

**Untersuchung der suppressiven Wirkung des Fibroblast Growth Factor  
Receptor Inhibitors Fexagratinib (AZD4547) auf den Verlauf einer  
experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis im Mausmodell**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Gurski, Fynn  
aus Hagen

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Aus der Arbeitsgruppe Multiple Sklerose und Neuroimmunologie  
der Klinik für Neurologie

Gutachter: Prof. Dr. Martin Berghoff

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Sachs

Tag der Disputation: 02.12.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Multiple Sklerose .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Pathogenese .....	2
1.1.3 Symptome .....	5
1.1.4 Verlaufsformen .....	6
1.1.5 Diagnostik.....	7
1.1.6 Therapie .....	9
1.2 Der unselektive FGFR-Inhibitor Fexagratinib (AZD4547) .....	12
1.3 Fibroblast growth factor (FGF) .....	14
1.4 Fibroblast growth factor receptor (FGFR) .....	15
1.5 VEGFR2 und CSF1R bei MS und EAE.....	17
1.6 Oligodendrozyten im gesunden ZNS und bei MS .....	18
1.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) .....	21
1.7.1 MOG <sub>35-55</sub> -induzierte EAE als Tiermodell für MS .....	21
1.7.2 Alternative Tiermodelle für MS .....	22
1.8 Ziele der Arbeit .....	24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1 Material.....	25
2.1.1 Primäre Antikörper für WB und IHC .....	25
2.1.2 Sekundäre Antikörper für WB und IHC .....	25
2.1.3 Primer für die RT-PCR .....	26
2.1.4 Puffer, Reagenzien und Enzyme.....	27
2.1.5 Molekularbiologische Kits .....	29
2.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.7 Laborgeräte .....	31
2.1.8 Software .....	32

2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Ethikvotum.....	33
2.2.2 Versuchsablauf.....	33
2.2.2.1 C57BL/6J Mäuse .....	33
2.2.2.2 Haltungsbedingungen während der Versuche .....	33
2.2.2.3 Induktion der EAE mit MOG <sub>35-55</sub> .....	34
2.2.2.4 Applikation von Fexagratinib (AZD4547).....	35
2.2.2.5 Probenentnahme und Fixierung der Gewebe.....	36
2.2.2.6 EAE-Scoring .....	37
2.2.3 Western Blot (WB).....	37
2.2.3.1 Probenvorbereitung .....	38
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach SMITH.....	38
2.2.3.3 Durchführung der Western Blots .....	38
2.2.3.4 Immundetektion von Proteinen.....	39
2.2.3.5 Auswertung der Western Blots .....	40
2.2.4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	40
2.2.4.1 Probenvorbereitung .....	40
2.2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	40
2.2.4.3 cDNA-Synthese .....	41
2.2.4.4 Durchführung der PCR.....	41
2.2.4.5 Auswertung der PCR.....	41
2.2.5 Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung (IHC) .....	41
2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	42
2.2.5.2 Bielschowsky-Silber-Färbung .....	42
2.2.5.3 Luxol fast blue/periodic acid-schiff-Färbung (LFB/PAS).....	42
2.2.5.4 Immunhistochemische Färbungen .....	42
2.2.5.5 Auswertung.....	43
2.2.6 Statistische Tests .....	44
2.2.7 Zusammenfassung der Methodik .....	45

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>46</b>
3.1 Reduktion der klinischen Krankheitsverläufe nach MOG <sub>35-55</sub> -induzierter EAE ....	46
3.2 AZD4547 wirkt antiinflammatorisch auf B- und T-Lymphozyten sowie Mikroglia in Läsionen der weißen Substanz des Rückenmarks .....	49
3.3 Die Applikation von AZD4547 verändert die Expressionsmuster bei FGF und FGFR.....	52
3.4 Der Immunrezeptor CSF1R und das proinflammatorische Interleukin 12 werden durch AZD4547 herunterreguliert.....	55
3.5 AZD4547 hemmt den VEGFR2 in der chronischen Phase der EAE.....	58
3.6 AZD4547 verringert die Demyelinisierung, erhöht die Anzahl von Oligodendrozyten und steigert die Remyelinisierung .....	59
3.7 AZD4547 steigert die Expression von Myelinproteinen.....	64
3.8 Der neuroprotektive Faktor BDNF ist signifikant erhöht, sein Rezeptor TrkB ist im Verlauf herunterreguliert.....	66
3.9 AZD4547 hat keinen Einfluss auf die Remyelinisierungsinhibitoren TGF $\beta$ , SEMA3A und LINGO-1 .....	68
3.10 AZD4547 hat einen Einfluss auf mitochondriale Komplexe .....	69
3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	72
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>73</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>86</b>
<b>6. Summary</b> .....	<b>87</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>88</b>
<b>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>91</b>
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	91
8.2 Tabellenverzeichnis.....	92
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
<b>10. Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>11. Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>113</b>

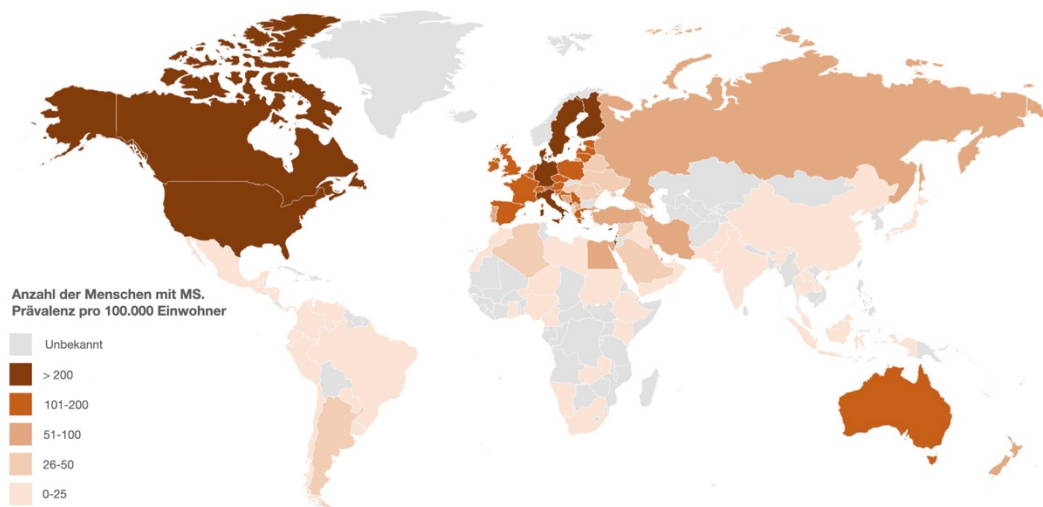
# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Epidemiologie

Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmune, inflammatorische und neurodegenerative Erkrankung mit Hauptmanifestation im zentralen Nervensystem (ZNS), die durch chronisch verlaufende demyelinisierende Prozesse geprägt ist.

Weltweit leben aktuellen Studien zufolge rund 2,8 Millionen Menschen mit MS, bei einer globalen Prävalenz von 35,9/100.000 Einwohner, die regional allerdings stark variiert<sup>203</sup>. Die jährlichen Neuerkrankungen werden mit 2,1/100.000 Einwohnern beziffert, mit einem durchschnittlichen Alter von 32 Jahren bei Erstdiagnose und einem Geschlechterverhältnis von 2:1 (w:m)<sup>203</sup>. Auffällig ist ein Anstieg der Prävalenz der Erkrankung in den vergangenen Jahren (2013: 30/100.000; 2020: 44/100.000), die auf frühere Diagnosestellung, längeres Gesamtüberleben und verbesserte Datenerfassung zurückzuführen sind<sup>43,203</sup>. Eine zwischen 1990 und 2016 reduzierte Sterblichkeitsrate bei MS (altersstandardisiert -11,5%) könnte ein Hinweis auf verbesserte medikamentöse Therapieoptionen gegen die Erkrankung innerhalb der letzten Jahre sein<sup>202</sup>. Dieser Entwicklung folgend, liegt der Höhepunkt der Years lived with disability (YLD) im sechsten Lebensjahrzehnt, nachdem die Erkrankung durchschnittlich bereits im Alter von 32 Jahren auftritt<sup>202</sup>. Anzumerken ist, dass weiterhin eine große globale Diskrepanz der Prävalenz zwischen hoch-industrialisierten Regionen wie Nordamerika, Europa und Australien (hoher sozio-demografischer-Index [SDI]), zu niedrig-industrialisierten Regionen wie Afrika, Südamerika oder Südostasien (niedriger SDI) besteht und die Diskrepanz einen Nord-Süd-Gradienten zu bilden scheint (Abb. 1)<sup>201,203</sup>. Hypothesen, die diesen geografischen Gradienten erklären können sind zum einen pathophysiologischer Natur, wie Zusammenhänge zwischen MS und juvenilen Infektionserkrankungen wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV)<sup>102,129,162</sup> oder genetischen Prädispositionen zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen<sup>202</sup>. Andererseits könnten aber auch statistische Fehler, wie wenig verlässliche bzw. unvollständige Datensätze einiger Länder, eine Rolle spielen<sup>202,203</sup>.



**Abbildung 1.** Grafische Darstellung der weltweiten Verteilung der Prävalenz von MS, eingefärbt nach Anzahl von Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern.

*Eigene Darstellung, in Anlehnung an Walton et al. <sup>203</sup>*

### 1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der Multiplen Sklerose wird aktuell weiter diskutiert und ist bis heute immer noch nicht endgültig geklärt. Allerdings werden zahlreiche Hypothesen erwogen, die versuchen eine Erklärung für die Genese der multifaktoriellen autoimmunen Entzündungsreaktionen im ZNS zu liefern. Ein Hauptauslöser der MS ist bisher nicht bekannt, vielmehr wird eine multifaktorielle Genese mit einander beeinflussenden Risikofaktoren angenommen. So wird eine primär virale Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) als Risiko für ein vermehrtes Auftreten von MS gesehen <sup>129,193</sup>. Diese meist in der Kindheit oder frühen Jugend stattfindende Infektion wird auch als der Grund für die höhere Prävalenz in nördlichen Ländern und den damit verbundenen Nord-Süd-Gradienten gesehen <sup>102</sup>. In diesem Zusammenhang wurde weiter beobachtet, dass Menschen, die vor ihrem 15. Lebensjahr ein Hoch-Risikogebiet verlassen und in ein Niedrig-Risikogebiet ziehen, das Erkrankungsrisiko des neuen Ziellandes annehmen; andersherum steigt das Risiko bei einer Migration von einem Niedrig- in ein Hoch-Risikogebiet entsprechend an <sup>102</sup>. Migranten im Erwachsenenalter behalten hingegen das Erkrankungsrisiko ihres Herkunftslandes. Des Weiteren wird ein erhöhtes Erkrankungsrisiko mit weiblichem Geschlecht, westlichem Lebensstil, unausgewogen-einseitiger Ernährung, Rauchen, Übergewicht sowie Vitamin A und D Mangel in Verbindung gebracht <sup>146,162,163</sup>. In den vergangenen Jahren gelangten die Auswirkungen von Veränderungen des Mikrobioms in Hinsicht auf eine MS-Erkrankung in den Fokus

einiger Arbeitsgruppen, konkrete Handlungsvorschläge, die über die Empfehlung einer ausgewogenen mediterranen Ernährung hinausgehen, gibt es allerdings noch nicht <sup>146</sup>. Hinweise auf genetische Einflussfaktoren bei der Entstehung von MS wurden in großen Genanalysen untersucht, deren Vorhersagekraft ist möglicherweise aber eingeschränkt, da über 200 Genvariationen gefunden werden konnten <sup>76</sup>. Rund zehn Prozent aller untersuchter Fälle wiesen jedoch eine Veränderung im HLA-DRB1-Gen auf, welches für die autoreaktive Präsentation von Antigenen auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verantwortlich ist <sup>76,175</sup>. Diese Erkenntnis könnte für das weitere Verständnis der Autoimmunreaktion der MS von Bedeutung sein, wenn sich die Ergebnisse bestätigen.

MS manifestiert sich durch disseminiert vorkommende Entzündungsherde und Demyelinisierungsprozesse in der weißen und grauen Substanz des ZNS, wie zum Beispiel in Regionen des Hirnstamms, Kleinhirns, Hippocampus, Basalganglien, Amygdala, Substantia nigra, Nervus opticus oder Rückenmarks <sup>38,122,162</sup>. Die Symptomatik variiert entsprechend mit dem Ort der Entzündung, der Größe der Läsion und kann je nach Krankheitsverlauf auch zeitlichen Veränderungen mit schubweisen Intervallen unterliegen <sup>122</sup>. Läsionen lassen sich dabei nach dem Grad der Immunzellaktivität in aktive, gemischt aktive/inaktive und chronische Läsionen einteilen, in denen fakultativ demyelinisierende Prozesse ablaufen können <sup>100</sup>. Die Vielzahl der beteiligten inflammatorischen Zellen umfasst B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten <sup>100,162</sup>. Kurz soll noch auf die Besonderheiten von Läsionen der grauen Substanz (GML) eingegangen werden, die bei rund 40% aller MS Patienten auftreten, mit den herkömmlichen diagnostischen Mitteln, wie der kontrastmittelgestützten Magnetresonanztomographie (MRT), aber schwerer zu erkennen sind <sup>23,120</sup>. Anzumerken ist, dass die Auswirkungen von Cortexläsionen weniger motorische Defizite zur Folge haben, sondern eher kognitive Fähigkeiten einzuschränken scheinen <sup>40,120</sup>. Die genaue Pathogenese der GML wirft bisher noch viele Fragen auf, als gesichert gilt allerdings eine geringere Entzündungsaktivität, mildere Demyelinisierung sowie weniger Infiltrationen von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und Mikroglia, verglichen mit Läsionen der weißen Substanz (WML) <sup>19,120,199</sup>. Die Beteiligung der Meningen scheint ein entscheidender Aspekt des Entzündungsprozesses zu sein, so konnten bei histopathologischen Untersuchungen von Gewebeproben drei verschiedene Arten von Plaques gefunden werden: Leukokortikale Plaques, die von der weißen Substanz in die graue Substanz ziehen, subpial, unterhalb der Pia mater gelegene Plaques und rein intracorticale Plaques <sup>20,23,24,105</sup>.

Im Folgenden wird nun auf die Pathogenese von WML eingegangen. Zu Anfang des Erkrankungsprozesses steht in den meisten Fällen eine inflammatorische Immunreaktion autoreaktiver CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen, die gegen körpereigenes Myelin der Myelinscheiden und Oligodendrozyten gerichtet ist <sup>101,122,162</sup>. In Folge der Ausschüttung von Zytokinen wie IL-17 und IFN- $\gamma$  werden ZNS-ständige Mikroglia aktiviert und durch Permeabilitätserhöhung der Bluthirnschranke (BBB) weitere periphere B- und T-Zellen rekrutiert <sup>11,67,101</sup>. B-Zellen sind in der Lage durch Antigen-Präsentation spezifische Antikörper gegen Bestandteile der Myelinscheiden zu produzieren und über eine parallele Komplementaktivierung die Immunreaktion zu potenzieren <sup>18,109,153</sup>. Im Zusammenspiel mit ebenfalls aktivierten zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und Mikroglia kommt es zu einer Demyelinisierung einzelner Axone sowie zum Untergang von Oligodendrozyten <sup>67,90,120,199</sup>. Nach der ersten akuten Schädigung der Axone, Myelinscheiden und Oligodendrozyten setzen, unter Umständen, langanhaltende chronische Entzündungs- und Schädigungsprozesse ein, deren Auswirkungen akkumulieren und zur neuronalen Degeneration führen <sup>105,106</sup>. Dies wird zumeist mit der Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) durch aktivierte Mikroglia initiiert, woraufhin es zu Störungen der mitochondrialen Integrität und folglich zur homöostatischen Dysbalance in den Neuronen kommt <sup>25,78,197</sup>. Eine eingeschränkte mitochondriale Funktion erschwert die suffiziente zelluläre Energieversorgung, während der Energieverbrauch bei Inflammation zusätzlich gesteigert ist <sup>15,170</sup>. Versorgungsdefizite gefährden die neuronale Integrität unter anderem durch Elektrolytverschiebungen und damit bedingter Freisetzung von pro-oxidativen Ionen wie Eisen bzw. Kupfer <sup>132,181</sup>. Erhöhte Konzentrationen von ROS führen aufgrund von Schäden an der mitochondrialen DNA zur weiteren Aggravation der Problematik <sup>10,77</sup>. Diese Prozesse unterhalten einen *circulus vitiosus*, der axonale Transportvorgänge hemmt und folglich Demyelinisierung und neuronalen Zelluntergang weiter verstärkt <sup>26,123,132</sup>. Mangelhafte axonale Transporte bewirken eine Unterversorgung der Neurone, die zu Apoptose und zur Progredienz der neuronalen Degeneration führen <sup>70,96</sup>. Ebenfalls wird die Differenzierung von OPCs durch ROS-Ausschüttung eingeschränkt, sodass das regenerative Potential in Form möglicher Remyelinisierungsprozesse sinkt <sup>187</sup>. In diesem Zusammenhang spielen Mikroglia eine doppelte Rolle, da sie neben ihrer pro-inflammatorischen Aktivität auch anti-inflammatorische Aufgaben übernehmen. So sind sie für die Phagozytose von Degradationsprodukten verantwortlich und können durch Unterstützung der Remyelinisierung die zelluläre Homöostase sogar verbessern <sup>67,135,169,210</sup>. Weiterhin bestehen noch viele offene Fragen bezüglich der genauen Regulation und Initiierung der pro- und anti-inflammatorischen Komponenten sowie der regenerativen

Remyelinisierungsprozesse. So wird eine regulatorische Wirkung im Rahmen einer Interaktion von microRNA (miRNA) mit messengerRNA (mRNA) vermutet, die zu einer Degradierung der mRNA führt und betroffene Genprodukte folglich vermindert translatiert werden <sup>139</sup>. Mehreren ZNS-spezifischen miRNAs werden dabei pro-inflammatorische Funktionen zugesprochen, wie die verstärkte Differenzierung naiver T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) zu T<sub>H</sub>17-Zellen <sup>141</sup>. Zusätzlich liefert die gesteigerte Ausschüttung von IL-17 mit daraus resultierender Demyelinisierung und Mikrogliaaktivität Hinweise auf eine immunmodulatorische Wirkung von miRNAs <sup>138,140</sup>. Astrozyten, Hauptbestandteil der neuronalen Gliazellen, bilden einen weiteren Akteur bei der regulatorischen Einflussnahme des Entzündungsgeschehen, anstatt wie häufig berichtet, nur für die Vernarbung chronischer Läsionen zuständig zu sein <sup>41,152</sup>. Genauere Untersuchungen zur Narbenbildung bzw. Astrogliose lassen erkennen, dass die überwiegend als schädlich konnotierte Gliose unter bestimmten Umständen auch neuroregenerative Wirkungen, wie verbesserte Wundheilung und Restriktion der Entzündungsprozesse, besitzt <sup>88,186</sup>. Astrozyten werden allerdings durch oxidativen Stress angeregt, inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 auszuschütten und sind an der Rekrutierung peripherer Immunzellen über die BBB ins ZNS beteiligt <sup>173,185</sup>. Gleichzeitig werden von ihnen zur Limitierung der Entzündung aber auch neuroprotektive Moleküle wie NGF, BDNF oder VEGF ausgeschüttet, wodurch sich ein zweiseitiges Bild der Astrozyten abzeichnet <sup>152</sup>.

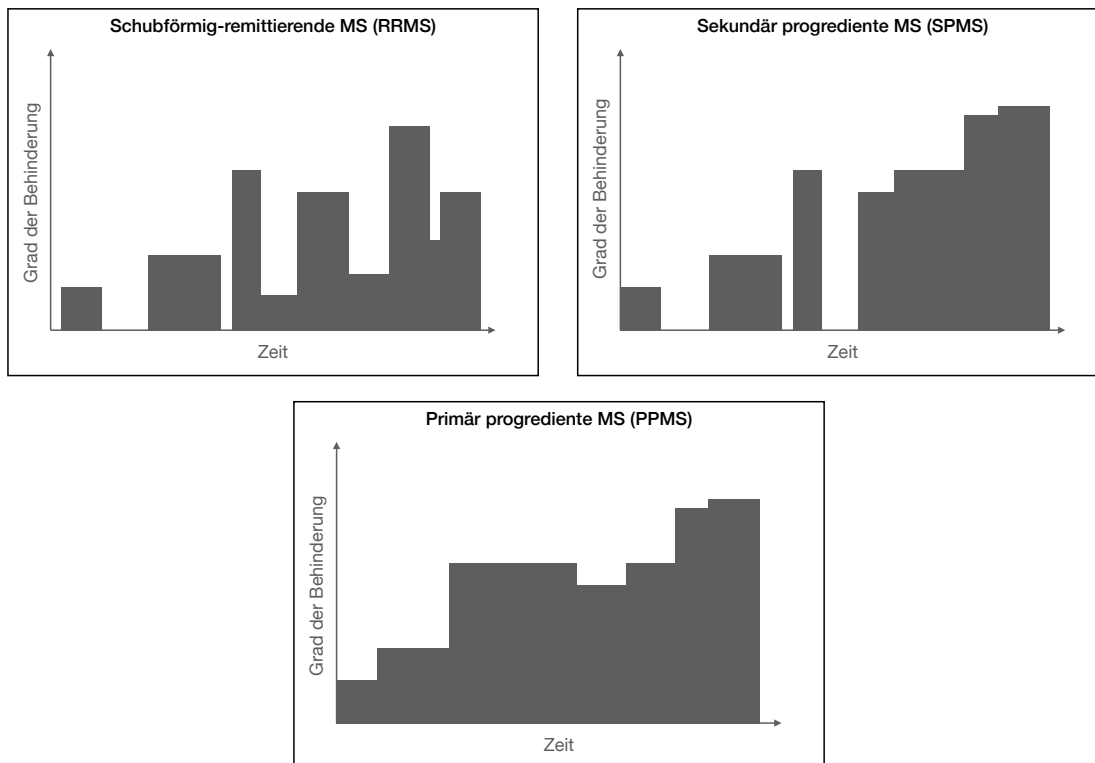
### 1.1.3 Symptome

Die Vielfalt der klinischen Symptomatik im Rahmen einer MS-Erkrankung sind enorm und erstrecken sich von sensomotorischen Defiziten bis hin zur Entwicklung depressiver Episoden. Symptome einer klinisch manifesten MS sind zu Anfang häufig Beschwerden, die im Zusammenhang mit einer Retrobulbärneuritis stehen, mit verschwommenem Sehen, Doppelbildern, schmerzhaften Augenbewegungen und gestörtem Farbsehen einhergehen und sich innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen entwickeln <sup>57,127</sup>. Im weiteren Verlauf können dann neben Par- und Hypästhesien, Paresen, Gangunsicherheiten mit Ataxien, Blasenschwäche oder kognitive Einschränkungen auftreten <sup>57,202</sup>. Besonders die sensorischen und motorischen Defizite treten gehäuft im Rahmen einer Myelitis und einem Hirnstamm-Syndrom auf, die beide auf inflammatorisch-demyelinisierende Prozesse im Rückenmark, Kleinhirn und weiteren Regionen zurückzuführen sind <sup>57</sup>. Besondere Einschränkungen des täglichen Lebens scheinen von kognitiven Defiziten und der Fatigue-Symptomatik auszugehen <sup>75,125</sup>. Dabei ist die Ursache von Fatigue-Symptomen durch Läsionen in der grauen Substanz

zu erklären, in Folge derer Schäden in Anteilen von Kerngebieten im Thalamus, Hypothalamus, Hypophyse sowie dem Hirnstamm auftreten <sup>125</sup>. Kognitive Einschränkungen scheinen dagegen eher mit kortikaler Atrophie und Läsionen der weißen Substanz in Zusammenhang zu stehen <sup>40</sup>. Hauptverantwortlich für die Progredienz der Symptomatik ist somit die Verbreitung demyelinisierter Läsionen, die Inflammation des ZNS und das Ausmaß zerebraler Atrophien, auf deren Entstehung, Ausbreitung und Regeneration pharmakotherapeutisch abgezielt wird <sup>40,52,189</sup>.

### 1.1.4 Verlaufsformen

Die möglichen Verlaufsformen der MS lassen sich in einen schubförmigen-remittierenden Verlauf (*engl.* relapsing-remitting-MS; RRMS) sowie einen primär bzw. sekundär progredienten Verlauf (PPMS, SPMS) mit stetig zunehmender Symptombelastung einteilen <sup>106,122</sup>. Ein Teil der Patienten wird mit einem klinisch-isolierten Syndrom (*engl.* clinically isolated syndrome; CIS) auffällig. Dieses umfasst eine Symptomkomponente, die im Zusammenhang mit einer entzündlich-demyelinisierenden ZNS-Erkrankung steht, aber die diagnostischen Kriterien einer MS noch nicht vollständig erfüllt <sup>119</sup>. Aktiv demyelinisierende Läsionen mit schubförmiger Exazerbation werden anschließend zur RRMS gezählt, die meist im Alter von 30 Jahren klinisch manifest wird und häufig mit einer Verzögerung von zehn Jahren in einen sekundär progressiven Verlauf übergeht <sup>106,122,176</sup>. Ein anderer Teil des Patientenkollektivs entwickelt durchschnittlich mit knapp 40 Jahren einen primär progressiven Verlauf, der ohne Remissionsphasen verläuft und kontinuierlich an Intensität zunimmt <sup>176,211</sup>. Ein Unterschied in der Geschwindigkeit der Progredienz zwischen PPMS und SPMS wurde dabei jedoch nicht festgestellt <sup>106,111,119</sup>.



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der verschiedenen Verlaufsformen einer MS aufgetragen nach Zeit und Grad der Behinderung.

*Eigene Darstellung*

### 1.1.5 Diagnostik

Zur Diagnostik der MS stehen zahlreiche apparative und meist nicht-invasive Methoden zur Auswahl. Beginnend bei klinischen Ranking-Scores zur Einschätzung des Schweregrades der körperlichen Behinderung (EDSS), über die Auswertung von MRT-Aufnahmen und der laborchemischen Analyse von Liquorpunktaten mit dem Auftreten von oligoklonalen Banden bis hin zur neurophysiologischen Diagnostik evozierter Potenziale (EP).

Der EDSS fokussiert sich auf die Quantifizierung von motorischen und sensorischen Einschränkungen im Rahmen einer MS-Erkrankung<sup>103</sup>. Dabei werden Veränderungen in sieben funktionellen Systemen betrachtet und entsprechend ihrer Schwere bewertet. Zu den funktionellen Systemen gehören das Kleinhirn, die Pyramidenbahnen, der Hirnstamm, sensorische Defizite, Rektum und Harnblase, Sehstörungen und kortikale Einschränkungen<sup>103</sup>. Ein Ausschnitt aus dem Ranking-System zeigt, wie die Punktwerte definiert sind: 0 Punkte entspricht keinen Einschränkungen, bei  $\leq 3,5$  Punkten besteht volle Gehfähigkeit mit mäßiger Behinderung, von 4 – 6,5 Punkten ist die Gehfähigkeit

eingeschränkt und der Patient auf Unterstützung angewiesen, bei 7 oder mehr Punkten liegt eine weitgehende Immobilität bis hin zum Erlöschen der Kommunikationsfähigkeit vor, bei 10 Punkten ist der Tod durch MS eingetreten<sup>103</sup>. Ein Kritikpunkt des EDSS ist die mangelnde Implementierung von kognitiven Defiziten, die nachweislich einen großen Einfluss auf das Empfinden von Behinderung und Einschränkung im Alltag haben<sup>75,125,136</sup>.

