	ΔΔCt	<i>Comparative cycle threshold method</i>
OVZ	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle	°C	Grad Celsius
P2X7	P2X-Purinorezeptor 7	%	Prozent
P2Y6	P2Y-Purinorezeptor 6	Ø	Durchmesser
P2Y12	P2Y-Purinorezeptor 12		
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>Phosphate-buffered-saline</i>		
PCA	Polycarbonat		
PNS	Peripheres Nervensystem		
PDL	Poly-D-Lysin		
PFA	Paraformaldehyd		
pmol	Pikomol		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das humane Nervensystem.....	1
1.1.1	Überblick über den Aufbau des Nervensystems, seine Zelltypen und Myelinisierungsprozesse	1
1.1.2	Mikrogliazellen: Beschreibung und Funktionen im gesunden ZNS	2
1.1.3	Astrozyten: Beschreibung und Funktionen im gesunden ZNS.....	3
1.2	Multiple Sklerose	4
1.2.1	Definition.....	4
1.2.2	Epidemiologie	4
1.2.3	Ätiologie	5
1.2.4	Verlaufsformen, Symptomatik und Schweregradeinteilung.....	6
1.2.5	Diagnostik und Differentialdiagnosen	8
1.2.6	Pathogenese und Histopathologie.....	8
1.2.7	Die Rolle von Mikrogliazellen in Neuroinflammation und MS.....	10
1.2.8	Die Rolle von Astrozyten in Neuroinflammation und MS	12
1.2.9	Therapieoptionen	15
1.3	Cladribin	17
1.3.1	Allgemeiner Wirkmechanismus	17
1.3.2	Cladribin als immunmodulierende Therapie in der MS	19
1.4	Ziele der Arbeit	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Material.....	24
2.1.1	Versuchstiere	24
2.1.2	Chemikalien	24
2.1.3	Medien und Seren.....	25
2.1.4	Zur Stimulation verwendete Substanzen	26
2.1.5	MACS Materialien	26
2.1.6	Materialien der Immunzytochemie.....	26
2.1.7	Antikörper	26
2.1.8	PCR Primer.....	27
2.1.9	Materialien für die quantitative <i>Real Time</i> Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	28
2.1.10	ELISA Sets	28
2.1.11	Laborbedarf	28
2.1.12	Gerätschaften	29
2.1.13	Software.....	30

2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Zusammensetzung und Herstellung der zur Stimulation verwendeten Substanzen	30
2.2.2	Beschichtung von PDL-Zellkulturplatten.....	31
2.2.3	Methoden der Zellkultur	31
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.5	Immunzytochemie	42
2.2.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)	43
2.2.7	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Reinheit der Zellkulturen	46
3.2	Mikrogliazellen	47
3.2.1	Cladribin reduziert zeit- und konzentrationsabhängig die mikrogliale Zellzahl.....	47
3.2.2	Cladribin moduliert die Genexpression von Mikrogliazellen: Regeneration, Phagozytose und Proinflammation	49
3.2.3	Cladribin verändert nicht die Genexpression von mikroglialen Purin- und Adenosinrezeptoren mit Ausnahme für P2Y6	52
3.2.4	Cladribin führt in mit LPS vorstimulierten Mikrogliazellen nicht zu einer Verringerung der iNOS-Expression	53
3.3	Astrozyten.....	56
3.3.1	Cladribin reduziert zeit- und konzentrationsabhängig die astrozytäre Zellzahl und hemmt die astrozytäre Proliferation	56
3.3.2	Cladribin moduliert die Genexpression in naiven Astrozyten: Regeneration und Proinflammation	59
3.3.3	Cladribin moduliert die Genexpression in naiven Astrozyten: Chemokine	62
3.3.4	Cladribin moduliert die Genexpression in mit TNF- α vorstimulierten Astrozyten: Regeneration und Proinflammation.....	63
3.3.5	Effekte von Cladribin auf die Genexpression in mit TNF- α vorstimulierten Astrozyten: Glianarbe	68
4	Diskussion.....	71
4.1	Mikrogliazellen	72
4.1.1	Die Reduktion der mikroglialen Zellzahl durch Cladribin ist zeit- und konzentrationsabhängig	72
4.1.2	Cladribin induziert die Genexpression von IGF-1 sowie der mit Myelinphagozytose assoziierten Gene MERTK, TREM2 und P2Y6 in Mikrogliazellen	73
4.1.3	Cladribin verringert in proinflammatorisch polarisierten Mikrogliazellen nicht die iNOS-Expression.....	77
4.2	Astrozyten.....	78

4.2.1	Cladribin reduziert die astrozytäre Zellzahl und Proliferation in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration	78
4.2.2	Modulation der Genexpression von naiven und proinflammatorisch polarisierten Astrozyten durch Cladribin	79
4.2.3	Cladribin erhöht die Genexpression des mit gliöser Narbenbildung assoziierten Transkriptionsfaktors SOX9 in naiven und proinflammatorisch polarisierten Astrozyten	82
4.3	Limitationen der Studie und Ausblick	83
4.4	Schlussfolgerung	86
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Das humane Nervensystem

1.1.1 Überblick über den Aufbau des Nervensystems, seine Zelltypen und Myelinisierungsprozesse

Das Nervensystem ist das komplexeste Organsystem des menschlichen Körpers und zuständig für die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen sowie die Planung und Ausführung von Handlungen. Es lässt sich unterteilen in das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark sowie in das periphere Nervensystem (PNS), die Gesamtheit aller Neuronen und Gliazellen außerhalb des ZNS. Funktionell eingeteilt werden sowohl ZNS als auch PNS in einen somatischen und einen vegetativen Anteil (Jalosinski et al., 2008; Blandford et al., 2023). Makroskopisch können ZNS und PNS in graue und weiße Substanz eingeteilt werden. Die graue Substanz enthält die Zellkörper der Neuronen, die weiße Substanz die Nervenfasern. Die Zellen des zentralen Nervensystems lassen sich einteilen in Neurone und Gliazellen (Gowers, 1897). Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper, Dendriten und einem Axon (Gowers, 1897) und ist in der Lage, Reize in Form von Aktionspotentialen weiterzuleiten und an andere Zellen über chemische oder elektrische Synapsen weiterzugeben. Alle Zellen, die keine Aktionspotentiale weiterleiten oder generieren können, werden Gliazellen genannt und lassen sich einteilen in Makroglia und Mikroglia (MG). Zu den Makroglia, die neuroepithelialen Ursprungs sind (Rowitch & Kriegstein, 2010) zählen Astrozyten, Oligodendrozyten (OL) und deren Vorläuferzellen sowie Ependymzellen und Radiärglia (Penfield, 1925). Mikroglia sind dagegen mesodermalen Ursprungs (Alliot et al., 1999). Die Aufgaben der Gliazellen sind vielfältig und umfassen neben der Aufrechterhaltung der Gewebearchitektur auch Stoffwechsel- sowie Abwehrfunktionen und die Ausübung neurosupportiver Aufgaben (Demmings et al., 2025). Innerhalb der Gliazellen stellen Astrozyten die größte Subpopulation dar und erfüllen sowohl im gesunden als auch im kranken Nervensystem zahlreiche Aufgaben, darunter die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) oder die gliöse Narbenbildung, unter Interaktion mit anderen Zellen des ZNS (Linnerbauer et al., 2020). Mikrogliazellen sind als Teil des angeborenen Immunsystems durch die Elimination von Pathogenen an der Aufrechterhaltung des gesunden Milieus innerhalb des ZNS beteiligt und nehmen durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen oder Chemokinen Einfluss auf Entzündungsreaktionen im ZNS (Hanisch, 2002). Oligodendrozyten bilden mit ihren

Zellmembranen die lipidreichen Myelinscheiden um die Axone der Neuronen des ZNS (De Robertis et al., 1958) und stellen eine heterogene Zellpopulation mit Unterschieden sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihren Funktionen dar (Weng et al., 2025). Oligodendrozyten entstehen aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZ), welche u.a. in der ventrikulären Zone des Rückenmarks sowie des Gehirns ihren Ursprung haben und von dort aus das ZNS besiedeln (Wang et al., 2023). Die Migration wird dabei gesteuert durch Wachstumsfaktoren, Chemokine und Proteine der Extrazellulärmatrix (Bradl & Lassmann, 2010). Morphologisch unterscheiden sich Oligodendrozyten abhängig von ihrem Ursprungsort sowie weiteren Einflussfaktoren wie ihrem Alter oder ihrer Verortung innerhalb des ZNS und dem Zustand ihrer Umgebung (entzündlich oder nicht entzündlich) (Seeker & Williams, 2022). Aus *OVZ-Pools* entwickeln sich auch im adulten Gehirn durch Proliferation und Zellteilung neue, reife, myelinbildende Oligodendrozyten (Kuhn et al., 2019). Das von den Oligodendrozyten gebildete Myelin bildet eine Isolationsschicht um die Axone und ist essenziell für eine rasche Weiterleitung von Aktionspotentialen zwischen Neuronen (Bunge, 1968). Dabei erfolgt die saltatorische Erregungsweiterleitung zwischen myelinisierten Abschnitten und den dazwischen liegenden, unmyelinisierten Ranvier-Schnürringen (Ranvier, 1871). Zudem spielt Myelin eine bedeutende Rolle im Rahmen von Stoffwechselprozessen sowie der Energiegewinnung von Nervenzellen und hat zudem auch immunmodulatorische Funktionen (Kuhn et al., 2019). Aufgrund ihres geringen Gehaltes an Antioxidantien zeigen Oligodendrozyten eine hohe Anfälligkeit für oxidativen Stress und sind daher im Rahmen von entzündlichen Vorgängen im ZNS besonders gefährdet (Kuhn et al., 2019). Vermittelt durch unterschiedliche Pathomechanismen (s. Abschnitt 1.2.6) kommt es im Rahmen der Multiplen Sklerose (MS) zur Demyelinisierung und einer Zerstörung der Oligodendrozyten (Lucchinetti et al., 2000), dem charakteristischen histopathologischen Merkmal dieser Erkrankung (Saxena et al., 2008). Hierbei kommt es zusätzlich zu einer Aktivierung ruhender Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die daraufhin beginnen zu proliferieren, in Bereiche der Demyelinisierung zu migrieren und als reife Oligodendrozyten eine neue, dünnere Myelinschicht zu bilden (Franklin & Ffrench-Constant, 2017). Dieser Prozess wird als Remyelinisierung bezeichnet und gestaltet sich im Kontext der MS insuffizient.

1.1.2 Mikrogliazellen: Beschreibung und Funktionen im gesunden ZNS

Mikrogliazellen, die ortsansässigen Makrophagen des ZNS und Teil des angeborenen Immunsystems, sind an vielfältigen Prozessen innerhalb des gesunden und kranken ZNS beteiligt und wurden durch den spanischen Mediziner Pío del Río Hortega

erstbeschrieben (del Rio-Hortega, 1932). Ihre Hauptaufgabe ist die Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS. Der Anteil von Mikrogliazellen an der Gesamtzellzahl des ZNS beträgt 10-15 % (Orihuela et al., 2016). Sie haben ihren Ursprung in myeloischen Vorläuferzellen des Dottersacks und besiedeln während der frühen Embryogenese, bevor sich die Blut-Hirn-Schranke schließt, das ZNS (Alliot et al., 1999). Mikrogliazellen sind eine Zellpopulation, die in der Lage ist, sich ständig durch Apoptose und proliferative Prozesse zu erneuern, sowohl im gesunden als auch im kranken ZNS (Askew et al., 2017). Im gesunden ZNS befinden sich Mikrogliazellen in einem ruhenden Zustand und überwachen das sie umgebende Milieu mit Hilfe ihres Sensoms (Hickman et al., 2013). Dabei bilden sie dünne Zellausläufer und migrieren durch das Parenchym, ständig auf der Suche nach Agenzen, die die Homöostase des ZNS bedrohen (Hickman et al., 2018). Hierfür stehen Mikrogliazellen in einem engen Austausch mit allen Zellarten des ZNS (Liddel et al., 2017; Marinelli et al., 2019). So beeinflussen Mikrogliazellen in engem Zusammenspiel mit Neuronen die synaptische Plastizität und somit die normale Funktionsfähigkeit des ZNS indem sie u.a. an der Eliminierung nicht-funktionsfähiger Synapsen (Borst et al., 2021) oder hemmender Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Nguyen et al., 2020) beteiligt sind. Mikrogliazellen sekretieren im gesunden, adulten ZNS das Peptidhormon *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), welches unter anderem die oligodendrogliale Reifung fördert und somit im Kontext der MS Remyelinisierungsprozesse vermittelt (Lovett-Racke et al., 1998; Miron et al., 2013).

1.1.3 Astrozyten: Beschreibung und Funktionen im gesunden ZNS

Astrozyten bilden mit 80 % den größten Anteil der Gliazellen im ZNS, haben eine Stützfunktion und sind neben der Bildung der Blut-Hirn-Schranke entscheidend an neuronalen Signal- und Stoffwechselwegen beteiligt (Allen & Barres, 2009). Astrozyten sind Zellen ektodermalen und neuroepithelialen Ursprungs und entstehen aus astroglären Vorläuferzellen, die während der Embryogenese und postnatal das ZNS besiedeln und prä- sowie postnatal durch Zellteilung das dichte Netzwerk aus Astrozyten bilden (Verkhatsky et al., 2021; Zheng et al., 2022). Charakteristisch ist dabei die Ausbildung von langen Zytoplasmaausläufern, durch die die Astrozyten mit anderen Zellen, insbesondere Neuronen, in Kontakt stehen (Krzisch et al., 2015). Je nach Lokalisation im ZNS zeigen sie dabei Unterschiede in ihrer Morphologie. So finden sich in der weißen Substanz Astrozyten vom fibrillären Typ mit schlanken Zytoplasmafortsätzen, in der grauen Substanz Astrozyten vom protoplasmatischen Typ mit kurzen und verzweigten Zytoplasmafortsätzen (Andriezen, 1893). Neben den strukturellen Funktionen wie der Bildung der Blut-Hirn-Schranke und ihrer Stützfunktion,

sind Astrozyten von Bedeutung im Stoffwechsel und in der Aufrechterhaltung der Homöostase von Neuronen sowie in der Modulierung der synaptischen Plastizität. So kontrollieren sie beispielsweise die extrazelluläre Kaliumkonzentration (Hertz, 1965; Walz, 2000) und sind am Glutamatstoffwechsel beteiligt (Hansson & Rönnbäck, 1995), wodurch sie zur normalen neuronalen Funktion beitragen. In ihrer Zellmembran tragen sie das Transmembranprotein Aquaporin-4 (AQP4) (Nielsen et al., 1997), über welches sie Einfluss nehmen auf den Wasserhaushalt sowie Migrationsvorgänge innerhalb des ZNS (Nagelhus & Ottersen, 2013). Des Weiteren ist bekannt, dass Astrozyten auch immunologische Funktionen übernehmen und an der Pathogenese von entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen des ZNS beteiligt sind (Karve et al., 2016; Guerrero-García, 2020).

1.2 Multiple Sklerose

1.2.1 Definition

Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Autoimmunerkrankung des ZNS, deren Ursache bis heute ungeklärt ist. Kennzeichnend für die MS ist eine chronische Neuroinflammation, die schließlich zur Zerstörung von Myelinscheiden und nachfolgend, über die Schädigung von Axonen, zur irreversiblen Neurodegeneration führt. Die hierdurch entstehenden, multiplen fokalen Läsionen können im gesamten ZNS auftreten und, abhängig von ihrer Lokalisation, zu einer Vielzahl unterschiedlicher neurologischer Symptome und zu Behinderungen unterschiedlichen Ausmaßes führen.

1.2.2 Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz beträgt rund 2,8 Millionen Menschen, wobei der Anteil an weiblichen Erkrankten mit 69 % deutlich über dem Anteil der männlichen Betroffenen liegt (The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). Mögliche Gründe hierfür könnten beispielsweise in Unterschieden in der Zusammensetzung und Funktionsweise des Immunsystems von Männern und Frauen, aber auch in der abweichenden Exposition gegenüber Umweltfaktoren zwischen den Geschlechtern, wie beispielsweise Medikamenten oder Kosmetika, liegen (Greer & McCombe, 2011). Betrachtet man die Prävalenz von MS in unterschiedlichen Ländern, so fallen deutliche Unterschiede auf. Deutschland liegt im weltweiten Vergleich mit einer Prävalenz von 303 pro 100 000 an zweiter Stelle, während die Prävalenz in anderen europäischen Staaten wie Portugal

oder der Ukraine bei unter 100 pro 100 000 liegt (The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). In der weltweiten Prävalenz zeigt sich, abhängig von den Breitengraden, eine niedrige Prävalenz am Äquator, die dann mit zunehmender Entfernung vom nullten Breitengrad ansteigt (The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). MS kann sich grundsätzlich in jeder Altersstufe manifestieren, wobei das mittlere Erkrankungsalter weltweit bei 32 Jahren liegt und mindestens 1,5 % der betroffenen Patient*innen Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren sind. (The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). Somit gehört MS zu den häufigsten Gründen für eine Behinderung bei jungen Menschen und führt durch die daraus resultierende lange Zeitspanne, in der die Patient*innen mit der Erkrankung leben, zu erheblichen Beeinträchtigungen in der Lebensplanung der Betroffenen (World Health Organization, 2008).

1.2.3 Ätiologie

Trotz intensiver Forschung bleibt die Ätiologie der MS weiterhin unklar. Es wird angenommen, dass ein multifaktorielles Zusammenspiel von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren die Entstehung der Erkrankung begünstigt (Goodin et al., 2021), jedoch wurde bis heute kein kausaler Faktor identifiziert. Verschiedene virale Infektionen werden mit der Pathogenese der MS assoziiert (Makhani et al., 2016). So wird ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und der Entstehung von MS schon lange diskutiert (Warner & Carp, 1981). Das Erkrankungsrisiko für MS scheint nach vorausgegangener EBV-Infektion 32-fach erhöht, was zu der Annahme führt, dass es sich bei EBV um einen entscheidenden Auslöser von MS handeln könnte (Bjornevik et al., 2022). Neben der Rolle als potenzieller *Trigger* der MS, wird EBV auch eine mögliche Rolle als *Driver* zugeschrieben (Soldan & Lieberman, 2023). Ebenfalls sind humane endogene Retroviren (HERVs) mit der Entstehung und/oder dem Fortschreiten der MS assoziiert. Hierunter sind die stärksten Assoziationen für das humane endogene Retrovirus der Familie W (HERV-W) und im Speziellen für sein Hüllprotein HERV-W Env beschrieben (Perron et al., 1989; Brudek et al., 2009). *In vitro* Studien in myelinisierten Ko-Kulturen sowie *in vivo* Studien in einem transgenen Mausmodell, welches die im erkrankten ZNS vorherrschende HERV-W Env Aktivität abbildete, zeigten, dass HERV-W Env u.a. über die Beeinflussung von Mikrogliazellen zur Demyelinisierung und axonaler Schädigung beiträgt (Kremer et al., 2019) sowie über Effekte auf Oligodendrozyten Myelinisierungsprozesse beeinträchtigt und zur Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten führt (Gruchot et al., 2023). Neben HERV-W Env und EBV scheinen weitere Viren in der Pathogenese der MS von

Bedeutung zu sein, darunter das Varizella-Zoster-Virus (VZV) (Maple et al., 2024), das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV1) (Koros et al., 2014) sowie das humane Herpesvirus 6 (HHV6) (Grut et al., 2024). Abgesehen von den genannten viralen Einflüssen, scheinen Umwelteinflüsse einen Beitrag zur Krankheitsätiologie der MS zu leisten. So stellt beispielsweise ein Mangel an Vitamin D einen Risikofaktor für die Entstehung von MS dar (Goldberg, 1974). Es konnte gezeigt werden, dass Personen mit einem hohen Serumspiegel an 25-Hydroxy-Vitamin-D eine geringere Wahrscheinlichkeit hatten, an MS zu erkranken, als Personen mit niedrigen Serumspiegeln (Munger et al., 2006). Eine verminderte Exposition gegenüber Sonnenlicht scheint das Risiko an MS zu erkranken zu erhöhen (Hedström et al., 2020), eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Prävalenz der MS abhängig vom Breitengrad. So konnten Migrationsstudien zeigen, dass Migrant*innen, die zum Zeitpunkt der Migration unter 15 Jahre alt waren, das Erkrankungsrisiko des Migrationslandes annahmen, während erwachsene Migrant*innen das Erkrankungsrisiko des Heimatlandes behielten (Dean, 1967; Dean & Kurtzke, 1971). Als weitere, vermeidbare Risikofaktoren, die das Erkrankungsrisiko erhöhen, sind die Exposition gegenüber Tabakrauch (Hedström et al., 2016) sowie ein erhöhter *Body-Mass-Index* (BMI) in der Kindheit zu nennen (Munger et al., 2013). Zudem werden auch genetische Faktoren hinsichtlich der Krankheitsentstehung der MS diskutiert. So konnte beobachtet werden, dass Familienangehörige von MS Patient*innen ein gegenüber der Allgemeinbevölkerung erhöhtes Erkrankungsrisiko aufwiesen (Robertson et al., 1996). Auf individueller Ebene konnten Variationen im humanen Leukozytenantigen-System (HLA-System) mit der Entstehung von MS assoziiert werden (Bertrams & Kuwert, 1972), wobei hierunter individuelle Unterschiede in Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II Allelen, beispielsweise HLA-DRB1*15:01, einen starken Effekt auf die Krankheitsentstehung zu haben scheinen (Sawcer et al., 2011). Des Weiteren führten genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifikation von über 200 Genloki, die in Zusammenhang mit einer MS-Erkrankung gebracht werden (Kim & Patsopoulos, 2022). In einer GWAS aus dem Jahr 2019 gelang es erstmalig eine mit MS assoziierte Genvariante auf dem X-Chromosom nachzuweisen, auch wenn dies allein nicht ausreichend erklärt, warum mehr weibliche als männliche Personen an MS erkranken (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019).

1.2.4 Verlaufsformen, Symptomatik und Schweregradeinteilung

MS wird anhand des klinischen Auftretens der sogenannten Schübe und deren Remissionsstatus in verschiedene Verlaufsformen unterteilt. Die Einteilung umfasst die

Formen schubförmig remittierende MS (RRMS), sekundär progrediente MS (SPMS), primär progrediente MS (PPMS), progressiv rezidivierende MS (PRMS) sowie das klinisch-isolierte Syndrom (KIS) und bezieht auch die Krankheitsaktivität mit ein (Lublin et al., 2014). Die RRMS ist mit 85 % die am häufigsten auftretende Form der MS (The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). Diese zeichnet sich aus durch Schübe, die charakterisiert sind durch mindestens 24 Stunden (h) anhaltende, und ohne Fieber oder andere Zeichen einer Entzündung auftretende, neue neurologische Symptome, die sich entweder komplett oder inkomplett zurückbilden. Zwischen den Schüben kommt es zu keiner Krankheitsprogression (Lublin et al., 2014). Die RRMS geht zu 80 % im weiteren Krankheitsverlauf in die SPMS über, die gekennzeichnet ist durch eine stetig fortschreitende Zunahme neurologischer Symptome mit oder ohne aufgesetzten Schüben. Eine Minderheit an Patient*innen (ca. 15 %) weist direkt zu Erkrankungsbeginn eine schwere Verlaufsform auf, die PPMS. Hierbei kommt es zu einer stetig fortschreitenden neurologischen Symptomatik ohne zwischenzeitliche Phasen einer vollständigen Remission der Symptome. Bestenfalls sind hier intermittierende Plateauphasen zu beobachten, bevor es zu einer weiteren Krankheitsprogression kommt. (Lublin et al., 2014). Wenn Symptome auftreten, die die Diagnosekriterien für die MS (noch) nicht vollständig erfüllen, spricht man vom KIS, wobei 85 % der späteren MS Erkrankungen mit einem KIS beginnen (Miller et al., 2005). Aufgrund der individuellen Lokalisationen der MS Plaques im ZNS, finden sich zahlreiche neurologische Symptome, die sich zu Erkrankungsbeginn oder im Verlauf manifestieren können. So kann es beispielsweise zu visuellen, motorischen oder sensorischen Beeinträchtigungen kommen sowie zu einer Schädigung des vegetativen Nervensystems und zerebellärer Strukturen. Eine Studie aus Großbritannien zeigte, dass MS Patient*innen schon innerhalb der 10 Jahre, die unmittelbar vor der eigentlichen Erstdiagnose liegen, unspezifische Symptome wie Übelkeit, Inkontinenz, Kopfschmerzen, Fatigue oder Depressionen entwickelten, worunter die Kombination mehrerer dieser Symptome das Risiko für eine spätere MS Diagnose signifikant erhöhte (Disanto et al., 2018). Um den Grad der Behinderung der Patient*innen klassifizieren und den Verlauf der Erkrankung beurteilen zu können, wird der *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) verwendet. Es erfolgt eine Beurteilung der Symptome der Patient*innen in insgesamt 8 Funktionssystemen und davon ausgehend, unter Miteinbeziehung der möglichen Gehstrecke, die Einstufung in eine von 10 EDSS Stufen zwischen 0 (keine Einschränkungen) und 10 (Tod durch MS) (Kurtzke, 1983).

1.2.5 Diagnostik und Differentialdiagnosen

Bei der MS handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose, die anhand der Symptome der Patient*innen, der neurologischen Untersuchungsbefunde sowie der Ergebnisse apparativer Untersuchungen, insbesondere der Magnetresonanztomographie (MRT) und der Liquordiagnostik, unter Anwendung der revidierten McDonald-Kriterien 2017 gestellt wird (McDonald et al., 2001; Thompson et al., 2018; Hemmer et al., 2023). Hierbei ist der Nachweis einer zeitlichen und örtlichen Dissemination notwendig. Der Nachweis einer örtlichen Dissemination erfolgt auf Grundlage von jeweils mindestens einer T₂-hyperintensiven Läsion in der MRT an zwei unterschiedlichen, MS-typischen Lokalisationen, kortikal/juxtakortikal, periventrikulär, spinal oder infratentoriell, oder dem klinischen Nachweis eines zusätzlichen Schubes anderer Lokalisation. Der Nachweis einer zeitlichen Dissemination erfolgt durch den zeitgleichen Nachweis alter, nicht Gadolinium-anreichernder, und neuer, Gadolinium-anreichernder Läsionen in der MRT, neuer Läsionen in einer Verlaufs-MRT, dem klinischen Nachweis eines weiteren Schubes oder dem Vorliegen oligoklonaler Banden im Liquor (Thompson et al., 2018; Hemmer et al., 2023). Andere angewandte diagnostische Methoden wie beispielsweise neurophysiologische Untersuchungen oder die optische Kohärenztomographie (OCT) sind zurzeit noch kein Bestandteil der McDonald-Kriterien, wobei eine zukünftige Miteinbeziehung denkbar ist und der Nutzen weiter erforscht werden muss (Thompson et al., 2018). Die wichtigsten Differentialdiagnosen der MS sind u.a. die Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD), die Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antikörper-assoziierte Erkrankung (MOGAD), die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM), Infektionskrankheiten wie Neurosyphilis, Neuroborreliose und eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) sowie die Neurosarkoidose, und müssen im Rahmen der Diagnostik ausgeschlossen werden (Hemmer et al., 2023).

1.2.6 Pathogenese und Histopathologie

Die histopathologischen Korrelate der MS sind multiple, fokale, heterogene Läsionen in der grauen und weißen Substanz des ZNS, auch Plaques genannt, die makroskopisch sichtbar und vorwiegend perivaskulär lokalisiert sind (J. Cruveilhier, 1842; Rindfleisch, 1863) sowie mittels MRT dargestellt werden können (Lee et al., 1999). Auf mikroskopischer Ebene bestehen diese Läsionen u.a. aus Lymphozyten, Gliazellen und Makrophagen und lassen sich anhand ihrer zellulären Zusammensetzung in präaktive, aktive, chronisch-aktive und chronisch-inaktive Läsionen einteilen, die verschiedene Stadien der Entzündung, einen unterschiedlichen Demyelinisierungsgrad sowie axonale Degeneration, Gliose und sogar Remyelinisierungsprozesse aufweisen (van der Valk &

De Groot, 2000). Die Läsionen finden sich an spezifischen Stellen innerhalb des ZNS, darunter in der periventrikulären weißen Substanz, juxtakortikal, dem Hirnstamm, dem Kleinhirn und Rückenmark sowie dem Nervus opticus (Filippi et al., 2019). Entscheidend für die Entstehung dieser Läsionen ist zunächst eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Kermode et al., 1990). Es kommt zur Einwanderung von u.a. autoreaktiven T-Lymphozyten, welche in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (INF- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin (IL) -17 zu sekretieren und dadurch weitere Zellen, wie Makrophagen, Mikrogliazellen und Astrozyten zu aktivieren und zu rekrutieren, die ihrerseits Einfluss auf die ablaufenden Entzündungsmechanismen nehmen und so entscheidend an der weiteren Pathogenese der MS beteiligt zu sein scheinen (Baecher-Allan et al., 2018). Die Einwanderung der T-Zellen in das ZNS über die Blut-Hirn-Schranke, vermittelt u.a. durch vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM), wird im Entzündungsprozess durch die Ausschüttung von Chemokinen und anderen Entzündungsmediatoren weiter angetrieben und erleichtert (Ortiz et al., 2014). Auch B-Zellen tragen als antigenpräsentierende Zellen zur Aufrechterhaltung der T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion bei (van Sechel et al., 1999) und haben zytotoxische Effekte auf Oligodendrozyten (Lisak et al., 2012). Neben der Einteilung der Plaques anhand ihrer Aktivität kann zudem zwischen vier verschiedenen histopathologischen Mustern, die zur Demyelinisierung führen, unterschieden werden, was die Vielfalt möglicher Mechanismen der Zerstörung des Myelins sowie die Heterogenität der MS im Gesamten unterstreicht (Lucchinetti et al., 2000). Muster I und II sind gekennzeichnet durch Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen und schließlich durch eine T-Zell-vermittelte Inflammation und Schädigung des Myelins. In Muster I scheint die Demyelinisierung u.a. durch das von Makrophagen ausgeschüttete TNF- α vermittelt zu sein. Muster II ist das am häufigsten vorliegende Muster und weist zusätzlich Immunglobuline sowie Bestandteile des Komplementsystems auf, und scheint so die Inflammation mit nachfolgender Demyelinisierung voranzutreiben. Das Muster III ist dagegen gekennzeichnet durch eine Infiltration von T-Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen ohne Nachweis von Immunglobulinen oder Komplementfaktoren, jedoch von partiell zerstörten Myelinscheiden sowie apoptotischen Oligodendrozyten, hervorgerufen möglicherweise durch von diesen Zellen produzierten Toxinen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Muster IV zeigt eine Infiltration in erster Linie durch T-Lymphozyten und Makrophagen sowie einen nahezu vollständigen Verlust von Oligodendrozyten. Während Muster I und II in ihrer Zusammensetzung an autoimmune Enzephalomyelitiden erinnern und Zeichen der Remyelinisierung aufweisen können, kennzeichnet Muster III und IV eine Dystrophie der Oligodendrozyten (Lucchinetti et al.,

2000). Die beschriebenen Prozesse führen schließlich zur anhaltenden Demyelinisierung mit nachfolgender axonaler Schädigung und Bildung einer sogenannten Glianarbe, welche zum Großteil aus einem dichten Netz von Fibroblasten und Astrozyten besteht sowie zu kleineren Teilen auch aus Oligodendrozyten, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Mikrogliazellen (Berry et al., 1983; Fawcett & Asher, 1999). Die an der Narbenbildung beteiligten Zellen und Strukturen üben ihrerseits über die Sekretion von Molekülen einen hemmenden Einfluss auf noch ablaufende neuroregenerative Prozesse und daran beteiligte Zellen aus (Liddel et al., 2017). Mit zunehmender Vernarbung und Atrophie kommt es zum weiteren Versagen von Remyelinisierungsprozessen und somit zum Voranschreiten der Erkrankung und zu einer Zunahme der Behinderung (Fisher et al., 2002).

1.2.7 Die Rolle von Mikrogliazellen in Neuroinflammation und MS

Mikrogliazellen spielen als Teil des angeborenen Immunsystems eine bedeutende Rolle im Entzündungsgeschehen des ZNS, so auch im Rahmen der MS. Dabei sind sie in der Lage, unterschiedliche Phänotypen anzunehmen, klassischerweise bezeichnet als M1 (proinflammatorisch) und M2 (antiinflammatorisch) (Mills et al., 2000). In den letzten Jahren bewegt sich die Wissenschaft jedoch immer weiter von dieser klassischen, zweiseitigen Einteilung weg, begründet durch die umfassenden funktionalen Studien, die Mikrogliazellen einnehmen können und welche durch die M1/M2 Einteilung unzureichend abgebildet werden (Yong, 2022). So sind Mikrogliazellen beispielsweise in der Lage, im Rahmen von Entzündungsvorgängen und abhängig von ihrer Umgebung, ihren Phänotyp dynamisch und schnell zwischen M1 und M2 zu verändern und so völlig unterschiedliche Effekte auszuüben (Stout et al., 2005). Im Rahmen von Entzündungsabläufen können Mikrogliazellen ihre Morphologie hin zu einem amöboiden Erscheinungsbild verändern und an den Ort des Entzündungsgeschehens migrieren (Qu et al., 2015). Mikrogliazellen tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, darunter NOD-*like*-Rezeptoren (NOD), *Scavenger*-Rezeptoren (SR) und Toll-*like*-Rezeptoren (TLR), über die sie Pathogene und andere Moleküle, die die Homöostase des ZNS bedrohen, erkennen können (Hickman et al., 2013). Sie sind als antigenpräsentierende Zellen zudem in der Lage, über MHC-II zu einer Aktivierung von T-Zellen zu führen (Williams et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Almolda et al., 2011). Unter inflammatorischen Bedingungen kann zudem eine Hochregulierung von MHC-II in Mikrogliazellen beobachtet werden (Aloisi et al., 2000). Als Auslöser der Polarisierung von Mikrogliazellen hin zu einem proinflammatorischen Phänotyp konnten Lipopolysaccharid (LPS), Myelindebris sowie proinflammatorische Zytokine wie INF- γ und TNF- α

identifiziert werden (Gordon & Taylor, 2005). Über intrazelluläre Signalwege kommt es im Verlauf zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren (Norden et al., 2016). Dabei gelten Mikrogliazellen als eine der Hauptquellen für die TNF- α -Sekretion, einer der Hauptakteure in entzündlichen und neurodegenerativen Prozessen innerhalb des ZNS, dessen prolongierte Ausschüttung zur chronischen Entzündung sowie dem Verlust von Synapsen führt (Rauf et al., 2022) und zur Apoptose von Oligodendrozyten beiträgt (Chai et al., 2023). Auf einen inflammatorischen Stimulus hin sekretieren Mikrogliazellen Stickstoffmonoxid (NO), vermittelt durch Hochregulierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), was zur Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke beiträgt sowie im Kontext der MS Oligodendrozyten und axonale Strukturen schädigt (Smith & Lassmann, 2002). Im Rahmen der proinflammatorischen Aktivierung sind Mikrogliazellen ebenfalls in der Lage, IL-6 zu sekretieren, ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, das zum Inflamationsgeschehen u.a. über Beeinflussung von Typ-17-T-Helferzellen (TH17-Zellen) beiträgt (Serada et al., 2008; Merighi et al., 2017). Weitere sekretierte, proinflammatorische Zytokine sind IL-12 (Holley et al., 2012) sowie IL-1 β (Norden et al., 2016). Während es im primär gesunden ZNS durch proinflammatorische Aktivierung der Mikrogliazellen und daraus resultierender Beseitigung des die Homöostase des ZNS bedrohenden Faktors zu einem Abklingen der Proinflammation kommt, hält diese im Rahmen der MS jedoch an (Orihuela et al., 2016). Über *Transforming growth factor* β (TGF- β), IL-10 sowie IL-4 kann ein restaurativer Phänotyp in Mikrogliazellen induziert werden (Boche et al., 2013). In der Folge sind Mikrogliazellen in der Lage, antiinflammatorische Moleküle wie IL-10, TGF- β und Arginase-1 (ARG1) auszuschütten (Colton, 2009; Boche et al., 2013). ARG1 ist als Enzym am Aminosäurestoffwechsel von Mikrogliazellen beteiligt und gilt als wichtiger Marker für den restaurativen Phänotyp in Mikrogliazellen (Cherry et al., 2014). ARG1 ist über sein Produkt L-Ornithin bedeutend für zellproliferative Vorgänge, zudem konkurriert ARG1 mit iNOS um das gemeinsame Substrat Arginin und kann dadurch die NO-Synthese reduzieren und so die Entzündungsreaktion verringern (Xu et al., 2003). Eine entscheidende, der regenerativen Funktion der Mikrogliazellen zuzuordnende Eigenschaft, ist die Phagozytose von Myelindebris, welches die normale Funktion von Oligodendrozyten sowie die oligodendrogliale Reifung und somit die Remyelinisierung verhindert (Lampron et al., 2015). Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Proto-Onkogen-Tyrosin-Proteinkinase MER (MERTK), codiert durch das MERTK-Gen, das im ZNS v.a. durch Mikrogliazellen exprimiert wird (Gautier et al., 2012). Durch die Rezeptordomäne von MERTK sind Mikrogliazellen in der Lage, Debris und apoptotische Zellen anhand des Liganden Phosphatidylserin (PS) zu erkennen und zu phagozytieren (Healy et al., 2017). Experimentelle Studien zeigten, dass ein MERTK

Knockout (K.O.) in der Maus zu Verminderung der mikroglialen Phagozytose und Migration sowie zur Demyelinisierung führt (Shen et al., 2021). Ebenfalls an der Regulation phagozytärer Vorgänge beteiligt ist der Transmembranrezeptor *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2), ebenfalls exprimiert von Mikrogliazellen. TREM2 bindet u.a. LPS sowie Phospholipide, die im Rahmen der Demyelinisierung freigesetzt werden. Im Cuprizone-Modell der Demyelinisierung führte ein TREM K.O. in der Maus zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen sowie zur verminderten Phagozytose von Myelindebris und dadurch zur Hemmung der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Poliani et al., 2015). Eine Expression von TREM2 und die dadurch vermittelte Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine ist somit assoziiert mit neuroprotektiven Effekten (Liu et al., 2020). Mikrogliazellen tragen auf ihrer Oberfläche, neben den bereits erwähnten Rezeptoren, auch purinerge Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle (P2X) oder G-Proteine (P2Y) (Hickman et al., 2013). Über den P2Y-Purinorezeptor 12 (P2Y12) werden chemotaktische Prozesse in der Migration von Mikrogliazellen zum Ort der Entzündung gesteuert, P2Y-Purinorezeptor 6 (P2Y6) ist mit Phagozytose assoziiert (Gómez Morillas et al., 2021). Beide Prozesse sind essenziell für die antiinflammatorischen Funktionen von Mikrogliazellen im entzündeten ZNS. Neben den genannten Purinorezeptoren sind auch Adenosin-Rezeptoren in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Der Adenosin-A₃-Rezeptor (ADORA3) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, lokalisiert u.a. auf Mikrogliazellen, über dessen Aktivierung es zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α kommt (Steininger et al., 2011; Xu et al., 2024). Im Rahmen von Entzündungsgeschehen nehmen Mikrogliazellen auch Einfluss auf andere Zellarten des ZNS, u.a. Astrozyten. So können sie über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, u.a. TNF- α und IL-1- α , zu einer Aktivierung von Astrozyten hin zu einem reaktiven, mit Proinflammation assoziierten Phänotyp führen (Liddel et al., 2017). Abschließend muss betont werden, dass Mikrogliazellen in der MS sowohl zur Entzündung beitragen als auch protektive Aufgaben übernehmen, wobei die Übergänge fließend sind. Die umfangreiche Rolle dieser Zellart in der Pathogenese der MS bleibt weiterhin nicht vollständig geklärt (Yong, 2022).

