

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: PD Dr. med. Michael Gliem

**Der Effekt des Sphingosin-1-Phosphat-Modulators
Siponimod auf das mikrogliale Zellverhalten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Ferdinand Lein

2026

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. phil. Patrick Küry

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden

Gruchot J, Lein F, Lewen I, Reiche L, Weyers V, Petzsch P, Göttle P, Köhrer K, Hartung HP, Kury P, Kremer D. Siponimod Modulates the Reaction of Microglial Cells to Pro-Inflammatory Stimulation. Int J Mol Sci. 2022 Oct 31;23(21):13278. doi: 10.3390/ijms232113278. PMID: 36362063; PMCID: PMC965593

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, ihr Verlauf ist meist schubförmig und progredient. Mit fast drei Millionen Erkrankten weltweit ist sie ursächlich für viele Behinderungen und Todesfälle, die genaue Pathogenese bleibt jedoch weiterhin unklar. Die meisten Therapien zielen darauf ab, autoimmune Charakteristika der MS zu stoppen, nach aktuellen Daten schreiten jedoch neurotoxische Prozesse fort und Regenerationsprozesse können den entstandenen Schaden nach wie vor nicht reparieren. Dahingehend wies der neue Immunmodulator Siponimod (BAF312) in präklinischen Studien das Potential auf, neuroprotektive und antiinflammatorische Effekte zu induzieren. Mikroglia sind für die Immunüberwachung und Homöostase im zentralen Nervensystem essenziell und spielen eine Schlüsselrolle in der neuronalen Plastizität. Im Rahmen der MS agieren sie als Vermittler zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen und beeinflussen so Entzündung, Demyelinisierung und Gewebeschädigung, aber auch Regenerations- und Remyelinisierungsprozesse, wodurch sie in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose mitwirken. Ziel der Dissertation war es daher, den Einfluss von Siponimod auf mikrogliale Zellen genauer zu charakterisieren. Dazu wurden Experimente an der murinen BV2-Zelllinie und an primären Mikrogliazellen von Ratten durchgeführt. Untersucht wurden sowohl die Genexpression relevanter Marker als auch die zellulären bzw. morphologischen Antworten unter verschiedenen Bedingungen, einschließlich eines entzündungsähnlichen Milieus. Die Ergebnisse zeigen, dass Siponimod dosisabhängig vielseitige Effekte auf die Expression pro- und antiinflammatorischer Gene bewirkt. In den BV-2-Zellen führte dies vor allem zu einer Induktion neuroprotektiver Marker, während in den Rattenmikrogliazellen die Reaktion auf eine proinflammatorische Stimulation moduliert wird. Dies lässt sich neben der transkriptionellen Ebene auch immunzytochemisch bestätigen, wobei iNOS als Marker für inflammatorisch aktivierte Zellen genutzt wurde.

Die vorliegende Arbeit betont die Bedeutung von Siponimod als potenzielles Therapeutikum für entzündliche ZNS-Erkrankungen. Neben der bekannten Wirkung auf periphere T-Zellen zeigt die Arbeit eine direkte Wirkung auf mikrogliale Zellen, die über die alleinige Reduktion von Entzündungsmarkern hinausgeht, um potenziell Regenerationsprozesse zu initiieren. Diese Erkenntnisse leisten einen Beitrag zur Entwicklung gezielterer Therapien und vertiefen gleichzeitig das Verständnis der Rolle von Mikroglia in ZNS-Pathologien wie der Multiplen Sklerose.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory autoimmune disease, characterized by a relapsing and progressive course. With nearly three million affected individuals worldwide, MS is a major cause of disability and mortality, yet its precise pathogenesis remains unclear. Most current therapies aim to suppress the autoimmune characteristics of MS; however, recent data indicate that neurotoxic processes continue to progress, and regenerative mechanisms remain insufficient to repair the resulting damage. In this context, the novel immunomodulator Siponimod (BAF312) has demonstrated the potential to induce neuroprotective and anti-inflammatory effects in preclinical studies.

Microglia play a crucial role in immune surveillance and homeostasis within the central nervous system (CNS) and are key regulators of neuronal plasticity. In MS, they act as mediators between pro- and anti-inflammatory processes, thereby influencing inflammation, demyelination and tissue damage, as well as regenerative and remyelination processes. Consequently, microglia are central to the pathogenesis of chronic inflammatory diseases such as MS. This dissertation aims to further characterize the effects of Siponimod on microglial cells. Experiments were conducted using the murine BV2 cell line and primary rat microglia, analyzing gene expression of relevant markers and cellular/morphological responses under various conditions, including an inflammation-like milieu.

The results indicate that Siponimod exerts dose-dependent and diverse effects on the expression of pro- and anti-inflammatory genes. In BV2 cells, this predominantly leads to the induction of neuroprotective markers, while in primary rat microglia, Siponimod modulates the response to pro-inflammatory stimulation. These findings were further confirmed using immunocytochemical analyses, with iNOS serving as a marker for inflammatory activation.

The present study highlights the significance of Siponimod as a potential therapeutic agent for inflammatory CNS diseases. Beyond its established effects on peripheral T cells, the study demonstrates a direct impact on microglial cells that extends beyond the reduction of proinflammatory markers, potentially initiating regenerative processes. These insights contribute to the development of more targeted therapies for diseases such as MS while deepening the understanding of microglial involvement in CNS pathologies like multiple sclerosis.

Abkürzungsverzeichnis

ARG Arginase	IGF insulinähnlicher Wachstumsfaktor
AV-Block Atrioventrikulärer Block	IL Interleukin
BHS Blut-Hirn-Schranke	iNOS induzierbare Stickstoffsynthase
BSA Rinderserumalbumin	LPS Lipopolysaccharid
CC-3 <i>Cleaved-caspase-3</i>	M1 proinflammatorische Mikrogliazelle
CD <i>Cluster of differentiation</i>	M2 Neuroprotektive Mikrogliazelle
cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure	MACS magnetisch aktivierte Zellsortierung
Ct Zyklus-Schwellenwert	MEM <i>Minimum essential medium</i>
DAM Krankheitsassoziierte Mikroglia	MerTK Mer-Tyrosinkinase
DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol	MHC Haupthistokompatibilitätskomplex
DMEM <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	MRT Magnetresonanztomographie
DMSO Dimethylsulfoxid	MS Multiple Sklerose
DMT Verlaufsmodifizierende Therapie	NDS Normales Esel-Serum
dNTP Desoxynukleosidtriphosphat	NGS Normales Ziegen-Serum
EAE Experimentelle Autoimmunenzephalitis	NO Stickstoffmonoxid
EBV Epstein-Barr-Virus	ODC Ornithin-Decarboxylase
EDSS <i>Expanded Disability Status Scale</i>	OPC Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
EDTA Ethylendinitrilotetraessigsäure	PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
FCS Fetales Kälberserum	PDL Poly-D-Lysin
GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	PFA Paraformaldehyd
HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1- Piperazineethanesulfonsäure	PI3K Phosphatidylinositol-3-Kinase
HER Humanes endogenes Retrovirus	PNS Peripheres Nervensystem
HHV Humanes Herpes-simplex-Virus	PPMS Primär-progrediente Multiple Sklerose
HLA Humanes Leukozytenantigen	q-RT-PCR quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
Iba-1 ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1	RNA Ribonukleinsäure
IFN Interferon	rpm Umdrehungen pro Minute

RRMS schubförmig-remittierende

Multiple Sklerose

S1P Sphingosin-1-Phosphat

S1P-R Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor

SEM Standardfehler des Mittelwerts

SPMS Sekundär-progrediente Multiple
Sklerose

TLR *Toll-like receptor*

TNF Tumornekrosefaktor

TREM *Triggering receptor on myeloid
cells*

VZV Varizella-Zoster-Virus

YM-1 *Chitinase-3-like-protein 3*

ZETT Zentrale Einrichtung für
Tierforschung und wissenschaftliche
Tierschutzaufgaben

ZNS Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das zentrale Nervensystem	1
1.2	Mikroglia	1
1.3	Multiple Sklerose	3
1.4	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und Siponimod	6
1.5	Ziel der Arbeit	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Materialien	9
2.1.1	Organismen	9
2.1.2	Zellkultur	9
2.1.3	Kulturmedien	10
2.1.4	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	12
2.1.5	Immunzytochemie	12
2.1.6	Technisches Equipment und Software	13
2.2	Zellkultur	14
2.2.1	BV2	14
2.2.2	Primäre Mikroglia	15
2.2.3	Stimulation	17
2.3	Reverse Transkription und quantitative Echt-Zeit PCR	17
2.3.1	Zelllyse	18
2.3.2	RNA-Aufreinigung	18
2.3.3	cDNA-Synthese	18
2.3.4	Quantitative Echt-Zeit PCR	19
2.4	Immunzytochemie	22
2.5	Statistik	24
3	Ergebnisse	25

3.1	BV2-Mikroglia exprimieren überwiegend S1P-Rezeptor 1 und tolerieren Konzentrationen bis 10 μ M Siponimod.....	25
3.2	Siponimod reguliert BV2 Genexpression dosisabhängig.....	26
3.3	Primäre Mikroglia weisen ein ähnliches S1P-Rezeptorexpressionsmuster auf und tolerieren höhere Stimulationskonzentrationen	30
3.4	Siponimod moduliert Genexpression LPS-abhängig	31
3.5	Siponimod reduziert mikrogliale iNOS-Expression nach proinflammatorischer Polarisierung	36
4	Diskussion	39
4.1	Antiinflammatorische Effekte Siponimods auf BV-2-Mikroglia.....	40
4.2	Primäre Zellen werden durch Siponimod komplex moduliert	41
4.3	Limitationen und Aussicht.....	43
4.4	Schlussfolgerungen.....	46
5	Literaturverzeichnis	48

1 Einleitung

1.1 Das zentrale Nervensystem

Das menschliche Nervensystem ist ein hochkomplexes Organ, welches sich zum einen aus dem zentralen Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, sowie dem peripheren Nervensystem (PNS), bestehend aus Nerven und Ganglienzellen, zusammensetzt. Während das PNS vorwiegend der Weiterleitung sensorischer, sensibler oder motorischer Informationen dient, lässt sich das ZNS in weitere Bereiche entsprechend der jeweiligen Funktion, wie etwa das visuelle, motorische und sensorische System, einteilen. Auf Zellebene besteht das ZNS überwiegend aus 2 Zelltypen, den Neuronen und den Gliazellen (Kettenmann und Verkhratsky, 2008). Neurone sind elektrisch erregbare Zellen, die diese Erregung über weite Distanzen forttragen können und an entsprechende Effektororgane – beispielsweise der Willkürmuskulatur bei den alpha-Motoneuronen – übermitteln. Gliazellen lassen sich weiterhin in Makroglia, zu denen im ZNS Astrozyten und Oligodendrozyten gehören, sowie Mikroglia unterteilen. Astrozyten spielen eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Nährstoffen wie etwa Glucose für die Neurone (Belanger et al., 2011), zudem formen sie mit ihren Fortsätzen die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden um die Axone der Neurone und sind somit entscheidend für eine effektive Signalweiterleitung (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Darüber hinaus stellen sie trophische und metabolische Faktoren zur Verfügung und sind somit auch an neuronalem Wachstum und Homöostase beteiligt (Saab et al., 2013).

1.2 Mikroglia

Mikroglia gehören zum angeborenen Immunsystems und als Teil dieses die ansässigen Makrophagen des Gehirns. Sie gehören zum Mesoderm und entstammen dem embryonalen Dottersack, wodurch sie formal nicht zu den ZNS-Zellen gehören. Sie machen im vollständig entwickelten Gehirn 5-10% aller Zellen aus und spielen in der Aufrechterhaltung der Homöostase und immunologischen Überwachung des ZNS eine wichtige Rolle (Li und Barres, 2018). Mikroglia tragen maßgeblich zur physiologischen Entwicklung des Gehirns bei. Durch Synapseneliminierung (*synaptic pruning*) haben sie Einfluss auf die neuronale Plastizität und sind an Gedächtnis- und Lernprozessen beteiligt (Geloso und D'Ambrosi, 2021). Im gesunden Gehirn verbleiben sie in einer Art Gleichgewichtszustand, überwachen Gewebe und Umgebung und sind in der Lage schnell auf Infektionen oder andere Schäden zu reagieren. Jedoch auch im nicht aktivierten, gesunden Zustand tragen sie zur Beseitigung

von Abfallstoffen bei (Davalos et al., 2005, Miron und Franklin, 2014). Morphologisch weisen Mikroglia im Ruhezustand eine runde Form mit einer Größe von 15-30µm und einer Vielzahl von langen, dünnen und verzweigten Fortsätzen auf, über die eine ständige Interaktion mit anderen Zellen erfolgt (Wendimu und Hooks, 2022). Im Falle einer Aktivierung antworten sie mit Phagozytose, der Sekretion von Zyto- und Chemokinen, Antigenpräsentierung sowie T-Zell-Rekrutierung. Diese Reaktion geht mit einer phänotypischen Veränderung einher, hierbei wandelt sich die Zelle von einem runden in einen amöboiden Zelltyp. Dieser ist gekennzeichnet durch einen größeren Zellkörper, kürzeren, jedoch prominenteren Fortsätzen sowie zytoplasmatischen Vakuolen. Weiterhin ist ein bipolarer Phänotyp beschrieben, welcher einem Übergangsstadium entspricht und tendenziell eher mit neuroprotektiven Eigenschaften in Verbindung gebracht wird (Wendimu und Hooks, 2022). Die Aktivierung und phänotypische Veränderung von Mikroglia wird auch Polarisierung genannt, anhand derer man lange Zeit von M1 oder M2-Mikroglia sprach (Orihuela et al., 2016). M1 bezeichnet dabei die „klassische“ Immunantwort mitsamt der Expression typischer proinflammatorischer Marker wie beispielsweise der induzierbaren Stickstoffsynthase (iNOS), Interleukin (IL)-1 β und -6 oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Eine Aktivierung im Sinne des M1-Typs folgt in der Regel auf eine Stimulation mit Interferon-gamma (IFN- γ) oder Lipopolysaccharid (LPS) (Orihuela et al., 2016). M2-Mikroglia werden einem „alternativen“ Phänotyp zugeordnet, welcher antiinflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Dies spiegelt sich in der Hochregulierung von Markern wie Arginase-1 (ARG-1), IL-10, *transforming growth factor* beta (TGF- β), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) oder *cluster of differentiation* (CD) - 206 wider (Mills et al., 2000), welche wiederum durch IL-4, -10 oder -13 induziert werden (Orihuela et al., 2016, Wendimu und Hooks, 2022). Neuere Daten deuten zudem darauf hin, dass eine starre Einteilung in M1 und M2 nicht mehr zutreffend ist. Vielmehr können Mikroglia zwischen M1 und M2 wechseln und auch diverse Zwischenstadien annehmen (Arnold et al., 2007, Crane et al., 2014). Daten aus Einzelzellsequenzierungen legen nahe, dass eine sich in Homöostase befindende Population rasch den Phänotyp wechseln und sich in kontext- und zeitpunktabhängige Untergruppen wandeln kann. So ließ sich zeigen, dass je nach Aktivierungsstadium der Mikroglia verschiedene Gene exprimiert werden, welche wiederum z.B. für eine Krankheitsassoziierte Mikroglia (*disease-associated microglia*, DAM)-Population sprechen. Derartige DAMs konnten in degenerativ veränderten Regionen des ZNS gefunden werden. Die Regulierung der Gene ließ sich dabei in Häufungen (*Cluster*) beschreiben, welche hinweisend für eine

verstärkte Proliferation und Chemokinproduktion waren (Deczkowska et al., 2018, Jordao et al., 2019).

1.3 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalitis disseminata genannt, ist eine autoimmun vermittelte chronisch-entzündliche Erkrankung des Nervensystems. Wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen sind Frauen häufiger als Männer betroffen, im Falle der MS im Verhältnis 2-3:1. Weltweit sind aktuell etwa 2,8 Millionen Menschen erkrankt (Walton et al., 2020), wobei es eine regional unterschiedliche Verteilung mit Häufung in gemäßigten Breiten wie Europa, Nordamerika und Australien gibt. Auch in Deutschland zeigt sich ein West-Ost-Gefälle mit höheren Prävalenzen im Nordwesten. Mit einer Prävalenz von zuletzt etwa 300 Fälle/ 100.000 EinwohnerInnen ergab sich eine deutliche Zunahme der Krankheitsprävalenz in den letzten Jahren (Holstiege et al., 2017), wodurch eine kontinuierlich wachsende Bedeutung der Erkrankung mitsamt Diagnostik und Therapie aufgezeigt wird.

Die Ätiologie der Krankheitsentstehung ist nicht abschließend geklärt, wenngleich genetische Prädisposition, Umweltfaktoren und virale Einflüsse diskutiert werden (Sawcer, 2008). Erstgradige Verwandte von MS-Betroffenen haben mit 2-5% im Vergleich zur Normalbevölkerung (0,1-0,3%) ein 30-50-fach erhöhtes Risiko (Sadovnick et al., 1988, Lindsey, 2005), weiter entfernte Verwandte weisen ein entsprechend abfallendes Risiko auf. Das Erkrankungsrisiko scheint mit mehreren Genloci assoziiert zu sein, insbesondere Polymorphismen des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA-System), welches auf Chromosom 6 codiert ist, werden diskutiert (Baranzini et al., 2009). Insgesamt sind über 200 Genvarianten beschrieben, die das Risiko zur Entwicklung einer MS steigern, wobei keine einzelne bekannt ist, die den klinischen Verlauf messbar beeinflusst (Reich et al., 2018). Die zuvor bereits beschriebenen Unterschiede in Abhängigkeit der Breitengrade lassen zudem auf einen Einfluss von Umweltfaktoren wie UV-Strahlung und Vitamin-D-Mangel schließen (Lucas et al., 2015). Dies erklärt jedoch nicht, dass es innerhalb der regionalen Unterschiede Bevölkerungsgruppen wie die Inuit (Milo und Kahana, 2010), Aborigines (Miller et al., 1990) oder generell chinesische oder japanische Menschen (Rosati, 2001) gibt, die trotz sonst höherer Prävalenzen der jeweiligen Region ein niedrigeres Erkrankungsrisiko aufweisen. Hinzu kommt, dass Untersuchungen im Rahmen von Migrationsbewegungen ergeben haben, dass bei einem dauerhaften Ortswechsel sich auch das Erkrankungsrisiko ändert. Ein solcher Ortswechsel von einer Gegend mit niedriger MS-Prävalenz zu einem Ort

mit höherer Prävalenz und andersrum geht mit einer Annäherung des Erkrankungsrisikos einher. In beiden Fällen schien jedoch das Risiko innerhalb der ersten beiden Lebensjahrzehnte bestimmt zu werden, Umzüge nach dem 15. Lebensjahr hatten keinen signifikanten Effekt auf das Erkrankungsrisiko (Kurtzke, 1993, Kurtzke, 2000). Dies führt zu der Annahme, dass es einen weiteren, vermeintlich in den ersten Lebensjahren festgelegten Risikofaktor gibt. Epidemiologische Daten legen einen Zusammenhang mit viralen Erkrankungen, allen voran dem Epstein-Barr-Virus (EBV), aber auch Varizella-Zoster-Virus (VZV), Humanes Herpes-simplex-Virus 6 (HHV-6) und dem humanen endogenen Retrovirus (HERV) nahe (Sola et al., 1993, Brudek et al., 2004, Perez-Cesari et al., 2005, Alvarez-Lafuente et al., 2007, Küry et al., 2018, Bjornevik et al., 2022). Auch wenn keine Kausalität gezogen werden kann, zeigte sich insbesondere nach EBV-Infektion ein über 30-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MS sowie eine Erhöhung der Neurofilament-Leichtketten im Serum nach EBV-Serokonversion (Bjornevik et al., 2022). Ein Zusammenhang zwischen den Hüllproteinen von HERV und deren pathogenen Effekte in der MS konnte sowohl in vitro als auch in vivo gesehen werden, wodurch perspektivisch ein neuer therapeutischer Ansatz vorstellbar ist (Küry et al., 2018, Kremer et al., 2019).