Eine wichtige Säule in der Diagnostik der MS stellt die umfassende MRT-Bildgebung dar, die nicht nur der Erstdiagnostik dient, sondern auch zur Verlaufskontrolle benutzt wird<sup>204</sup>. Dazu werden einerseits demyelinisierende sowie inflammatorische Läsionen in der grauen und weißen Substanz gesucht, andererseits aber auch ein wachsendes Augenmerk auf die Identifizierung zerebral-atrophischer Prozesse gelegt<sup>189,204</sup>. Bei der verlässlichen Darstellung und Messung von Hirnatrophien im klinischen Alltag scheint es aktuell jedoch noch technische Einschränkungen zu geben<sup>4,189</sup>. Wesentlich verbreiteter und etablierter ist die Bildgebung von WML. Demyelinisierende Läsionen erscheinen in T1-gewichteten Aufnahmen hypointens und in T2-gewichteten Aufnahmen hyperintens<sup>45</sup>. Ein indirekter Nachweis entzündlicher Aktivität ist durch die perivaskuläre Anreicherung von Gadolinium, einem MRT-fähigen Kontrastmittel, nachweisbar und auf die erhöhte Permeabilität der BBB zurückzuführen<sup>45,82</sup>. Durch Unterdrückung des Liquors (CSF) in der FLAIR-Sequenz wird eine starke T2-Gewichtung ermöglicht und die Identifizierung hyperintenser Läsionen erleichtert<sup>80,108</sup>. Bisher nicht in den Richtlinien der MRT-Befundung zur MS-Diagnostik berücksichtigt sind u.a. das Zentralvenen-Zeichen, der Nachweis subpialer Läsionen und die Beteiligung der Leptomeningen bei kortikaler Manifestation<sup>45,174,182</sup>. Dies ist mitunter auf fehlende Definition bei der Befundung oder auf mangelnde Sensitivität der verbreiteten MRT-Geräte zurückzuführen. Die vergleichbare Interpretation von MRT-Aufnahmen wird international mit Hilfe der McDonald-Kriterien durchgeführt<sup>194</sup>. Entscheidend sind dabei die zeitliche (DIT) und räumliche (DIS) Dissemination der demyelinisierten Entmarkungsherde innerhalb des ZNS, die sich durch T2-gewichtete hyperintense bzw. Gadolinium-aufnehmende Bereiche kennzeichnen<sup>182,194</sup>. Die Markläsionen müssen definitionsgemäß periventrikulär, kortikal bzw. juxtakortikal, infratentoriell oder spinal zu finden sein und zusätzlich zur pathognomonischen Symptomatik der MS bestehen<sup>182,194</sup>. Der Nachweis von oligoklonalen Banden (OKBs) im Liquor (CSF) wird ebenfalls als diagnostisches Kriterium im Rahmen der McDonald-Kriterien herangezogen<sup>182,194</sup>. Die Revision der Kriterien von 2017 soll im Vergleich zur Version aus 2010 eine erhöhte Sensitivität von 82% haben<sup>55,68</sup>.

Die Relevanz von Untersuchungen des Liquors zur Diagnosesicherung wurde bereits in den McDonald-Kriterien deutlich. Besonders im Rahmen der Verlaufs- und Therapiekontrolle sind sie von besonderer Bedeutung, darüber hinaus spielt ihre prognostische Aussagekraft eine immer größere Rolle. Der wichtigste Marker ist der Nachweis oligoklonaler Banden (OKBs) im CSF, der auf eine intrathekale Synthese von IgG und IgM durch Plasmazellen hinweist<sup>156,217</sup>. Bei einem positiven Nachweis im CSF und einem negativen Nachweis im Serum, geben die OKBs mit einer Sensitivität von 95% einen Hinweis auf MS<sup>156,217</sup>. Zusätzlich kann bei langjähriger Verlaufskontrolle eine prognostische Aussage, hinsichtlich einer Konversion von einem klinisch-isolierten Syndrom zu einer manifesten MS, gemacht werden<sup>27,98</sup>. Mit der Bildung eines intrathekalen IgG:Albumin-Quotienten nach REIBER gelingt der quantitative Nachweis einer isolierten Schrankenstörung oder einer kombinierten Störung mit zusätzlich intrathekaler Immunglobulinsynthese<sup>21,112</sup>. Nicht unmittelbar mit der Pathogenese der MS in Zusammenhang stehend, werden Liquorproben auf intrathekal gebildete Antikörper gegen Masern, Röteln und das Varizella-Zoster-Virus (MRZ) überprüft<sup>22,79</sup>. Dieser Marker deutet auf erhöhte B-Zell-Aktivität hin, bildet einen Prädiktor für eine Konversion und erhöht die Spezifität bei zusätzlicher OKB-Untersuchung<sup>22,79</sup>. Anti-Aquaporin-4-Antikörper werden gegen die von Astrozyten exprimierte Aquaporin-4 Kanäle gebildet<sup>17</sup>. Sie kommen nicht im CSF von MS-Patienten vor und dienen mit ihrer hohen Spezifität somit vornehmlich dem Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen wie der Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung (NMOSD)<sup>37,47,147</sup>. Als zukünftiges Markerprotein könnten die Leichtketten-Neurofilamente in den nächsten Fokus rücken<sup>17</sup>. Sie sind Teil des neuronalen Zytoskeletts der grauen und weißen Substanz und bei Axonschädigungen oder neuronaler Inflammation vermehrt im CSF und peripheren Blut nachweisbar<sup>17,92,209</sup>.

Zuletzt lässt sich die lang genutzte Methode der visuell- und motorisch-evozierten Potentiale (VEP, MEP) nennen, die in der Leitlinie zur MS-Diagnostik 2021 als Mittel zum Ausschluss von Differentialdiagnosen genannt wird<sup>51,74</sup>. Die Relevanz dieser Untersuchung für die Diagnosestellung und die weiteren Verlaufskontrollen scheint gering zu sein und durch die präziseren, zuvor genannten Methoden, weitestgehend abgelöst worden zu sein.

### 1.1.6 Therapie

Die therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung der MS entwickelten sich während der vergangenen Jahre rasant, sodass sich verschiedenste pharmakologische Ansätze

etabliert haben. In den aktuellsten Leitlinien bilden verlaufsmodifizierende Therapiekonzepte (disease-modifying-therapy, DMT) die Basis<sup>73</sup>. Die Behandlung einer MS stellt sich je nach Verlaufsform als unterschiedlich herausfordernd dar. So spricht ein schubförmig-remittierender Verlauf (RRMS) besser auf DMTs an, als die primär und sekundär progredienten Verlaufsformen (PPMS, SPMS)<sup>122</sup>. Der Unterschied in der Effektivität je nach Verlaufsform könnte mit der hauptsächlich anti-inflammatorischen Wirkungsweise aktuell verwendeter DMTs erklärt werden. Patienten mit einer progredient verlaufenden MS-Erkrankung weisen niedrigere Entzündungsparameter auf, als Patienten mit einem schubförmigen Verlauf. Zugleich leiden sie vermehrt an den neurodegenerativen Folgen, sodass die meisten der bisher verwendeten DMTs nicht zielgerichtet genug sind, um die Symptome signifikant zu lindern<sup>65</sup>.

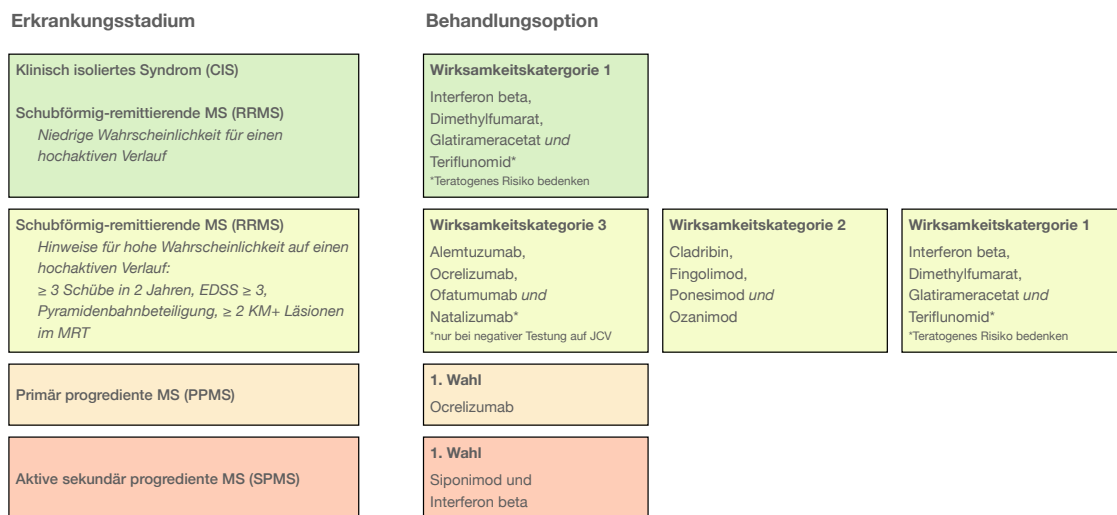
Bei der Therapie der RRMS sind mittlerweile zahlreiche Substanzen unterschiedlicher Wirkungsweisen zugelassen worden. Angefangen bei Klasse I INF- $\beta$ , welches seit rund 30 Jahren bei der Behandlung der MS eingesetzt wird, ist die genaue Wirkungsweise noch nicht endgültig verstanden. Es vermindert jedoch die Migration von T-Zellen ins ZNS, reguliert die proinflammatorische Aktivität herunter und steigert die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine, ebenso, wie es die Expression von MHC-Molekülen verringert, um eine Immunreaktion zu dämpfen<sup>71,160</sup>. Glatirameracetat wirkt ebenfalls immunmodulatorisch und antiinflammatorisch. Das aus vier Aminosäuren (Glutaminsäure, Lysin, Alanin, Tyrosin) bestehende Peptid wirkt über die vermehrte Differenzierung von  $T_H4$ -Zellen in  $T_H2$ -Zellen, die stärkere Proliferation regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und die Beeinflussung der Antigen-Präsentation von B-Zellen modulierend auf die Immunantwort<sup>72</sup>. Dimethylfumarat zielt durch Interaktion mit dem Nrf2-Signalweg auf eine Stärkung antioxidativer und zytoprotektiver Mechanismen zum Schutz von Neuronen und Axonen ab<sup>117</sup>. Eine wachsende Gruppe vielversprechender Therapeutika sind monoklonale Antikörper gegen das auf B-Zellen befindliche Oberflächenprotein CD20. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Rituximab, Ocrelizumab und Ofatumumab. Die Antikörper induzieren eine Zell-abhängige Phagozytose zirkulierender B-Zellen im Blut und CSF durch Makrophagen (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) oder eine Apoptose bzw. Depletion mit Hilfe des Komplementsystems (complement-dependent cytotoxicity; CDC)<sup>30</sup>. Dadurch nimmt die Menge an proinflammatorischen Zytokinen sowie an IgG-Molekülen im Serum ab und die entzündliche Aktivität sinkt<sup>44</sup>. Eine weitere Gruppe von Zell-Modulatoren bilden die S1PR-Modulatoren um die Substanzen Ponesimod, Fingolimod, Ozanimod und Siponimod. Der S1P-Rezeptor wird auf der Zelloberfläche von Lymphozyten exprimiert und ist an der Regulation der Blutzirkulation und Migration von Lymphozyten aus den

lymphatischen Organen in das ZNS beteiligt <sup>168</sup>. Durch Internalisierung und Degradierung des entsprechenden S1P-Rezeptors wird die Inflammation und die Zellwanderung autoreaktiver Lymphozyten über die BBB vermindert, um so Symptomatik und Progredienz der MS abzumildern <sup>151</sup>. Ein auf den Zellzyklus, die DNA-Synthese und die DNA-Reparatursysteme abzielende Medikamentenklasse ist das Purinnukleosid-Analogon Cladribin. Cladribin wirkt präferenziell inhibierend auf die Population von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowie vereinzelt auf B-Zellen <sup>110</sup>. In Zulassungsstudien fielen oftmals Nebenwirkungen wie Lymphopenien auf, ebenso war die Neigung zur Entwicklung schwerer Infekte erhöht <sup>62</sup>. Verwendung findet es zumeist bei der Therapie der schubförmig-remittierenden MS als Wirkstoff der Kategorie 2 <sup>73</sup>. Zuletzt wird Natalizumab vorgestellt, welches durch seine Inhibierung des  $\alpha 4\beta 1$ -Integrins auf Lymphozyten eine Interaktion mit dem Liganden VCAM1 auf Endothelzellen im ZNS blockiert <sup>206</sup>. Somit wird eine lymphozytäre Migration durch die BBB ins Parenchym des ZNS verhindert und inflammatorische Prozesse abgemildert <sup>93</sup>. An dieser Stelle ist die unerwünschte Arzneimittelwirkung des vermehrten Auftretens einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) bei Einnahme von Natalizumab anzumerken. Diese kann bei John-Cunningham-Virus (JC-Virus) infizierten Patienten gehäuft auftreten, wodurch ein Screening auf den JC-Virus vor Therapiebeginn anzuraten ist <sup>93</sup>.

Wie bereits zuvor erwähnt, zielen der Großteil aktuell verwendeter Therapeutika auf die Behandlung der RRMS ab. Allerdings sind mittlerweile Ocrelizumab und Siponimod zur Therapie der primär und sekundär progredienten MS zugelassen. In den Zulassungsstudien wirkten die Pharmaka jedoch nur in geringem Maße der Progredienz der PPMS bzw. SPMS entgegen und wiesen lediglich einen moderaten Mehrwert auf, verglichen mit bestehenden Therapien <sup>89</sup>.

Die Behandlung erstmals aufgetretener Schübe kann mithilfe von Glukokortikosteroiden, in der Regel durch eine Stoßtherapie mit intravenös appliziertem Methylprednisolon, therapiert werden. Bei weiterhin bestehenden neurologischen Defiziten kann vor einer erneuten Stoßtherapie eine Plasmapherese genutzt werden, um zeitnah die Rückbildung der schubassoziierten Symptomatik zu erreichen. Weitere, nicht medikamentöse Therapieoptionen stellen nach wie vor die Logopädie, Physio-, Ergo- und Psychotherapie dar, die allesamt der Verbesserung beziehungsweise dem Erhalt der motorischen und geistigen Fähigkeiten dienen und im Rahmen der Patientencompliance nicht zu vernachlässigen sind.

## 1. EINLEITUNG



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der Behandlungsoptionen nach Erkrankungsstadium.

*Eigene Darstellung, in Anlehnung an Hemmer et al. <sup>73</sup>*

### 1.2 Der unselektive FGFR-Inhibitor Fexagratinib (AZD4547)

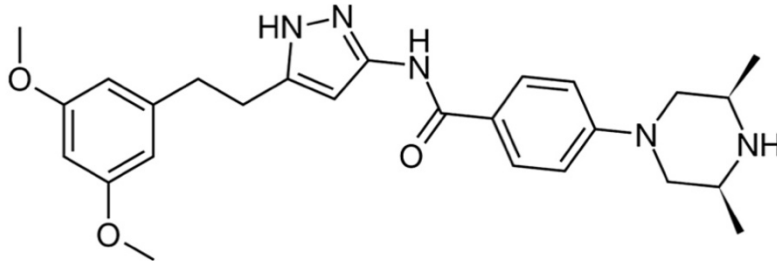
AZD4547, neuerdings als Fexagratinib bezeichnet, (chemische Bezeichnung: N-[5-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2H-pyrazol-3-yl]-4-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)benzamide) ist ein reversibler unselektiver Inhibitor für FGFR1-3, Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) und Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) <sup>60</sup>. AZD4547 bindet kompetitiv zu ATP an dessen Bindungsstelle an der Kinase-Domäne des Rezeptors. Die höchste Affinität besitzt AZD4547 in absteigender Reihenfolge für FGFR1, 3, 2, CSF1R und VEGFR2, die entsprechenden Konzentrationen für eine Inhibition von 50% der Enzymaktivitäten (IC<sub>50</sub>-Werte) betragen 0,2 (FGFR1), 1,8 (FGFR3), 2,5 (FGFR2), 9,7 (CSF1R) bzw. 24 nmol/L (VEGFR2) <sup>60</sup>. Die maximale Plasmakonzentration (C<sub>max</sub>) beträgt bei zweimaliger täglicher oraler Einnahme von 80 mg AZD4547 rund 216 ng/ml, die Bioverfügbarkeit (AUC) beträgt bei gleicher Dosis und Verabreichungsform rund 3417 ng x h/ml, die Halbwertszeit (T<sub>1/2</sub>) liegt bei knapp 28 Stunden <sup>171</sup>. AZD4547 wird oral verabreicht und wurde an Mäusen in Dosierungen zwischen 1,5-50 mg/kg Körpergewicht bei 1-2-maliger täglicher Gabe erprobt. Eine auf den Menschen übertragbare Dosierung, die in einer Phase II Studie mit einer akzeptablen Menge an unerwünschten Arzneimittelwirkungen einherging, war die zweimalige tägliche Einnahme von 80 mg AZD4547 <sup>191</sup>. Die Inhibierung der FGFRs beeinflusst die abwärts befindliche PLCγ sowie das FRS2 und reduziert die Phosphorylierung der PI3K/AKT-Kinase, die ebenfalls Bestandteil der Signalkaskade ist <sup>60</sup>. Das Pharmakon hat insbesondere antiproliferative und antiangiogene Auswirkungen auf FGFR-mutierte Zelllinien, bewirkt trotz seiner Affinität zu VEGFR2 aber keine

hypertensiven Effekte und zeichnet sich durch gute Verträglichkeit aus<sup>60</sup>. In späteren Phase I-III Studien unterschiedlicher FGFR-Inhibitoren traten Arzneimittelnebenwirkungen in erwartbarer Häufigkeit und Schwere auf, darunter Hyper-/ Hypophosphatämie, Stomatitis, Diarrhoe, Verdauungsprobleme oder Nageldystrophien<sup>42</sup>. In Probandengruppen ohne FGFR-Veränderungen traten keine nennenswerten Nebenwirkungen auf, was die Spezifität der FGFR-Inhibitoren auszeichnet<sup>91</sup>.

Veränderungen an Rezeptoren des FGF-Metabolismus sind in zahlreichen Organsystemen beobachtet worden und werden teils als ursächlich für die Entstehung maligner Prozesse angesehen. Die häufigsten Auslöser unregulierter Rezeptoraktivität betreffen die Amplifikation (66%), Mutation (26%) bzw. die Fusion (6%) der verantwortlichen Gene<sup>42</sup>. Die bisher klinisch erprobten selektiven FGFR-Inhibitoren üben ihre Wirksamkeit einerseits direkt auf die FGFR-mutierten Tumorzellen aus, in dem sie durch Hemmung unregulierter Rezeptoren pro-apoptotisch, anti-proliferativ und anti-angiogen wirken<sup>91</sup>. Dadurch normalisieren sie das Mikromilieu des Tumors und erzeugen eine physiologische Homöostase. FGFR-Inhibitoren wie AZD4547 üben andererseits zusätzlich eine indirekte immunregulatorische Wirkung durch Inhibierung des CSF1R aus, wodurch die Aktivität von T-Lymphozyten gegen Tumorzellen gerichtet wird und es zur Blockade der sogenannten *immune evasion* kommt<sup>91</sup>.

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden zahlreiche FGFR-Inhibitoren in klinischen Studien untersucht und zuletzt zwei Substanzen durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Erdafitinib wird zur Behandlung von metastasierten Urothelkarzinomen genutzt und Infigratinib (beides FGFR1-4-Inhibitoren), dient der Therapie von metastasierten cholangiozellulären Karzinomen. Für beide Medikamente ist der Nachweis von FGFR-Mutationen im Tumorgewebe Voraussetzung zur Indikationsstellung. In rund 20% der Urothelkarzinomen konnten Mutationen im FGFR3-Gen gefunden werden, bei 15% der cholangiozellulären Karzinomen sind FGFR2-Mutationen nachweisbar<sup>42</sup>. Aber auch in weiteren Anwendungsgebieten erzielten FGFR-Inhibitoren wie AZD4547 Fortschritte: So konnte die Chemoresistenz gegenüber Paclitaxel bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) durch die kombinierte Gabe mit AZD4547 reduziert und die Wirksamkeit der bestehenden Therapie wieder gesteigert werden<sup>8</sup>. Ebenfalls konnte die Strahlensensitivität von FGFR-exprimierenden nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom-Zellen (NSCLC) gegenüber der Behandlung mit Radiotherapie durch zusätzliche Gabe von AZD4547 gesteigert werden, woraufhin die Apoptose-Rate zunahm und sich das Tumorstadium verlangsamte<sup>179</sup>. Im Mausmodell für das Ovarialkarzinom bewirkte eine AZD4547 Gabe eine geringere Proliferation,

gesteigerte Apoptose sowie ein weniger invasives Wachstum der Neoplasien<sup>142</sup>. Auch bei der Behandlung von Brustkrebs kann die Verwendung von FGFR-Inhibitoren helfen, bestehende Resistenzen gegenüber CDK4/6-Inhibitoren zu reduzieren und den Therapieerfolg weiterhin sicherzustellen<sup>184</sup>.



**Abbildung 4.** Chemische Molekülstruktur von AZD4547.

*Eigene Darstellung, in Anlehnung an Gavine et al.*<sup>60</sup>

### 1.3 Fibroblast growth factor (FGF)

Fibroblast growth factors (FGFs) bilden eine aus sechs Untergruppen mit insgesamt 22 einzelnen Faktoren bestehende Superfamilie von Wachstumsfaktoren. Sie wurden seit ihrer Entdeckung in beinahe allen Körpergeweben nachgewiesen und stellen durch ihre mitogenen und metabolischen Wirkungen wichtige Regulatoren jeglicher Zellen dar<sup>205</sup>. Die FGFs aus fünf der Untergruppen wirken parakrin auf Wachstums-, Differenzierungs-, Proliferations- und Migrationsprozesse, lediglich die Faktoren 19, 21 und 23 beeinflussen metabolische Abläufe endokrin<sup>113</sup>. Dabei sind sie peripher an der homöostatischen Regulation des Gallensäure-, Glukose-, Mineral- und Lipidstoffwechsels beteiligt, zentral wirken sie auf den Hypothalamus und über dessen sympathische Efferenzen auf die Lipolyse<sup>113</sup>.

Das größere Augenmerk der Forschung liegt allerdings vermehrt auf dem Wachstums- und Differenzierungspotenzial verschiedener Gewebe unter dem Einfluss von FGFs. So konnten sie in Lunge, Herz, Urogenitalsystem, Skelett, Muskel, Blut- und Lymphgefäßen, Haut sowie dem ZNS nachgewiesen werden<sup>205</sup>. Relevant sind an dem Punkt auch die Zusammenhänge zwischen den FGFs und Tumoren in entsprechenden Organsystemen, die auf eine vermehrte Expression, veränderte Bindungsaffinitäten oder gestörte Regulation zurückzuführen sind<sup>91</sup>. FGFs und deren Rezeptoren sind so Ziel diverser neuer Therapeutika, wie Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKIs) geworden und bereits in klinischen Studien erprobt. Während der intensiven Untersuchungen konnten Unterschiede hinsichtlich der Interaktionen und Wirkungen der Wachstumsfaktoren auf verschiedene Gewebe bei entsprechenden Erkrankungen und Krankheitsmodellen

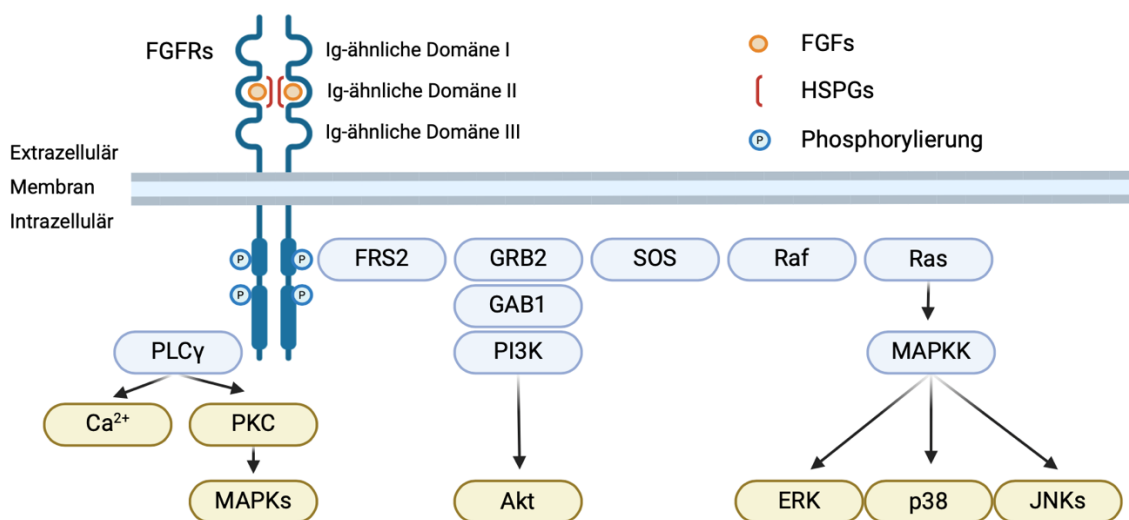
gefunden werden: Betrachtet man im Folgenden speziell Zelldifferenzierung und Zellregeneration im Rahmen neurologischer Erkrankungen, wurden sowohl von positiven, wachstumsfördernden Ergebnissen nach FGF-Induktion bei Neuronen berichtet, als auch von gegenteiligen, proinflammatorischen Effekten<sup>58,213</sup>. Im Cerebellum schadet eine unregulierte FGF-Aktivität möglicherweise der physiologischen Differenzierung und Funktionalität neuronaler Zellen, wohingegen FGF2-defiziente Mäuse von einer gesteigerten neuronalen Regenerationsfähigkeit in der Substantia nigra zu profitieren scheinen<sup>161,208</sup>. Ebenso gibt es Differenzen bei der möglichen Wirkungsweise von FGF auf das Rückenmark. So konnten einerseits Symptome nach FGF-Applikation bei EAE-induzierten Mäusen abgemildert werden, was für eine eher neuroprotektive Wirkung von FGF spricht<sup>167</sup>. Andererseits führte FGF zur erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Mikroglia, mit folglich ausgeprägteren Schädigungen<sup>59</sup>. Der Zeitpunkt der Induktion bzw. Inhibition von FGFs und den beteiligten Rezeptoren scheint möglicherweise ebenso Einfluss auf die Signal- und Wirkungskaskade zu haben, wie das Mikromilieu, welches Läsionen oder Entzündungsherde umgibt.

### 1.4 Fibroblast growth factor receptor (FGFR)

Die Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) sind eine 4 Isoformen (FGFR1-4) umfassende Gruppe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die den Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) zugerechnet werden. Sie werden von vier entsprechenden Genen (FGFR1-4) codiert und bestehen aus drei, die Membran durchziehenden Anteilen. Die extrazelluläre Domäne bildet die Ligandenbindungsstelle und besteht aus drei Immunglobulin-ähnlichen Motiven (D1-3), ein transmembranöser Anteil vermittelt die Dimerisierung der Rezeptormonomere, wohingegen die intrazelluläre Rezeptordomäne die Tyrosinkinase-Aktivität beinhaltet. Durch Bindung eines FGF-Liganden an die extrazellulären Ig-ähnlichen Motive wird eine Kaskade von Phosphorylierungen von Hilfsproteinen initiiert. Abhängig von der parakrinen oder endokrinen Wirkung der FGFs sind Heparansulfat-haltige Proteoglykane (HSPG) oder der Klotho Co-Rezeptor Ziel dieser Reaktion. Die Co-Rezeptoren vermitteln die weiteren Phosphorylierungsschritte, die zur Dimerisierung führen und folglich die Signalkaskade der Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), des Ras/Raf/MAP-Kinase-Weges oder des Protein C (engl. Akt) aktivieren (Abb. 5)<sup>205</sup>. Die Signalkaskade und andere Eigenschaften wie die Affinität der unterschiedlichen FGF-Liganden an die Rezeptor-Subtypen ebenso wie die gewebsspezifischen Expressionsmuster können durch alternatives Splicing verändert werden<sup>66</sup>. Von einer hohen Variabilität durch Splicing sind insbesondere die Ig-ähnlichen

Bindungsstellen und die HSPGs betreffen, die die Rezeptoraffinität stark beeinflussen<sup>114</sup>. Es konnten in dem Zusammenhang gewebspezifische Splicingvarianten nachgewiesen werden, die je nach Gewebeexpression Auswirkungen auf den Signalweg haben<sup>207</sup>. Des Weiteren wirken sich epigenetische Einflüsse, Ubiquitinierung, Phosphorylierungsmuster und generell posttranslationale Modifizierungen in relevantem Maß auf die fein abzustimmende Regulation der Rezeptoren aus<sup>216</sup>. In der Superfamilie der GPCRs sind umfangreiche Interaktionen zwischen den Rezeptoren bekannt, so scheinen unter anderem rezeptorübergreifende Aktivierungen zwischen EGFR, PDGFR und IGF1-R möglich zu sein<sup>28</sup>. Darüber hinaus können Signalkaskaden der GPCRs durch Bindung alternativer Liganden wie Vorläufer-Agonisten oder sogar ligandenunabhängig durch ROS initiiert werden<sup>28</sup>. Entsprechende Interaktionen zwischen FGFR und A<sub>2A</sub>R (Adenosin-2A-Rezeptor), ausgelöst durch FGF-Liganden, zeigten eine kombinierte Aktivierung und Auslösung der MAPK/ERK-Kaskade mit gesteigertem neuronalem Wachstum und erhöhter kortikaler Plastizität bei psychisch Erkrankten<sup>46,116</sup>.