1.2.8 Die Rolle von Astrozyten in Neuroinflammation und MS

Astrozyten scheinen ebenfalls in unterschiedlicher Art und Weise zum Entzündungs- und Regenerationsgeschehen der MS beizutragen (Salles et al., 2022). Auch Astrozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren, u.a. TLR, und können so auf Umgebungsreize reagieren (Kimmelberg, 1995; Park et al., 2006). So können auch sie

verschiedene Phänotypen einnehmen unterschieden in einen proinflammatorischen (A1) oder antiinflammatorischen/regenerativen Phänotyp (A2) (Liddel et al., 2017; Neal et al., 2018; Joshi et al., 2019). Vergleichbar mit der Problematik der strikten Einteilung der Mikrogliazellen in M1/M2, wird auch dieses A1/A2 Modell kritisch bewertet (Escartin et al., 2021). Im Rahmen einer Aktivierung von Astrozyten zu einem proinflammatorischen Phänotyp durch einen Schädigungsreiz, z.B. im Rahmen entzündlicher Prozesse, ändern Astrozyten ihre Morphologie und ihr Verhalten, was einhergeht mit dem teilweisen Verlust ihrer physiologischen und neuroprotektiven Aufgaben (Liddel et al., 2017). Studien konnten zeigen, dass von Mikrogliazellen sekretiertes IL-1- α , Komplementfaktor C1q (C1q) und TNF- α in Astrozyten einen proinflammatorischen Phänotyp hervorrufen können (Liddel et al., 2017). Ebenfalls zu einer proinflammatorischen Aktivierung kommt es durch IFN- γ (Halonen et al., 2006). Astrozyten dieses reaktiven Phänotyps sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine auszuschütten, darunter IL-1- β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23 und TNF- α (Correale & Farez, 2015). Durch umfangreiche Prozesse kommt es zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und so zur erleichterten Infiltration von Immunzellen in das ZNS (Argaw et al., 2012). VEGF-A ist ein Molekül, das von Astrozyten unter inflammatorischen Bedingungen der MS sezerniert wird und mit der Neoangiogenese von durchlässigen Gefäßen (Shahriar et al., 2024) sowie ebenfalls mit einer Zunahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke assoziiert ist und so negativ zum Entzündungsgeschehen beitragen kann (Croll et al., 2004; Argaw et al., 2012; Rasol et al., 2016). Erhöhte Werte von VEGF-A konnten im Blut von MS Patient*innen nachgewiesen werden (Azimi et al., 2020). Lipocalin 2 (LCN2) ist ein kleines sekretorisches Protein, welches von Mikrogliazellen und Astrozyten auf einen Entzündungsreiz hin ausgeschüttet wird (Jung et al., 2023). Es führt in Astrozyten über autokrine Mechanismen zu phänotypischen Veränderungen hinsichtlich ihrer Morphologie sowie dem Migrationsverhalten, welche assoziiert sind mit einem reaktiven, proinflammatorischen Erscheinungsbild (Lee et al., 2009). Zudem hat das sezernierte LCN2 auch toxische Effekte auf Neuronen (Bi et al., 2013). Von Astrozyten sezerniertes IL-6 nimmt als pleiotropes Molekül eine besondere Stellung ein, da es sowohl als proinflammatorisches Zytokin u.a. über Beeinflussung der Funktion von T-Zellen zum Entzündungsgeschehen beitragen, als auch über das Hervorrufen eines restaurativen Phänotyps in Mikrogliazellen einen neuroprotektiven Effekt ausüben kann (Janssens et al., 2015). Mit TNF- α und IL-1- β proinflammatorisch vorstimulierte Astrozyten können die Chemokine CC-Chemokin-Ligand-5 (CCL5) und C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) sekretieren (Ambrosini et al., 2005; Choi et al., 2014). Erhöhte Werte von CCL5 und CXCL10 finden sich ebenfalls im Liquor von MS Patient*innen (Comini-Frota et al., 2011; Szczuciński & Losy, 2011). Chemokin-vermittelt

kommt es zum Anlocken und zur Einwanderung von dendritischen Zellen, Makrophagen, Mikrogliazellen und T-Zellen in das ZNS und so zum Voranschreiten der entzündlichen und autoimmunen Prozesse (Zang et al., 2000; Jalosinski et al., 2008; Blandford et al., 2023). CCL5 hat neben der Funktion als Chemokin auch Einfluss auf den Glutamatstoffwechsel von Neuronen. So kommt es, ausgelöst durch CCL5, zu einer vermehrten, Calcium-vermittelten Freisetzung von Glutamat, welches neben seiner Rolle als exzitatorischer Neurotransmitter auch als chemotaktischer Botenstoff zum Entzündungsgeschehen beitragen kann (Pittaluga, 2017). Astrozyten, die einen antiinflammatorischen Phänotyp annehmen, haben protektive Effekte auf das ZNS (Liddel et al., 2017). Dabei können über TLR-3 aktivierte Astrozyten die antiinflammatorischen Zytokine IL-9, IL-10 und IL-11 ausschütten (Bsibsi et al., 2006). Einen weiteren antiinflammatorischen Effekt können Astrozyten über die Sekretion von IGF-1 ausüben, welches im ZNS auf multiple Zellarten wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen Einfluss nehmen kann (Labandeira-Garcia et al., 2017) und Neuronen vor oxidativem Stress schützt (Genis et al., 2014). Zudem können Astrozyten über die Ausschüttung weiterer Moleküle, wie beispielsweise TGF- β , antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte ausüben (Kerkering et al., 2023). Antiinflammatorisch polarisierte Astrozyten sind zudem in der Lage Pentraxin 3 (PTX3) freizusetzen, welches VEGF-A inhibiert und zur Integrität der Blut-Hirn-Schranke beiträgt (Shindo et al., 2016).

Eine entscheidende Aufgabe von Astrozyten ist die Bildung einer Glianarbe, ein Vorgang, der sowohl positive Aspekte durch Eindämmung des Entzündungsgeschehens als auch negative Aspekte, vermittelt durch Hemmung von neuronaler Regeneration und Remyelinisierung, hervorruft (Correale & Farez, 2015). Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSG), werden von reaktiven Astrozyten im Rahmen der Bildung der Glianarbe sekretiert und hemmen das axonale Wachstum sowie die Differenzierung oligodendroglialer Vorläuferzellen (Kamermans et al., 2019; Feliu et al., 2020). Zu den CSG zählen u.a. Aggrecan (ACAN) und Brevican (BCAN). AQP4 spielt eine zusätzliche Rolle in der Migration der Astrozyten zum Ort der Narbenbildung und scheint an der Freisetzung proinflammatorischer Moleküle beteiligt zu sein (Verkman et al., 2006; Li et al., 2011). Ein weiterer, mit gliöser Narbenbildung assoziierter Marker ist das Zelladhäsionsmolekül Cadherin-2 (CDH2), welches Zell-Zell Kontakte zwischen Astrozyten im Rahmen der Bildung einer gliösen Narbe vermittelt (Vázquez-Chona & Geisert, 1999). Ebenfalls von Bedeutung sind die an der Bildung von CSGs beteiligten Enzyme Kohlenhydrat-Sulfotransferase 11 (CHST11) und Xyloyltransferase 1 (XYLT1) (Gris et al., 2007) sowie die Chondroitinsulfat-N-Acetylgalactosaminyltransferase 1 (CSGALNACT1) (Igarashi et al., 2018). Der Transkriptionsfaktor *SRY-box transcription factor 9* (SOX9) reguliert

hierbei die Expression der CSG (Gris et al., 2007). Zudem können sowohl naive als auch proinflammatorisch modulierte Astrozyten auf das Überleben von B-Zellen sowie auf die Sekretion Co-stimulatorischer Moleküle durch B-Zellen Einfluss nehmen und durch die daraus resultierende Aktivierung von T-Zellen zum Entzündungsgeschehen beitragen (Touil et al., 2018).

1.2.9 Therapieoptionen

Bei der MS handelt es sich weiterhin um eine nicht kausal therapierbare Erkrankung, auf deren Verlauf jedoch durch verschiedene Therapien entscheidend Einfluss genommen werden kann (Hauser & Cree, 2020). Ein wichtiger Faktor ist dabei ein möglichst zeitnaher Therapiebeginn. So konnte gezeigt werden, dass der Grad der erreichten Behinderung der Patient*innen niedriger ist, wenn der Zeitraum zwischen Erstmanifestation der MS und Therapiebeginn möglichst geringgehalten wird (Kavaliunas et al., 2017). Im Rahmen der medikamentösen Therapie wird zwischen der Schubtherapie, der verlaufsmodifizierenden Therapie und der symptomatischen Therapie unterschieden (Hauser & Cree, 2020). Laut aktueller Leitlinie ist die erste Wahl im Rahmen der Schubtherapie die intravenöse Gabe des hochdosierten Glukokortikosteroids (GKS) Methylprednisolon in einer Dosis von 500 bis 1 000 mg für insgesamt 3 bis 5 Tage. Bei therapierefraktären Schüben kann die Dosis von Methylprednisolon erhöht oder, als *Ultima Ratio*, eine Apherese-Therapie erwogen werden (Hemmer et al., 2023). Methylprednisolon ist in der Lage, die Einschränkungen, gemessen am EDSS Wert, die die Patient*innen durch einen Schub erfahren, zu verringern (Milligan et al., 1987). Da Glukokortikosteroide keinen relevanten Einfluss auf den langfristigen Krankheitsverlauf der Patient*innen nehmen können (Griffiths & Newman, 1994), ist eine verlaufsmodifizierende Therapie (*disease-modifying therapy*, DMT) notwendig. Die verlaufsmodifizierende Therapie ist in der Lage, die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine initiale RRMS in eine SPMS übergeht, signifikant zu reduzieren (Brown et al., 2019). Die Aufgabe dieser, in die Prozesse der Neuroinflammation eingreifenden Wirkstoffe, liegt darin, zukünftige Schübe zu verhindern oder ihre Anzahl zu reduzieren, das Voranschreiten der Krankheit zu verhindern oder zu verlangsamen und die Lebensqualität der Patient*innen zu bewahren (Hemmer et al., 2023). Das erklärte Ziel liegt in der Erreichung von *no evidence of disease activity* (NEDA), genauer definiert als Schubfreiheit, fehlender Nachweisbarkeit von Aktivität in der MRT sowie stabilem EDSS (Banwell et al., 2013). Die Einteilung der sogenannten krankheitsmodifizierenden Medikamente (*disease-modifying drugs*, DMD), die in der verlaufsmodifizierenden Therapie der MS Anwendung finden, erfolgt in drei

Kategorien anhand der durch sie zu erwartenden Reduktion der Schubrate (Abb. 1) (Hemmer et al., 2023). Die Entscheidung für ein bestimmtes Präparat ist individuell und erfolgt gemeinsam mit den Patient*innen abhängig von der Krankheitsaktivität, vorliegenden Begleiterkrankungen und anderen Faktoren wie Alter und Familienplanung unter Berücksichtigung der begleitenden Risiken und Nebenwirkungen (Rotstein & Montalban, 2019; Hemmer et al., 2023). Alle Patient*innen mit MS sollen eine verlaufsmodifizierenden Therapie erhalten. Nur in wenigen Ausnahmen ist ein abwartendes Vorgehen unter engmaschiger Kontrolle gerechtfertigt (Hemmer et al., 2023). In der Therapie der RRMS wird, ausgenommen beim Vorliegen eines wahrscheinlich hochaktiven Verlaufes, der Einstieg mit einem Wirkstoff der Kategorie I empfohlen, bei Anzeichen für einen hochaktiven Verlauf soll der Einstieg mit einem Wirkstoff der Kategorie II oder III erfolgen. Kriterien für einen hochaktiven Verlauf sind beispielsweise eine hohe Schubfrequenz von mindestens 2 Schüben oder ein Erreichen von einem EDSS Wert von $\geq 3,0$ jeweils im ersten Erkrankungsjahr (Hemmer et al., 2023). Diesem als *target to treat* bezeichnetem Vorgehen steht ein neuerer Ansatz, genannt *hit hard and early* gegenüber, der einen direkten Einstieg mit einem Wirkstoff der Gruppe II oder III empfiehlt (Ontaneda et al., 2019), bisher aber aufgrund noch laufender Studien keinen Einzug in die Leitlinie gefunden hat (Hemmer et al., 2023). Kommt es unter der Therapie mit einem Wirkstoff der Kategorie I zu mindestens einem neuen Schub und/oder MS-typischen Veränderungen in der MRT in den ersten 6 Monaten nach Therapiebeginn, so wird die Erkrankung als entzündlich aktiv eingestuft und es soll eine Eskalation auf einen Wirkstoff der Kategorie II oder III erfolgen (Hemmer et al., 2023). Zur Behandlung der PPMS ist aktuell nur der *Cluster of Differentiation 20* (CD20) Antikörper Ocrelizumab zugelassen, Rituximab als weiterer CD20-Antikörper findet im *Off-Label-Use* Anwendung (Hemmer et al., 2023). Bei der SPMS ist eine Therapie nur bei Nachweis einer Aktivität im Sinne von Schüben oder neuen MS-typischen Läsionen in der MRT erfolgsversprechend und indiziert, eingesetzte Wirkstoffe sind Beta-Interferone, Cladribin, Siponimod und die CD20-Antikörper Ocrelizumab und im *Off-Label-Use* auch Rituximab (Hemmer et al., 2023). Begleitend zur nicht-medikamentösen Therapie von Spastiken mit regelmäßiger Physiotherapie finden unter anderem die Muskelrelaxantien Tizanidin sowie Baclofen Anwendung (Hemmer et al., 2023). Neben den zahlreichen medikamentösen Therapien spielen auch nicht-medikamentöse Maßnahmen eine wichtige Rolle in der Therapie der MS. Studien konnten positive Effekte auf Lebensqualität und Motorik durch regelmäßiges Fahrradfahren (Tollár et al., 2020) sowie eine Verringerung des besonders belastenden Symptoms der Fatigue durch Yoga (Hasanpour Dehkordi, 2016) nachweisen.

Kategorie	Relative Reduktion der Schubrate im Vergleich zum Placebo [%]	Wirkstoffe	Wirkmechanismus
I	30 - 50	Beta-Interferon	Immunmodulation (Zytokin)
		Dimethylfumarat	Immunzellmigration, Immunzellphänotyp
		Glatirameramide	T-Zell-vermittelte Immunmodulation
		Teriflunomid	Hemmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH)
II	50 - 60	Cladribin	Purinanalogon, Antimetabolit
		Fingolimod	Funktioneller Antagonismus am Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1P1)
		Ozanimod	Funktioneller Antagonismus an S1P1
III	> 60	Alemtuzumab	Anti-CD52-Antikörper
		Natalizumab	Humanisierter monoklonaler IgG4-AK
		Ocrelizumab	Anti-CD20-Antikörper
		Rituximab	Anti-CD20-Antikörper

Abb. 1: Einteilung der Wirkstoffe zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS in Wirksamkeitskategorien anhand der relativen Reduktion der Schubrate im Vergleich zum Placebo sowie Darstellung der jeweiligen Wirkmechanismen. Cladribin (2-CdA) ist der Kategorie II zugeordnet (modifiziert nach Hemmer et al., 2023).

1.3 Cladribin

1.3.1 Allgemeiner Wirkmechanismus

Cladribin (2-Chlor-2'-desoxyadenosin; 2-CdA) ist ein Purinanalogon, das der Base Desoxyadenosin ähnelt und sich lediglich durch ein Chlor-Atom an Position 2 des Purinrings von ihr unterscheidet (s. Abb. 2) (Beutler, 1992). Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 45,6 % (Hermann et al., 2019). Zudem ist Cladribin liquorgängig und erreicht im ZNS 25 % seiner Plasmakonzentration (Liliemark, 1997). An der intestinalen Aufnahme, der Verteilung im Körper und der Aufnahme in die Zielzelle sind hauptsächlich die Nukleosidtransporter (NTs) *equilibrative nucleosid transporter 1* (ENT1), *equilibrative nucleosid transporter 2* (ENT2), *equilibrative nucleosid transporter 4* (ENT4) sowie *concentrative nucleosid transporter 2* (CNT2) und *concentrative nucleosid transporter 3* (CNT3) beteiligt (Hermann et al., 2021). In der Zielzelle angelangt, erfolgt die

Umwandlung des Propharmakons 2-CdA in seine aktive Form 2-Chlor-2'-desoxyadenosintriphosphat (2-Cd-ATP) über mehrere Phosphorylierungsschritte, katalysiert durch Kinasen (Beutler, 1992). In einer ersten Reaktion erfolgt die Phosphorylierung von 2-CdA durch die Desoxycytidinkinase (DCK) zu 2-Chlor-2'-desoxyadenosinmonophosphat (2-Cd-AMP), die Gegenreaktion der Dephosphorylierung von 2-Cd-AMP erfolgt über die 5'-Nukleotidase (5'NT). Auf die durch die DCK katalysierte Reaktion folgen zwei weitere Phosphorylierungsschritte zu 2-Chlor-2'-desoxyadenosindiphosphat (2-Cd-ADP) und schließlich zu 2-Cd-ATP (Beutler, 1992). Der folgende Einbau von 2-Cd-ATP als Antimetabolit in den neu entstehenden Desoxyribonukleinsäure (DNS) -Strang im Zuge der DNS-Synthese führt über die Hemmung der Polymerase II zu Einzelstrangbrüchen und schließlich, u.a. vermittelt über p53, zur Apoptose der Zielzelle (Jacobs et al., 2018). Der amerikanische Arzt Dennis A. Carson identifizierte in den 1970er Jahren während seiner Forschung an der hereditären Adenosin-Desaminase-Defizienz (ADA-Defizienz) 2-CdA als zytotoxisches Agens, das sich gezielt gegen Lymphozyten richtet (Carson et al., 1977) und so als Immunsuppressivum genutzt werden könnte (Carson et al., 1983). Die Tatsache, dass das Verhältnis von DCK zu 5'NT in Lymphozyten auf Seite der DCK liegt, trägt entscheidend dazu bei, dass Lymphozyten als wichtige Zielzellen von 2-CdA fungieren (Carson et al., 1983). Klinische Studien konnten die Wirksamkeit von 2-CdA mit einem guten Nebenwirkungspofil in der Therapie der Haarzelleukämie (Estey et al., 1992) sowie der chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) und dem kutanen T-Zell-Lymphom zeigen (Saven & Piro, 1993).

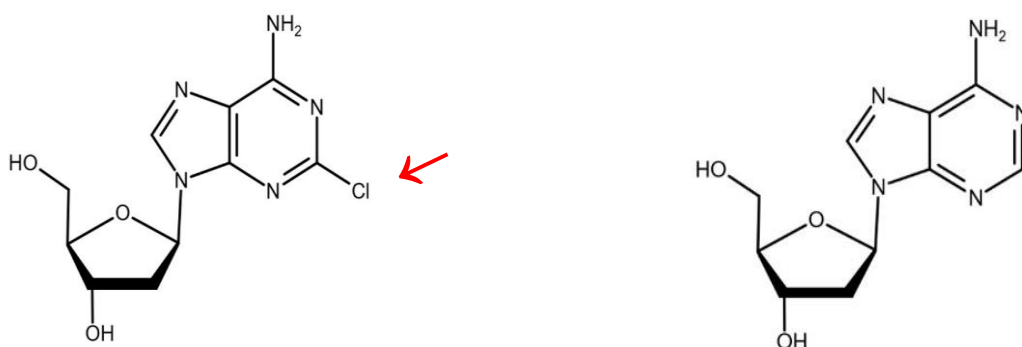


Abb. 2: Chemische Struktur von 2-Chlor-2'-desoxyadenosin (links) und Desoxyadenosin (rechts) im direkten Vergleich. Die beiden Substanzen unterscheiden sich nur durch ein Chlor-Atom an Position 2 des Purinrings (roter Pfeil) (modifiziert nach Beutler, 1992).

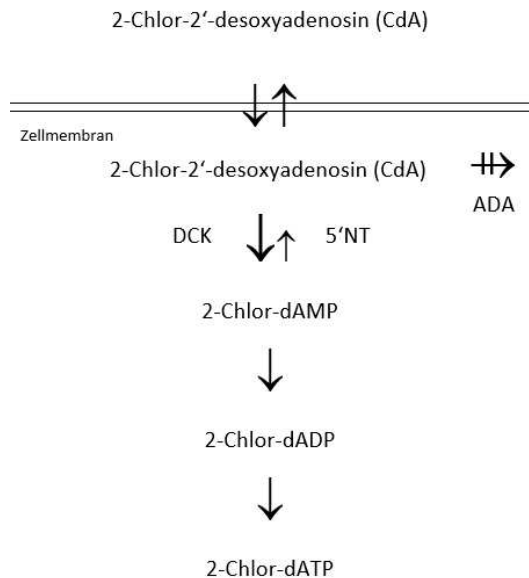


Abb. 3: Pharmakokinetik von 2-CdA in der Zielzelle. 2-CdA gelangt über Transportproteine in die Zelle und wird in einem ersten Schritt durch die DCK zu 2-Cd-AMP phosphoryliert. Es folgen zwei weitere Phosphorylierungsschritte zu 2-Cd-ADP und 2-Cd-ATP, der aktiven Form von 2-CdA. 2-CdA ist resistent gegenüber der Desaminierung durch die ADA. In Zellen mit einem hohen DCK Gehalt gegenüber dem 5'NT Gehalt kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung von 2-CdA (modifiziert nach Beutler, 1992).

1.3.2 Cladribin als immunmodulierende Therapie in der MS

Ausgehend von den Erkenntnissen über die gute Wirkungsweise von 2-CdA insbesondere auf Immunzellen, erfolgte weitere Forschungsarbeit zu einem Einsatz von 2-CdA in der Therapie anderer Erkrankungen aus dem Bereich der Neoplasien und Autoimmunerkrankungen (Sipe et al., 1996). Aufgrund der entscheidenden Rolle von Lymphozyten in der Pathogenese der MS, wurde ein Einsatz von Cladribin auch in der Therapie dieser Erkrankung erwogen und zeigte in ersten Studien sowohl beim Einsatz in der progressiven Form der MS als auch in der RRMS gute Ergebnisse u.a. hinsichtlich der Verbesserung des EDSS-Scores, wobei die Applikation intravenös erfolgte (Sipe et al., 1996). Die große multizentrische Placebo-kontrollierte Phase III Doppelblindstudie CLARITY (ClinicalTrial.gov: NCT00213135) untersuchte die Effekte einer oralen Gabe von 2-CdA in mehreren Zyklen an 1362 Patient*innen mit RRMS über einen Zeitraum von 96 Wochen (Giovannoni et al., 2010). Die Patient*innen erhielten entweder eine von zwei unterschiedlichen Dosen Cladribin oder ein Placebo, verteilt auf insgesamt 6 Behandlungszyklen, wobei jeder Zyklus 4-5 aufeinanderfolgende Tage dauerte und die Einnahme von 1 bis 2 Tabletten der Wirkstärke 10 mg pro Tag beinhaltete (Giovannoni et al., 2010). Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Schubrate nach 96 Wochen gewählt (Giovannoni et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Cladribin in beiden

getesteten Dosen im Vergleich zum Placebo sowohl die Schubrate nach 96 Wochen signifikant verringerte (RR 57,6 % und 54,5 %), als auch dazu führte, dass die Patient*innen komplett ohne Schübe blieben. So lag der Anteil schubfreier Patient*innen in den Cladribin Gruppen bei 79,7 % und 78,9 %, verglichen mit 60,9 % in der Placebo Gruppe (Giovannoni et al., 2010). Zudem konnte beobachtet werden, dass das Risiko einer Behinderungszunahme sowie die in der MRT gemessene Läsionslast in den 2-CdA Gruppen signifikant niedriger war als in der Placebo Gruppe (Giovannoni et al., 2010). Im August 2017 erhielt Cladribin vom Hersteller Merck unter dem Handelsnamen Mavenclad® durch die Europäische Kommission die Zulassung zum Einsatz in der Therapie der hochaktiven RRMS (Europäische Arzneimittel Agentur, 2017). Cladribin ist ausschließlich für die Therapie von Personen über 18 Jahren zugelassen (Merck, 2017). Neben der RRMS wird Cladribin auch vereinzelt in der Therapie der aktiven SPMS eingesetzt (Hemmer et al., 2023). Die Therapie mit Cladribin verfolgt das Ziel, dass nach Abschluss der Behandlungszyklen eine Immunrekonstitution erreicht ist, die zu einer anhaltenden Stabilität in der Symptomatik der Patient*innen führen und dazu beitragen soll, dass auf weitere immunmodulatorische Therapien verzichtet werden kann (Hemmer et al., 2023). Die Einnahme von Cladribin erfolgt anhand eines personalisierten Schemas in jeweils einer Woche in zwei aufeinanderfolgenden Monaten mit Wiederholung im darauffolgenden Jahr. Die zu erreichende kumulative Zieldosis beträgt 3,5 g/kg Körpergewicht (Europäische Arzneimittel Agentur, 2017). Die Zieldosis bestimmt die Anzahl der einzunehmenden Tabletten je Einnahmetag. In jeder der beiden Wochen erfolgt die orale Einnahme von 1 oder 2 Tabletten mit einer Dosis von jeweils 10 mg an insgesamt 4 bis 5 Tagen (Merck, 2017). Abbildung 4 zeigt beispielhaft das Einnahmeschema einer Person mit einem Körpergewicht von 62 kg mit Behandlungsbeginn im Januar.

	Behandlungswoche 1	Behandlungswoche 2
Behandlungsjahr 1	Januar: 6 Tabletten	Februar: 6 Tabletten
Behandlungsjahr 2	Januar: 6 Tabletten	Februar: 6 Tabletten

	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Anzahl Tabletten	2	1	1	1	1	0	0

Abb. 4: Einnahmeschema einer Person mit einem Körpergewicht von 62 kg und Behandlungsbeginn im Januar. Kumulativ ist eine Einnahme von insgesamt 6 Tabletten mit einer Gesamtdosis von 60 mg je Behandlungswoche notwendig, welche auf insgesamt 5 Tage verteilt wird. Die Behandlungswochen beginnen im Abstand von 4 Wochen. Die Einnahme wird in den beiden ersten Monaten des Folgejahres in gleicher Form wiederholt (modifiziert nach Merck, 2017).

Cladribin ist als krankheitsmodifizierendes Medikament in der Therapie der MS auch Bestandteil der sogenannten pharmakologischen selektiven Immunrekonstitutions-Therapie (SIRT) (Boyko & Boyko, 2018; Sorensen & Sellebjerg, 2019). Dieses Therapiekonzept umfasst Wirkstoffe, die zwar über einen kurzen Zeitraum gegeben werden, jedoch einen langanhaltenden Effekt auf das Immunsystem sowie die Krankheitsaktivität vermitteln. Der Effekt der SIRT hält deutlich länger an als die initiale Immunsuppression durch Zelldepletion (AlJumah et al., 2020). Dem Konzept der SIRT liegen die „3 R“ zugrunde: Reduktion, Rekonstitution und Repopulation von Lymphozyten, resultierend in der Wiederherstellung und Modifikation ihrer Funktionen als Immuneffektorzellen (Giovannoni & Mathews, 2022). Cladribin vermittelt seine Wirkung als SIRT vor allem durch die Reduktion CD19+ B-Lymphozyten und in geringerem Ausmaß auch von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten (Stuve et al., 2019). So kam es nach dem ersten Zyklus der Gabe von Cladribin zur Reduktion der Zellzahl CD19+ B-Lymphozyten um 80 %, der CD4+ T-Lymphozyten um 50 % sowie der CD8+ T-Lymphozyten um etwa 40 % (Stuve et al., 2019). Andere Studien bestätigen diese Beobachtungen (Comi et al., 2019; Ammoscato et al., 2024). Nach initialer Reduktion der Zellzahlen kommt es im Verlauf zu einer Repopulation. So erreichten die CD19+ B-Lymphozyten 30 Wochen nach der letzten Gabe von Cladribin im zweiten Behandlungsjahr wieder Normalwerte (Comi et al., 2019). Im Rahmen dieser Prozesse kommt es zu einer Rekonstitution der Immunzellen. So konnte gezeigt werden, dass die neue Population von B-Lymphozyten nach Cladribin einen weniger proinflammatorischen Phänotyp aufwies (Holm Hansen et al., 2023), die Anzahl der B-Gedächtniszellen verringert war und dass die Antwort von T-Lymphozyten auf präsentierte Autoantigene reduziert war (Holm Hansen et al., 2024). Zudem kam es zu einer geringeren intrathekalen Antikörper-Produktion, erklärbar durch den Effekt auf B-Lymphozyten (Ammoscato et al., 2024). Auf die Zellzahl neutrophiler Granulozyten sowie von Monozyten scheint Cladribin dagegen keine relevanten Effekte zu haben (Stuve et al., 2019), was vermuten lässt, dass Cladribin v.a. die erworbene, adaptive Immunantwort beeinflusst (Comi et al., 2019). Im Vergleich zu anderen, in der verlaufsmodifizierenden Therapie eingesetzten Wirkstoffen, punktet Cladribin mit einem geringeren Monitoring-Aufwand sowie einer höheren Therapieadhärenz der Patient*innen aufgrund der kurzen Behandlungsdauer (Giovannoni & Mathews, 2022). So zeigten Patient*innen unter Cladribin in einer retrospektiven Studie signifikant längere Zeitspannen vor einem Therapieabbruch oder einem Wechsel der Therapie, eine längere Zeit bis zu einem Rückfall in Form eines Schubes sowie eine geringere Schubrate im Vergleich zu anderen, in der verlaufsmodifizierenden Therapie eingesetzten Wirkstoffen, wie Fingolimod, Teriflunomid oder Dimethylfumarat (Spelman

et al., 2023) sowie eine geringere Schwere der Schübe verglichen zu Fingolimod (Brownlee et al., 2023). Hinzu kommt die Erkenntnis, dass eine Therapie mit Cladribin, im Vergleich zu einer Therapie mit Fingolimod, kosteneffektiver erscheint (Pinheiro et al., 2020). Hinsichtlich des Nebenwirkungsprofil zeigte sich, dass die häufigste Nebenwirkung (NW) unter Cladribin Therapie das Auftreten einer Infektion war (Giovannoni et al., 2010), wobei nachgewiesen werden konnte, dass Cladribin hinsichtlich weiterer unerwünschten Wirkungen gegenüber anderen Wirkstoffen der verlaufsmodifizierenden Therapie keine Nachteile bietet (Siddiqui et al., 2018). Cladribin entfaltet als SIRT seine Wirkung schnell sowie langanhaltend bei selektiver Wirkung auf B- und T-Lymphozyten (Cortese et al., 2024), mit großer Patientensicherheit hinsichtlich unerwünschter Nebenwirkungen (Siddiqui et al., 2018) sowie patientenfreundlichen, kurzen Behandlungszyklen (Europäische Arzneimittel Agentur, 2017), was es zu einer zentralen Substanz in der Therapie der RRMS macht.

1.4 Ziele der Arbeit

Bisherige Erkenntnisse zu den umfangreichen Funktionen, die Mikrogliazellen und Astrozyten in der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf der MS einnehmen (Goldmann & Prinz, 2013; Ponath et al., 2018; Voet et al., 2019), zur guten Wirksamkeit von Cladribin in der Therapie der RRMS (Spelman et al., 2023) als SIRT mit Effekten auf Zellen der erworbenen Immunantwort (Stuve et al., 2019) sowie der Tatsache, dass Cladribin lipophil ist und somit auch im ZNS Effekte ausüben kann (Liliemark, 1997), lieferten Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeit. Daher war es von großem Interesse im Rahmen dieses Dissertationsprojektes zu untersuchen, ob Cladribin auch auf Zellen der angeborenen Immunantwort des ZNS, im Genaueren auf Mikrogliazellen und Astrozyten, in einer nicht-zytotoxischen Dosis wirkt und ihre Polarisation hinsichtlich eines proinflammatorischen oder protektiven/antiinflammatorischen Phänotyps beeinflussen kann. Bezüglich der Mikrogliazellen gab es bereits erste Hinweise darauf, dass Cladribin in immunmodulatorischer Hinsicht Einfluss auf diese Zellart zu nehmen scheint (Singh et al., 2012). In einem ersten Schritt dieses Dissertationsprojektes waren neben der Evaluation einer nicht-zytotoxischen Dosis weitere Untersuchungen hinsichtlich der Einflüsse von Cladribin auf die Genexpression sowie Sekretion im Kontext der MS bekannter, mit Pro- oder Antiinflammation assoziierter Marker bedeutsam. Da es sich bei der Phagozytose um eine Schlüsselaufgabe der Mikrogliazellen, sowohl im gesunden als auch vor allem im entzündlichen ZNS, handelt (Lampron et al., 2015), war es von weiterem Interesse zu untersuchen, ob Cladribin in

der Lage ist, die Phagozytosefähigkeit von Mikrogliazellen positiv zu modulieren, dahingehend, dass diese das im Rahmen der MS frei im ZNS befindliche Myelin möglicherweise schneller aufnehmen und so zu Remyelinisierungsprozessen beitragen könnten. Von Interesse war ebenfalls die Beantwortung der Frage, ob Cladribin in einem entzündlichen Kontext, im Rahmen dieses Dissertationsprojektes in Mikrogliazellen durch LPS induziert, einen möglicherweise reduktiven Einfluss auf die iNOS-Expression und die daraus resultierende, auch im Rahmen der MS ausgelöste, für Axone schädliche (Smith & Lassmann, 2002) NO-Sekretion durch Mikrogliazellen hat. Hinsichtlich der Astrozyten war die wissenschaftliche Datenlage zum Zeitpunkt des Beginns dieses Dissertationsprojektes sehr gering (Aybar et al., 2022). Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften, die Astrozyten im entzündlich veränderten ZNS annehmen können (Salles et al., 2022), war eine genauere Betrachtung möglicher immunmodulatorischer Effekte von Cladribin auf die größte Population der Gliazellen im ZNS von Interesse. Um dieser Fragestellung nachzugehen, erfolgte in einem ersten Schritt dieses Dissertationsprojektes eine umfangreiche Untersuchung von mit Pro- oder Antiinflammation assoziierten astrozytären Genen. Zudem war es von Interesse zu untersuchen, ob Cladribin modulierend auf eine Schlüsselrolle der Astrozyten im Kontext der MS wirkt, nämlich die Beteiligung an der Bildung einer gliösen Narbe nach abgelaufenen inflammatorischen und demyelinisierenden Prozessen (Correale & Farez, 2015). Cladribin wird in der Therapie der hochaktiven RRMS eingesetzt (Europäische Arzneimittel Agentur, 2017). Daher war es ebenfalls von Interesse innerhalb dieser *in vitro* Studie eine proinflammatorische Umgebung zu generieren und ausgehend hiervon zu untersuchen, ob Cladribin modulierende Effekte auf Astrozyten in der Monokultur dahingehend ausüben kann, dass Astrozyten möglicherweise einen neuroregenerativen Phänotyp annehmen. Für die Untersuchung der jeweiligen Fragestellungen wurden primäre Mikrogliazellen und Astrozyten der Wistar-Ratte verwendet und verschiedene *in vitro* Methoden angewendet, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für alle durchgeführten Versuche wurden Astrozyten oder Mikrogliazellen neugeborener (P0/P1) Wistar-Ratten der Spezies *Rattus norvegicus* des Unternehmens Janviers Labs mit Sitz in Saint-Berthevin, Frankreich, verwendet. Die Zucht der Ratten erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Tierorganentnahmenummer O69/11 unter strenger Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) sowie der Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (TierSchVersV).