Erstbeschrieben wurde die MS 1868 durch Jean-Martin Charcot als eine Triade aus Nystagmus, Intentionstremor und skandierender Sprache, welche er als kennzeichnend für die Erkrankung empfand (Clanet, 2008). Dieses sogenannte Charcot-Trias ist auch heute noch im klinischen Alltag zu finden, jedoch sind inzwischen viele weitere, heterogene Symptome beschrieben und die MS für ihre individuell unterschiedlichen Verläufe bekannt. Zu den häufigsten Initialsymptomen gehören dabei unter anderem eine Optikusneuritis mit visueller Beeinträchtigung, Sensibilitätsstörungen (Parästhesien), Fatigue und Muskelschwächen (Paresen). Weitere Symptome wie Aphasie und zerebelläre Beeinträchtigungen inklusive Ataxie und Nystagmus sind möglich, jedoch eher selten (Coles, 2008). Anhand des Auftretens neurologischer Defizite kann man die MS in verschiedene Verlaufsformen unterteilen (Lublin et al., 1996). Mit einem Anteil von etwa 85% bei Erstdiagnose ist die schubförmig-remittierende MS (*relapsing-remitting* MS, RRMS) die häufigste Form. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer neurologischen Symptomatik in Schüben. Ein Schub ist definiert als das Anhalten von MS-typischen Symptomen für mindestens 24 Stunden ohne Anzeichen von Fieber oder anderen Infektionszeichen. Die Defizite können sich unter Umständen vollständig zurückbilden und zwischen Schüben gibt es keine Progredienz der Behinderung. In etwa 80% der Fälle entwickelt sich auf dem Boden einer RRMS eine sekundär-progrediente MS (*secondary-*

progressive MS, SPMS). Hierbei entsteht nach zunächst schubförmigem Verlauf eine progrediente Behinderungszunahme, dem noch aufgesetzte Schübe sind zudem möglich. Mit etwa 15% bei Erstdiagnose ist die primär-progrediente MS (*primary-progressive* MS, PPMS) seltener; sie ist gekennzeichnet durch eine mit Krankheitsauftreten beginnende progrediente Behinderungszunahme ohne vorherigen schubförmigen Verlauf.

Auf Zell- und Gewebeebene findet bei der MS eine Invasion peripherer und autoreaktiver T-Lymphozyten statt, welche die von Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden angreifen und so zu entzündlichen, demyelinisierten Läsionen in der weißen oder grauen Substanz führen (Prineas und Graham, 1981). Als Folge ist die saltatorische Reizweiterleitung zunächst gestört und kommt bei Krankheitsprogress ganz zum Erliegen (Trapp et al., 1998, Chang et al., 2000). Mikroglia spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase zwischen Pro- und Antiinflammation im ZNS und sind somit auch an der Entstehung, Progression und Suppression chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der MS beteiligt (Li und Barres, 2018, Voet et al., 2019). Mikroglia sind als Antigen-präsentierende Zellen an der Kommunikation mit anderen Immunzellen und hierdurch auch an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt (Frohman et al., 2006). Darüber hinaus können sie sowohl Remyelinisierung durch Sekretion antiinflammatorischer Zytokine oder Phagozytose von Debris fördern als auch Myelinscheiden und Oligodendrozyten durch proinflammatorische Aktivierung schädigen (Voß et al., 2012, Prinz und Priller, 2014, Domingues et al., 2016).

Die Therapie der MS ist aufgrund der noch ungeklärten Ätiologie derzeit nicht kausal möglich. Sie setzt sich zusammen aus der akuten Schubtherapie, meist mittels Glukokortikoiden, einer verlaufsmodifizierenden Therapie (*disease-modifying therapy*, DMT) und der symptomatischen Therapie. Insbesondere innerhalb der verlaufsmodifizierenden Therapie wurden über die letzten Jahre viele Medikamente und Therapieschemata entwickelt, sodass sich eine heterogene Gruppe ergibt. Alle haben gemeinsam, die inflammatorische Aktivität zu senken und damit den Krankheitsprogress zu mildern oder gar zum Stillstand zu bringen (Kappos et al., 2016). Die bekanntesten und ältesten Vertreter der DMTs sind β -Interferone, die unter anderem auf die T-Lymphozyten-Proliferation Einfluss nehmen und eine Verschiebung von einer Th₁- hin zu einer Th₂-Immunantwort bewirken (Dhib-Jalbut und Marks, 2010, Jakimovski et al., 2018). Ein ebenfalls älterer Vertreter der DMT ist Glatirameracetat, dessen Wirkmechanismus noch nicht vollends geklärt ist, jedoch dem der Interferone ähnlich zu sein scheint (Weber et al., 2007). Neuere, inzwischen auch oral applizierbare DMTs sind Cladribin, Dimethylfumarat,

Teriflunomid sowie Fingolimod und Siponimod. Cladribin ist ein Purinanalogon, welches die DNA- und RNA-Synthese stört und so in die Zellteilung von Lymphozyten eingreift. Der Wirkmechanismus von Dimethylfumarat ist nicht abschließend geklärt, jedoch scheint eine Geninduktion mit antioxidativer Wirkung eine Rolle zu spielen (Al-Jaderi und Maghazachi, 2016). Teriflunomid hemmt die Pyrimidinsynthese und somit die Immunzellproliferation (Confavreux et al., 2014). Fingolimod war der erste zugelassene Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulator, zu dem auch Siponimod (siehe 1.4) gehört. Als letztes gehören die monoklonalen Antikörper zur Gruppe der DMTs. Der bekannteste Vertreter ist Natalizumab, welcher sich gegen das *very late antigen 4* (VLA 4) richtet und die Lymphozytenmigration über die BHS hemmt (Yu et al., 2013, Li et al., 2018). Alemtuzumab wirkt gegen CD-52, ein Marker auf Lymphozyten und Monozyten und reduziert sowohl B- als auch T-Lymphozyten (Ruck et al., 2015). Ocrelizumab ist gegen CD20-positive B-Zellen gerichtet und der einzig zugelassene Wirkstoff bei PPMS (Hohlfeld und Meinl, 2017).

1.4 Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und Siponimod

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein im gesamten Organismus vorkommendes, biologisch aktives und zur Gruppe der Sphingolipide gehörendes Signalmolekül. Es wird intrazellulär aus Sphingomyelin, einem Plasmamembranbestandteil, mithilfe von Sphingomyelinase, Ceramidase und Sphingosinkinase synthetisiert und über einen Transporter nach extrazellulär gebracht. Syntheseorte sind vor allem rote Blutkörperchen sowie vaskuläre und lymphatische Endothelzellen, aber nach Stimulation auch Thrombozyten, Makrophagen und Mastzellen (Hänel et al., 2007, Venkataraman et al., 2008). Über fünf G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1P-R₁₋₅), die in unterschiedlicher Ausprägung und Verteilung in Zellen und Gewebe exprimiert sind, entfaltet S1P seine Wirkung. S1P spielt eine wichtige Rolle in vielen Signalwegen des Körpers, darunter Lymphozytenmigration, vaskuläre Homöostase, Aufrechterhaltung der BHS, neuronale Interaktion, Myelinisierung, mikrogliale Aktivierung und ist auch an der Entwicklung des ZNS wesentlich beteiligt (Chaudhry et al., 2017, Scott, 2020). Die Vielzahl der möglichen Effekte beruht auf der je nach Zellart unterschiedlichen S1P-R-Expriemierung sowie ebenfalls unterschiedlichen Kopplung der G-Proteine. S1P-R₁ und ₄ sind mit einem inhibitorischen G-Protein gekoppelt (G_i), wodurch der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) - und der Ras/raf/mitogen-Signalweg induziert werden. S1P-R₂ und ₃ binden an mehrere G-Proteine, vorwiegend aber G_q und G_{12/13}, wodurch Phospholipase C und der Rho-Rho-Signalweg induziert werden. S1P-R₅ ist

wiederum mit $G_{12/13}$ gekoppelt (Sugimoto et al., 2003, Okamoto et al., 2011, Tsai und Han, 2016). Alle Zellen des ZNS exprimieren S1P-Rezeptoren. Für Mikroglia wird die Expression von S1P-R₁ und ₅ (Kipp, 2020) beschrieben, jedoch scheinen auch weitere Rezeptorsubtypen in Abhängigkeit des mikroglialen Aktivierungsstadiums ausgebildet zu werden (Tham et al., 2003). Oligodendrozyten exprimieren S1P-R₁ und ₅, Astrozyten S1P-R₁ und ₃ und Neurone S1P-R₁, ₂ und ₃. Andere wichtige Beispiele sind S1P-R₁ auf Leukozyten und S1P-R₃ auf Kardiomyozyten (Chaudhry et al., 2017, Kipp, 2020).

Siponimod (BAF312) ist ein selektiver Sphingosin-1-Phosphat -Rezeptor_{1,5}-Modulator, der als funktioneller Antagonist wirkt und zur Gruppe der verlaufsmodifizierenden Therapie der MS gehört. Er ist die Weiterentwicklung des S1P-R_{1,3,4,5}-Modulators Fingolimod, der durch seine unselektive Rezeptorbindung ein ungünstigeres Nebenwirkungsprofil aufweist. Insbesondere die Aktivität an S1P-R₃ wird mit Bradyarrhythmien und einem Atrioventrikulärem (AV)-Block Typ II Mobitz in Verbindung gebracht (Chaudhry et al., 2017, Kipp, 2020). Vor diesem Hintergrund besteht das Bestreben, S1P-Rezeptormodulatoren mit einem engeren Wirkprofil und vor allem mit Aussparung des Rezeptorsubtyps 3 zu entwickeln. Seit 01/2020 ist Siponimod für die Behandlung der SPMS mit Krankheitsaktivität zugelassen, nachdem in der EXPAND-Studie eine verringerte Krankheitsprogression anhand des *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) festgestellt werden konnte. Daneben verbesserten sich im Vergleich zum Placebo-Arm auch weitere klinische Gesichtspunkte sowie magnetresonanztomographische (MRT)-morphologische Korrelate (Kappos et al., 2018). Der Hauptwirkmechanismus Siponimods (und auch Fingolimods) ist nach aktueller Datenlage vor allem auf die antagonistische Wirkung am S1P-R₁ der T-Zellen zurückzuführen, wodurch eine Rezirkulation der Immunzellen und die Inflammation im ZNS reduziert wird (Matloubian et al., 2004, Kappos et al., 2010). Präklinische Studien zeigten zudem, dass Siponimod die BHS unverändert passieren kann und sowohl eine antiinflammatorische Wirkung auf ZNS-Lymphozyten und Gliazellen sowie eine S1P-R₅-vermittelte reparaturfördernde Wirkung auf Oligodendrozyten aufweist (Gentile et al., 2016, Bigaud et al., 2021). Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), welches als ein Modell für die menschliche MS gilt, konnte Siponimod außerdem die EAE supprimieren, was gleichzeitig mit einer verminderten mikroglialen inflammatorischen Aktivität und mit einer Wiederherstellung der Transmission des Neurotransmitters gamma-Aminobuttersäure (GABA) einherging (Gentile et al., 2016). Weiter ist eine generell abgeschwächte Demyelinisierung unter Siponimod beschrieben (O'Sullivan et al., 2016). Im Cuprizon-Modell für Demyelinisierung konnte eine verstärkte

Remyelinisierung unter Siponimod gezeigt werden (Dietrich et al., 2022). Im Mausmodell der EAE mit Optikusneuritis (EAEON) schwächt Siponimod die Retinadegeneration sowie die entzündlichen Infiltrate und Demyelinisierung im Nervus opticus ab, zudem wird die Sehfähigkeit verbessert (Dietrich et al., 2022). All dies deutet auf vielseitig immunmodulatorische und auch direkte neuroprotektive Effekte Siponimods im ZNS hin, welche über die Reduktion zirkulierender Lymphozyten hinausgehen.

1.5 Ziel der Arbeit

Mikroglia spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase zwischen Pro- und Antiinflammation im ZNS und sind an der Entstehung, Progression und Suppression chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der MS beteiligt (Li und Barres, 2018, Voet et al., 2019). Mittels Zytokinsekretion, T-Zellinteraktion sowie Phagozytose können sie direkten Einfluss auf entzündliches Geschehen nehmen und die MS positiv und negativ beeinflussen (Voß et al., 2012, Prinz und Priller, 2014). Wie viele andere Zellen des menschlichen Körpers exprimieren Mikroglia S1P-Rezeptoren, die eine Zielstruktur des S1P-Rezeptormodulators Siponimod sind. Klinisch reduziert Siponimod die Krankheitsprogression (Kappos et al., 2018) und auch präklinisch zeigen sich, wie oben beschrieben, immunmodulatorische und neuroprotektive Eigenschaften des Medikaments. Diese Arbeit hat es daher zum Ziel, die Wirkung von Siponimod auf das mikrogliale Verhalten zum einen auf der Ebene des Phänotyps und zum anderen auf Genexpressionsebene zu untersuchen. Hierzu wurden Stimulationsversuche an Zellen der murinen BV2-Zelllinie sowie primären Rattenmikroglia durchgeführt und dabei unterschiedliche Aktivierungsmarker auf transkriptioneller und zellulärer Ebene charakterisiert. Zunächst wurde ein Profil des S1P-Rezeptorexpressionsmusters von BV2- und Rattenmikroglia erstellt, gefolgt von Titrationsversuchen zur Dosisfindung für die folgenden Experimente. Neben der alleinigen Stimulation mit Siponimod erfolgte zusätzlich eine Kostimulation mit TNF- α oder LPS, um ein ähnlich wie in der MS entzündliches Milieu zu simulieren und damit einen möglicherweise abgeschwächten proinflammatorischen Effekt im Beisein von Siponimod zu untersuchen. Die Ergebnisse haben Einfluss auf unser Verständnis von der vielfältigen Wirkungsweise von S1P-Rezeptormodulatoren. Insbesondere eine direkte neuroprotektive Wirkung an den Zellen des ZNS, in diesem Fall Mikroglia, ist im Hinblick auf chronisch-entzündliche Erkrankungen von Bedeutung und könnte weitere therapeutische Optionen eröffnen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Organismen

Reagens	Hersteller
BV2 murine Mikroglia Zelllinie	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Wistar-Ratten	Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich

2.1.2 Zellkultur

Reagens	Hersteller
Accutase	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i> , BSA)	Thermo Fisher, Waltham, USA
DNase I Type IV	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad, USA
<i>Dulbecco's modified eagle medium low glucose</i> (DMEM, D-Glucose 1g/l)	Life Technologies, Carlsbad, USA
<i>Dulbecco's modified eagle medium high glucose</i> (DMEM, D-Glucose 4,5g/l)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> , PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FCS)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Isofluran	Piramal-Healthcare, Mumbai, Indien
LiChroSolve® Wasser	Merck, Darmstadt, Germany
Papain	Worthington / Cell Systems, Lakewood, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, USA

Poly-D-Lysine (PDL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ratte Anti-CD11b <i>magnetic microbeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
24- <i>well</i> -Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure (HEPES)	Life Technologies, Carlsbad, USA

Substrate und Inhibitoren	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MACS-Puffer - Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) - Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V (0,5%)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA V - Thermo Fisher, Waltham, USA
Ratten-Tumornekrosefaktor (TNF)- α	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Siponimod (BAF312)	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland

2.1.3 Kulturmedien

Medium	Inhalt	Hersteller
BV2-Kulturmedium	<i>Dulbecco's modified eagle medium high glucose</i> (DMEM, D-Glucose 4,5g/l)	Life Technologies, Carlsbad, USA
	10% Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
	50 U/mL Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, USA

	2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
BV2-Stimulationsmedium	<i>Dulbecco's modified eagle medium high glucose</i> (DMEM, D-Glucose 4,5g/l)	Life Technologies, Carlsbad, USA
	2% Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
	50 U/mL Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, USA
	2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Primäres Mikroglia-Medium	<i>Dulbecco's modified eagle medium low glucose</i> (DMEM, D-Glucose 1g/l)	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Fetales Kälberserum, 10%	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
	50 U/mL Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, USA
	2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Mischkulturmedium	<i>Dulbecco's modified eagle medium low glucose</i> (DMEM, D-Glucose 1g/l)	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Fetales Kälberserum, 10%	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
	50 U/mL Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, USA
	2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Präparationsmedium	<i>Minimum essential medium</i> (MEM)	Life Technologies, Carlsbad, USA

	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure (HEPES)	Thermo Fisher, Waltham, USA
	2mM L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.4 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

Reagens	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, Waltham, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher, Waltham, USA

2.1.5 Immunzytochemie

Reagens	Hersteller
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Citifluor Eindeckmedium	Electron Microscopy Science, Hatfield, USA
Esel Anti-Hase 488	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Esel Anti-Hase 594	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Esel Anti-Ziege 488	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Esel Anti-Ziege 594	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Hase Anti Cleaved-Caspase 3	Cell-Signaling, Danvers, USA
Hase Anti-Iba-1	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland
Hase Anti-iNOS	Abcam, Cambridge, UK
Hase Anti-Ki67	Abcam, Cambridge, UK
Normales Esel-Serum (NDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Normales Ziegen-Serum (NGS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ziege Anti-Iba-1	Abcam, Cambridge, UK
Ziege Anti-Hase 488	Alexa Invitrogen, Waltham, USA

Ziege Anti-Hase 594	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Ziege Anti-Ratte 594	Alexa Invitrogen, Waltham, USA

2.1.6 Technisches Equipment und Software

Produkt	Hersteller
96-well Fast Thermal Cycler „Veriti“	Applied Biosystems, Waltham, USA
ABI 7900 Real-time PCR System	Thermo Fisher, Waltham, USA
Deckgläser (13mm)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Falcon Zentrifugenröhrchen (50ml)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Axioplan 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Endnote 21.4	Thomas Reuters, New York City, USA
GraphPad PRISM Software 8	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ Software	National Institute of Health, Rockville, USA
Inkubator BBD6220	Thermo Fisher, Waltham, USA
Lab-Tek Zellkulturplatten	Thermo Fisher, Waltham, USA
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
Megafuge 3.0R	Thermo Fisher, Waltham, USA
Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Petrischalen (6cm, 10cm)	Greiner bio-one, Greismünster, Österreich
Thoma Zählkammer	Optik Labor, Görlitz, Deutschland
Schüttler	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Germany
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen 75cm ²	Greiner bio-one, Greismünster, Österreich

2.2 Zellkultur

Die Arbeit mit Zellkulturen muss steril erfolgen. Um dies sicherzustellen, wurden alle Prozeduren in einer sterilen Werkbank mit vorsterilisierten Utensilien durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend im Inkubator bei standardisierten Bedingungen von 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. BV2-Zellen sind Zellen der C57BL/6-Maus, welche durch das v-raf/v-myc tragende Retrovirus J2 immortalisiert wurden, weswegen die Arbeiten mit dieser Zelllinie unter die gentechnische Sicherheitsstufe S1 fallen und nur nach vorausgegangener Schulung und mit entsprechender Dokumentation durchgeführt werden durften. Die funktionellen und morphologischen Charakteristika entsprechen denen von Mikroglia.

Primäre Mikroglia wurden aus Wistar-Ratten (Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich) präpariert. Alle Tieranwendungen entsprechen den ARRIVE-Richtlinien und wurden in Übereinstimmung mit dem Leitfaden des *National Institutes of Health* (NIH) für die Pflege und Verwendung von Labortieren (NIH-Publikationen Nr. 8023, überarbeitet 1978) durchgeführt. Das Institutionelle Prüfungsgremium der ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat alle Tierversuche unter den Zulassungen 069/11. Darüber hinaus wurden alle Tierversuche in dieser Arbeit von einem erfahrenen, nach den FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) -Richtlinien ausgebildeten Labormitarbeiter durchgeführt. Haltung und Zucht entsprachen definierten und sterilen Bedingungen.

2.2.1 BV2

2.2.1.1 PDL-Beschichtung

Poly-D-Lysin (PDL)- Beschichtung verbessert die Haftungseigenschaften kultivierter Zellen an Deckgläsern. Dafür wurden zunächst 13 mm Deckgläser in die Vertiefungen einer 24-well-Platte platziert, je 500 µl einer 0,1 mg/dl (in PBS gelösten) PDL-Lösung hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen zunächst 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Medium befüllt. Anschließend erfolgte die Prä-Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit.

2.2.1.2 Auftauen

BV2-Zellen werden in Flüssigstickstoff gelagert. Nach dem Herausnehmen erfolgte ein vorsichtiges Auftauen im Wasserbad, bis sich eine zähe Suspension bildete. Anschließend

wurden die Zellen in 30 ml kühles BV2-Kulturmedium überführt und 5 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml Medium resuspendiert und anschließend in eine mit 20 ml Medium vorinkubierte Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Hierzu wurde das Medium durch Drehen der Zellkulturflasche auf die zellabgewandte Seite abgesaugt und 20 ml neues, vorgewärmtes Medium hinzugegeben.