FGF-Rezeptoren sind entsprechend des Vorkommens der FGF-Liganden im gesamten Organismus verbreitet, im ZNS sind vor allem die Subtypen 1-3 exprimiert und für die prä- bzw. postnatale zerebrale Entwicklung relevant<sup>35,95</sup>. FGFR1 und FGFR2 werden am stärksten auf Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert, wobei eine Beteiligung an Prozessen der De- und Remyelinisierung nachgewiesen wurde<sup>33,95</sup>. Über die genauen Auswirkungen und Interaktionen, die der FGFR-Kaskade unterliegen, herrschen teils gegensätzliche Meinungen, die später diskutiert werden.



**Abbildung 5.** Schematische Darstellung der Signalkaskade der FGF-Rezeptoren.  
Eigene Darstellung, in Anlehnung an Xie et al.<sup>205</sup>, erstellt mit Biorender.com

### 1.5 VEGFR2 und CSF1R bei MS und EAE

Der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und sein Rezeptor VEGFR2 gehören zu den wichtigsten Regulatoren der Angiogenese. Sie steuern die Neovaskularisation und bilden ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren. Darüber hinaus beeinflussen sie durch Veränderung der Gefäßpermeabilität und Aktivierung von Immunzellen die Entzündungsaktivität und das umgebende zelluläre Milieu, sodass Störungen zu diversen neurologischen Krankheitsbildern, wie zerebralen Ischämien, Epilepsien oder Hirntumoren führen können<sup>164,178</sup>. Die VEGF-Familie setzt sich aus insgesamt vier Faktoren zusammen (VEGFA – D) und einem plazentaren Faktor (PlGF), die unter anderem von Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten, Fibroblasten, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausgeschüttet werden<sup>63,180</sup>. Sie binden an den VEGFR1 und mit niedrigerer Affinität an den VEGFR2, die zur Gruppe der RTKs gehören<sup>150</sup>. Von VEGFR2 geht jedoch eine höhere Tyrosinkinase-Aktivität aus, sodass dieser den regulatorisch dominanteren Rezeptor darstellt, der von Astrozyten, Mikroglia, Neuronen, Makrophagen und OPCs exprimiert wird<sup>32,63,180</sup>. Reguliert wird die VEGF-Freisetzung und damit die VEGFR-Aktivierung klassischerweise durch Sauerstoffmangel und über den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF), der die Transkription von VEGF steigert<sup>121</sup>. Ähnlich der Signalkaskaden der FGFRs (Abb. 4), läuft die Signalweiterleitung ebenfalls über PI3K und Akt sowie über PLC $\gamma$  und die MAP-Kinasen<sup>121</sup>. Therapeutisch sind bereits mehrere Substanzen, wie der VEGF-Antikörper Bevacizumab bei altersbedingter Makuladegeneration oder der VEGFR-Inhibitor Sunitinib bei intestinalen Tumoren durch die FDA und die EMA zugelassen worden<sup>149</sup>. Wirkstoffe für weitere Krankheitsentitäten wie Mamma-, Lungen oder Kolonkarzinome befinden sich in Entwicklung, in klinischen Studien oder in der Zulassung.

Ein weiterer Zielrezeptor des Multikinase-Inhibitors AZD4547 ist der Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1-R), der als homodimere Tyrosinkinase neben dem gleichnamigen Liganden CSF1 ebenfalls durch das weniger relevante IL-34 aktiviert werden kann<sup>31</sup>. Der CSF1-R wird in einem weiten Spektrum an Geweben und auf Zellen exprimiert, darunter sind Osteoklasten, Oozyten, hämatopoetische Stammzellen, Makrophagen, Mikroglia, Neuronen und deren Vorläufer sowie Gliazellen<sup>190</sup>. An der Signalkaskade des CSF1-R beteiligt sind unter anderem die PLC $\gamma$ , PI3K und ERK/Akt-Kinasen, die über I $\kappa$ B und NF $\kappa$ B eine immunmodulatorische Wirkung auf die Proliferation und Aktivität von Monozyten und Makrophagen haben<sup>190</sup>. Im ZNS ist die Expression des CSF1-R während der frühen Entwicklung gesteigert, jedoch nimmt sie im weiteren Reifungsprozess wieder ab und beschränkt sich primär auf die Regulierung von

Microglia/Makrophagen. Auf Oligodendrozyten ist der CSF1-R nicht exprimiert, vielmehr soll er indirekt über die Regulierung von Microglia und deren Interaktionen einen Einfluss auf de- und remyelinisierende Prozesse ausüben <sup>144</sup>. Der CSF1-Ligand wird von T-Helferzellen und Neuronen im Kortex, Cerebellum und im Rückenmark ausgeschüttet und induziert mittels eines positiven Feedback-Loops mit Monozyten über die Sezernierung von IL-1 $\beta$  einen Zytokinausstoß und somit die Aktivierung von Microglia und die Etablierung eines pro-inflammatorischen Milieus <sup>160</sup>. Die Rolle des VEGFR2 und des CSF1R im Rahmen einer MS oder EAE wird im Verlauf diskutiert.

### 1.6 Oligodendrozyten im gesunden ZNS und bei MS

Oligodendrozyten sind im zentralen Nervensystem maßgeblich für die Synthese und Versorgung von Myelinscheiden verantwortlich, die die Axone der Neuronen umgeben und die physiologische saltatorische Weiterleitung elektrischer Potentiale ermöglichen. Darüber hinaus bilden sie ein Netzwerk mit anderen versorgenden Zellen, wie den Astrozyten, um die trophischen und metabolischen Prozesse innerhalb der Axone sicher zu stellen. Sie gehören neben der Mikroglia, Makroglia und den Astrozyten zur übergeordneten Gruppe der Gliazellen, die rund die Hälfte des Hirnvolumens von Säugetieren ausmachen. Oligodendrozyten alleine haben einen Anteil von rund 5 – 10% an allen neuronalen Zellen. Oligodendrozyten sind definitionsgemäß in der weißen Substanz zu finden, deren Name von der charakteristischen weißlichen Farbe der Myelinscheiden abgeleitet ist. Mittlerweile konnten Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen jedoch auch in der grauen Substanz nachgewiesen werden. Die dortige Myelinisierung verläuft im Vergleich zur weißen Substanz wesentlich langsamer und unterliegt einer veränderten Dynamik im Alterungsprozess die ihr Maximum rund ein Jahr nach Geburt erreicht und von da an stetig abnimmt <sup>196</sup>. Myelin besteht im Allgemeinen zu 70% aus langkettigen, gesättigten Fettsäuren wie Glykosphingolipiden und Cholesterin sowie zu 30% aus Proteinen wie Myelin proteolipid protein 1 (PLP1), Myelin basic protein (MBP) und 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) <sup>188</sup>. Ein Oligodendrozyt bildet mit seinen zahlreichen kleine Zellausläufern an bis zu 40 verschiedenen Axon-Segmenten die Myelinscheiden, die aus 40 – 50 komprimiert gewickelten einzelnen Myelin-Lamellen bestehen können <sup>130</sup>. Die Generierung der Aktionspotentiale sowie die Erregungsweiterleitung ist in den Bereichen der Ranvier'schen Schnürringe lokalisiert, dies sind die knapp 1  $\mu$ m breiten Lücken zwischen den einzelnen Myelinscheiden, an denen das Axon frei liegt (Abb. 6). Die Entwicklungsgeschichte der Oligodendrozyten betrachtend, sei die wellenartige Verbreitung neuronaler Vorläuferzellen (NPCs) über die Hirnrinde erwähnt, bei derer sie

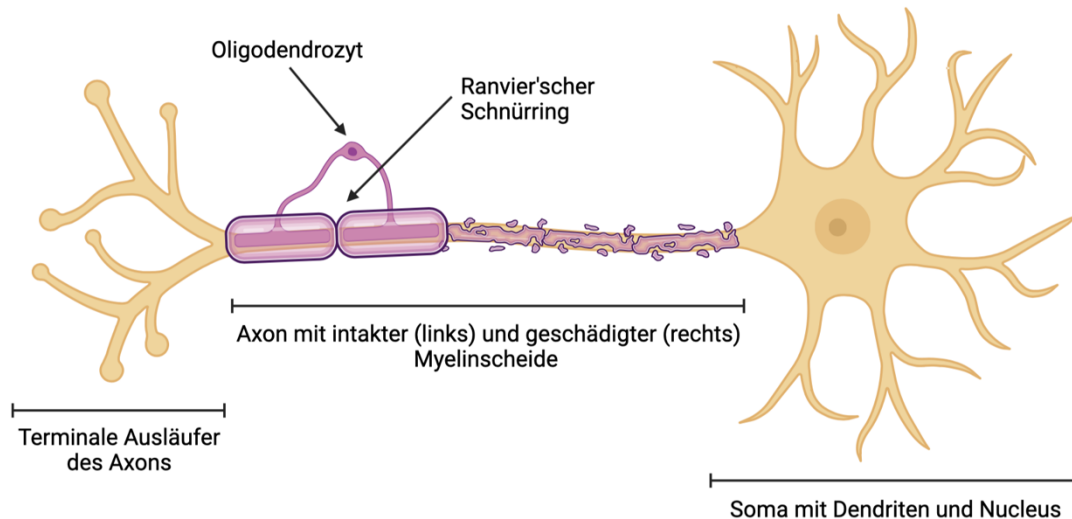
sich an neuronalen Gliazellen orientieren<sup>212</sup>. Aus den NPCs entwickeln sich im weiteren Verlauf die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (OPCs), die sich in den Mantelzonen des ZNS ansiedeln und im entdifferenzierten Stadium die reifen Oligodendrozyten (OLs) bilden<sup>148</sup>. Rund 5% der ursprünglich vorhandenen OPCs verbleiben jedoch in ihrem undifferenzierten Entwicklungsstadium und bilden ein Reservoir für spätere regenerative Prozesse, sowie für Lern- und Gedächtnisleistungen im Rahmen der neuronalen Plastizität<sup>148,187</sup>. Der Differenzierungsprozess von Vorläuferzellen in myelinbildende Oligodendrozyten wird auf vielen Ebenen durch intrinsische und extrinsische Faktoren beeinflusst. So wirken epigenetische Veränderungen wie Histon-Modifikationen, DNA-Methylierungen oder microRNA (miRNA) auf Transkriptionsfaktoren ein, die die Differenzierung, Migration oder Reifung der Myelinscheiden regulieren. Die bedeutendsten Transkriptionsfaktoren stellen in diesem Zusammenhang der Oligodendrocyte transcription factor 1/2 (OLIG1/2), SRY-box-10 (SOX-10) und der Myelin regulatory factor (MYRF) dar<sup>39,195</sup>. Zusätzlich haben extrinsische Signalmoleküle wie Leucine rich repeat and Immunglobulin-like domain-containing protein 1 (LINGO-1) oder FGFs teils inhibitorische Wirkungen auf Oligodendrozyten und deren Differenzierungsprozesse<sup>48,130</sup>. Supportiv unterstützt werden etwaige Abläufe hingegen durch von Astrozyten ausgeschüttete Faktoren wie Platelet-derived growth factor (PDGF), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) oder FGFs<sup>188</sup>. Einen weiteren Einflussfaktor auf das oligodendrozytäre Potential stellen Alterungsprozesse dar, diese verschlechtern die Regenerationsfähigkeit der Zellen durch eine geringere Anzahl neu differenzierter Oligodendrozyten aus OPCs und einer generell ineffizienteren Remyelinisierung<sup>195</sup>. Regenerationsmöglichkeiten bestehen allerdings auch in zunehmendem Alter, da sie sich nicht in einem statischen Endzustand befinden, sondern fortlaufenden Veränderungen unterliegen. Diese Dynamik scheint neben der Neusynthese von Myelin möglicherweise auch die Umstrukturierung bestehender Myelinscheiden zu ermöglichen<sup>188</sup>. Störungen dieses Regelkreises führen dabei zu degenerativen Prozessen, die die Basis für die Entstehung weiterer Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder psychiatrischen Störungen wie Schizophrenie bilden können<sup>177</sup>.

Bei inflammatorisch demyelinisierenden Erkrankungen wie MS kommt es zu Schädigungen an myelinisierten Axonen und damit zur Bildung von Plaques. Man unterscheidet Plaques nach dem Grad ihrer demyelinisierenden und inflammatorischen Aktivitäten und teilt sie in aktive, chronisch-aktive und chronisch-inaktive Plaques ein<sup>50</sup>. Aktive Plaques werden primär von Microglia/Macrophagen und T-Lymphozyten besiedelt; B-Zellen finden sich anfangs noch weniger in aktiven MS-Läsionen. Zusätzlich führen zahlreiche Astrozyten zu einer beginnenden Narbenbildung im Sinne einer

Astrogliose<sup>99</sup>. Im Verlauf der Zeit nimmt die inflammatorische Aktivität ab, sodass die Plaques in ein chronisch-aktives Stadium eintreten. Dies sind MS-Läsionen, die einen zellulär inaktiven Kern haben und von aktiven Microglia/Makrophagen umgeben sind, die Abbauprodukte von Myelinbestandteilen beinhalten und so ein „schaumiges“ Zytoplasma (engl. *foam cells*) haben<sup>50</sup>. Ein vollständiges Abklingen der Immunzellen ist in diesem Stadium noch nicht geschehen, T- und B-Zellen sind zusammen mit Astrozyten die vorherrschenden Zelltypen neben den Microglia<sup>2</sup>. Der chronisch-entzündliche Charakter der Läsion wird darüber hinaus durch die verstärkte Ausschüttung von Komplementfaktor C1q durch Microglia/Macrophagen aufrechterhalten<sup>2</sup>. Eine Narbe im Zentrum der Läsion besteht weiterhin und regenerative Prozesse sind noch nicht erkennbar, die Anzahl an Oligodendrozyten ist wesentlich vermindert im Vergleich zu gesunder weißer Substanz<sup>2</sup>. Chronisch-inaktive Plaques stellen den größten Anteil an Plaques bei MS-Patienten dar. Die Astrogliose im Inneren der Läsion ist nach wie vor erhalten, die Aktivität der Immunzellen ist jedoch abgeklungen, eine Regeneration ist nicht erkennbar, wodurch die Läsion weiterhin im demyelinisierten Zustand verbleibt und eine axonale Degeneration aufweist<sup>50</sup>. In den Randregionen sind überwiegend Oligodendrozyten und Astrozyten zu finden. Das Zentrum chronisch-inaktiver Läsionen ist jedoch hypozellulär, die ursprüngliche Zellarchitektur ist aufgehoben und nicht in den Ursprungszustand, wie dem der weißen Substanz, zurückzusetzen<sup>2</sup>. Darüber hinaus gibt es zwei weitere Arten von Läsionen, die konkret charakterisiert werden: Shadow Plaques sind partiell remyelinisierte Areale, die eine scharfe Entmarkungslinie aufweisen, innerhalb der Plaque, jedoch ohne entzündliche Aktivität sind<sup>50</sup>. Smouldering lesions weisen eine niedrig-chronische Aktivität mit langsam fortschreitender Demyelinisierung auf und sind mit einer schlechten Prognose sowie dem Übergang in einen sekundär-progredienten Verlauf assoziiert<sup>2</sup>.

An der Aktivität, Differenzierung und allgemeinen Regulierung von Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen sind mehrere Rezeptor- und Transmittersystem beteiligt. Besonderes Augenmerk soll hier auf die Rezeptoren der FGF-Familie gerichtet werden. Die Expression der im ZNS dominant vorkommenden FGFR1-3 ist abhängig von dem jeweiligen Entwicklungsstand der Oligodendrozyten und unterliegt Veränderungen. FGFR1 wird sowohl auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, als auch auf ausdifferenzierten Zellen exprimiert, eine Stimulierung von FGFR1 mit FGF2 bewirkt eine gesteigerte Proliferation von OPCs und OLs, gleichzeitig jedoch auch eine verringerte Expression von Myelin-Proteinen<sup>48,54</sup>. FGFR2 ist auf reifen Oligodendrozyten ausgeprägt, die Aktivierung durch FGF2 und FGF9 resultiert in einer höheren Anzahl von oligodendrozytären Zellausläufern<sup>54</sup>. FGF8 wiederum wirkt an FGFR3

exprimierenden Vorläuferzellen hemmend auf deren terminale Differenzierung<sup>48</sup>. In Versuchen bei Mäusen mit FGFR1/2 Knock-outs konnten jedoch ebenfalls Hinweise auf gegenteilige Funktionen der Rezeptoren beobachtet werden, dahingehend, dass die Versuchstiere nach Inhibierung der Rezeptoren eine anwachsende Population von OLs, eine verstärkte Remyelinisierung und abgeschwächte Entzündungsaktivität aufwiesen<sup>86,158,159,215</sup>.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung eines Axons mit teils intakter Myelinscheide samt Ausläufern des Oligodendrozyten und Ranvier'schem Schnürring sowie Darstellung eines Teils demyelinisierten Axonabschnitts.

*Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com*

## 1.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

### 1.7.1 MOG<sub>35-55</sub>-induzierte EAE als Tiermodell für MS

Für diese Studie wurde die MOG<sub>35-55</sub>-induzierte EAE-Variante bei C57BL/6J-Mäusen verwendet. Dieses Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ist das heutzutage am weitesten verbreitete Modell im Rahmen experimenteller MS-Forschung. Es war Grundlage der ersten Versuche zur Wirksamkeit von einigen heute klinisch genutzten Medikamenten wie z.B. Natalizumab oder Glatirameracetat<sup>94,165</sup>. Erstmals beschrieben wurde das EAE-Modell im Jahr 1933 durch Rivers et al. und ist seitdem stetig weiterentwickelt und verbessert worden. Heute existieren zahlreiche Möglichkeiten der Induktion einer EAE und den dafür verwendeten Substanzen, die je nach Fragestellung individuell gewählt werden sollten.

Grundsätzlich lassen sich aktive von passiven Induktionen unterscheiden, die mit jeweils anderen Antigenen durchgeführt werden. Alle für die EAE verwendeten Antigene sind entweder Myelinproteine oder Epitope solcher Proteine, sodass für die Immunisierung

PLP, MBP oder MOG-Antigene (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) in Frage kommen<sup>165</sup>. Die Antigene werden in einer kompletten Freund'schen Emulsion (CFA) gelöst und den Versuchstieren injiziert. Darüber hinaus erhalten die Tiere zwei Injektionen mit Toxinen der *B. pertussis*, um die Permeabilität der Bluthirnschranke (BBB) zu erhöhen und den Übertritt der MOG-Antigene ins ZNS sicherzustellen. Aus pathophysiologischer Sicht wird eine autoimmune MHC-II-Rezeptor vermittelte Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen induziert<sup>107</sup>. Auf diese folgt eine ZNS-Infiltration durch Monozyten und T-Lymphozyten sowie eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen, wodurch die Immunreaktion verstärkt wird<sup>107</sup>. Resultate sind eine axonale Degeneration und sekundäre Demyelinisierung sowie konfluierende Entzündungsherde, die ihr Aktivitätsmaximum im Rückenmark haben<sup>165</sup>. Neben dem Rückenmark sind in einer verringerten Ausprägung auch der Hirnstamm, das Frontalhirn und das Cerebellum betroffen<sup>165</sup>. Diese Art der EAE ähnelt klinisch einem chronisch-progredientem Verlauf einer MS, bei entsprechend kürzerer Versuchsdauer und erhöhten Antigen-Konzentrationen kann ebenfalls ein akutes Erkrankungsstadium simuliert werden<sup>107</sup>. Klassischerweise treten die ersten Symptome nach einer anfänglichen Prodromalphase innerhalb von etwa zehn Tagen auf und äußern sich in einer am Schwanz beginnenden Paralyse, die sich im weiteren Verlauf, bei entsprechend zunehmender Krankheitsintensität, von den Hinterläufen auf die Vorderläufe ausbreiten kann. Die maximale Symptomatik ist nach ca. 15 Tagen erreicht. Von da an nimmt die Symptomlast meist für 4 – 5 Tage ab, bevor sie in eine Plateauphase übergeht oder alternativ um den 30. Tag eine zweite, geringergradigere Zunahme der Symptome folgt<sup>81</sup>. Typischerweise kann ein Gewichtsverlust der Versuchstiere während der Studiendauer beobachtet werden.

### 1.7.2 Alternative Tiermodelle für MS

Bei den EAE-Modellen gibt es neben der oben beschriebenen aktiven Sensitivierung auch eine passive Variante. Bei diesem passiven Modell findet ein T-Zell-Transfer statt, in dem entnommene T-Lymphozyten *in vitro* gegen Myelinproteine immunisiert und im Anschluss in naive Versuchstiere injiziert werden. Der Vorteil des Verfahrens ist, dass man die Induktion einer EAE sowohl mit CD4<sup>+</sup> als auch mit CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durchführen kann und sich die gewonnenen Studienergebnisse durch eine gute Reproduzierbarkeit auszeichnen<sup>107</sup>. Jedoch eignet sich der passive T-Zell-Transfer nicht für die Untersuchung chronisch-demyelinisierter Läsionen und Axon-Verlusten, da die Immunreaktion und die Krankheitssymptomatik nach Entfernen der auslösenden Antigene stark abflacht und sich kein chronischer Erkrankungszustand entwickelt<sup>165</sup>.

Ein weiteres Modell ist die Induktion entzündlicher Demyelinisierung durch Picorna-Viren, konkret dem Theiler's Murine Enzephalomyelitis Virus (TMEV) <sup>154</sup>. Der Erkrankungsverlauf entspricht dem einer chronisch-progressiven MS und zeichnet sich durch eine sekundäre inflammatorische Demyelinisierung mit axonaler Schädigung aus <sup>154</sup>. Die Viren infizieren die Zellreihen von Makrophagen/Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten, wodurch eine Chronifizierung möglich wird <sup>154</sup>. Die Läsionen zeichnen sich durch eine Infiltration von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus, was den relevanten Zellen einer humanen MS entspricht <sup>107</sup>. Jedoch sind die pathophysiologischen Prozesse, die bei der Induktion mit Viren ablaufen, noch nicht vollständig verstanden <sup>107</sup>. Darüber hinaus konnte bisher keine Virusinfektion nachgewiesen werden, die zur Ausbildung einer MS im Menschen führt, es wird lediglich eine Verbindung zwischen einer Infektion mit EBV und einem erhöhten Risiko eine MS zu entwickeln, angenommen. So bilden Virus-Modelle zwar wichtige Aspekte von MS-Erkrankungen ab, dienen aber letztlich mehr dem Zweck Beobachtungen über Virus-induzierte autoimmune Prozesse sammeln zu können.

Eine weitere Kategorie von MS-Modellen bilden die toxisch-ausgelösten Demyelinisierungen durch Kupfer-Chelatbildner (Cuprizone-Modell) oder durch Lysolecithin. Beide zeichnen sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse aus, besitzen allerdings keinen autoimmunen Charakter bei demyelinisierenden Prozessen und gehen nicht in einen chronischen Krankheitsverlauf über <sup>107,154</sup>. Das Cuprizone-Modell bewirkt durch Apoptose von Oligodendrozyten, Induktion einer Mikrogliose und Astrozytose eine sekundäre Demyelinisierung <sup>94</sup>. Im Rahmen der Demyelinisierung erfolgt keine Aktivierung reaktiver T-Lymphozyten im Cuprizone-Modell und Veränderung an der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BBB) konnten ebenfalls nicht festgestellt werden, was ein Unterschied zur Pathophysiologie einer MS im Menschen ist <sup>94</sup>. Im Lysolecithin-Modell wird eine primäre Demyelinisierung durch Aktivierung der Phospholipase A2 induziert, die direkt toxisch auf das Myelin wirkt, Oligodendrozyten, Axone oder andere Zellen sind eher weniger beteiligt <sup>154</sup>. Limitierungen beider Modelle entstehen durch die endogene Remyelinisierung nach Beendigung der Fütterung mit Cuprizone oder Lysolecithin <sup>154</sup>. Dadurch ist die Aussagekraft von Untersuchungen der Auswirkungen etwaiger neuer Therapeutika auf das neuroregenerative Potential nur eingeschränkt verwertbar. Toxische Modelle eignen sich schlussendlich weniger für die Untersuchung der Pathophysiologie einer MS, sondern mehr für die grundlegenden Abläufe bei de- und remyelinisierenden Prozessen im ZNS.