2.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Citifluor Eindeckmedium	Citifluor, London, UK
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Cell Systems, Lakewood, USA
Ethanol ≥ 96 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Piramal-Healthcare, Mumbai, Indien
LiChrosolv® Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Papain	Cell Systems, Lakewood, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.3 Medien und Seren

Substanz	Inhaltsstoffe und Konzentrationen
Astrozytenzellkulturmedium	• <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>; niedriger Glucosegehalt • FCS (10 %) • Penicillin/Streptomycin (50 U/ml) • L-Glutamin (2 mM)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i> ; hoher Glucosegehalt (D-Glucose 4,5 g/L)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i> ; niedriger Glucosegehalt	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i> ; niedriger Glucosegehalt, Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Leibovitz-L15-Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mikrogliazellkulturmedium	• <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>; niedriger Glucosegehalt • FCS (10 %) • L-Glutamin (2 mM) • Penicillin/Streptomycin (50 U/ml)
<i>Minimal Essential Medium (MEM)</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Medium der gemischten Hirnzellkultur	• <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>; niedriger Glucosegehalt • Fetales Kälberserum FCS (10 %) • Penicillin/Streptomycin (50 U/ml) • L-Glutamin (2 mM)
Rinderserumalbumin 7,5 % (BSA)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-Inhibitor Medium	• Leibovitz-L-15-Medium • Trypsin-Inhibitor (0,1 mg/ml) • Rinderserumalbumin (5 mg/ml) • DNase I (0,4 µg/ml)
Zersetzungsgsmedium	• 2 % DNase I (40 µg/ml) • 20 % L-Cystein (0,24 mg/ml) • 10 % Papain (30 U/ml)

2.1.4 Zur Stimulation verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Cladribin, 2-CdA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rekombinantes TNF- α Protein der Ratte 510-RT-010	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.5 MACS Materialien

Substanz/Zusammensetzung	Hersteller
<i>Anti-GLAST (ACSA-1) MicroBead Kit</i> , Mensch, Maus, Ratte	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Anti-Biotin MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>CD11b/c (Microglia) MicroBeads</i> , Ratte	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Pufferlösung - Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) - Rinderserumalbumin (BSA) (0,5%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Materialien der Immunzytochemie

Substanz	Inhaltsstoffe und Konzentrationen
Antikörperlösung	- Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) - Normales Ziegenserum (NGS, 2 %) - Triton X-100 (0,1 %)
Blockierungslösung	- Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) - Normales Ziegenserum (NGS, 2 %) - Triton X-100 (0,5 %)
Paraformaldehyd (PFA)	- Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) - Paraformaldehyd (PFA, 4 %)

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
Hase anti-Iba-1 (ab 5076)	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Hase anti-Ki-67 (ab 16667)	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Maus anti-GFAP (ab 3402)	1:1.000	Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland

Sekundärantikörper		
Ziege anti-Hase <i>Fluor 488</i>	1:500	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Ziege anti-Maus <i>Fluor 594</i>	1:500	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.1.8 PCR Primer

Name	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
r-ODC	GGT TCC AGA GGC CAA ACA TC	GTT GCC ACA TTG ACC GTG AC
r-HPRT1	CAG TCC CAG CGT CGT GAT TA	ATG GCC TCC CAT CTC CTT CA
r-IGF-1	AGACGGGCATTGTGGATG A	ACATCTCCAGCCTCCTCAG ATC
r-TNF α	AGC CCT GGT ATG AGC CCA TGT A	CCG GAC TCC GTG ATG TCT AAG T
r-IL-6	GTT GTG CAA TGG CAA TTC TGA	TCT GAC AGT GCA TCA TCG CTG
r-CXCL10	GGG ATC CCT CTC GCA AGA A	CTC AGC GTC TGT TCA TGG AAG T
r-CCL5	CCA ACC TTG CAG TCG TCT TTG	TCT GGG TTG GCA CAC ACT TG
r-LCN2	GGG CAG GTG GTT CGT TGT C	AGC GGC TTT GTC TTT CTT TCT G
r-iNOS	CTC AGC ACA GAG GGC TCA AAG	TGC ACC CAA ACA CCA AGG T
r-ARG1	CCA AGC CAA AGC CCA TAG AG	TCC TCG AGG CTG TCC CTT AG
r-TREM2	CCA AGG AGC CAA TCA GGA AA	GGC CAG GAG GAG AAG AAT GG
r-MERTK	TCT GAC AGA GAC CGC AGT CTT C	TGG ACA CCG TCA GTC CTT TG
r-P2Y6	GCC AAG CCA AAT GAG TCC TTT	TTA AGT CGT TGC CTG CTT TCA C
r-P2Y12	CTG TTT TTT GCT GGG CTC ATC	GCG GAT CTG GAA GAA AAT CCT
r-P2X7	TCT TGA GGA GCG CCG AAA	CCC GGG AAG TCG ATA TTG TTC
r-ADORA3A	GTG CCT GGG CAT CCT GTT	GGC GTA GAC AAT AGG GTT CAT CA
r-ADORA3B	CCC ATG TTT GGC TGG AAT AGA	GAG AGG GTG GAG CTG TTT TGA G
r-PTX3	GGC CAA AAG TCA CCC TGT TC	CCA TTC TTT TCT TGG CCA ATCT
r-VEGFA	GCA CTG GAC CCT GGC TTT ACT	TGC AGC CTG GGA CCA CTT
r-ACAN	GCA ACC TCC TGG GTG TAA GG	GCG TCG TAG CGG GAT GAG
r-AQP4	CAT GGC CAG CAG TGA GGT TT	CAT CGC CAA GTC CGT CTT CT
r-SOX9	CCA GGC CAG TCC CAG AGA	GTA GTG GCT CGG GCT CAG TT
r-BCAN	GCA TCG CTC ACA GAT GTG TCT T	GCG ATA GAC CCC GGA ATC AT

r-CDH2	CAA GCA CAG CGG ACG TCT A	CAA GTT GAT CGG AGG GAT GAC
r-CSGALNACT1	ATG TGC ACC TGT ACC GGA AAT A	CCG TAC AGG CGT GCG TAT C
r-CHST11	CCC GAA CTA CCG ACG AGA TG	GCT CGG CGC TGA TGT TCT
r-XYLT-1	CCC AAT GTG ACC GTG ACT GTT	TCA TAG GTG GCT GCG ATG AC

2.1.9 Materialien für die quantitative *Real Time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Set	Hersteller
<i>Power SYBR™ Green PCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Set</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.1.10 ELISA Sets

Set	Hersteller
<i>Rat IL-6 SimpleStep ELISA Kit (ab234570)</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>Rat Lipocalin-2 SimpleStep ELISA Kit (ab239422)</i>	Abcam, Cambridge, UK
<i>Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-1</i>	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

2.1.11 Laborbedarf

Produkt	Hersteller
<i>Applied Biosystems™ MicroAmp™ Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte</i> , 0,1 ml	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>Applied Biosystems™ MicroAmp™ Fast Reaktionsgefäße mit Deckel</i> , 0,1 ml	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland
Deckglas (<i>Coverslip</i>) Ø 13 mm	Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
MACS™ Säulen, MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS™ Säulen, LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Petrischalen, Ø 10 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße, Mikroreaktionsgefäße 50 ml, 15 ml, 5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Spritzenfilter Filtropur S, 0,2 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10/20 µl, 10 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Stripetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Gilson International, Limburg a. d. Lahn, Deutschland
X-well Zellkulturkammer, 8 Vertiefungen, auf PCA-Objektträger, ablösbarer Rahmen	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 cm ² , behandelt mit Triethoxycaprylsilane (TC)	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.12 Gerätschaften

Produkt	Hersteller
<i>Applied Biosystems™</i> <i>7900HT Fast Real-Time PCR System</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Dampfsterilisator GLA30	Fritz Gössner GmbH, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Flüssigkeitsabsaugsystem Vacusip	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Ewald Innovationstechnik AG, Rodenberg, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank 2-8 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
<i>Infinite® 200 PRO Microplate Reader</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Inkubator BBD 6220 CO ₂	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
MACS ® MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minischüttler MS2	IKA Works Incl., Wilmington, USA
<i>Pipett-Boy</i>	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Schüttelinkubator Excella E24	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe HSP 12	Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop™ 1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland

Thermozykler Veriti	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge 5804	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wessling-Berzdorf, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer Typ Thoma (Kammertiefe: 0,1 mm; Kammerfläche: 0,0025 mm ²)	Optik Labor, Görlitz, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland

2.1.13 Software

Produkt	Hersteller
Axiovision 4.2 Software	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Endnote Version X9.3.3	Clarivate Analytics, London, UK
GraphPad PRISM software 8.0.2	GraphPad Software, San Diego, USA
i-control™ Software Version 1.7.1.12	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ImageJ Bildverarbeitungsprogramm	NIH, Rockville, USA
Microsoft Office 2016 für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Primer Express Software v3.0.1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Sequenz-Detektionssystem (SDS)-Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung der zur Stimulation verwendeten Substanzen

Cladribin und DMSO

Die Bereitstellung von Cladribin erfolgte durch die Firma Merck mit Sitz in Darmstadt. Die Menge des zur Verfügung gestellten Konzentrates betrug 0,025 g (Batch-Nummer N1800624; Produktionsdatum 04/2018). Dieses wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer Ausgangskonzentration von 10 Millimol/Liter (mmol/l) verdünnt und in kleinen Einheiten in Mikroreaktionsgefäßen bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. DMSO in der Konzentration 10 mmol/l diente als Kontrollsubstanz. Es erfolgte, analog zum Vorgehen bei Cladribin, die Lagerung in Mikroreaktionsgefäßen bei -80 °C bis zur Verwendung.

TNF- α

Für Co-Stimulationsexperimente mit Cladribin/DMSO in der Astrozytenkultur wurde kommerziell erworbenes rekombinantes TNF- α -Protein der Ratte verwendet. Gemäß des Herstellerprotokolls wurde das rekombinante TNF- α zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mittels sterilem PBS und 0,5 % BSA verdünnt und bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert. Die Kombination aus sterilem PBS und 0,5 % BSA wurde als Kontrolle verwendet.

LPS

Für Co-Stimulationsexperimente mit Cladribin/DMSO in der Mikrogliakultur wurde kommerziell erworbenes LPS verwendet. Dieses wurde gemäß Herstellerprotokoll mit sterilem Wasser (ddH₂O) zu einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Beschichtung von PDL-Zellkulturplatten

Um eine adäquate Adhäsion der Astrozytenzellkultur auf den verwendeten Deckgläsern ($\varnothing$ 13 mm) zu gewährleisten, erfolgte im Vorfeld die Beschichtung dieser mit PDL in PBS mit einer Konzentration von 0,1 ng/ml. Dazu wurde in jede Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ein Deckglas eingebracht und im Anschluss 500 μl der oben beschriebenen PDL-Lösung hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Zellkulturplatten luftdicht versiegelt und bis zu ihrer weiteren Verwendung, mindestens jedoch 24 h, bei 2-8 °C gelagert. Vor Verwendung der Zellkulturplatten erfolgte eine dreimalige Waschung mit je 500 μl PBS. Im Anschluss wurden 500 μl 37 °C warmes Astrozytenzellkulturmedium je Vertiefung aufgebracht und die Zellkulturplatten unmittelbar für die Aussaat von Astrozyten verwendet.

2.2.3 Methoden der Zellkultur

Alle beschriebenen Arbeitsschritte der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen auf der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur (RT), wenn nicht anders beschrieben.

Mikrogliazellen

Herkunft und Präparation der Rattenmikrogliazellen

Die für die durchgeführten Experimente verwendeten Mikrogliazellen entstammten einer gemischten Zellkultur aus Hirnen von neugeborenen Wistar-Ratten (P0 und P1). Die Entnahme erfolgte nach dem Protokoll von McCarthy und de Vellis (McCarthy & de Vellis, 1980). Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch technische MitarbeiterInnen des Forschungslabors durchgeführt.

Es erfolgte zunächst die Betäubung und Tötung der Tiere mit dem Narkosegas Isofluran. Im Anschluss daran erfolgten die Dekapitation sowie die Entfernung von Haut und Schädelknochen. Die Hirne der Tiere wurden entnommen und in Minimum Essential 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Medium (MEM-HEPES Medium) gesammelt. Als nächster Arbeitsschritt erfolgte eine Trennung der Großhirnhemisphären und die Entfernung der Meningen. Die Kortexe wurden zerkleinert und in Reaktionsgefäße, gefüllt mit 50 ml MEM-HEPES Medium, verbracht. Nun erfolgte eine Zentrifugation mit 2000 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei RT für eine Minute (min). Der entstandene Überstand wurde verworfen und 1 ml Zersetzungsmedium auf das Gewebe gegeben. Es erfolgte nun eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit für insgesamt 45 min, um eine vollständige Verflüssigung des Gewebes zu erzielen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 ml Trypsin-Inhibitor Medium hinzugegeben und es erfolgte eine erneute Inkubation von 5 min bei RT. Im Anschluss wurde das verflüssigte Gewebe mit einer Pasteurpipette aus Glas gemischt und 10 ml DMEM mit hohem Glucosegehalt sowie 10 % FCS wurden hinzugefügt. Nun erfolgte eine Zentrifugation mit 1200 UpM bei RT für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 15 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur resuspendiert. Dann erfolgte die Aussaat des Zellgemisches in T75 Zellkulturflaschen. Dabei enthielt eine Flasche das gewonnene Material von jeweils 2 Tieren. Die Zellkulturflaschen wurden daraufhin für 10 Tage (d) bei 37 °C, 10 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um ein bestmögliches Wachstum zu ermöglichen, erfolgte zwei Mal in der Woche ein Mediumwechsel. Nach Ablauf der 10 d erfolgte eine Inkubation von 2 h auf dem Schüttelinkubator mit 180 UpM bei 37 °C. Der vorhandene Überstand, hauptsächlich bestehend aus nicht-adhärenenten Mikrogliazellen, wurde als nächstes in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur resuspendiert und zu 9 ml des identischen Mediums, die sich bereits auf einer Petrischale befanden, hinzugegeben. Es folgte nun eine Inkubation bis zum nächsten Tag bei 37 °C, 5 % CO₂

und 98 % Luftfeuchtigkeit. Die verbliebenen Zellkulturflaschen, die größtenteils Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Astrozyten enthielten, wurden im nächsten Schritt mit 10 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur gefüllt und für weitere 22 h in den Inkubationsschüttler mit 180 UpM bei 37 °C verbracht. Im Anschluss wurde der Überstand, hauptsächlich bestehend aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und in kleineren Teilen bestehend aus Astrozyten und Mikrogliazellen, in eine 10 ml Petrischale überführt. Darauf erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit für mindestens 2 h, die dazu führte, dass die Mikrogliazellen adhärent zur Oberfläche der Petrischale wurden. Um die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Astrozyten zu entfernen, wurde der Überstand im Anschluss entnommen und 10 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur auf die Petrischale gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit. Um eine maximale Anzahl an Mikrogliazellen zu generieren, wurden somit Mikrogliazellen aus insgesamt 2 Schüttelvorgängen (2 h und 22 h) verwendet und zusammengeführt.

Isolation der Mikrogliazellen mittels MACS

Die Isolation der Mikrogliazellen erfolgte mittels des *Magnetic Activated Cell Sorting* Systems (MACS) von Miltenyi Biotec nach Herstellervorgaben. Es wurden alle benötigten Reagenzien, während der im Folgenden beschriebenen Schritte, auf Eis gekühlt, um Stoffwechselprozesse der Mikrogliazellen herunterzufahren und sie so vor Apoptose zu schützen. In einem ersten Schritt wurde das in der Petrischale befindliche Medium entnommen und verworfen. Es erfolgte ein Waschschrift mit 4 ml PBS je Petrischale, um die verbliebenen Mediumreste zu entfernen. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Zugabe von 3 ml Accutase je Petrischale. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C sowie 98 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe von 4 ml 37 °C warmen Mikrogliazellkulturmedium, um die enzymatische Reaktion der Accutase zu beenden. Während dieser Zeit lösten sich die Mikrogliazellen von der Oberfläche der Petrischalen. Die nun vorhandenen 7 ml Zellsuspension wurden umgehend entnommen und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Als nächster Schritt erfolgte eine erste Zentrifugation mit 1200 UpM bei 4 °C für 5 min. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde in 80 µl MACS-Pufferlösung resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl der *CD11b/c MicroBeads* hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubationszeit von 15 min bei 2-8 °C, um eine Bindung der magnetischen Antikörper an die entsprechenden mikroglialen Oberflächenproteine zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurden die *MicroBeads*, die nicht gebunden haben, durch Zugabe von 2 ml MACS-Pufferlösung und einer anschließenden Zentrifugation mit 1200 UpM bei 4 °C für

5 min ausgewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 500 µl MACS-Pufferlösung resuspendiert. Daraufhin erfolgte der eigentliche MACS-Vorgang. Dafür wurde zunächst der magnetische MACS *MultiStand* aufgebaut und mit den *MiniMACS*-Separatoren sowie den MACS-Säule in der Größe MS versehen. In einem ersten Schritt erfolgte die Befeuchtung der MACS-Säulen mit 500 µl der MACS-Pufferlösung. Im Anschluss wurden 500 µl der Zellsuspension in die jeweilige MACS-Säule gegeben. Nachdem diese die Säule passiert hatten, wurde diese insgesamt drei Mal mit jeweils 500 µl der MACS-Pufferlösung gewaschen. Daraufhin wurde die Säule aus dem MACS *MultiStand* sowie dem *MiniMACS Separator* entnommen. In die Säule wurde 1 ml der MACS-Pufferlösung gegeben und diese wurde mit dem beiliegenden Kolben zügig durch die Säule gedrückt. Die separat aufgefangene Zellsuspension wurde in einem nächsten Schritt erneut mit 1 200 UpM bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Zellpellet in 500 µl MACS-Pufferlösung resuspendiert. Um eine möglichst reine Mikrogliazellkultur zu erhalten, wurde der Zellseparationsschritt unter Verwendung neuer MACS MS Säulen wiederholt. In einem nächsten Schritt erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 1 200 UpM bei 4 °C für 5 min und die Mikrogliazellen wurden anschließend in 1 ml 37 °C warmen Mikrogliazellkulturmedium resuspendiert. Hiernach wurde die Anzahl der erhaltenen vitalen Mikrogliazellen mittels einer Thoma Zählkammer ermittelt. Dafür erfolgte die Färbung von 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau und anschließender Zählung der vitalen Mikrogliazellen. In einem letzten Schritt wurde die benötigte Anzahl an Mikrogliazellen ausgesät und nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 5 % CO₂, 37 °C und 98 % Luftfeuchtigkeit für die entsprechenden Experimente weiterverwendet.

Stimulation und Kultivierung der primären Mikrogliazellen

Die Mikrogliazellen wurden 24 h nach dem MACS-Vorgang mit Cladribin bzw. der Kontrollsubstanz DMSO stimuliert.

Für die Dosistitrationsexperimente erfolgte die Aussaat und Stimulation von 25 000 Mikrogliazellen je Vertiefung in einer Zellkulturkammer mit 8 Vertiefungen mit einer Fläche von 0,8 cm² je Vertiefung auf PCA-Objektträgern mit ablösbarem Rahmen mit 300 µl Cladribin bzw. DMSO in den Konzentrationen 10 µM, 1 µM, 0,5 µM und 0,1 µM. Dabei wurden je 2 Vertiefungen einer Bedingung zugeordnet.

Für die qRT-PCR Experimente erfolgte die Aussaat und Stimulation von 300 000 Mikrogliazellen je Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen mit einer Fläche

von 1,9 cm² je Vertiefung mit jeweils 1 ml der angefertigten Stimulationslösungen in der Konzentration 0,1 µM. Je Bedingung erfolgte die Zuordnung von 3 Vertiefungen, um eine ausreichende RNS (Ribonukleinsäure) -Menge für die qRT-PCR Experimente zu generieren.

Nach der Stimulation wurden die Mikrogliazellen unmittelbar zurück in den Inkubator verbracht und für weitere 24 h bzw. 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit bebrütet.

Für ELISA-Experimente wurden 50 000 Mikrogliazellen je Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät und mit Cladribin bzw. DMSO in der Konzentration 0,1 µM stimuliert. Je Bedingung wurden 3 Vertiefungen verwendet. Die weiteren Messungen erfolgten nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit.

Für Experimente mittels Vorstimulation durch LPS wurde ein anderer Versuchsaufbau gewählt. Unmittelbar im Anschluss an den MACS-Vorgang wurden in Zellkulturkammern mit 8 Vertiefungen je Vertiefung 50 000 Mikrogliazellen in je 300 µl Zellkulturmedium ausgesät. Es erfolgte ein Inkubationsschritt für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit. Im Anschluss an diesen erfolgte die Stimulation mit LPS (L) in der Konzentration 100 ng/ml oder der Kontrollsubstanz steriles Wasser (bL). Um die für die Experimente benötigte Konzentration von 100 ng/ml zu erhalten, erfolgte die Vermischung von 1 µl LPS der Konzentration 1 mg/ml und 10 ml gelb-Punkt-Medium. Als Kontrolle diente steriles Wasser. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit wurden die vorstimulierten Mikrogliazellen mit Cladribin (C) oder der Kontrollsubstanz DMSO (bC) der Konzentration 0,1 µM stimuliert. Im Anschluss an den letzten Stimulationsschritt erfolgte die Inkubation der Mikrogliazellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit für 24 h sowie 72 h.

L/C	L/bC	bL/C	bL/bC
L/C	L/bC	bL/C	bL/bC

Abb. 5: Schematischer Überblick des Versuchsaufbaus der Vorstimulationen mit LPS
Folgende Abkürzungen wurden verwendet: LPS (L), Cladribin (C), *buffer* Cladribin (bC), *buffer* LPS (bL).

Astrozyten

Herkunft und Präparation der verwendeten Astrozytenkultur aus der Ratte

Die Astrozytenkultur hatte ihren Ursprung ebenfalls in einer gemischten Zellkultur, hervorgegangen aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten (P0 und P1). Die im Nachfolgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch die technischen Mitarbeiter*innen des Labors durchgeführt nach dem Protokoll von McCarthy und de Vellis (McCarthy & de Vellis, 1980).

Die Tötung der Ratten erfolgte mittels Betäubung mit Narkosegas (Isofluran) und nachfolgender Dekapitation. Im Anschluss erfolgte die Lösung der Kopfhaut vom Schädel sowie die Eröffnung des Schädelknochens. Das entnommene Hirn wurde auf eine Petrischale verbracht und die Hemisphären voneinander getrennt. Daraufhin wurden die Meningen entfernt. Im Anschluss erfolgte der Transfer auf eine weitere Petrischale, gefüllt mit DMEM, sowie eine Zerkleinerung der Hemisphären mittels eines Skalpells und die Überführung in ein Reaktionsgefäß der Größe 50 ml, gefüllt mit MEM. Es folgte die Zentrifugation mit 2000 UpM bei 4 °C für 1 min. Der Überstand wurde daraufhin entfernt und es folgte die Resuspendierung in 1 ml Medium der gemischten Zellkultur. Die anschließende Zellisolierung erfolgte mittels Scherkräfte durch Pipettieren mittels einer Pasteurpipette. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit 9 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur vermischt sowie steril filtriert. Dann erfolgte die Aussaat von jeweils 5 ml des Zellgemisches und 15 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur in einer T75 Zellkulturflasche. Dabei wurden die gewonnenen Zellen aus einem Tier auf 2 Flaschen aufgeteilt. Die Zellkulturflaschen wurden daraufhin für 8 d bei 37 °C, 10 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um ein ideales Wachstum zu gewährleisten, wurde alle drei bis vier Tage das Medium gewechselt. Um eine gleichmäßige Zellkultur zu erhalten, erfolgte am Tag 8 nach Präparation der Astrozytenkultur eine erste Passage der Zellen. Die Zellkulturflaschen wurden aus dem Inkubator entnommen und dreimalig mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden in jede Zellkulturflasche 5 ml des Enzyms Trypsin gegeben, um die adhärenenten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C, 10 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit für 5 min. Im Anschluss erfolgte die Hinzugabe von 5 ml Astrozytenzellkulturmedium. Die nun in jeder Zellkulturflasche enthaltenen 10 ml des Zellgemisches wurden im Anschluss in einem 50 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt. Es folgte eine Zentrifugation mit 1200 UpM bei 4 °C für 5 min. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml Astrozytenzellkulturmedium resuspendiert, auf 4 neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und für weitere 7 d bei 37 °C, 10 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Hierbei erfolgte

ein Mediumwechsel zweimal wöchentlich. Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine Inkubation von 2 h auf dem Schüttelinkubator mit 180 UpM bei 37 °C. Der vorhandene Überstand wurde entfernt und die Zellkulturflaschen, die nun größtenteils Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Astrozyten enthielten, wurden mit 10 ml Medium der gemischten Hirnzellkultur gefüllt und für weitere 22 h in den Inkubationsschüttler mit 180 UpM bei 37 °C verbracht.

Isolation der Astrozyten mittels MACS

Die Isolation der Astrozyten erfolgte mittels des MACS-Systems des Herstellers Miltenyi Biotech unter sterilen Bedingungen. In einem ersten Schritt erfolgte die Entnahme der Zellkulturflaschen mit den Astrozyten aus dem Inkubationsschüttler sowie die Abnahme des enthaltenen Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Hiernach erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C, 10 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit für 5 min, um die Astrozyten vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Im Anschluss wurde der Ablösevorgang durch die Hinzugabe von 10 ml Astrozytenzellkulturmedium beendet und die jetzt im Medium befindlichen Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 1200 UpM und 4 °C für 5 min. Nach Resuspendierung der Zellen in 160 µl MACS-Pufferlösung wurden diese mit 40 µl anti-GLAST *MicroBeads* vermischt und für 10 min bei 2-8 °C inkubiert. Daraufhin wurden 2 ml MACS-Pufferlösung zu der Zellsuspension gegeben und diese dann bei 1200 UpM und 4 °C für 5 min zentrifugiert, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen in 160 µl MACS-Pufferlösung resuspendiert und mit 40 µl Anti-Biotin *Microbeads* vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit bei 2-8 °C für 15 min. Im Anschluss erfolgte die Hinzugabe von 2 ml MACS-Pufferlösung und ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 1200 UpM bei 4 °C für 5 min. Die Zellen wurden anschließend erneut in 2 ml MACS-Pufferlösung resuspendiert. Analog zum Vorgehen beim MACS-Vorgang der Mikrogliazellen erfolgte nun die magnetische Isolation der Astrozyten aus dem Zellgemisch. Dazu wurde der MACS *MultiStand* mit dem MidiMACS Separator versehen und LS Säulen verwendet. Diese wurden zunächst durch die Zugabe von 3 ml MACS-Pufferlösung befeuchtet. Im nächsten Schritt wurden 2 ml Zellsuspension in die jeweilige Säule gegeben. Anschließend wurden die Säule durch die Zugabe von jeweils 3 ml MACS-Pufferlösung insgesamt drei Mal gewaschen. Abschließend wurden 5 ml MACS-Pufferlösung in die jeweilige Säule gegeben und mit dem beiliegenden Kolben zügig durch die Säule gedrückt. Die so entstandene Zellsuspension wurde in einem separaten Reaktionsgefäß aufgefangen und bei

1 200 UpM und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die erhaltenen Astrozyten wurden in 5 ml Astrozytenzellkulturmedium resuspendiert, gezählt und ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37 °C, 10 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit erfolgte die Stimulation der Astrozyten.

Stimulation und Kultivierung der primären Astrozyten

Die Stimulation der Astrozyten mit Cladribin sowie der Kontrollsubstanz DMSO erfolgte 72 h nach Beendigung des oben beschriebenen MACS-Vorganges.

Für die Dosistitrationsexperimente erfolgte die Stimulation von 50 000 Astrozyten je Vertiefung auf PDL-beschichteten Deckgläsern in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen mit Cladribin bzw. DMSO in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Dabei wurden je 2 Vertiefungen einer Bedingung zugeordnet.

Für die qRT-PCR Experimente erfolgte die Stimulation von 100 000 Astrozyten je Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen mit Cladribin bzw. DMSO in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Dabei wurden je 4 Vertiefungen einer Bedingung zugeordnet.

Für ELISA-Experimente wurden 100 000 Astrozyten je Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät und mit Cladribin bzw. DMSO in der Konzentration 10 µM stimuliert. Je Bedingung und Zeitpunkt wurden 4 Vertiefungen verwendet.

Die Zellkulturplatten mit den Astrozyten wurden im Anschluss an die Stimulation umgehend wieder in den Inkubator verbracht. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 72 h bei 37 °C, 10 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit erfolgte die weitere Verwendung der Astrozyten für die entsprechenden Experimente.

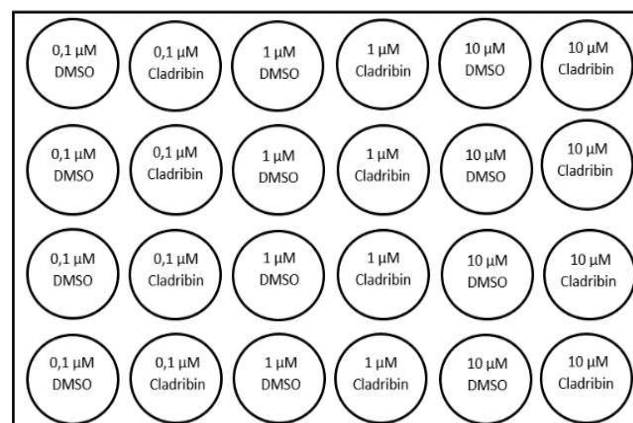


Abb. 6: Schematischer Aufbau der Zellkulturplatte für qRT-PCR Messungen

Für die Prästimulations-Experimente wurde ein anderes Vorgehen gewählt. Pro Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen erfolgte die Stimulation von 60 000 Astrozyten. Dabei wurden 2 verschiedene Versuchsbedingungen (A-B) gewählt mit jeweils 4 Unterbedingungen. Einer Unterbedingung wurden dabei jeweils 4 Vertiefungen zugeordnet. Die Inkubationen erfolgten bei 37 °C, 10 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 98 %.

- A) Simultane** Stimulation der Astrozyten mit TNF- α (T) in einer Konzentration von 10 μ g/ml oder der Kontrollsubstanz (*buffer* TNF α (bT)) sowie mit Cladribin (C) in einer Konzentration von 10 μ M oder der Kontrollsubstanz (*buffer* Cladribin (bC)) an Tag 0. Inkubation der Zellen für 24 h oder 72 h.
- B) Prästimulation** der Astrozyten mit TNF- α (T) in einer Konzentration von 10 μ g/ml oder der Kontrollsubstanz bT an Tag 0, weitere Stimulation der Astrozyten mit Cladribin (C) in einer Konzentration von 10 μ M oder der Kontrollsubstanz bC nach 24 h. Inkubation der Zellen für 24 h oder 72 h.

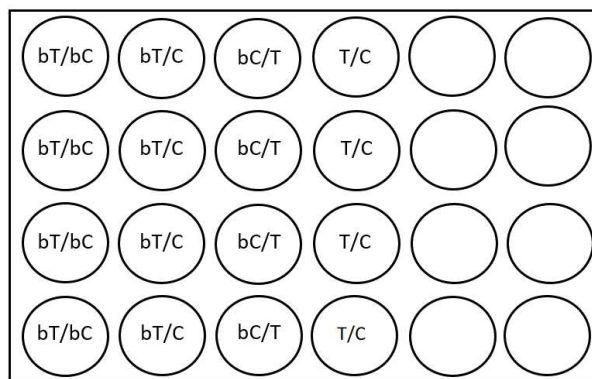


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Zellkulturplatte der Prästimulations-Experimente. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: TNF- α (T), Cladribin (C), *buffer* TNF- α (bT), *buffer* Cladribin (bC).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Extraktion von Ribonukleinsäuren

Die im Nachfolgenden beschriebenen Schritte erfolgten mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen nach Herstellervorgaben. In einem ersten Schritt erfolgte die Lyse der kultivierten und stimulierten Mikrogliazellen bzw. Astrozyten mittels eines Gemisches zusammengesetzt aus 0,1 M β -Mercaptoethanol und RLT Lyse Puffer (1:100) durch kratzende Bewegungen mit einer Pipettenspitze. Das entstandene Lysat wurde unmittelbar in *Qia-Shredder*-Säulen überführt. Es folgte eine Zentrifugation mit 14 000 UpM bei 4 °C für 2 min. Im Anschluss wurde das Eluat mit 350 μ l Ethanol 70 % verdünnt, und daraufhin in die *RNeasy* Säule überführt. Darauf folgte eine erneute

Zentrifugation mit 10 000 UpM bei 4 °C für 2 min, wobei die RNS an die in der Säule enthaltene Kieselerde gebunden wurde. Das Eluat wurde entsorgt und im nächsten Schritt wurden 350 µl RW1-Puffer in die Säule pipettiert. Nach Zentrifugation mit 10 000 UpM bei 4 °C für 2 min erfolgte die Zugabe von 80 µl *RNAse free DNase buffer*, bestehend aus 70 µl RDD Puffer und 10 µl *DNase*, zur Entfernung von in der Säule enthaltener DNS. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei RT und im Anschluss die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer. Daraufhin wurde eine Zentrifugation bei 10 000 UpM und 4 °C für 2 min durchgeführt und es erfolgte die Zugabe von 500 µl RPE, einem weiteren Waschpuffer. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation mit 10 000 UpM bei 4 °C für 2 min. Der Vorgang wurde wiederholt, um das Ethanol vollständig auszuwaschen. Das Eluat wurde dabei jeweils verworfen. Als Nächstes wurde eine trockene Zentrifugation durchgeführt mit 14 000 UpM bei 4 °C für 2 min. In einem letzten Schritt erfolgte die Zugabe von 21 µl *RNAse-free water* auf jede Säule und, nach einer Inkubationszeit von 4 min, eine letzte Zentrifugation mit 10 000 UpM bei 4 °C für 2 min, um die RNS aus der Säule zu lösen. Das die RNS enthaltende Eluat wurde aufgefangen und die enthaltene RNS-Menge mit Hilfe des NanoDrop ND 1000 gemessen. Die Proben wurden im Anschluss entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

Synthese der komplementären DNS (cDNS)

Für die folgenden Schritte wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Set* von Thermo Fisher sowie der Thermozykler Veriti verwendet. Alle Schritte wurden nach Herstellervorgaben durchgeführt. Es erfolgte, abhängig vom RNS Gehalt einer Probe, die Verdünnung mit LiChrosolv® Wasser bis zu einem RNS Gehalt von 250 ng/Probe bei einem Gesamtvolumen von 19,8 µl. Im Anschluss erfolgte die Zusammenstellung des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Mix* mit einem Gesamtvolumen von 10,2 µl je Probe auf Eis (s. Tabelle 1). Nach Zusammenführung der RNS mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Mix*, ergab sich ein Gesamtvolumen von 30 µl je Probe (s. Tabelle 2), welches in den Thermozykler verbracht wurde. Dort verlief die cDNS Synthese nach einem festgelegten Programm in drei Schritten bei unterschiedlichen Temperaturen. Begonnen wurde mit einem ersten Schritt bei 25 °C für 10 min, um die Primer an die RNS zu binden. Dann folgte der eigentliche Syntheseschritt bei 37 °C für 120 min, währenddessen sich, ausgehend von den Primern, die Reverse Transkriptase sowie die Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dTNP) an die RNS anlagerten, angeschlossen von einem letzten Schritt zur Inaktivierung der beteiligten Enzyme bei 85 °C für 5 s.

Reagenz	Volumen je Probe [μ l]
10x RT Buffer	3
dTNP's, 100 mM	1,2
10x RT Random Primers	3
RNAse Inhibitor 20 U/ml	1,5
Reverse Transcriptase	1,5
Gesamtvolumen je Probe [μl]	10,2 μl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Reagenzien des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Mix*

Reagenz	Volumen [μ l]
RNS in LiChrosolv® Wasser	19,8
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Mix</i>	10,2
Gesamtvolumen je Probe [μl]	30

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNS Synthese

Durchführung der qRT-PCR

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit dem *Applied Biosystems™ 7900HT Fast Real-Time PCR System* und der *Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte* nach Herstellervorgaben. Es erfolgte zunächst die Zusammenstellung des *PCR Master Mix* für jedes zu messende Gen (s. Tabelle 3). Der *POWER SBYR Green PCR Master Mix* enthält eine DNS-Polymerase sowie einen Fluoreszenzfarbstoff. Die Primer wurden in einer Konzentration von 15 pmol eingesetzt. Es erfolgte eine durchgehende Kühlung der verwendeten Reagenzien auf Eis. In einem ersten Schritt wurden 30 μ l der cDNS mit 170 μ l LiChrosolv® Wasser verdünnt. Im Anschluss wurden 4 μ l der so verdünnten cDNS mit 16 μ l des *PCR Master Mix* zusammengeführt zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen und zur Kontrollsubstanz zum Zeitpunkt 24 h normiert. Als Referenzgene wurden Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) für Astrozyten und Ornithindecaboxylase (ODC) für Mikrogliazellen verwendet. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte anhand eines Amplifikationsprofils mit 40 Zyklen wobei jeder Zyklus aus 15 s bei 95 °C sowie 1 min bei 60 °C bestand. Zur Messung der relativen Genexpression wurde die $\Delta\Delta C_t$ Methode verwendet (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Reagenz	Volumen [µl]
Primer vorwärts	1,2
Primer rückwärts	1,2
<i>LiChrosolv</i> ® Wasser	3,6
<i>POWER SBYR Green PCR Master Mix</i>	10
Gesamtvolumen je Gen [µl]	16

Tabelle 3: Bestandteile des *PCR Master Mix*

2.2.5 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Färbungen der Mikrogliazellen wurden Zellkulturkammern mit 8 Vertiefungen mit einer Fläche von je 0,8 cm² auf PCA-Objektträgern mit ablösbarem Rahmen verwendet. Pro Vertiefung wurden 25 000 bzw. 50 000 Mikrogliazellen ausgesät und für die entsprechenden Experimente stimuliert (s. 2.2.3). Für die im Folgenden beschriebenen Färbungen der Astrozyten wurden pro Vertiefung 50 000 Astrozyten auf PDL-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen mit einer Oberfläche von 1,9 cm² je Vertiefung ausgesät und für die Experimente stimuliert (s. 2.2.3)

In einem ersten Schritt erfolgte die Fixierung der Zellen. Dafür wurde, 24 h bzw. 72 h nach der Stimulation, das in den Zellkulturplatten befindliche Medium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Fixierungsmittels Paraformaldehyd 4% (PFA 4%), gefolgt von einer 10-minütigen Inkubationszeit bei RT. Im Anschluss erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS.

Zur Färbung der Astrozytenzellkultur erfolgte die Entnahme der in den Vertiefungen befindlichen Deckgläser und der Transfer dieser auf Petrischalen. Im Anschluss daran wurde in jede Vertiefung bzw. auf jedes Deckglas die Blockierungslösung aufgetragen, gefolgt von einer Inkubationszeit von 40 min bei RT. Anschließend wurde die Blockierungslösung entfernt und die jeweilige primäre Antikörperlösung hinzugefügt. Nun folgte eine Inkubation in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung verworfen und die Zellkulturkammern bzw. die Deckgläser dreimalig mit PBS gewaschen. Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe des jeweiligen Fluorophor enthaltenden Sekundärantikörpers verdünnt in PBS und versehen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:100). Es folgte eine zweistündige Inkubation im Dunkeln bei RT. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS. Anschließend wurde der Rahmen der Zellkulturkammer entfernt und ein 24 x 50 mm großes Deckglas unter Zuhilfenahme des Eindeckmediums Citifluor

aufgebracht. Die Deckgläser, die für die Färbung der Astrozyten verwendet wurden, wurden auf einen Objektträger verbracht und ebenfalls mit Citifluor versiegelt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 und der Software Axiovision 4.2 des Herstellers Carl Zeiss erfolgte die Erstellung von 7 Bildern je Bedingung. Die Auswahl der Positionen erfolgte dabei zufällig anhand eines Z-Musters. Die anschließende Auswertung wurde mit dem Programm Image J des National Institute of Health durchgeführt. Dabei wurden zunächst alle DAPI-positiven Zellkerne gezählt, um eine Gesamtzellzahl zu erhalten. Im Anschluss daran wurde die Anzahl aller weiteren signalgebenden Zellen ermittelt. Die Darstellung erfolgte als Prozentwert des Anteils der signalgebenden Zellen an der Gesamtzellzahl.

2.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

IL-6 ELISA

Die Durchführung des IL-6 ELISA erfolgte mit dem *Rat IL-6 SimpleStep ELISA Kit (ab234570)* von Abcam nach Herstellervorgaben. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde der *IL-6 protein standard* mit *Sample Diluent NS* vermischt und in mehreren Schritten weiter verdünnt, bis eine Serie mit insgesamt 8 Konzentrationen zwischen 0 pg/ml und 8 000 pg/ml entstand. In jede Vertiefung, der mit einem speziellen *anti-tag* IL-6 Antikörper beschichteten ELISA-Platte, wurden 50 µl der entsprechenden Konzentration der Verdünnungsreihe oder 50 µl des zu untersuchenden Überstandes in Dubletten pipettiert. Das im Überstand enthaltene IL-6 band an den bereits vorhandenen *anti-tag* IL-6 Antikörper und wurde dadurch immobilisiert. Im Anschluss daran wurden in jede Vertiefung 50 µl des Antikörper *Cocktails* hinzugegeben. Der darin vorliegende, Enzym-enthaltende Antikörper band wiederum an den Komplex aus *anti-tag* Antikörper und IL-6. Die Platte wurde anschließend versiegelt und für eine Stunde bei RT auf dem Tischschüttler bei 400 UpM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Platte dreimalig mit 350 µl *1X Wash Buffer PT* je Vertiefung gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl *TMB Development Solution* in jede Vertiefung gegeben und die Platte lichtgeschützt für 10 min auf dem Tischschüttler bei 400 UpM inkubiert. In dieser Zeit wurde das in der *Development Solution* enthaltene Substrat enzymatisch umgesetzt und es entstand eine Blaufärbung, deren Intensität sich proportional zu der in der Probe enthaltenen IL-6 Konzentration verhielt. Die Reaktion wurde nach Ablauf der 10 min durch die Zugabe von 100 µl *Stop Solution* je Vertiefung beendet. Dadurch kam es zu einem Farbumschlag ins Gelbe. Die abgegebene

Signalintensität des Lichts der Wellenlänge 450 Nanometer (nm) wurde mit dem Infinite® 200 PRO Microplate Reader und der i-control™ Software Version 1.7.1.12 gemessen. Die Ergebnisse der Messung wurden mit Microsoft Excel (MS Office 2016) weiterverarbeitet. Dafür wurde zunächst eine Kalibrierungskurve unter Verwendung der Konzentrationen (0 pg/ml bis 8 000 pg/ml) und entsprechenden Extinktionen der Standardverdünnungsreihe berechnet und in Anlehnung daran der IL-6 Gehalt einer jeden zu untersuchenden Probe ermittelt.