2.2.1.3 Subkultivierung

Die Zellkulturflaschen wurden auf die den Zellen abgewandte Seite gedreht und das Medium abgesaugt. Jede Flasche wurde mit 10 ml PBS gewaschen und nach Hinzufügen von 5 ml Trypsin für 5 min bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde die doppelte Menge des verwendeten Trypsins an Medium hinzugegeben und der Inhalt aus je 2 Zellkulturflaschen in einem 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Es wurde für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml Kulturmedium pro T75-Flasche resuspendiert. Nach Anfärbung von 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau erfolgte die Auszählung mittels Thoma Zählkammer und anschließend das Aussäen in neue, vorinkubierte T75-Zellkulturflaschen beziehungsweise 24-*well*-Platten.

2.2.2 Primäre Mikroglia

2.2.2.1 Präparation einer Mikroglia-Mischkultur

Primäre Mikroglia wurden aus einer Mischkultur gewonnen, welche auch Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPC) enthielten. Zur Präparation wurden postnatale (P0-P1) Wistar Ratten verwendet. Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgte die Arbeit an einem sterilen Präparationstisch. Isofluran wurde zur Narkotisierung verwendet, Ethanol (70%) zur Beseitigung von Keimen. Mit einer Schere wurde der Kopf abgetrennt, Haut und Schädel entfernt und das Gehirn in eine Petrischale mit etwas Präparationsmedium (MEM, HEPES und Glutamin) gelegt. Die Meningen wurden entfernt, die Hirnhälften voneinander getrennt und abgeschnitten und anschließend in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden in Zentrifugen-Röhrchen mit 50 ml Präparationsmedium gesammelt und für 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 1 ml Papain-Lösung hinzugegeben und das Gewebe für 45 min bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. 1 ml Trypsininhibitor wurde hinzugefügt und erneut für 4 min inkubiert. Mittels gläserner Pasteur-Pipetten wurde die Suspension vorsichtig gemischt,

bevor 10 ml DMEM-Hochglukose-Medium mit 10% FCS hinzugegeben und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und in 15 ml Mischkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf T75-Zellkulturflaschen verteilt und für 10 Tage inkubiert, wobei das Medium 2-mal wöchentlich gewechselt wurde. Danach wurden die Flaschen für 2 Stunden mit 180 rpm bei 37°C auf einen Schüttler (Excella E24) gestellt, der Überstand mit den abgelösten Mikroglia auf 10cm bakterielle Petrischalen überführt und 10 ml Mischkulturmedium hinzugegeben. Während die T75-Flaschen mit den Astrozyten und OPCs für weitere 22 Stunden geschüttelt wurden, wurden die Petrischalen mit den Mikroglia für eine Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand der T75-Zellkulturflaschen erneut in bakterielle Petrischalen überführt und für 20 min inkubiert. Mikroglia haften sich sehr schnell an den Boden der Petrischalen, sodass nach 20 min das Medium gewechselt wurde, um verbleibende OPCs zu separieren. Hierzu wurden 20ml frisches Mischkulturmedium verwendet und anschließend für 2 Stunden inkubiert.

2.2.2.2 Isolierung und Aufreinigung der Mikroglia

Zur weiteren Aufreinigung und Isolierung von Mikroglia wurde das magnetisch aktivierte Zellsortier (*magnetic-activated-cell-sorting*, MACS)-Verfahren verwendet, welches auf der Trennung bestimmter Zellen anhand von Oberflächenmerkmalen beruht. Hierzu wurden Antikörper gegen Cd11b, eine alpha-M-Untereinheit des β -Integrins, verwendet.

Da es sich um ein zeitaufwendiges Verfahren handelt, wurden alle Medien vorab auf 2-8°C gekühlt. Die Petrischalen mit den Mikroglia wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit 3 ml Accutase im Inkubator behandelt, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Die Reaktion wurde mit 4 ml FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellsuspensionen in 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschließend bei 4°C und 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 80 μ l MACS-Puffer und 20 μ l CD11b/c Magnetpartikeln (*microbeads*) resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 2-8°C für 15 min wurden 2 ml kalten MACS-Puffers hinzugegeben, vermischt und bei 4°C und 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Für die magnetische Separierung wurden die Säulen in das magnetische Feld des Separators platziert und zur Vorbereitung mit 500 μ l MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension hinzugegeben und 3-mal mit je 500 μ l MACS-Puffer gewaschen. Die Säulen wurden aus dem magnetischen Feld entfernt, auf ein 50 ml Zentrifugenröhrchen platziert und 1 ml MACS-Puffer hinzugegeben. Die magnetisch markierten Mikroglia wurden dann direkt durch Aufsetzen des Kolbens ausgespült. Um Verunreinigungen vorzubeugen, wurde der gesamte Vorgang der magnetischen Separierung

nochmals wiederholt. Abschließend wurde das Röhrchen bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Mikroglia Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte nach Färbung von 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau mittels Thoma Zählkammer. Für Polymerase Kettenreaktion (PCR)-Experimente wurden die Zellen in 24-*well*-Platten, für immunzytochemische Färbungen in 8-*well*-Lab-Tek-Platten ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.3 Stimulation

Die Stimulation der BV2- und primären Rattenmikroglia erfolgte 24 Stunden nach Ausplattierung mit Siponimod beziehungsweise Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) als Kontrolle. Hierzu wurde zunächst das Medium verworfen und 1 ml neues Stimulationsmedium in gewünschter Konzentration hinzugegeben. Für die BV2-Mikroglia wurden die Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM sowie 10 µM verwendet, für die primären Rattenmikroglia die Konzentrationen 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM und 50 µM. BV2-Mikroglia wurden eine Stunde nach primärer Stimulation TNF-α als proinflammatorischer Stimulus hinzugegeben, bei den primären Rattenmikroglia geschah die Kostimulation zeitgleich mit LPS. Die Konzentrationen betrugen für TNF-α c=50 ng/ml und für LPS c=100 ng/ml. Die Stimulation erfolgte für 24 oder 72 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit, anschließend wurden die Zellen entweder lysiert oder fixiert.

2.3 Reverse Transkription und quantitative Echt-Zeit PCR

Die quantitative Echt-Zeit Polymerase Kettenreaktion (q-RT-PCR) erlaubt durch Vervielfältigung von DNA-Sequenzen die Quantifizierung von Gentranskripten, wodurch eine Aussage über die Expressionsstärke von ausgewählten Genen möglich ist. Dazu wurden die Mikrogliazellen zunächst lysiert und die RNA extrahiert und aufgereinigt. Mittels reverser Transkription erfolgte die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) und anschließend die q-RT-PCR. Durch die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green in die Doppelstrang DNA wird während der Amplifikation ein detektierbares Signal erzeugt, welches in Echtzeit gemessen wird. Das Ergebnis wird als Zyklus-Schwellenwert (*Cycle threshold*, Ct) angegeben. Dies ist der Amplifikationszyklus, an dem sich die Reaktion in einer exponentiellen Phase befindet. Der Ct-Wert ist invers proportional zur Menge der Nukleinsäure der untersuchten Probe, da weniger Amplifikationszyklen notwendig sind, um ein detektierbares Signal zu erzeugen. Niedrige Ct-Werte deuten somit auf eine starke Genexpression hin.

2.3.1 Zelllyse

Die Zelllyse erfolgte 24 bzw. 72 Stunden nach der Stimulation. Hierzu wurde das Medium aspiriert und 350 µl Lyse-Puffer (β-Mercaptoethanol 1:100 RLT-Puffer) auf je drei Vertiefungen einer Bedingung verteilt. Mit seinen reduzierenden Eigenschaften sorgt β-Mercaptoethanol für eine Denaturierung und Inaktivierung von Enzymen und Substraten, während der RLT-Puffer gleichzeitig die Zellmembran auflöst. Durch Kratzen mit einer Pipettenspitze wurden die Zellen zusätzlich mechanisch vom Plastik der Näpfchen gelöst und die Lösung anschließend in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Falls das RNA-Extrakt nicht direkt weiter aufgereinigt wurde, wurde die Lösung bei -80°C eingefroren.

2.3.2 RNA-Aufreinigung

Zur Aufbereitung der RNA wurde das *RNeasy Mini Kit* von QIAGEN verwendet, die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Hierfür wurde das RNA-Extrakt in QIAshredder-Säulen überführt und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl 70%igen Ethanols hinzugefügt, das Eluat in RNeasy Säulen überführt und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Hierbei haftet die RNA in der RNeasy Säule, der Überstand wurde verworfen. Nach dem Waschen mit 350 µl RW1 Puffer und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm wurde genomische DNA in einer 15-minütigen Inkubation mittels 80 µl RNase freiem DNase Puffer (10 µl DNase in 70 µl RDD-Puffer) entfernt. Es folgte ein erneutes Waschen mit 350 µl RW1 Puffer und Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm, bevor in zwei weiteren Schritten je 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und für je 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Abschließend wurde die an der RNeasy Säule haftende isolierte RNA in 21 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugieren für 1 min bei 14.000 rpm aufgelöst und die RNA-Konzentration mittels Nano-drop Spektroskopie bestimmt.

2.3.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) beruht auf dem Prinzip der reversen Transkription, hierbei katalysiert das Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) die Umschreibung von RNA zu DNA.

Die Synthese erfolgte mit dem *high-capacity cDNA reverse transcription Kit*. Es wurden 250 ng der zuvor isolierten RNA verwendet und mit LiChroSolve® Wasser auf 19,8 µl verdünnt. Anschließend wurden 10,2 µl Mastermix (Tab. 1) hinzugegeben und in einen Thermocycler gegeben. Die jeweiligen Temperaturschritte mit Funktion sind Tabelle 2 zu

entnehmen. Im Anschluss an die Synthese wurde die cDNA-Lösung mit 170 µl LiChroSolve® Wasser verdünnt.

Komponente	Volumen (µl) pro Probe
10x- RT Puffer	3
dNTPs, 100 mM	1,2
10x RT Random Primer	3
RNase Inhibitor, 20 U/µl	1,5
Reverse Transkriptase, 50 U/µl	1,5
Totales Volumen	10,2

Tabelle 1: Komponenten des Mastermix mit ihrer jeweiligen Menge

Temperatur (in °C)	Zeit	Funktion
25	10 min	Primerhybridisierung
37	120 min	DNA-Polymerisation
85	5 sek	Hitzeinaktivierung
4	∞	Lagerung

Tabelle 2: Temperaturzyklen der cDNA-Synthese mit ihrer jeweiligen Funktion

2.3.4 Quantitative Echt-Zeit PCR

Die Quantifizierung der DNA-Transkripte erfolgte mittels quantitativer Echt-Zeit Polymerase Kettenreaktion, welche mittels ABI 7900 Fast-Real-Time System durchgeführt wurde. Die ausgewählten Gene sind Tabelle 3 aufgelistet, die einzelnen Temperaturabschnitte mit ihrer Dauer in Tabelle 4. Als Referenzgene bzw. nicht regulierte Gene (*housekeeping genes*) dienten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) für BV2-Mikroglia sowie Ornithin-Decarboxylase (ODC) für primäre Ratten-Mikroglia.

4 µl der in LiChroSolve verdünnten cDNA wurden mit 16 µl des Mastermix in die Vertiefungen einer 96-well-Platte pipettiert. Der Mastermix setzte sich zusammen aus 1,2 µl des Vowärtsprimers und 1,2 µl des Rückwärtsprimers (je 5pmol/µl), 3,6 µl LiChroSolve Wasser und 10 µl SYBR Green, welches als Fluoreszenzfarbstoff diente.

Gen	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
m-Gapdh	AGG TTG TCT CCT GCG ACT TCA	CCA GGA AAT GAG CTT GAC AAA G
m-Il-1 β	ACA CTC CTT AGT CCT CGG CCA	TGG TTT CTT GTG ACC CTG AGC
m-Tnf- α	AAT TCG AGT GAC AAG CCT GTA GC	CCT CCA CTT GGT GGT TTG CT
m-Il-6	CCA CGG CCT TCC CTA CTT C	TTG GGA GTG GTA TCC TCT GTG A
m-Inos	GAC GAG ACG GAT AGG CAG AG	GTG GGG TTG TTG CTG AAC TT
m-Il-4	CAC GGA TGC GAC AAA AAT CA	CTC GTT CAA AAT GCC GAT GA
m-Il-10	TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT	CAC CTG CTC CAC TGC CTT G
m-Ym1	GAA CAC TGA GCT AAA AAC TCT CCT G	GAG ACC ATG GCA CTG AAC G
m-Igf-1	TCA CCT CGG CCT CAT AGT ACC	CCG GGT CGT TTA CAC AGC
m-Arg-1	CCT GAA GGA ACT GAA AGG AAA G	TTG GCA GAT ATG CAG GGA GT
m-Cd-206	CCC AAG GGC TCT TCT AAA GCA	CGC CGG CAC CTA TCA CA
m-Mertk	TCA TCA TCC TCG GCT GCT TC	CCC AGG CTC TGC AAG GTA AG
m-S1p-r1	TTT AGC CGC AGC AAA TCA GA	GGT TGT CCC CAT CGT CCT T
m-S1p-r2	TCA AGC TCT ACG GCA GTG ACA	GAG GCC CCG ATG AGC AT
m-S1p-r3	GCC CCG CGT GGC TAC T	CCG TTC TGA AAC GAC CTG TTT T
m-S1p-r4	CTG CCC GCC GCA AGT	CAC AAA GGC CAC CAA GAT CA
m-S1p-r5	TGG CTG TG TGT GCC TTC ATT	GCG GAC CAG CAC CAA GAG

r-Odc	GGT TCC AGA GGC CAA ACA TC	GTT GCC ACA TTG ACC GTG AC
r-Il-1 β	GAA ACA GCA ATG GTC GGG AC	AAG ACA CGG GTT CCA TGG TG
r-Tnf- α	AGC CC TGG TAT GAG CCC ATG TA	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-Inos	CTC AGC ACA GAG GGC TCA AAG	TGC ACC CAA ACA CCA AGG T
r-Il-10	CCC AGA AAT CAA GGA GCA TTT G	CAG CTG TAT CCA GAG GGT CTT CA
r-Il-4	TGA GAA GCT GCA CCG TGA AT	GGC TTT CCA GGA AGT CTT TCA G
r-Ym-1	AAT CCC AAG GCT GCT TCT CA	ACC AGA CTG GAT TGT GTC AAT GA
r-Igf-1	AGA CGG GCA TTG TGG ATG A	ACA TCT CCA GCC TCC TCA GAT C
r-Arg-1	CCA AGC CAA AGC CCA TAG AG	TCC TCG AGG CTG TCC CTT AG
r-Mertk	TCT GAC AGA GAC CGC AGT CTT C	TGG ACA CCG TCA GTC CTT TG
r-Il-27	GCT GCG CAG GGA ATT CAC	CCC TGA ACC TCA GAG AGC AGT T
r-Tgf- β	AAA CGG AAG CGC ATC GAA	TGG CGA GCC TTA GTT TGG A
r-Trem-2	CCA AGG AGC CAA TCA GGA AA	GGC CAG GAG GAG AAG AAT GG
r-Ifn- β	TGG AAG GCT CAA CCT CAG CTA	GGG TGC ATC ACC TCC ATA GG
r-Gapdh	GAA CGG GAA GCT CAC TGG C	GCA TGT CAG ATC CAC AAC GG
r-S1P-r1	AAA TGC CCC AAC GGA GAC T	TCC ATG CCC GGG ATG AT

r-S1P-r2	GGT CAA GCT CTA CGG CAG TGA	AAG AGG CCC CAA TGA GCA T
r-S1P-r3	TCC TCA ACT CGG CCA TGA A	ACG CCG CAT CTC TTT GCT
r-S1P-r4	TGA GGC CCA GGG ACA GTT T	GGC TCT CGC ATC TTG AAG CT
r-S1P-r5	TTG GCT GTG TGC GCT TTC	GGT GCA TGG AAG CGA GGA T

Tabelle 3: Verwendete Primer mit den jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtssequenzen

Temperatur (in °C)	Zeit (in min)		Funktion
50	2 min		Aktivierung der Polymerase
95	10 min		Denaturierung vorformierter Dimere
95	15 sek	Alternierend	Trennung doppelsträngiger DNA
60	1 min	45x	Primerhybridisierung
4	∞		Lagerung

Tabelle 4: Temperaturzyklen der quantitativen Echt-Zeit PCR mit ihrer jeweiligen Funktion

2.4 Immunzytochemie

Um Zellen immunzytochemisch darstellen zu können, mussten sie zunächst mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Dafür wurde das Medium aspiriert und 500 µl einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation unter Raumtemperatur für 15 min wurde 3-mal mit PBS gewaschen und die Zellen, sofern nicht direkt gefärbt, bei 4°C gelagert.

Für die immunzytochemische Färbung wurden die Deckgläser aus den Vertiefungen entnommen. Es erfolgte zunächst die Permeabilisierung der Zellmembran und Blockierung unspezifischer Bindungen für 45 min mit 80 µl einer 0,5%igen (in PBS) Triton- und 2%igen normalen Ziegsen- (NGS)- bzw. normalen Esels- (NDS)- Lösung, abhängig des verwendeten Zweitantikörpers. Anschließend wurden 80 µl einer primären Antikörper-Lösung (Tab. 5) hinzugegeben (in PBS) mit 0,1% Triton und 2% NGS oder NDS auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser 3-mal mit PBS gewaschen und 80 µl der Zweitantikörper-Lösung (in PBS, Tab. 6) mit 0,1% Triton und 2% NGS hinzugegeben und für 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Deckplättchen erneut 3-mal mit PBS gewaschen und in Citifluor Eindeckmedium überführt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop.

Zur Visualisierung von Mikroglia wurden in dieser Arbeit ein Antikörper gegen das ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1 (Iba-1) und Phalloidin verwendet. Iba-1 gehört zur Gruppe der β -Integrine und wird von Mikroglia als Oberflächenmarker exprimiert (Ito et al., 1998). Phalloidin ist ein Peptid und ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes. Es bindet irreversibel an F-Actin, wodurch das Zytoskelett sichtbar gemacht wird. Zellkerne wurden mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Hase Anti-Cleaved-Caspase 3	1:500	Cell-Signaling, Danvers, USA
Hase Anti-Iba-1	1:500	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland
Hase Anti-Ki67	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Ziege Anti-Iba-1	1:500	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 5: Primärantikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	1:100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Esel Anti-Hase 594	1:500	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Esel Anti-Ziege 488	1:500	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Phalloidin-FITC	1:50	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ziege Anti-Hase 488	1:500	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Ziege Anti-Hase 594	1:500	Alexa Invitrogen, Waltham, USA
Ziege Anti-Ratte 594	1:500	Alexa Invitrogen, Waltham, USA

Tabelle 6: Sekundärantikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung

2.5 Statistik

Alle Daten sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mittels zweifacher Varianzanalyse (two-way ANOVA) und Tukey post-hoc bestimmt, es wurde das Programm GraphPad PRISM V.8 verwendet. Experimente wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$, n steht für die Anzahl unabhängiger Experimente. Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen erfolgten am Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop. Für die Analyse wurden mittels Z-Schema 7 Aufnahmen pro Deckglas mit gleicher Beleuchtung und Lichtintensität aufgenommen und 2 Deckgläser pro Experiment und Bedingung ausgewertet. Das Programm Image-J wurde zur Quantifizierung verwendet. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Negativbild mit einem Schwellwert im DAPI-Kanal (80, 255) erstellt, Wasserscheidentransformation (*watershedding*) angewandt und alle Partikel mit einer Größe von 150-3000 Pixel und Zirkularität von 0,4-1 ausgewertet. Für die Auswertung der Iba-1-Färbung wurde ebenfalls ein Schwellenwert festgelegt (30, 255), ein Negativbild erzeugt und die Gesamtfläche Iba-1-positiver Färbung gemessen. Anschließend wurde die Gesamtfläche Iba-1-positiver Färbung mit der Gesamtzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt. Maßstabsbalken wurden gemäß Mikroskopeinstellung angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 BV2-Mikroglia exprimieren überwiegend S1P-Rezeptor 1 und tolerieren Konzentrationen bis 10 μ M Siponimod

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) -Rezeptoren und seine fünf Subtypen kommen in vielen Zellen unseres Organismus vor, darunter Immunzellen und Zellen des ZNS (Tham et al., 2003). Für Mikroglia ist beschrieben, dass sie die für Siponimod relevanten Rezeptoren S1P-R₁ und ₅ exprimieren (Kipp, 2020). Diesbezüglich galt es zu testen, ob dies auch auf die BV2-Zelllinie zutrifft und über welchen Mechanismus Effekte möglich sind und stattfinden. Wie in Abb. 1A zu sehen ist, exprimieren BV2-Mikroglia relativ gesehen am meisten S1P-Rezeptor ₁, gefolgt von Subtyp ₂ und ₄ mit mittleren Ct-Werten von etwa 23,5 für S1P-R₁, 25,6 für S1P-R₂ und 28,5 für S1P-R₄. S1P-R₃ und ₅ hingegen sind mit mittleren Ct-Werten von 32,6 (S1P-R₃) und 30,7 (S1P-R₅) so gut wie nicht messbar. Auch wenn es sich hierbei um Transkriptmessungen handelt, kann aufgrund der Selektivität Siponimods für die Rezeptorsubtypen S1P-R₁ und ₅ von einer Wirkung vorrangig über S1P-R₁ ausgegangen werden. Um als nächsten Schritt verträgliche Konzentrationen für weiterführende Experimente zu bestimmen, wurden BV2-Mikroglia in 24-*well*-Platten ausgesät und für 24 h mit Siponimod/DMSO in den Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M stimuliert. Nach Fixation wurden die Zellen mit DAPI, Phalloidin und *Cleaved-Caspase-3* (CC-3) immunzytochemisch gefärbt. In Abb. 2B ist zu sehen, dass die absolute Zellzahl unter der Stimulation mit 10 μ M Siponimod sprunghaft abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass Mikroglia Konzentrationen dieser Größenordnung nicht tolerieren, sodass es als Grenze der Verträglichkeit interpretiert werden kann. CC-3 ist ein Fragment der Caspase-3, ein Schlüsselmolekül im Prozess der Apoptose einer Zelle (Porter und Jänicke, 1999). Da sich keine Zunahme an CC-3-positiven Zellen zeigte, kann zumindest für den Zeitpunkt nach 24 h von keiner verstärkten apoptotischen Aktivität ausgegangen werden. Zusätzlich wurde eine einmalige Färbung mit Ki-67 als Marker für Zellproliferation durchgeführt (Abb. 1C). Hierbei ließen sich, wie bei der Nutzung einer immortalisierten Zelllinie erwartbar, praktisch alle Zellen anfärben.