## 1.8 Ziele der Arbeit

- a) Darstellung der suppressiven Wirksamkeit des FGFR-Inhibitors Fexagratinib auf den Krankheitsverlauf der MOG<sub>35-55</sub>-induzierten EAE
- b) Untersuchung der Wirkung von AZD4547 auf Protein- und Genexpression, die an der Myelinsynthese, Inflammation, dem FGFR-Signalweg und an mitochondrialen Komplexen beteiligt sind
- c) Wirkung von Fexagratinib auf die inflammatorische Aktivität von T- und B-Lymphozyten sowie Microglia/Macrophagen mittels immunhistochemischen und histopathologischen Gewebeschnitten
- d) Untersuchung des Einflusses von AZD4547 auf de- und remyelinisierende Prozesse und deren Morphologie sowie auf die Zelllinie von Oligodendrozyten

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Primäre Antikörper für WB und IHC

Antikörper	Molekulargewicht	Bestellnummer	Hersteller
Anti-ATP6E	33	sc-514143	Santa Cruz, CA, USA
Anti-ATP $\beta$ Subunit	57	A21351	Invitrogen, CA, USA
Anti-BDNF	12-14	47808S	Cell Signaling, MA, USA
Anti-CNPase	46	sc-166019	Santa Cruz, TX, USA
Anti-CSF1R	108	ab221684	Abcam, CB, UK
Anti-FGF9	30	PA5-50202	Invitrogen, CA, USA
Anti-FGFR1	92	9740S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-FGFR2	145	23328S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-GAPDH	37	sc-365062	Santa Cruz, TX, USA
Anti-MBP	12-18	78896S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-MT-ND1	36	ab222892	Abcam, CB, UK
Anti-pAkt	60	4060S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-pErk	42, 44	4370S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-pFGFR1	120	44-1140G	Invitrogen, CA, USA
Anti-pFGFR2	92	PA5-64796	Invitrogen, CA, USA
Anti-PLP1	20-30	85971S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-SOD2	25	13194S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-TrkB	95	ab18987	Abcam, CB, UK
Anti-VEGF	20-42	PA1-16948	Invitrogen, CA, USA
Anti-VEGFR2	210	9698S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-Mac3 (M3/84)	Färbung (IHC)	550929	BD Pharmingen, NJ, USA
Anti-CD3 (CD3-12)	Färbung (IHC)	MCA1477	Bio-Rad, CA, USA
Anti-CD45R/B220	Färbung (IHC)	553089	BD Pharmingen, NJ, USA
Anti-Olig2	Färbung (IHC)	MABN50	Merck, HE, DE
Anti-TPPP/P25	Färbung (IHC)	ab92305	Abcam, CB, UK

#### 2.1.2 Sekundäre Antikörper für WB und IHC

Antikörper	Dosierung	Bestellnummer	Hersteller
Anti-mouse IgG HRP-linked	1:1000	7076S	Cell Signaling, CA, USA
Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:1000	7074S	Cell Signaling, CA, USA

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1.3 Primer für die RT-PCR

Zielgen	Sequenz (3' – 5')	Hersteller
ATP6 FP	AGC TCA CTT GCC CAC TTC CT	Eurofins Genomics, NRW, DE
ATP6 RP	AAG CCG GAC TGC TAA TGC CA	Eurofins Genomics, NRW, DE
BDNF FP	AAG GGC CAG GTC TGT TAA GC	Eurofins Genomics, NRW, DE
BDNF RP	GGT AAG AGA GCC AGC CAC TG	Eurofins Genomics, NRW, DE
CNPase FP	CAG AGA GTG ATC CTT GGA GCC	Eurofins Genomics, NRW, DE
CNPase RP	GTT CAT CTC CAG AAA TAA AGT GTC G	Eurofins Genomics, NRW, DE
CSF1R FP	GAG GTG ACA GTG GTT GAG GG	Eurofins Genomics, NRW, DE
CSF1R RP	GTC CAC AGC GTT GAG ACT GA	Eurofins Genomics, NRW, DE
CX3CL1 FP	CTG CTC AGG ACC TCA CCA TGT	Eurofins Genomics, NRW, DE
CX3CL1 RP	ATG TCG CCC AAA TAA CAG GC	Eurofins Genomics, NRW, DE
CX3CR1 FP	CTG CTC AGG ACC TCA CCA TGT	Eurofins Genomics, NRW, DE
CX3CR1 RP	ATG TCG CCC AAA TAA CAG GC	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGF1 FP	AGG AAA CGT CCA CAG TCA GG	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGF1 RP	CTC CTA CGC CCA CTC TTC AG	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGF2 FP	GGC TGC TGG CTT CTA AGT GT	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGF2 RP	ACT GGA GTA TTT CCG TGA CCG	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGF9 FP	GTG AAG GAA CCT TAC TTC TGT GGT	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGF9 RP	GTC CTT GGG GTC TTC TAC CTT TCT C	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGFR1 FP	CAG ATG CAC TCC CAT CCT CG	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGFR1 RP	GGG AGC TAC AGG GTT TGG TT	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGFR2 FP	AGC GCC TGT GAG AGA GAA G	Eurofins Genomics, NRW, DE
FGFR2 RP	CCG AAA CTG TTA CCT GTC TCC	Eurofins Genomics, NRW, DE
GAPDH FP	TGG CAA AGT GGA GAT TGT TGC C	Eurofins Genomics, NRW, DE
GAPDH RP	AAG ATG GTG ATG GGC TTC CCG	Eurofins Genomics, NRW, DE
IFN- $\gamma$ FP	CGG CAC AGT CAT TGA AAG CC	Eurofins Genomics, NRW, DE
IFN- $\gamma$ RP	TGC ATC CTT TTT CGC CTT GC	Eurofins Genomics, NRW, DE
IL-12 FP	AGA CCA CAG ATG ACA TGG TGA	Eurofins Genomics, NRW, DE
IL-12 RP	ACG ACG TGG GCT ACA GGC TT	Eurofins Genomics, NRW, DE
IL-1 $\beta$ FP	TAC CTG TGG CCT TGG GCC TCA A	Eurofins Genomics, NRW, DE
IL-1 $\beta$ RP	GCT TGG GAT CCA CAC TCT CCA GCT	Eurofins Genomics, NRW, DE
IL-6 FP	CTC TGC AAG AGA CTT CCA	Eurofins Genomics, NRW, DE
IL-6 RP	AGT CTC CTC TCC GGA CTT	Eurofins Genomics, NRW, DE
iNOS FP	TTG GAG GCC TTG TGT CAG CCC T	Eurofins Genomics, NRW, DE
iNOS RP	AAG GCA GCG GGC ACA TGC AA	Eurofins Genomics, NRW, DE
LINGO-1 FP	TCA TCA GGT GAG CGA GAG GA	Eurofins Genomics, NRW, DE
LINGO-1 RP	CAG TAC CAG CAG GAG GAT GG	Eurofins Genomics, NRW, DE
MBP FP	TCC ATC GGG CGC TTC TTT AG	Eurofins Genomics, NRW, DE

## 2. MATERIAL UND METHODEN

MBP RP	TCT CGT GTG TGA GTC CTT GC	Eurofins Genomics, NRW, DE
MT-ND1 FP	GCT TTA CGA GCC GTA GCC CA	Eurofins Genomics, NRW, DE
MT-ND1 RP	GGG TCA GGC TGG CAG AAG TAA	Eurofins Genomics, NRW, DE
PLP1 FP	GAG CAA AGT CAG CCG CAA AA	Eurofins Genomics, NRW, DE
PLP1 RP	CAA GCC CAT GTC TTT GGC AC	Eurofins Genomics, NRW, DE
SDHD FP	GCT CGA GCT CTC CTA CTC C	Eurofins Genomics, NRW, DE
SDHD RP	GCT TGG TGA CAG GTG AAT GT	Eurofins Genomics, NRW, DE
SEMA3A FP	GGA TGG GTC CTC ATG CTC AC	Eurofins Genomics, NRW, DE
SEMA3A RP	TGG TGC TGC AAG TCA GAG CAG	Eurofins Genomics, NRW, DE
TGF- $\beta$ FP	CTC CTG CTG CTT TCT CCC TC	Eurofins Genomics, NRW, DE
TGF- $\beta$ RP	GTG GGG TCT CCC AAG GAA AG	Eurofins Genomics, NRW, DE
TNF- $\alpha$ FP	CGG TCC CCA AAG GGA TGA GAA GT	Eurofins Genomics, NRW, DE
TNF- $\alpha$ RP	ACG ACG TGG GCT ACA GGC TT	Eurofins Genomics, NRW, DE
TrkB FP	TGA CGC AGT CGC AGA TGC TG	Eurofins Genomics, NRW, DE
TrkB RP	TTT CCT GTA CAT GAT GCT CTC TGG	Eurofins Genomics, NRW, DE
VEGF FP	AAC GAT GAA GCC CTG GAG TG	Eurofins Genomics, NRW, DE
VEGF RP	GCT GGC TTT GGT GAG GTT TG	Eurofins Genomics, NRW, DE
VEGFR2 FP	ACA TTG CCT GGT CAA ACA GC	Eurofins Genomics, NRW, DE
VEGFR2 RP	AGG CAT TGC AAT TCT GTC ACC	Eurofins Genomics, NRW, DE

### 2.1.4 Puffer, Reagenzien und Enzyme

Name	Chemikalien	Bestell-Nr.	Hersteller
Trenngel	30% Acryl-bisacrylamid-Mix; <i>Rotiphorese® Gel 30</i>	3029.1	Carl Roth, DE
	1,5 M Tris (pH 8,8); <i>Resolving Gel Buffer</i>	1610798	Bio-Rad, CA, USA
	10% SDS; <i>SDS ultrapure</i>	2326.4	Carl Roth, DE
	10% APS	9592.3	Carl Roth, DE
	TEMED	2367.3	Carl Roth, DE
	2-Propanol	33539	Sigma-Aldrich, MO, USA
	ddH <sub>2</sub> O		
Sammelgel	30% Acryl-bisacrylamid-Mix; <i>Rotiphorese® Gel 30</i>	3029.1	Carl Roth, DE
	1,5 M Tris (pH 6,8); <i>Staching Gel Buffer</i>	1610799	Bio-Rad, CA, USA
	10% SDS; <i>SDS ultrapure</i>	2326.4	Carl Roth, DE
	10% APS	9592.3	Carl Roth, DE
	TEMED	2367.3	Carl Roth, DE
	2-Propanol	33539	Sigma-Aldrich, MO, USA
	ddH <sub>2</sub> O		
Running Buffer	Rotiphorese® 10X Running Buffer	3060.2	Carl Roth, DE

## 2. MATERIAL UND METHODEN

	H <sub>2</sub> O		
Transfer Buffer	Rotiphorese® 10X Running Buffer	3060.2	Carl Roth, DE
	Methanol	STBJ9157	Sigma-Aldrich, MO, USA
	ddH <sub>2</sub> O		
10x TBS (pH 7,2-7,6)	Tris Pufferan®	4855.2	Carl Roth, DE
	NaCl Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth, DE
	ddH <sub>2</sub> O		
1x TBST	Tris Pufferan®	4855.2	Carl Roth, DE
	NaCl Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth, DE
	Tween® 20	817072	Merck, DE
	ddH <sub>2</sub> O		
5% BSA	BSA-Fraction-V	BSA-1T	Capricorn Scientific, DE
	Tris Pufferan®	4855.2	Carl Roth, DE
	NaCl Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth, DE
	Tween® 20	817072	Merck, DE
	ddH <sub>2</sub> O		
Lysis Buffer	NaCl Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth, DE
	Tris Pufferan®	4855.2	Carl Roth, DE
	EDTA	8040.1	Carl Roth, DE
	Glycerin	3783.1	Carl Roth, DE
	Nonidet-P40	N3500	US Biological, MA, USA
	NaN <sub>3</sub>	K39252688 906	Merck, DE
	cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack	5892970001	Roche, DE
	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726-5ML	Sigma-Aldrich, MO, USA
Anästhetikum	Ketamin 10%	-	Betapharm, DE
AZD4547	AZD4547	S2801	Selleck Chemicals, TX, USA
Dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.1	Carl Roth, DE
Formaldehyd	Formaldehydlösung 4%	1.00496.5000	Merck, DE
Freund-Adjuvans	Freund's Adjuvant, Incomplete	F5506	Sigma-Aldrich, MO, USA
Proteinleitern	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616 22619	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Loading Dye	Roti® Load 1	K929.1	Carl Roth, DE
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	63689	Sigma-Aldrich, MO, USA
Muskelrelaxans	Xylavet® (Xylazin)	1205	CP-Pharma, DE
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	M. Tuberculosis Des. H37 Ra	231141	Becton, Dickinson and Company, MD, USA
Myelin-Oligodendrozyten-	MOG35-55 (AA: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)	SB023	sb-PEPTIDE, FR

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Glykoprotein Peptid (MOG)			
Narkotikum	IsoFlo (Isofluran)	-	Zoetis, NJ, USA
NFDM	Nonfat-Dry-Milk	9999S	Cell Signaling, MA, USA
<i>Pertussis Toxin</i>	Pertussis Toxin, Bordetella	516560	EMD Millipore, MO, USA
Polyethylenglycol	Polyethylenglycol 300 (PEG300)	A2853	AppliChem, DE
RNAse-freies Wasser	Water for Molecular Biology	H20MB0106	Merck, DE
Stripping Buffer	Restore® PLUS Western Blot Stripping Buffer	46430	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
SYBR® Green	iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (5 ml)	172-5124	Bio-Rad, CA, USA
TWEEN® 80	TWEEN® 80	P1754	Sigma-Aldrich, MO, USA

### 2.1.5 Molekularbiologische Kits

Name	Chemikalien	Bestellnummer	Hersteller
BCA	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Illuminating Solution	SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	34580	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Reverse Transkription	QuantiTect® Reverse Transcription Kit	205313	QIAGEN, DE
RNA-Extraktion	RNeasy® Mini Kit	74104	QIAGEN, DE

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Artikelname	Bestellnummer	Hersteller
48-Well-Adapter (PCR)	MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor	4375284	Applied Biosystems, CA, USA
48-Well-Halterung (PCR)	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray	4375383	Applied Biosystems, CA, USA
8er-Reagiergefäß-Streifen (PCR)	MicroAmp™ 8-Tube Strip (0,2 ml)	10733087	Applied Biosystems, CA, USA
8er-Verschlusskappen-Streifen (PCR)	MicroAmp™ Optical 8-cap Strips	4323032	Applied Biosystems, CA, USA
Anästhetikum	Ketamin 10%	-	Betapharm, DE
Blotting Papier	Filter paper	1703969	Bio-Rad, CA, USA
Cryotubes	CRYO.S™ (2 ml)	122263	Greiner Bio-One, DE
Filter	Minisar® NML, Filter unit (0,2 µm)	16534-K	Sartorius Lab Instruments, DE

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Gefäße für Nass-/Gelfutter	Nunclon™ Delta Surface, 35x10 mm	150318	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Gefäße für Nass-/Gelfutter	CELLSTAR® Cell Culture Dishes, 60x15 mm	628160	Greiner Bio-One, DE
Gelfutter	DietGel® Boost	72-04-5022	ClearH2O, ME, USA
Glasspipetten	CELLSTAR® Serological pipette (25, 10, 5 ml)	760180; 607180; 606180	Greiner Bio-One, DE
Hydrogel	HydroGel®	70-01-1062	ClearH2O, ME, USA
Inhalationsnarkotikum	IsoFlo (Isofluran)	-	Zoetis, NJ, USA
Kanüle	Sterican® Insulinanüle 27G 0,40 x 12 mm	4665406	B. Braun SE, DE
Kanüle	Sterican® Standardkanüle 24G 0,55 x 25 mm	4657675	B. Braun SE, DE
Mikrotestplatte	Mikrotestplatte 96 Well	821.581	SARSTEDT, DE
Muskelrelaxans	Xylavet® (Xylazin)	1205	CP-Pharma, DE
Nagerhölzer	Nagerhölzer Größe S	NGS E-021	ABEDD, LVA
Nahrungssonde	Plastic Feeding Tubes, 22ga x 25 mm	FTP-22-25	Instech Laboratories, PA, USA
Nitrocellulose Membran	Amersham™ Protran® 0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membran	10600004	General Electric Healthcare, IL, USA
Reagiergefäße	Reagiergefäße (1,5 ml)	72690001; 04-212-3000	SARSTEDT, DE; Nerbe Plus, DE
Reagiergefäße	SafeSealed Reagiergefaß (2 ml)	72.695.500	SARSTEDT, DE
Reagiergefäße (PCR)	Reagiergefäße (0,2 ml)	04-012-1130	Nerbe Plus, DE
Spritze	Injekt® Luer Solo (20 ml)	4606305V	B. Braun SE, DE
Spritze	Injekt®-F Solo (1 ml)	99166017V	B. Braun SE, DE
Sterile Pipettenspitzen	Filtertips (1000, 100, 20, 10 µl)	06-693-5300; 06-642-5300; 07-622-8300; 06-602-5300	Nerbe Plus, DE
Tapeband	Durapore™ Kunstseidenpflaster 2,5 cm x 9,1 m	1538-1	3M, MN, USA
Teströhrchen	CELLSTAR® TUBES (50, 15 ml)	227 261; 188 271	Greiner Bio-One, DE
Trockenfutter	1324 TPF (Total Pathogen Frei)	1324	Altromin Spezialfutter, DE
Unsterile Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (1000, 200, 10 µl)	70.3050.020; 70.760.012; 70.1115	SARSTEDT, DE

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1.7 Laborgeräte

Beschreibung	Artikelname	Hersteller
Bildentwickler	INTAS ECL Chemocam Imager	INTAS Science Imaging Instruments, DE
Elektroden	Mini-PROTEAN® Tetra Electrode Assembly	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Elektrophorese-Behälter	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Elektrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Feinwaage	Analysenwaage MS105DU/M	Mettler Toledo, DE
Filterhaube	Filterhaube mit Verschlussklammer	TECNIPLAST, IT
Froster	NUAIRE -86°C ultralow freezer	NuAire, MN, USA
Gel-Kamm	Mini-PROTEAN® Combs, 15 well, 1.5 mm	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Gewebe-Homogenisator	TissueRuptor II	QIAGEN, DE
Gitterdeckel (Tierversuch)	Innenliegender Standard Gitterdeckel	TECNIPLAST, IT
Glasplatten	Mini-PROTEAN® Short plates	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Glasplatten Halterung	Mini-PROTEAN® Casting Frame	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Glasplatten m. Abstandhalter	Mini-PROTEAN® Glass plates with 1.5 mm spacers	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Heizblock	Eppendorf ThermoMixer® Comfort	Eppendorf, DE
Inkubator	Heraeus® Function Line Incubator	Heraeus Holding, DE
Käfig (Tierversuch)	1284L EUROSTANDARD TYP II L	TECNIPLAST, IT
Kühlschränke	Kühlschränke +4°C, Froster - 20°C	Robert Bosch Hausgeräte, DE
Magnetrührer	IKA RH Basic	IKA-Werke, DE
Mikroliterzentrifuge	Mikro 120	Andreas Hettich, DE
Mikroskop	Axio Scan Z1 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy, DE
Multipipette	BIOHIT Proline Plus (300 µl)	Sartorius Stedim Biotech, DE
Nanophotometer	Nanophotometer P330	IMPLEN, DE
PCR-System	StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, CA, USA
pH-Messgerät	HI2002 edge®	Hanna Instruments, DE
Pipetten	Eppendorf Reference (1000, 200, 100, 20, 10 µl)	Eppendorf, DE
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, DE
Rollenmischgerät	RM5 Assistent Nr. 348	Glaswarenfabrik Karl Hecht, DE
Spektrometer	Thermo Scientific Multiskan EX®	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Stromversorgung	Elektrophoresis Power Supply EV 231	Consort bvba, BEL
Tischzentrifuge	Universal 320 R	Andreas Hettich, DE

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Tischzentrifuge (PCR)	Labnet Spectrafuge™ C1301B	Labnet International, NJ, USA
Tränkeflasche (Tierversuch)	Tränkeflasche, max. Volumen 300 ml	TECNIPLAST, IT
Tränkekappe, kurz	Standard Tränkekappe, 25 mm	TECNIPLAST, IT
Tränkekappe, lang	Spezielle Tränkekappe, 65 mm	TECNIPLAST, IT
Transferblot-Gerät	Trans Blot® SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Ultraschall-Homogenisator	SONOPLUS HD 2070.2	BANDELIN electronic, DE
Unterschlupf (Tierversuch)	Mouse House®	TECNIPLAST, IT
Vertikale Gel Halterung	Mini-PROTEAN® Casting Stand	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Vortexmischer	PEQ TWIST	PEQLAB Biotechnologie, DE
Waage	Präzisionswaage PCB 1000- 2, max. 1000 g	KERN & SOHN, DE
Waage	Präzisionswaage PCB, max. 1000 g	KERN & SOHN, DE

### 2.1.8 Software

<b>Programmname</b>	<b>Versionsnummer</b>
GraphPad Prism	Version 9.5
ImageJ	Version 1.8.0_172
INTAS ChemoStar Imager Software	Version 0.4.18.0
StepOne Software	Version 2.3
ZEN 3.2 (blue edition)	Version 3.2

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Ethikvotum

Alle Maßnahmen, die im Rahmen des hier beschriebenen Tierversuches stattfanden, unterliegen der Richtlinie 2010/63 zum Schutz von Versuchstieren der Europäischen Union. Das Tierversuchsvorhaben wurde durch das Regierungspräsidium Gießen am 09.09.2020 nach § 8 Abs. 1 TierSchG unter dem Aktenzeichen GI20/18 Nr. G38/2020 genehmigt.

#### 2.2.2 Versuchsablauf

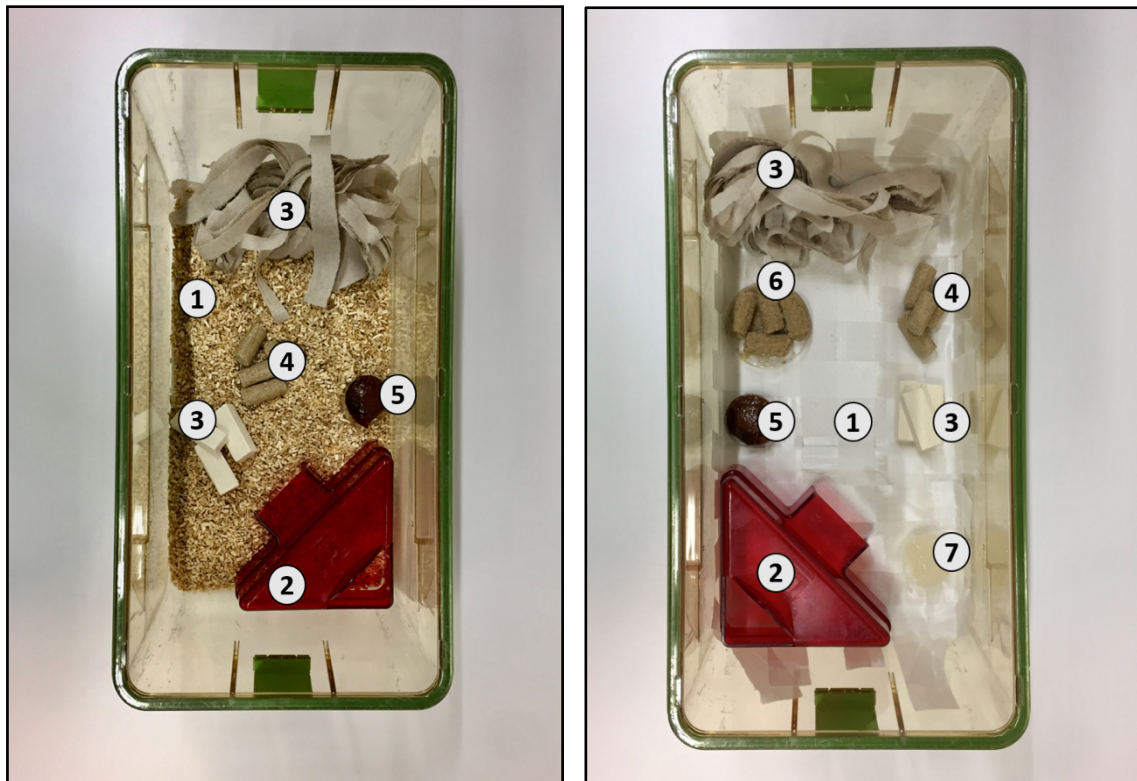
##### 2.2.2.1 C57BL/6J Mäuse

In den Tierversuchen wurden weibliche C57BL/6J Wild Typ Mäuse (Charles River Laboratories, DE), im Alter von 8 – 12 Wochen (zu Versuchsbeginn) und einem altersentsprechenden Gewicht von rund 20 – 25 g, genutzt. C57BL/6J Mäuse sind etablierte Versuchstiere eines Inzuchtstammes, die zur Beantwortung zahlreicher medizinischer Fragestellungen, aus den Gebieten rund um Diabetes, Adipositas, Tumorstadium, kardiovaskulären Pathologien sowie neurobiologischen Erkrankungen, herangezogen werden <sup>1</sup>. In früheren Publikationen zum Thema MS und EAE-Induktion wurden weibliche Tiere dieses Stammes verwendet, da MS bei weiblichen Patientinnen rund 2,8-mal häufiger auftritt, als in männlichen Vergleichsgruppen <sup>201</sup>. Ebenfalls wurde das typische Alter bei Erstmanifestation einer MS, das bei Menschen üblicherweise im jungen Erwachsenenalter durchschnittlich bei 30 Jahren liegt, auf die Lebensspanne der Versuchstiere übertragen, was einem Alter von ca. 12 Wochen entspricht <sup>157</sup>.

##### 2.2.2.2 Haltungsbedingungen während der Versuche

Während der Versuche wurden die Mäuse in Gruppen von 2-5 Tieren in Standardkäfigen (Tecniplast, IT) mit Holzstreu und zusätzlichem Enrichment-Material (Abedd, LVA) gehalten. Sie hatten unbegrenzten Zugang zu Wasser, außerdem standen Trocken- und Gelfutter (Altromin Spezialfutter, DE; ClearH2O, ME, USA) im Käfig bereit, welche täglich aufgefüllt wurden. Sobald die Krankheitssymptome einen EAE-Score von 3 überschritten, wechselten die betroffenen Tiere in einen modifizierten Käfig. Dieser war zur erleichterten Fortbewegung und Nahrungsaufnahme der Mäuse mit Cellulose Papier ausgelegt, das Gelfutter wurde durch Nassfutter und andgedicktes Wasser (ClearH2O, ME, USA) ergänzt (Abb. 7).

Innerhalb des Tierstalls herrschte eine konstante Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , eine relative Luftfeuchte von  $55 \pm 10\%$  und ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 14:10 Stunden.



**Abbildung 7. Ausstattung der im Tierversuch verwendeten Käfige.**

*Links:* Standardkäfig für Tiere mit EAE-Score < 3. Holzstreu (1), Versteck (2), Enrichment-Material (3), Trockenfutter (4) und Gelfutter (5).

*Rechts:* Modifizierter Käfig für Tiere mit EAE-Score  $\geq 3$ . Cellulose-Papier (1), Versteck (2), Enrichment-Material (3), Trockenfutter (4), Gelfutter (5), Nassfutter (6), Hydrogel (7).

*Hinweis:* Weiteres Trockenfutter und Wasser befinden sich in Halterungen des Käfigdeckels.

*Eigene Darstellung*

### 2.2.2.3 Induktion der EAE mit MOG<sub>35-55</sub>

Die EAE kann, wie bereits unter Abschnitt 1.4.1 beschrieben, durch unterschiedliche Methoden ausgelöst werden. Für die hier beschriebene Arbeit wurde das Verfahren der EAE-Induktion durch MOG<sub>35-55</sub> gewählt, da es die Pathophysiologie, die Symptomatik und den klinischen Verlauf einer MS Erkrankung am genauesten nachahmt.

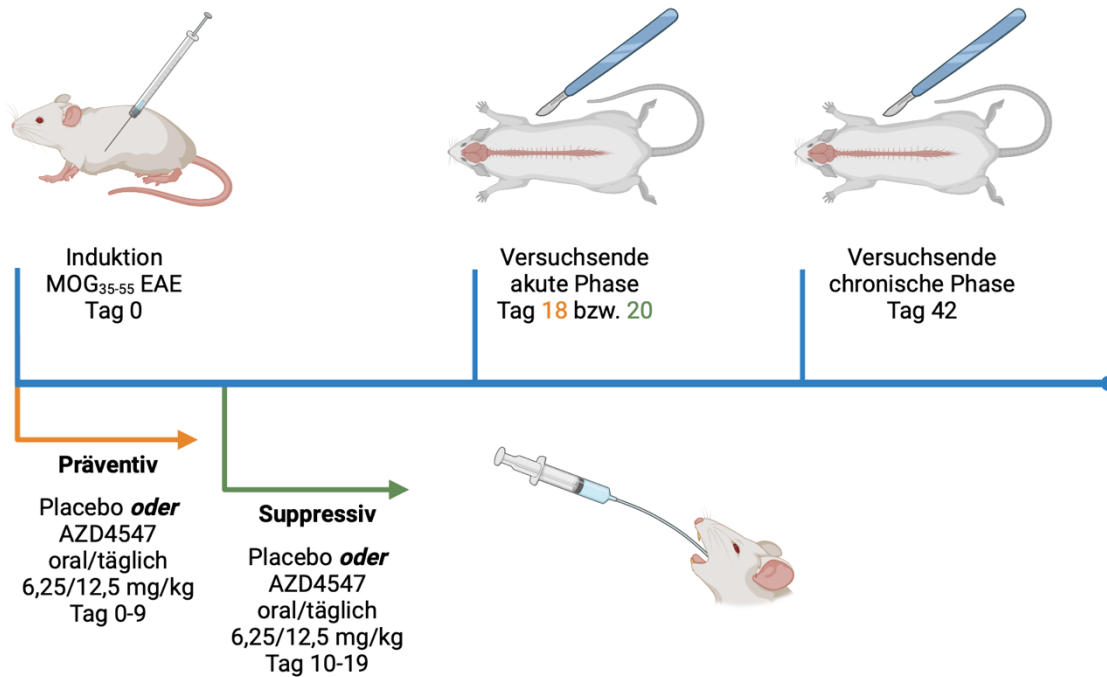
Die EAE-Induktion findet an Tag 0 des Versuches statt. 60 Minuten vor der eigentlichen MOG-Applikation wird den Mäusen jeweils 300 ng *Pertussis Toxin* (EMD Millipore, MO, USA) gelöst in 100  $\mu\text{l}$  PBS i.p. verabreicht, mit dem Ziel die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen. Im Blutstrom zirkulierende Effektorzellen sollen so leichter ins ZNS eintreten und ihre Wirkung entfalten können. Für die EAE-Induktion werden 200  $\mu\text{l}$

MOG-Emulsion benötigt, die im Verhältnis 1:1 aus MOG-Antigen und vollständigem Freund'schen Adjuvans (CFA) bestehen. Dazu werden zunächst 300 µg MOG<sub>35-55</sub> (sb-PEPTIDE, FR) mit 100 µl PBS vermengt. Weiter werden 100 µl unvollständiges Freund'sches Adjuvans (ICF; Sigma-Aldrich, MO, USA) mit 1 mg *Mycobacterium tuberculosis* (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) zum CFA gemischt. Die Emulsion aus Antigen und CFA wird mit Hilfe von Ultraschall homogenisiert (BANDELIN electronic, DE). *M. tuberculosis* wird zur Verstärkung der Immunreaktion im ZNS genutzt<sup>13,104</sup>, unter anderem um sicherzustellen, dass die EAE mit höherer Wahrscheinlichkeit ausgelöst wird. Anschließend werden jedem Versuchstier 4 x 50 µl (gesamt 200 µl) der MOG-Emulsion s.c. in den Bereich der drainierenden Lymphknoten in der Achsel- und Leistenregion injiziert. Während der Injektion werden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Zoetis, NJ, USA) narkotisiert. Die erforderliche Narkosetiefe wird über Reflextestungen an den Vorder- und Hinterläufen überprüft. 48 Stunden nach der MOG-Injektion wird erneut eine zweite Dosis von 300 ng Pertussis Toxin zur Permeabilitätserhöhung der BHS verabreicht, um den Wirkeintritt der EAE sicherzustellen.