IGF-1 ELISA

Die Durchführung des IGF-1 ELISA erfolgte mit dem *Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-1* von R&D Systems nach Herstellervorgaben. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Zu Beginn wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Hierfür wurde der *IGF-1 Standard* mit *Calibrator Diluent* vermischt und in mehreren Schritten weiter verdünnt, bis eine Serie mit insgesamt 8 Konzentrationen zwischen 0 pg/ml und 2 000 pg/ml entstand. In jede Vertiefung, der mit einem IGF-1 Antikörper beschichteten ELISA-Platte, wurden 50 µl der entsprechenden Konzentration der Verdünnungsreihe oder 50 µl des zu untersuchenden Überstandes in Dubletten pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei RT für 2 h auf dem Minischüttler. Dabei kam es zu einer Immobilisierung des im Überstand enthaltenen IGF-1 durch Bindung an den IGF-1 Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Platte viermalig mit 400 µl *Wash Buffer* je Vertiefung gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl des *IGF-Conjugate* in jede Vertiefung gegeben, gefolgt von einer Inkubation für 2 h bei RT auf dem Minischüttler und einer Wiederholung des beschriebenen Wachschrilles. Als Nächstes wurden 100 µl der *Substrate-Solution* in jede Vertiefung pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Die Reaktion wurde nach Ablauf der 30 min durch die Zugabe von 100 µl *Stop Solution* je Vertiefung beendet. Dadurch kam es zu einem Farbumschlag ins Gelbe. Die abgegebene Signalintensität des Lichts der Wellenlänge 450 nm wurde mit dem Infinite® 200 PRO Microplate Reader und der i-control™ Software, Version 1.7.1.12, gemessen. Die Ergebnisse der Messung wurden mit Microsoft Excel (MS Office 2016) weiterverarbeitet. Dafür wurde zunächst eine Kalibrierungskurve unter Verwendung der Konzentrationen (0 pg/ml bis 2 000 pg/ml) und entsprechenden Extinktionen der Standardverdünnungsreihe berechnet, und in Anlehnung daran, der IGF-1 Gehalt einer jeden zu untersuchenden Probe ermittelt.

LCN2-ELISA

Die Durchführung des LCN2-ELISA erfolgte mit dem *Rat Lipocalin-2 SimpleStep ELISA Kit* (ab239422) nach Herstellervorgaben. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Hierfür wurde der *LCN2 Stock Standard* mit *Sample Diluent NS* vermischt und in mehreren Schritten weiter verdünnt, bis eine Serie mit insgesamt 8 Konzentrationen zwischen 0 pg/ml und 500 pg/ml entstand. In jede Vertiefung wurden nun 50 µl der entsprechenden Konzentration der Verdünnungsreihe oder 50 µl des zu untersuchenden Überstandes in Dubletten pipettiert. Dazu wurden je Vertiefung 50 µl des *Antibody Cocktail* pipettiert. Es folgte ein Inkubationsschritt für 1 h bei RT auf dem Tischschüttler bei 400 UpM. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Platte mit 350 µl *1X Wash Buffer PT* je Vertiefung dreimalig gewaschen. Im Anschluss wurden 100 µl *TMB Development Solution* in jede Vertiefung pipettiert und die Platte lichtgeschützt für 10 min auf dem Tischschüttler bei 400 UpM inkubiert. Der nun sichtbare Farbumschlag ins Blaue wurde daraufhin durch die Zugabe von 100 µl *Stop Solution* je Vertiefung beendet und die in den Vertiefungen befindliche Flüssigkeit für 1 min auf dem Tischschüttler vermischt. Die abgegebene Signalintensität des Lichts der Wellenlänge 450 nm wurde mit dem Infinite® 200 PRO Microplate Reader und der i-control™ Software, Version 1.7.1.12, gemessen. Die Ergebnisse der Messung wurden mit Microsoft Excel (MS Office 2016) weiterverarbeitet. Dafür wurde zunächst eine Kalibrierungskurve unter Verwendung der Konzentrationen (0 pg/ml bis 500 pg/ml) und entsprechenden Extinktionen der Standardverdünnungsreihe berechnet und in Anlehnung daran der LCN2-Gehalt einer jeden zu untersuchenden Probe ermittelt.

2.2.7 Statistik

Die gezeigten Daten werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM). Die Testung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test. Die statistischen Berechnungen für Experimente mit zwei Stichproben erfolgten mittels eines Zweistichproben t-Test für unabhängige und normalverteilte Stichproben. Für Experimente mit drei oder mehr Stichproben erfolgte die statistische Berechnung mittels einfacher oder zweifacher Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Test nach Tukey. Als Signifikanzniveaus wurden die p-Werte 5 % (*p < 0,05), 1 % (**p < 0,01) und 0,1 % (**p < 0,001) festgelegt. Die Abkürzung n steht für die Anzahl der durchgeführten unabhängigen Experimente. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Graphpad prism in der Version 8.0.2.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheit der Zellkulturen

Um die Reinheit der Mikrogliazellkultur nachzuweisen, erfolgte eine immunzytochemische Färbung unstimulierter Mikrogliazellen gegen den mikroglialen Marker Iba-1 sowie gegen DAPI nach 1 d (Abb. 8 A). Iba-1 erlaubt die Identifikation der Zellen als Mikrogliazellen oder Makrophagen, da es sich dabei um ein Calcium-bindendes EF-Hand Protein handelt, welches von diesen Zellarten exprimiert wird (Ohsawa et al., 2004). Die Quantitative Analyse zeigte einen Anteil Iba-1-positiver Mikrogliazellen an der Gesamtzellzahl von 99,35 % (Daten nicht gezeigt). Saures Gliafaserprotein (GFAP) ist als Intermediärfilament Bestandteil des Zytoskeletts von Astrozyten und gilt als Marker, der für die Identifikation von Astrozyten genutzt werden kann (Raff et al., 1979). Um die Reinheit der Astrozytenzellkultur nachzuweisen, erfolgte eine immunzytochemische Färbung einer unstimulierten Astrozytenzellkultur gegen GFAP sowie DAPI nach 1 d (Abb. 8 B). Mittels GFAP konnten die Zellen als Astrozyten identifiziert werden und nachfolgend in der Zellkultur mit einem Anteil von 99,01 % nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

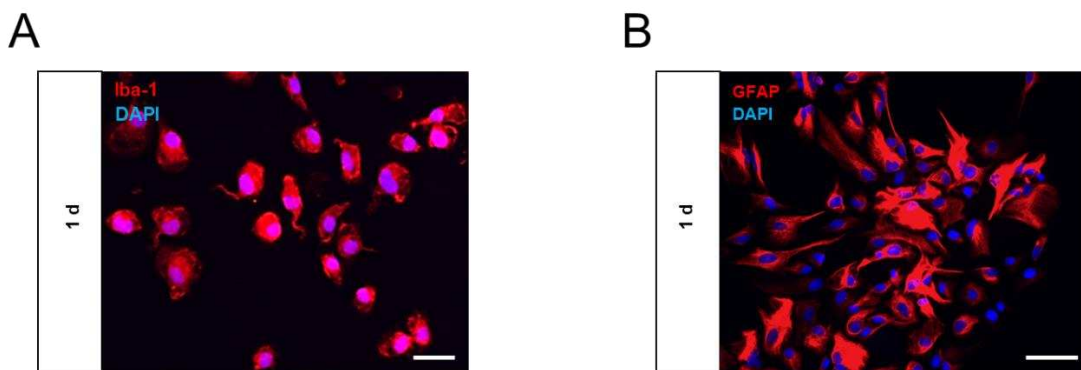


Abb. 8: Immunzytochemische Färbung einer unstimulierten Mikrogliazellkultur gegen Iba-1 sowie einer unstimulierten Astrozytenzellkultur gegen GFAP zum Nachweis der Reinheit der verwendeten Zellkulturen.

(A) Repräsentatives Bild immunzytochemischer Färbungen unstimulierter Iba-1 (rot) positiver Mikrogliazellen sowie DAPI (blau) positiver Zellkerne zum Zeitpunkt 1 d; (B) Repräsentative, visuelle Darstellung der immunzytochemischen Färbung der unstimulierten Astrozytenzellkultur gegen DAPI (blau) und GFAP (rot) nach 1 d; Die gezeigten Daten entstammen aus (A) $n = 3$ und (B) $n = 1$ Experimenten. (A) 40-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 50 μM , (B) 20-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μM .

3.2 Mikrogliazellen

3.2.1 Cladribin reduziert zeit- und konzentrationsabhängig die mikrogliale Zellzahl

Eine vorherige Studie konnten zeigen, dass Cladribin sowohl über antiproliferative Effekte in einer Konzentration von 0,1 μM , 1 μM und 10 μM , als auch über die Induktion von Apoptose in einer Konzentration von 10 μM die mikrogliale Zellzahl reduziert (Singh et al., 2012). In einem ersten Schritt dieses Dissertationsprojektes war es daher von Interesse, diese beschriebenen Effekte für das bereitgestellte Cladribin zu bestätigen und zudem eine ideale, für Mikrogliazellen nicht-toxische Dosis zu ermitteln, um damit geeignete Voraussetzungen zu schaffen, mögliche immunmodulierende Eigenschaften von Cladribin auf Mikrogliazellen untersuchen zu können. Hierfür erfolgten immunzytochemische Analysen der mit Cladribin in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM sowie 10 μM und der entsprechenden Kontrollsubstanz DMSO exponierten Mikrogliazellkultur nach 1 d, 3 d und 5 d. Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme der Zellzahl, ermittelt durch die Anzahl DAPI-positiver, nicht fragmentierter Zellkerne mit steigender Expositionsdauer gegenüber Cladribin (Abb. 9 A-D) sowie steigender Stimulationsdosis (Abb. 9 E). Die größte Reduktion der Zellzahl wurde nach einer mikroglialen Exposition mit Cladribin in der Konzentration 10 μM nach einer Expositionsdauer von 5 d beobachtet (Abb. 9 D). Zum Zeitpunkt 5 d zeigte sich, außer für die Konzentration von 0,1 μM , in allen weiteren, höher gewählten Konzentrationen eine Abnahme der mikroglialen Zellzahl. Diese war für die Konzentration 10 μM am höchsten (Abb. 9 E). Eine Abnahme der mikroglialen Zellzahl war unter Exposition mit Cladribin in der Konzentration 0,1 μM zu keinem untersuchten Zeitpunkt statistisch signifikant (Abb. 9 A). Basierend hierauf wurde eine Exposition der Mikrogliazellen mit einer Konzentration von 0,1 μM Cladribin als geeignet befunden, die eingangs gestellte Fragestellung hinsichtlich möglicher immunmodulierender Effekte von Cladribin auf Mikrogliazellen unter Ausschluss des bekannten zytotoxischen Effekts untersuchen zu können.

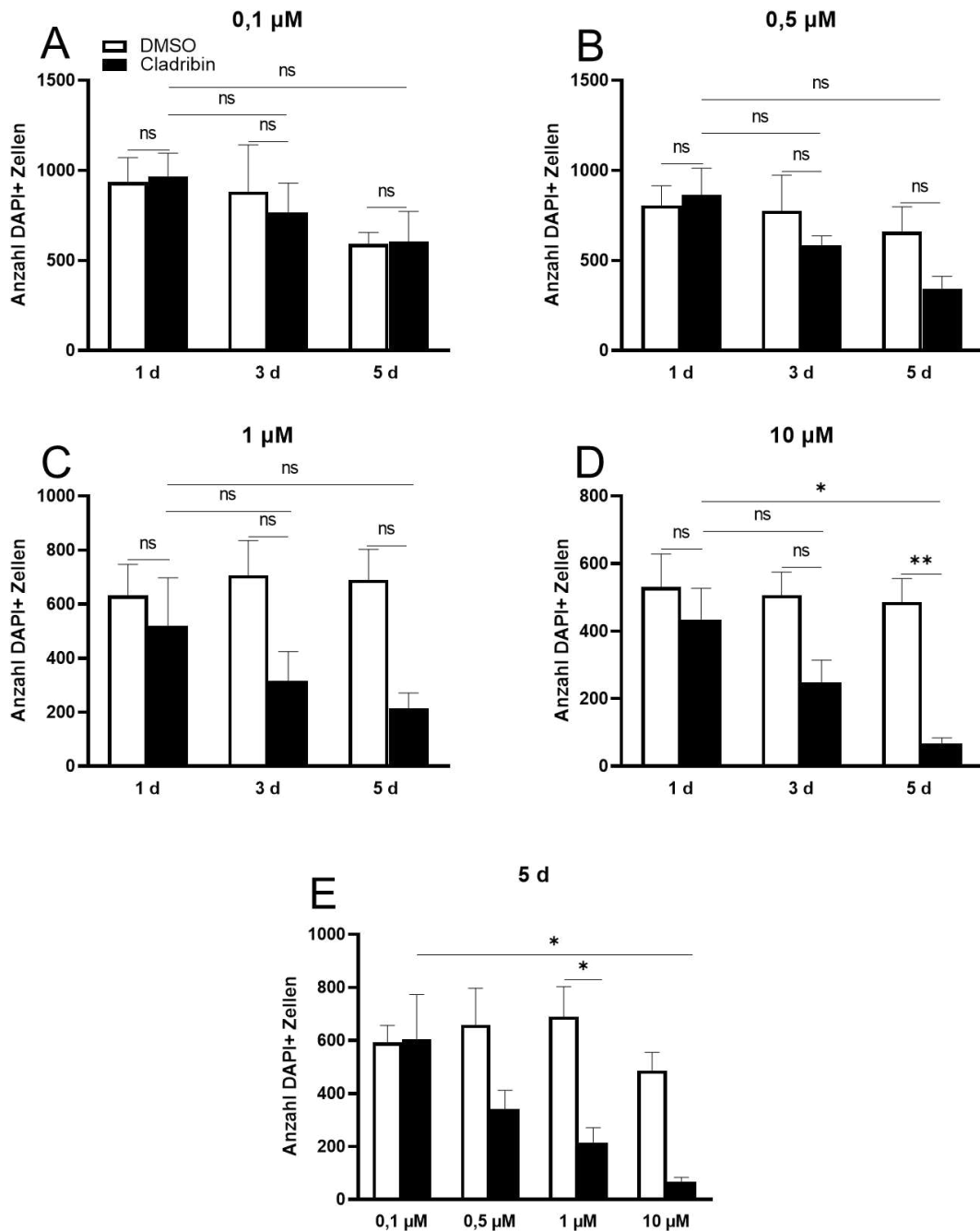


Abb. 9: Zellzahlanalysen einer in unterschiedlichen Konzentrationen zu Cladribin exponierten Mikrogliazellkultur.

(A-E) Quantitative Analysen immunzytochemischer Färbungen DAPI-positiver Mikrogliazellen nach Stimulation mit Cladribin oder der Kontrollsubstanz DMSO in den Konzentration (A) 0,1 µM, (B) 0,5 µM, (C) 1 µM, (D) 10 µM nach 1 d, 3 d und 5 d sowie (E) erneute Darstellung aller gewählten Konzentrationen zum Zeitpunkt 5 d. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der mikroglialen Zellzahl unter Cladribinexposition sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist, mit der stärksten zytoreduktiven Wirkung für die Konzentration von 10 µM (D, E) und der geringsten zytoreduktiven Wirkung für die Konzentration von 0,1 µM (A, E). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM und entstammen $n = 4$ unabhängigen Experimenten. (A-E) Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s. nicht signifikant.

3.2.2 Cladribin moduliert die Genexpression von Mikrogliazellen: Regeneration, Phagozytose und Proinflammation

Obwohl eine strikte Einteilung der mikroglialen Phänotypen in M1 (proinflammatorisch) und M2 (antiinflammatorisch) mittlerweile als überholt angesehen wird (Yong, 2022), gibt es Gene, die im Rahmen der Rolle von Mikrogliazellen in MS als protektiv und damit regenerativ oder als zum Entzündungsgeschehen beitragend angesehen werden (Orihuela et al., 2016). Daher waren Expressionsanalysen von verschiedenen mikroglialen Genen aus diesen Kategorien unter Exposition der Mikrogliazellen mit Cladribin in einer nicht-zytotoxischen Dosis von weiterem Interesse. Da Mikrogliazellen im Rahmen der MS über die Phagozytose von insbesondere Myelindebris einen entscheidenden Beitrag zur Remyelinisierung leisten können (Lampron et al., 2015), war es von Interesse zu untersuchen, ob Cladribin einen Einfluss auf die Genexpression der mit der Myelinphagozytose assoziierten Transmembranproteine TREM2 und MERTK hat. Das Peptidhormon IGF-1 wird von Mikrogliazellen vor allem in einer neurosupportiven Umgebung sekretiert und vermittelt regenerative Effekte, beispielsweise durch die Unterstützung der Reifung oligodendroglialer Vorläuferzellen (Miron et al., 2013). Neben IGF-1 gilt ARG1 als wichtiger Marker für die antiinflammatorische Polarisierung der Mikrogliazellen (Cherry et al., 2014). Über eine vermehrte Sekretion von TNF- α und NO können proinflammatorische Mikrogliazellen im Kontext der MS einen schädigenden Einfluss auf Oligodendrozyten sowie axonale Strukturen nehmen (Smith & Lassmann, 2002; Rauf et al., 2022). Daher war die Analyse eines möglichen Einflusses von Cladribin auf die Expression dieser Gene sowie des ebenfalls mit Proinflammation assoziierten Zytokins IL-6 im Rahmen dieses Dissertationsprojektes von zusätzlichem Interesse.

Hierzu erfolgten Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR von einer mit Cladribin (0,1 μ M) oder DMSO stimulierten Mikrogliazellkultur nach 1 d und 3 d. Es wurde die relative Genexpression von verschiedenen, mit Regeneration (Abb. 10 A-B; grün), Phagozytose (Abb. 10 C-D; blau) oder Proinflammation (Abb. 10 E-G; rot), assoziierten Genen gemessen. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg in der relativen Expression des antiinflammatorischen Gens IGF-1 nach Stimulation mit Cladribin (0,1 μ M) zum Zeitpunkt 3 d im Vergleich zu den kontrollstimulierten Mikrogliazellen (Abb. 10 A). Zum Zeitpunkt 1 d konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der relativen mikroglialen IGF-1-Genexpression unter Exposition mit Cladribin gegenüber DMSO exponierter Mikrogliazellen detektiert werden (Abb. 10 A). ELISA-basierte Analysen anhand des Zellkulturüberstands von mit Cladribin (0,1 μ M) oder mit DMSO stimulierten Mikrogliazellen zum Zeitpunkt 3 d zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied in

der mikrogliären IGF-1-Sekretion unter Exposition mit Cladribin im Vergleich zu DMSO (Abb. 11). Zudem konnte gezeigt werden, dass Cladribin keinen Einfluss auf die Genexpression des antiinflammatorischen ARG1 hat (Abb. 10 B). Hinsichtlich der mit Phagozytose assoziierten Gene TREM2 und MERTK zeigte sich zum Zeitpunkt 3 d nach Exposition mit Cladribin (0,1 μ M) ein signifikanter Anstieg der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (Abb. 10 C-D). Dieser Effekt war für MERTK stärker ausgeprägt (Abb. 10 C). Für die mit Proinflammation assoziierten Gene IL-6, iNOS und TNF- α konnte zwar ein Anstieg der relativen Genexpression unter Cladribinexposition (0,1 μ M), sowohl zum Zeitpunkt 1 d als auch zum Zeitpunkt 3 d detektiert werden (Abb. 10 E-G), jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. Hierbei war die Zunahme der relativen mikrogliären Genexpression für IL-6 und iNOS zum Zeitpunkt 1 d, obwohl statistisch nicht signifikant, am stärksten ausgeprägt (Abb. 10 E-F).

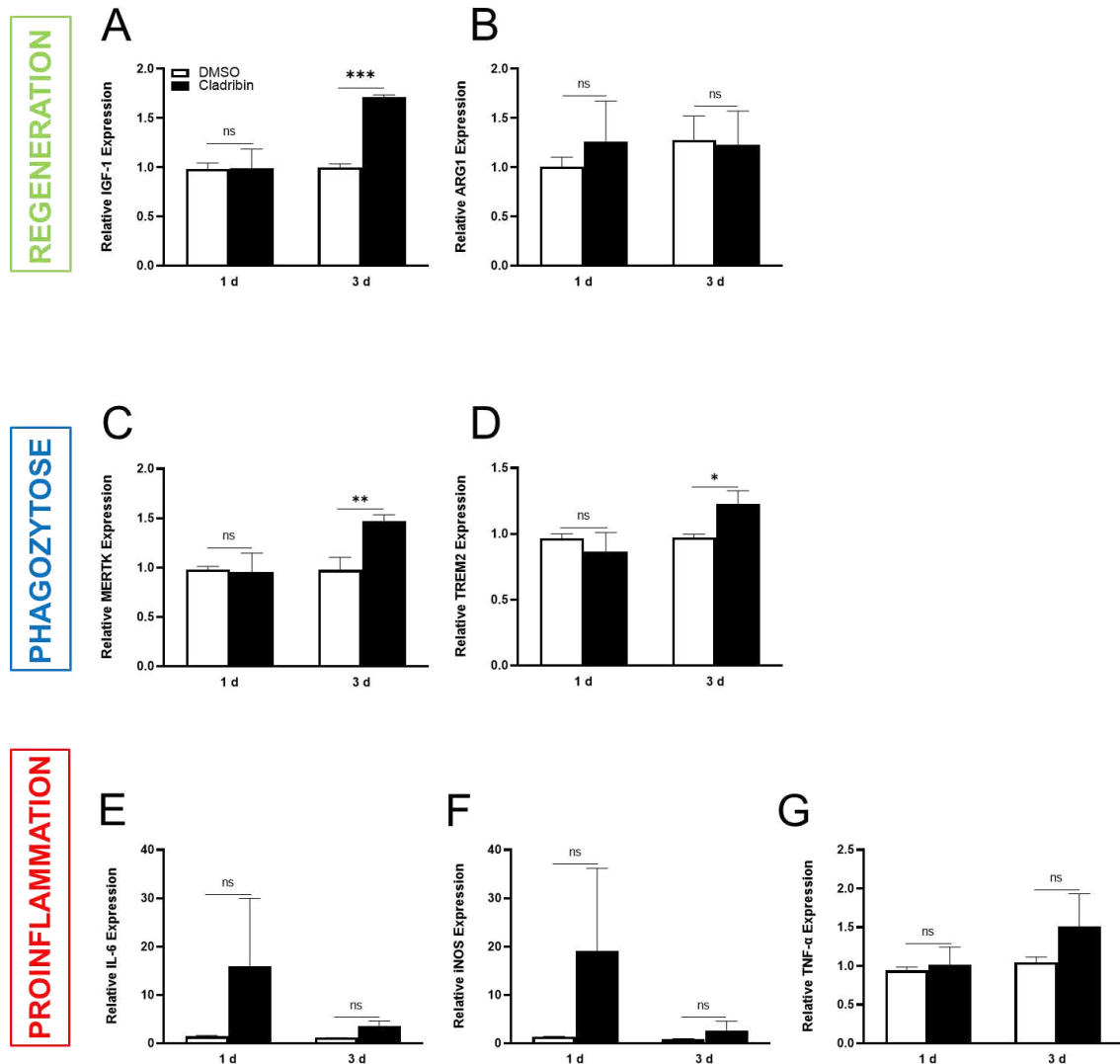


Abb. 10: Genexpressionsprofile von mit Regeneration, Phagozytose oder Proinflammation assoziierten Genen nach Exposition der Mikrogliazellen mit Cladribin.

(A-G) qRT-PCR Analysen der relativen (A) IGF-1, (B) ARG1, (C) MERTK, (D) TREM2, (E) IL-6, (F) iNOS, (G) TNF-α Genexpression nach Stimulation mit Cladribin (0,1 μM) und der Kontrollsubstanz DMSO nach 1 d und 3 d zeigten eine signifikante Zunahme der relativen Genexpression des antiinflammatorischen Markers IGF-1 zum Zeitpunkt 3 d (A). Hinsichtlich des antiinflammatorischen Markers ARG1 zeigte sich keine Änderung der Genexpression unter Exposition mit Cladribin (B). Für die mit Phagozytose assoziierten Gene MERTK und TREM2 zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der relativen Genexpression zum Zeitpunkt 3 d unter Exposition mit Cladribin im Vergleich zur Kontrollsubstanz (C und D). Ein nicht-signifikanter Anstieg der relativen Genexpression konnte für die proinflammatorischen Marker IL-6, iNOS und TNF-α zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d unter Cladribinexposition gemessen werden (E-G), wobei dieser Effekt für IL-6 und iNOS zum Zeitpunkt 1 d am stärksten war. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten. (A-G) Standard t-Test: * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001, n.s. nicht signifikant.

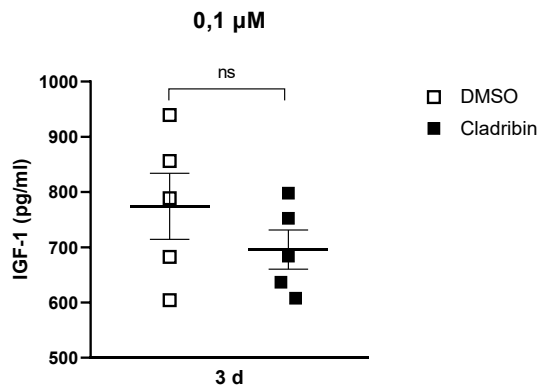


Abb. 11: ELISA-basierte Analysen der mikroglialen IGF-1-Sekretion nach Cladribinexposition.

ELISA-basierte Analysen der IGF-1-Sekretion von mit DMSO oder Cladribin (0,1 µM) stimulierten Mikrogliazellen nach 3 d zeigten keinen Unterschied in der mikroglialen IGF-1-Sekretion. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten. Standard t-Test: n.s. nicht signifikant.

3.2.3 Cladribin verändert nicht die Genexpression von mikroglialen Purin- und Adenosinrezeptoren mit Ausnahme für P2Y6

Über die Aktivierung des Adenosinrezeptors ADORA3 wird in Mikrogliazellen die Sekretion proinflammatorischer Zytokine verringert (Xu et al., 2024). Purinrezeptoren, die an der Zelloberfläche von Mikrogliazellen lokalisiert sind, wie P2Y12, P2Y6 und P2X7, sind u.a. an Chemotaxis und Phagozytose beteiligt (Gómez Morillas et al., 2021). Es war daher von weiterem Interesse zu untersuchen, ob Cladribin in nicht-toxischer Dosis in der Lage ist, die Expression dieser Rezeptoren zu modulieren.

Hierfür erfolgten Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR von der mit Cladribin (0,1 µM) oder DMSO stimulierten Mikrogliazellkultur nach 1 d und 3 d. Es wurde die relative Genexpression von für Purinrezeptoren (Abb. 12 A-C) oder den Adenosinrezeptor ADORA3A (Abb. 12 D) codierenden Genen gemessen. Es zeigte sich eine geringe Zunahme der relativen Genexpression für die Purinrezeptoren P2Y6 (Abb. 12 A), und P2Y12 (Abb. 12 B) sowie für den Adenosinrezeptor ADORA3A (Abb. 12 D) nach Exposition mit Cladribin im Vergleich zu DMSO zum Zeitpunkt 3 d, mit Nachweis einer statistischen Signifikanz lediglich für das Genexpressionsniveau von P2Y6 nach einer Exposition mit Cladribin zum Zeitpunkt 3 d (Abb. 12 A). Die Regulation der relativen Genexpression von P2X7 blieb unter Exposition der Mikrogliazellen zu Cladribin unbeeinflusst (Abb. 12 C)

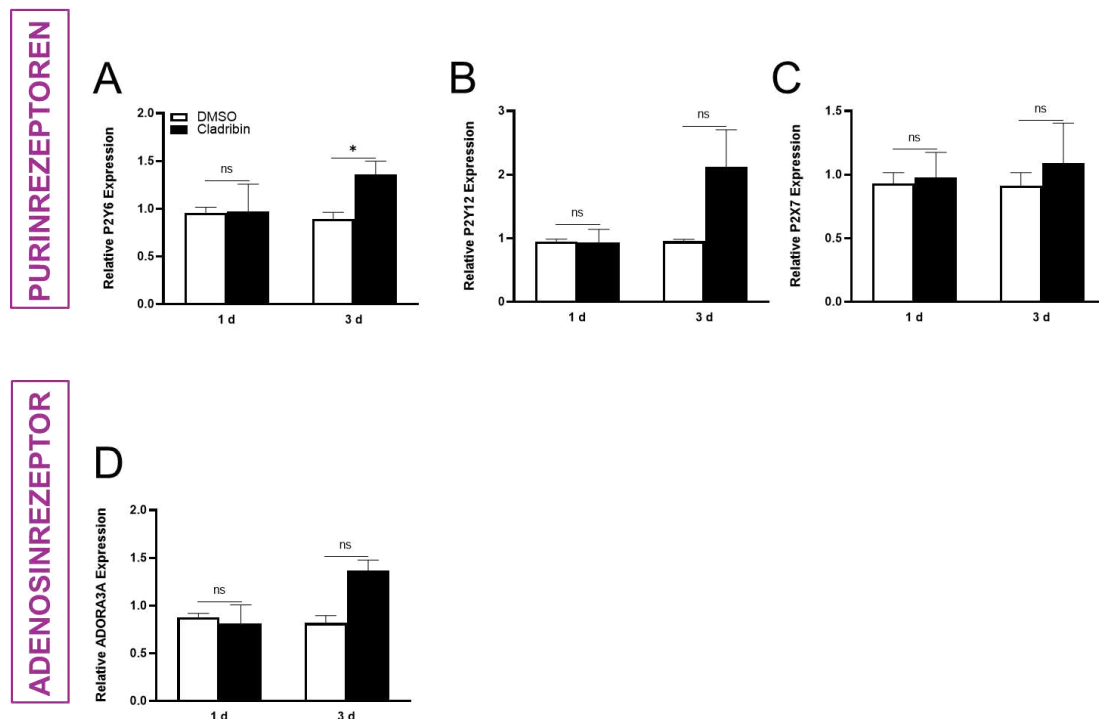


Abb. 12: Genexpressionsprofile von für Purinrezeptoren oder den Adenosinrezeptor ADORA3A codierenden Genen nach Exposition von Mikrogliazellen mit Cladribin.

(A-E) qRT-PCR Analysen der relativen (A) P2Y6, (B) P2Y12, (C) P2X7, (D) ADORA3A Genexpression nach mikroglialer Exposition mit Cladribin (0,1 µM) oder der Kontrollsubstanz DMSO nach 1 d und 3 d. Es zeigte sich ein geringer Anstieg in der relativen Genexpression von P2Y6, P2Y12 sowie ADORA3A nach Stimulation mit Cladribin zum Zeitpunkt 3 d (A, B, D), mit Nachweis einer statistischen Signifikanz ausschließlich für P2Y6 zum Zeitpunkt 3 d (A). Die Genexpression von P2X7 (C) blieb unter Cladribinexposition unbeeinflusst. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. (A-E) Standard t-Test: * $p \leq 0,05$, n.s. nicht signifikant.

3.2.4 Cladribin führt in mit LPS vorstimulierten Mikrogliazellen nicht zu einer Verringerung der iNOS-Expression

Vorherige Studien haben gezeigt, dass LPS in primären Mikrogliazellen aus der Ratte *in vitro* über den TLR4 Rezeptorsignalweg einen proinflammatorischen Phänotyp induzieren kann (Lively & Schlichter, 2018). Nachfolgend kommt es über diesen Signalweg unter anderem zu einer erhöhten Genexpression von iNOS und darüber zu einer vermehrten mikroglialen Sekretion von NO (Smith & Lassmann, 2002).

Im Hinblick auf den Krankheitsverlauf der MS spielen inflammatorische Prozesse im ZNS eine bedeutende Rolle. Um diesen Aspekt *in vitro* abbilden zu können, erfolgte in einem nächsten Schritt dieses Dissertationsprojektes die Prästimulation der isolierten Mikrogliazellkultur mit LPS (100 ng/ml) oder der Kontrollsubstanz steriles Wasser (bLPS) für 24 h.

Mittels immunzytochemischer Co-Färbungen der Zellkulturen gegen DAPI und Iba-1 konnte zunächst gezeigt werden, dass es unter Exposition zu der Kombination aus LPS und DMSO zu keiner Änderung der Zellzahl der Mikrogliazellen kam, im Vergleich zur Kontrollbedingung zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d (Abb. 13 A-A').

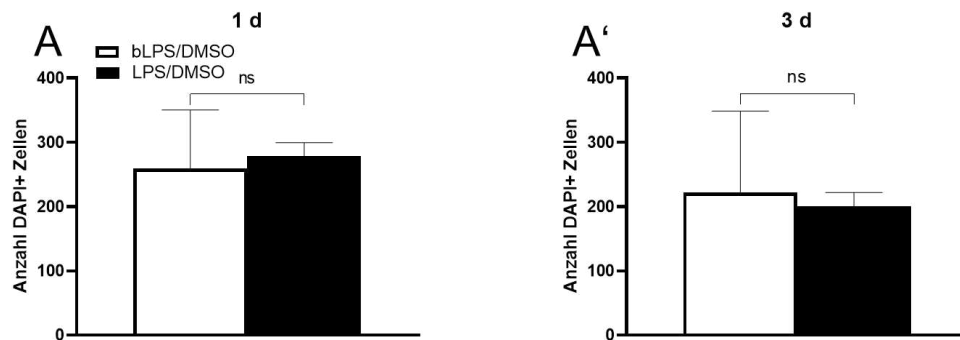


Abb. 13: Quantitative Analysen immunzytochemischer Färbungen einer simultan mit LPS und DMSO stimulierten Mikrogliazellkultur.

(A-A'): Quantitative Analysen der DAPI-positiven Mikrogliazellen nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) oder der Kontrollsubstanz steriles Wasser (bLPS) sowie mit jeweils DMSO (0,1 μ M) nach (A) 1 d und (B) 3 d. Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied in der Anzahl DAPI-positiver Mikrogliazellen nach Exposition mit LPS. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Standard t-Test: n.s. nicht signifikant.

In immunzytochemischen Co-Färbungen gegen DAPI, Iba-1 und iNOS zeigte sich unter der Exposition mit LPS und der Kontrollsubstanz für Cladribin (DMSO) ein Anstieg der iNOS-positiven Mikrogliazellen um 5,91 % zum Zeitpunkt 1 d (Abb. 14 A). Die unter LPS-Konditionen proinflammatorisch aktivierten Mikrogliazellen wurden für einen Zeitraum von 1 d oder 3 d mit Cladribin (0,1 μ M) oder seiner Kontrollsubstanz DMSO exponiert. Es wurde der Anteil iNOS-positiver Mikrogliazellen in Bezug auf die Gesamtheit der Mikrogliazellen (Iba-1) ermittelt. Unter den mit LPS vorstimulierten Mikrogliazellen zeigte sich keine signifikante Reduktion der iNOS-Expression unter nachfolgender Stimulation mit Cladribin (0,1 μ M) nach 1 d und 3 d (Abb. 14 A-A'). Hier konnte für den Zeitpunkt 1 d sogar eine geringe, nicht-signifikante Zunahme iNOS-positiver Mikrogliazellen unter Exposition mit LPS und Cladribin detektiert werden (Abb. 14 A; schwarzer Balken). Zum Zeitpunkt 3 d fiel die mikrogliale iNOS-Expression, sowohl unter Exposition mit LPS und der Kontrollsubstanz (Abb. 14 A'; dunkelgrauer Balken) als auch unter Exposition mit LPS und Cladribin (Abb. 14 A'; schwarzer Balken) gleichermaßen, statistisch nicht-signifikant, unter die iNOS-Expression der Kontrollbedingungen (Abb. 14 A'; weißer Balken).

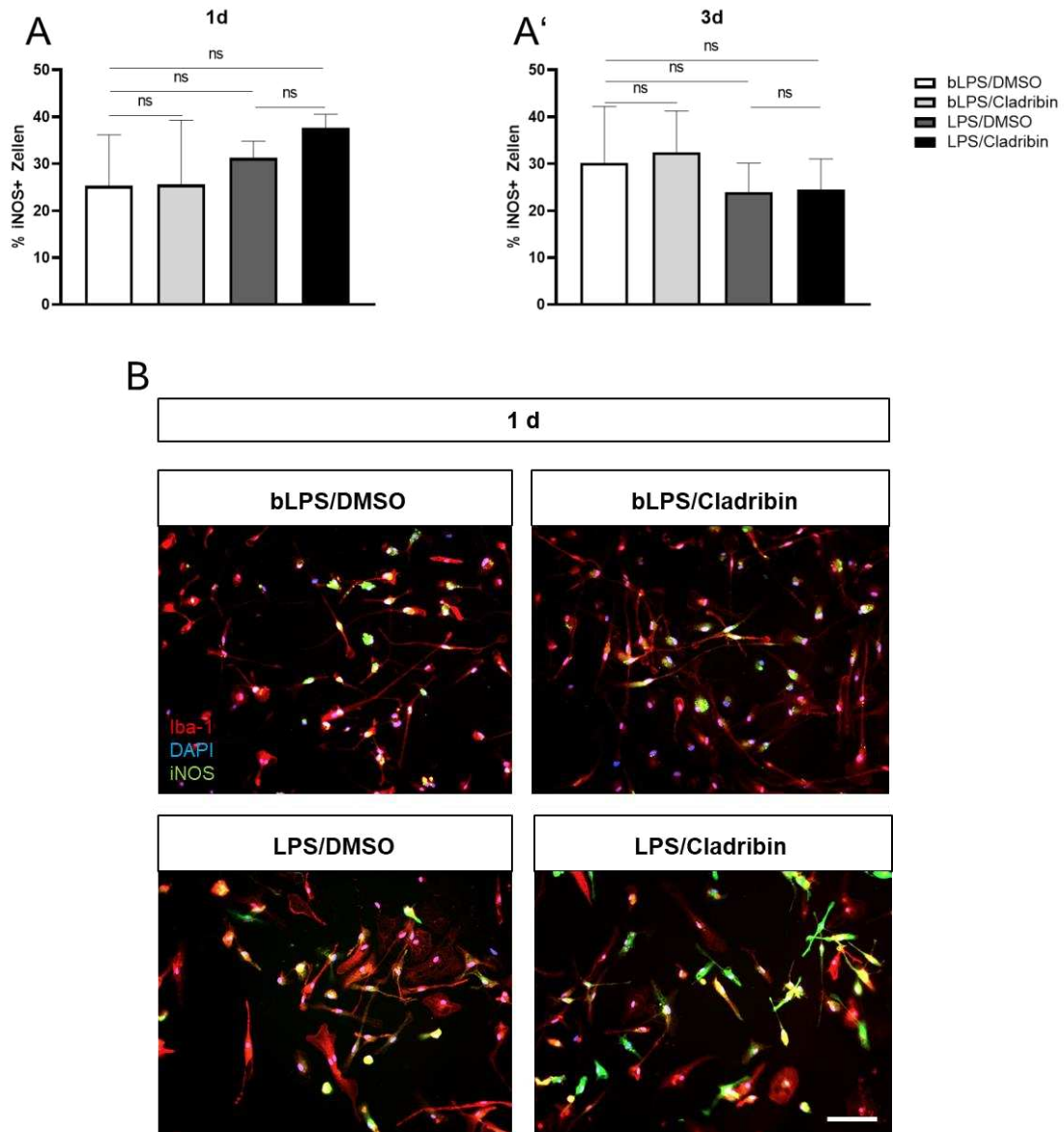


Abb. 14: Quantitative Analysen und immunzytochemische Co-Färbungen einer mit LPS für 24 h vorstimulierten und dann mit Cladribin exponierten Mikrogliazellkultur zum Zeitpunkt 1 d und 3 d.