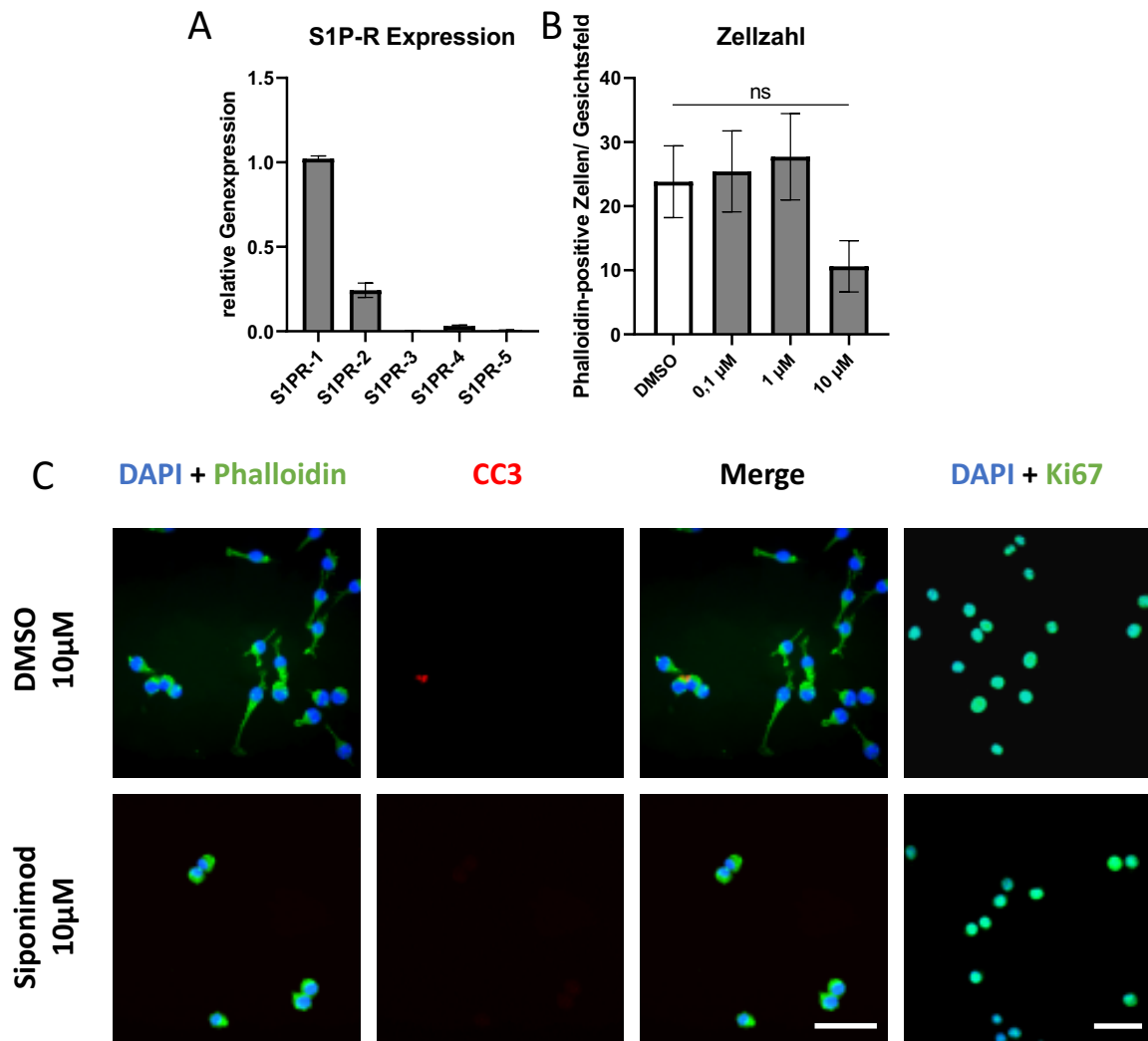


Abb. 1: S1P-Rezeptorexpression und Dosisfindung bei BV2-Mikroglia. (A) q-RT-PCR-Analyse der S1P-Rezeptoren und ihrer relativen Expression. Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 3 unabhängigen Experimenten. Jeweilige Ct-Mittelwerte sind 23,5 (S1PR₁), 25,6 (S1PR₂), 32,6 (S1PR₃), 28,5 (S1PR₄) und 30,7 (S1PR₅) (B) Statistische Analyse mikroglialer (Phalloidin-positiver Zellen) Zellzahlen. Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz für * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. (C) Representative Aufnahmen von Mikroglia unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen ($\pm$ 10 μ M Siponimod/DMSO). Immunzytochemische Färbung mit DAPI, Phalloidin, CC-3 und Ki67. Maßstabsbalken: 25 μ m

3.2 Siponimod reguliert BV2 Genexpression dosisabhängig

Nach der oben beschriebenen Zellzahlreduktion unter 10 μ M Siponimod lag das Augenmerk nun insbesondere auf den Konzentrationen zwischen 1 μ M und 10 μ M. Hierfür wurden BV2-Mikroglia in 24-*well*-Platten ausgesät und für 24 h mit Siponimod in den Konzentrationen 2,5 μ M, 5 μ M und 7,5 μ M stimuliert. In einem weiteren Experiment wurde eine Stunde nach Stimulation mit Siponimod zusätzlich mit Tumornekrosefaktor (TNF)- α bzw. Puffer-Lösung als Kontrolle in der Konzentration 50 ng/ml kostimuliert. Dies hatte zum Ziel, ein proinflammatorisches Milieu, ähnlich einem in der MS vorherrschendem, nachzuempfinden.

Expressionsstärken wurden mittels q-RT-PCR bestimmt. Zunächst erfolgte die Analyse proinflammatorischer Gene (Abb. 2A, B, D, E) sowie des Phagozytose-Markers Mer-Tyrosinkinase (MerTK) (Abb. 2C, F). Erhöhte TNF- α -Werte finden im Liquor und Serum von MS-PatientInnen, gehen mit Zelltod und axonalem Schaden einher und korrelieren mit Schwere und Fortschreiten der Erkrankung (Sharief und Hentges, 1991, Karamita et al., 2017, Göbel et al., 2018). Der Interleukin (IL)-1 β -Spiegel im Liquor zeigt eine Korrelation zu fortschreitender Bewegungseinschränkung der RRMS (Rossi et al., 2014). Es zeigte sich für die IL-1 β -Expression eine signifikante, dosisabhängige Induktion um maximal den Faktor 1,5 für die Siponimodkonzentrationen 5 μ M und 7,5 μ M verglichen mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle (Abb. 2A). Die TNF- α -Expression wurde nicht signifikant verändert (Abb. 2B). Mit TNF- α proinflammatorisch aktivierte Mikroglia zeigten sowohl für IL-1 β als auch für TNF- α eine deutliche und erwartbare Induktion, jedoch ohne dass Siponimod diesen Effekt abfangen konnte (Abb. 2D, E). Auch der Phagozytose-Marker MerTK zeigte in der Stimulation mit Siponimod einen dosisabhängigen Effekt für die Konzentrationen 5 μ M und 7,5 μ M, in Kombination mit TNF- α ergaben sich keine relevanten Unterschiede (Abb. 2C, F). Weiterhin wurden Messungen der proinflammatorischen Marker IL-6 und iNOS durchgeführt, diese sind aufgrund inkongruenter Ergebnisse hier nicht aufgeführt.

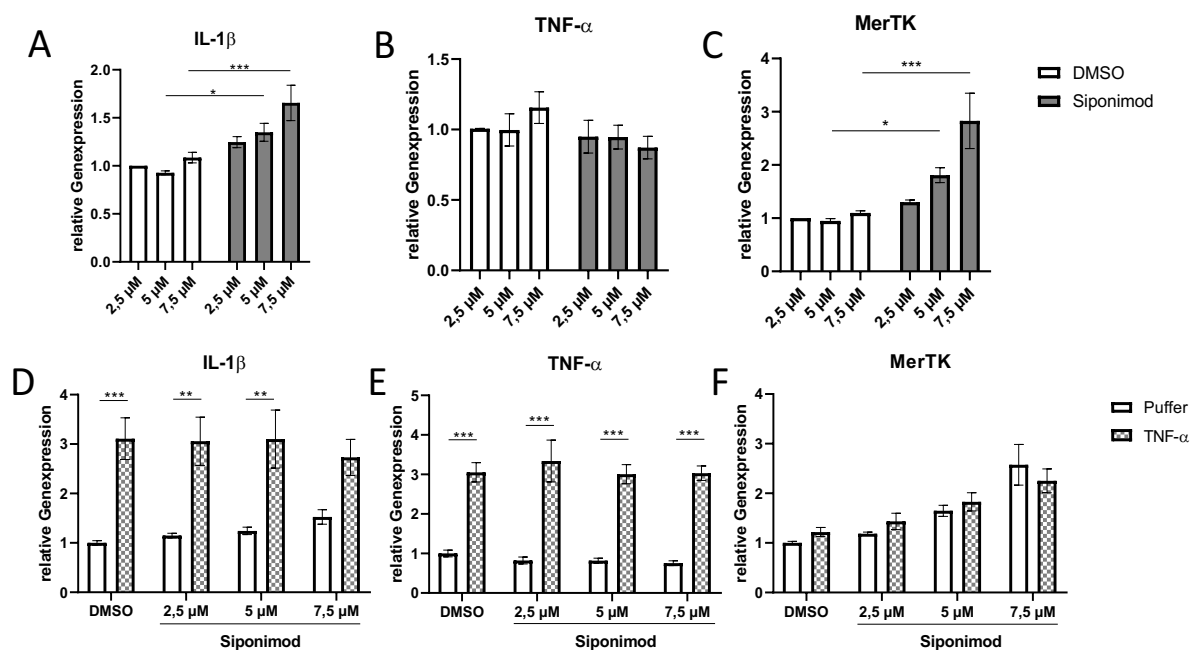


Abb. 2: Expressionsstärken proinflammatorischer und phagozytotischer Gene. q-RT-PCR-Ergebnisse von IL-1 β (A, D), TNF- α (B, E) und MerTK (C, F). Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 4 unabhängigen Experimenten. In (D)-(F) wurde auf die höchste Kontrollkonzentration (7,5 μ M DMSO) normiert. Statistische Signifikanz für *p $\leq$ 0,05; **p $\leq$ 0,01; ***p $\leq$ 0,001.

Für eine ausgeglichene Homöostase im ZNS, welche unter anderem durch Mikroglia sichergestellt wird, spielt neben den proinflammatorischen Genen bzw. Zytokinen auch die Regulierung antiinflammatorischer Gene eine entscheidende Rolle. Es wurde gezeigt, dass Siponimod Krankheitsfortschreiten sowie Gehirnatrophie im Rahmen der SPMS verringert (Kappos et al., 2018), hinweisgebend für mögliche antiinflammatorische Eigenschaften des Medikaments. Arginase-1 (ARG-1) fungiert als direkter Gegenspieler zur induzierbaren Stickstoffsynthase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) und hat somit eine potente antiinflammatorische Wirkung (Cherry et al., 2014). IL-4 ist als Zytokin an der T-Zell-Kommunikation beteiligt und fördert wie der insulinähnliche Wachstumsfaktor (*insulin-like-growth-factor*, IGF) -1 einen antiinflammatorischen Phänotyp (ehemals M2) von Mikroglia (Suzumura et al., 1994, Labandeira-Garcia et al., 2017). YM-1 (auch *Chitinase-3-like-protein 3*, Chi3l3) spielt eine wichtige Rolle in der extrazellulären Homöostase (Cherry et al., 2014). Der Mannoserezeptor *Cluster of differentiation* (CD) -206 wirkt über die Internalisierung bzw. Phagozytose entsprechender Liganden direkt antiinflammatorisch (Cherry et al., 2014). In Abb. 3 ist zu sehen, dass sich wie zuvor ebenfalls eine dosisabhängige Induktion für die Genexpression von ARG-1, IGF-1 und YM-1, mit je statistischer Signifikanz für die Konzentrationen 5 μ M und 7,5 μ M, ergaben (Abb. 3A, B, F). Auch IL-4 und CD-206 zeigten einen leichten dosisabhängigen Anstieg mit signifikanter Induktion für die hohe 7,5 μ M Konzentration (Abb. 3E, G). Innerhalb der durch TNF- α proinflammatorisch stimulierten Mikroglia ergab sich eine Supprimierung von ARG-1, IL-4 und YM-1, welche auch in höheren Konzentrationen nicht durch Siponimod aufgehoben werden konnte. IGF-1 schien sowohl durch Siponimod als auch durch TNF- α induziert zu werden, die Expression von CD-206 veränderte sich unter Stimulation mit TNF- α nicht wesentlich. Es ergibt sich insgesamt ein Bild mit überwiegender Induktion antiinflammatorischer Gene, welche zudem für die untersuchten Konzentrationen dosisabhängig erfolgt. Eine Aufhebung des proinflammatorischen Effekts durch TNF- α konnte nicht nachgewiesen werden.

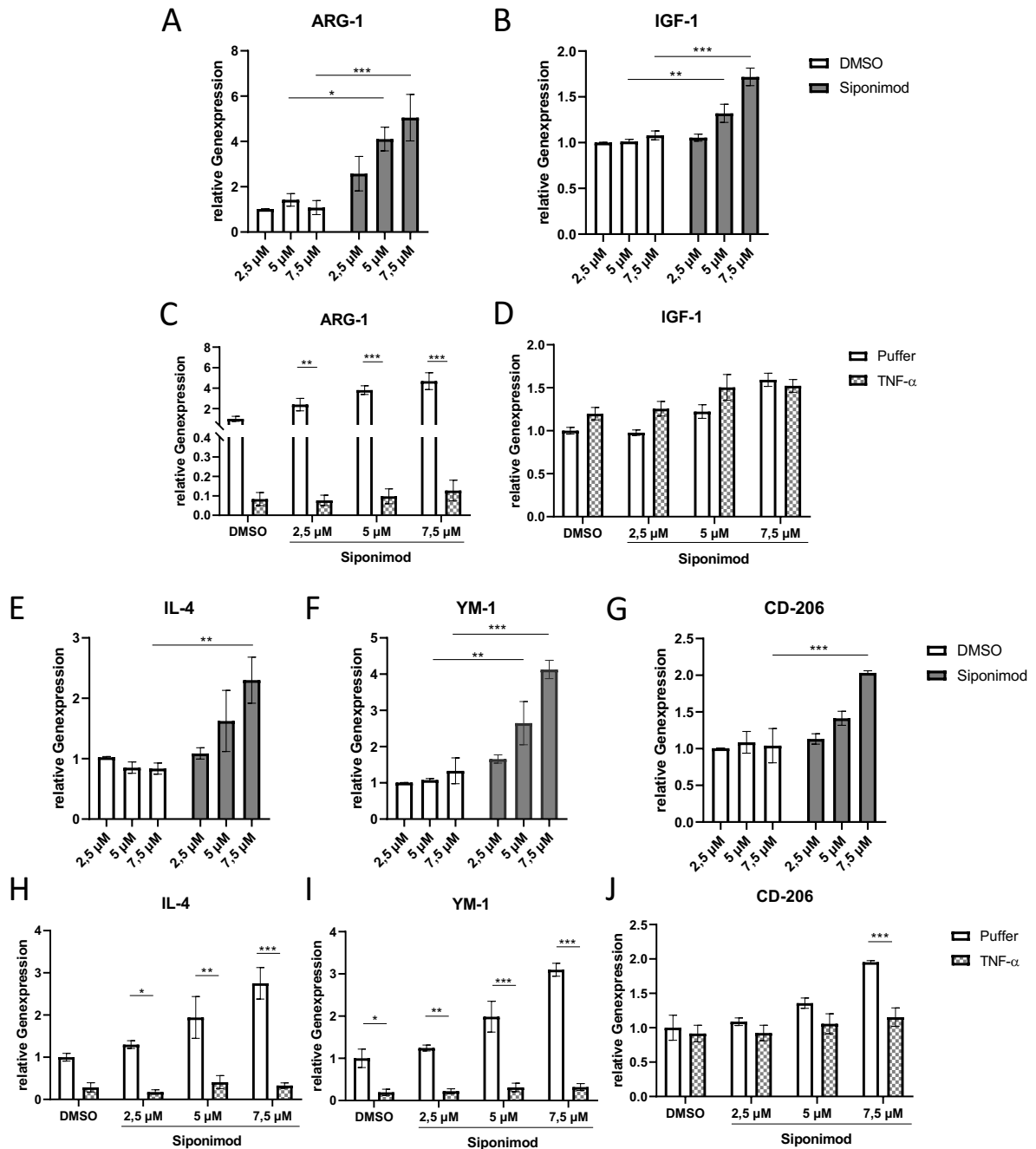


Abb. 3: Antiinflammatorische Genexpressionsmuster der BV2-Mikroglia. q-RT-PCR-Ergebnisse von ARG-1, IGF-1, IL-4, YM-1 und CD-206. Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 4 (A - D) bzw. 3 (E - J) unabhängigen Experimenten. Im je unteren Bild des gleichen Gens (C, D, H, I, J) wurde auf die höchste Kontrollkonzentration (7,5 µM DMSO) normiert. Statistische Signifikanz für * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.3 Primäre Mikroglia weisen ein ähnliches S1P-Rezeptorexpressionsmuster auf und tolerieren höhere Stimulationskonzentrationen

Bezugnehmend auf die S1P-Rezeptorexpression der BV2-Mikroglia wurde zunächst untersucht, wie stark die einzelnen Rezeptorsubtypen bei den primären Rattenmikroglia exprimiert sind. Es zeigte sich, dass der S1P-Rezeptor₂ am stärksten ausgeprägt ist (mittlerer Ct-Wert 26,2), gefolgt von S1P-Rezeptor₁ (mittlerer Ct-Wert 26,4). Die drei Subtypen_{3,4} und₅ werden im Vergleich dazu mit mittleren Ct-Werten >30 nur sehr schwach bis kaum messbar exprimiert (Abb. 4A). Aufgrund des Wirkprofils von Siponimod ist auch hier von einer Wirkung vorrangig über S1P-Rezeptor₁ auszugehen. Da es sich um eine andere Zellart handelte, wurde in einem nächsten Schritt erneut eine Titration zur Ermittlung einer verträglichen Dosis durchgeführt. Hierbei wurden primäre Rattenmikroglia zunächst in 8-well-Lab-Tek-Platten ausgesät und anschließend für 24 h mit Siponimod in den Konzentrationen 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M stimuliert. Nach Fixation erfolgte die immunzytochemische Färbung mit DAPI und Iba-1 und die Bestimmung der Zellzahl anhand der Iba-1-positiven Zellen. Unter Stimulation mit Siponimodkonzentrationen von 100 μ M zeigte sich ein massiver Einbruch der Zellzahl (Abb. 4B), sodass vom Erreichen einer für die Rattenmikroglia toxischen Dosis ausgegangen werden konnte. Es stellte sich somit außerdem dar, dass die primären Rattenzellen deutlich höhere Dosierungen als die BV-2-Mikroglia tolerieren (vgl. 3.1).