### 2.2.2.4 Applikation von Fexagratinib (AZD4547)

Diese Studie bestand darin, den unselektiven FGFR-Inhibitor Fexagratinib in zwei Dosierungen (6,25 bzw. 12,5 mg/kg Körpergewicht) in einem suppressiven Ansatz zu erproben. Die Versuchstiere befanden sich während des Versuchs in einem akuten bzw. chronischen Krankheitsstadium. Innerhalb des suppressiven Ansatzes werden der Wirkstoff bzw. das Placebo-Präparat täglich von Tag 10-19 p.i. oral verabreicht. Die Tötung der Versuchstiere der akuten Phase erfolgte an Tag 20 p.i.; die der chronischen Phase an Tag 42 p.i. (Abb. 8).

Das Verum wurde auf Basis eines mittleren Körpergewichts der Mäuse von 20 g für beide Konzentrationen (6,25 bzw. 12,5 mg/kg KG) mit 4% DMSO (Carl Roth, DE), 30% PEG300 (AppliChem, DE), 5% TWEEN® 80 (Sigma-Aldrich, MO, USA) und 61% ddH<sub>2</sub>O gemischt. Das Placebo-Präparat wurde ebenfalls im oben genannten Verhältnis vermengt, jedoch ohne die Wirkstoffkomponente AZD4547. Verum bzw. Placebo wurden täglich oral per Magensonde (Instech Laboratories, PA, USA) in einem Volumen von 0,1 ml pro 20 g Körpergewicht verabreicht.



**Abbildung 8. Schema des Versuchsablaufs.**

Zeitliche Darstellung des Versuchsablaufs der akuten und chronischen Phase mit Zeitpunkt und Dauer der Medikamenten-/ Placebo-Gabe beim präventiven und suppressiven Therapieansatz. In dieser Arbeit wird nur über die Ergebnisse des akuten und chronisch suppressiven Therapieansatzes berichtet.

*Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com*

### 2.2.2.5 Probenentnahme und Fixierung der Gewebe

Die Art der Probenentnahme unterscheidet sich je nach weiterer Verwendung, im Rahmen dieser Arbeit wurde Gewebe mittels Western Blot, PCR und IHC verwendet. Für Protein- und mRNA-Analysen werden die Versuchstiere in ihren vertrauten Käfigen mittels CO<sub>2</sub>-Einstroms (ca. 13 l/min) getötet. Die Gewebeanteile für die spätere Untersuchung im Western Blot werden in Lysis Buffer bei +4 °C gelagert, um weiterverarbeitet zu werden. Gewebe, die einer mRNA-Analyse unterzogen werden, müssen in flüssigem Stickstoff direkt nach der Entnahme schockgefrostet werden und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

Die Gewebeentnahme für immunologisch/morphologische Untersuchungen im Rahmen der Immunhistochemie unterscheiden sich dahingehend, dass die Gewebe direkt mit Formaldehyd (Merck, DE) perfundiert werden müssen. Dazu werden die Mäuse zunächst mit Ketamin (Betapharm, DE) anästhesiert und mit Xylazin (CP-Pharma, DE) muskelrelaxiert. Nach entsprechender Prüfung der Anästhesietiefe durch versuchte Reflexauslösung an den Vorder- und Hinterläufen wird der Hautschnitt und die

Sternotomie durchgeführt. Diese Schritte sind nötig, um nun den gesamten Körper mit Formaldehyd perfundieren zu können. Dazu wird zunächst eine Kanüle (B. Braun SE, DE) in den linken Ventrikel gestochen und danach das rechte Atrium eröffnet, um ein ausreichendes Durchspülen der Organe zu gewährleisten. Nun wird der Körperkreislauf mit ca. 10 ml gekühltem PBS durchspült (Perfusionsgeschwindigkeit: 30 ml/min mittels Perfusor), um möglichst das gesamte Blutvolumen herauszuwaschen. Danach folgt die erste Fixierung des Gewebes mit 10 ml gekühlter 4%iger Formaldehyd-Lösung, anschließend werden die Proben für mindestens sieben Tage in Formaldehyd eingelegt.

### 2.2.2.6 EAE-Scoring

Die neurologischen Defizite der Mäuse, hervorgerufen durch die EAE-Induktion, werden innerhalb des Versuchszeitraums täglich morgens, bei Mäusen mit einem Score  $\geq 3$  zusätzlich nachmittags, bewertet. Die Quantifizierung wird unabhängig durch einen erfahrenen Mitarbeiter\*in nach den in Tabelle 9 definierten Kriterien vorgenommen.

Score	Definition
0	Keine erkennbaren Defizite
0,5	Parese der Schwanzspitze
1	Parese des Schwanzes
1,5	Leichte Parese der Hinterbeine
2	Mittelschwere Parese der Hinterbeine
2,5	Schwere Parese der Hinterbeine
3	Plegie der Hinterbeine
3,5	Plegie der Hinterbeine mit kombinierter Parese der Vorderbeine
4	Hochgradige Parese aller Extremitäten
4,5	Hochgradige Parese aller Extremitäten mit kombinierter Inkontinenz
5	Moribund/Tod

**Tabelle 9.** Definition der motorischen Defizite bei entsprechendem EAE-Score nach MOG<sub>35-55</sub> EAE-Induktion.

### 2.2.3 Western Blot (WB)

Der Western Blot ist eine semi-quantitative Methode zur Analyse von Proteinen. Dazu wird ein Polyacrylamid-Gel mit Proteinen beladen, die anschließend in einer Gelelektrophorese entsprechend ihres molekularen Gewichts aufgetrennt werden. Anschließend werden die sich im Gel befindlichen, aufgetrennten Proteine, im semi-dry-Verfahren auf eine zwischen puffergetränkten Filterpapieren befindliche

Nitrocellulosemembran übertragen bzw. *geblottet*. Die proteinhaltige Membran dient nun als Grundlage für weitere Arbeitsschritte, wie z.B. der Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern.

### 2.2.3.1 Probenvorbereitung

Nach der unter Abschnitt 2.2.2.5 geschilderten Probenentnahme wird das bei +4 °C in Lysis Buffer gelagerte Gewebe nun mit Hilfe eines Gewebe-Homogenisators (QIAGEN, DE) für die weiteren Arbeitsschritte zerkleinert. Die Zerkleinerung des Gewebes ist nötig, damit die Zellverbände, in deren Inneren sich die benötigten Proteine befinden, zerstört werden. So befinden sich die Proteine nach der Homogenisierung frei im Lysis Buffer, der zum Schutz vor Proteinverdau während der Lagerung mit Proteinase-/Phosphatase-Inhibitoren (Sigma-Aldrich, MO, USA) versehen ist. Das Homogenisat wird zur weiteren Trennung von Zelldetritus und Proteinen bei +4 °C und 14.000 U/min. für 30 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hat sich ein pellet-artiger Bodensatz gebildet, um den herum nun der proteinhaltige Überstand abpipettiert wird. Bis zum nächsten Arbeitsschritt wird der Überstand bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach SMITH

Nach der Probenaufbereitung ist es nötig die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben zu bestimmen, um eine spätere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Nur so kann bei veränderten Proteinmustern im Western Blot auch auf eine unterschiedliche Proteinkonzentration in den Ausgangsproben geschlossen werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) benutzt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die eigentliche Konzentrationsbestimmung wird die Intensität des Farbwechsels nach Zugabe der im Protokoll erwähnten Reagenzien mit Hilfe eines Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) gemessen. Nach der Konzentrationsbestimmung werden die Proben mit Lysis Buffer verdünnt, sodass sie eine Konzentration von 1 µg/µl besitzen.

### 2.2.3.3 Durchführung der Western Blots

Zur Durchführung eines Western Blots wird zuerst eine SDS-PAGE durchgeführt, für die ein, aus Sammel- und Trenngel bestehendes, 10%iges-Polyacrylamid-Gel hergestellt werden muss. Von den in Absatz 2.2.3.2 gereinigten Proben werden nun 15 µg Proteine mit je 5 µl Loading Dye (Carl Roth, DE) vermischt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock

erhitzt, um anschließend das Gel mit einem Volumen von 15 µl pro Tasche zu befüllen. Zur späteren Identifizierung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts werden Proteinleitern (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) verwendet. Das beladene Polyacrylamid-Gel wird nun in Running Buffer gestellt und eine vertikale Spannung angelegt. Die Proteine sind durch Hitze und den Einsatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol im Loading Dye denaturiert, sodass sie mit Hilfe von SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen werden und sich anschließend entlang der Spannung aufreihen.

Nach Abschluss der SDS-PAGE wird das Gel auf eine Nitrocellulosemembran (General Electric Healthcare, IL, USA) gelegt, die sich zwischen zwei in Transfer Buffer getränkten Filterpapieren (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) befindet. Während dieses semi-dry-blotting Verfahrens wird erneut eine senkrecht zum Gel stehende Spannung angelegt, die nun die Proteine auf die Nitrocellulosemembran überträgt ohne dabei ihre Position untereinander zu verändern.

### 2.2.3.4 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Transfer werden die Membranen für 1 Stunde bei +4 °C in 10 ml BSA gerollt. Anschließend werden 5 ml neues BSA zu der Membran gefüllt und der primäre Antikörper wird in der nötigen Konzentration hinzugegeben, der nun für ca. 12-15 Stunden bei +4 °C rollend inkubieren muss. Nach der Inkubationszeit wird die Membran 3 x für 5 min mit je 10 ml TBST rollend bei Raumtemperatur gewaschen, um die verbliebenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird der sekundäre Antikörper in 5 ml NFDN hinzugegeben und ebenfalls rollend bei Raumtemperatur für ca. 1,5 Stunden inkubiert. BSA und NFDN werden verwendet, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern, indem freie Bindungsstellen an den Proteinen auf der Membran durch Zugabe von BSA/NFDN blockiert werden. Zuletzt wird die Membran erneut 3 x für 5 min mit je 10 ml TBST bei Raumtemperatur rollend gewaschen, um auch die restlichen, nicht gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen.

Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Komplexe wird nun eine Chemilumineszenz Lösung (ECL; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) für 5 min auf die Membran aufgetragen. Die primären Antikörper binden spezifisch an die Proteine und wurden wiederum von den sekundären Antikörpern gebunden. Die sekundären Antikörper sind zusätzlich mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, die nun durch Zugabe der ECL-Lösung eine Lichtreaktion katalysiert. Diese Chemilumineszenz-Reaktion kann mit einem Bildentwickler (INTAS Science Imaging Instruments, DE) detektiert werden, sodass das gesuchte Protein als Bande erkennbar ist.

### 2.2.3.5 Auswertung der Western Blots

Um nun Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ziehen zu können, müssen die Proteinbanden quantifiziert werden. Zur Quantifizierung wurde ImageJ benutzt und die ermittelten Werte jeweils ins Verhältnis zur Konzentration der Ladungskontrolle gesetzt. Als Ladungskontrolle diente in dieser Arbeit durchgängig das Glykolyse-Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

### 2.2.4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Eine Polymerase Kettenreaktion ist ein molekularbiologisches Verfahren zur künstlichen Vervielfältigung von DNA-Proben und kann als Nachweis- und Quantifizierungsverfahren von genetischem Material dienen. Der Zusatz *reverse transcription* drückt in diesem Fall aus, dass das ursprüngliche genetische Material als mRNA codiert war und künstlich durch Einsatz einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben worden ist. mRNA wird verwendet, da diese Art der RNA bereits alle Splicing-Prozesse durchlaufen hat und somit nur noch aus codierenden Abschnitten besteht.

#### 2.2.4.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden wie unter Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei -20 °C gelagert. Im weiteren Verlauf wird die Probe nun ebenfalls mit einem Gewebe-Homogenisator (QIAGEN, DE) zerkleinert, um die in der Zelle befindliche mRNA freizusetzen. Für die daran anschließende Aufreinigung der mRNA wurde das RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, DE) benutzt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der zuvor isolierten mRNA wird nun im Nanophotometer (IMPLEN, DE) bestimmt, damit für die nachfolgende cDNA-Synthese alle Proben die gleiche Ausgangsmenge an mRNA besitzen. Die bei dieser Arbeit für die cDNA-Synthese verwendete Menge an mRNA betrug 1 µg.

### 2.2.4.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der für die PCR benötigten cDNA erfolgt nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN, DE). Die verwendete Menge an mRNA für die cDNA-Synthese betrug 1 µg/Probe. Das gesamte Reaktionsvolumen nach Beendigung der Synthese betrug 25 µl/Probe (inkl. aller verwendeten Reagenzien nach Protokoll des Herstellers) und wurde nachfolgend mit jeweils 175 µl RNase-freiem Wasser (Merck, DE) auf ein Totalvolumen von 200 µl verdünnt.

### 2.2.4.4 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR wurde jeweils ein Mastermix mit den Primern des zu untersuchenden Gens und ein Mastermix mit Primern für die Ladungskontrolle (GAPDH) angesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen pro Probe beträgt 20 µl, davon sind 19 µl Mastermix, bestehend aus 10 µl iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, CA, USA), 7 µl RNase-freies Wasser (Merck, DE), und jeweils 1 µl Forward- und Reverse-Primer. Die individuelle cDNA wird in einem Volumen von 1 µl hinzugegeben. Jede Probe wurde zur Verbesserung der Ergebnisgenauigkeit doppelt pipettiert. Anschließend werden die Proben in insgesamt 40 Zyklen repliziert und die Schmelzkurven ermittelt, um die Spezifität der Amplifikate sicherzustellen.

### 2.2.4.5 Auswertung der PCR

Die letztendliche Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgt mit der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Bei dieser Methode werden zuerst die CT-Werte des Zielgens mit denen der Ladungskontrolle ins Verhältnis gesetzt und anschließend die Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe verglichen.

### 2.2.5 Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung (IHC)

Die gesonderte Probengewinnung und Fixierung der Gewebe sind im Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, hier wird nur auf die verwendeten Färbungen eingegangen. Alle Rückenmarksproben wurden nach der Einbettung in Paraffinblöcke zwecks folgender immunhistochemischer Untersuchungen in 1 µm dünne Scheiben geschnitten.

### 2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird zur Darstellung feingeweblicher Strukturen verwendet und wurde im Rahmen dieser Studie zur Beurteilung der Entzündungsaktivität anhand von Zellakkumulationen genutzt. Dazu wurden die 1 µm dicken Gewebsschnitte zunächst mit Xylol nach der Paraffineinbettung gereinigt und mit Ethanol rehydriert. Im ersten Schritt folgte die Färbung mit Hämatoxylin für 5 Minuten und einer nachfolgenden Spülung mit Wasser. Im zweiten Schritt wurden die Gewebsschnitte für weitere 5 Minuten in Eosin eingefärbt und mittels Spülung mit Alkohol dehydriert. Zuletzt wurden die Schnitte unter Verwendung von Eindeckmittel und Deckgläsern auf den Objektträgern platziert.

### 2.2.5.2 Bielschowsky-Silber-Färbung

Die Versilberung nach Bielschowsky stellt eine Methode zur Darstellung von Neuronen und ihren axonalen Verästelungen dar und wurde in dieser Studie zur Quantifizierung der Remyelinisierung in Läsionen der weißen Substanz des ZNS benutzt. Die Schnitte wurden erneut mit Xylol entwacht und mit Ethanol rehydriert. Anschließend folgte die 20-minütige Inkubation mit 20%iger Silbernitrat-Lösung ( $\text{AgNO}_3$ ) ohne Lichteinfluss und der Reinigung mit Wasser. Nachfolgend wurden die Gewebe mit Natriumthiosulfat für 2 Minuten inkubiert und erneut mit Wasser gewaschen, danach dehydriert und letztlich auf Objektträgern fixiert.

### 2.2.5.3 Luxol fast blue/periodic acid-schiff-Färbung (LFB/PAS)

Die LFB/PAS-Färbung dient der Darstellung von Myelin und eignet sich zur Beurteilung von demyelinisierten Arealen im Rahmen der MS-Erkrankung. Die Gewebeschnitte wurden zuerst mit Xylol entwacht und mit Ethanol rehydriert. Die Inkubation mit Luxol fast blue erfolgte bei 56 °C über Nacht und wurde mit der Färbung in Kristall-Violett für 30-40 Sekunden abgeschlossen. Nachdem das überschüssige Färbemittel abgetropft war, wurden die Schnitte rehydriert und mit Eindeckmittel und Deckgläsern auf Objektträgern fixiert.

### 2.2.5.4 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen wurden in dieser Arbeit zur spezifischen Markierung und Differenzierung von immunmodulatorischen Zellen und Oligodendrozyten verwendet, um das Ausmaß der Zelinfiltration, Zelldifferenzierung und Inflammation im

Rückenmark zu untersuchen. Dazu wurden die Gewebsschnitte zunächst mit Xylol entwachst und mit Ethanol rehydriert. Im Anschluss daran wurden Schnitte für 3 x 5 Minuten in kochendem Citratpuffer (10 mM, pH 6) behandelt, um eine ausreichende Antigendemaskierung bzw. Antigen-Retrieval zu gewährleisten. Zusätzlich wurde die Aktivität endogener Peroxidasen durch 10-minütiges Einwirken in 3%igem Wasserstoffperoxid blockiert. Die vorbereiteten Gewebe wurden anschließend in 10%igem-FBS für 1 Stunde und mit den entsprechenden primären Antikörpern über Nacht bei +4 °C inkubiert. Im Rahmen der Versuche wurden primäre Antikörper gegen aktivierte Mikroglia/Makrophagen (Mac3, Pharmingen, CA, USA), T-Lymphozyten (CD3, Serotec, UK), B-Lymphozyten (B220, Pharmingen, CA, USA), unreife Oligodendrozyten (Olig2, MerckMillipore, DE) und reife Oligodendrozyten (P25, Abcam, UK) genutzt. Im letzten Schritt erfolgte die Inkubation mit sekundären, biotinylierten Antikörper für 1 Stunde. Die Immunreaktivität wurde mit Hilfe des Avidin-Biotin-Komplexes nachgewiesen.

### 2.2.5.5 Auswertung

Die Arten der Auswertungen bei den histopathologischen Färbungen und bei den immunhistochemischen Verfahren unterscheiden sich voneinander. Bei allen Färbungen wurden stets zwischen 3 bis 6 verschiedene Schnittebenen (zervikal bis lumbal) je Maus und Färbung untersucht, um eine möglichst verlässliche Aussage über das gesamte Rückenmark treffen zu können. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe des Axio Scan Z1 Mikroskops angefertigt und mit der Software ZEN 3.2 (blue edition) ausgewertet (beide Carl Zeiss Microscopy GmbH, DE).

Die HE-Färbung stellt Zellkerne und vorhandene Zellakkumulationen dar, diese sind Zeichen einer vermehrten Gewebsinfiltration und können Hinweise für inflammatorische Prozesse liefern. Im Rahmen der Auswertung wurden Zellansammlungen nach Anzahl der Zellen mit einem Punktwert zwischen 1 und 5 bewertet, 1 spricht für eine sehr geringe Inflammation, 5 für stärkste Entzündungsprozesse (Tabelle 10). Anschließend wurde der durchschnittliche Inflamationsindex je Maus ermittelt.

Die Versilberung nach Bielschowsky färbt Neurone und deren axonale Verästelungen an und kann als Indikator für die axonale Dichte herangezogen werden. Dazu wurde die Anzahl von Axonen pro Gewebeschnitt in jeweils 10 Quadraten mit einer Größe von je 5.000  $\mu\text{m}^2$  in demyelinisierten Arealen der weißen Substanz (White matter lesion; WML) bestimmt. Für jede Maus wurde die Anzahl an Axonen ebenfalls in einem gesund-

erscheinenden Areal (Normal-appearing white matter; NAWM) gleicher Größe erfasst und mit den Werten aus den WMLs ins Verhältnis gesetzt. Die Werte wurden anschließend gemittelt und als WML/NAWM (%) angegeben. Die Werte geben Rückschlüsse auf den Grad und das Ausmaß der Remyelinisierung und der neuronalen Regenerationsfähigkeit in ursprünglich demyelinisierten Läsionen der weißen Substanz. Die LFB/PAS-Färbung färbt das Myelin der axonalen Myelinscheiden ein und ermöglicht die Beurteilung des Anteils der Demyelinisierung an der Gesamtfläche der weißen Substanz. Dazu wurde die Fläche der gesamten weißen Substanz jedes verwertbaren Gewebeschnittes ausgemessen (Total White Matter; TWM). Anschließend wurden die Flächen aller demyelinisierten Herde erfasst (White Matter Lesions; WML) und diese Summe ins Verhältnis zur TWM gesetzt (WML/TWM (%)).

Die Auswertung der immunhistochemischen Marker (CD3, Mac3, B220, Olig2, p25) erfolgte einheitlich, in dem pro Gewebsschnitt die angefärbten Zellen in je 20 Quadraten mit je einer Fläche von 10.000  $\mu\text{m}^2$  ausgezählt wurden. Die Einzelwerte wurden gemittelt und auf eine Fläche von 1  $\text{mm}^2$  normalisiert.

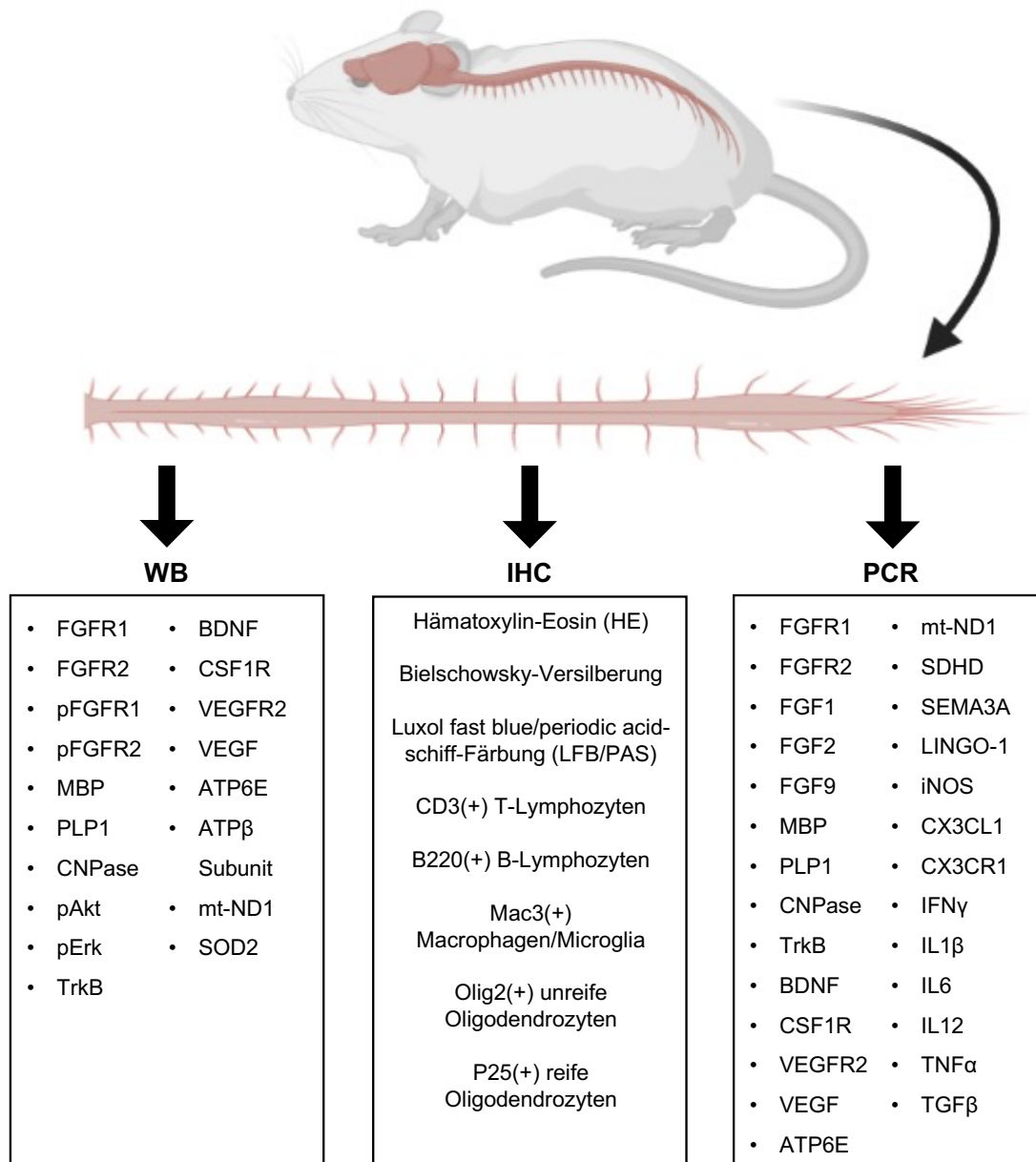
Punktwert	Zellanzahl
1	8-15
2	16-23
3	24-31
4	32-39
5	40-47

**Tabelle 10.** Verwendete Punkteskala bei der Bewertung der Entzündungsaktivität in untersuchten histopathologischen Hämatoxylin-Eosin gefärbten Rückenmarkschnitten.

### 2.2.6 Statistische Tests

Alle Experimente, Erhebungen und Auswertungen wurden verblindet durchgeführt. Die klinischen Krankheitsverläufe der Mäuse wurden mittels eines Mann-Whitney U Tests ausgewertet. Alle histopathologischen und immunhistochemischen Resultate wurden mittels eines Student's t-Tests ausgewertet. Zur statistischen Testung von Ergebnissen im Western Blot und PCR wurden die One-way analysis of variance (One-way ANOVA) sowie als Posthoc-Test der Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt. Alle statistischen Auswertungen sowie die Anfertigung der Graphen erfolgten mit Hilfe von GraphPad Prism Version 9.5. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, das Signifikanzniveau wurde bei  $p \leq 0,05$  festgelegt (\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ).