(A-A'): Quantitative Analysen des prozentualen Anteils iNOS-positiver Mikrogliazellen an der Anzahl Iba-1-positiver Mikrogliazellen nach Vorstimulation mit LPS (100 ng/ml) oder der Kontrollsubstanz steriles Wasser (bLPS) für 24 h und anschließender Exposition mit Cladribin (0,1 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO nach (A) 1 d und (A') 3 d. (B) Repräsentative Bilder immunzytochemischer Co-Färbungen gegen Iba-1 (rot), DAPI (blau) und iNOS (grün) der mit LPS oder der Kontrolle vorstimulierten und im Anschluss mit Cladribin oder DMSO exponierten mikroglialen Zellkultur nach 1 d. Die Resultate zeigten keinen reduktiven Effekt von Cladribin auf die iNOS-Expression der Mikrogliazellen nach inflammatorischer Vorstimulation mit LPS. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. (A-A') Einfache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: n.s. nicht signifikant. 20-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100 μ M.

3.3 Astrozyten

3.3.1 Cladribin reduziert zeit- und konzentrationsabhängig die astrozytäre Zellzahl und hemmt die astrozytäre Proliferation

Da Cladribin in Mikrogliazellen konzentrationsabhängig sowohl zur Apoptose führt als auch die Proliferation hemmt (Singh et al., 2012), war es in einem nächsten Schritt dieses Dissertationsprojektes von Interesse zu überprüfen, ob Cladribin auf Astrozyten ähnliche Effekte ausübt. Analog zu den oben beschriebenen Studien zum Einfluss von Cladribin auf Mikrogliazellen, war es zunächst auch für Astrozyten notwendig eine ideale, nicht-zytotoxische Stimulationsdosis zu ermitteln, um mögliche immunmodulatorische Eigenschaften von Cladribin auf diese Zellart untersuchen zu können.

Hierzu erfolgten immunzytochemische Analysen der Zellzahl, ermittelt durch die Anzahl DAPI-positiver Zellkerne, der mit Cladribin in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM oder 10 μM oder der Kontrollsubstanz DMSO stimulierten Astrozytenzellkultur nach 1 d und 3 d (Abb. 15 A-A'). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der Anzahl DAPI-positiver Zellen lediglich nach Exposition mit Cladribin in der Konzentration 10 μM zum Zeitpunkt 3 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz (Abb. 15 A'). Zum Zeitpunkt 1 d zeigte sich ein marginaler, nicht-signifikanter reduktiver Trend der Zellzahl nach Exposition mit Cladribin in den Konzentrationen 1 μM sowie 10 μM (Abb. 15 A).

Um den Einfluss von Cladribin auf die Proliferationsrate von Astrozyten zu untersuchen, erfolgten parallel zu den Dosistitratversuchen immunzytochemische Analysen von Ki-67-positiven Astrozyten unter Exposition mit Cladribin (0,1 μM , 1 μM oder 10 μM) oder der Kontrollsubstanz DMSO nach 1 d und 3 d (Abb. 15 B-B'). Ergebnisse zeigten, dass es konzentrationsabhängig nach Stimulation mit Cladribin (10 μM) nach 1 d zu einer signifikanten Abnahme des prozentualen Anteils Ki-67-positiver Astrozyten an der Gesamtzahl GFAP-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle sowie im Vergleich zur Exposition mit Cladribin in einer geringeren Konzentration (0,1 μM) kam (Abb. 15 B). Zudem zeigte sich ein signifikanter Rückgang des Anteils Ki-67-positiver Astrozyten an der Gesamtzahl GFAP-positiver Zellen nach Stimulation mit Cladribin (1 μM) im Vergleich zur Stimulation mit Cladribin in einer geringeren Konzentration (0,1 μM) nach 1 d (Abb. 15 B). Nach 3 d lässt sich ein Rückgang des prozentualen Anteils Ki-67-positiver Zellen lediglich für eine Cladribinkonzentration von 10 μM darstellen, jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 15 B'). Insgesamt fällt der Anteil Ki-67-positiver Astrozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl GFAP-positiver Zellen nach 3 d deutlich geringer aus als nach 1 d (Abb. 15 B-B').

Im Vergleich zum zytoreduktiven Effekt von Cladribin auf Mikrogliazellen (s. Kapitel 3.2.1) zeigte sich in der Astrozytenzellkultur zwar auch eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl, jedoch in geringerem Ausmaß. Da lediglich eine statistisch signifikante Abnahme der astrozytären Zellzahl nach Exposition mit Cladribin in der Konzentration 10 μ M zum Zeitpunkt 3 d gemessen werden konnte und zum Zeitpunkt 1 d für alle drei gewählten Konzentrationen keine zytoreduktiven Effekte detektiert werden konnten, wurden die nachfolgenden Studien mit allen drei gewählten Konzentrationen fortgesetzt.

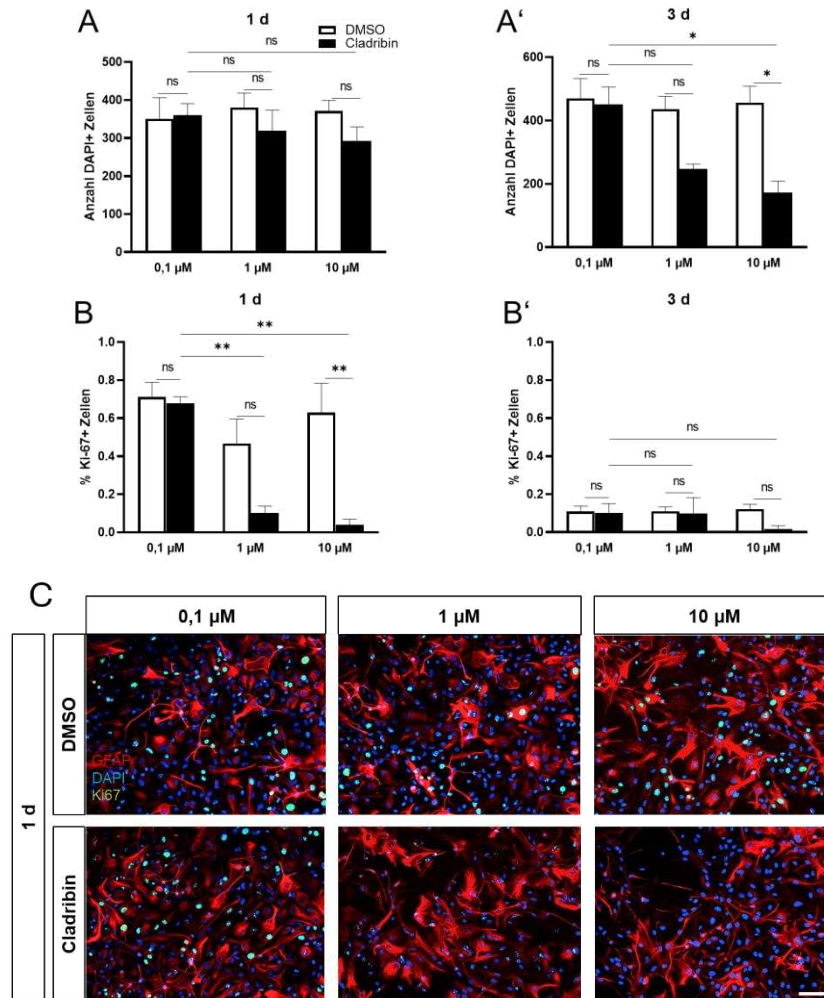


Abb. 15: Quantitative Analysen sowie visuelle Darstellung immunzytochemischer Färbungen einer in unterschiedlichen Konzentrationen mit Cladribin exponierten Astrozytenzellkultur.

(A-A') Quantitative Analysen DAPI-positiver Astrozyten nach Exposition mit Cladribin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO nach 1 d und 3 d. (B-B') Quantitative Analysen des Anteils der Ki-67-positiven Astrozyten im Vergleich zur Gesamtzahl der GFAP-positiven Astrozyten nach Exposition mit Cladribin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO nach 1 d und 3 d. (C) Repräsentative, visuelle Darstellung immunzytochemischer Färbungen gegen GFAP (rot), DAPI (blau) und Ki67 (grün) positiver Astrozyten unter Exposition mit Cladribin und DMSO in den Konzentrationen 10 μ M, 1 μ M und 0,1 μ M zum Zeitpunkt 1 d. Es zeigte sich eine Abnahme der Anzahl DAPI-positiver Astrozyten unter Exposition mit Cladribin nach 1 d und 3 d (A-A') mit Nachweis einer statistischen Signifikanz nach Exposition mit Cladribin in der Konzentration 10 μ M nach 3 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz (A'). Zudem zeigte sich ein Rückgang in der Ki-67 Expression unter Exposition mit Cladribin in einer Konzentration von 1 μ M und 10 μ M zum Zeitpunkt 1 d mit Nachweis einer statistischen Signifikanz für die Konzentration 10 μ M im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO sowie zur Exposition mit 0,1 μ M und für die Exposition mit 1 μ M Cladribin im Vergleich zur Exposition mit 0,1 μ M Cladribin (B). Zum Zeitpunkt 3 d zeigte sich ein statistisch nicht-signifikanter Rückgang der Ki-67-positiven Astrozyten lediglich für die Cladribinkonzentration 10 μ M im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (B'). Generell fiel der Anteil Ki-67-positiver Zellen nach 3 d deutlich geringer aus als zum Zeitpunkt 1 d (B-B'). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s. nicht signifikant. 20-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken 100 μ M.

3.3.2 Cladribin moduliert die Genexpression in naiven Astrozyten: Regeneration und Proinflammation

Astrozyten vermitteln u.a. immunmodulatorische Effekte im ZNS und können im Kontext der MS sowohl zur Proinflammation beitragen als auch neuroregenerative Effekte beeinflussen (Liddel et al., 2017; Neal et al., 2018). Über IGF-1 sind Astrozyten fähig, auf Mikrogliazellen antiinflammatorisch Einfluss zu nehmen sowie Neuronen vor oxidativem Stress zu schützen (Genis et al., 2014; Labandeira-Garcia et al., 2017). Ein weiterer, mit Neuroprotektion assoziierter Marker ist TGF- β . TGF- β hemmt im Rahmen der MS die Proliferation von B-Zellen sowie die Antikörperproduktion und hat zudem positive Effekte auf Migration und Differenzierung von Oligodendrozyten (Kerkering et al., 2023). IL-6 ist ein Zytokin mit zahlreichen Funktionen, und kann sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Prozesse modulieren, indem es in Makrophagen zur Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine beiträgt (Janssens et al., 2015) jedoch auch zur Aktivierung antigenpräsentierender Zellen führt (Ireland et al., 2015). TNF- α wird zudem durch proinflammatorisch polarisierte Astrozyten sekretiert (Correale & Farez, 2015) und trägt im Kontext der MS über die Schädigung von Oligodendrozyten zur Demyelinisierung bei (Probert et al., 2000).

Es erfolgten relative Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR von einer mit Cladribin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO stimulierten Astrozytenzellkultur nach 1 d und 3 d. Es wurde die relative Genexpression von verschiedenen, mit Regeneration (Abb. 16 A-B'') oder Proinflammation (Abb. 17 A-A'') assoziierten astrozytären Genen sowie des in Astrozyten pleiotropen IL-6 (Abb. 17 B-B'') gemessen. Ergebnisse zeigten einen signifikanten Abfall der relativen Genexpression des antiinflammatorischen IGF-1 nach Exposition mit Cladribin in der Konzentration 10 μ M im Vergleich zur Kontrolle nach 1 d (Abb. 16 A''). Dieser Effekt ließ sich auch nach 3 d, jedoch in geringerer Ausprägung und ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz, beobachten (Abb. 16 A''). Eine ähnliche, jedoch statistisch nicht-signifikante Tendenz zeigte sich zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d nach Cladribinexposition in der Konzentration 0,1 μ M (Abb. 16 A). Hinsichtlich der relativen Genexpressionsanalysen für TGF- β ließen sich ähnliche Tendenzen beobachten. Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall der relativen Genexpression von TGF- β nach Exposition mit Cladribin in der Konzentration 0,1 μ M über die Zeit (Abb. 16 B) sowie nach Exposition mit Cladribin (10 μ M) zum Zeitpunkt 1 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (Abb. 16 B'').

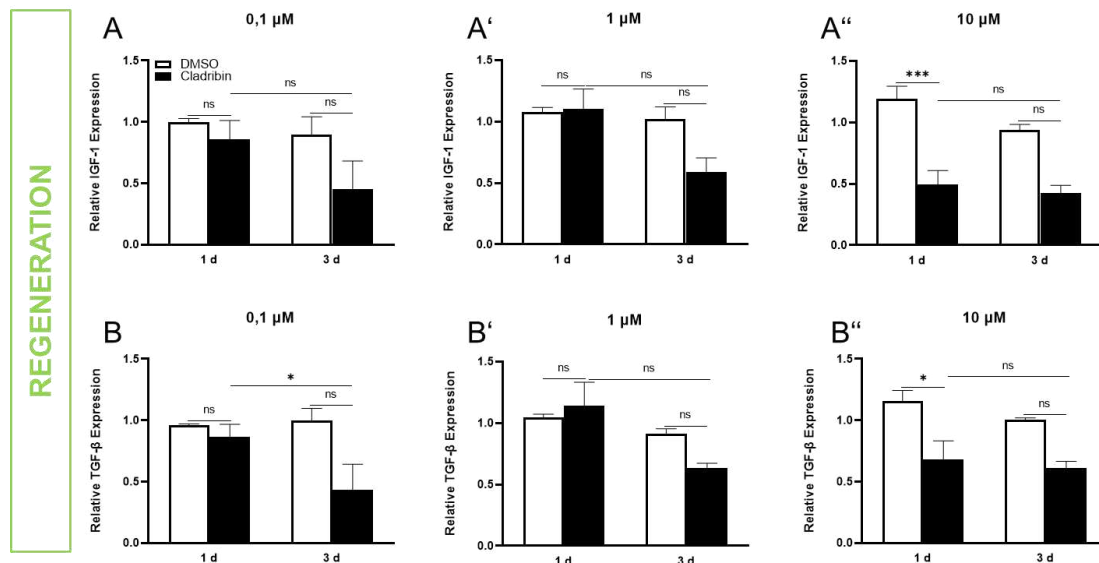


Abb. 16: Relative Genexpressionsanalysen von mit Regeneration assoziierten astrozytären Genen nach Exposition mit Cladribin.

(A-B'') qRT-PCR Analysen der relativen (A-A'') IGF-1, (B-B'') TGF- β -Genexpression nach Exposition mit Cladribin oder der Kontrollsubstanz DMSO in verschiedenen Konzentrationen (A, B) 0,1 μ M, (A', B') 1 μ M, (A'', B'') 10 μ M nach 1 d und 3 d. Die Resultate zeigten einen Rückgang der relativen IGF-1 Expression unter Exposition mit Cladribin in nahezu allen untersuchten Konzentrationen zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz (A-A''), wobei der Effekt nur für die Exposition mit 10 μ M Cladribin zum Zeitpunkt 1 d statistisch signifikant war (A''). Des Weiteren kam es zu einer Reduktion der relativen Genexpression von TGF- β unter Cladribinexposition in fast allen der drei untersuchten Konzentrationen zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d (B-B'') mit Nachweis einer statistischen Signifikanz sowohl für die Exposition mit Cladribin in der Konzentration 0,1 μ M nach 3 d (B) als auch für die Genexpression nach Exposition mit 10 μ M Cladribin zum Zeitpunkt 1 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz (B''). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 6$ (1 d) und $n = 3$ (3 d) unabhängigen Experimenten. Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, n.s. nicht signifikant.

Hinsichtlich des proinflammatorischen TNF- α zeigte sich allenfalls ein reduzierender, statistisch nicht-signifikanter Trend in der relativen Genexpression unter Cladribinexposition in allen untersuchten Konzentrationen sowohl zum Zeitpunkt 1 d als auch zum Zeitpunkt 3 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz (Abb. 17 A-A''). Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Genexpression von IL-6 nach Exposition mit Cladribin (10 μ M) nach 1 und 3 d im Vergleich zur Kontrolle sowie über die Zeit nach 3 d unter Exposition mit Cladribin (10 μ M) (Abb. 17 B''). Dieser Effekt ließ sich auch in den Astrozytenkulturen beobachten, die mit einer geringeren Konzentration von Cladribin (0,1 μ M und 1 μ M) exponiert waren, allerdings ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 17 B, B'). Interessanterweise verdoppelte sich die relative IL-6-Genexpression der cladribinexponierten Astrozytenkultur zum Zeitpunkt 3 d in Abhängigkeit der gewählten Konzentration (Abb. 17 B', B''). Nachfolgend war es hier von

Interesse zu untersuchen, ob Astrozyten unter Cladribinexposition auch vermehrt IL-6 sezernieren. ELISA-basierte Analysen anhand von Zellkulturüberständen von mit Cladribin in der Konzentration 10 μM exponierten Astrozyten nach 1 d und 3 d konnten die auf Genexpressionsebene gemessenen, statistisch signifikanten Ergebnisse jedoch nicht bestätigen (Abb. 18 A). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der astrozytären IL-6-Sekretion nach Exposition mit Cladribin im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (Abb. 18).

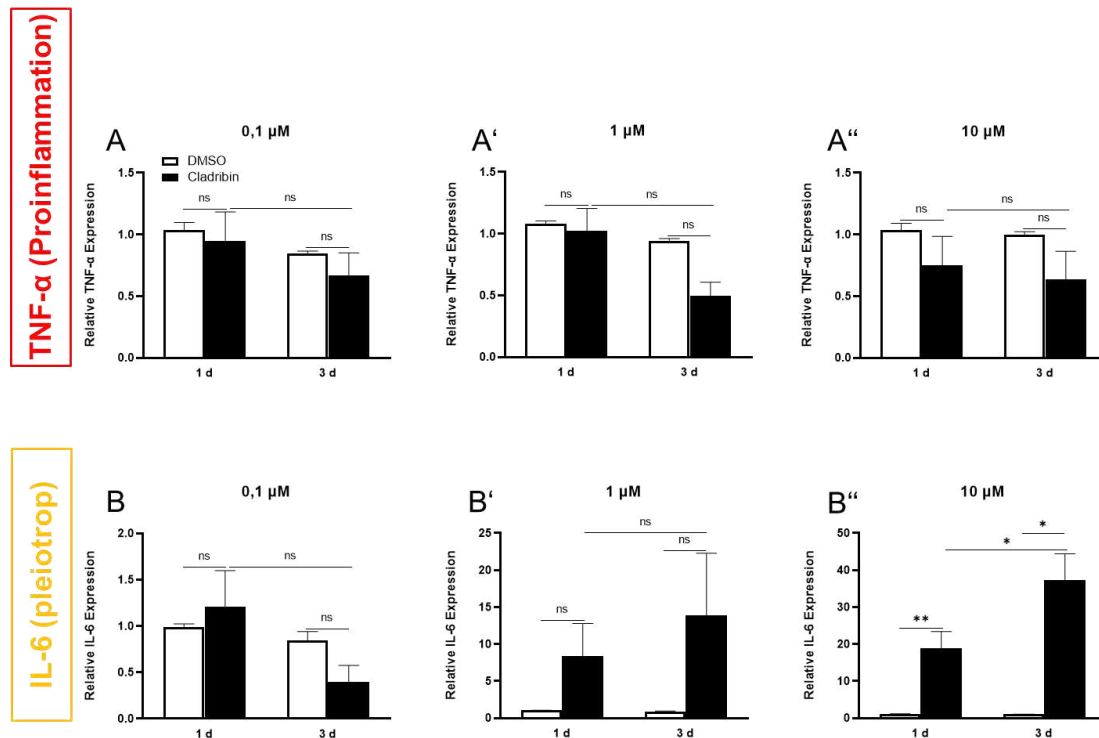


Abb. 17: Relative Genexpressionsanalysen des mit Proinflammation assoziierten astrozytären Gens TNF- α sowie des in Astrozyten pleiotropen IL-6 nach Cladribinexposition.

(A-B'') qRT-PCR Analysen der relativen, (A-A'') TNF- α sowie (B-B'') IL-6-Genexpression nach Stimulation mit Cladribin oder der Kontrollsubstanz DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen (A, B) 0,1 μM , (A', B') 1 μM , (A'', B'') 10 μM nach 1 d und 3 d. Es zeigte sich ein statistisch nicht-signifikanter, reduktiver Trend in der relativen TNF- α -Genexpression unter Exposition mit allen Konzentrationen von Cladribin zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d (A-A''). Nach Exposition mit Cladribin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM kam es zu einer Zunahme der relativen IL-6 Genexpression zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz (B'-B''), die statistisch signifikant und am größten ausgeprägt war für die Exposition mit 10 μM Cladribin (B''). Für die Exposition mit 0,1 μM Cladribin konnte lediglich ein statistisch nicht-signifikanter marginaler Trend für den Zeitpunkt 1 d beobachtet werden (B). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 6$ (1 d) und $n = 3$ (3 d) unabhängigen Experimenten. Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s. nicht signifikant.

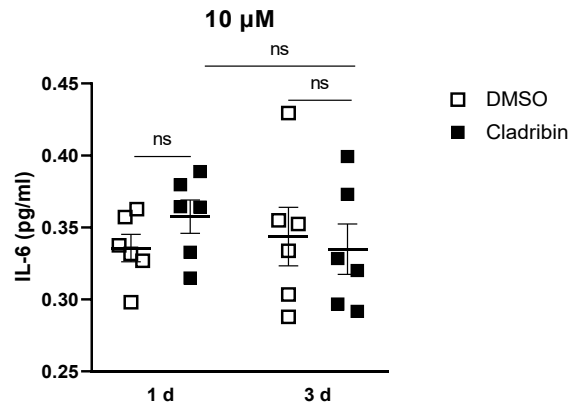


Abb. 18: Darstellung der astrozytären IL-6-Freisetzung nach Exposition mit Cladribin.

ELISA-basierte Analysen der IL-6-Sekretion von mit Cladribin (10 µM) oder der Kontrollsubstanz DMSO stimulierten Astrozyten nach 1 d und 3 d. Analysen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied in der astrozytären IL-6-Sekretion nach Exposition mit Cladribin im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO nach 1 d oder 3 d. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 6$ unabhängigen Experimenten. Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: n.s. nicht signifikant

3.3.3 Cladribin moduliert die Genexpression in naiven Astrozyten: Chemokine

Über die Ausschüttung von Chemokinen, u.a. CCL5 und CXCL10, können Astrozyten in entzündlicher Umgebung zur Rekrutierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen in das ZNS beitragen und so die Entzündung vorantreiben (Jalosinski et al., 2008; Blandford et al., 2023).

Um eine mögliche Modulation von Cladribin auf die Genexpression dieser Chemokine zu untersuchen, erfolgten relative Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR von einer mit Cladribin (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) oder der Kontrollsubstanz DMSO stimulierten Astrozytenzellkultur nach 1 d und 3 d (Abb. 19 A-B''). Bezüglich CCL5 zeigte sich ein geringer, statistisch nicht-signifikanter Anstieg der relativen Genexpression unter Exposition mit Cladribin in den Konzentration 1 µM sowie 10 µM zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d (Abb. 19 A'-A'') sowie unter Exposition mit 0,1 µM Cladribin nach 1 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (Abb. 19 A). Obwohl zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant, nahm der Effekt des Anstiegs der relativen CCL5-Genexpression unter Cladribin mit steigender Konzentration zu (Abb. 19 A-A''). Zudem zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg in der Genexpression von CXCL10 nach Exposition mit Cladribin (10 µM) nach 1 d und 3 d im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (Abb. 19 B''). Dieser Effekt ließ sich auch nach Stimulation mit Cladribin (1 µM) beobachten, allerdings in geringerer Ausprägung und ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 19 B').

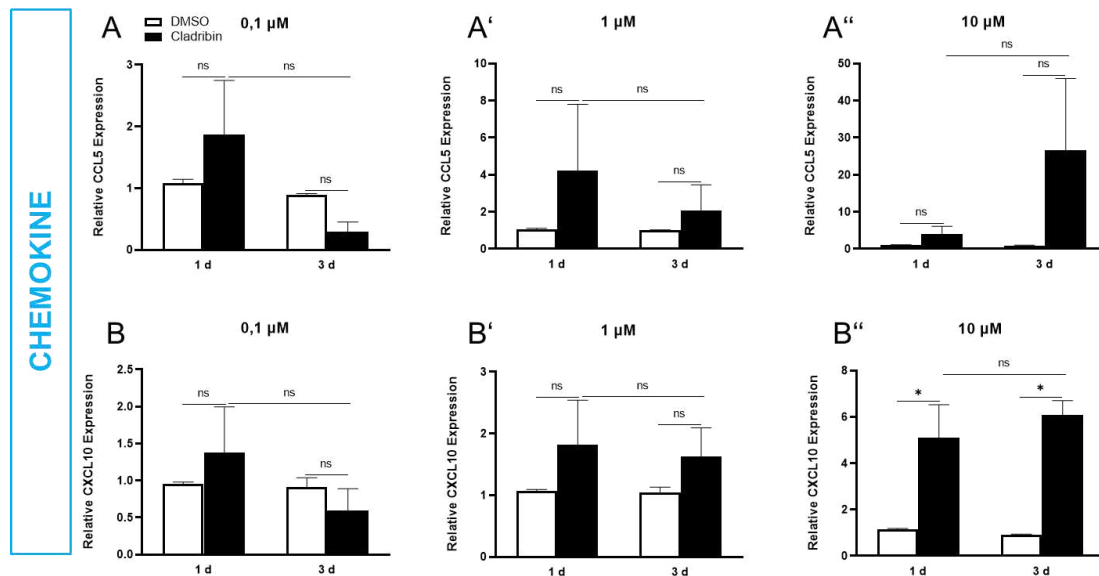


Abb. 19: Genexpressionsanalysen von Chemokine-codierenden Genen nach Exposition der Astrozyten mit Cladribin.

(A-B'') qRT-PCR Analysen der relativen (A-A'') CCL5 und (B-B'') CXCL10-Genexpression nach Exposition mit Cladribin oder der Kontrollsubstanz DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen (A, B) 0,1 μM, (A', B') 1 μM, (A'', B'') 10 μM nach 1 d und 3 d. Die Ergebnisse zeigten einen geringen, nicht-signifikanten Anstieg der relativen Genexpression von CCL5 nach Exposition mit allen untersuchten Konzentrationen von Cladribin nach 1 d (A-A'') sowie in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM auch zum Zeitpunkt 3 d (A'-A''). Dieser Trend nahm mit steigender Konzentration von Cladribin zu (A', A''). Zudem zeigte sich ein nicht-signifikanter Anstieg der relativen CXCL10-Genexpression nach Exposition mit Cladribin in den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM zum Zeitpunkt 1 d (B-B') sowie in der Konzentrationen 1 μM auch zum Zeitpunkt 3 d (B'). Für die Cladribinexposition in der Konzentration 10 μM zeigte sich für beide untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Anstieg der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO (B''). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 6$ (1 d) und $n = 3$ (3 d) unabhängigen Experimenten. Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, n.s. nicht signifikant.

3.3.4 Cladribin moduliert die Genexpression in mit TNF- α vorstimulierten Astrozyten: Regeneration und Proinflammation

Eine vorherige *in vitro* Studie in murinen Mikrogliazellen hat gezeigt, dass die durch Cladribin vermittelten Effekte nur in pro- oder antiinflammatorisch polarisierten Zellen auftraten (Jørgensen et al., 2020). Für dieses Dissertationsprojekt war es daher von Interesse, in einem nächsten Schritt die astrozytäre Genexpression unter Cladribinexposition in einer bereits inflammatorisch polarisierten Astrozytenkultur zu untersuchen. Eine Studie von Liddel und Kollegen zeigte, dass TNF- α in der Lage ist, *in vivo* in Astrozyten einen proinflammatorischen Phänotyp hervorzurufen (Liddel et al., 2017). Basierend hierauf wurde die Astrozytenkultur mit rekombinantem TNF- α vorstimuliert bzw. es erfolgte alternativ die simultane Exposition der Astrozytenkultur mit TNF- α und Cladribin.

Es ist bekannt, dass proinflammatorisch vorstimulierte Astrozyten in der Lage sind, CCL5 zu exprimieren und dadurch die Migration von Entzündungszellen an den Ort der Entzündung zu fördern (Choi et al., 2014). Zudem schütten mit TNF- α proinflammatorisch stimulierte Astrozyten das neurotoxische Protein LCN2 aus (Jung et al., 2023). Über VEGF-A kommt es u.a. durch die Neoangiogenese von durchlässigen Blutgefäßen zu einer Zunahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und dem Voranschreiten der Entzündung (Argaw et al., 2012; Shahriar et al., 2024). Über eine vermehrte Expression von iNOS und daraus resultierender NO-Freisetzung kommt es zur axonalen Schädigung und Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Smith & Lassmann, 2002). PTX3-vermittelt, tragen Astrozyten dagegen zur Integrität der Blut-Hirn-Schranke bei und vermitteln so neuroprotektive Effekte (Shindo et al., 2016).

Es wurden relative Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR von einer Astrozytenzellkultur nach 24 h Vorstimulation mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz PBS mit 0,5 % BSA (bT) sowie folgender Stimulation mit Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) sowie nach simultaner Stimulation mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz PBS mit 0,5 % BSA (bT) und Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) nach 1 d und 3 d durchgeführt. Es wurde die relative Genexpression von verschiedenen, mit Regeneration (Abb. 20 A-B') oder Proinflammation (Abb. 21 A-D') assoziierten Genen gemessen. Die Resultate zeigten einen statistisch hoch-signifikanten Anstieg der relativen PTX3-Genexpression zwischen simultaner Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur ausschließlichen Exposition mit TNF- α zum Zeitpunkt 1 d (Abb. 20 A). Zum Zeitpunkt 3 d zeigte sich weiterhin ein Anstieg der relativen PTX3-Genexpression der simultan mit TNF- α und Cladribin exponierten Astrozytenkultur. Dieser Anstieg war jedoch weniger ausgeprägt als zum Zeitpunkt 1 d und statistisch nicht-signifikant (Abb. 20 A'). Der gleiche Effekt zeigte sich in der Vorstimulationsbedingung nach 1 d, hier weniger stark ausgeprägt und statistisch nicht-signifikant im Vergleich zur simultanen Exposition der Astrozytenkultur mit TNF- α und Cladribin, und stärker ausgeprägt zum Zeitpunkt 3 d (Abb. 20 A-A') mit Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 20 A'). Zudem zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg in der relativen Genexpression von IL-6 zwischen Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur ausschließlichen Exposition mit TNF- α in beiden untersuchten Stimulationsbedingungen nach 1 d und 3 d (Abb. 20 B-B'). Dieser Effekt stellte sich in der proinflammatorisch polarisierten Astrozytenkultur größer dar als unter der simultanen Exposition (Abb. 20 B-B').

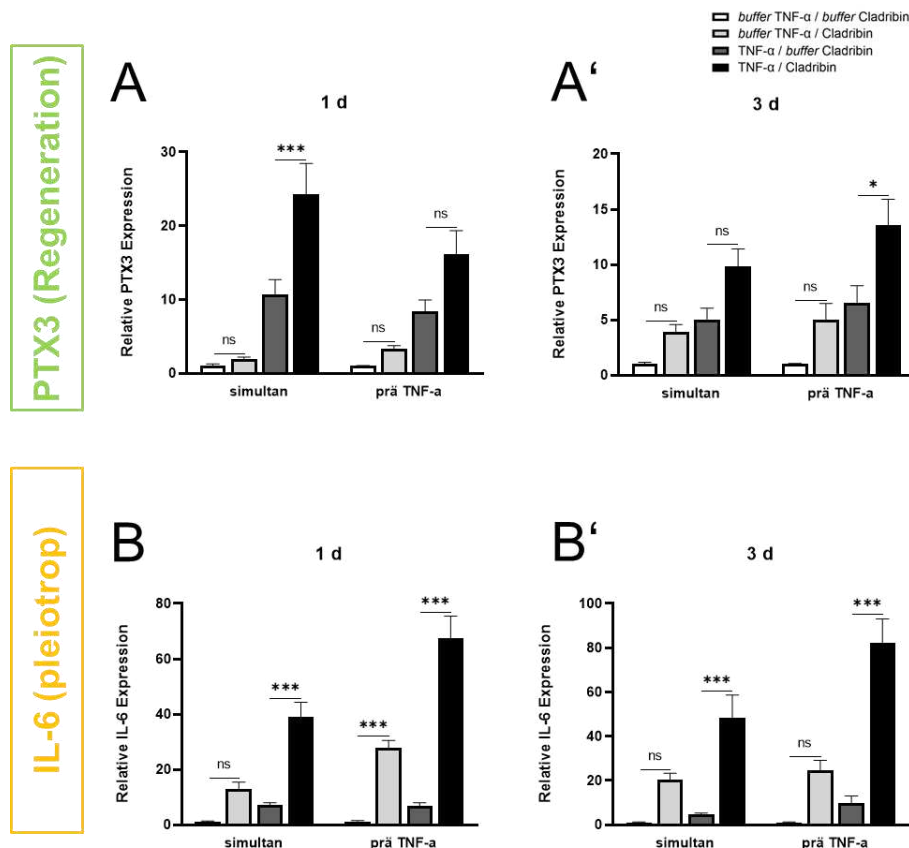


Abb. 20: Genexpressionsanalysen von PTX3 sowie von IL-6 in Astrozyten nach simultaner Exposition mit TNF- α und Cladribin sowie nach Vorstimulation mit TNF- α und nachfolgender Exposition mit Cladribin.

(A-B') qRT-PCR Analysen der relativen (A-A') PTX3, (B-B') IL-6 Genexpression nach simultaner Stimulation mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) und Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz (D) sowie nach proinflammatorischer Polarisierung durch Vorstimulation mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) sowie nachfolgender Exposition mit Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz (D) nach 1 d und 3 d. Die Resultate zeigten einen statistisch hoch-signifikanten Anstieg der relativen PTX3-Genexpression zwischen simultaner Stimulation mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur ausschließlichen Stimulation mit TNF- α nach 1 d (A). Dieser Effekt ließ sich auch nach 3 d beobachten, ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (A'). In der Vorstimulationsbedingung zeigte sich ebenfalls ein Anstieg in der relativen PTX3-Genexpression nach Exposition der Astrozyten mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α zum Zeitpunkt 1 d und 3 d (A-A'), mit Nachweis einer statistischen Signifikanz für den Zeitpunkt 3 d (A'). Die Resultate zeigten zudem einen hoch-signifikanten Anstieg der relativen IL-6-Genexpression nach Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur ausschließlichen Exposition mit TNF- α , sowohl unter Vorstimulation als auch unter simultaner Stimulation zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d, wobei dieser Effekt in der Vorstimulationsbedingung deutlich stärker ausgeprägt war (B-B'). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 6$ (PTX3) und $n = 7$ (IL-6) unabhängigen Experimenten. Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$, n.s. nicht signifikant.

Hinsichtlich der mit Proinflammation assoziierten Gene zeigte sich für CCL5 lediglich ein geringer, statistisch nicht-signifikanter Anstieg der relativen Genexpression in der simultanen Stimulation unter Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α (Abb. 21 A). In den anderen Bedingungen und Zeitpunkten blieb die relative CCL5-Genexpression unreguliert (Abb. 21 A, A'). Für iNOS zeigte sich in der Vorstimulationsbedingung ein Anstieg der Genexpression unter alleiniger Exposition mit TNF- α sowie unter Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zu den Bedingungen ohne TNF- α -Exposition nach 1 d (Abb. 21 B). Zum Zeitpunkt 3 d zeigte sich eine insgesamt verringerte iNOS-Genexpression. Zudem konnte ein Anstieg der relativen Genexpression unter Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α in der Vorstimulationsbedingung detektiert werden, ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 21 B'). Bezüglich der relativen Genexpression von VEGF-A konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Regulation beobachtet werden (Abb. 21 C, C'). Die Genexpression von LCN2 blieb unter simultaner Exposition mit TNF- α und Cladribin zum Zeitpunkt 1 d unreguliert. Es zeigte sich hier lediglich zum Zeitpunkt 3 d ein geringer, statistisch nicht-signifikanter, ansteigender Trend in der astrozytären LCN2-Genexpression, der über dem Niveau der alleinigen Exposition mit TNF- α lag (Abb. 21 D, D'). Hinsichtlich der vorherigen Exposition der Astrozytenkultur mit TNF- α und nachfolgender Cladribinexposition konnte der gleiche Trend wie unter den simultanen Bedingungen gemessen werden, jedoch mit größerem, statistisch nicht-signifikantem Anstieg der relativen LCN2-Genexpression zum Zeitpunkt 3 d, der sich im Vergleich zu der alleinigen TNF- α Exposition jedoch nahezu verdoppelte (Abb. 21 D'). Auch wenn keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte, war es nachfolgend von Interesse zu untersuchen, ob sich dieser Trend auch auf Proteinebene abbilden ließ. Hierzu erfolgten ELISA-basierte Analysen von Zellkulturüberständen von mit TNF- α (10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz PBS mit 0,5 % BSA vorstimulierten und im Anschluss mit Cladribin (10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO exponierten Astrozyten nach 3 d (Abb. 21 D''). Hier zeigte sich eine erhöhte LCN2-Sekretion sowohl der Astrozyten, die ausschließlich mit TNF- α exponiert waren, als auch der Astrozyten, die mit TNF- α und Cladribin exponiert waren, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen mit Nachweis einer statistischen Signifikanz zwischen der Kontrollbedingung und der Exposition mit TNF- α und Cladribin. Es konnte jedoch kein Unterschied in der LCN2-Sekretion der Astrozytenzellkultur zwischen alleiniger TNF- α -Exposition und der Kombination aus TNF- α -Exposition und nachfolgender Exposition mit Cladribin detektiert werden (Abb. 21 D'').

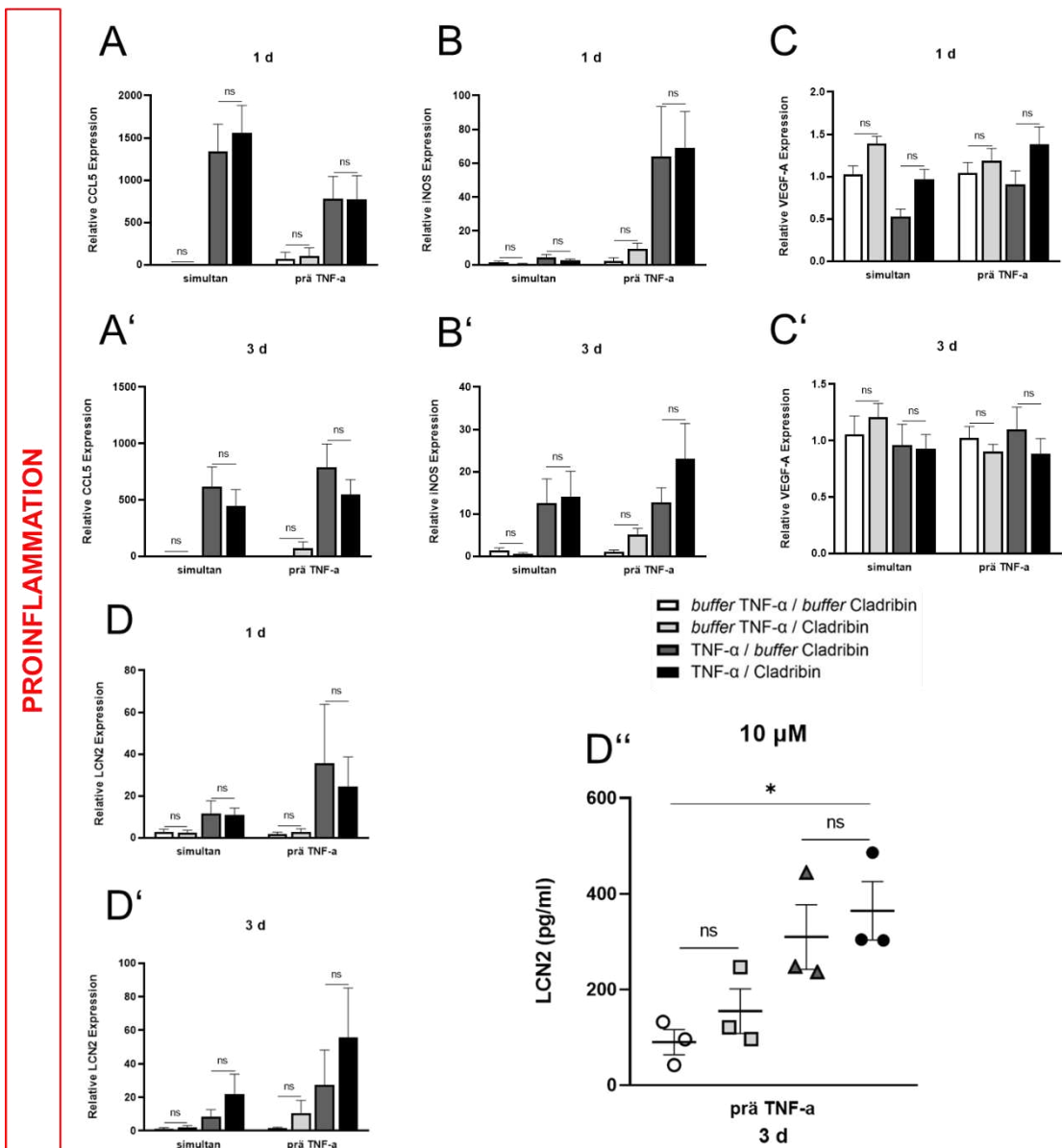


Abb. 21: Genexpressionsanalysen von mit Proinflammation assoziierten Genen in Astrozyten nach simultaner Exposition mit TNF- α und Cladribin oder nach Präexposition mit TNF- α und folgender Exposition mit Cladribin sowie Darstellung der astrozytären LCN2-Freisetzung nach proinflammatorischer Polarisation und nachfolgender Cladribinexposition.