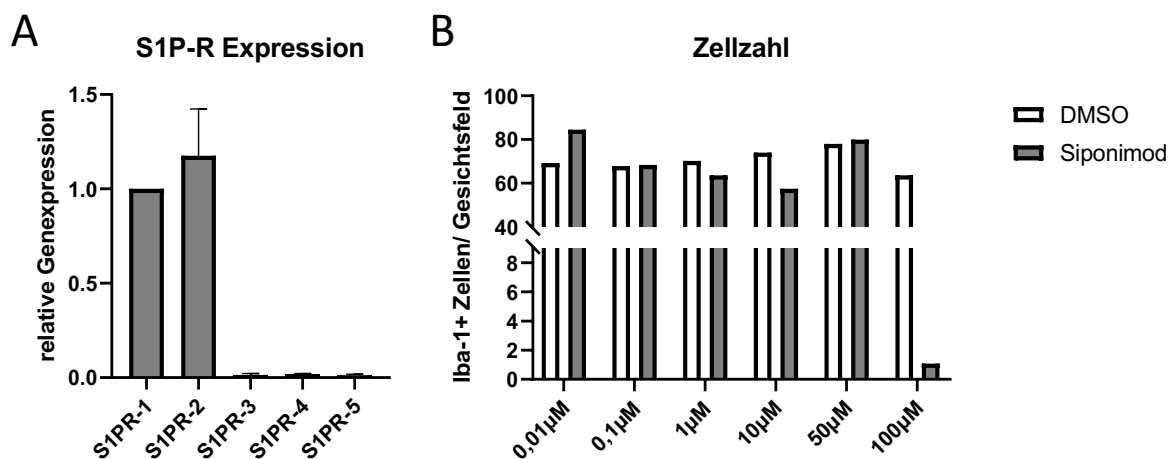


Abb. 4: S1P-Rezeptorexpression primärer Mikroglia und Zellzahlverlust bei 100 μ M Siponimod (A) q-RT-PCR-Analyse der S1P-Rezeptoren und ihrer relativen Expression. Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 4 unabhängigen Experimenten. Jeweilige Ct-Mittelwerte sind 26,4 (S1PR₁), 26,2 (S1PR₂), 32,9 (S1PR₃), 32,1 (S1PR₄) und 33,1 (S1PR₅). (B) Statistische Analyse mikroglialer (Iba1-positive Zellen) Zellzahlen entstammen 1 Experiment.

3.4 Siponimod moduliert Genexpression LPS-abhängig

Nachdem eine toxische Dosis von 100 μM Siponimod bestimmt werden konnte, wurden für die anschließende Bestimmung der Genexpression Stimulationskonzentrationen von 10 μM und 50 μM Siponimod festgelegt. Hierzu wurden die primären Mikroglia in 24-*well*-Platten ausgesät und für je 24 h mit der entsprechenden Konzentration Siponimod/DMSO stimuliert. Um ein inflammatorisches Milieu zu simulieren, wurden 100 ng/ml LPS bzw. Pufferlösung als Kontrolle parallel zur Siponimodstimulation hinzugegeben. Die Analyse eines breiten Spektrums an Mikroglia markern und -genen zeigte, dass Siponimod die Aktivierung von Mikroglia stark moduliert, ohne einen ausschließlichen pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp zu bedienen. Dies ist in der Gruppe der proinflammatorischen Gene TNF- α , IL-1 β , IL-6 und iNOS zu sehen. Unter Stimulation mit 10 μM Siponimod (Abb. 5 A - D) veränderte sich die Genexpression nicht signifikant, wenngleich im Falle von iNOS der Trend in Richtung einer Induktion geht. Eine proinflammatorische Polarisierung durch LPS wurde durch Siponimod nicht beeinflusst bzw. konnte nicht aufgehoben werden. Im Vergleich dazu zeigte sich durch Stimulation mit 50 μM Siponimod (Abb. 6 A - D), dass Siponimod allein ähnlich wie bei der niedrigeren Stimulationskonzentration keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression der proinflammatorischen Marker hat, lediglich für IL-6 und iNOS ergibt sich eine leichte, nicht-signifikante Induktion. Anders verhält es sich in der Gruppe der proinflammatorisch aktivierten Mikroglia. Zunächst einmal zeigte sich die zu erwartende Induktion proinflammatorischer Gene durch LPS (Abb. 5 und 6 A – D). Im Gegensatz zu 10 μM gelang hier durch 50 μM Siponimod die durch LPS-induzierte Expression von TNF- α und IL-1 β (Abb. 6 B) deutlich und signifikant zu verringern. Im Falle von TNF- α geschieht dies sogar nahezu auf das Ausgangsniveau (Abb. 6 A). Für die LPS-abhängige Induktion von IL-6 und iNOS hatte eine erhöhte Siponimodkonzentration kein verändertes Expressionsmuster zur Folge (Abb. 6 C, D). IL-27 ist ein Zytokin, welches sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweist und von Astrozyten in MS-Läsionen exprimiert wird (Fitzgerald und Rostami, 2009, Sénécal et al., 2016). Durch Stimulation mit Siponimod zeigt sich eine geringe und nicht-signifikante Supprimierung für 10 μM (Abb. 5 E) bzw. Induktion für 50 μM (Abb. 6 E). Jedoch ist Siponimod in der höheren 50 μM Konzentration in der Lage die durch LPS induzierte Genexpression um den Faktor 3 zu verringern (Abb. 6 E). Zu sehen ist bis hierhin folglich ein vor allem in Abhängigkeit von LPS messbarer Effekt von Siponimod, welches in hoher Dosierung eine proinflammatorische Polarisierung abfangen kann.

Innerhalb der antiinflammatorischen Gene zeigte sich ein gemischteres Bild. IGF-1 wurde sowohl durch 10 als auch 50 μ M Siponimod nicht signifikant beeinflusst, jedoch zeigte sich eine deutliche Supprimierung durch LPS, welche durch Siponimod nicht aufgehoben wurde (Abb. 5 und 6 F). ARG-1 wurde durch Siponimod allein nicht, durch LPS jedoch sehr stark induziert, ohne dass eine Kombination der beiden einen veränderten Effekt zur Folge hatte (Abb. 5 und 6 G). Die Expression von IL-4 wurde durch 10 μ M Siponimod nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 5 H). Eine Stimulation mit 50 μ M Siponimod bewirkte jedoch eine Induktion um das etwa 7-fache, wenngleich sich die Expression im proinflammatorischen Milieu mit LPS wieder normalisierte (Abb. 6 H). TGF- β hat vielseitige kontextabhängige Funktionen im Organismus und wirkt dabei unter anderem proapoptotisch und immunsuppressiv. Durch eine Induktion der IL-17-Expression wird zudem eine möglicherweise krankheitsfördernde Wirkung angenommen (Mirshafiey und Mohsenzadegan, 2009). Durch die Stimulation mit Siponimod und LPS (Abb. 5 und 6 J) zeigte sich kein eindeutiges Bild, einzig im höheren Stimulationsmuster schien eine Kombination von Siponimod und LPS zu einer reduzierten Genexpression zu führen. Ähnlich verhielt es sich für YM-1 (Abb. 5 und 6 I), auch hier ergab sich keine signifikante Änderung im Expressionsmuster, jedoch mit der Tendenz einer Geninduktion unter alleiniger Stimulation mit 50 μ M Siponimod (Abb. 6 I). IFN- β ist, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, eines der ersten MS-Medikamente und setzt an verschiedenen Stellen des Immunsystems, allen voran des peripheren Immunsystems, an (Jakimovski et al., 2018). Unter Stimulation mit 10 μ M Siponimod ergab sich kein signifikanter Effekt (Abb. 5 K), 50 μ M Siponimod fingen jedoch die durch LPS induzierte Genexpression nahezu vollständig ab (Abb. 6 K). IL-10 ist ein Zytokin mit potenter antiinflammatorischer Wirkung und der Fähigkeit, die Synthese von IFN- γ zu unterdrücken (Imitola et al., 2005, Kwilas et al., 2015). In der geringeren Konzentration von 10 μ M Siponimod (Abb. 5 L) deutete sich, wenngleich ohne statistische Signifikanz, an, dass Siponimod die IL-10-Expression leicht senkt und LPS die Genexpression induziert. Im Gegensatz dazu führte eine höhere Konzentration von 50 μ M (Abb. 6 L) dazu, dass die durch proinflammatorische Polarisierung induzierte Expression rückgängig gemacht wurde, während sich die Expression ohne Polarisierung im Ausgangsbereich hielt.

Die Expression des Phagozytose-Markers MerTK (Abb. 5 und 6 M) veränderte sich durch Stimulation mit Siponimod nicht signifikant, jedoch schien eine Erhöhung der Siponimodkonzentration auf 50 μ M eine leichte Induktion zu bedingen. Während LPS allein und in Kombination mit 10 μ M Siponimod zu einer leicht verstärkten Genexpression um

den Faktor 1,5 - 2 führte (Abb. 5 M), reduzierte die Kombination von 50 μ M Siponimod und LPS die Expression (Abb. 6 M). TREM-2, ein Mikroglia-spezifischer Oberflächenrezeptor, spielt eine wichtige Rolle in der mikroglialen Entwicklung, Proliferation und phagozytotischer Aktivität (Cignarella et al., 2020). Seine Genexpression wurde durch Siponimod allein nicht wesentlich beeinflusst. Ein proinflammatorisches Milieu hatte jedoch eine signifikante Suppression zur Folge, die durch Siponimod nicht abgefangen werden konnte (Abb. 5 und 6 N).

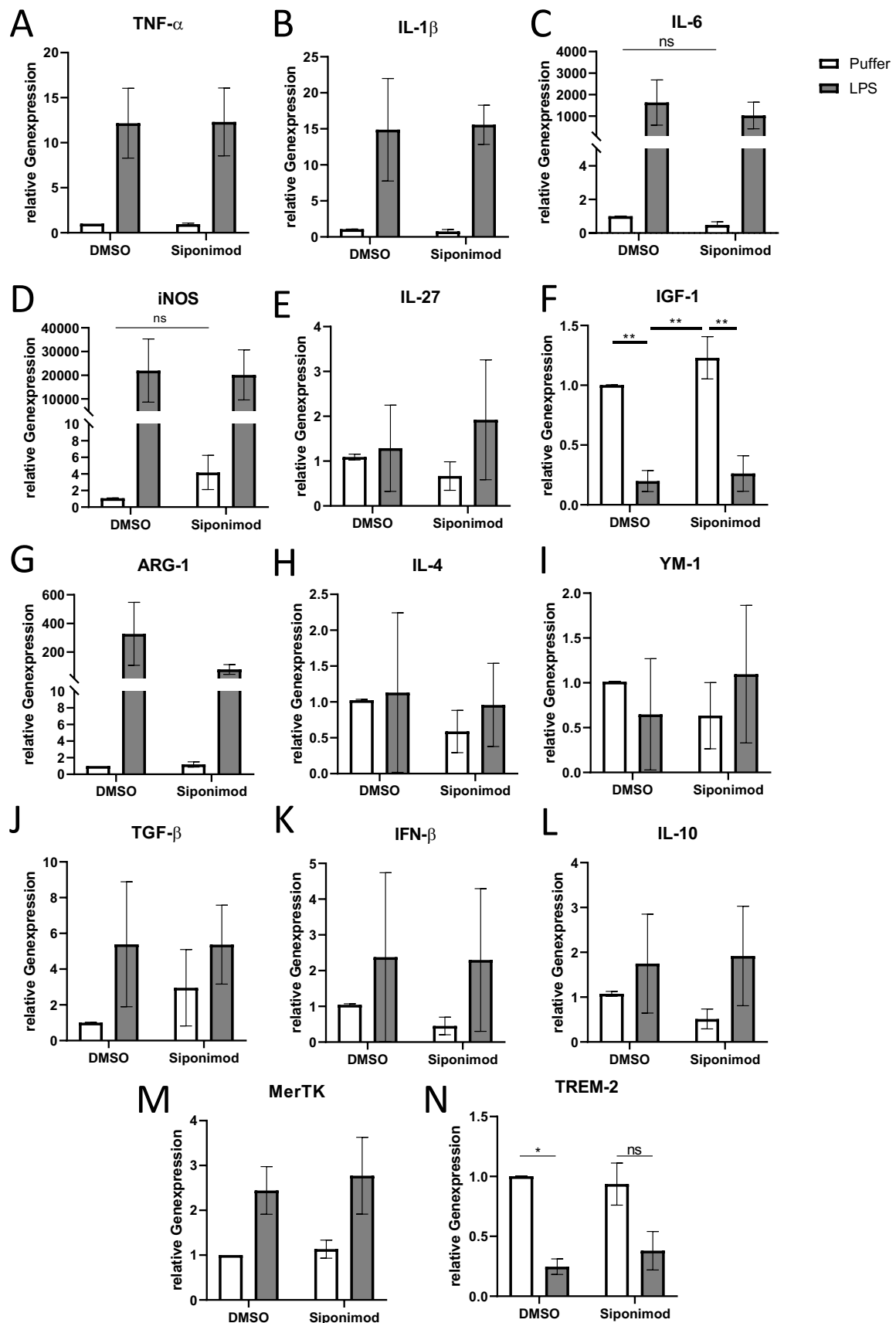


Abb. 5: q-RT-PCR-Analyse der Genexpression pro-und antiinflammatorischer Gene nach Stimulation mit 10 μ M Siponimod. Dargestellt sind die Gene TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, IL-27, IGF-1, ARG-1, IL-4, YM-1, IL-10, TGF- β , IFN- β , MerTK und TREM-2. Stimuliert wurde mit 10 μ M Siponimod/DMSO und 100 ng/ml LPS/Puffer für 24 Stunden. Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 4 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz für * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

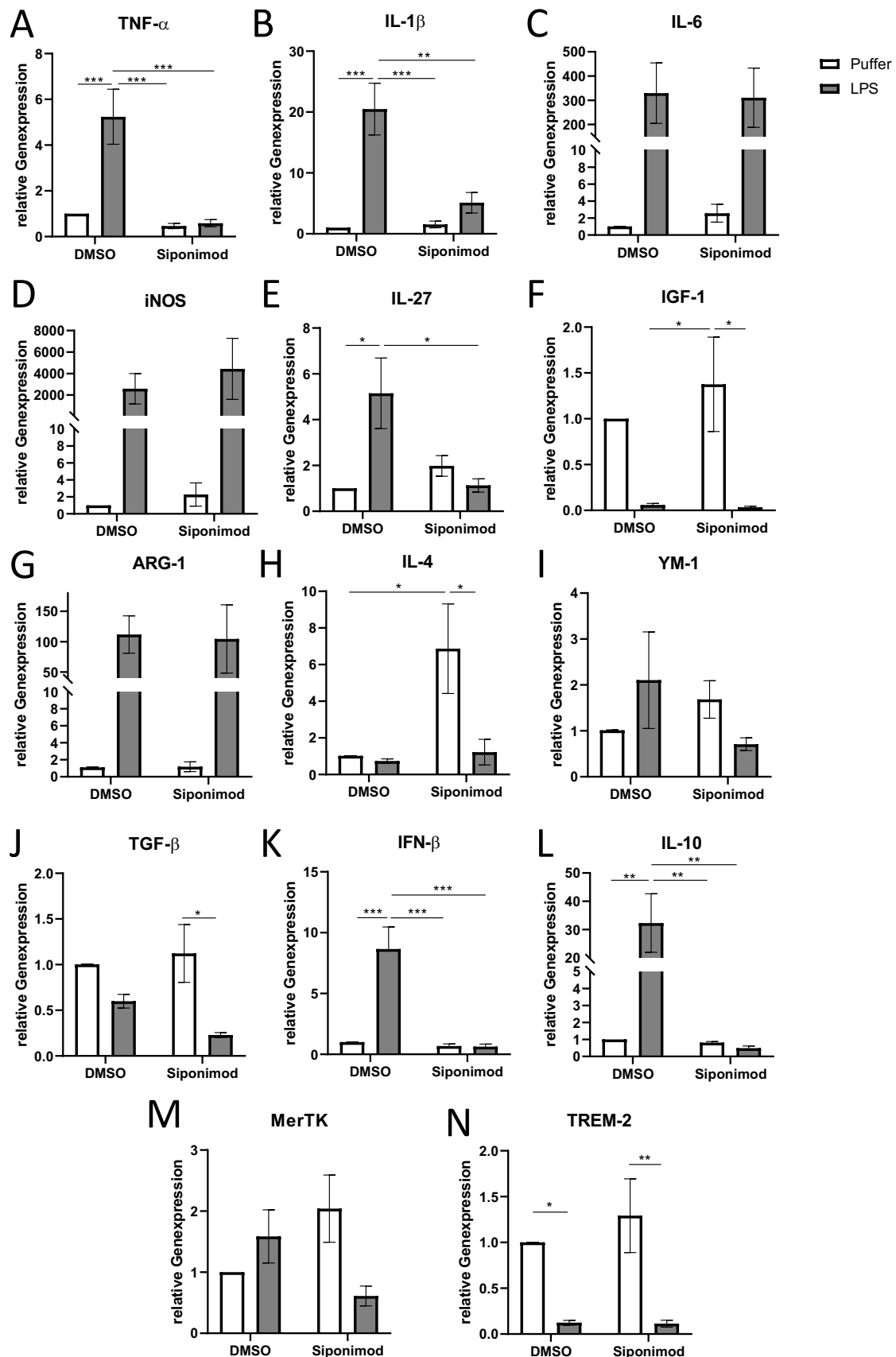


Abb. 6: q-RT-PCR-Analyse der Genexpression pro- und antiinflammatorischer Gene nach Stimulation mit 50 μ M Siponimod. Dargestellt sind die Gene TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, IL-27, IGF-1, ARG-1, IL-4, YM-1, IL-10, TGF- β , IFN- β , MerTK und TREM-2. Stimuliert wurde mit 50 μ M Siponimod/DMSO und 100 ng/ml LPS/Puffer für 24 Stunden. Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 4 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz für * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.5 Siponimod reduziert mikrogliale iNOS-Expression nach proinflammatorischer Polarisierung

Mikroglia reagieren auf eine Aktivierung mit einer phänotypischen Veränderung, welche mit einer Vergrößerung der Zelloberfläche und einer Formveränderung einhergeht (abd-el-Basset und Fedoroff, 1995). Während sie im gesunden Gehirn als kleine rundliche Zellen zu finden sind, wandeln sie sich nach Aktivierung in eine amöboide Form mit größerem Zellkörper, prominenten Fortsätzen und vermehrten Vakuolen. (Wendimu und Hooks, 2022). Um die Effekte von Siponimod auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Stimulationsmuster verwendet und zusätzlich ein weiterer Zeitpunkt nach 3 Tagen verwendet: Primäre Rattenmikroglia wurden ausgesät und für 24 h oder 72 h mit Siponimod/DMSO in den Konzentrationen 10 μ M bzw. 50 μ M stimuliert. Zusätzlich wurde zur Schaffung eines proinflammatorischen Milieus LPS/Puffer in der Konzentration 100 ng/ml parallel zur Stimulation mit Siponimod hinzugegeben. Nach Fixation wurde gegen Iba-1 und iNOS immunzytochemisch gefärbt, Zellkerne wurden mittels DAPI sichtbar gemacht. Die Auswertung von mittlerer Zellgröße und Anteil iNOS-positiver Zellen erfolgte automatisiert mittels Erstellung eines Negativbildes und Schwellenwertfestlegung. Zum Eintageszeitpunkt ergab sich für die mittlere Zellgröße (Abb. 7A) für keine der beiden Stimulationskonzentrationen von Siponimod statistische Signifikanz, jedoch mit der Tendenz, dass Siponimod in der höheren Konzentration eine durch LPS hervorgerufene Zellvergrößerung wieder rückgängig machen zu können schien. Nach drei Tagen (Abb. 7B) ergab sich durch eine proinflammatorische Aktivierung mit LPS ohne gleichzeitige Siponimodstimulation ein signifikanter Anstieg der mittleren Zellgröße. Siponimod allein reduzierte in der niedrigen Konzentration mit 10 μ M nicht-signifikant und in der hohen Konzentration mit 50 μ M signifikant die mittlere Zellgröße. Besonders wichtig erscheint zudem, dass 50 μ M Siponimod eine proinflammatorische Aktivierung, gemessen an der Zellgröße, rückgängig machen und die Zellgröße bis mindestens auf das Ausgangsniveau verkleinern konnte.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal, welches in hohen Konzentrationen in aktiven MS-Läsionen vorkommt. Dies beruht auf einer erhöhten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) in beispielsweise myeloiden Zellen oder Astrozyten im proinflammatorischen Milieu. NO spielt eine wichtige Rolle in der Funktionsstörung der Blut-Hirn-Schranke, axonaler Degeneration und der mitochondrialen Dysfunktion (Smith und Lassmann, 2002, Tang et al., 2017). Folglich war

es das Ziel zu untersuchen, ob Siponimod auch die Expression des iNOS-Proteins modulieren kann. Nach einem Tag änderte sich der Anteil an iNOS-positiven Zellen (Abb. 7C, E, G) durch sowohl 10 als auch 50 μ M Siponimod nicht wesentlich. LPS steigerte den Anteil um das etwa 30-40-fache, ohne dass Siponimod diesen Effekt rückgängig machen konnte. Nach drei Tagen (Abb. 7 D, F, H) zeigt sich ein anderes Bild: Zwar hat Siponimod allein weiterhin keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil iNOS-positiver Zellen, jedoch ist es in der Lage, den durch LPS induzierten Anstieg signifikant abzufangen. Im Fall von 10 μ M Siponimod gelang dies auf etwa die Hälfte des inflammatorischen Niveaus und im Fall von 50 μ M Siponimod nahezu vollständig. Siponimod scheint insbesondere im proinflammatorischen Milieu neuroprotektiven Eigenschaften aufzuweisen und die iNOS-Expression zu reduzieren.