2.2.7 Zusammenfassung der Methodik



**Abbildung 9. Zusammenfassung der Methodik und der Targets**

Zusammenfassende Darstellung der Probenentnahme und der durchgeführten molekularbiologischen Methoden mit Auflistung der untersuchten Proteine, Gene und Färbungen.  
*Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com*

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 Reduktion der klinischen Krankheitsverläufe nach MOG<sub>35-55</sub>-induzierter EAE

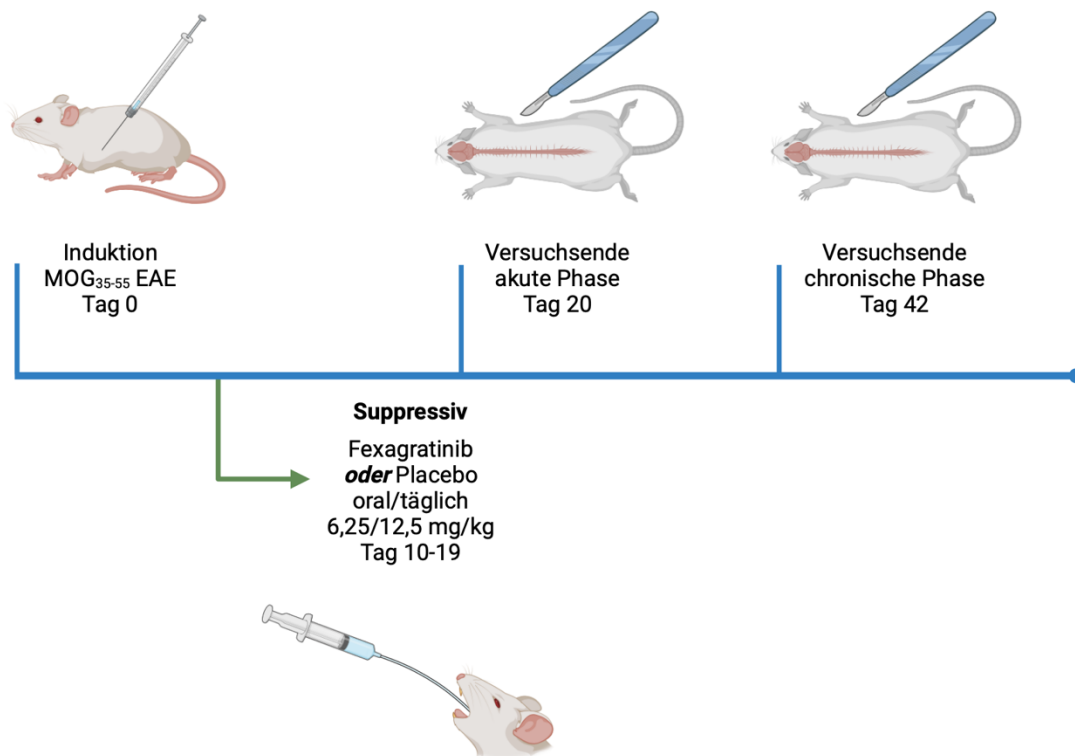
Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse sind im Rahmen der Versuche an MOG<sub>35-55</sub>-EAE-Mäusen erhoben worden. Diese erhielten den unselektiven FGFR-Inhibitor AZD4547 unter der Hypothese einer Symptomlinderung und einer verbesserten Neuroregeneration. Die Mäuse der Interventionsgruppen erhielten den Wirkstoff in einer Dosierung von 6,25 bzw. 12,5 mg/kg Körpergewicht täglich von Tag 10-19 p.i. per Magensonde oral, die Kontrollgruppe bekam das Placebo Präparat nach gleichem Schema. Die Tiere der akuten Phase wurden am 20. Tag p.i. getötet; die Tiere der chronischen Phase am 42. Tag (Abb. 10).

Der Krankheitsverlauf zeichnet sich durch einen Symptombeginn um den zehnten Tag nach EAE-Induktion aus, die maximale Symptomschwere wird vom 15. bis 17. Tag erreicht (Placebo EAE von 2,2; 6,25 mg EAE von 1,0; 12,5 mg EAE von 0,8;  $P = 0,001$ ). Daran anschließend folgt eine Regenerationsphase bis zum 27. bzw. 28. Tag p.i. (Abb. 11A). Ab dem 30. Tag des Experiments ist in der Placebogruppe ein erneuter klassischer Anstieg der mittleren EAE-Werte zu erkennen, der bis zum Ende der Untersuchung am 42. Tag anhält (Placebo EAE von 1,8; 6,25 mg EAE von 0,8; 12,5 mg EAE von 0,3;  $P = 0,002$ ). Die EAE-Werte in den Interventionsgruppen mit 6,25 und 12,5 mg/kg sind über den gesamten Untersuchungszeitraum gegenüber der Placebogruppe reduziert. Darüberhinausgehend wird eine frühere Abmilderung des ersten Symptommaximums deutlich, der in den Interventionsgruppen bereits zwei bzw. drei Tage früher als in der Placebogruppe erreicht wurde, bei gleichem Symptombeginn um den zehnten Tag herum (Abb. 11B). Ebenfalls abgemildert werden konnte der zweite Symptomgipfel, der bei den AZD4547 behandelten Mäusen lediglich zu einer minimalen kurzzeitigen Erhöhung der EAE-Werte führte. Im weiteren Verlauf bis zum Ende des Experiments glichen sich die Symptomwerte der Interventionsgruppen den Werten während der Regenerationsphase wieder an bzw. wurden in der 12,5 mg/kg Gruppe sogar noch unterschritten (Abb. 11A).

In der akuten Phase des suppressiven Therapieansatzes (20 Tage p.i.) konnte durch die AZD4547 Gabe in beiden Dosierungen eine deutliche Symptommindering von schweren Symptomen (EAE-Wert  $\geq 2,5$ ) erreicht werden (Abb. 11D). In der Placebo Gruppe waren 37% der Versuchstiere schwer erkrankt, bei den mit 6,25 bzw. 12,5 mg

### 3. ERGEBNISSE

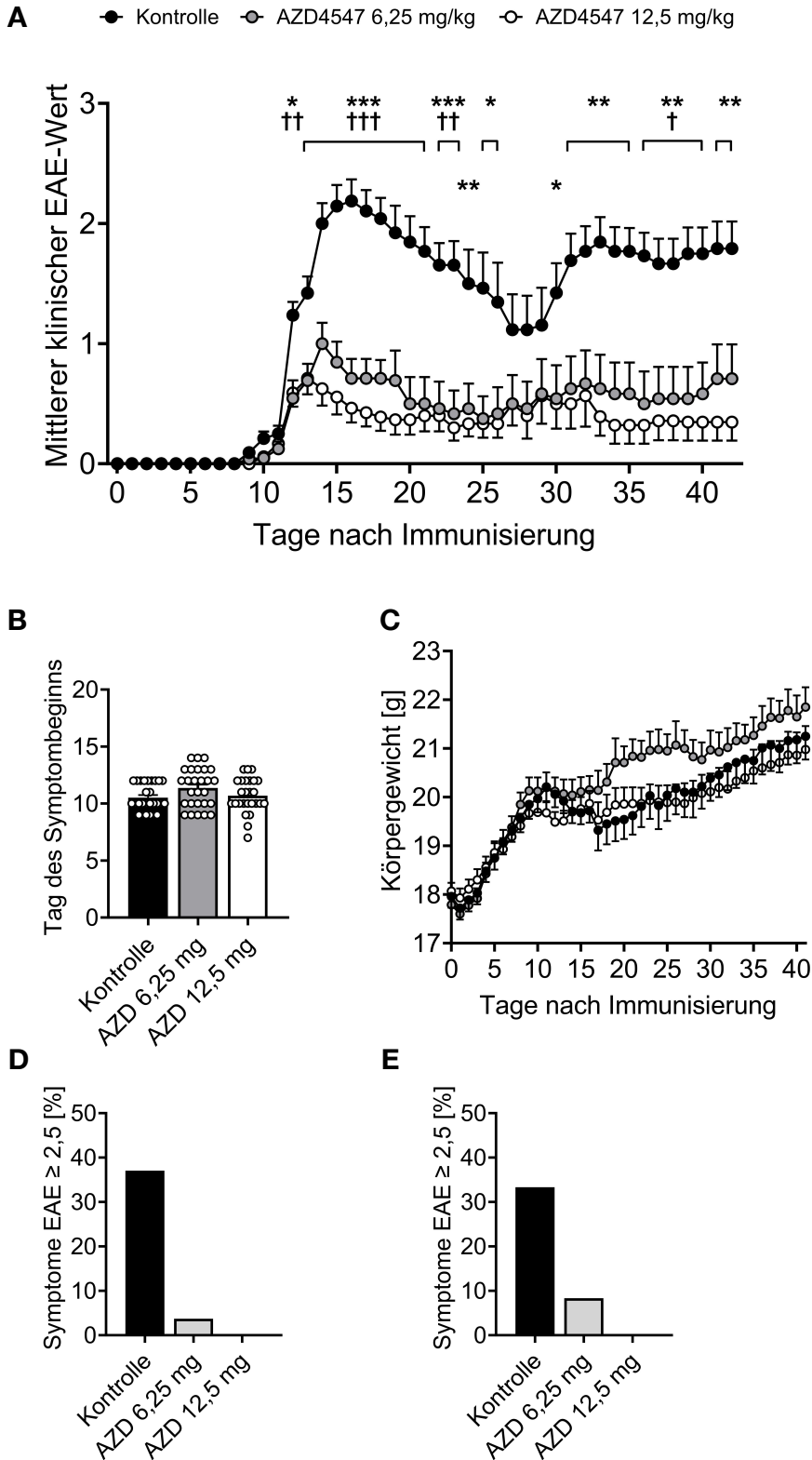
AZD4547 behandelten Tieren lediglich 4% bzw. 0% ( $P = 0,0011$  bzw.  $P = 0,002$ ). Während der chronischen Phase (Tag 42 p.i.) waren 33% der Mäuse in der Placebo Gruppe schwer erkrankt, wohingegen nur 8% bzw. 0% der mit 6,25 bzw. 12,5 mg/kg AZD4547 behandelten Mäuse einen EAE-Wert  $\geq 2,5$  aufwiesen ( $P = 0,2425$  bzw.  $P = 0,0597$ ; Abb. 11E). Signifikante Unterschiede im Körpergewicht konnten während der Versuche nicht beobachtet werden (Abb. 11C).



**Abbildung 10.** Zeitliche Darstellung des suppressiven Versuchsablaufs der akuten und chronischen Phase mit Zeitpunkt und Dauer der Medikamenten-/ Placebo-Gabe beim suppressiven Therapieansatz.

*Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com*

### 3. ERGEBNISSE



**Abbildung 11. Darstellung der klinischen Krankheitsverläufe nach EAE-Induktion in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A: Darstellung der Symptomlast mit Hilfe der klinischen EAE-Scores während der akuten und chronischen Phase.

B: Anzahl der Tage nach EAE-Induktion bis zum Auftreten erster Symptome.

### 3. ERGEBNISSE

---

C: Entwicklung des Körpergewichts (g) nach EAE-Induktion.

D: Anteil an Mäusen der jeweiligen Versuchsgruppe in der akuten Phase (20 Tage p.i.), die eine schwere Symptomatik aufwiesen (EAE-Score  $\geq 2,5$ ).

E: Anteil an Mäusen der jeweiligen Versuchsgruppe in der chronischen Phase (42 Tage p.i.), die eine schwere Symptomatik aufwiesen (EAE-Score  $\geq 2,5$ ).

Placebo Gruppe n = 13. AZD4547 6,25 Gruppe n = 13. AZD4547 12,5 Gruppe n = 13. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ .

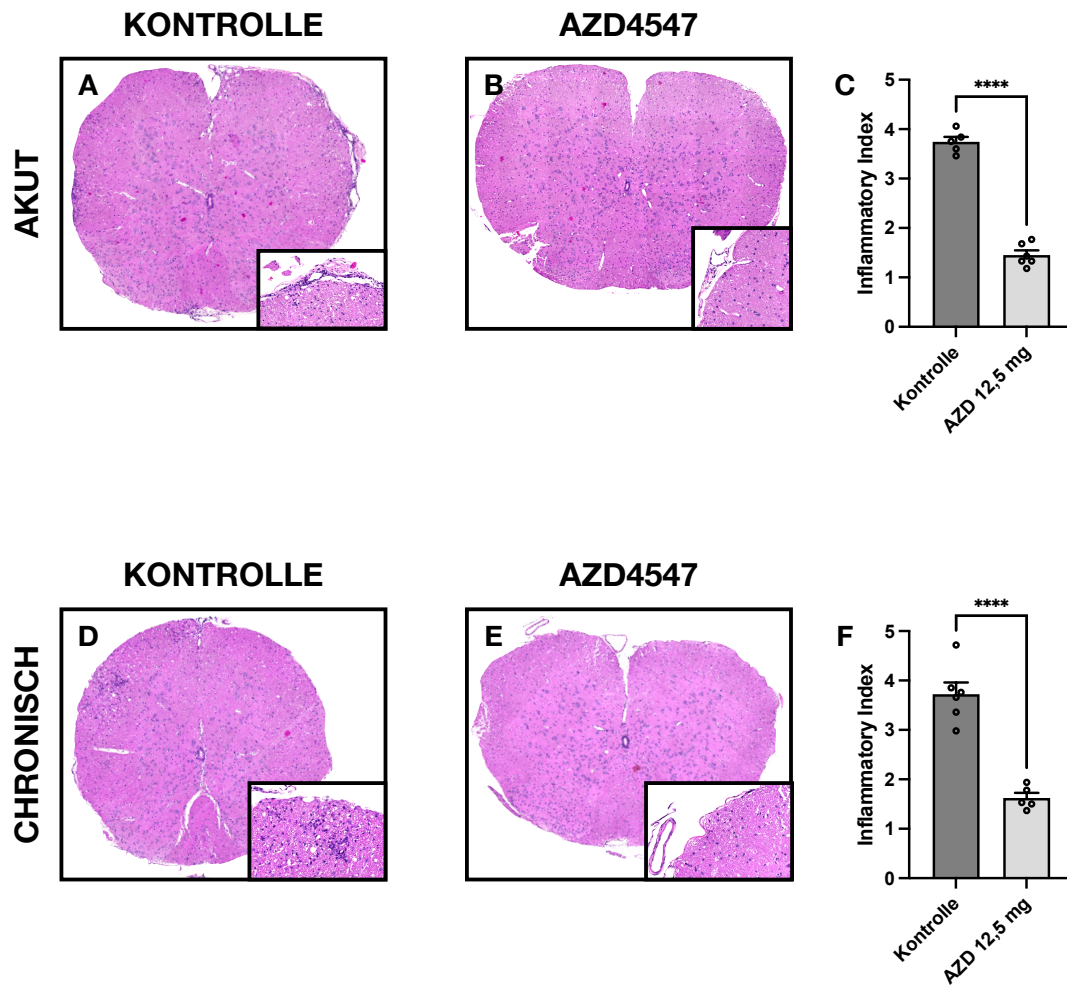
† = Placebo vs. AZD4547 6,25 mg/kg. \* = Placebo vs. AZD4547 12,5 mg/kg

#### 3.2 AZD4547 wirkt antiinflammatorisch auf B- und T-Lymphozyten sowie Mikroglia in Läsionen der weißen Substanz des Rückenmarks

Die Beurteilung inflammatorischer Prozesse ist ein wichtiger diagnostischer Marker für die Aktivität einer MS-Erkrankung. Zur Beurteilung einer erfolgreichen Therapie in Bezug auf Ziele wie Reduktion der Schubintensität und Schubhäufigkeit, sind Daten zu Entzündungsprozesse im ZNS essentiell. Im Rahmen dieser Studie wurden die Rückenmarksschnitte der Versuchstiere histologisch/immunhistochemisch analysiert.

Während der akuten Phase konnte in der Interventionsgruppe mit 12,5 mg AZD4547 an Tag 20 p.i., verglichen mit der Kontrollgruppe, eine Reduktion der Entzündungsaktivität im Gewebe der weißen Substanz des Rückenmarks beobachtet werden ( $P < 0,0001$ ). In der chronischen Phase an Tag 42 p.i., wurde im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine reduzierte Entzündungsaktivität gemessen ( $P < 0,0001$ ) (Abb. 12).

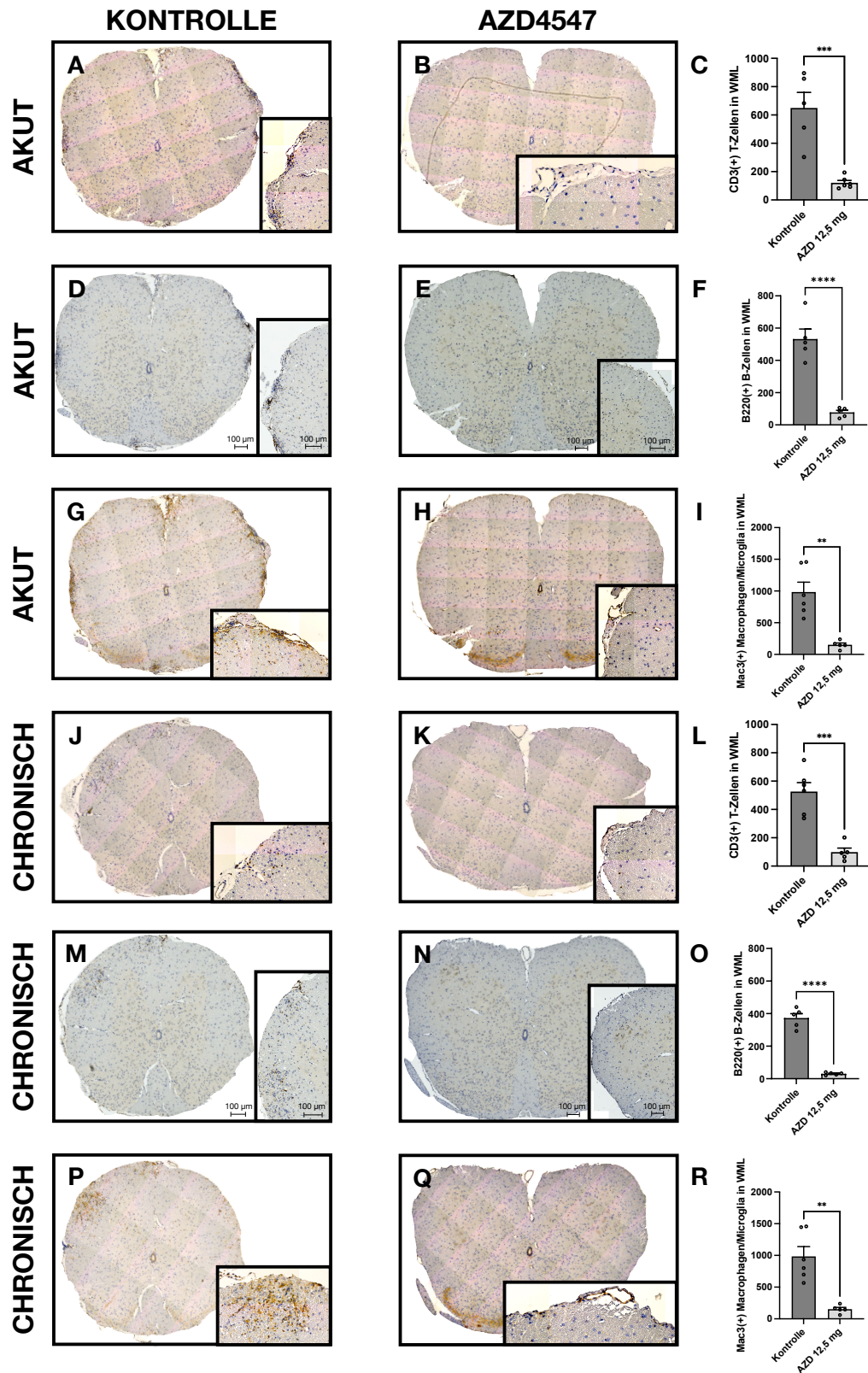
Die Anzahl CD3(+) T-Lymphozyten war in Läsionen der weißen Substanz in der akuten Phase ( $P = 0,0006$ ) sowie in der chronischen Phase ( $P = 0,0003$ ) vermindert. AZD4547 wirkte auf die Populationen von B220(+) B-Lymphozyten in der akuten Phase ( $P < 0,0001$ ) und in der chronischen Phase ( $P < 0,0001$ ) hemmend. Ebenso verringerte AZD4547 die Anzahl aktivierter Mac3(+) Macrophagen/Microglia in Läsionen nach 20 Tagen ( $P = 0,0004$ ) und nach 42 Tagen ( $P = 0,001$ ) (Abb. 13).



**Abbildung 12. Immunhistochemische Auswertung der Entzündungsaktivität in histologischen Schnitten der weißen Substanz des Rückenmarks in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.**

A – C: Entzündungsaktivität in Läsionen der weißen Substanz des Rückenmarks während der akuten Phase.  
D – F: Entzündungsaktivität in Läsionen der weißen Substanz des Rückenmarks während der chronischen Phase.

Akute Phase n = 5-6/Gruppe. Chronische Phase n = 5-6/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM präsentiert. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001



**Abbildung 13. Immunhistochemische Auswertung der Anzahl proinflammatorischer Zellen in Läsionen der weißen Substanz (WML) in histologischen Schnitten des Rückenmarks in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.**

A – C: Anzahl von CD3(+) T-Lymphozyten in WML in der akuten Phase.

D – F: Anzahl von B220(+) B-Lymphozyten in WML während der akuten Phase.

G – I: Anzahl von Mac3(+) Macrophagen/Microglia in WML während der akuten Phase.

J – L: Anzahl von CD3(+) T-Lymphozyten in Läsionen der weißen Substanz in der chronischen Phase.

M – O: Anzahl von B220(+) B-Lymphozyten in WML in der chronischen Phase.

P – R: Anzahl von Mac3(+) Macrophagen/Microglia während der chronischen Phase in WML.

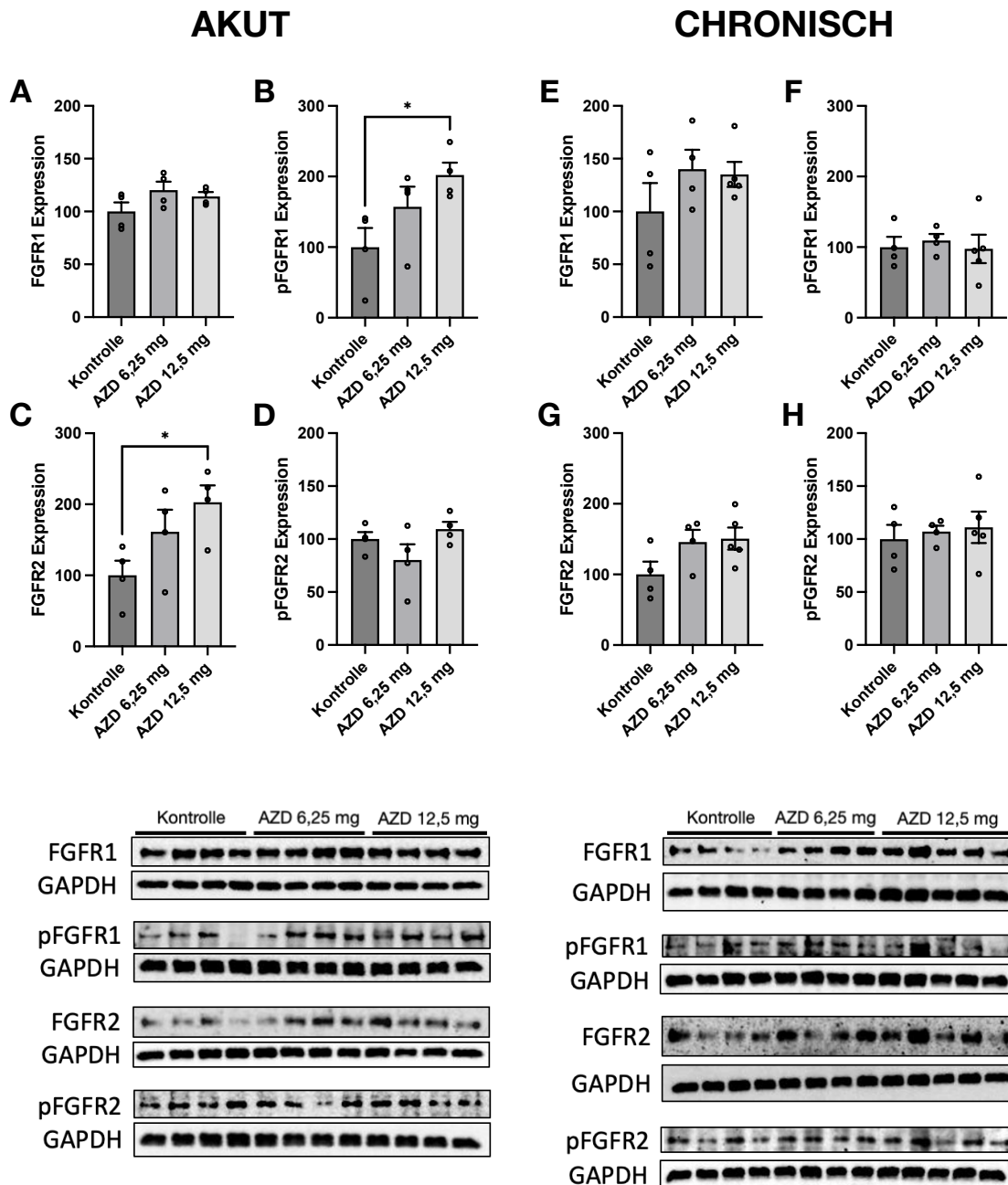
Akute Phase n = 5-6/Gruppe. Chronische Phase n = 5-6/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$

### 3.3 Die Applikation von AZD4547 verändert die Expressionsmuster bei FGF und FGFR

Fibroblast growth factor Rezeptoren stellen die Hauptzielmoleküle des Inhibitors AZD4547 dar und sind auf Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert. Eine Beteiligung der FGFRs an pathophysiologischen Abläufen im Rahmen der Krankheitsprozesse einer MS-Erkrankung wurden bereits zuvor beschrieben. Ebenso haben die FGF-Liganden Einfluss auf die Aktivität der Rezeptoren selbst, sowie auf Differenzierungs- und Wachstumsprozesse in vielen Organsystemen und Zelllinien des Körpers, im Speziellen aber auch im ZNS. Zuletzt sind auch die signalabwärts gelegenen unspezifischen Kinasen pAkt oder pERK an der Regulation der Rezeptor- und Zellaktivität beteiligt.

Hierzu wurden Untersuchungen auf Protein- und DNA-Basis durchgeführt. In der akuten Phase (Tag 20 p.i.) war die Proteinexpression von pFGFR1 ( $P = 0,0414$ ) und FGFR2 ( $P = 0,0456$ ) nach AZD4547-Applikation signifikant erhöht. Einen Einfluss auf FGFR1 oder pFGFR2 konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnten keine Veränderungen der genannten Proteine in der chronischen Phase (Tag 42 p.i.) gefunden werden (Abb. 14). Die molekularbiologischen Analysen mittels PCR zeigten in beiden Phasen keine Veränderungen der mRNA-Expression von FGFR1 und R2. Bei der Analyse der relevanten Liganden FGF1, FGF2 und FGF9 regulierte AZD4547 in beiden Dosierungen während der akuten Phase (Tag 20 p.i.) die mRNA-Expression von FGF2 signifikant herunter ( $P = 0,0406$  bzw.  $P = 0,0337$ ). Keine Regulation durch AZD4547 auf die Liganden konnte in der chronischen Phase beobachtet werden (Abb. 15).

Die Protein-Expressionen der abwärts befindlichen Kinasen pAkt und pERK unterlagen weder in der akuten, noch in der chronischen Phase einer Regulation durch AZD4547 (Abb. 16).