(A-D') qRT-PCR Analysen der relativen (A-A') CCL5, (B-B') iNOS, (C-C') VEGF-A, (D-D') LCN2-Genexpression nach simultaner Exposition mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) und Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) sowie nach Vorstimulation mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) sowie folgender Exposition mit Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) nach 1 d und 3 d. (D'') ELISA-basierte Analysen der LCN2-Sekretion nach Exposition mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) sowie folgender Exposition mit Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) nach 3 d. Es zeigte sich ein geringer, statistisch nicht-signifikanter Anstieg in der relativen CCL5-Expression nach simultaner Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur ausschließlichen Exposition mit TNF- α zum Zeitpunkt 1 d (A). In den weiteren Bedingungen war keine Regulation nachweisbar. Des Weiteren konnte ein Anstieg der relativen iNOS-Expression nach alleiniger Exposition mit TNF- α sowie nach Exposition mit TNF- α und Cladribin in der Vorstimulationsbedingung im Vergleich zu den Bedingungen ohne TNF- α

detektiert werden zu den Zeitpunkten 1 d und 3 d, wobei der Effekt zum Zeitpunkt 1 d größer war. Zum Zeitpunkt 3 d zeigte sich eine insgesamt verringerte iNOS-Genexpression sowie ein statistisch nicht-signifikanter Anstieg der relativen Genexpression unter Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α in der Vorstimulationsbedingung (B-B'). Bezüglich VEGF-A zeigte sich keine Regulation der Genexpression in den untersuchten Bedingungen (C). Hinsichtlich des Gens LCN2 zeigte sich zum Zeitpunkt 1 d in der simultanen Bedingung keine Regulation der relativen Genexpression (D). Zum Zeitpunkt 3 d zeigte sich ein nicht-signifikanter Anstieg der relativen Genexpression von LCN2 nach Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α in beiden Bedingungen, wobei der Effekt in der Vorstimulationsbedingung größer war (D'). Die Resultate der ELISA-basierten Analysen zeigten einen Anstieg der LCN2-Sekretion zwischen den Versuchsbedingungen mit TNF- α -Exposition und ohne TNF- α -Exposition mit Nachweis einer statistischen Signifikanz zwischen der Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne Exposition mit TNF- α oder Cladribin. Zwischen der alleinigen Exposition mit TNF- α sowie der kombinierten Exposition mit TNF- α und Cladribin konnte kein Effekt detektiert werden (D''). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 7$ (A-A'), $n = 3$ (B-B'), $n = 6$ (C-C', D-D') und $n = 5$ (D'') unabhängigen Experimenten. (A-D') Zweifache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: n.s. nicht signifikant. (D'') Einfache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, n.s. nicht signifikant.

3.3.5 Effekte von Cladribin auf die Genexpression in mit TNF- α vorstimulierten Astrozyten: Glianarbe

Neben der Fähigkeit von Astrozyten über die Expression und Sekretion unterschiedlicher Moleküle sowohl in pro- als auch antiinflammatorischer Hinsicht Einfluss auf das Entzündungsgeschehen im Rahmen der MS zu nehmen, ist eine ihrer entscheidenden Aufgaben im entzündlich veränderten ZNS die Beteiligung an der Bildung einer gliösen Narbe. Dadurch kommt es im Kontext der MS neben einer Eindämmung und räumlichen Begrenzung der entzündlichen Bereiche auch zu hemmenden Effekten beispielsweise auf Oligodendrozyten und somit nachfolgend zur Einschränkung von Remyelinisierungsprozessen (Correale & Farez, 2015). Von reaktiven Astrozyten im Rahmen der Bildung einer gliösen Narbe produzierte CSG wie ACAN und BCAN üben hemmende Einflüsse auf die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sowie das axonale Wachstum aus (Kamermans et al., 2019, Feliu et al., 2020). An der Bildung dieser CSG beteiligt sind die Enzyme CHST11, XYLT1 sowie der Transkriptionsfaktor SOX9 (Gris et al., 2007) und als weiteres Enzym CSGALNACT1 (Igarashi et al., 2018). Das Transmembranprotein AQP4 ist von Bedeutung für die Migration der Astrozyten zum Ort der Narbenbildung (Verkman et al., 2006) und das Zelladhäsionsmolekül CDH2 vermittelt Zellkontakte im Rahmen der gliösen Narbenbildung (Vázquez-Chona & Geisert, 1999).

Um mögliche Einflüsse von Cladribin auf diese Rolle der Astrozyten zu untersuchen, erfolgten Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR von einer mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) vorstimulierten, und im Anschluss mit Cladribin (C,

10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) exponierten Astrozytenzellkultur nach 3 d (Abb. 23 A-H). Die Ergebnisse zeigten einen geringen, statistisch nicht-signifikant ansteigenden Trend in der relativen Genexpression von ACAN nach Exposition mit Cladribin und vorheriger Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α (Abb. 23 A). Zudem zeigt sich ein signifikanter Anstieg der relativen Genexpression von ACAN nach Exposition ausschließlich mit Cladribin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23 A). Im Gegensatz dazu zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall in der relativen Genexpression von BCAN nach Exposition ausschließlich mit Cladribin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23 B). Diese Tendenz ließ sich auch unter Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α beobachten, jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 23 B). Für AQP4 konnte keine Regulation der relativen Genexpression detektiert werden (Abb. 23 C). Hinsichtlich der Gene CHST11, CSGALNACT1 und XYLT1 konnte ein marginaler, statistisch nicht-signifikanter Anstieg der relativen Genexpression beobachtet werden, nach Cladribinexposition sowohl in naiven als auch in mit TNF- α proinflammatorisch polarisierten Astrozyten (Abb. 23 E, F, H). Des Weiteren konnte ein milder, statistisch nicht-signifikanter Abfall in der relativen Genexpression von CDH2 nach Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α detektiert werden. Es zeigte sich für die alleinige Cladribinexposition im Vergleich zur Kontrolle sogar ein signifikanter Abfall der relativen CDH2-Genexpression (Abb. 23 D). Zudem zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall in der relativen Genexpression von SOX9, sowohl nach ausschließlicher Exposition mit Cladribin im Vergleich zur Kontrolle als auch nach Vorstimulation mit TNF- α und anschließender Cladribinexposition im Vergleich zur ausschließlichen Stimulation mit TNF- α (Abb. 23 G). Insgesamt blieb jedoch die Regulation der untersuchten Gene durch Cladribin, bis auf SOX9, in der vorher durch TNF- α entzündlich polarisierten Astrozytenkultur unbeeinflusst.

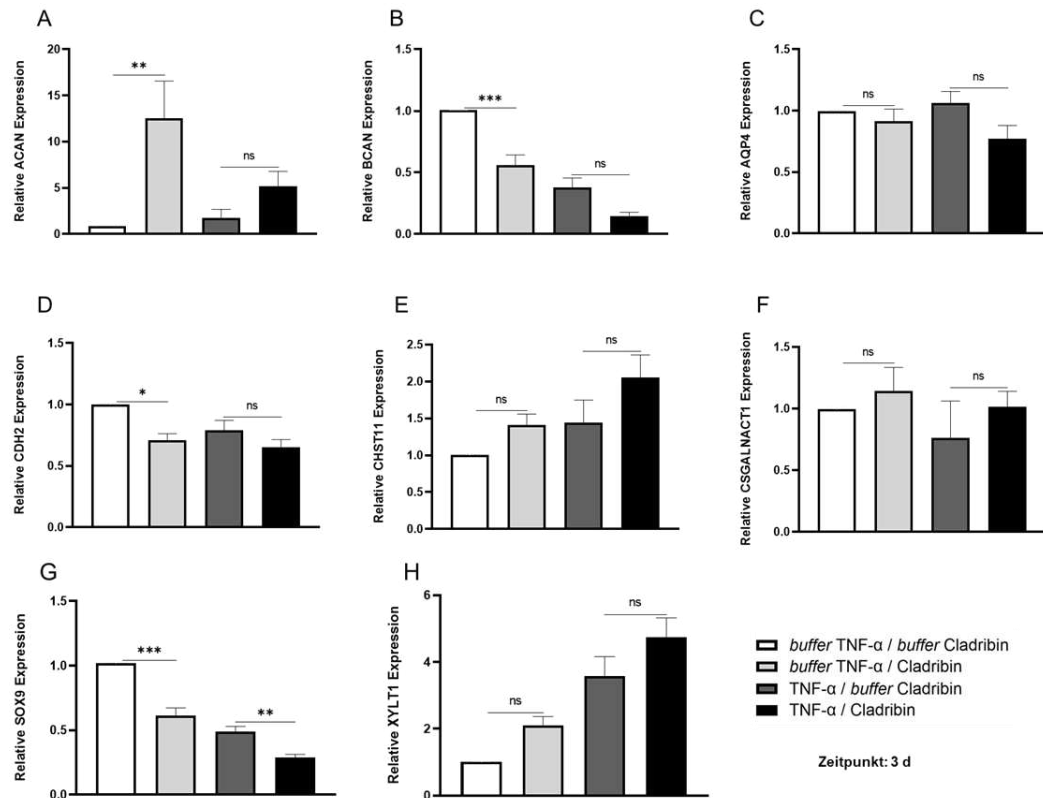


Abb. 23: Genexpressionsanalysen von mit gliöser Narbenbildung assoziierten Genen in Astrozyten nach Exposition zu TNF- α und nachfolgender Exposition zu Cladribin

(A-H) qRT-PCR Analysen der relativen (A) ACAN, (B) BCAN, (C) AQP4, (D) CDH2, (E) CHST11, (F) CSGALNACT1, (G) SOX9, (H) XYLT1-Genexpression nach Vorstimulation mit TNF- α (T, 10 μ g/ml) oder der Kontrollsubstanz (bT) für 24 h sowie nachfolgender Exposition zu Cladribin (C, 10 μ M) oder der Kontrollsubstanz DMSO (D) nach 3 d. Die Resultate zeigten einen statistisch signifikanten Abfall der relativen Genexpression von SOX9 nach Exposition zu TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition zu TNF- α (G). Hinsichtlich der weiteren untersuchten Marker zeigten sich statistisch signifikante Effekte nur unter Exposition der naiven Astrozyten zu Cladribin. Es kam zu einer statistisch signifikanten Abnahme der relativen Genexpression von BCAN und CDH2 sowie zu einer statistisch signifikanten Zunahme der relativen Genexpression von ACAN (A, B, D). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus n = 6 unabhängigen Experimenten. Einfache Varianzanalyse mit Schnelltest nach Tukey: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. nicht signifikant.

4 Diskussion

MS ist eine bisher unheilbare, chronisch-entzündliche, demyelinisierende Autoimmunerkrankung des ZNS mit einem mittleren Erkrankungsalter von 32 Jahren (The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). Sie kennzeichnet sich durch eine chronische Neuroinflammation, Zerstörung von Myelinscheiden mit nachfolgender axonaler Schädigung und irreversibler Neurodegeneration aus. Für die oft jungen Patient*innen bedeutet dies häufig eine mit der Zeit zunehmende Behinderung und damit verbundenen, starken Einschränkungen in der weiteren Lebensplanung (World Health Organization, 2008). Der entscheidende Auslöser der MS bleibt weiterhin unbekannt und mögliche Auslöser sowie Pathomechanismen sind Themen intensiver Forschungsarbeit (Goodin et al., 2021; Bjornevik et al., 2022). Mikrogliazellen sowie Astrozyten können sowohl in pro- als auch in antiinflammatorischer Hinsicht auf die im Rahmen der MS ablaufenden Pathomechanismen Einfluss nehmen und sowohl neuroprotektive Effekte vermitteln als auch zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen (Goldmann & Prinz, 2013; Correale & Farez, 2015; Orihuela et al., 2016). Trotz der Tatsache, dass die Vielfalt der dahinterliegenden Zusammenhänge noch nicht vollständig erforscht ist, stellen sie mögliche Zielstrukturen für neue medikamentöse Therapien dar. Das Purinanalogon 2-Chlor-2'-desoxyadenosin, auch unter dem Namen Cladribin bekannt und initial als Chemotherapeutikum zur Behandlung der Haarzell-Leukämie angewandt (Estey et al., 1992), ist seit 2017 in niedriger Dosis auch als immunmodulierendes Medikament in der verlaufsmodifizierenden Therapie der hochaktiven RRMS zugelassen (Europäische Arzneimittel Agentur, 2017; The Multiple Sclerosis International Federation, 2020). Es reduziert nachweislich die Hirnatrophie sowie die Behinderungszunahme (De Stefano et al., 2018; Giovannoni et al., 2021). Neben seiner gut beschriebenen zytoreduktiven Wirksamkeit auf Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten (Stuve et al., 2019), stellt Cladribin einen verlaufsmodifizierenden Wirkstoff dar, durch den eine anhaltende Immunrekonstitution erreicht werden kann (Holm Hansen et al., 2023; Ammoscato et al., 2024; Holm Hansen et al., 2024). Die Tatsache, dass Cladribin liquorgängig ist, lässt vermuten, dass Cladribin auch auf ZNS-ansässige Zellen wie Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Astrozyten Effekte ausüben könnte (Liliemark, 1997). Zu Beginn dieses Dissertationsprojektes lagen erste Erkenntnisse vor, dass Cladribin in Mikrogliazellen der Ratte die Proliferation hemmt sowie die Apoptose induziert (Singh et al., 2012). Daher war es von großem Interesse, im Rahmen dieses Dissertationsprojektes zu untersuchen, welche Effekte Cladribin in einer nicht-zytotoxischen Dosis sowohl auf naive als auch auf proinflammatorisch polarisierte

Mikrogliazellen und Astrozyten ausübt und inwieweit Cladribin in der Lage ist, Zellfunktionen dieser beiden Zellarten zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten der Ratte als mögliche Zielzellen von Cladribin fungieren könnten, da Cladribin die Genexpression von im Kontext der MS bekannter, proinflammatorischer und neurosupportiver Gene zu modulieren scheint.

4.1 Mikrogliazellen

4.1.1 Die Reduktion der mikroglialen Zellzahl durch Cladribin ist zeit- und konzentrationsabhängig

Eine frühere *in vitro* Studie lieferte bereits Hinweise auf mögliche Wirkungsweisen von Cladribin auf Mikrogliazellen der Ratte, durch die Vermittlung sowohl antiproliferativer Effekte als auch durch die Induktion von Apoptose (Singh et al., 2012). Weitere *in vitro* Studien in Mikrogliazellen aus der Maus sowie der Ratte zeigten zudem, dass Cladribin als *Prodrug* in die Mikrogliazellen gelangt, eine intrazelluläre Phosphorylierung jedoch für die Entfaltung seiner antiproliferativen und apoptotischen Wirkung notwendig ist (Singh et al., 2012; Aybar et al., 2022), analog zur in Lymphozyten stattfindenden Aktivierung von Cladribin (Carson et al., 1983). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Cladribin in Mikrogliazellen die mit der intrinsischen Apoptose assoziierte Caspase 9 aktiviert, welche zu den Initiatorcaspasen zählt und im weiteren Verlauf die Vorstufen der Effektorcaspasen aktiviert, was schließlich zur Spaltung von zellulären Proteinen und zum gerichteten Zelltod führt (Pan et al., 1998; Singh et al., 2012; Aybar et al., 2022). Für Cladribin konnte *in vitro* in Mikrogliazellen der Ratte zudem eine vermehrte Spaltung und somit Aktivierung der mit dem intrinsischen Weg der Apoptose assoziierten Effektorcaspase 3 nachgewiesen werden (Aybar et al., 2022). Gestützt wird die Annahme einer apoptotischen Wirkung durch den Nachweis einer Cladribin-induzierten DNA-Fragmentation in Mikrogliazellen (Singh et al., 2012). In der hier gezeigten Dissertationsarbeit konnte im Rahmen der Ermittlung einer für Mikrogliazellen nicht-zytotoxischen Dosis von Cladribin mittels immunzytochemischer Färbungen ebenfalls gezeigt werden, dass Cladribin zeit- und konzentrationsabhängig die mikrogliale Zellzahl reduziert, mit dem größten, statistisch signifikanten Effekt für eine Exposition mit der hier gewählten Höchstkonzentration von 10 μM Cladribin bei einer Expositionsdauer von 5 Tagen (Abb. 9 D, E). Auch in niedrigeren Konzentrationen (0,5 μM und 1 μM) und nach kürzeren Expositionszeiträumen ist ein zytoreduktiver Trend beobachtbar gewesen, jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 9 B-E). Für die Exposition mit 0,1 μM Cladribin konnte zu keinem Zeitpunkt eine

wesentliche Reduktion der mikroglialen Zellzahl detektiert werden (Abb. 9 A). Die hier präsentierten Ergebnisse stimmen mit weiteren, unabhängigen und mit verschiedenen Konzentrationen von Cladribin durchgeführten *in vitro* Studien in Mikrogliazellen der Ratte, der Maus sowie des Menschen überein (Singh et al., 2012; Aybar et al., 2022; Medeiros-Furquim et al., 2022). Die Beobachtung, dass eine signifikante Reduktion der mikroglialen Zellzahl erst ab einer Expositionsdauer von 5 Tagen eintrat, ist möglicherweise erklärbar durch eine verzögerte Induktion der Apoptose bei vorher einsetzender antiproliferativer Wirkung (Singh et al., 2012). Diese Annahme wird durch die Untersuchung von Aybar und Kollegen untermauert, die *in vitro* an murinen Mikrogliazellen ebenfalls zeigten, dass die Inhibition der Proliferation von Mikrogliazellen bei niedrigeren Dosen begann als der Nachweis der Apoptose (Aybar et al., 2022). Eine mögliche Autophagie als Ursache für die verzögerte Apoptose konnte nicht nachgewiesen werden (Singh et al., 2012). Denkbar wäre jedoch auch die Notwendigkeit einer Akkumulation einer bestimmten Konzentration von Cladribin in der Mikrogliazelle, bevor es zur Induktion von Apoptose kommt. Dieser Aspekt ist jedoch rein spekulativ. Insgesamt ist unter Exposition mit der im Rahmen dieses Dissertationsprojektes gewählten Konzentration von 0,1 μ M Cladribin von keiner relevanten apoptotischen Wirkung auf Mikrogliazellen auszugehen, was sie ideal für weitere Studien hinsichtlich modulierender, nicht-zytotoxischer Effekte auf Mikrogliazellen machte.

4.1.2 Cladribin induziert die Genexpression von IGF-1 sowie der mit Myelinphagozytose assoziierten Gene MERTK, TREM2 und P2Y6 in Mikrogliazellen

Neben anderen krankheitsmodifizierenden, immunmodulatorisch wirkenden Medikamenten, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie ihre Wirkung u.a. durch Beeinflussung von Mikrogliazellen entfalten, wie beispielsweise Fingolimod (Noda et al., 2013) oder Siponimod (Gruchot et al., 2022), scheint auch die Wirkungsweise von Cladribin in der Therapie der MS über die bekannte, rein zytotoxische Wirkung auf Lymphozyten hinauszugehen (Singh et al., 2012). Neben Einflüssen auf DNA-Synthese, DNA-Reparatur und Mitochondrienfunktionen, die zum gerichteten Zelltod von Immunzellen führen, scheint Cladribin auch zu zahlreichen immunmodulatorischen Vorgängen beizutragen und so einen Teil seiner Wirkung in der Therapie der MS zu entfalten (Jacobs et al., 2018). In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass Cladribin in peripheren mononukleären Blutzellen zu einer erhöhten Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-10 führt (Korsen et al., 2015). Um mögliche modulatorische Effekte des nachgewiesenermaßen liquorgängigen

Cladribin auf Mikrogliazellen zu untersuchen, erfolgten zunächst Analysen der relativen Genexpression bestimmter im Kontext der MS bekannter, mit Regeneration, Proinflammation oder Phagozytose assoziierter Gene nach Exposition mit Cladribin (0,1 μ M). Über die Sekretion einer Vielzahl von Molekülen, beispielsweise des Peptidhormons IGF-1, sind Mikrogliazellen in der Lage, die oligodendrogliale Differenzierung zu fördern und so Remyelinisierungsprozesse voranzutreiben, die im Rahmen der MS insuffizient sind (Lovett-Racke et al., 1998; Kremer et al., 2011; Miron et al., 2013; Gruchot et al., 2019). Die hier gezeigten Ergebnisse deuten auf eine signifikant erhöhte Genexpression von IGF-1 nach Exposition mit Cladribin nach 3 Tagen hin (Abb. 10 A). In der nachfolgenden ELISA-basierten Analyse konnte jedoch keine erhöhte mikrogliale IGF-1-Sekretion in Folge der Cladribinexposition nachgewiesen werden (Abb. 11). Cladribin-vermittelt scheint es somit zwar zu einer erhöhten Genexpression, jedoch zu keiner mikroglialen Sekretion von IGF-1 zu kommen. Mögliche Erklärungen hierfür könnten beispielsweise eine Hemmung der Translation durch Cladribin, die fehlende Freisetzung der intrazellulär befindlichen Moleküle wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine (Jørgensen et al., 2020), oder eine sehr geringe Freisetzungsmenge unter der Nachweisgrenze der verwendeten Verfahren sein. Eine intrazelluläre Akkumulation der Proteine ohne Freisetzung könnte beispielsweise mittels Western Blot oder ELISA-basierten Messungen von Zelllysaten nachgewiesen werden. Hinsichtlich der untersuchten proinflammatorischen Marker IL-6, TNF- α und iNOS konnte lediglich ein nicht-signifikanter ansteigender Trend der relativen Genexpression unter Exposition mit Cladribin gezeigt werden (Abb. 10 E-G), der zum Zeitpunkt 1 Tag für IL-6 und iNOS größer ausfiel als zum Zeitpunkt 3 Tage (Abb. 10 E, F). Für TNF- α zeigte sich dagegen nach 3 Tagen eine geringfügig erhöhte, ebenfalls nicht-signifikante Genexpression nach Exposition mit Cladribin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10 G). Diese Ergebnisse decken sich mit der *in vitro* Studie von Jørgensen et al., in der naive Mikrogliazellen ebenfalls keinen signifikanten, durch Cladribin induzierten Effekt in einer höheren Konzentration (10 μ M) auf die Regulation der Expression der proinflammatorischen Gene TNF- α und iNOS zeigten (Jørgensen et al., 2020). In einer *in vitro* Studie in naiven humanen Mikrogliazellen konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt von Cladribin auf die TNF- α -Genexpression nachgewiesen werden (Medeiros-Furquim et al., 2022). Die Beobachtung der Tendenz einer höheren relativen Genexpression der proinflammatorischen Marker IL-6 und iNOS nach einer Expositionsdauer von einem Tag im Vergleich zur längeren Exposition im Rahmen dieses Dissertationsprojektes lässt vermuten, dass Cladribin in naiven Mikrogliazellen möglicherweise, bedingt durch den Eingriff von Cladribin als fremdes Agens in das sie umgebene Milieu, zu einer kurzfristigen proinflammatorischen Modulation führen könnte,

wobei dieser Effekt mit anhaltender Exposition abzunehmen scheint. Dies ist in Einklang zu bringen mit der Tatsache, dass Mikrogliazellen in der Lage sind, ihre Polarisation in Abhängigkeit des sie umgebenden Milieus rasch und dynamisch zwischen ruhend und aktiviert zu ändern (Orihuela et al., 2016). Die Phagozytose von Myelindebris durch Mikrogliazellen ist ein entscheidender Mechanismus im Rahmen von Remyelinisierungsprozessen im ZNS und insbesondere im Rahmen der MS von besonderer Bedeutung, da Myelindebris die Myelinsynthese und somit Remyelinisierungsprozesse durch Oligodendrozyten hemmt (Lampron et al., 2015). Die Rezeptor-Tyrosinkinase MERTK sowie der Transmembranrezeptor TREM2 sind entscheidend für die Funktion der Mikrogliazellen, apoptotische Zellen und insbesondere Myelindebris zu erkennen und zu phagozytieren (Poliani et al., 2015; Healy et al., 2017). Es konnte eine statistisch signifikant erhöhte relative Genexpression, sowohl für MERTK als auch für TREM2, nach Exposition der Mikrogliazellen mit 0,1 μ M Cladribin nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen detektiert werden (Abb. 10 C, D). Dies deutet darauf hin, dass Cladribin in der Lage sein könnte, die Phagozytosefähigkeit der Mikrogliazellen zu erhöhen und dadurch Remyelinisierungsprozesse zu unterstützen. Weiter überprüft werden könnte dies beispielsweise mittels eines Myelinphagozytose-Assays, wie bereits in Mikrogliazellen etabliert (Healy et al., 2016; Kremer et al., 2019). Verschiedene durchgeführte Studien anderer Arbeitsgruppen kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. In humanen naiven Mikrogliazellen konnte *in vitro*, konträr zu diesem Dissertationsprojekt, kein Anstieg der Genexpression von MERTK nach Exposition mit Cladribin detektiert werden. Hier wurden humane Mikrogliazellen allerdings mit anderen Cladribinkonzentrationen (0,01 μ M, 0,05 μ M und 0,25 μ M) über eine Expositionsdauer von 6 Tagen exponiert (Medeiros-Furquim et al., 2022). Zudem muss betont werden, dass Medeiros-Furquim et al. die humanen Mikrogliazellen in einer Zellzahl von 50 000 Zellen je Bedingung gegenüber Cladribin exponierten, während im Rahmen dieses Dissertationsprojektes eine Zellzahl von 300 000 Mikrogliazellen je Bedingung mit Cladribin exponiert wurde. Das abweichende Studiendesign und die unterschiedliche Herkunft der Mikrogliazellen aus Ratte bzw. Mensch erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Singh und Kollegen konnten mittels Phagozytose-Assay *in vitro* keinen Effekt von Cladribin in einer Konzentration von 0,1 μ M und 1 μ M auf die Phagozytosefähigkeit von naiven Mikrogliazellen der Ratte nachweisen, gemessen an der Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Latexpartikeln. Die Expositionsdauer betrug dabei jedoch nur 24 Stunden, was sich mit den beobachteten Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit zum Zeitpunkt 1 Tag deckt (Singh et al., 2012). In mit LPS proinflammatorisch modulierten, murinen Mikrogliazellen konnte in einer weiteren Studie dagegen *in vitro* nach Exposition mit Cladribin (0,1 μ M - 1 μ M) sogar ein Rückgang der

Phagozytosefähigkeit beobachtet werden, während Cladribin (0,01 μM - 10 μM) keinen Effekt auf die Phagozytose durch naive Mikrogliazellen hatte (Jørgensen et al., 2020). Möglicherweise sind der Aktivitätszustand, die Herkunft der untersuchten Mikrogliazellen sowie die Expositionsdauer und die Expositions-dosis von Bedeutung für das Ansprechen der Mikrogliazellen auf Cladribin hinsichtlich der Beeinflussung ihrer Phagozytosefähigkeit. Über auf der Oberfläche von Mikrogliazellen lokalisierte Purinrezeptoren wie P2Y6, P2Y12 und P2X7 werden u.a. Phagozytose und Migrationsvorgänge gesteuert (Gómez Morillas et al., 2021). Unter Exposition mit Cladribin (0,1 μM) kam es zum Zeitpunkt 3 Tage zu einer signifikant erhöhten Genexpression von P2Y6 (Abb. 12 A). Für P2Y12 zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Tage ein ähnlicher Effekt, jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 12 B). Dies lässt die Vermutung aufstellen, dass Cladribin möglicherweise längerfristig einen Einfluss auf diese essenziellen Funktionen der Mikrogliazellen, Migration zum Ort der Entzündung (P2Y12) sowie Phagozytose von Remyelinisierungsprozesse-hemmendem Myelindebris (P2Y6), ausüben, und so den Krankheitsverlauf der MS beeinflussen könnte. Dies untermauert die bereits diskutierten Ergebnisse hinsichtlich der erhöhten relativen Expression der mit Phagozytose assoziierten Gene MERTK und TREM2 nach Exposition mit Cladribin. Auf die Genexpression des G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptors ADORA3, ebenfalls assoziiert mit mikroglialer Migration sowie Änderungen ihrer Morphologie hin zu einem aktivierten Phänotyp (Ohsawa et al., 2012), scheint Cladribin im Gegensatz dazu jedoch keinen Einfluss zu haben (Abb. 12 D). Insgesamt konnte diese Dissertationsarbeit in naiven Mikrogliazellen zeigen, dass es unter Exposition mit Cladribin (0,1 μM) nach 3 Tagen zu einer statistisch signifikant erhöhten, relativen Expression der mit Regeneration und Remyelinisierung assoziierten Gene IGF-1, MERTK, TREM2 und P2Y6 kam, während nach einer kürzeren Expositions-dauer von einem Tag ein statistisch nicht-signifikanter, ansteigender Trend der relativen Genexpression der mit Proinflammation assoziierten Gene IL-6 und iNOS zu beobachten war. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Cladribin in naiven Mikrogliazellen initial und kurzzeitig einen proinflammatorischen Phänotyp induzieren könnte, während mit zunehmender Expositions-dauer ein antiinflammatorischer, regenerativer Phänotyp überwiegen könnte, der zu den in der klinischen Anwendung von Cladribin beobachteten Effekten in der Therapie der RRMS beitragen könnte.

4.1.3 Cladribin verringert in proinflammatorisch polarisierten Mikrogliazellen nicht die iNOS-Expression

Über LPS kann *in vitro* in primären Mikrogliazellen der Ratte ein proinflammatorischer Phänotyp hervorgerufen werden (Lively & Schlichter, 2018), wodurch es im Verlauf zu einer gesteigerten Genexpression von iNOS und so zur vermehrten Sekretion von NO durch Mikrogliazellen kommt (Smith & Lassmann, 2002). Während NO in einer physiologischen Umgebung immunregulatorische und somit neuroprotektive Aufgaben erfüllen kann, u.a. durch seine Funktion in der Abwehr schädlicher Agenzen (Pflüger et al., 2016; Smith & Lassmann, 2002), führt eine gesteigerte NO-Freisetzung im inflammatorisch veränderten ZNS, wie es im Rahmen der MS zu finden ist, zu oligodendroglialer und axonaler Schädigung sowie zur Zerstörung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Smith & Lassmann, 2002). In Biopsien aus humanen MS Läsionen ist zudem eine erhöhte iNOS-Expression nachweisbar (Bitsch et al., 1999). Es stellte sich nun die Frage, ob Cladribin möglicherweise auch einen Einfluss auf die iNOS-Expression in proinflammatorisch polarisierten Mikrogliazellen haben könnte. Es erfolgten immunzytochemische Co-Färbungen einer mit LPS vorstimulierten und dann mit Cladribin exponierten Mikrogliazellkultur. Unter der alleinigen Exposition mit LPS zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollbedingungen sowohl nach im Anschluss erfolgter Exposition mit Cladribin als auch mit der Kontrollsubstanz ein nicht-signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils iNOS-positiver Mikrogliazellen an der Gesamtzahl der Mikrogliazellen nach einer Expositionsdauer von einem Tag (Abb. 14 A), wogegen Mitglieder der Arbeitsgruppe im Rahmen eines anderen Projektes zeigen konnten, dass LPS in Mikrogliazellen der Ratte zu einer signifikant erhöhten Expression von iNOS führte (Gruchot et al., 2022). Diese abweichenden Ergebnisse hinsichtlich der erreichten Signifikanz könnten möglicherweise in den unterschiedlichen verwendeten Chargen der Wistar-Ratten oder minimalen, technisch-bedingten Abweichungen in der Mikroumgebung der Mikrogliazellen begründet sein. Nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen fiel dagegen der prozentuale Anteil iNOS-positiver Zellen nach LPS-Exposition und zusätzlicher Exposition mit Cladribin oder mit der Kontrollsubstanz DMSO statistisch nicht-signifikant unter den Wert der naiven Kontrollbedingungen (Abb. 14 A'), möglicherweise erklärbar durch den nachlassenden proinflammatorischen Impuls durch die länger zurückliegende LPS-Exposition nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen. Hinsichtlich eines möglichen modulierenden Effektes von Cladribin auf die mikrogliale iNOS-Expression konnte nach einer Expositionsdauer von einem Tag lediglich ein marginaler, statistisch nicht-signifikanter, ansteigender Trend des prozentualen Anteils iNOS-positiver Mikrogliazellen unter Exposition mit LPS und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit LPS detektiert werden (Abb. 14 A). Nach einer

Expositionsdauer von 3 Tagen zeigte sich dagegen kein Effekt (Abb. 14 A'). Dies lässt, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer anderen Arbeit zur NO-Freisetzung von mit LPS proinflammatorisch polarisierten Mikrogliazellen nach Exposition mit Cladribin (Singh et al., 2012) annehmen, dass Cladribin im Gegensatz zu beispielsweise Siponimod, einem selektiven Sphingosin-1-phosphat-Rezeptormodulator, der in der Therapie der SPMS eingesetzt wird (Gruchot et al., 2022), nicht in der Lage zu sein scheint, die mikrogliale iNOS-Expression bzw. NO-Freisetzung nach proinflammatorischer Polarisierung zu reduzieren. Der minimale, statistisch nicht-signifikante Anstieg der relativen iNOS-Expression nach einem Tag verbunden mit dem Rückgang nach 3 Tagen, deckt sich jedoch mit der Beobachtung aus den Genexpressionsanalysen in naiven Mikrogliazellen in diesem Dissertationsprojekt, dass eine Exposition mit Cladribin zwar kurzzeitig zu einem proinflammatorischen Impuls in Mikrogliazellen führen, es im Verlauf jedoch zu einer langfristigen Modulation in Richtung eines neuroregenerativen Phänotyps der Mikrogliazellen kommen könnte. Auf diese Weise könnte Cladribin möglicherweise einen Teil seiner Wirkung in der verlaufsmodifizierenden Therapie der RRMS vermitteln.

4.2 Astrozyten

4.2.1 Cladribin reduziert die astrozytäre Zellzahl und Proliferation in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration

Astrozyten sind die größte Subpopulation der Gliazellen im ZNS und nehmen eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben wahr (Allen & Barres, 2009). Sie sind beteiligt an der Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS, der Bildung der Blut-Hirn-Schranke aber auch an neuroinflammatorischen und neuroregenerativen Prozessen im Rahmen der MS (Liddel et al., 2017; Neal et al., 2018; Joshi et al., 2019). In einem ersten Schritt erfolgte die Untersuchung möglicher zytoreduktiver und antiproliferativer Effekte von Cladribin auf Astrozyten. Dabei konnte gezeigt werden, dass Cladribin zeit- und konzentrationsabhängig die Zellzahl der Astrozyten reduziert (Abb. 15 A, A') sowie die astrozytäre Proliferation hemmt (Abb. 15 B-C). Der stärkste zytoreduktive Effekt ließ sich unter Exposition mit der hier gewählten Höchstdosis von 10 μ M Cladribin und einer Expositionsdauer von 3 Tagen beobachten (Abb. 15 A'). Hinsichtlich der ebenfalls untersuchten Proliferation anhand immunzytochemischer Färbungen gegen Ki-67, konnte die stärkste Reduktion bei Exposition der Astrozyten mit 10 μ M Cladribin nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Abb. 15 B). Nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen zeigten sich keine Unterschiede im Anteil Ki-67-positiver Astrozyten unter

Exposition zu Cladribin, zudem ist der Anteil Ki-67-positiver Astrozyten im Vergleich zur Expositionsdauer von 24 Stunden deutlich gesunken (Abb. 15 B, B'). Dies lässt vermuten, dass nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen der initiale, proliferationshemmende Effekt von Cladribin in Astrozyten nachgelassen hat und der zytoreduktive Effekt, der sich zu diesem Zeitpunkt beobachten lässt, auf eine später beginnende Induktion von Apoptose zurückzuführen sein könnte. Diese Erkenntnisse würden sich mit den bisherigen Beobachtungen in Mikrogliazellen decken, dass Cladribin zunächst antiproliferative Effekte vermittelt und erst im Verlauf zur Apoptose der Zellen führt (Singh et al., 2012), und könnten in Astrozyten im Rahmen weiterer Forschungsarbeit näher beleuchtet werden.