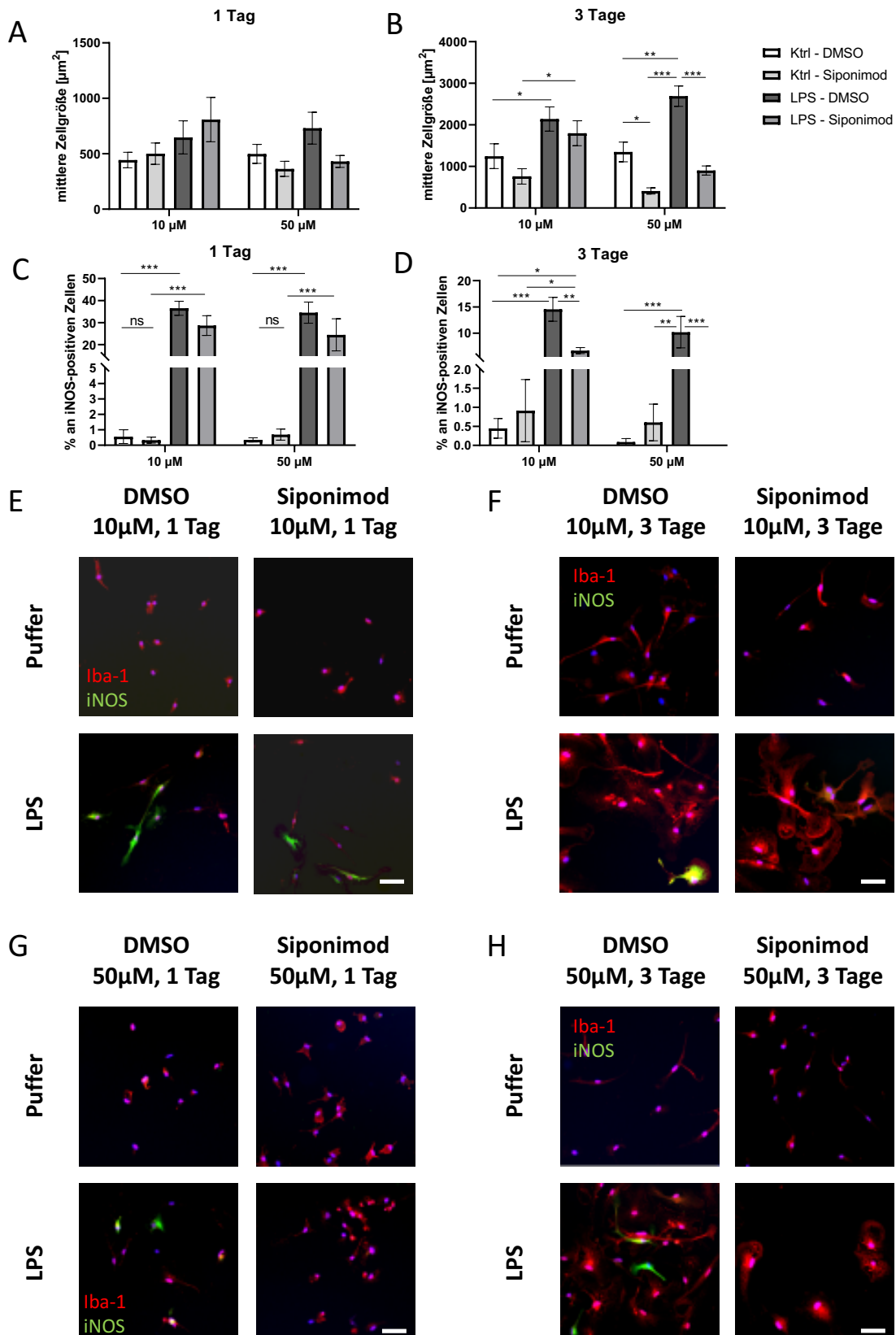


Abb. 7: Mikrogliale iNOS-Expression nach Siponimodstimulation im inflammatorischen Milieu. Statistische Analyse der mittleren Zellgröße in μm^2 nach 1 Tag (A) oder 3 Tagen (B) und des Anteils iNOS-positiver Zellen nach 1 (C) oder 3 Tagen (D). Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ SEM und entstammen 3 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz für * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. (E-H) Representative Bilder der Stimulation mit 10 oder 50 μM Siponimod/DMSO und 100 ng/ml LPS/Puffer nach 1 (E, G) oder 3 Tagen (F, H) sowie der Stimulationskonzentration von 10 μM (E, F) oder 50 μM (G, H). Immunzytochemische Färbungen mit DAPI (blau), Iba-1 (rot) und iNOS (grün). Maßstabsbalken: 25 μm .

4 Diskussion

Neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer Vielzahl von möglichen Symptomen einher und weisen meist eine über kurz oder lang voranschreitende Krankheitsschwere auf. Hinzu kommt, dass die Krankheitsentstehung häufig nicht vollständig verstanden ist sowie die Diagnosestellung zu einem Zeitpunkt erfolgt, bei dem auf zellulärer Ebene teils schon irreversibler Schaden genommen wurde und vorrangig eine Progressionshemmung erzielbar ist. Neue therapeutische Optionen werden daher für viele Erkrankungen gesucht, so auch für die Multiple Sklerose, deren Therapie sich weiterhin als schwierig darstellt. Nachdem lange Zeit ein eher ungerichteter, immunsupprimierender Ansatz ähnlich zu anderen Krankheiten gewählt wurde (und im Akutfall weiterhin gewählt wird), besteht das Bestreben einer vermehrt zielgerichteten Therapie im Sinne einer Immunmodulation. Als Angriffspunkt einer solchen Immunmodulation dienen unter anderem Mikroglia als Zellen des zentralen Nervensystems. Sie sind an der direkten Abwehr und Bekämpfung von Infektionen oder Verletzungen beteiligt und erfüllen weitere wichtige Aufgaben wie Phagozytose von Zell- und Gewebedebris, Zytokinsekretion und können oxidativen Stress vermitteln sowie die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen (Muzio et al., 2021). Im Tiermodell der MS (EAE) zeigt sich eine Mikroglia-Aktivierung zudem bereits vor Sichtbarwerden motorischer Defizite und deutet damit auf eine zentrale Rolle in der Genese der Erkrankung hin (Haji et al., 2012, Moreno et al., 2014, Gentile et al., 2015).

Der selektive Sphingosin-1-Phosphat Modulator Siponimod ist ZNS-gängig und kann somit direkte Effekte auf Mikroglia vermitteln. Seine Zulassung erhielt er für den Effekt auf das periphere Immunsystem mit einer verminderten Leukozytenmigration. Darüber hinaus sind multiple weitere Wirkungsweisen mit insbesondere neuroprotektiven Eigenschaften denkbar, positive Effekte Siponimods im Sinne einer verminderten Krankheitsschwere oder Reduktion der Demyelinisierung wurden bereits in der EAE gezeigt (Gentile et al., 2016, O'Sullivan et al., 2016). Um die Komplexität des Wirkmechanismus und -profils weiter zu verstehen, wurde in dieser Arbeit nun die Wirkung auf die immortalisierte Zelllinie BV2 sowie primäre Rattenmikroglia untersucht.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Siponimod sowohl einen direkten als auch neuroprotektiven Effekt hat, wurden Mikroglia zum einen mit Siponimod allein behandelt und zum anderen nach Vorbehandlung mit Siponimod ein proinflammatorisches Agens mit TNF- α oder LPS hinzugefügt.

4.1 Antiinflammatorische Effekte Siponimods auf BV-2-Mikroglia

BV2-Zellen sind immortalisierte Mikrogliazellen der C57BL/6-Maus. Sie exprimieren vorrangig den S1P-Rezeptor 1 (vgl. Kapitel 3.1), über den Siponimod die Expression von verschiedenen an pro- und antiinflammatorischen Prozessen beteiligten Genen beeinflusst. Besonders ausgeprägt fällt diese Geninduktion im antiinflammatorischen Panel bzw. innerhalb der antiinflammatorischen Gengruppe auf. Diese breite Induktion lässt eine neuroprotektive Wirkung, welche an verschiedenen Stellen ansetzt, annehmen. Hierzu zählen antiinflammatorische Oberflächenmarker, zu denen zum Beispiel CD-206 gehört, dessen vermehrte Expression mit einer Internalisierung bzw. Phagozytose entsprechender Liganden einhergeht und somit direkt protektiv wirkt (Cherry et al., 2014). Zu den zytokinvermittelten neuroprotektiven Effekten trägt IL-4 bei, welches IFN- γ hemmt und somit die Produktion von TNF- α und NO supprimiert (Chao et al., 1993). Die sekretorische Ebene wird über YM-1 abgebildet, ein Protein, welches einen wichtigen Marker für Antiinflammation in murinen Zellen darstellt, eine wichtige Rolle in der extrazellulären Homöostase spielt und dessen Freisetzung wiederum von IL-4 abhängt (Raes et al., 2002, Cherry et al., 2014, Kang et al., 2022). Als Beispiel für enzymatisch vermittelte Neuroprotektion dient ARG-1, dessen Substratumwandlung für Wundheilung und Gewebeumbau (*remodeling*) benötigt werden. Gleichzeitig ist sie ein direkter Gegenspieler zur induzierbaren Stickstoffsynthase (iNOS), konkurriert um deren gemeinsame Substrate und hat damit eine direkte antiinflammatorische Wirkung (Hesse et al., 2001, Munder et al., 2005, Munder, 2009, Cherry et al., 2014). Um eine Aussage bezüglich pro- oder antiinflammatorischer Aktivierung treffen zu können, lassen sich iNOS und ARG-1 aufgrund des Konkurrierens um das gleiche Substrat auch ins Verhältnis setzen und erlauben so eine Unterscheidung hinsichtlich der klassischen M1 oder M2-Polarisierung (Corraliza et al., 1995, Modolell et al., 1995). Weiter bekräftigt wird die umfassende antiinflammatorische Wirkung Siponimods auf BV-2 nochmals durch die Induktion von IGF-1 und MerTK. Weitere Versuche könnten in Zukunft außerdem MS-assoziierte antiinflammatorische Gene wie z.B. BACH-2, PTGER4 und ZFP36L1 unter Stimulation mit Siponimod miteinbeziehen (Perga et al., 2015).

Siponimod kann somit über eine Vielzahl von Mechanismen einen neuroprotektiven Effekt bewirken, die einen auch die MS positiv beeinflussenden Einfluss nahelegen. Innerhalb der proinflammatorischen Gruppe steht demgegenüber zwar eine Induktion von IL-1 β , jedoch ohne eine gleichzeitige Induktion von TNF- α , iNOS oder IL-6 (letztere beide sind aufgrund

der nicht mehr relevanten Ct-Werte in den PCR-Messungen in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt worden). Die Hypothese, durch Siponimod einen mit TNF- α proinflammatorischen Stimulus abfangen zu können, konnte zumindest in BV2-Zellen nicht bestätigt werden. Dies steht im Gegensatz zu einem in Vorarbeiten (Gentile et al., 2016) beobachteten Effekt, bei denen mit 0,1 μ M Siponimod eine Reduktion der durch TNF- α hervorgerufene IL-6-Induktion gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu dieser Arbeit haben Gentile und KollegInnen jedoch Proteinmessung durchgeführt.

4.2 Primäre Zellen werden durch Siponimod komplex moduliert

Bisherige Versuche mit Siponimod und Mikroglia fanden ausschließlich an immortalisierten Zelllinien statt (Gentile et al., 2016). Mit Gruchot (Gruchot et al., 2022), in der auch Teile dieser Arbeit eingeflossen sind, konnten erstmals Ergebnisse innerhalb der primären Rattenmikroglia publiziert werden. Hierbei zeichnet sich ein inhomogeneres Bild als in der BV-2-Gruppe ab, nur IL-4 wird durch alleinige Stimulation mit Siponimod signifikant induziert. Eindeutiger zu sehen waren die Effekte Siponimods in der Gruppe der mit LPS kostimulierten Versuche, hier konnte die Induktion klassischer proinflammatorischer Marker (TNF- α , IL-1 β , IL-27 und IL-10) abgefangen werden. Diese Gene haben einen direkten Link zur Pathogenese der MS, sodass die entsprechende Reduktion einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf und somit den neuroprotektiven Effekt von Siponimod nahelegt. TNF- α ruft eine inflammatorische Antwort hervor, wodurch direkte neurotoxische Effekte mit neuronalem und axonalem Schaden bewirkt werden (Kollias et al., 1999, Kemanetzoglou und Andreadou, 2017), zudem hemmt es die Oligodendrozytendifferenzierung (Bonora et al., 2014) bzw. induziert deren Zelltod (Jurewicz et al., 2005). Unterstützt wird dies weiterhin dadurch, dass sowohl in aktiven MS-Läsionen als auch im Liquor von MS-PatientInnen erhöhte TNF- α -Spiegel nachweisbar sind (Sharief und Hentges, 1991, Kemanetzoglou und Andreadou, 2017). Nichtsdestotrotz scheint die Rolle von TNF- α komplexer zu sein, denn eine alleinige Herunterregulierung durch eine medikamentöse Therapie mit TNF- α -Antikörpern, wie sie in anderen autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen gängig ist, führte im Falle von Infliximab zu einer schwereren Krankheitslast mit progredienter Demyelinisierung, sodass die MS aktuell eine Kontraindikation für eine TNF-Inhibitor-Therapie darstellt (van Oosten et al., 1996). Zurückzuführen ist dies auf zwei unterschiedliche TNF-Rezeptoren, TNF-Rezeptor-1, der eine proinflammatorische Signalkette bewirkt und TNF-Rezeptor-2, der antiinflammatorische Effekte zur Folge hat, sodass sich hieraus neue therapeutische

Optionen für die Zukunft ergeben könnten (Kemanetzoglou und Andreadou, 2017, Zahid et al., 2021). Weiterhin konnte die Hochregulation von IL-1 β , einem ebenfalls klassischen proinflammatorischen Marker, durch Siponimod abgefangen werden. Auch er ist in MS Läsionen (Argaw et al., 2006, Ronchi et al., 2016) sowie im Liquor (Hauser et al., 1990, Dujmovic et al., 2009, Lin und Edelson, 2017) von MS-PatientInnen nachweisbar. Darüber hinaus unterhält IL-1 β die Leukozytenrekritierung sowie eine BHS-Beeinträchtigung (Argaw et al., 2006) und kann als Spiegel im Liquor auch als Korrelat zu fortschreitender Bewegungseinschränkung bei RRMS herangezogen werden (Rossi et al., 2014). Ähnlich stellt es sich für IL-27 dar, ein Gen, welches unter anderem von Astrozyten in MS-Läsionen produziert wird (Fitzgerald und Rostami, 2009, Sénécal et al., 2016), wodurch die neuroprotektive Wirkung Siponimods weiter unterstrichen wird.

Auffallend ist die Herunterregulation von Interferon- β im mit LPS kostimulierten Versuchsaufbau. IFN- β gehört zu den Typ-I-Interferonen, hat eine antivirale Wirkung und ist, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, eines der ersten MS-Medikamente. Zu seinen vielseitigen Wirkungen gehören unter anderem die Induktion von IL-10, Inhibition der T-Zell-Migration und Herunterregulierung des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC)-Klasse II (Jakimovski et al., 2018) – vollständig geklärt ist die Rolle von IFN- β jedoch noch nicht und insbesondere Studien, die den direkten Effekt auf die Zellen des ZNS untersuchen, gibt es kaum (Guo et al., 2008, Prinz et al., 2008).

Insgesamt ergibt sich auf Genexpressionsebene ein umfassendes Bild einer modulierten inflammatorischen Wirkung, welches die neuroprotektive Wirkung Siponimods bekräftigt. Dieses Bild lässt sich auch auf die Ebene der Immunzytochemie und Zellexpression tragen und bestätigen. Die mikrogliale Zellgröße ließ sich durch Siponimod reduzieren und eine durch LPS induzierte Zellvergrößerung vollständig rückgängig machen. Zellgröße und -form dienen als Marker einer mikroglialen Aktivierung (abd-el-Basset und Fedoroff, 1995), hierbei wandeln sich Mikroglia von kleinen runden Zellen hin zu amöboid geformten Zellen mit im Zellinneren befindlichen Vakuolen (Wendimu und Hooks, 2022). Eine Formveränderung erlaubt hierbei noch keine Aussage bezüglich im Sinne einer Aktivierung noch keine eindeutige Aussage bezüglich einer M1- oder M2-Aktivierung, sondern spricht vielmehr für eine generelle Aktivierung. Ein direkter Effekt Siponimods kann dennoch angenommen werden, wenngleich vorrangig der Standpunkt der Immunmodulation unterstrichen wird.

Ein eindeutiger Aspekt, der die neuroprotektive Wirkung Siponimods untermauert, ist eine signifikante Reduktion der iNOS exprimierenden Zellen. Während eine geringe Konzentration von NO im ZNS für die physiologischen Abläufe wichtig ist, sind eine Erhöhung von sowohl Stickstoffmonoxid als freies Radikal sowie auch iNOS an einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse beteiligt und spielen auch in der Pathogenese der MS eine wichtige Rolle. Sie sind assoziiert mit einer Blut-Hirn-Schranken-Dysfunktion, axonaler Degeneration mit beeinträchtigter Reizweiterleitung, mitochondrialer Dysfunktion sowie Demyelinisierung (Smith und Lassmann, 2002, Tang et al., 2017). Die iNOS-Expression ist streng reguliert, die mikrogliale Expression wird beispielsweise durch IFN- γ induziert und geht mit vermehrt Gewebeschäden einher (Cross et al., 1997, Danilov et al., 2003). Für die MS ist beschrieben, dass sich erhöhte NO-Spiegel im Liquor nachweisen lassen und die Höhe zudem mit der Krankheitsschwere zu korrelieren scheint (Okuda et al., 1995, Calabrese et al., 2002). Gleichzeitig besitzt iNOS auch eine regulatorische Funktion, denn im Tierversuch sind iNOS-depletierte Mäuse wiederum im besonderen Maße anfällig für die Entwicklung einer EAE (Fenyk-Melody et al., 1998). In Hinblick auf die in dieser Arbeit festgestellte reduzierte iNOS-Expression unter Siponimod ist darüber hinaus bemerkenswert, dass in chronisch aktiven MS-Läsionen oxidativer Stress eine besondere Rolle für DNA- und mitochondriale DNA-Schäden spielt (Lu et al., 2000). Hierdurch wird nochmals das starke neuroprotektive Potential Siponimods im inflammatorischen Milieu unterstrichen.