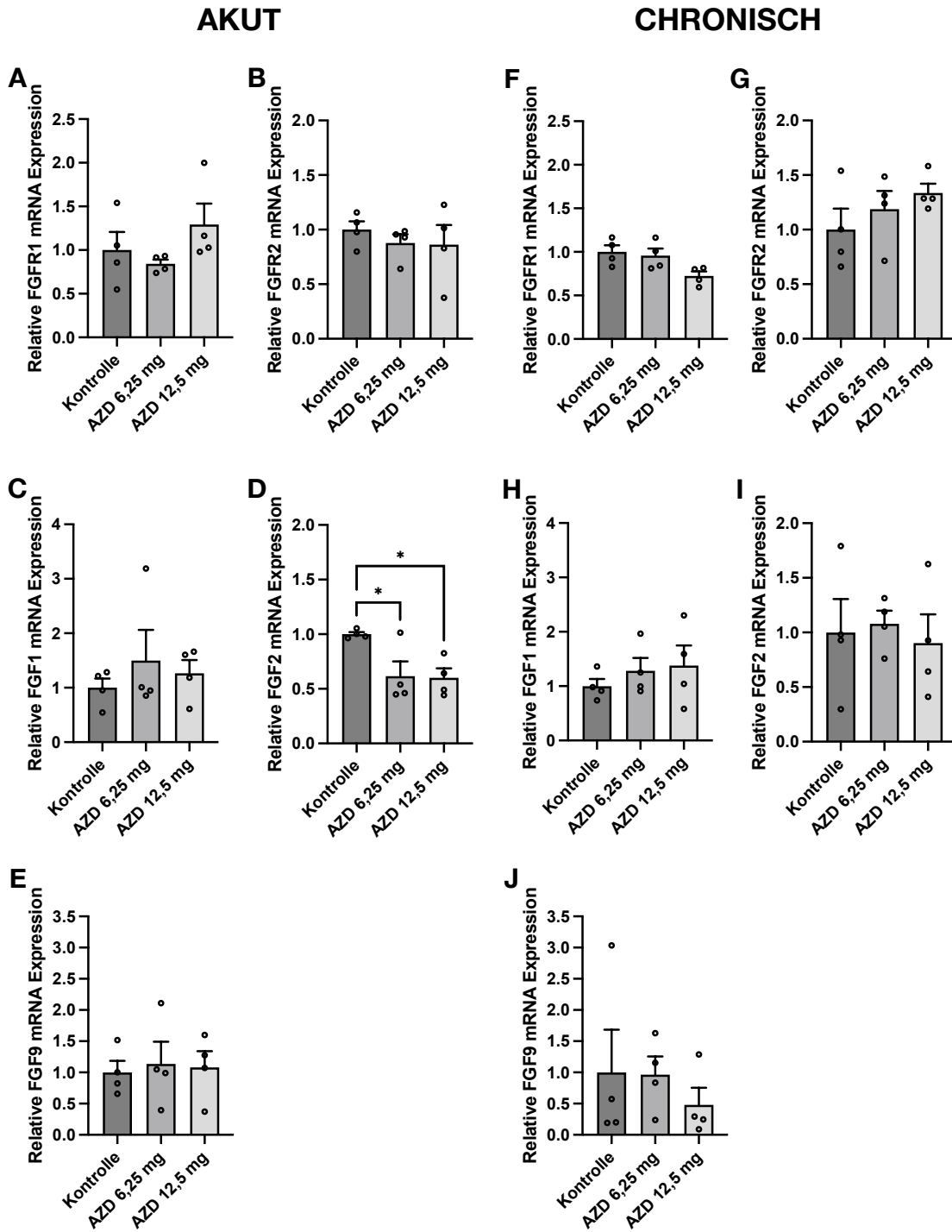


**Abbildung 14. FGFR1/2 und pFGFR1/2 Proteinexpression im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – D: Proteinexpression der FGFR1/2 und der phosphorylierten FGFR1/2 in der akuten Phase.

E – H: Proteinexpression der FGFR1/2 und der phosphorylierten FGFR1/2 in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4-5/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM präsentiert. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001

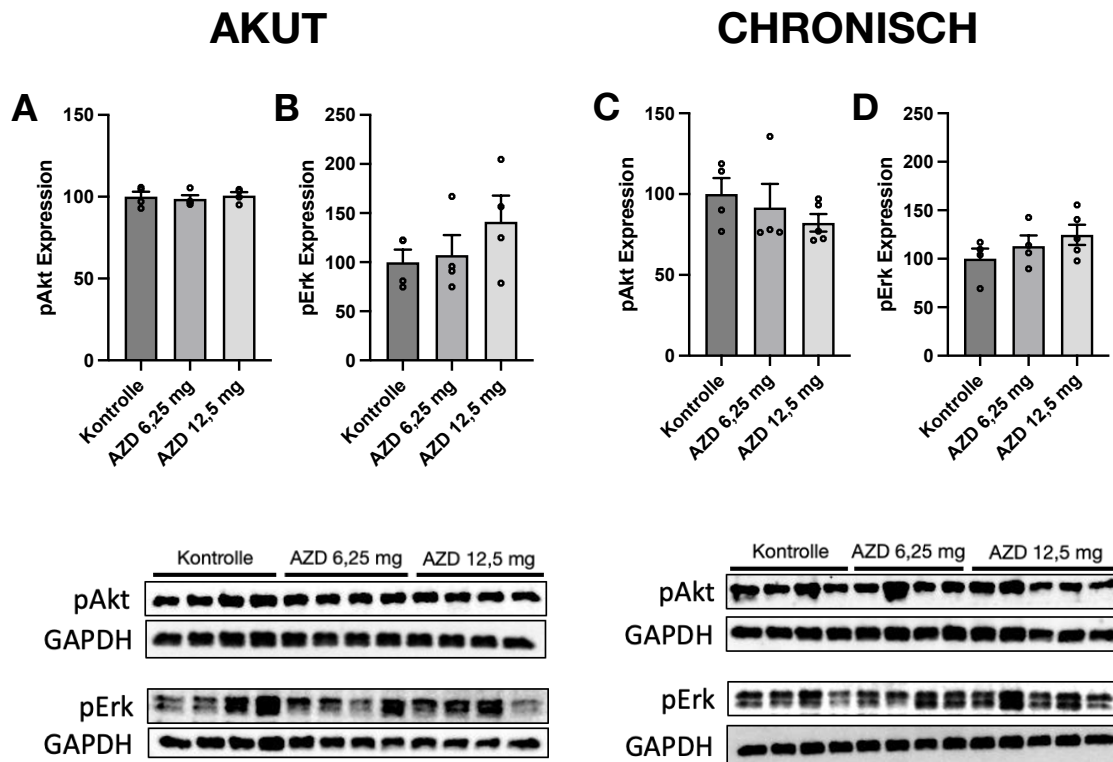


**Abbildung 15.** mRNA-Expression im Rückenmark von FGF-Rezeptoren und deren Liganden in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.).

A – E: mRNA-Expression der FGFR1/2 und der FGF-Faktoren in der akuten Phase.

F – J: mRNA-Expression der FGFR1/2 und der FGF-Faktoren in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM präsentiert. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001



**Abbildung 16. pAkt und pErk Proteinexpression im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – B: Proteinexpression von pAkt und pErk in der akuten Phase.

C – D: Proteinexpression von pAkt und pErk in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4-5/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001

### 3.4 Der Immunrezeptor CSF1R und das proinflammatorische Interleukin 12 werden durch AZD4547 herunterreguliert

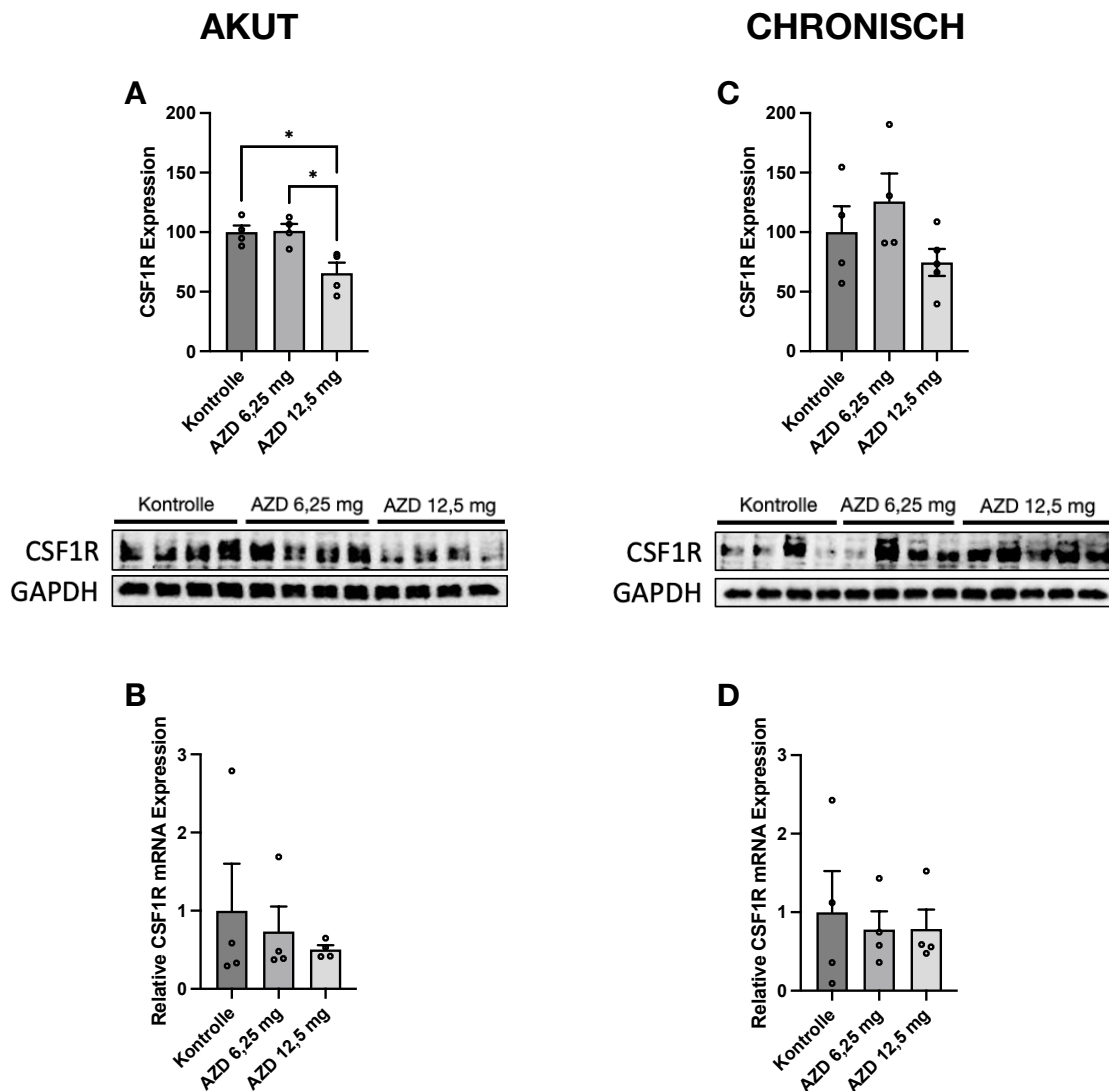
Im Rahmen einer abgeschwächten Immunantwort EAE-induzierter Mäuse nach AZD4547 Gabe wurde die reduzierte Expression des immunmodulatorischen CSF1-Rezeptors nachgewiesen. Dieser stellt ebenfalls einen Zielrezeptor von AZD4547 dar und ist in vielfältiger Weise an der Regulation und der Differenzierung von Microglia, Monozyten und Macrophagen beteiligt. Daneben konnte eine Reduktion des proinflammatorischen Interleukin 12 gezeigt werden. IL-12 ist neben anderen Zytokinen ein Mediator im Rahmen proinflammatorischer Prozesse und zusätzlich an autoimmunen Reaktionen beteiligt.

Die Proteinexpression des CSF1R wurde in der akuten Phase (Tag 20 p.i.) signifikant in der 12,5 mg Interventionsgruppe gegenüber den Kontrollen und der 6,25 mg Gruppe

### 3. ERGEBNISSE

gesenkt ( $P = 0,0159$  bzw.  $P = 0,0134$ ), auf genetischer Ebene wurden keine Veränderungen beobachtet (Abb. 17).

Bei der Untersuchung der RNA-Expression von Interleukinen, Chemokinen und Zytokinen konnte in der akuten Erkrankungsphase (Tag 20 p.i.) bei IL-12 eine signifikante Reduktion zwischen der 6,25 und 12,5 mg Interventionsgruppe beobachtet werden ( $P = 0,0174$ ) (Abb. 18).



**Abbildung 17. Protein- und mRNA-Expression von CSF1R im Rückenmark in der akuten EAE (20 Tage p.i.) und der chronischen EAE (42 Tage p.i.).**

A – B: Protein- und mRNA-Expression des CSF1R in der akuten Phase.

C – D: Protein- und mRNA-Expression des CSF1R in der chronischen Phase.

Akute Phase  $n = 4$ /Gruppe. Chronische Phase  $n = 4-5$ /Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$

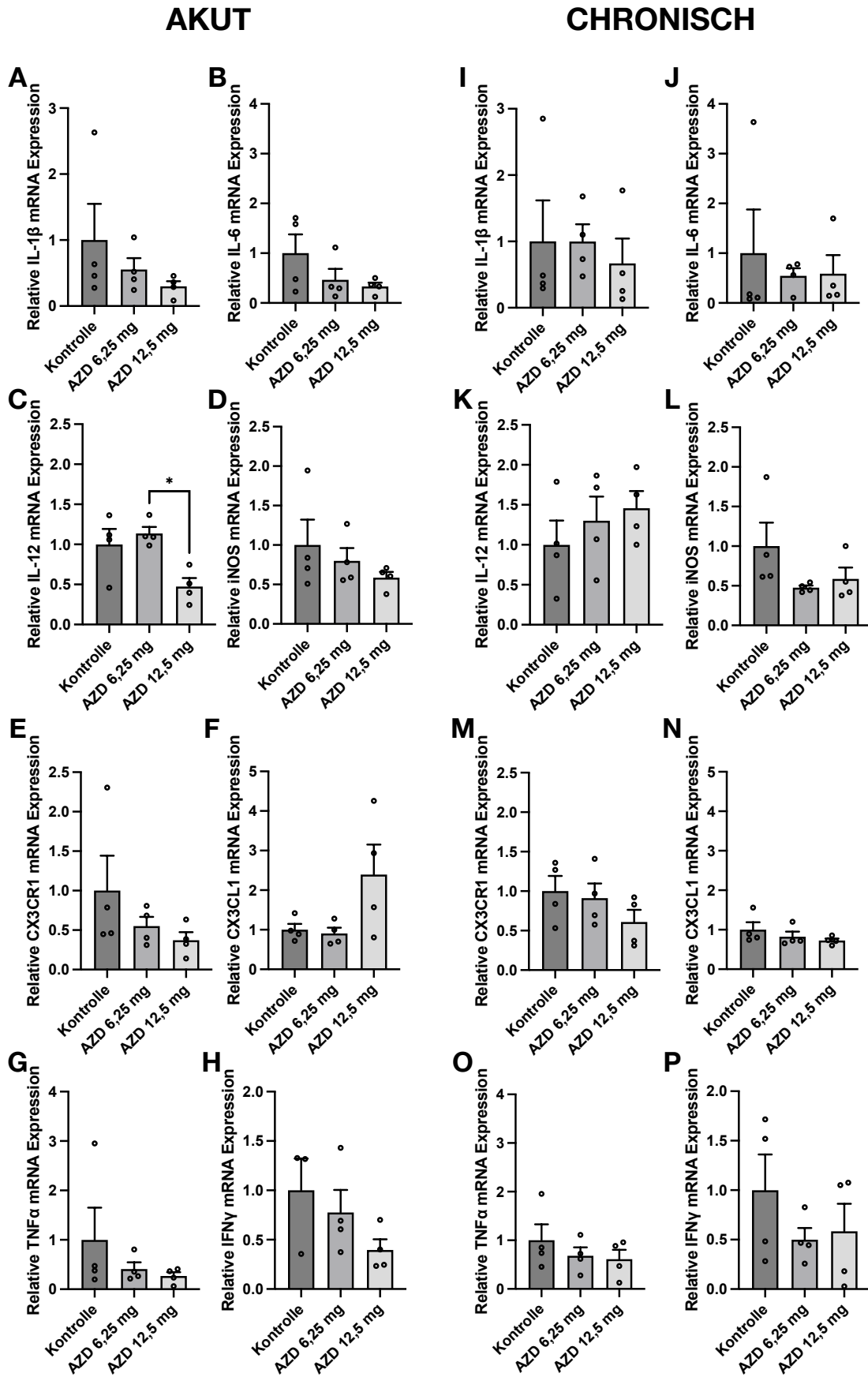


Abbildung 18. mRNA-Expression im Rückenmark von proinflammatorischen Interleukinen und Zytokinen in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.

### 3. ERGEBNISSE

---

A – H: mRNA-Expression von Interleukinen, Chemokinen und Zytokinen in der akuten Phase.

F – J: mRNA-Expression von Interleukinen, Chemokinen und Zytokinen in der chronischen Phase.

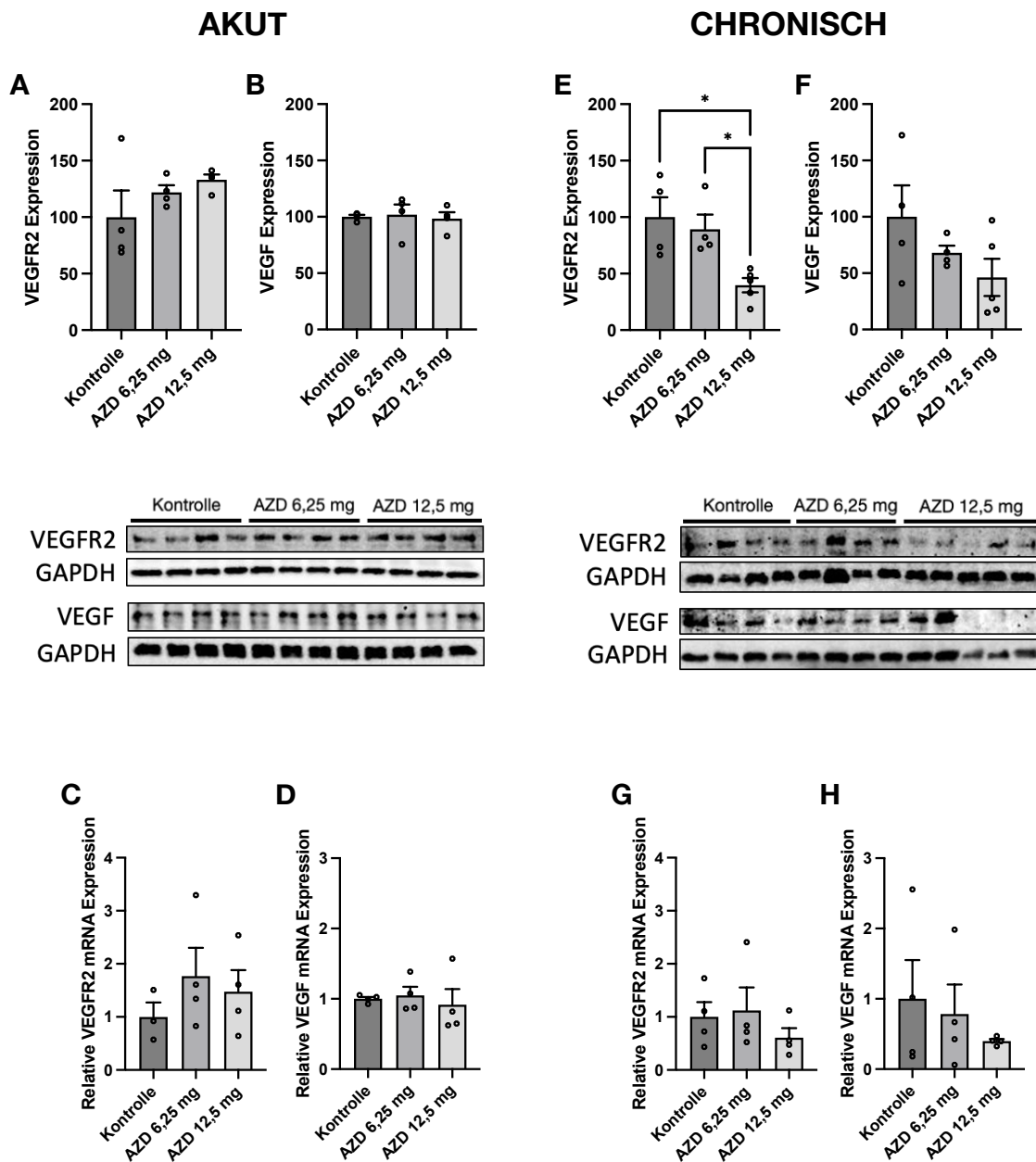
Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$

#### 3.5 AZD4547 hemmt den VEGFR2 in der chronischen Phase der EAE

AZD4547 besitzt eine Affinität gegen den VEGFR2 ( $IC_{50} = 24$  nmol/L), der im Zusammenspiel mit seinem Liganden VEGF an Neovaskularisationen, vaskulärer Permeabilität und darüber hinaus an der Migration von Microglia und Astrozyten sowie deren Chemotaxis beteiligt sein soll.

Untersucht wurde der Einfluss von AZD4547 auf die Protein- und mRNA-Expression von VEGFR2 und VEGF in der akuten und chronischen Phase, 20 bzw. 42 Tage nach EAE-Induktion. In der akuten Phase konnten keine Unterschiede auf Proteinebene festgestellt werden. Veränderungen zeigten sich allerdings bei der Proteinexpression des VEGF-Rezeptors 2 in der chronischen Phase. Dieser wurde in der 12,5 mg Dosierung von AZD4547 signifikant herunterreguliert ( $P = 0,0139$  bzw.  $P = 0,0387$ ) (Abb. 19).

Signifikante Unterschiede der mRNA-Expression konnten in keiner der Phasen gefunden werden (Abb. 19).



**Abbildung 19. Protein- und mRNA-Expression von VEGFR2 und VEGF im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – D: Protein- und mRNA-Expression von VEGFR2 und VEGF in der akuten Phase.

E – H: Protein- und mRNA-Expression von VEGFR2 und VEGF in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4-5/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM präsentiert. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001

### 3.6 AZD4547 verringert die Demyelinisierung, erhöht die Anzahl von Oligodendrozyten und steigert die Remyelinisierung

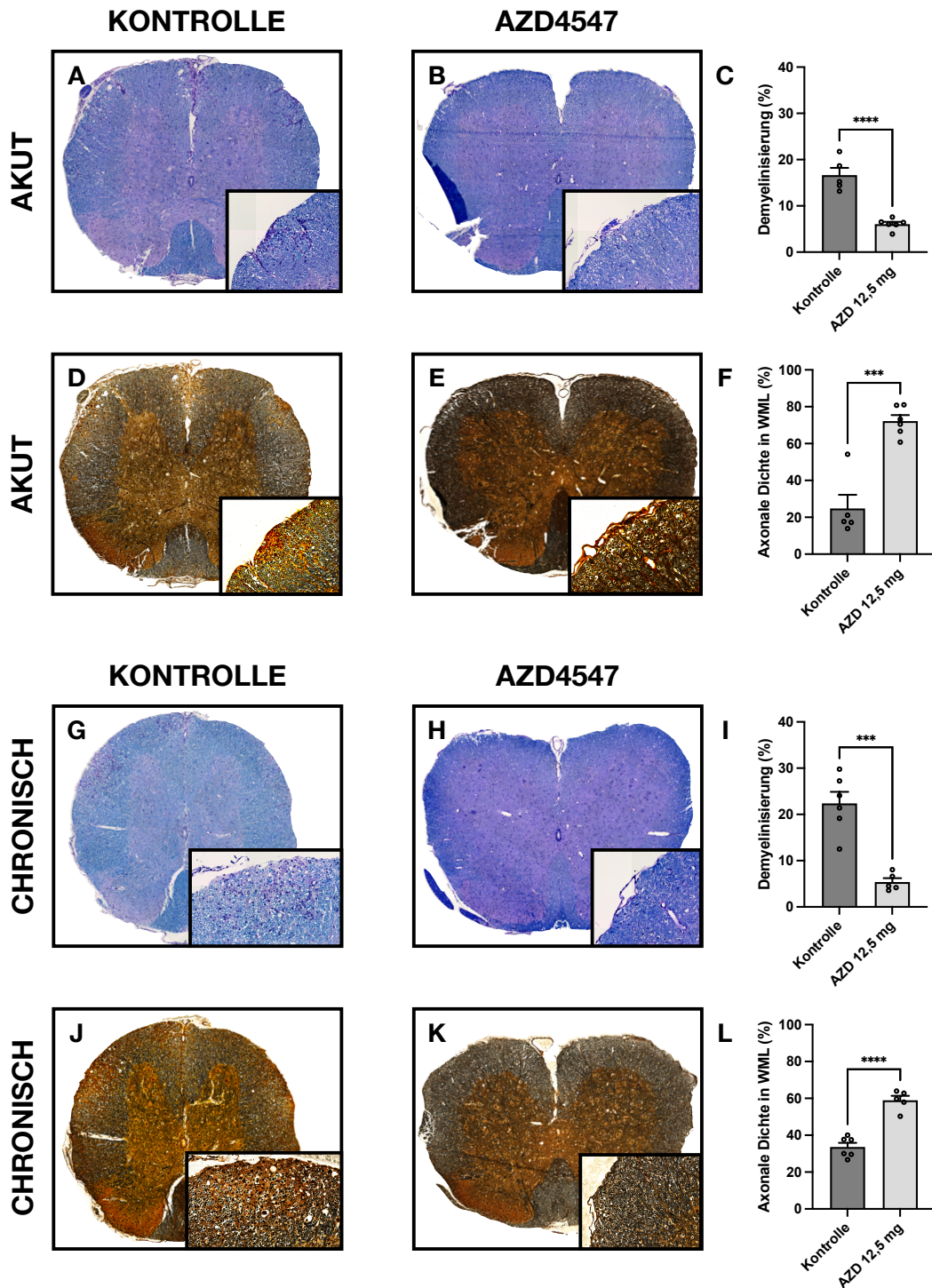
Der wohl schwerwiegendste pathognomonische Faktor bei der Multiplen Sklerose ist die fortschreitende Demyelinisierung von Axonen im ZNS. Zahlreiche Symptome sind auf

den Verlust von Axonen und Neuronen zurückzuführen und weisen nach Manifestation der Erkrankung im weiteren Verlauf meist eine Progredienz auf. Regenerative Prozesse, wie eine suffiziente Remyelinisierung geschädigter Areale, finden meist nur unzureichend statt, bergen aber ein großes Potenzial, wie u.a. in vorherigen klinischen Ergebnissen gezeigt werden konnte (vgl. 3.1). Eine Voraussetzung der Remyelinisierung ist unter anderem eine ausreichende Migration oligodendrozytärer Vorläuferzellen und deren anschließende Differenzierung in reife, Myelin-produzierende Oligodendrozyten.

Hierzu wurden die Auswirkungen von AZD4547 auf den relativen Anteil von demyelinisierten Arealen an der Gesamtfläche der weißen Substanz im Rückenmark untersucht. Dabei konnte sowohl in der akuten Phase (20 Tage p.i.), als auch in der chronischen Phase (42 Tage p.i.) eine signifikant reduzierte Demyelinisierung beobachtet werden (akut:  $P < 0,0001$ ; chronisch:  $P = 0,0002$ ). Zeitgleich stieg zu beiden Zeitpunkten die axonale Dichte in den geschädigten Arealen der weißen Substanz signifikant an (akut:  $P = 0,0002$ ; chronisch:  $P < 0,0001$ ), was ein Indikator für eine erfolgte Remyelinisierung ist (Abb. 20).

Bei der Untersuchung des Ausmaßes der Migration Olig2(+) oligodendrozytärer Vorläuferzellen konnten in Läsionsarealen der weißen Substanz während der akuten Phase (20 Tage p.i.) signifikante Unterschiede gefunden werden ( $P = 0,0002$ ). In der NAWM konnten keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe festgestellt werden. 42 Tage p.i. wurde eine signifikant gesteigerte Migration von Olig2(+) oligodendrozytärer Vorläuferzellen in Läsionen der weißen Substanz gemessen ( $P = 0,0019$ ). In den gesund erscheinenden Arealen der weißen Substanz konnten keine Unterschiede gefunden werden (Abb. 21).

Das Vorkommen von ausdifferenzierten P25(+) Oligodendrozyten wurde ebenfalls in Läsionen (WML) und normal erscheinenden Arealen der weißen Substanz (NAWM) gemessen. In der akuten Phase (20 Tage p.i.) konnten in WML und NAWM keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. In der chronischen Phase nach dem 42. Tag war eine signifikant höhere Anzahl an ausdifferenzierten P25(+) Oligodendrozyten in Läsionen der weißen Substanz nachweisbar ( $P < 0,0001$ ). In der NAWM wurden keine Unterschiede gefunden (Abb. 22).