4.2.2 Modulation der Genexpression von naiven und proinflammatorisch polarisierten Astrozyten durch Cladribin

Zur Modulation der Genexpression oder Sekretion von naiven und proinflammatorisch polarisierten Astrozyten unter dem Einfluss von Cladribin war die Datenlage zu Beginn dieses Dissertationsprojektes gering. Es gelang nun der Nachweis, dass Cladribin *in vitro* in primären, naiven sowie mit TNF- α proinflammatorisch polarisierten Astrozyten der Ratte in der Lage ist, die Expression unterschiedlicher, im Kontext der MS stehender, mit Pro- oder Antiinflammation assoziierter Gene, zu beeinflussen. In naiven Astrozyten führte die Cladribin-Exposition in einer Konzentration von 10 μ M nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden zu einer statistisch-signifikanten Abnahme der relativen Expression der mit Antiinflammation und Regeneration assoziierten Gene IGF-1 und TGF- β (Abb. 16 A'', B''). Dies steht im Kontrast zur in Mikrogliazellen nach Exposition mit Cladribin gemessenen, statistisch signifikant erhöhten relativen Genexpression von IGF-1 (Abb. 10 A) und lässt vermuten, dass Cladribin je nach untersuchter Zellart die IGF-1-Genexpression in unterschiedlicher Art und Weise modulieren kann. In den anderen, niedrigeren Konzentrationen ließ sich kein statistisch-signifikanter Effekt auf die Expression dieser Gene detektieren (Abb. 16 A, A', B, B'). Die Ergebnisse hinsichtlich TGF- β decken sich mit den Ergebnissen von Aybar und Kollegen, die mittels ELISA-basierten Analysen keinen Effekt von Cladribin in Konzentrationen von 10 μ M bis 200 μ M auf die Sekretion von TGF- β nach 24 bis 72 Stunden in naiven sowie durch LPS proinflammatorisch polarisierten Astrozyten aus der Maus nachweisen konnten (Aybar et al., 2022). Ergebnisse dieses Dissertationsprojektes zeigten zudem, dass Cladribin die Genexpression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α in Astrozyten nicht zu

beeinflussen scheint (Abb. 17 A-A''), eine Sekretion von TNF- α durch Astrozyten konnte durch Aybar et al. zudem nicht nachgewiesen werden (Aybar et al., 2022). Das Zytokin IL-6 ist an einer ganzen Reihe von Stoffwechselprozessen beteiligt und wird im ZNS u.a. durch Astrozyten ausgeschüttet (Janssens et al., 2015). Unter physiologischen Bedingungen erfüllt es neuroprotektive Effekte, unter entzündlichen Bedingungen führt eine Dysregulation und Überexpression von IL-6 zum Voranschreiten von Demyelinisierung und Astroglieose (Van Wagoner & Benveniste, 1999). Erhöhte Spiegel von IL-6 finden sich MS Läsionen (Maimone et al., 1997). Eine Modulation des IL-6-Stoffwechsels ist ein möglicher Ansatzpunkt für immunmodulatorische Therapien, wobei eine alleinige Ausschaltung der proinflammatorischen Effekte ohne Beeinflussung der physiologischen Funktionen dieses Zytokins eine Herausforderung darstellt (Janssens et al., 2015). Mittels Genexpressionsmessungen gelang im Rahmen dieses Dissertationsprojektes der Nachweis, dass eine Exposition der naiven Astrozyten mit Cladribin in einer Konzentration von 10 μ M und einer Expositionsdauer von 3 Tagen zu einer statistisch signifikant erhöhten relativen Genexpression von IL-6 im Vergleich zur Kontrollsubstanz führte (Abb. 17 B''). Dieser Effekt war bereits nach Exposition mit Cladribin in einer geringeren Konzentration von 1 μ M nachweisbar, wenn auch statistisch nicht-signifikant (Abb. 17 B'). Nach Exposition mit 0,1 μ M Cladribin war dagegen noch kein Effekt detektierbar (Abb. 17 B). Zudem fiel auf, dass es mit steigender Konzentration von Cladribin zu einer deutlichen Zunahme der Relation der IL-6-Genexpression im Vergleich zur Kontrollsubstanz kam (Abb. 17 B-B''). Im Gegensatz zur erhöhten Genexpression von IL-6 hatte Cladribin keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion durch naive Astrozyten (Abb. 18), ein Effekt, der durch Aybar et al. ebenfalls beobachtet wurde (Aybar et al., 2022). In mit TNF- α proinflammatorisch polarisierten Astrozyten konnte ebenfalls eine erhöhte Genexpression von IL-6 nach Exposition zu TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition zu TNF- α zu beiden untersuchten Zeitpunkten detektiert werden (Abb. 20 B, B'). Auffällig ist, dass die relative IL-6-Genexpression unter Exposition mit Cladribin in der Vorstimulationsbedingung zu beiden untersuchten Zeitpunkten insgesamt höher ausfällt als in der simultanen Stimulation (Abb. 20 B, B'). Der Zeitpunkt der Exposition der proinflammatorisch polarisierten Astrozyten mit Cladribin (simultan vs. nach 24 Stunden) scheint also eine Rolle für das Ausmaß des Einflusses von Cladribin auf die IL-6-Genexpression zu spielen und es ist zudem denkbar, dass Cladribin die durch proinflammatorische Polarisierung hervorgerufene, erhöhte relative IL-6-Genexpression weiter verstärkt. Chemokin-vermittelt kommt es im Rahmen der MS zur Einwanderung von Immunzellen in das ZNS und an die Orte der Entzündung (Ambrosini et al., 2005). Mittels Genexpressionsmessungen konnte im Rahmen dieses Dissertationsprojektes für

die Chemokine-kodierenden Gene CCL5 und CXCL10 ein konzentrationsabhängiger Anstieg der relativen Expression unter Exposition mit Cladribin in Konzentrationen von 1 μ M sowie 10 μ M im Vergleich zur Kontrollsubstanz detektiert werden (Abb. 19 A', A'', B', B''), statistisch signifikant war diese Induktion jedoch nur für CXCL10 und bei einer Konzentration von 10 μ M Cladribin (Abb. 19 B''). Die in naiven Astrozyten detektierbaren Einflüsse von Cladribin auf die Expression der untersuchten Gene erreichten eine statistische Signifikanz ausschließlich nach Exposition mit Cladribin in einer Konzentration von 10 μ M, während in Mikrogliazellen Effekte bereits nach Exposition zu 0,1 μ M Cladribin detektierbar waren. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass Astrozyten geringere Mengen der DCK, dem entscheidenden Enzym in der intrazellulären Phosphorylierung und damit Aktivierung von Cladribin (Beutler, 1992), enthalten als Mikrogliazellen (Aybar et al., 2022) und daher höhere Konzentrationen notwendig sind, um eine ausreichende Akkumulation von phosphoryliertem Cladribin in der Zelle zu erreichen. Aus diesem Grund wurde für die Studien in mit TNF- α proinflammatorisch polarisierten Astrozyten eine Konzentration von 10 μ M Cladribin gewählt. Über das multifunktionale Akute-Phase-Protein PTX3 leisten Astrozyten einen Beitrag zur Integrität der Blut-Hirn-Schranke und vermitteln so Neuroprotektion (Shindo et al., 2016). Auf einen inflammatorischen Stimulus hin kommt es in zahlreichen Zellarten wie beispielsweise in Leukozyten des peripheren Blutes sowie dendritischen Zellen aber auch in Mikroglia und Astrozyten zu einem Anstieg der PTX3-Sekretion (Ummenthum et al., 2016; Wu et al., 2020). PTX-3-vermittelt kommt es außerdem durch Aktivierung des Komplementsystems zu einer Eliminierung des inflammatorischen Agens, zudem schützt PTX3 bereits geschädigte neuronale Strukturen vor einer weiteren Schädigung und reguliert Phagozytoseprozesse sowie Reparaturprozesse im entzündlich veränderten ZNS (Ummenthum et al., 2016). Eine leicht erhöhte, statistisch nicht-signifikante PTX3-Genexpression konnte im Rahmen dieses Dissertationsprojektes in Astrozyten nach Exposition mit TNF- α gezeigt werden (Abb. 20 A, A'). Nach Exposition mit TNF- α und Cladribin zum Zeitpunkt 3 Tage kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der relativen PTX3-Genexpression im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α (Abb. 20 A'). Möglicherweise ist Cladribin in der Lage, die PTX3-Genexpression in Astrozyten zu modulieren und so neuroprotektive Effekte zu vermitteln. Hinsichtlich der mit Inflammation assoziierten Gene, die im Rahmen dieses Dissertationsprojektes untersucht wurden, zeigte sich für CCL5, iNOS und VEGF-A kein detektierbarer Effekt von Cladribin auf die relative Genexpression (Abb. 21 A-C). Für das neurotoxische Protein LCN2 zeigte sich nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen ein statistisch nicht-signifikanter Anstieg in der relativen LCN2-Genexpression nach Exposition mit Cladribin und TNF- α im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α (Abb. 21 D'),

während Cladribin auf Proteinebene keinen Einfluss auf die LCN2-Sekretion von bereits proinflammatorisch polarisierten Astrozyten hatte (Abb. 21 D''). Die statistisch signifikant erhöhte, astrozytäre LCN2-Sekretion in proinflammatorisch polarisierten und zu Cladribin exponierten Astrozyten im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne TNF- α und Cladribin-Exposition lässt sich somit ausschließlich auf den proinflammatorischen Stimulus durch TNF- α zurückführen, Cladribin scheint keinen Einfluss darauf zu haben.

4.2.3 Cladribin erhöht die Genexpression des mit gliöser Narbenbildung assoziierten Transkriptionsfaktors SOX9 in naiven und proinflammatorisch polarisierten Astrozyten

Eine entscheidende Funktion der Astrozyten im Kontext der MS ist die Beteiligung an der Bildung einer gliösen Narbe. Neben positiven Effekten durch Eindämmung der entzündlichen Aktivität hat die entstandene Glianarbe jedoch auch hemmenden Einfluss auf Remyelinisierungsprozesse (Correale & Farez, 2015). Mittels Genexpressionsmessungen erfolgte die Untersuchung des Einflusses von Cladribin auf bestimmte, mit Bildung der Glianarbe assoziierter, astrozytärer Gene. Bei ACAN und BCAN handelt es sich um Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSG), die im Rahmen der gliösen Narbenbildung durch Astrozyten sekretiert werden (Feliu et al., 2020). In naiven Astrozyten konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der relativen ACAN-Genexpression unter Exposition mit Cladribin dargestellt werden (Abb. 23 A). Hinsichtlich BCAN zeigte sich dagegen in naiven Astrozyten ein statistisch signifikanter Abfall der relativen Genexpression unter Cladribin-Exposition (Abb. 23 B). Ein ähnlicher Trend in der Genexpression der verwandten Moleküle ließ sich somit nicht herausstellen, und in proinflammatorisch polarisierten Astrozyten konnte kein Effekt durch Cladribin beobachtet werden (Abb. 23 A, B). Möglicherweise ist die Richtung der Modulation der Genexpression durch Cladribin individuell für unterschiedliche CSG. In diesem Zusammenhang wäre beispielsweise eine Genexpressionsmessung des CSG Neurocan (NCAN) (McKillop et al., 2016) von weiterem Interesse. Bei SOX9 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit Beteiligung an der Regulation der Synthese der CSG ACAN, BCAN und NCAN (Gris et al., 2007; McKillop et al., 2016). Eine verringerte Expression von SOX9 resultiert in einer verringerten Sekretion der, die Neuroregeneration hemmenden CSG der Extrazellulärmatrix, die an der Bildung der gliösen Narbe maßgeblich beteiligt sind (Yuan et al., 2017). In proinflammatorisch polarisierten Astrozyten gelang für SOX9 der Nachweis eines statistisch signifikanten Rückgangs der relativen Genexpression unter Exposition mit TNF- α und Cladribin im Vergleich zur alleinigen Exposition mit TNF- α (Abb. 23 G). Dies war ebenfalls

detektierbar in naiven Astrozyten unter Exposition mit Cladribin (Abb. 23 G). Möglicherweise ist Cladribin in der Lage, über die Verringerung der Genexpression von SOX9 und daraus folgender, verringerter Sekretion der CSG den durch diese vermittelten, hemmenden Effekt auf Prozesse der Remyelinisierung zu verringern. Bedacht werden muss, dass jedoch ausschließlich für das CSG BCAN ebenfalls eine verringerte Genexpression durch Cladribin gezeigt werden konnte (Abb. 23 B). Hinsichtlich der weiteren untersuchten Gene AQP4, CHST11, CSGALNACT1 sowie XYLT konnte keine Regulation der Genexpression durch Cladribin herausgestellt werden (Abb. 23 C, E, F, H). In Zusammenschau der Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung von Genen der gliösen Narbenbildung durch Cladribin kann allenfalls von einer geringen, auf SOX9 sowie die CSG beschränkten Modulation ausgegangen werden, die auf Proteinebene weiter überprüft werden müsste. Denkbar wäre zudem eine Ausweitung der Untersuchung auf weitere, bisher in diesem Zusammenhang noch nicht untersuchte Gene, mit Assoziation zur gliösen Narbenbildung.

4.3 Limitationen der Studie und Ausblick

Die im Rahmen dieses Dissertationsprojektes erhobenen Daten stammen aus primären neonatalen Astrozyten- und Mikrogliazellkulturen der Wistar-Ratte, die einige Einschränkungen, insbesondere hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sowie den Kontext der MS, mit sich bringen. Auch wenn der entscheidende Auslöser der MS bis heute ungeklärt ist, wird von einem multifaktoriellen Erkrankungsgeschehen ausgegangen (Goodin et al., 2021), welches im Rahmen von Untersuchungen an neugeborenen Wistar-Ratten nicht vollumfänglich abgebildet werden kann. Zudem erfolgt der Therapiebeginn mit Cladribin in der RRMS nachdem das ZNS mit seinen dort ansässigen Zellarten, u.a. Mikrogliazellen und Astrozyten, bereits Monate bis hin zu Jahren unter inflammatorischem Einfluss stand. Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes wurde versucht, diesen entzündlichen Zustand durch die vorherige Stimulation mit LPS in Mikrogliazellen bzw. TNF- α in Astrozyten zu simulieren, da bekannt ist, dass diese Agenzen in der Lage sind, in den jeweiligen Zellarten einen proinflammatorischen Phänotyp zu induzieren (Liddel et al., 2017; Lively & Schlichter, 2018). Die Dauer der Exposition von Mikrogliazellen bzw. Astrozyten gegenüber LPS oder TNF- α betrug in diesem Projekt 24 Stunden. Auch wenn dadurch bereits ein inflammatorischer Phänotyp in den untersuchten Zellarten *in vitro* induziert werden konnte, lässt sich dies nur bedingt mit der entzündlichen Aktivität, der diese Zellarten *in vivo* im humanen ZNS ausgesetzt sind, vergleichen. Um eine möglichst große Nähe

zum Krankheitsbild der MS erreichen zu können, wären *in vitro* Studien mit humanen Mikrogliazellen, Astrozyten oder Ko-Kulturen notwendig, die beispielsweise *post mortem* oder im Rahmen von operativen Eingriffen gewonnen werden könnten. Es wäre daher von großem Interesse, weitere Studien insbesondere an humanen Zellen durchzuführen, die aus Patient*innen oder Körperspender*innen stammen, die an MS erkrankt sind bzw. waren. Dabei wären sowohl Experimente an Zellen aus therapienaiven sowie aus bereits mit Cladribin oder anderen Medikamenten behandelten Patient*innen interessant. Da die Verfügbarkeit und Gewinnung dieser Proben jedoch Hindernisse darstellen könnten, wären auch weitere Untersuchungen der Wirkung von Cladribin in einem *in vivo* Tiermodell, beispielsweise dem Cuprizone Modell erfolgsversprechend (Jørgensen et al., 2020; Aybar et al., 2022). Eine Untersuchung der Wirkung von Cladribin im EAE Modell der Maus lieferte bereits Ergebnisse hinsichtlich neuroprotektiver Effekte von Cladribin, wenn auch kein Nachweis einer Beeinflussung der mikroglialen oder astrozytären Aktivierung durch Cladribin gelang (Musella et al., 2013). In einer anderen *in vivo* Studie im EAE Modell der Maus konnte zudem gezeigt werden, dass Cladribin in der Lage ist, die klinischen Defizite der Mäuse zu verringern und die Infiltration von Immunzellen in das ZNS zu reduzieren (Schroeter et al., 2022).

Die im Rahmen dieses Dissertationsprojektes untersuchten Zellkulturen bestanden zudem jeweils aus einer einzigen Zellart. Es ist jedoch bekannt, dass an den im Rahmen der MS im ZNS ablaufenden Prozessen weitaus mehr unterschiedliche Zellarten beteiligt sind und dass dem Zusammenspiel und der Interaktion dieser Zellarten untereinander eine große Bedeutung zukommt (Baecher-Allan et al., 2018; Gruchot et al., 2023). Eine Untersuchung des Effektes von Cladribin innerhalb einer Ko-Kultur oder Tri-Kultur, bestehend aus Neuronen, Mikrogliazellen und Astrozyten (Goshi et al., 2020), wäre notwendig, um diese Interaktionen besser abbilden zu können. Hinzu kommt, dass das ZNS neben den zellulären Bestandteilen auch aus Komponenten der Extrazellulärmatrix besteht, auf die Cladribin Einfluss nehmen, und die ihrerseits die Wirkung von Cladribin auf Mikrogliazellen und Astrozyten beeinflussen könnten, wobei die Untersuchung dieser Zusammenhänge nicht Ziel dieses Dissertationsprojektes war.

Cladribin ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, eine entscheidende Voraussetzung dafür, seinen Effekt auf ZNS-ansässige Zellen auszuüben (Liliemark, 1997). Im Liquor erreicht die Konzentration von Cladribin mit 0,019–0,025 μM etwa 25 % der Plasmakonzentration (Warnke et al., 2012). Für die Experimente dieses Dissertationsprojektes über einen Zeitraum von ein oder drei Tagen wurden die Mikrogliazellen mit Cladribin in einer Dosis von 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM oder 10 μM exponiert, wobei die Durchführung der Genexpressionsanalysen anhand von

Mikrogliazellen erfolgte, die Cladribin in einer Dosis von 0,1 μM ausgesetzt waren. Die untersuchten Astrozyten wurden mit Cladribin in einer Dosis von 0,1 μM , 1 μM oder 10 μM für ein oder drei Tage exponiert. Singh und Kollegen wählten für ihre Untersuchungen mit Cladribin in Mikrogliazellen ähnliche Dosen von 0,01-10 μM mit einer Stimulationsdauer von 6, 12 oder 24 Stunden (Singh et al., 2012). Auch Jørgensen et al. verwendeten identische Stimulationsdosen und untersuchten zudem den Effekt einer geringeren Dosis von 0,01 μM Cladribin (Jørgensen et al., 2020). Die verwendeten Konzentrationen, denen die Zellen ausgesetzt waren, lagen deutlich über der Konzentration von Cladribin, die im Liquor erreicht werden. Die DCK ist als Enzym entscheidend beteiligt an der Phosphorylierung von 2-CdA zu 2-Cd-AMP, dem ersten Schritt in der intrazellulären Umwandlung von 2-CdA in seine aktive Form 2-Cd-ATP (s. Abb. 3) (Beutler, 1992). In Nagetieren ist die Aktivität der DCK verringert gegenüber der Aktivität im Menschen (Johansson & Karlsson, 1995), weswegen davon ausgegangen wird, dass die verwendeten Konzentrationen (0,1 μM , 1 μM) äquivalent zu denen im Liquor sind (Jørgensen et al., 2020). Es lässt sich somit nur annehmen, dass es sich bei den in diesem Dissertationsprojekt verwendeten Konzentrationen von Cladribin um solche handelt, die *in vitro* in Mikrogliazellen und Astrozyten der Ratte ähnliche Effekte ausüben, wie die *in vivo* im humanen Liquor erreichte Konzentration auf humane Mikrogliazellen und Astrozyten. Neben diesen Beobachtungen muss ebenfalls bedacht werden, dass die im Liquor vorliegende Konzentration nicht unbedingt mit der im Parenchym erreichten Konzentration übereinstimmt und die Übertragbarkeit zwischen Ergebnissen aus *in vitro* Studien auf die im Gehirn von MS-Patient*innen unter Therapie mit Cladribin vorherrschende Situation erschwert. Neben der gewählten Konzentration zur Stimulation der Mikrogliazellen und Astrozyten spielt auch der zeitliche Aspekt der Cladribin-Gabe eine Rolle für die Vergleichbarkeit des durchgeführten Dissertationsprojektes mit dem Einsatz von Cladribin in der Therapie der RRMS im Menschen. So erfolgte die Gabe von Cladribin in den untersuchten Konzentrationen unmittelbar auf die entsprechenden Zellkulturen, die Auswertung erfolgte nach 1 oder 3 Tagen. Dagegen erfolgt die Gabe von Cladribin als verlaufsmodifizierende Therapie der MS *per os* in zwei aufeinanderfolgenden Wochen mit Wiederholung im darauffolgenden Jahr (Merck, 2017), wobei die Effekte dieser zweizeitigen Gabe langanhaltend sind und eine selektive Immunrekonstitution als Ziel haben (Boyko & Boyko, 2018). Dies lässt sich in einer Zellkultur aufgrund der begrenzten Überlebensdauer der Mikrogliazellen und Astrozyten jedoch nicht abbilden. Insgesamt fällt zudem auf, dass im Rahmen dieses Dissertationsprojektes statistisch nicht-signifikante Genexpressionsmessungen dominierten, wobei dies möglicherweise

durch eine gezieltere Auswahl der zu messenden Transkripte, beispielsweise unter Nutzung einer Transkriptomanalyse (*RNA-Seq*) gelingen könnte.

Neben den erwähnten Limitationen der hier präsentierten Studie und den daraus resultierenden weiteren Forschungsansätzen, muss erwähnt werden, dass sich die meiste Forschungsarbeit zur Wirkung von Cladribin auf ortsansässige Zellen des ZNS auf die Zellart der Mikroglia beschränkt (Singh et al., 2012; Jørgensen et al., 2020; Aybar et al., 2022; Medeiros-Furquim et al., 2022). Zu den Effekten von Cladribin auf Astrozyten (Aybar et al., 2022) sowie Oligodendrozyten oder deren Vorläuferzellen (Jank et al., 2024) sind die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse gering und bedürfen weiterer Forschungsarbeit.

4.4 Schlussfolgerung

Das Purinanalogon Cladribin reduziert in der verlaufsmodifizierenden Therapie der hochaktiven RRMS als Teil der Immunrestitutions-Therapie nachweislich Schubrate und Behinderungszunahme (Giovannoni et al., 2021; Giovannoni & Mathews, 2022), bei günstigem Nutzen-Risiko-Profil, guter Therapieadhärenz und langanhaltender Wirkung insbesondere auf Lymphozyten (Siddiqui et al., 2018; Giovannoni & Mathews, 2022; Holm Hansen et al., 2024). Im Rahmen durchgeführter Studien an anderen Zellpopulationen erhärteten sich die Hinweise darauf, dass die Wirkungsweise von Cladribin über die reine Lymphozytendepletion hinausgeht (Holm Hansen et al., 2024) und auch auf ZNS-ansässige Zellen Effekte ausüben könnte (Singh et al., 2012; Aybar et al., 2022). Im Rahmen dieses Dissertationsprojektes konnte diese Annahme weiter untermauert werden. Cladribin ist in der Lage, zeit- und konzentrationsabhängig die mikrogliale sowie astrozytäre Zellzahl zu reduzieren und die astrozytäre Proliferation zu hemmen. In naiven Mikrogliazellen führt Cladribin zu einer signifikant erhöhten Genexpression von mit Regeneration und Phagozytose von Myelindebris assoziierten Genen bei kurzfristigem proinflammatorischem Impuls. Dies lässt vermuten, dass Cladribin langfristig die bei der MS stattfindenden neurodegenerativen Prozesse zusätzlich hemmen könnte, ein wesentlicher Aspekt für den es in der heutigen Therapie der MS kein zugelassenes Medikament gibt. In Astrozyten beeinflusst Cladribin die Genexpression von sowohl mit Pro- als auch mit Antiinflammation und glöser Narbenbildung im Kontext der MS assoziierter Gene, eine einheitliche Richtung der Modulation dieser Zellart ist in der hier präsentierten Studie allerdings nicht zu erkennen und bedarf weiterer Forschungsarbeit, um die Therapie der MS stetig im Sinne der betroffenen Patient*innen zu verbessern und weiterzuentwickeln.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ALJUMAH, M., ALKHAWAJAH, M. M., QURESHI, S., AL-THUBAITI, I., AYOUB, O., BOHLEGA, S. A., BUSHNAG, A., CUPLER, E., DAIF, A., EL BOGHDADY, A., HASSAN, A., AL MALIK, Y., SAEEDI, J., AL-SHAMRANY, F., SHOSHA, E., & RIECKMANN, P. (2020). Cladribine Tablets and Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Pragmatic, Narrative Review of What Physicians Need to Know. *Neurol Ther*, 9 (1), 11-23.
- ALLEN, N. J., & BARRES, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457 (7230), 675-677.
- ALLIOT, F., GODIN, I., & PESSAC, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Research: Developmental Brain Research*, 117 (2), 145-152.
- ALMOLDA, B., GONZALEZ, B., & CASTELLANO, B. (2011). Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16 (3), 1157-1171.
- ALOISI, F., RIA, F., & ADORINI, L. (2000). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology Today*, 21 (3), 141-147.
- AMBROSINI, E., REMOLI, M. E., GIACOMINI, E., ROSICARELLI, B., SERAFINI, B., LANDE, R., ALOISI, F., & COCCIA, E. M. (2005). Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64 (8), 706-715.
- AMMOSCATO, F., WAFI, M., SKONIECZNA, J., BESTWICK, J., MONERO, R., ANDREWS, M., DE TRANE, S., HOLDEN, D., ADAMS, A., BIANCHI, L., TURNER, B., MARTA, M., SCHMIERER, K., BAKER, D., GIOVANNONI, G., & GNANAPAVAN, S. (2024). Cladribine tablets in relapsing-remitting multiple sclerosis preferentially target B-cells. *Clinical Immunology*, 269, 110380.
- ANDRIEZEN, W. L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *British Medical Journal*, 2 (1700), 227-230.
- ARGAW, A. T., ASP, L., ZHANG, J., NAVRAZHINA, K., PHAM, T., MARIANI, J. N., MAHASE, S., DUTTA, D. J., SETO, J., KRAMER, E. G., FERRARA, N., SOFRONIEW, M. V., & JOHN, G. R. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *Journal of Clinical Investigation*, 122 (7), 2454-2468.
- ASKEW, K., LI, K., OLMOS-ALONSO, A., GARCIA-MORENO, F., LIANG, Y., RICHARDSON, P., TIPTON, T., CHAPMAN, M. A., RIECKEN, K., BECCARI, S., SIERRA, A., MOLNÁR, Z., CRAGG, M. S., GARASCHUK, O., PERRY, V. H., & GOMEZ-NICOLA, D. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Reports*, 18 (2), 391-405.
- AYBAR, F., JULIA PEREZ, M., SILVINA MARCORA, M., EUGENIA SAMMAN, M., MARRODAN, M., MARÍA PASQUINI, J., & CORREALE, J. (2022). 2-Chlorodeoxyadenosine (Cladribine) preferentially inhibits the biological activity of microglial cells. *International Immunopharmacology*, 105, 108571.
- AZIMI, G., RANJBARAN, F., ARSANG-JANG, S., GHAFOURI-FARD, S., MAZDEH, M., SAYAD, A., & TAHERI, M. (2020). Upregulation of VEGF-A and correlation between VEGF-A and FLT-1 expressions in Iranian multiple sclerosis patients. *Neurological Sciences*, 41 (6), 1459-1465.
- BAECHER-ALLAN, C., KASKOW, B. J., & WEINER, H. L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, 97 (4), 742-768.
- BANWELL, B., GIOVANNONI, G., HAWKES, C., & LUBLIN, F. (2013). Editors' welcome and a working definition for a multiple sclerosis cure. *Mult Scler Relat Disord*, 2 (2), 65-67.
- BERRY, M., MAXWELL, W. L., LOGAN, A., MATHEWSON, A., MCCONNELL, P., ASHHURST, D. E., & THOMAS, G. H. (1983). Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochirurgica. Supplementum*, 32, 31-53.
- BERTRAMS, J., & KUWERT, E. (1972). HL-A antigen frequencies in multiple sclerosis. Significant increase of HL-A3, HL-A10 and W5, and decrease of HL-A12. *European Neurology*, 7 (1), 74-78.
- BEUTLER, E. (1992). Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet*, 340 (8825), 952-956.
- BI, F., HUANG, C., TONG, J., QIU, G., HUANG, B., WU, Q., LI, F., XU, Z., BOWSER, R., XIA, X. G., & ZHOU, H. (2013). Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (10), 4069-4074.
- BITSCH, A., WEGENER, C., DA COSTA, C., BUNKOWSKI, S., REIMERS, C. D., PRANGE, H. W., & BRÜCK, W. (1999). Lesion development in Marburg's type of acute multiple sclerosis: from inflammation to demyelination. *Multiple Sclerosis*, 5 (3), 138-146.
- BJORNEVIK, K., CORTESE, M., HEALY, B. C., KUHLE, J., MINA, M. J., LENG, Y., ELLEDGE, S. J., NIEBUHR, D. W., SCHER, A. I., MUNGER, K. L., & ASCHERIO, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375 (6578), 296-301.
- BLANDFORD, S. N., FUDGE, N. J., & MOORE, C. S. (2023). CXCL10 Is Associated with Increased Cerebrospinal Fluid Immune Cell Infiltration and Disease Duration in Multiple Sclerosis. *Biomolecules*, 13 (8).
- BOCHE, D., PERRY, V. H., & NICOLL, J. A. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39 (1), 3-18.
- BORST, K., DUMAS, A. A., & PRINZ, M. (2021). Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*, 54 (10), 2194-2208.
- BOYKO, A. N., & BOYKO, O. V. (2018). Cladribine tablets' potential role as a key example of selective immune reconstitution therapy in multiple sclerosis. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 8, 35-44.
- BRADL, M., & LASSMANN, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119 (1), 37-53.
- BROWN, J. W. L., COLES, A., HORAKOVA, D., HAVRDOVA, E., IZQUIERDO, G., PRAT, A., GIRARD, M., DUQUETTE, P., TROJANO, M., LUGARESI, A., BERGAMASCHI, R., GRAMMOND, P., ALROUGHANI, R., HUPPERTS, R., MCCOMBE, P., VAN PESCH, V., SOLA, P., FERRARO, D., GRAND'MAISON, F., ROBERTSON, N. (2019). Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA*, 321 (2), 175-187.
- BROWNLEE, W. J., HAGHIKIA, A., HAYWARD, B., WASER, N., KAYANIYIL, S., KHAN, Z., DUNCAN, J., MILLAR, S., & HARTY, G. T. (2023). Comparative effectiveness of cladribine tablets versus fingolimod in the treatment of highly active multiple sclerosis: A real-world study. *Mult Scler Relat Disord*, 76, 104791.
- BRUDEK, T., CHRISTENSEN, T., AAGAARD, L., PETERSEN, T., HANSEN, H. J., & MØLLER-LARSEN, A. (2009). B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology*, 6, 104.
- BSIBSI, M., PERSON-DEEN, C., VERWER, R. W., MEEUWSEN, S., RAVID, R., & VAN NOORT, J. M. (2006). Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia*, 53 (7), 688-695.
- BUNGE, R. P. (1968). Glial cells and the central myelin sheath. *Physiological Reviews*, 48 (1), 197-251.
- CARSON, D. A., KAYE, J., & SEEGLER, J. E. (1977). Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency: possible role of nucleoside kinase(s). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12), 5677-5681.
- CARSON, D. A., WASSON, D. B., TAETLE, R., & YU, A. (1983). Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood*, 62 (4), 737-743.
- CHAI, Z., MA, T., LI, Y., CHEN, Q., KANG, Y., SUN, J., PENG, T., WANG, N., YU, C., WANG, L., HOU, X., WANG, W., & WANG, Y. (2023). Inhibition of inflammatory factor TNF- α by ferrostatin-1 in microglia regulates necroptosis of oligodendrocyte precursor cells. *Neuroreport*, 34 (11), 583-591.
- CHERRY, J. D., OLSCHOWKA, J. A., & O'BANION, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 98.
- CHOI, S. S., LEE, H. J., LIM, I., SATOH, J., & KIM, S. U. (2014). Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PloS One*, 9(4), e92325.
- COLTON, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4 (4), 399-418.
- COMI, G., COOK, S., GIOVANNONI, G., RIECKMANN, P., SØRENSEN, P. S., VERMERSCH, P., GALAZKA, A., NOLTING, A., HICKING, C., & DANGOND, F. (2019). Effect of

- cladribine tablets on lymphocyte reduction and repopulation dynamics in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*, 29, 168-174.
- COMINI-FROTA, E. R., TEIXEIRA, A. L., ANGELO, J. P., ANDRADE, M. V., BRUM, D. G., KAIMEN-MACIEL, D. R., FOSS, N. T., & DONADI, E. A. (2011). Evaluation of serum levels of chemokines during interferon- β treatment in multiple sclerosis patients: a 1-year, observational cohort study. *CNS Drugs*, 25 (11), 971-981.
- CORREALE, J., & FAREZ, M. F. (2015). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Frontiers in Neurology*, 6, 180.
- CORTESE, R., TESTA, G., ASSOGNA, F., & DE STEFANO, N. (2024). Magnetic Resonance Imaging Evidence Supporting the Efficacy of Cladribine Tablets in the Treatment of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 38 (4), 267-279.
- CROLL, S. D., RANSOHOFF, R. M., CAI, N., ZHANG, Q., MARTIN, F. J., WEI, T., KASSELMAN, L. J., KINTNER, J., MURPHY, A. J., YANCOPOULOS, G. D., & WIEGAND, S. J. (2004). VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Experimental Neurology*, 187 (2), 388-402.
- DE ROBERTIS, E., GERSCHENFELD, H. M., & WALD, F. (1958). Cellular mechanism of myelination in the central nervous system. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4 (5), 651-656.
- DE STEFANO, N., GIORGIO, A., BATTAGLINI, M., DE LEUCIO, A., HICKING, C., DANGOND, F., GIOVANNONI, G., & SORMANI, M. P. (2018). Reduced brain atrophy rates are associated with lower risk of disability progression in patients with relapsing multiple sclerosis treated with cladribine tablets. *Multiple Sclerosis*, 24 (2), 222-226.
- DEAN, G. (1967). Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *British Medical Journal*, 2(5554), 724-730. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5554.724>
- DEAN, G., & KURTZKE, J. F. (1971). On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *British Medical Journal*, 3 (5777), 725-729.
- DEL RIO-HORTEGA. (1932). Microglia. W. Penfield (ed.), *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. P. B. Hoeber, New York, N.Y., 483-534.
- DEMMINGS, M. D., DA SILVA CHAGAS, L., TRAETTA, M. E., RODRIGUES, R. S., ACUTAIN, M. F., BARYKIN, E., DATUSALIA, A. K., GERMAN-CASTELAN, L., MATTERA, V. S., MAZENGENYA, P., SKOUG, C., & UMEMORI, H. (2025). (Re)building the nervous system: A review of neuron-glia interactions from development to disease. *Journal of Neurochemistry*, 169(1), e16258.
- DISANTO, G., ZECCA, C., MACLACHLAN, S., SACCO, R., HANDUNNETTHI, L., MEIER, U. C., SIMPSON, A., MCDONALD, L., ROSSI, A., BENKERT, P., KUHLE, J., RAMAGOPALAN, S. V., & GOBBI, C. (2018). PRODROMAL SYMPTOMS OF MULTIPLE SCLEROSIS IN PRIMARY CARE. *Annals of Neurology*, 83 (6), 1162-1173.
- ESCARTIN, C., GALEA, E., LAKATOS, A., O'CALLAGHAN, J. P., PETZOLD, G. C., SERRANO-POZO, A., STEINHÄUSER, C., VOLTERRA, A., CARMIGNOTO, G., AGARWAL, A., ALLEN, N. J., ARAQUE, A., BARBEITO, L., BARZILAI, A., BERGLES, D. E., BONVENTO, G., BUTT, A. M., CHEN, W. T., COHEN-SALMON, M.,...VERKHRATSKY, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24 (3), 312-325.
- ESTEY, E. H., KURZROCK, R., KANTARJIAN, H. M., O'BRIEN, S. M., MCCREDIE, K. B., BERAN, M., KOLLER, C., KEATING, M. J., HIRSCH-GINSBERG, C., HUH, Y. O., & ET AL. (1992). Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *Blood*, 79 (4), 882-887.
- EUROPÄISCHE ARZNEIMITTEL AGENTUR. (2017). Mavenclad product information.
- FAWCETT, J. W., & ASHER, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*, 49 (6), 377-391.
- FELIU, A., MESTRE, L., CARRILLO-SALINAS, F. J., YONG, V. W., MECHA, M., & GUAZA, C. (2020). 2-arachidonoylglycerol reduces chondroitin sulphate proteoglycan production by astrocytes and enhances oligodendrocyte differentiation under inhibitory conditions. *Glia*, 68 (6), 1255-1273.
- FILIPPI, M., PREZIOSA, P., BANWELL, B. L., BARKHOF, F., CICCARELLI, O., DE STEFANO, N., GEURTS, J. J. G., PAUL, F., REICH, D. S., TOOSY, A. T., TRABOULSEE, A., WATTJES, M. P., YOUSRY, T. A., GASS, A., LUBETZKI, C., WEINSHENKER, B. G., & ROCCA, M. A. (2019). Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain*, 142 (7), 1858-1875.

- FISHER, E., RUDICK, R. A., SIMON, J. H., CUTTER, G., BAIER, M., LEE, J. C., MILLER, D., WEINSTOCK-GUTTMAN, B., MASS, M. K., DOUGHERTY, D. S., & SIMONIAN, N. A. (2002). Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. *Neurology*, 59 (9), 1412-1420.
- FRANKLIN, R. J. M., & FFRENCH-CONSTANT, C. (2017). Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nature Reviews: Neuroscience*, 18 (12), 753-769.
- GAUTIER, E. L., SHAY, T., MILLER, J., GRETER, M., JAKUBZICK, C., IVANOV, S., HELFT, J., CHOW, A., ELPEK, K. G., GORDONOV, S., MAZLOOM, A. R., MA'AYAN, A., CHUA, W. J., HANSEN, T. H., TURLEY, S. J., MERAD, M., & RANDOLPH, G. J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, 13 (11), 1118-1128.
- GENIS, L., DÁVILA, D., FERNANDEZ, S., POZO-RODRIGÁLVAREZ, A., MARTÍNEZ-MURILLO, R., & TORRES-ALEMAN, I. (2014). Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Res*, 3, 28.
- GIOVANNONI, G., COMI, G., COOK, S., RAMMOHAN, K., RIECKMANN, P., SOELBERG SØRENSEN, P., VERMERSCH, P., CHANG, P., HAMLETT, A., MUSCH, B., & GREENBERG, S. J. (2010). A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 362 (5), 416-426.
- GIOVANNONI, G., COMI, G., RAMMOHAN, K., RIECKMANN, P., DANGOND, F., KELLER, B., JACK, D., & VERMERSCH, P. (2021). Long-Term Disease Stability Assessed by the Expanded Disability Status Scale in Patients Treated with Cladribine Tablets 3.5 mg/kg for Relapsing Multiple Sclerosis: An Exploratory Post Hoc Analysis of the CLARITY and CLARITY Extension Studies. *Advances in Therapy*, 38 (9), 4975-4985.
- GIOVANNONI, G., & MATHEWS, J. (2022). Cladribine Tablets for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Clinician's Review. *Neurol Ther*, 11(2), 571-595.
- GOLDBERG, P. (1974). Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence. *International Journal of Environmental Studies*, 6 (1), 19-27.
- GOLDMANN, T., & PRINZ, M. (2013). Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 208093.
- GÓMEZ MORILLAS, A., BESSON, V. C., & LEROUET, D. (2021). Microglia and Neuroinflammation: What Place for P2RY12? *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (4).
- GOODIN, D. S., KHANKHANIAN, P., GOURRAUD, P. A., & VINCE, N. (2021). The nature of genetic and environmental susceptibility to multiple sclerosis. *PloS One*, 16 (3), e024615.
- GORDON, S., & TAYLOR, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews: Immunology*, 5 (12), 953-964.
- GOSHI, N., MORGAN, R. K., LEIN, P. J., & SEKER, E. (2020). A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 17 (1), 155.
- GOWERS, W. R. (1897). The Neuron and Disease. *Hospital (Lond 1886)*, 23 (579), 78.
- GREER, J. M., & MCCOMBE, P. A. (2011). Role of gender in multiple sclerosis: Clinical effects and potential molecular mechanisms. *Journal of Neuroimmunology*, 234 (1), 7-18.
- GRIFFITHS, T. D., & NEWMAN, P. K. (1994). Steroids in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 19 (4), 219-222.
- GRIS, P., TIGHE, A., LEVIN, D., SHARMA, R., & BROWN, A. (2007). Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *Glia*, 55 (11), 1145-1155.
- GRUCHOT, J., LEIN, F., LEWEN, I., REICHE, L., WEYERS, V., PETZSCH, P., GÖTTLE, P., KÖHRER, K., HARTUNG, H. P., KÜRY, P., & KREMER, D. (2022). Siponimod Modulates the Reaction of Microglial Cells to Pro-Inflammatory Stimulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (21).
- GRUCHOT, J., LEWEN, I., DIETRICH, M., REICHE, L., SINDI, M., HECKER, C., HERRERO, F., CHARVET, B., WEBER-STADLBAUER, U., HARTUNG, H. P., ALBRECHT, P., PERRON, H., MEYER, U., & KÜRY, P. (2023). Transgenic expression of the HERV-W envelope protein leads to polarized glial cell populations and a neurodegenerative environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(38), e2308187120.
- GRUCHOT, J., WEYERS, V., GÖTTLE, P., FÖRSTER, M., HARTUNG, H. P., KÜRY, P., & KREMER, D. (2019). The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis. *Cells*, 8 (8).