4.3 Limitationen und Aussicht

Eine wiederkehrende Thematik ist die Dosis für die Stimulationsversuche. Titrationsversuche ergaben für die primären Mikroglia eine höhere toxische Dosis. Eine weitere Eingrenzung des Zelltods mittels CC-3 ergab zumindest innerhalb der BV-2 Gruppe keinen Hinweis auf Apoptose, eine Übertragung auf primäre Zellen erfolgte nicht. In einer Färbung der BV-2-Zellen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 ließen sich praktisch alle Zellen anfärben. Da es sich hierbei allerdings um eine immortalisierte Ziellinie handelt, ist dies wenig überraschend und spricht am Ehesten nicht für eine Proliferationsinduktion nach Zellsterben. Es mag auffällig erscheinen, insbesondere im Vergleich zu Vorarbeiten (Gentile et al., 2016), dass in dieser Arbeit mit deutlich höheren Konzentrationen gearbeitet wurde. Andere Studien legen jedoch nahe, dass Konzentrationen von mehr als 10 μ M tatsächlich der im ZNS erreichten Dosis von Siponimod entsprechen (Bigaud et al, 2021). Dies erklärt sich durch die Benutzung von 10% fetalem Kälberserum mit einer nahezu vollständigen

Proteinbindung Siponimods (Gardin et al., 2017). Die hohe Proteinbindung wird ebenfalls dadurch unterstrichen, dass die Liquorkonzentration Siponimods etwa um den Faktor 1000 geringer ist als die im Hirnschnitt gemessene (Bigaud et al., 2021). Die Plausibilität und Relevanz der hier dargestellten Ergebnisse werden somit unterstrichen.

Neben der Dosis ist auch der Messzeitpunkt von großer Relevanz. In dieser Arbeit wurde ein 24 h-Zeitpunkt festgelegt. Untersuchungen zeigten jedoch, dass pro- und antiinflammatorische Mikroglia-Marker zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihren jeweiligen Peak erreichen. Klassische proinflammatorische Marker stiegen tendenziell bereits frühzeitig in ihrer Expression an, während ein Großteil der protektiv-assoziierten Gene erst 36 Stunden nach Stimulation signifikant anstiegen (Chhor et al., 2013). Für zukünftige Studien ist somit auch die Untersuchung zu möglichst vielen verschiedenen Zeitpunkten wichtig.

Wie bereits angedeutet gibt es eindeutige Hinweise, dass die strenge Trennung in M1- und M2-Mikroglia nicht mehr zutreffend ist. Es wurde angenommen, dass aufgrund von Schaden bzw. Infektion Mikroglia den klassischen M1-Aktivierungszustand annehmen und die gleiche Zelle im Verlauf ein M2-Reperaturstadium annimmt (Stout et al., 2005, Kigerl et al., 2009, Perry et al., 2010). Jedoch scheinen Mikroglia vielmehr eine heterogene Gruppe zu sein, die auf den gleichen Stimulus in unterschiedlicher Umgebung verschieden reagieren, zwischen den genannten Aktivierungstypen dynamisch wechseln und hierbei auch Zwischenstadien annehmen können (Ransohoff, 2016, Hammond et al., 2019, Stratoulis et al., 2019). Dies hat auch zur Folge, dass sowohl hier als auch in zukünftigen Studien ein breites Panel an untersuchten Markern herangezogen werden muss, um eine möglichst exakte Aussage über den Aktivierungszustand treffen zu können. Neuere Studien haben darüber hinaus mittels RNA-Sequenzierung sowie Genomweiten Assoziationsstudien (*genome-wide association studies*, GWAS) die Existenz sogenannter krankheitsassoziiierter Mikroglia (*disease-associated microglia*, DAM) beschrieben (Keren-Shaul et al., 2017). Diese DAMs wurden erstmalig in neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer nachgewiesen. Auch wenn die genauen Mechanismen teils noch unklar sind, scheinen sie über neurodegenerationsassoziierte molekulare Muster (*neurodegeneration-associated molecular patterns*, NAMP) einen Mechanismus zu haben, Schäden innerhalb des ZNS zu erkennen. Hierdurch kommt Mikroglia innerhalb vieler neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder dem Altern allgemein eine wichtige Rolle zu (Deczkowska et al., 2018). Alle DAMs haben eine für ihre Erkrankung einzigartige funktionelle als auch transkriptionelle

Signatur (Keren-Shaul et al., 2017), allein dies offenbart bereits einige therapeutische Möglichkeiten, um den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen zu beeinflussen. Weitere Studien deuten zudem darauf hin, dass auch die Stimulation mit Siponimod wiederum eine neue und einzigartige Zytokinsignatur hervorbringt (Gruchot et al., 2022).

Bezüglich der Limitationen der Arbeit ist zunächst die Verwendung von TNF- α in BV2-Mikroglia und LPS in primären Zellen diskutabel, wodurch eine Übertragbarkeit reduziert wird. Hintergrund ist, dass LPS konzentrationsabhängig toxische Effekte bis hin zum Zelltod auf BV2 ausübt (Kacimi et al., 2011), sodass für die BV2 Stimulationsversuche TNF- α verwendet wurde. Nichtsdestoweniger bleibt LPS, obwohl es als bakterielles Toxin in proinflammatorischen Versuchen sicherlich andere Nachteile mit sich bringt, der in mikroglialen Versuchsaufbauten die am häufigsten verwendete Substanz zur proinflammatorischen Stimulation (Chen et al., 2012, Ye et al., 2020). LPS scheint gleichzeitig eine teilweise gesteigerte Immunantwort, beispielsweise für IL-10, hervorzurufen (Lively und Schlichter, 2018), ein Effekt, der auch in dieser Arbeit zu sehen ist. Gleichzeitig werden durch die Verwendung von sowohl LPS als auch TNF- α zwei verschiedene Systeme abgebildet: LPS wirkt über den *toll-like receptor* (TLR)-4 und das angeborene Immunsystem während TNF- α eine zytokinvermittelte Wirkung membranständige und lösliche Rezeptoren bedient. Da in der MS ebenfalls beide Systeme zum Tragen kommen wird zwar die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen etwas geschmälert, jedoch wird insgesamt ein breiteres Bild erzeugt. Ein genereller Vorteil des kostimulierten Aufbaus ist, dass nahezu jede immunmodulierende Therapie mit bereits aktivierten (meist durch Verletzung, Entzündung oder sonstigen Schaden) Mikroglia konfrontiert wird, sodass das Verständnis, wie aktivierte Mikroglia auf eine Stimulation antworten, entscheidend ist. Gleichzeitig ist wiederum die Kenntnis über den Aktivierungszustand von Mikroglia ein entscheidender Faktor für die Therapiewahl und auch den Therapiezeitpunkt.

Unabhängig von der Wahl des Stimulus steht sowohl in dieser Arbeit als auch in vergleichbarer Literatur die Übertragung auf menschliche Zellen noch aus, sodass sich noch nicht sagen lässt, welches Modell der Realität schließlich am nächsten kommt. Als Grundlage bleibt die Zellkultur jedoch weiterhin unerlässlich. Die immortalisierte Zelllinie bietet unter kontrollierten Bedingungen eine hohe Konsistenz und eine schnelle Reproduzierbarkeit, sodass sie einen wesentlichen Beitrag zur Grundlagenforschung liefert. Primärzellen weisen zwar, da sie dem *in vivo* Gewebe entsprechen, eine deutlich höhere biologische Relevanz auf, sind aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer und schwierigeren

Kulturbedingungen jedoch nicht endlos einsetzbar. Spannend und derzeit unbeantwortet ist auch die Frage, ob Mikroglia geschlechterabhängig eine unterschiedliche Immunantwort hervorrufen – die MS als Autoimmunerkrankung weist bekanntermaßen eine deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko für weibliche Personen auf. Hierfür wäre in Zukunft ein Studiendesign denkbar, welches das Geschlecht als eigenes Kriterium mituntersucht, beispielsweise indem im Tierversuch männliche und weibliche Ratten nach Geburt getrennt und die jeweils isolierten Mikroglia *ex vivo* mit Siponimod stimuliert werden.

Da die Pathogenese der MS zum jetzigen Zeitpunkt weiterhin nicht vollständig verstanden ist, kann kein Studiendesign ein vollumfassendes Bild der Erkrankung widerspiegeln. Wie dargelegt hat Siponimod einen direkten Effekt auf ZNS-Zellen, in diesem Fall Mikroglia. Auch weiterreichende, teilweise indirekte Effekte, wie einen Schutz der BHS durch Zytokinreduktion, sind denkbar. Nichtsdestotrotz erfolgt der aktuell vorrangig anzunehmende Effekt von Siponimod über die in den Zulassungsstudien belegte Wirkung auf periphere Immunzellen, indem es die Leukozytenmigration ins ZNS reduziert. In der im dort entstehenden Entzündungsreaktion spielen wiederum Mikroglia eine wichtige Rolle. Diese werden wie dargelegt durch Siponimod positiv beeinflusst, wodurch ein positiver Effekt auch auf den Verlauf der MS anzunehmen ist. Weitere Studien sind aber nötig, um zum einen die Übertragung auf den menschlichen Organismus zu ermöglichen, aber auch den durch eine Siponimodstimulation entstehenden Mikroglia-Subtyp im Sinne der DAM weiter zu charakterisieren.

4.4 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der Suche nach einer möglichst zielgerichteten Therapie gegen die MS ist Siponimod als *disease-modifying therapy* Medikament für die Behandlung der SPMS, einer schweren Verlaufsform, zugelassen. In den Zulassungsstudien wurde eine signifikante Reduktion der Leukozytenmigration und konsekutiv eine verringerte Entzündungsaktivität im ZNS nachgewiesen (Kappos et al., 2016). Die vorgelegte Dissertationsarbeit konnte nun zeigen, dass Siponimod neben den peripheren Effekten auch direkte Effekte auf Mikroglia und somit Zellen des zentralen Nervensystems hat, wodurch Mikroglia als direkte Zielstruktur einer Siponimodtherapie denkbar sind. Innerhalb der BV2-Zelllinie unter Stimulation mit TNF- α bewirkt die Siponimodstimulation vor allem eine antiinflammatorische Immunantwort, während in primären Zellen in Anwesenheit eines proinflammatorischen Stimulus (LPS) eine komplexe Immunantwort im Sinne einer Modulation überwiegt. Vor allem ergibt sich aber insgesamt ein starkes Bild einer

neuroprotektiven Wirkung, welche insbesondere die neurodegenerativen Aspekte der MS adressiert. Neuere Daten zeigen, dass Mikroglia einen Krankheitsspezifischen Subtyp (DAM) annehmen (Keren-Shaul et al., 2017) und in diesem Zusammenhang auch Siponimod eine ganz eigene Zytokinantwort hervorruft, welche nicht dem klassischen M1/M2-Paradigma zuzuordnen ist (Gruchot et al., 2022). Siponimod und Sphingosin-1-Phosphat-Modulatoren generell stellen somit auch in Zukunft eine spannende Medikamentenklasse für weitere Studien dar, um die von den DMTs bisher weiter nur unzureichend abgedeckten progredienten Verläufe der MS zu adressieren.

5 Literaturverzeichnis

- ABD-EL-BASSET, E. & FEDOROFF, S. 1995. Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J Neurosci Res*, 41, 222-37.
- AL-JADERI, Z. & MAGHAZACHI, A. A. 2016. Utilization of Dimethyl Fumarate and Related Molecules for Treatment of Multiple Sclerosis, Cancer, and Other Diseases. *Frontiers in Immunology*, 7.
- ALVAREZ-LAFUENTE, R., DE LAS HERAS, V., GARCIA-MONTOJO, M., BARTOLOME, M. & ARROYO, R. 2007. Human herpesvirus-6 and multiple sclerosis: relapsing-remitting versus secondary progressive. *Multiple Sclerosis Journal*, 13, 578-583.
- ARGAW, A. T., ZHANG, Y., SNYDER, B. J., ZHAO, M.-L., KOPP, N., LEE, S. C., RAINE, C. S., BROSNAN, C. F. & JOHN, G. R. 2006. IL-1 β regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *The Journal of Immunology*, 177, 5574-5584.
- ARNOLD, L., HENRY, A., PORON, F., BABA-AMER, Y., VAN ROOIJEN, N., PLONQUET, A., GHERARDI, R. K. & CHAZAUD, B. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*, 204, 1057-69.
- BARANZINI, S. E., WANG, J., GIBSON, R. A., GALWEY, N., NAEGELIN, Y., BARKHOF, F., RADUE, E. W., LINDBERG, R. L., UITDEHAAG, B. M., JOHNSON, M. R., ANGELAKOPOULOU, A., HALL, L., RICHARDSON, J. C., PRINJHA, R. K., GASS, A., GEURTS, J. J., KRAGT, J., SOMBEKKE, M., VRENKEN, H., QUALLEY, P., LINCOLN, R. R., GOMEZ, R., CAILLIER, S. J., GEORGE, M. F., MOUSAVI, H., GUERRERO, R., OKUDA, D. T., CREE, B. A., GREEN, A. J., WAUBANT, E., GOODIN, D. S., PELLETIER, D., MATTHEWS, P. M., HAUSER, S. L., KAPPOS, L., POLMAN, C. H. & OKSENBERG, J. R. 2009. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*, 18, 767-78.
- BAUMANN, N. & PHAM-DINH, D. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 81, 871-927.
- BELANGER, M., ALLAMAN, I. & MAGISTRETTI, P. J. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*, 14, 724-38.
- BIGAUD, M., RUDOLPH, B., BRIARD, E., BEERLI, C., HOFMANN, A., HERMES, E., MUELLERSHAUSEN, F., SCHUBART, A. & GARDIN, A. 2021. Siponimod (BAF312) penetrates, distributes, and acts in the central nervous system: Preclinical insights. *Mult Scler J Exp Transl Clin*, 7, 20552173211049168.
- 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, 296-301.
- BONORA, M., DE MARCHI, E., PATERGNANI, S., SUSKI, J., CELSI, F., BONONI, A., GIORGI, C., MARCHI, S., RIMESSI, A. & DUSZYŃSKI, J. 2014. Tumor necrosis factor- α impairs oligodendroglial differentiation through a mitochondria-dependent process. *Cell Death & Differentiation*, 21, 1198-1208.
- BRUDEK, T., CHRISTENSEN, T., HANSEN, H. J., BOBECKA, J. & MØLLER-LARSEN, A. 2004. Simultaneous Presence of Endogenous Retrovirus and Herpes

- Virus Antigens Has Profound Effect on Cell-Mediated Immune Responses: Implications for Multiple Sclerosis. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 20, 415-423.
- CALABRESE, V., SCAPAGNINI, G., RAVAGNA, A., BELLA, R., FORESTI, R., BATES, T. E., GIUFFRIDA STELLA, A. M. & PENNISI, G. 2002. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *Journal of neuroscience research*, 70, 580-587.
- CHANG, A., NISHIYAMA, A., PETERSON, J., PRINEAS, J. & TRAPP, B. D. 2000. NG2-Positive Oligodendrocyte Progenitor Cells in Adult Human Brain and Multiple Sclerosis Lesions. *The Journal of Neuroscience*, 20, 6404-6412.
- CHAO, C. C., MOLITOR, T. W. & HU, S. 1993. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J Immunol*, 151, 1473-81.
- CHAUDHRY, B. Z., COHEN, J. A. & CONWAY, D. S. 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 14, 859-873.
- CHEN, Z., JALABI, W., SHPARGEL, K. B., FARABAUGH, K. T., DUTTA, R., YIN, X., KIDD, G. J., BERGMANN, C. C., STOHLMAN, S. A. & TRAPP, B. D. 2012. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*, 32, 11706-15.
- CHERRY, J. D., OLSCHOWKA, J. A. & O'BANION, M. K. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11, 98.
- CHHOR, V., LE CHARPENTIER, T., LEBON, S., ORE, M. V., CELADOR, I. L., JOSSERAND, J., DEGOS, V., JACOTOT, E., HAGBERG, H., SAVMAN, K., MALLARD, C., GRESSENS, P. & FLEISS, B. 2013. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*, 32, 70-85.
- CIGNARELLA, F., FILIPELLO, F., BOLLMAN, B., CANTONI, C., LOCCA, A., MIKESELL, R., MANIS, M., IBRAHIM, A., DENG, L., BENITEZ, B. A., CRUCHAGA, C., LICASTRO, D., MIHINDUKULASURIYA, K., HARARI, O., BUCKLAND, M., HOLTZMAN, D. M., ROSENTHAL, A., SCHWABE, T., TASSI, I. & PICCIO, L. 2020. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 140, 513-534.
- CLANET, M. 2008. Jean-Martin Charcot: 1825-1893. *The International MS Journal*, 15, 59+.
- COLES, A. 2008. Alastair Compston, Alasdair Coles. *Lancet*, 372, 1502-1517.
- CONFAVREUX, C., O'CONNOR, P., COMI, G., FREEDMAN, M. S., MILLER, A. E., OLSSON, T. P., WOLINSKY, J. S., BAGULHO, T., DELHAY, J.-L., DUKOVIC, D., TRUFFINET, P. & KAPPOS, L. 2014. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, 13, 247-256.
- CORRALIZA, I. M., SOLER, G., EICHMANN, K. & MODOLELL, M. 1995. Arginase Induction by Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in Murine Bone-Marrow-Derived Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206, 667-673.