- GRUT, V., BISTRÖM, M., SALZER, J., STRIDH, P., JONS, D., GUSTAFSSON, R., FOGDELL-HAHN, A., HUANG, J., BUTT, J., LINDAM, A., ALONSO-MAGDALENA, L., BERGSTRÖM, T., KOCKUM, I., WATERBOER, T., OLSSON, T., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K., ANDERSEN, O., NILSSON, S., & SUNDSTRÖM, P. (2024). Human herpesvirus 6A and axonal injury before the clinical onset of multiple sclerosis. *Brain*, 147 (1), 177-185.
- GUERRERO-GARCÍA, J. J. (2020). The role of astrocytes in multiple sclerosis pathogenesis. *Neurologia (Engl Ed)*, 35 (6), 400-408.
- HALONEN, S. K., WOODS, T., MCINNERNEY, K., & WEISS, L. M. (2006). Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 175 (1-2), 19-30.
- HANISCH, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40 (2), 140-155.
- HANSSON, E., & RÖNNBÄCK, L. (1995). Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB Journal*, 9 (5), 343-350.
- HASANPOUR DEHKORDI, A. (2016). Influence of yoga and aerobics exercise on fatigue, pain and psychosocial status in patients with multiple sclerosis: a randomized trial. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 56 (11), 1417-1422.
- HAUSER, S. L., & CREE, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *American Journal of Medicine*, 133(12), 1380-1390.e1382.
- HEALY, L. M., JANG, J. H., WON, S. Y., LIN, Y. H., TOUIL, H., ALJARALLAH, S., BAR-OR, A., & ANTEL, J. P. (2017). MerTK-mediated regulation of myelin phagocytosis by macrophages generated from patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 4 (6), e402.
- HEALY, L. M., PERRON, G., WON, S. Y., MICHELL-ROBINSON, M. A., REZK, A., LUDWIN, S. K., MOORE, C. S., HALL, J. A., BAR-OR, A., & ANTEL, J. P. (2016). MerTK Is a Functional Regulator of Myelin Phagocytosis by Human Myeloid Cells. *Journal of Immunology*, 196 (8), 3375-3384.
- HEDSTRÖM, A. K., OLSSON, T., & ALFREDSSON, L. (2016). Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 22 (8), 1021-1026.
- HEDSTRÖM, A. K., OLSSON, T., KOCKUM, I., HILLERT, J., & ALFREDSSON, L. (2020). Low sun exposure increases multiple sclerosis risk both directly and indirectly. *Journal of Neurology*, 267 (4), 1045-1052.
- HEMMER B., GEHRING K. ET AL. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie, 2024, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 01.10.2024)
- HERMANN, R., KARLSSON, M. O., NOVAKOVIC, A. M., TERRANOVA, N., FLUCK, M., & MUNAFO, A. (2019). The Clinical Pharmacology of Cladribine Tablets for the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis. *Clinical Pharmacokinetics*, 58 (3), 283-297.
- HERMANN, R., KRAJCSI, P., FLUCK, M., SEITHEL-KEUTH, A., BYTYQI, A., GALAZKA, A., & MUNAFO, A. (2021). Review of Transporter Substrate, Inhibitor, and Inducer Characteristics of Cladribine. *Clinical Pharmacokinetics*, 60 (12), 1509-1535.
- HERTZ, L. (1965). Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal--neuroglial--neuronal impulse transmission system. *Nature*, 206 (989), 1091-1094.
- HICKMAN, S., IZZY, S., SEN, P., MORSETT, L., & EL KHOURY, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21 (10), 1359-1369.
- HICKMAN, S. E., KINGERY, N. D., OHSUMI, T. K., BOROWSKY, M. L., WANG, L. C., MEANS, T. K., & EL KHOURY, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16 (12), 1896-1905.
- HOLLEY, M. M., ZHANG, Y., LEHRMANN, E., WOOD, W. H., BECKER, K. G., & KIELIAN, T. (2012). Toll-like receptor 2 (TLR2)-TLR9 crosstalk dictates IL-12 family cytokine production in microglia. *Glia*, 60 (1), 29-42.
- HOLM HANSEN, R., VON ESSEN, M. R., MAHLER, M. R., COBANOVIC, S., BINKO, T. S., & SELLEBJERG, F. (2023). Cladribine Effects on T and B Cells and T Cell Reactivity in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, 94 (3), 518-530.
- HOLM HANSEN, R., VON ESSEN, M. R., REITH MAHLER, M., COBANOVIC, S., & SELLEBJERG, F. (2024). Sustained effects on immune cell subsets and autoreactivity in multiple sclerosis patients treated with oral cladribine. *Frontiers in Immunology*, 15, 1327672.

- IGARASHI, M., TAKEUCHI, K., & SUGIYAMA, S. (2018). Roles of CSGalNAcT1, a key enzyme in regulation of CS synthesis, in neuronal regeneration and plasticity. *Neurochemistry International*, 119, 77-83.
- INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM. (2019). Multiple Sclerosis Genomic Map implicates peripheral immune cells & microglia in susceptibility. *Science* 365.
- IRELAND, S. J., MONSON, N. L., & DAVIS, L. S. (2015). Seeking balance: Potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL-6 and IL-10. *Cytokine*, 73 (2), 236-244.
- J. CRUVEILHIER. (1842). *Pathological anatomy of the human body vol. 21829*
- JACOBS, B. M., AMMOSCATO, F., GIOVANNONI, G., BAKER, D., & SCHMIERER, K. (2018). Cladribine: mechanisms and mysteries in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 89 (12), 1266-1271.
- JALOSINSKI, M., KAROLCZAK, K., MAZUREK, A., & GLABINSKI, A. (2008). The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 118 (2), 120-125.
- JANK, L., CATENACCI, R. B., MINNEY, V., GALLEGUILLOS, D., & CALABRESI, P. A. (2024). Pharmacological modulation of inflammatory oligodendrocyte progenitor cells using three multiple sclerosis disease modifying therapies in vitro. *Neurotherapeutics*, 21 (4), e00379.
- JANSSENS, K., SLAETS, H., & HELLINGS, N. (2015). Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351, 52-60.
- JOHANSSON, M., & KARLSSON, A. (1995). Differences in kinetic properties of pure recombinant human and mouse deoxycytidine kinase. *Biochemical Pharmacology*, 50 (2), 163-168.
- JØRGENSEN, L., HYRLOV, K. H., ELKJAER, M. L., WEBER, A. B., PEDERSEN, A. E., SVENNINGSSEN Å, F., & ILLES, Z. (2020). Cladribine modifies functional properties of microglia. *Clin Exp Immunol*, 201 (3), 328-340.
- JOSHI, A. U., MINHAS, P. S., LIDDELOW, S. A., HAILESELASSIE, B., ANDREASSON, K. I., DORN, G. W., 2ND, & MOCHLY-ROSEN, D. (2019). Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 22 (10), 1635-1648.
- JUNG, B. K., PARK, Y., YOON, B., BAE, J. S., HAN, S. W., HEO, J. E., KIM, D. E., & RYU, K. Y. (2023). Reduced secretion of LCN2 (lipocalin 2) from reactive astrocytes through autophagic and proteasomal regulation alleviates inflammatory stress and neuronal damage. *Autophagy*, 19(8), 2296-2317.
- KAMERMANS, A., PLANTING, K. E., JALINK, K., VAN HORSSSEN, J., & DE VRIES, H. E. (2019). Reactive astrocytes in multiple sclerosis impair neuronal outgrowth through TRPM7-mediated chondroitin sulfate proteoglycan production. *Glia*, 67 (1), 68-77.
- KARVE, I. P., TAYLOR, J. M., & CRACK, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*, 173 (4), 692-702.
- KAVALIUNAS, A., MANOUCHEHRINIA, A., STAWIARZ, L., RAMANUJAM, R., AGHOLME, J., HEDSTRÖM, A. K., BEIKI, O., GLASER, A., & HILLERT, J. (2017). Importance of early treatment initiation in the clinical course of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 23 (9), 1233-1240.
- KERKERING, J., MUINJONOV, B., ROSIEWICZ, K. S., DIECKE, S., BIESE, C., SCHIWECK, J., CHIEN, C., ZOCHOLL, D., CONRAD, T., PAUL, F., ALISCH, M., & SIFFRIN, V. (2023). iPSC-derived reactive astrocytes from patients with multiple sclerosis protect cocultured neurons in inflammatory conditions. *Journal of Clinical Investigation*, 133 (13).
- KERMODE, A. G., THOMPSON, A. J., TOFTS, P., MACMANUS, D. G., KENDALL, B. E., KINGSLEY, D. P., MOSELEY, I. F., RUDGE, P., & MCDONALD, W. I. (1990). Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain*, 113 (Pt 5), 1477-1489.
- KIM, W., & PATSOPOULOS, N. A. (2022). Genetics and functional genomics of multiple sclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 44 (1), 63-79.
- KIMELBERG, H. K. (1995). Receptors on astrocytes--what possible functions? *Neurochemistry International*, 26 (1), 27-40.
- KOROS, C., IOANNIDIS, A., ACQUAVIVA, T., ZOGA, M., NIKOLAOU, C., CHATZIPANAGIOTOU, S., KOSSYVAKIS, A., & ANAGNOSTOULI, M. (2014). HSV1 and 2 detection in the CSF of multiple sclerosis patients by real-time PCR. *In Vivo*, 28 (6), 1201-1205.

- KORSEN, M., BRAGADO ALONSO, S., PEIX, L., BRÖKER, B. M., & DRESSEL, A. (2015). Cladribine Exposure Results in a Sustained Modulation of the Cytokine Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS One*, 10 (6), e0129182.
- KREMER, D., AKTAS, O., HARTUNG, H. P., & KÜRY, P. (2011). The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Annals of Neurology*, 69 (4), 602-618.
- KREMER, D., GRUCHOT, J., WEYERS, V., OLDEMEIER, L., GÖTTLE, P., HEALY, L., HO JANG, J., KANG, T. X. Y., VOLSKO, C., DUTTA, R., TRAPP, B. D., PERRON, H., HARTUNG, H. P., & KÜRY, P. (2019). pHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116 (30), 15216-15225.
- KREUTZBERG, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19 (8), 312-318.
- KRZISCH, M., TEMPRANA, S. G., MONGIAT, L. A., ARMIDA, J., SCHMUTZ, V., VIRTANEN, M. A., KOCHER-BRAISSANT, J., KRAFTSIK, R., VUTSKITS, L., CONZELMANN, K. K., BERGAMI, M., GAGE, F. H., SCHINDER, A. F., & TONI, N. (2015). Pre-existing astrocytes form functional perisynaptic processes on neurons generated in the adult hippocampus. *Brain Structure & Function*, 220 (4), 2027-2042.
- KUHN, S., GRITTI, L., CROOKS, D., & DOMBROWSKI, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, 8 (11).
- KURTZKE, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33 (11), 1444-1452.
- LABANDEIRA-GARCIA, J. L., COSTA-BESADA, M. A., LABANDEIRA, C. M., VILLAR-CHEDA, B., & RODRÍGUEZ-PÉREZ, A. I. (2017). Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 365.
- LAMPRON, A., LAROCHELLE, A., LAFLAMME, N., PRÉFONTAINE, P., PLANTE, M. M., SÁNCHEZ, M. G., YONG, V. W., STYS, P. K., TREMBLAY, M., & RIVEST, S. (2015). Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *Journal of Experimental Medicine*, 212 (4), 481-495.
- LEE, M. A., SMITH, S., PALACE, J., NARAYANAN, S., SILVER, N., MINICUCCI, L., FILIPPI, M., MILLER, D. H., ARNOLD, D. L., & MATTHEWS, P. M. (1999). Spatial mapping of T2 and gadolinium-enhancing T1 lesion volumes in multiple sclerosis: evidence for distinct mechanisms of lesion genesis? *Brain*, 122 (Pt 7), 1261-1270.
- LEE, S., PARK, J. Y., LEE, W. H., KIM, H., PARK, H. C., MORI, K., & SUK, K. (2009). Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *Journal of Neuroscience*, 29 (1), 234-249.
- LI, L., ZHANG, H., VARRIN-DOYER, M., ZAMVIL, S. S., & VERKMAN, A. S. (2011). Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation. *FASEB Journal*, 25(5), 1556-1566.
- LIDDELOW, S. A., GUTTENPLAN, K. A., CLARKE, L. E., BENNETT, F. C., BOHLEN, C. J., SCHIRMER, L., BENNETT, M. L., MÜNCH, A. E., CHUNG, W. S., PETERSON, T. C., WILTON, D. K., FROUIN, A., NAPIER, B. A., PANICKER, N., KUMAR, M., BUCKWALTER, M. S., ROWITCH, D. H., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M.,...BARRES, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541 (7638), 481-487.
- LILJEMARK, J. (1997). The clinical pharmacokinetics of cladribine. *Clinical Pharmacokinetics*, 32 (2), 120-131.
- LINNERBAUER, M., WHEELER, M. A., & QUINTANA, F. J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108 (4), 608-622.
- LISAK, R. P., BENJAMINS, J. A., NEDELKOSKA, L., BARGER, J. L., RAGHEB, S., FAN, B., OUAMARA, N., JOHNSON, T. A., RAJASEKHARAN, S., & BAR-OR, A. (2012). Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 246 (1-2), 85-95.
- LIU, W., TASO, O., WANG, R., BAYRAM, S., GRAHAM, A. C., GARCIA-REITBOECK, P., MALLACH, A., ANDREWS, W. D., PIERS, T. M., BOTIA, J. A., POCKOCK, J. M., CUMMINGS, D. M., HARDY, J., EDWARDS, F. A., & SALIH, D. A. (2020). Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions. *Human Molecular Genetics*, 29 (19), 3224-3248.
- LIVELY, S., & SCHLICHTER, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 215.

- LOVETT-RACKE, A. E., BITTNER, P., CROSS, A. H., CARLINO, J. A., & RACKE, M. K. (1998). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis with insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-1/IGF-binding protein-3 complex (IGF-1/IGFBP3). *Journal of Clinical Investigation*, 101 (8), 1797-1804.
- LUBLIN, F. D., REINGOLD, S. C., COHEN, J. A., CUTTER, G. R., SØRENSEN, P. S., THOMPSON, A. J., WOLINSKY, J. S., BALCER, L. J., BANWELL, B., BARKHOF, F., BEBO, B., JR., CALABRESI, P. A., CLANET, M., COMI, G., FOX, R. J., FREEDMAN, M. S., GOODMAN, A. D., INGLESE, M., KAPPOS, L.,...POLMAN, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83 (3), 278-286.
- LUCCHINETTI, C., BRÜCK, W., PARISI, J., SCHEITHAUER, B., RODRIGUEZ, M., & LASSMANN, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47 (6), 707-717.
- MAIMONE, D., GUAZZI, G. C., & ANNUNZIATA, P. (1997). IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *Journal of the Neurological Sciences*, 146 (1), 59-65.
- MAKHANI, N., BANWELL, B., TELLIER, R., YEA, C., MCGOVERN, S., O'MAHONY, J., AHORRO, J. M., ARNOLD, D., SADOVNICK, A. D., MARRIE, R. A., & BAR-OR, A. (2016). Viral exposures and MS outcome in a prospective cohort of children with acquired demyelination. *Multiple Sclerosis*, 22 (3), 385-388.
- MAPLE, P. A., TANASESCU, R., CONSTANTINESCU, C. S., VALENTINO, P., CAPOBIANCO, M., D'ORSO, S., BORSELLINO, G., BATTISTINI, L., RISTORI, G., MECHELLI, R., SALVETTI, M., & GRAN, B. (2024). Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Herpes Simplex Virus, and Varicella Zoster Virus Infection Dynamics in People with Multiple Sclerosis from Northern Italy. *Pathogens*, 13 (6).
- MARINELLI, S., BASILICO, B., MARRONE, M. C., & RAGOZZINO, D. (2019). Microglia-neuron crosstalk: Signaling mechanism and control of synaptic transmission. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 94, 138-151.
- MCDONALD, W. I., COMPSTON, A., EDAN, G., GOODKIN, D., HARTUNG, H. P., LUBLIN, F. D., MCFARLAND, H. F., PATY, D. W., POLMAN, C. H., REINGOLD, S. C., SANDBERG-WOLLHEIM, M., SIBLEY, W., THOMPSON, A., VAN DEN NOORT, S., WEINSHENKER, B. Y., & WOLINSKY, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 50 (1), 121-127.
- MCKILLOP, W. M., YORK, E. M., RUBINGER, L., LIU, T., OSSOWSKI, N. M., XU, K., HRYCIW, T., & BROWN, A. (2016). Conditional Sox9 ablation improves locomotor recovery after spinal cord injury by increasing reactive sprouting. *Experimental Neurology*, 283 (Pt A), 1-15.
- MEDEIROS-FURQUIM, T., AYOUB, S., JOHNSON, L. J., APRICO, A., NWOKE, E., BINDER, M. D., & KILPATRICK, T. J. (2022). Cladribine Treatment for MS Preserves the Differentiative Capacity of Subsequently Generated Monocytes, Whereas Its Administration In Vitro Acutely Influences Monocyte Differentiation but Not Microglial Activation. *Frontiers in Immunology*, 13, 678817.
- MERCK. (2017). Gebrauchsinformation: Mavenclad 10 mg Tabletten.
- MERIGHI, S., BENCIVENNI, S., VINCENZI, F., VARANI, K., BOREA, P. A., & GESSI, S. (2017). A(2B) adenosine receptors stimulate IL-6 production in primary murine microglia through p38 MAPK kinase pathway. *Pharmacological Research*, 117, 9-19.
- MILLER, D., BARKHOF, F., MONTALBAN, X., THOMPSON, A., & FILIPPI, M. (2005). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurology*, 4 (5), 281-288.
- MILLIGAN, N. M., NEWCOMBE, R., & COMPSTON, D. A. (1987). A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 50 (5), 511-516.
- MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., HEILMAN, M. J., & HILL, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology*, 164 (12), 6166-6173.
- MIRON, V. E., BOYD, A., ZHAO, J. W., YUEN, T. J., RUCKH, J. M., SHADRACH, J. L., VAN WIJNGAARDEN, P., WAGERS, A. J., WILLIAMS, A., FRANKLIN, R. J. M., & FFRENCH-CONSTANT, C. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, 16 (9), 1211-1218.
- MUNGER, K. L., BENTZEN, J., LAURSEN, B., STENAGER, E., KOCH-HENRIKSEN, N., SØRENSEN, T. I., & BAKER, J. L. (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Multiple Sclerosis*, 19 (10), 1323-1329.

- MUNGER, K. L., LEVIN, L. I., HOLLIS, B. W., HOWARD, N. S., & ASCHERIO, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 296 (23), 2832-2838.
- MUSELLA, A., MANDOLESI, G., GENTILE, A., ROSSI, S., STUDER, V., MOTTA, C., SEPMAN, H., FRESEGNA, D., HAJI, N., PAOLILLO, A., MATARESE, G., & CENTONZE, D. (2013). Cladribine interferes with IL-1 β synaptic effects in experimental multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 264 (1-2), 8-13.
- NAGELHUS, E. A., & OTTERSEN, O. P. (2013). Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological Reviews*, 93 (4), 1543-1562.
- NEAL, M., LUO, J., HARISCHANDRA, D. S., GORDON, R., SARKAR, S., JIN, H., ANANTHARAM, V., DÉSAUBRY, L., KANTHASAMY, A., & KANTHASAMY, A. (2018). Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *Glia*, 66 (10), 2137-2157.
- NGUYEN, P. T., DORMAN, L. C., PAN, S., VAINCHTEIN, I. D., HAN, R. T., NAKAO-INOUE, H., TALOMA, S. E., BARRON, J. J., MOLOFSKY, A. B., KHEIRBEK, M. A., & MOLOFSKY, A. V. (2020). Microglial Remodeling of the Extracellular Matrix Promotes Synapse Plasticity. *Cell*, 182 (2), 388-403.
- NIELSEN, S., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., BOURQUE, C., AGRE, P., & OTTERSEN, O. P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 17 (1), 171-180.
- NODA, H., TAKEUCHI, H., MIZUNO, T., & SUZUMURA, A. (2013). Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 256 (1-2), 13-18.
- NORDEN, D. M., TROJANOWSKI, P. J., VILLANUEVA, E., NAVARRO, E., & GODBOUT, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64 (2), 300-316.
- OHSAWA, K., IMAI, Y., SASAKI, Y., & KOHSAKA, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88 (4), 844-856.
- OHSAWA, K., SANAGI, T., NAKAMURA, Y., SUZUKI, E., INOUE, K., & KOHSAKA, S. (2012). Adenosine A3 receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration. *Journal of Neurochemistry*, 121 (2), 217-227.
- ONTANEDA, D., TALLANTYRE, E., KALINCIK, T., PLANCHON, S. M., & EVANGELOU, N. (2019). Early highly effective versus escalation treatment approaches in relapsing multiple sclerosis. *Lancet Neurology*, 18 (10), 973-980.
- ORIHUELA, R., MCPHERSON, C. A., & HARRY, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173 (4), 649-665.
- ORTIZ, G. G., PACHECO-MOISÉS, F. P., MACÍAS-ISLAS, M., FLORES-ALVARADO, L. J., MIRELES-RAMÍREZ, M. A., GONZÁLEZ-RENOVATO, E. D., HERNÁNDEZ-NAVARRO, V. E., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. L., & ALATORRE-JIMÉNEZ, M. A. (2014). Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Archives of Medical Research*, 45 (8), 687-697.
- PAN, G., HUMKE, E. W., & DIXIT, V. M. (1998). Activation of caspases triggered by cytochrome c in vitro. *FEBS Letters*, 426 (1), 151-154.
- PARK, C., LEE, S., CHO, I. H., LEE, H. K., KIM, D., CHOI, S. Y., OH, S. B., PARK, K., KIM, J. S., & LEE, S. J. (2006). TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression. *Glia*, 53 (3), 248-256.
- PENFIELD, W. (1925). Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas. *American Journal of Pathology*, 1 (1), 77-90.15.
- PERRON, H., GENY, C., LAURENT, A., MOURIQUAND, C., PELLAT, J., PERRET, J., & SEIGNEURIN, J. M. (1989). Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Research in Virology*, 140 (6), 551-561.
- PFLÜGER, P., VIAU, C. M., COELHO, V. R., BERWIG, N. A., STAUB, R. B., PEREIRA, P., & SAFFI, J. (2016). Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. *European Journal of Pharmacology*, 780, 38-45.
- PINHEIRO, B., GUERREIRO, R., COSTA, J., & MIGUEL, L. S. (2020). Cost-effectiveness of cladribine tablets versus fingolimod in patients with highly active relapsing multiple sclerosis in Portugal. *Journal of Medical Economics*, 23 (5), 484-491.

- PITTALUGA, A. (2017). CCL5-Glutamate Cross-Talk in Astrocyte-Neuron Communication in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 8, 1079.
- POLIANI, P. L., WANG, Y., FONTANA, E., ROBINETTE, M. L., YAMANISHI, Y., GILFILLAN, S., & COLONNA, M. (2015). TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *Journal of Clinical Investigation*, 125 (5), 2161-2170.
- PONATH, G., PARK, C., & PITT, D. (2018). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 9, 217.
- PROBERT, L., EUGSTER, H. P., AKASSOGLOU, K., BAUER, J., FREI, K., LASSMANN, H., & FONTANA, A. (2000). TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain*, 123 (Pt 10), 2005-2019.
- QU, W. S., LIU, J. L., LI, C. Y., LI, X., XIE, M. J., WANG, W., & TIAN, D. S. (2015). Rapidly activated epidermal growth factor receptor mediates lipopolysaccharide-triggered migration of microglia. *Neurochemistry International*, 90, 85-92.
- RAFF, M. C., FIELDS, K. L., HAKOMORI, S. I., MIRSKY, R., PRUSS, R. M., & WINTER, J. (1979). Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Research*, 174(2), 283-308.
- RANVIER, L. (1871). Contributions à l'histologie et à la physiologie des nerfs périphériques.
- RASOL, H. A., HELMY, H., EL-MOUSLY, S., AZIZ, M. A., & EL BAHAE, H. (2016). Vascular endothelial growth factor-A mRNA gene expression in clinical phases of multiple sclerosis. *Annals of Clinical Biochemistry*, 53 (Pt 2), 252-258.
- RAUF, A., BADONI, H., ABU-IZNEID, T., OLATUNDE, A., RAHMAN, M. M., PAINULI, S., SEMWAL, P., WILAIRATANA, P., & MUBARAK, M. S. (2022). Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 27 (10).
- RINDFLEISCH, E. (1863). Histologisches Detail zu der grauen Degeneration von Gehirn und Rückenmark. (Zugleich ein Beitrag zu der Lehre von der Entstehung und Verwandlung der Zelle.). *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 26 (5), 474-483.
- ROBERTSON, N. P., FRASER, M., DEANS, J., CLAYTON, D., WALKER, N., & COMPSTON, D. A. (1996). Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain*, 119 (Pt 2), 449-455.
- ROTSTEIN, D., & MONTALBAN, X. (2019). Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nature Reviews: Neurology*, 15 (5), 287-300.
- ROWITCH, D. H., & KRIEGSTEIN, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468 (7321), 214-222.
- SALLES, D., SAMARTINI, R. S., ALVES, M. T. S., MALINVERNI, A. C. M., & STÁVALE, J. N. (2022). Functions of astrocytes in multiple sclerosis: A review. *Mult Scler Relat Disord*, 60, 103749.
- SAVEN, A., & PIRO, L. D. (1993). 2-Chlorodeoxyadenosine: a new nucleoside agent effective in the treatment of lymphoid malignancies. *Leukemia and Lymphoma*, 10 Suppl, 43-49.
- SAWCER, S., HELLENTAL, G., PIRINEN, M., SPENCER, C. C., PATSOPOULOS, N. A., MOUTSIANAS, L., DILTHEY, A., SU, Z., FREEMAN, C., HUNT, S. E., EDKINS, S., GRAY, E., BOOTH, D. R., POTTER, S. C., GORIS, A., BAND, G., OTURAI, A. B., STRANGE, A., SAARELA, J.,...COMPSTON, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476 (7359), 214-219.
- SAXENA, A., BAUER, J., SCHEIKL, T., ZAPPULLA, J., AUDEBERT, M., DESBOIS, S., WAISMAN, A., LASSMANN, H., LIBLAU, R. S., & MARS, L. T. (2008). Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *Journal of Immunology*, 181 (3), 1617-1621.
- SCHROETER, C. B., ROLFES, L., GOTHAN, K. S. S., GRUCHOT, J., HERRMANN, A. M., BOCK, S., FAZIO, L., HENES, A., NARAYANAN, V., PFEUFFER, S., NELKE, C., RÄUBER, S., HUNTEMANN, N., DUARTE-SILVA, E., DOBELMANN, V., HUNDEHEGE, P., WIENDL, H., RABA, K., KÜRY, P.,...MEUTH, S. G. (2022). Cladribine treatment improves cortical network functionality in a mouse model of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, 19 (1), 270.
- SEEKER, L. A., & WILLIAMS, A. (2022). Oligodendroglia heterogeneity in the human central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 143 (2), 143-157.

- SERADA, S., FUJIMOTO, M., MIHARA, M., KOIKE, N., OHSUGI, Y., NOMURA, S., YOSHIDA, H., NISHIKAWA, T., TERABE, F., OHKAWARA, T., TAKAHASHI, T., RIPLEY, B., KIMURA, A., KISHIMOTO, T., & NAKA, T. (2008). IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (26), 9041-9046.
- SHAHRIAR, S., BISWAS, S., ZHAO, K., AKCAN, U., TUOHY, M. C., GLENDINNING, M. D., KURT, A., WAYNE, C. R., PROCHILLO, G., PRICE, M. Z., STUHLMANN, H., BREKKEN, R. A., MENON, V., & AGALLIU, D. (2024). VEGF-A-mediated venous endothelial cell proliferation results in neoangiogenesis during neuroinflammation. *Nature Neuroscience*, 27 (10), 1904-1917.
- SHEN, K., REICHEL, M., KYAUK, R. V., NGU, H., SHEN, Y. A., FOREMAN, O., MODRUSAN, Z., FRIEDMAN, B. A., SHENG, M., & YUEN, T. J. (2021). Multiple sclerosis risk gene *Mertk* is required for microglial activation and subsequent remyelination. *Cell Reports*, 34 (10), 108835.
- SHINDO, A., MAKI, T., MANDEVILLE, E. T., LIANG, A. C., EGAWA, N., ITOH, K., ITOH, N., BORLONGAN, M., HOLDER, J. C., CHUANG, T. T., MCNEISH, J. D., TOMIMOTO, H., LOK, J., LO, E. H., & ARAI, K. (2016). Astrocyte-Derived Pentraxin 3 Supports Blood-Brain Barrier Integrity Under Acute Phase of Stroke. *Stroke*, 47 (4), 1094-1100.
- SIDDIQUI, M. K., KHURANA, I. S., BUDHIA, S., HETTLE, R., HARTY, G., & WONG, S. L. (2018). Systematic literature review and network meta-analysis of cladribine tablets versus alternative disease-modifying treatments for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Current Medical Research and Opinion*, 34 (8), 1361-1371.
- SINGH, V., VOSS, E. V., BÉNARDAIS, K., & STANGEL, M. (2012). Effects of 2-chlorodeoxyadenosine (Cladribine) on primary rat microglia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7 (4), 939-950.
- SIPE, J. C., ROMINE, J. S., KOZIOL, J. A., MCMILLAN, R., ZYROFF, J., & BEUTLER, E. (1996). Development of cladribine treatment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 1 (6), 343-347.
- SMITH, K. J., & LASSMANN, H. (2002). The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurology*, 1 (4), 232-241.
- SOLDAN, S. S., & LIEBERMAN, P. M. (2023). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nature Reviews: Microbiology*, 21 (1), 51-64.
- SORENSEN, P. S., & SELLEBJERG, F. (2019). Pulsed immune reconstitution therapy in multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 12, 1756286419836913.
- SPELMAN, T., OZAKBAS, S., ALROUGHANI, R., TERZI, M., HODGKINSON, S., LAUREYS, G., KALINCIK, T., VAN DER WALT, A., YAMOUT, B., LECHNER-SCOTT, J., SOYSAL, A., KUHLE, J., SANCHEZ-MENOYO, J. L., BLANCO MORGADO, Y., SPITALERI, D., VAN PESCH, V., HORAKOVA, D., AMPAPA, R., PATTI, F.,...BUTZKUEVEN, H. (2023). Comparative effectiveness of cladribine tablets versus other oral disease-modifying treatments for multiple sclerosis: Results from MSBase registry. *Multiple Sclerosis*, 29 (2), 221-235.
- STEININGER, T. S., STUTZ, H., & KERSCHBAUM, H. H. (2011). Beta-adrenergic stimulation suppresses phagocytosis via Epac activation in murine microglial cells. *Brain Research*, 1407, 1-12.
- STOUT, R. D., JIANG, C., MATTA, B., TIETZEL, I., WATKINS, S. K., & SUTTLES, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of Immunology*, 175 (1), 342-349.
- STUVE, O., SOELBERG SOERENSEN, P., LEIST, T., GIOVANNONI, G., HYVERT, Y., DAMIAN, D., DANGOND, F., & BOSCHERT, U. (2019). Effects of cladribine tablets on lymphocyte subsets in patients with multiple sclerosis: an extended analysis of surface markers. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 12, 1756286419854986.
- SZCZUCIŃSKI, A., & LOSY, J. (2011). CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, 18 (1), 67-72.
- THE MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. (2020). *Atlas of MS, 3rd Edition*.
- THOMPSON, A. J., BANWELL, B. L., BARKHOF, F., CARROLL, W. M., COETZEE, T., COMI, G., CORREALE, J., FAZEKAS, F., FILIPPI, M., FREEDMAN, M. S., FUJIHARA, K., GALETTA, S. L., HARTUNG, H. P., KAPPOS, L., LUBLIN, F. D., MARRIE, R. A., MILLER, A. E., MILLER, D. H., MONTALBAN, X.,...COHEN, J. A. (2018). Diagnosis of

- multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*, 17 (2), 162-173.
- TOLLÁR, J., NAGY, F., TÓTH, B. E., TÖRÖK, K., SZITA, K., CSUTORÁS, B., MOIZS, M., & HORTOBÁGYI, T. (2020). Exercise Effects on Multiple Sclerosis Quality of Life and Clinical-Motor Symptoms. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 52 (5), 1007-1014.
- TOUIL, H., KOBERT, A., LEBEURRIER, N., RIEGER, A., SAIKALI, P., LAMBERT, C., FAWAZ, L., MOORE, C. S., PRAT, A., GOMMERMAN, J., ANTEL, J. P., ITOYAMA, Y., NAKASHIMA, I., & BAR-OR, A. (2018). Human central nervous system astrocytes support survival and activation of B cells: implications for MS pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation*, 15 (1), 114.
- UMMENTHUM, K., PEFEROEN, L. A., FINARDI, A., BAKER, D., PRYCE, G., MANTOVANI, A., BSIBSI, M., BOTTAZZI, B., PEFEROEN-BAERT, R., VAN DER VALK, P., GARLANDA, C., KIPP, M., FURLAN, R., VAN NOORT, J. M., & AMOR, S. (2016). Pentraxin-3 is upregulated in the central nervous system during MS and EAE, but does not modulate experimental neurological disease. *European Journal of Immunology*, 46 (3), 701-711.
- VAN DER VALK, P., & DE GROOT, C. J. (2000). Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 26 (1), 2-10.
- Van Sechel, A. C., Bajramovic, J. J., van Stipdonk, M. J., Persoon-Deen, C., Geutskens, S. B., & van Noort, J. M. (1999). EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*, 162 (1), 129-135.
- VAN WAGONER, N. J., & BENVENISTE, E. N. (1999). Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 100 (1-2), 124-139.
- VÁZQUEZ-CHONA, F., & GEISERT, E. E., JR. (1999). N-cadherin at the glial scar in the rat. *Brain Research*, 838 (1-2), 45-50.
- VERKHRATSKY, A., PARPURA, V., LI, B., & SCUDERI, C. (2021). Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS. *Adv Neurobiol*, 26, 21-53.
- VERKMAN, A. S., BINDER, D. K., BLOCH, O., AUGUSTE, K., & PAPADOPOULOS, M. C. (2006). Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 (8), 1085-1093.
- VOET, S., PRINZ, M., & VAN LOO, G. (2019). Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in Molecular Medicine*, 25 (2), 112-123.
- WALZ, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry International*, 36 (4-5), 291-300.
- WANG, J. Q., GAO, M. Y., GAO, R., ZHAO, K. H., ZHANG, Y., & LI, X. (2023). Oligodendrocyte lineage cells: Advances in development, disease, and heterogeneity. *Journal of Neurochemistry*, 164 (4), 468-480.
- WARNER, H. B., & CARP, R. I. (1981). MULTIPLE SCLEROSIS AND EPSTEIN-BARR VIRUS. *The Lancet*, 318 (8258), 1290.
- WARNKE, C., LEUSSINK, V. I., GOEBELS, N., AKTAS, O., BOYKO, A., KIESEIER, B. C., & HARTUNG, H. P. (2012). Cladribine as a therapeutic option in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, 142 (1), 68-75.
- WENG, C., GROH, A. M. R., YAQUBI, M., CUI, Q. L., STRATTON, J. A., MOORE, G. R. W., & ANTEL, J. P. (2025). Heterogeneity of mature oligodendrocytes in the central nervous system. *Neural Regen Res*, 20 (5), 1336-1349.
- WILLIAMS, K., JR., ULVESTAD, E., CRAGG, L., BLAIN, M., & ANTEL, J. P. (1993). Induction of primary T cell responses by human glial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 36 (4), 382-390.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2008). *Atlas multiple sclerosis resources in the world*. WHO Press.
- WU, Q., CAO, F., TAO, J., LI, X., ZHENG, S. G., & PAN, H. F. (2020). Pentraxin 3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 19 (12), 102584.
- XU, L., HILLIARD, B., CARMODY, R. J., TSABARY, G., SHIN, H., CHRISTIANSON, D. W., & CHEN, Y. H. (2003). Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology*, 110 (1), 141-148.
- XU, Y., TANG, L., ZHOU, C., SUN, L., HU, Y., ZHANG, Z., XIA, S., BAO, X., YANG, H., & XU, Y. (2024). Inhibition of ADORA3 promotes microglial phagocytosis and alleviates chronic ischemic white matter injury. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 30 (5), e14742.

- YONG, V. W. (2022). Microglia in multiple sclerosis: Protectors turn destroyers. *Neuron*, 110 (21), 3534-3548.
- YUAN, J., LIU, W., ZHU, H., CHEN, Y., ZHANG, X., LI, L., CHU, W., WEN, Z., FENG, H., & LIN, J. (2017). Curcumin inhibits glial scar formation by suppressing astrocyte-induced inflammation and fibrosis in vitro and in vivo. *Brain Research*, 1655, 90-103.
- ZANG, Y. C., SAMANTA, A. K., HALDER, J. B., HONG, J., TEJADA-SIMON, M. V., RIVERA, V. M., & ZHANG, J. Z. (2000). Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Overexpression of chemokine receptor CCR5. *Brain*, 123 (Pt 9), 1874-1882.
- ZHENG, K., HUANG, H., YANG, J., & QIU, M. (2022). Origin, molecular specification, and stemness of astrocytes. *Developmental Neurobiology*, 82 (2), 149-159.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle einigen Personen danken, die mich auf meinem Weg unterstützt haben:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Patrick Küry für die Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Forschungsarbeit und Erstellung dieser Dissertation.

Prof. Dr. Ulrich Germing für das Interesse an meinem Forschungsthema.

PD Dr. David Kremer für die Eröffnung der Möglichkeit einer Dissertation in der AG Neuroregeneration.

Dr. Vivien Weyers für deine bedingungslose Unterstützung. Ich bin froh, dich als meine Betreuerin gehabt und eine Freundin in dir gefunden zu haben. Danke für alles.

Dr. Joel Gruchot, M. Sc. Laura Reiche sowie Dr. Anastasia Manousi und Dr. Iria Samper Agrelo dafür, dass ich mit wirklich jeder Frage und zu jedem Zeitpunkt zu euch kommen durfte.

Brigida Ziegler und Birgit Blumenkamp für die Geduld, euren Rat und eure Hilfe. Ihr wart so manches Mal meine Rettung.

Meiner Familie und Freunden dafür, dass ihr immer an mich und diese Dissertation geglaubt habt. Darunter meiner langjährigen Freundin Alessa Wagner für das Korrekturlesen.

Meinen Eltern, Marianne und Joachim. Ohne eure unbeschreibliche Unterstützung und euren Rückhalt wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Dr. Philip Denz für dein Motivationstalent, deinen Humor und deine Liebe.