- CRANE, M. J., DALEY, J. M., VAN HOUTTE, O., BRANCATO, S. K., HENRY, W. L., JR. & ALBINA, J. E. 2014. The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS One*, 9, e86660.
- CROSS, A. H., MANNING, P. T., STERN, M. K. & MISKO, T. P. 1997. Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination. *Journal of neuroimmunology*, 80, 121-130.
- DANILOV, A. I., ANDERSSON, M., BAVAND, N., WIKLUND, N. P., OLSSON, T. & BRUNDIN, L. 2003. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 136, 112-118.
- DAVALOS, D., GRUTZENDLER, J., YANG, G., KIM, J. V., ZUO, Y., JUNG, S., LITTMAN, D. R., DUSTIN, M. L. & GAN, W. B. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8, 752-8.
- DECZKOWSKA, A., KEREN-SHAUL, H., WEINER, A., COLONNA, M., SCHWARTZ, M. & AMIT, I. 2018. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 173, 1073-1081.
- DHIB-JALBUT, S. & MARKS, S. 2010. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 74, S17-S24.
- DIETRICH, M., HECKER, C., MARTIN, E., LANGUI, D., GLIEM, M., STANKOFF, B., LUBETZKI, C., GRUCHOT, J., GOTTLE, P., ISSBERNER, A., NASIRI, M., RAMSEIER, P., BEERLI, C., TISSERAND, S., BECKMANN, N., SHIMSHEK, D., PETZSCH, P., AKBAR, D., LEVKAU, B., STARK, H., KOHRER, K., HARTUNG, H. P., KURY, P., MEUTH, S. G., BIGAUD, M., ZALC, B. & ALBRECHT, P. 2022. Increased Remyelination and Proregenerative Microglia Under Siponimod Therapy in Mechanistic Models. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 9.
- DOMINGUES, H. S., PORTUGAL, C. C., SOCODATO, R. & RELVAS, J. B. 2016. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4.
- DUJMOVIC, I., MANGANO, K., PEKMEZOVIC, T., QUATTROCCHI, C., MESAROS, S., STOJSAVLJEVIC, N., NICOLETTI, F. & DRULOVIĆ, J. 2009. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: The elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. *Journal of neuroimmunology*, 207, 101-106.
- FENYK-MELODY, J. E., GARRISON, A. E., BRUNNERT, S. R., WEIDNER, J. R., SHEN, F., SHELTON, B. A. & MUDGETT, J. S. 1998. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *The Journal of Immunology*, 160, 2940-2946.
- FITZGERALD, D. C. & ROSTAMI, A. 2009. Therapeutic potential of IL-27 in multiple sclerosis? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9, 149-160.
- FROHMAN, E. M., RACKE, M. K. & RAINE, C. S. 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*, 354, 942-55.
- GELOSO, M. C. & D'AMBROSI, N. 2021. Microglial Pruning: Relevance for Synaptic Dysfunction in Multiple Sclerosis and Related Experimental Models. *Cells*, 10.
- GENTILE, A., DE VITO, F., FRESEGNA, D., MUSELLA, A., BUTTARI, F., BULLITTA, S., MANDOLESI, G. & CENTONZE, D. 2015. Exploring the role of microglia in mood disorders associated with experimental multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci*, 9, 243.
- GENTILE, A., MUSELLA, A., BULLITTA, S., FRESEGNA, D., DE VITO, F., FANTOZZI, R., PIRAS, E., GARGANO, F., BORSELLINO, G., BATTISTINI, L., SCHUBART, A., MANDOLESI, G. & CENTONZE, D. 2016. Siponimod

- (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 13, 207.
- GÖBEL, K., RUCK, T. & MEUTH, S. G. 2018. Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation. *Multiple Sclerosis Journal*, 24, 432-439.
- GRUCHOT, J., LEIN, F., LEWEN, I., REICHE, L., WEYERS, V., PETZSCH, P., GOTTLE, P., KOHRER, K., HARTUNG, H. P., KURY, P. & KREMER, D. 2022. Siponimod Modulates the Reaction of Microglial Cells to Pro-Inflammatory Stimulation. *Int J Mol Sci*, 23.
- GUO, B., CHANG, E. Y. & CHENG, G. 2008. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118, 1680-1690.
- HAJI, N., MANDOLESI, G., GENTILE, A., SACCHETTI, L., FRESEGNA, D., ROSSI, S., MUSELLA, A., SEPMAN, H., MOTTA, C., STUDER, V., DE CHIARA, V., BERNARDI, G., STRATA, P. & CENTONZE, D. 2012. TNF-alpha-mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 237, 296-303.
- HAMMOND, T. R., DUFORT, C., DISSING-OLESEN, L., GIERA, S., YOUNG, A., WYSOKER, A., WALKER, A. J., GERGITS, F., SEGEL, M. & NEMESH, J. 2019. Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes. *Immunity*, 50, 253-271. e6.
- HÄNEL, P., ANDRÉANI, P. & GRÄLER, M. H. 2007. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *The FASEB Journal*, 21, 1202-1209.
- HAUSER, S. L., DOOLITTLE, T. H., LINCOLN, R., BROWN, R. H. & DINARELLO, C. A. 1990. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients. *Neurology*, 40, 1735-1735.
- HESSE, M., MODOLELL, M., LA FLAMME, A. C., SCHITO, M., FUENTES, J. M., CHEEVER, A. W., PEARCE, E. J. & WYNN, T. A. 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *The Journal of Immunology*, 167, 6533-6544.
- HOHLFELD, R. & MEINL, E. 2017. Ocrelizumab in multiple sclerosis: markers and mechanisms. *Lancet Neurol*, 16, 259-261.
- HOLSTIEGE, J., STEFFEN, A., GOFFRIER, B. & BÄTZING, J. 2017. Epidemiologie der Multiplen Sklerose – Eine populationsbasierte deutschlandweite Studie.
- IMITOLA, J., CHITNIS, T. & KHOURY, S. J. 2005. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacology & Therapeutics*, 106, 163-177.
- ITO, D., IMAI, Y., OHSAWA, K., NAKAJIMA, K., FUKUUCHI, Y. & KOHSAKA, S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*, 57, 1-9.
- JAKIMOVSKI, D., KOLB, C., RAMANATHAN, M., ZIVADINOV, R. & WEINSTOCK-GUTTMAN, B. 2018. Interferon beta for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- JORDAO, M. J. C., SANKOWSKI, R., BRENDKE, S. M., SAGAR, LOCATELLI, G., TAI, Y. H., TAY, T. L., SCHRAMM, E., ARMBRUSTER, S., HAGEMEYER, N., GROSS, O., MAI, D., CICEK, O., FALK, T., KERSCHENSTEINER, M., GRUN, D. & PRINZ, M. 2019. Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science*, 363.
- JUREWICZ, A., MATYSIAK, M., TYBOR, K., KILIANEK, L., RAINE, C. S. & SELMAJ, K. 2005. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain*, 128, 2675-2688.

- KACIMI, R., GIFFARD, R. G. & YENARI, M. A. 2011. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF-kappaB, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J Inflamm (Lond)*, 8, 7.
- KANG, Q., LI, L., PANG, Y., ZHU, W. & MENG, L. 2022. An update on Ym1 and its immunoregulatory role in diseases. *Frontiers in Immunology*, 13.
- KAPPOS, L., BAR-OR, A., CREE, B. A. C., FOX, R. J., GIOVANNONI, G., GOLD, R., VERMERSCH, P., ARNOLD, D. L., ARNOULD, S., SCHERZ, T., WOLF, C., WALLSTROM, E., DAHLKE, F. & INVESTIGATORS, E. C. 2018. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*, 391, 1263-1273.
- KAPPOS, L., LI, D. K., STUVE, O., HARTUNG, H. P., FREEDMAN, M. S., HEMMER, B., RIECKMANN, P., MONTALBAN, X., ZIEMSEN, T., HUNTER, B., ARNOULD, S., WALLSTROM, E. & SELMAJ, K. 2016. Safety and Efficacy of Siponimod (BAF312) in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Dose-Blinded, Randomized Extension of the Phase 2 BOLD Study. *JAMA Neurol*, 73, 1089-98.
- KAPPOS, L., RADUE, E.-W., O'CONNOR, P., POLMAN, C., HOHLFELD, R., CALABRESI, P., SELMAJ, K., AGOROPOULOU, C., LEYK, M., ZHANG-AUBERSON, L. & BURTIN, P. 2010. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 362, 387-401.
- KARAMITA, M., BARNUM, C., MÖBIUS, W., TANSEY, M. G., SZYMKOWSKI, D. E., LASSMANN, H. & PROBERT, L. 2017. Therapeutic inhibition of soluble brain TNF promotes remyelination by increasing myelin phagocytosis by microglia. *JCI Insight*, 2.
- KEMANETZOGLOU, E. & ANDREADOU, E. 2017. CNS Demyelination with TNF-alpha Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17, 36.
- KEREN-SHAUL, H., SPINRAD, A., WEINER, A., MATCOVITCH-NATAN, O., DVIR-SZTERNFELD, R., ULLAND, T. K., DAVID, E., BARUCH, K., LARA-ASTAISO, D., TOTH, B., ITZKOVITZ, S., COLONNA, M., SCHWARTZ, M. & AMIT, I. 2017. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169, 1276-1290 e17.
- KETTENMANN, H. & VERKHRATSKY, A. 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci*, 31, 653-9.
- KIGERL, K. A., GENSEL, J. C., ANKENY, D. P., ALEXANDER, J. K., DONNELLY, D. J. & POPOVICH, P. G. 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*, 29, 13435-44.
- KIPP, M. 2020. Does Siponimod Exert Direct Effects in the Central Nervous System? *Cells*, 9.
- KOLLIAS, G., DOUNI, E., KASSIOTIS, G. & KONTOYIANNIS, D. 1999. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58, I32-I39.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 15216-15225.
- KURTZKE, J. F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*, 6, 382-427.

- KURTZKE, J. F. 2000. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J Neurovirol*, 6 Suppl 2, S134-40.
- KÜRY, P., NATH, A., CRÉANGE, A., DOLEI, A., MARCHE, P., GOLD, J., GIOVANNONI, G., HARTUNG, H. P. & PERRON, H. 2018. Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends Mol Med*, 24, 379-394.
- KWILASZ, A. J., GRACE, P. M., SERBEDZIJA, P., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. 2015. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*, 96, 55-69.
- LABANDEIRA-GARCIA, J. L., COSTA-BESADA, M. A., LABANDEIRA, C. M., VILLAR-CHEDA, B. & RODRIGUEZ-PEREZ, A. I. 2017. Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci*, 9, 365.
- LI, H., SHI, F.-H., HUANG, S.-Y., ZHANG, S.-G. & CHEN, M.-L. 2018. A Review on Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenomics of Natalizumab: A Humanized Anti- $\alpha_4\beta_1$ Integrin Monoclonal Antibody. *Current Drug Metabolism*, 19, 1213-1223.
- LI, Q. & BARRES, B. A. 2018. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 18, 225-242.
- LIN, C.-C. & EDELSON, B. T. 2017. New insights into the role of IL-1 β in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 198, 4553-4560.
- LINDSEY, J. W. 2005. Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis. *Am J Med Genet A*, 135, 53-8.
- 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). *Front Cell Neurosci*, 12, 215.
- LU, F., SELAK, M., O'CONNOR, J., CROUL, S., LORENZANA, C., BUTUNOI, C. & KALMAN, B. 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 177, 95-103.
- LUBLIN, F. D., REINGOLD, S. C. & SCLEROSIS*, N. M. S. S. A. C. O. C. T. O. N. A. I. M. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*, 46, 907-911.
- LUCAS, R. M., BYRNE, S. N., CORREALE, J., ILSCHNER, S. & HART, P. H. 2015. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*, 5, 413-24.
- MATLOUBIAN, M., LO, C. G., CINAMON, G., LESNESKI, M. J., XU, Y., BRINKMANN, V., ALLENDE, M. L., PROIA, R. L. & CYSTER, J. G. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 427, 355-360.
- MILLER, D. H., HAMMOND, S. R., MCLEOD, J. G., PURDIE, G. & SKEGG, D. C. 1990. Multiple sclerosis in Australia and New Zealand: are the determinants genetic or environmental? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 53, 903-905.
- 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. *J Immunol*, 164, 6166-73.
- MILO, R. & KAHANA, E. 2010. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*, 9, A387-94.
- MIRON, V. E. & FRANKLIN, R. J. 2014. Macrophages and CNS remyelination. *J Neurochem*, 130, 165-71.
- MIRSHAFIEY, A. & MOHSENZADEGAN, M. 2009. TGF-beta as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology*, 56, 929-36.

- MODELELL, M., CORRALIZA, I. M., LINK, F., SOLER, G. & EICHMANN, K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *European Journal of Immunology*, 25, 1101-1104.
- MORENO, M., BANNERMAN, P., MA, J., GUO, F., MIERS, L., SOULIKA, A. M. & PLEASURE, D. 2014. Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci*, 34, 8175-85.
- MUNDER, M. 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology*, 158, 638-651.
- MUNDER, M., MOLLINEDO, F., CALAFAT, J., CANCHADO, J., GIL-LAMAIGNERE, C., FUENTES, J. M., LUCKNER, C., DOSCHKO, G., SOLER, G. N., EICHMANN, K., MÜLLER, F.-M., HO, A. D., GOERNER, M. & MODELELL, M. 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 105, 2549-2556.
- MUZIO, L., VIOTTI, A. & MARTINO, G. 2021. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Frontiers in Neuroscience*, 15.
- O'SULLIVAN, C., SCHUBART, A., MIR, A. K. & DEV, K. K. 2016. The dual S1PR1/S1PR5 drug BAF312 (Siponimod) attenuates demyelination in organotypic slice cultures. *J Neuroinflammation*, 13, 31.
- OKAMOTO, Y., WANG, F., YOSHIOKA, K., TAKUWA, N. & TAKUWA, Y. 2011. Sphingosine-1-Phosphate-Specific G Protein-Coupled Receptors as Novel Therapeutic Targets for Atherosclerosis. *Pharmaceuticals*, 4, 117-137.
- OKUDA, Y., NAKATSUJI, Y., FUJIMURA, H., ESUMI, H., OGURA, T., YANAGIHARA, T. & SAKODA, S. 1995. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 62, 103-112.
- ORIHUELA, R., MCPHERSON, C. A. & HARRY, G. J. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173, 649-65.
- PEREZ-CESARI, C., SANIGER, M. M. & SOTELO, J. 2005. Frequent association of multiple sclerosis with varicella and zoster. *Acta Neurologica Scandinavica*, 112, 417-419.
- PERGA, S., MONTAROLO, F., MARTIRE, S., BERCHIALLA, P., MALUCCHI, S. & BERTOLOTTI, A. 2015. Anti-inflammatory genes associated with multiple sclerosis: a gene expression study. *J Neuroimmunol*, 279, 75-8.
- PERRY, V. H., NICOLL, J. A. & HOLMES, C. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 6, 193-201.
- PORTER, A. G. & JÄNICKE, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6, 99-104.
- PRINEAS, J. W. & GRAHAM, J. S. 1981. Multiple sclerosis: Capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Annals of Neurology*, 10, 149-158.
- PRINZ, M. & PRILLER, J. 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*, 15, 300-12.
- PRINZ, M., SCHMIDT, H., MILDNER, A., KNOBELOCH, K. P., HANISCH, U. K., RAASCH, J., MERKLER, D., DETJE, C., GUTCHER, I., MAGES, J., LANG, R., MARTIN, R., GOLD, R., BECHER, B., BRÜCK, W. & KALINKE, U. 2008. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity*, 28, 675-86.

- RAES, G., DE BAETSELIER, P., NOËL, W., BESCHIN, A., BROMBACHER, F. & HASSANZADEH GH., G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 71, 597-602.
- RANSOHOFF, R. M. 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature neuroscience*, 19, 987-991.
- REICH, D. S., LUCCHINETTI, C. F. & CALABRESI, P. A. 2018. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 378, 169-180.
- RONCHI, F., BASSO, C., PREITE, S., REBOLDI, A., BAUMJOHANN, D., PERLINI, L., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2016. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. *Nature communications*, 7, 1-11.
- ROSATI, G. 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*, 22, 117-39.
- ROSSI, S., MOTTA, C., STUDER, V., MACCHIARULO, G., VOLPE, E., BARBIERI, F., RUOCCO, G., BUTTARI, F., FINARDI, A., MANCINO, R., WEISS, S., BATTISTINI, L., MARTINO, G., FURLAN, R., DRULOVIC, J. & CENTONZE, D. 2014. Interleukin-1 β causes excitotoxic neurodegeneration and multiple sclerosis disease progression by activating the apoptotic protein p53. *Molecular Neurodegeneration*, 9, 56.
- RUCK, T., BITTNER, S., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2015. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 16414-16439.
- SAAB, A. S., TZVETANOVA, I. D. & NAVE, K. A. 2013. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol*, 23, 1065-72.
- SADOVNICK, A. D., BAIRD, P. A. & WARD, R. H. 1988. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet*, 29, 533-41.
- SAWCER, S. 2008. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain*, 131, 3118-31.
- SCOTT, L. J. 2020. Siponimod: A Review in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 34, 1191-1200.
- SÉNÉCAL, V., DEBLOIS, G., BEAUSEIGLE, D., SCHNEIDER, R., BRANDENBURG, J., NEWCOMBE, J., MOORE, C. S., PRAT, A., ANTEL, J. & ARBOUR, N. 2016. Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses. *Glia*, 64, 553-569.
- SHARIEF, M. K. & HENTGES, R. 1991. Association between Tumor Necrosis Factor- α and Disease Progression in Patients with Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 325, 467-472.
- SMITH, K. J. & LASSMANN, H. 2002. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 1, 232-41.
- SOLA, P., MERELLI, E., MARASCA, R., POGGI, M., LUPPI, M., MONTORSI, M. & TORELLI, G. 1993. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 56, 917-919.
- 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. *The Journal of Immunology*, 175, 342-349.

- STRATOULIAS, V., VENERO, J. L., TREMBLAY, M. È. & JOSEPH, B. 2019. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *The EMBO journal*, 38, e101997.
- SUGIMOTO, N., TAKUWA, N., OKAMOTO, H., SAKURADA, S. & TAKUWA, Y. 2003. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol*, 23, 1534-45.
- SUZUMURA, A., SAWADA, M., ITOH, Y. & MARUNOUCHI, T. 1994. Interleukin-4 induces proliferation and activation of microglia but suppresses their induction of class II major histocompatibility complex antigen expression. *J Neuroimmunol*, 53, 209-18.
- TANG, X., LAN, M., ZHANG, M. & YAO, Z. 2017. Effect of nitric oxide to axonal degeneration in multiple sclerosis via downregulating monocarboxylate transporter 1 in oligodendrocytes. *Nitric Oxide*, 67, 75-80.
- THAM, C. S., LIN, F. F., RAO, T. S., YU, N. & WEBB, M. 2003. Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *Int J Dev Neurosci*, 21, 431-43.
- TRAPP, B. D., PETERSON, J., RANSOHOFF, R. M., RUDICK, R., MORK, S. & BO, L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 338, 278-85.
- TSAI, H. C. & HAN, M. H. 2016. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. *Drugs*, 76, 1067-79.
- VAN OOSTEN, B. W., BARKHOF, F., TRUYEN, L., BORINGA, J. B., BERTELSMANN, F. W., VON BLOMBERG, B. M., WOODY, J. N., HARTUNG, H. P. & POLMAN, C. H. 1996. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*, 47, 1531-4.
- VENKATARAMAN, K., LEE, Y.-M., MICHAUD, J., THANGADA, S., AI, Y., BONKOVSKY, H. L., PARIKH, N. S., HABRUKOWICH, C. & HLA, T. 2008. Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate. *Circulation Research*, 102, 669-676.
- VOET, S., PRINZ, M. & VAN LOO, G. 2019. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in Molecular Medicine*, 25, 112-123.
- VOß, E. V., ŠKULJEC, J., GUDI, V., SKRIPULETZ, T., PUL, R., TREBST, C. & STANGEL, M. 2012. Characterisation of microglia during de- and remyelination: Can they create a repair promoting environment? *Neurobiology of Disease*, 45, 519-528.
- WALTON, C., KING, R., RECHTMAN, L., KAYE, W., LERAY, E., MARRIE, R. A., ROBERTSON, N., LA ROCCA, N., UITDEHAAG, B., VAN DER MEI, I., WALLIN, M., HELME, A., ANGOOD NAPIER, C., RIJKE, N. & BANEKE, P. 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*, 26, 1816-1821.
- WEBER, M. S., HOHLFELD, R. & ZAMVIL, S. S. 2007. Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, 4, 647-653.
- WENDIMU, M. Y. & HOOKS, S. B. 2022. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 11.
- YE, X., ZHU, M., CHE, X., WANG, H., LIANG, X. J., WU, C., XUE, X. & YANG, J. 2020. Lipopolysaccharide induces neuroinflammation in microglia by activating

- the MTOR pathway and downregulating Vps34 to inhibit autophagosome formation. *J Neuroinflammation*, 17, 18.
- YU, Y., SCHÜRPF, T. & SPRINGER, T. A. 2013. How Natalizumab Binds and Antagonizes $\alpha4\beta1$ Integrins *. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 32314-32325.
- ZAHID, M., BUSMAIL, A., PENUMETCHA, S. S., AHLUWALIA, S., IRFAN, R., KHAN, S. A., ROHIT REDDY, S., VASQUEZ LOPEZ, M. E. & MOHAMMED, L. 2021. Tumor Necrosis Factor Alpha Blockade and Multiple Sclerosis: Exploring New Avenues. *Cureus*, 13, e18847.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich während der Arbeit und der Anfertigung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Patrick Küry, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Projekt zu forschen. Durch die sehr gute Betreuung war es mir möglich, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen und anzuwenden. Neben der professionellen Zusammenarbeit werde ich auch die angenehme und stets hilfsbereite persönliche Art nicht vergessen.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Prof. Dr. Germing, der sich als Co-Betreuer und als Begutachter bereiterklärt und dieser Arbeit angenommen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Joel Gruchot, der mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Lieber Joel, ich hätte mir keinen besseren Labor- und Ansprechpartner als dich wünschen können. Auch als es zum Berufsstart ein schwieriger Prozess wurde, hast du immer an mich geglaubt und mich im richtigen Moment gefordert und -fördert. Danke für deine von Anfang an stets geduldige, hilfsbereite und unterstützende Art.

Ein ebenfalls großer Dank geht an die gesamte AG Küry, die mich mit offenen Armen empfangen und als Teil des Teams integriert hat. Auf eure uneingeschränkte Unterstützung konnte ich mich immer verlassen. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Anastasia Manousi, Dr. Iria Samper-Agrelo, Dr. Joel Gruchot, Dr. Laura Reiche und Dr. Vivien Weyers, durch die Spaß und Lachen nicht zu kurz kamen.

Aber auch den technischen Assistentinnen Birgit Blumenkamp, Brigida Ziegler, Marion Hendricks und Zippora Kohne möchte ich danken, dass sie mich mit ihrem unfassbaren Wissen unterstützt und an ihren praktischen Fähigkeiten haben teilhaben lassen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, auf deren Unterstützung und Motivation ich mich sowohl im Studium als auch bei der Arbeit an dieser Dissertation sowie später im Berufsleben immer verlassen konnte. All das wäre ohne euch nicht möglich gewesen.