**Abbildung 20. Immunhistochemische Auswertung der axonalen Dichte in Läsionen der weißen Substanz und der Demyelinisierung in histologischen Schnitten des Rückenmarks in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.**

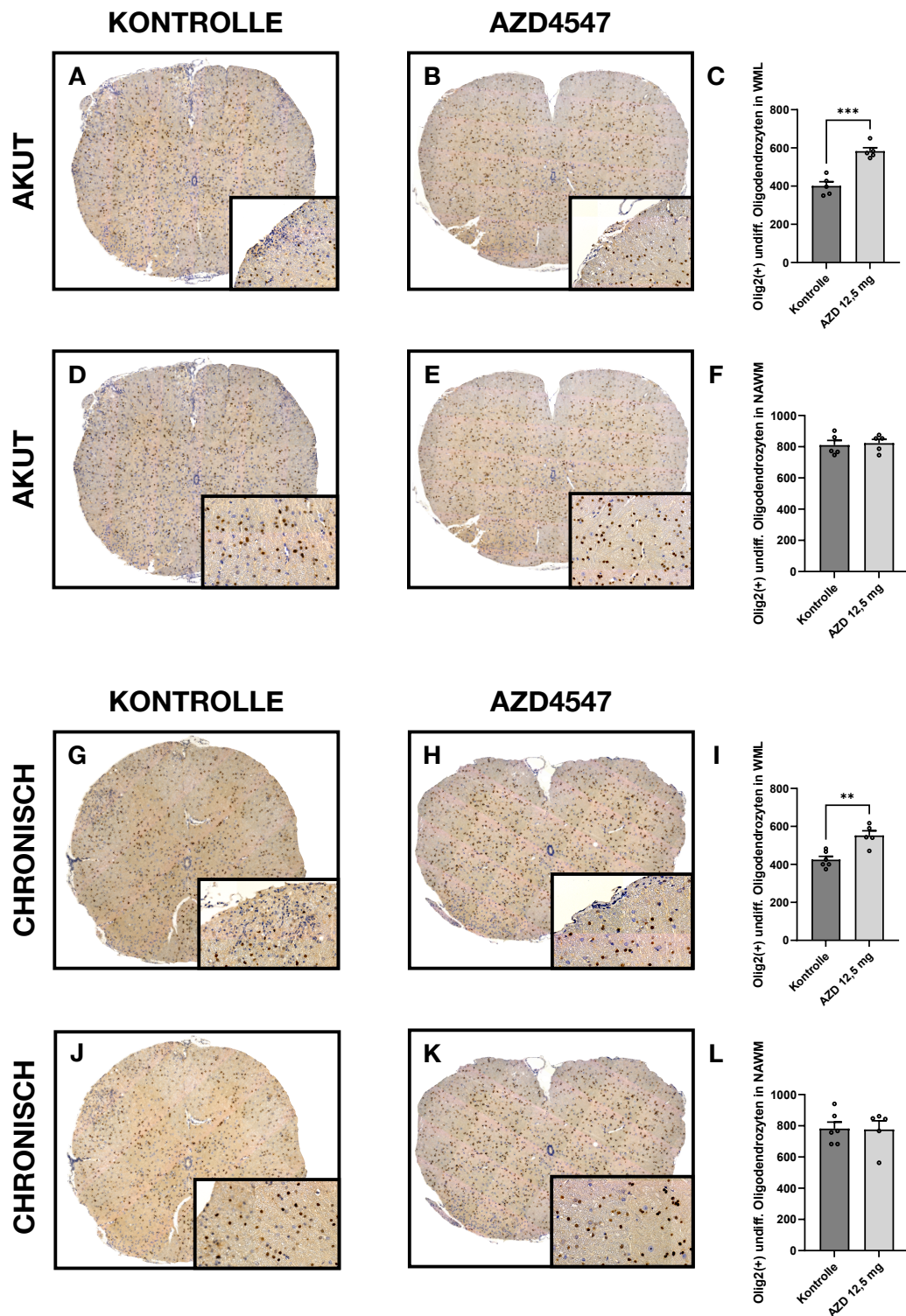
A – C: Messung der Demyelinisierung in der akuten Phase.

D – F: Axonale Dichte in der akuten Phase.

G – I: Ausmaß der demyelinisierten Areale in der chronischen Phase.

J – L: Messung der axonalen Dichte in WML während der chronischen Phase.

Akute Phase n = 5-6/Gruppe. Chronische Phase n = 5-6/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001



**Abbildung 21. Immunhistochemische Auswertung der Anzahl Olig2(+) undifferenzierter Oligodendrozyten in Läsionen (WML) und gesunden Arealen (NAWM) der weißen Substanz in histologischen Schnitten des Rückenmarks in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.**

A – C: Anzahl von Olig2(+) undifferenzierten Oligodendrozyten in WML während der akuten Phase.

D – F: Anzahl von Olig2(+) undifferenzierten Oligodendrozyten in der NAWM in der akuten Phase.

G – I: Anzahl von Olig2(+) undifferenzierten Oligodendrozyten in WML während der chronischen Phase.

J – L: Anzahl von Olig2(+) undifferenzierten Oligodendrozyten in der NAWM in der chronischen Phase.

### 3. ERGEBNISSE

Akute Phase n = 5-6/Gruppe. Chronische Phase n = 5-6/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM presentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001

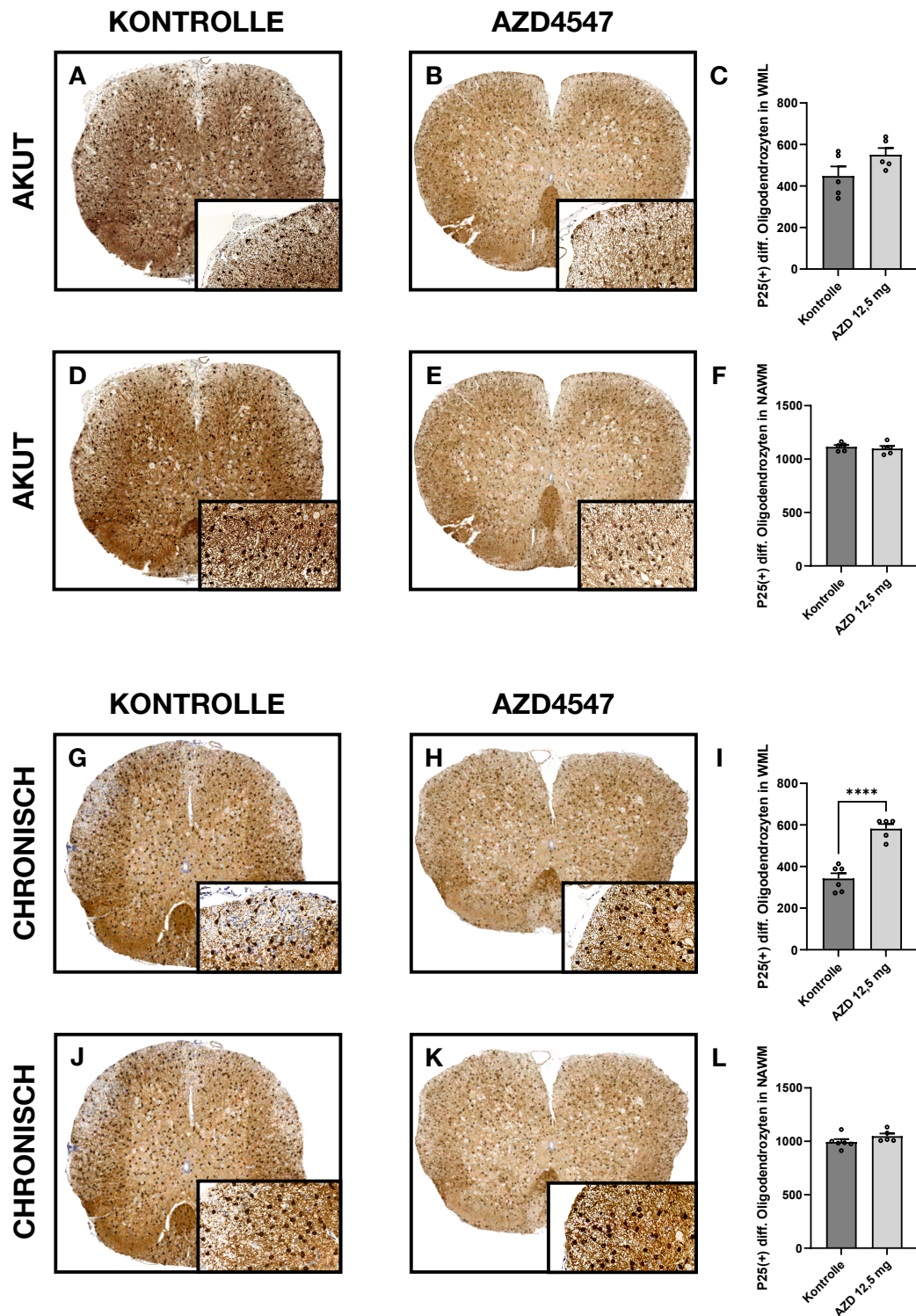


Abbildung 22. Immunhistochemische Auswertung der Anzahl P25(+) differenzierter Oligodendrozyten in Läsionen (WML) und gesunden Arealen (NAWM) der weißen Substanz in histologischen Schnitten des Rückenmarks in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.

### 3. ERGEBNISSE

---

A – C: Anzahl von P25(+) differenzierten Oligodendrozyten in WML während der akuten Phase.

D – F: Anzahl von P25(+) differenzierten Oligodendrozyten in NAWM in der akuten Phase.

G – I: Anzahl von P25(+) differenzierter Oligodendrozyten in WML in der chronischen Phase.

J – L: Anzahl von P25(+) differenzierten Oligodendrozyten in NAWM in der chronischen Phase.

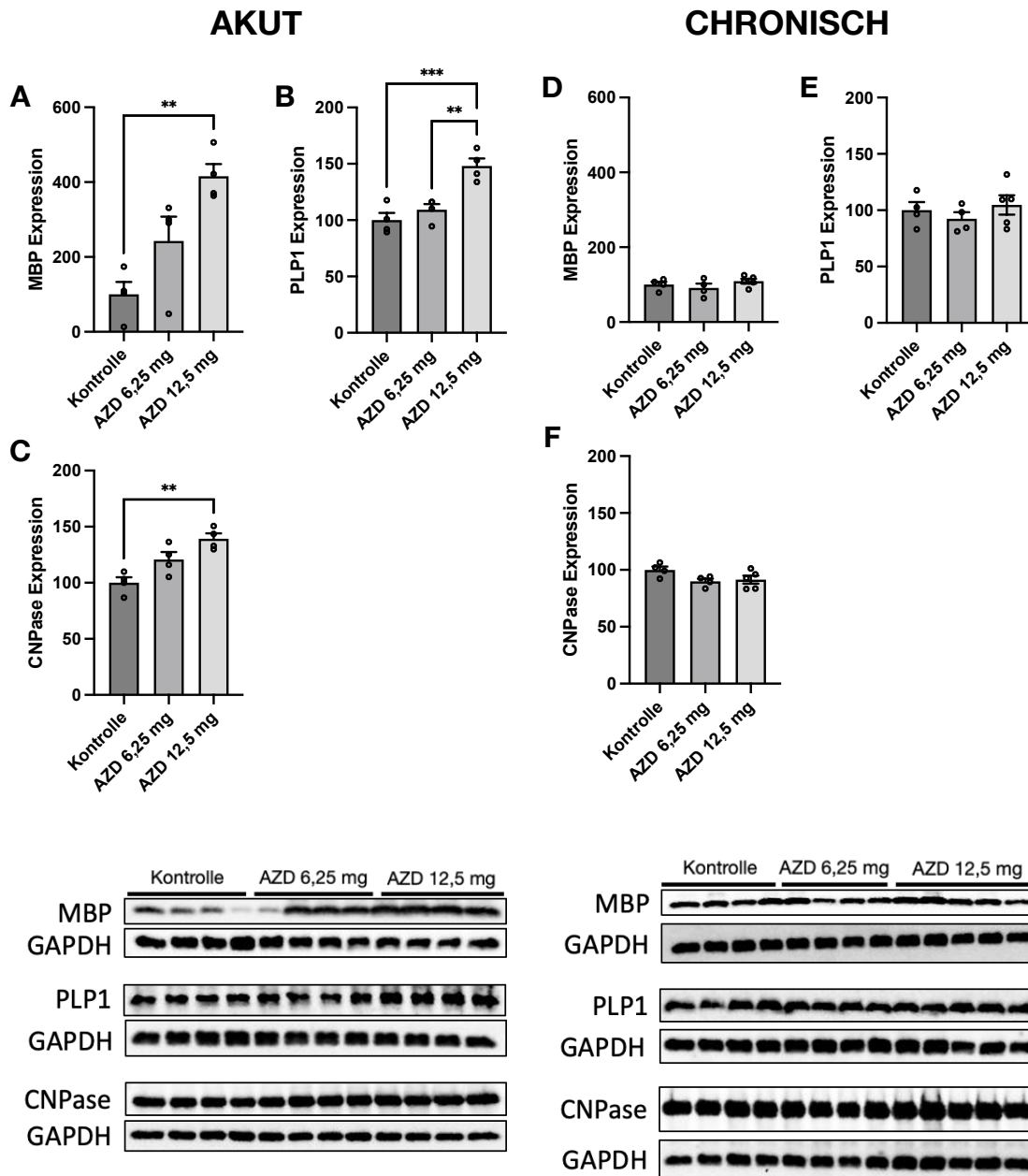
Akute Phase n = 5-6/Gruppe. Chronische Phase n = 5-6/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$

#### 3.7 AZD4547 steigert die Expression von Myelinproteinen

Myelinscheiden bestehen neben Fettsäuren und membranständigen Lipiden zu knapp einem Drittel aus den Proteinen MBP, PLP1 und CNPase. Diese Proteine stellen einen validen Maßstab für die Quantifizierung von Myelinscheiden dar und ermöglichen eine indirekte Einschätzung des Ausmaßes von demyelinisierenden Prozessen.

Untersucht wurde die Expression der Proteine und ihrer relativen mRNA-Mengen. Im akuten Versuchsarm (20 Tage p.i.) konnte eine signifikante Hochregulation von MBP in der 12,5 mg Interventionsgruppe gezeigt werden ( $P = 0,0025$ ). PLP1 zeigte eine signifikante Überexpression in der 12,5 mg Gruppe sowohl gegenüber den Kontrollen, als auch der 6,25 mg Interventionsgruppe ( $P = 0,0037$  bzw.  $P = 0,0009$ ). AZD4547 zeigte in der höheren 12,5 mg Konzentration eine signifikant positive Regulation von CNPase gegenüber der Kontrollgruppe ( $P = 0,0018$ ). Einen Einfluss von AZD4547 auf die Proteinexpression der drei Proteine im chronischen Verlauf konnte 42 Tage p.i. nicht gefunden werden (Abb. 23).

Auswirkungen von AZD4547 auf die Expression der mRNA von MBP, PLP1 und CNPase konnten keine nachgewiesen werden (Abb. 24).

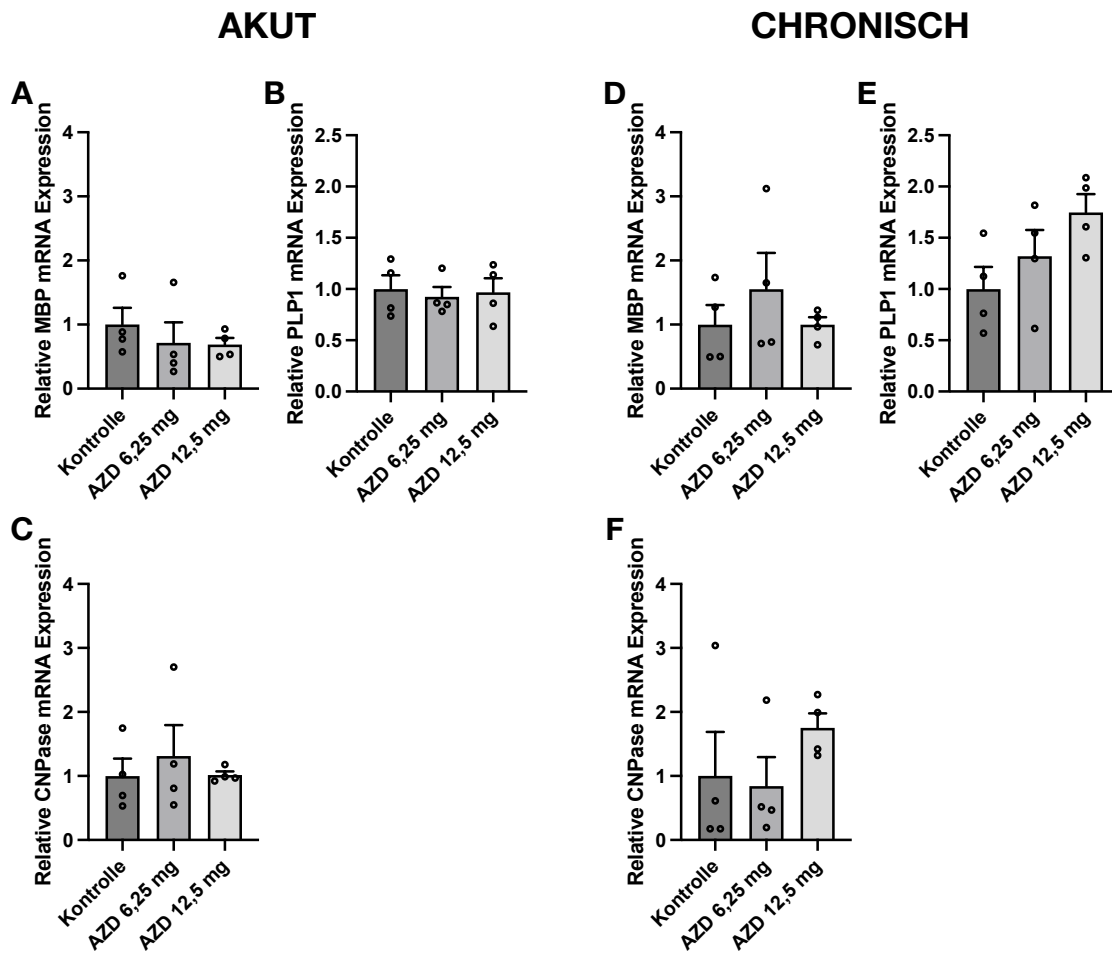


**Abbildung 23. Proteinexpression der Myelinproteine MBP, PLP1 und CNPase im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – C: Proteinexpression von MBP, PLP1 und CNPase in der akuten Phase.

D – F: Proteinexpression von MBP, PLP1 und CNPase in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4-5/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM präsentiert. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001



**Abbildung 24.** mRNA-Expression der Myelinproteine MBP, PLP1 und CNPase im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.

A – C: mRNA-Expressionen von MBP, PLP1 und CNPase In der akuten Phase.

D – F: mRNA-Expressionen von MBP, PLP1 und CNPase In der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM präsentiert. \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001

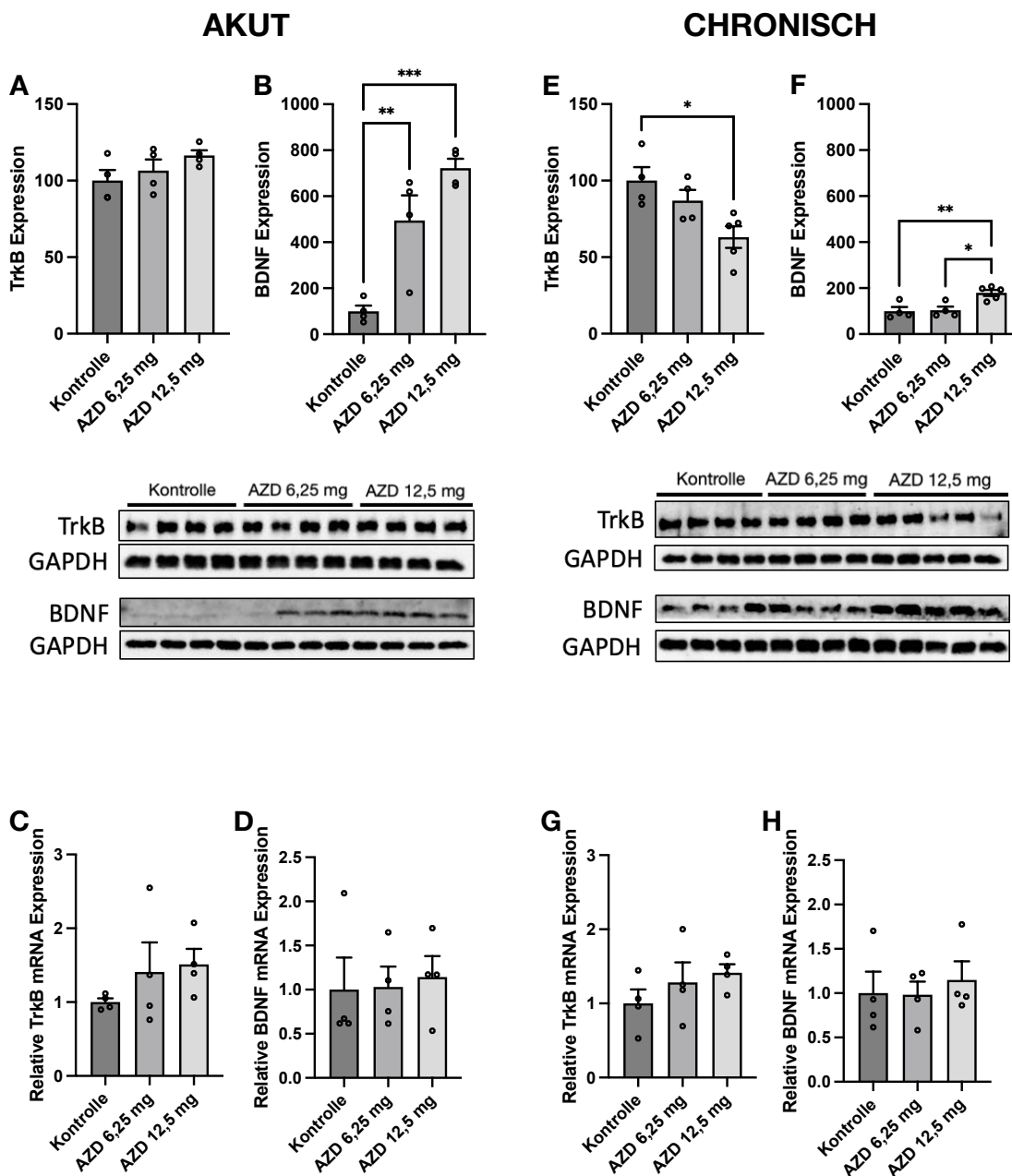
### 3.8 Der neuroprotektive Faktor BDNF ist signifikant erhöht, sein Rezeptor TrkB ist im Verlauf herunterreguliert

Der neurotrophe Faktor BDNF wirkt über seinen Rezeptor TrkB neuroprotektiv auf Neurone und Synapsen und ist in weiten Teilen des ZNS nachweisbar, allerdings ist er ebenfalls im PNS aktiv. Primär wirkt er positiv auf die adulte Neurogenese, wirkt antioxidativ, anti-apoptotisch und ist somit ein protektiver Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen<sup>29</sup>.

### 3. ERGEBNISSE

In Untersuchungen der Proteinquantifizierung wurde eine stark signifikante Hochregulation von BDNF in beiden Interventionsgruppen von AZD4547 in der akuten Phase (Tag 20 p.i.) nachgewiesen ( $P = 0,007$  bzw.  $P = 0,0003$ ). Ebenso konnte eine Hochregulation von BDNF in der 12,5 mg Interventionsgruppe im chronischen Verlauf (Tag 42 p.i.) beobachtet werden ( $P = 0,0127$  bzw.  $P = 0,0096$ ). Der entsprechende Rezeptor TrkB wurde im chronischen Versuchsarm 42 Tage p.i. herunterreguliert ( $P = 0,0155$ ). In der akuten Phase 20 Tage p.i. wurde kein Einfluss von AZD4547 auf TrkB nachgewiesen (Abb. 25).

Veränderungen von BDNF oder TrkB auf genetischer Ebene konnten nicht festgestellt werden (Abb. 25).



**Abbildung 25. Protein- und mRNA-Expression von TrkB und BDNF im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – D: Protein- und mRNA-Expression von TrkB und BDNF in der akuten Phase.

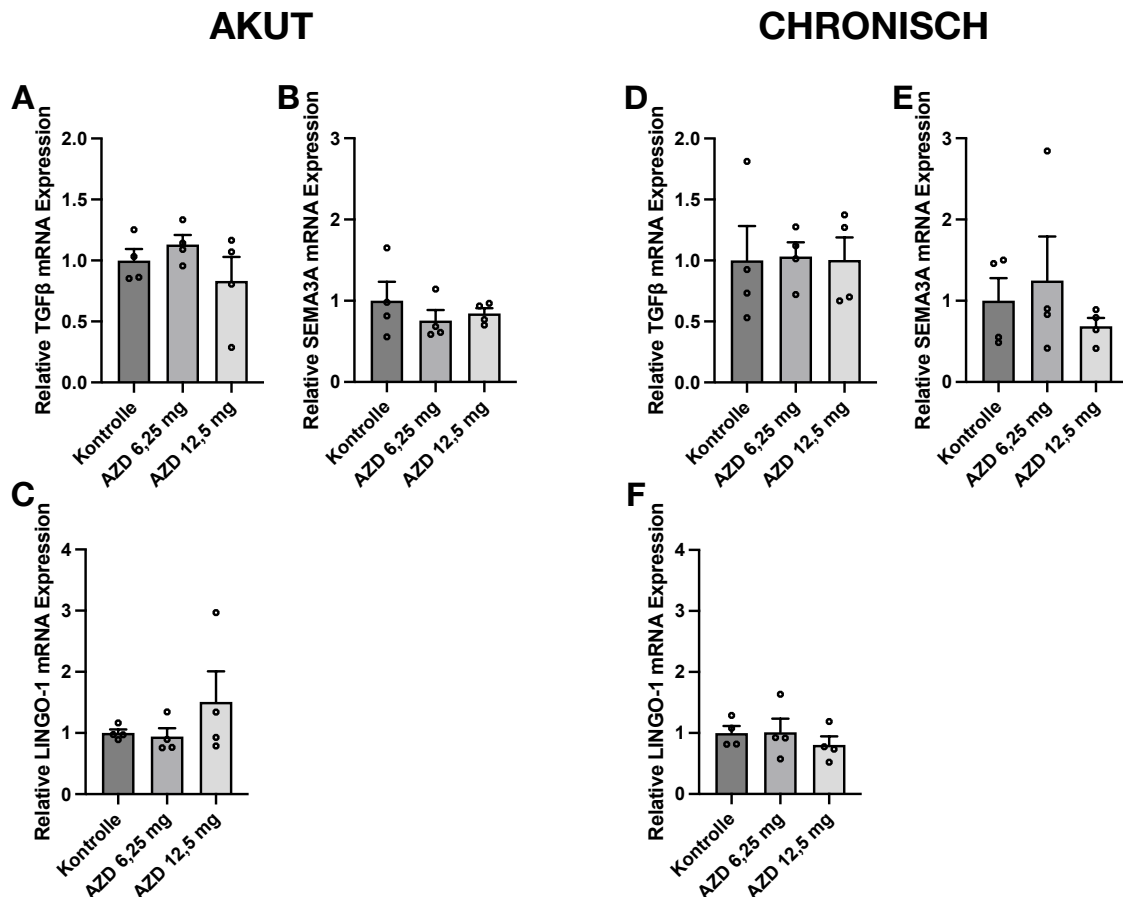
E – H: Protein- und mRNA-Expression von TrkB und BDNF in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4-5/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001

### 3.9 AZD4547 hat keinen Einfluss auf die Remyelinisierungsinhibitoren TGF $\beta$ , SEMA3A und LINGO-1

Neben dem Einfluss von AZD4547 auf Myelinproteine und deren gesteigerte Expression, ist die Untersuchung einer Regulierung von Inhibitoren der Remyelinisierung ebenso von Interesse. Remyelinisierungsinhibitoren wie TGF $\beta$ , SEMA3A oder LINGO-1 wirken hemmend auf die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläufern und reduzieren zusätzlich die Remyelinisierung.

Untersucht wurde die regulierende Wirkung von AZD4547 auf die Expression der mRNA der Proteine LINGO-1, SEMA3A und des Zytokins TGF $\beta$ . Sowohl nach 20, wie auch nach 42 Tagen p.i. konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Interventionsgruppen gefunden werden (Abb. 26).



**Abbildung 26.** mRNA-Expression der Myelininhibitoren TGF $\beta$ , SEMA3A und LINGO-1 im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.) nach EAE-Induktion.

A – C: mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ , SEMA3A und LINGO-1 in der akuten Phase.

D – F: mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ , SEMA3A und LINGO-1 in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001

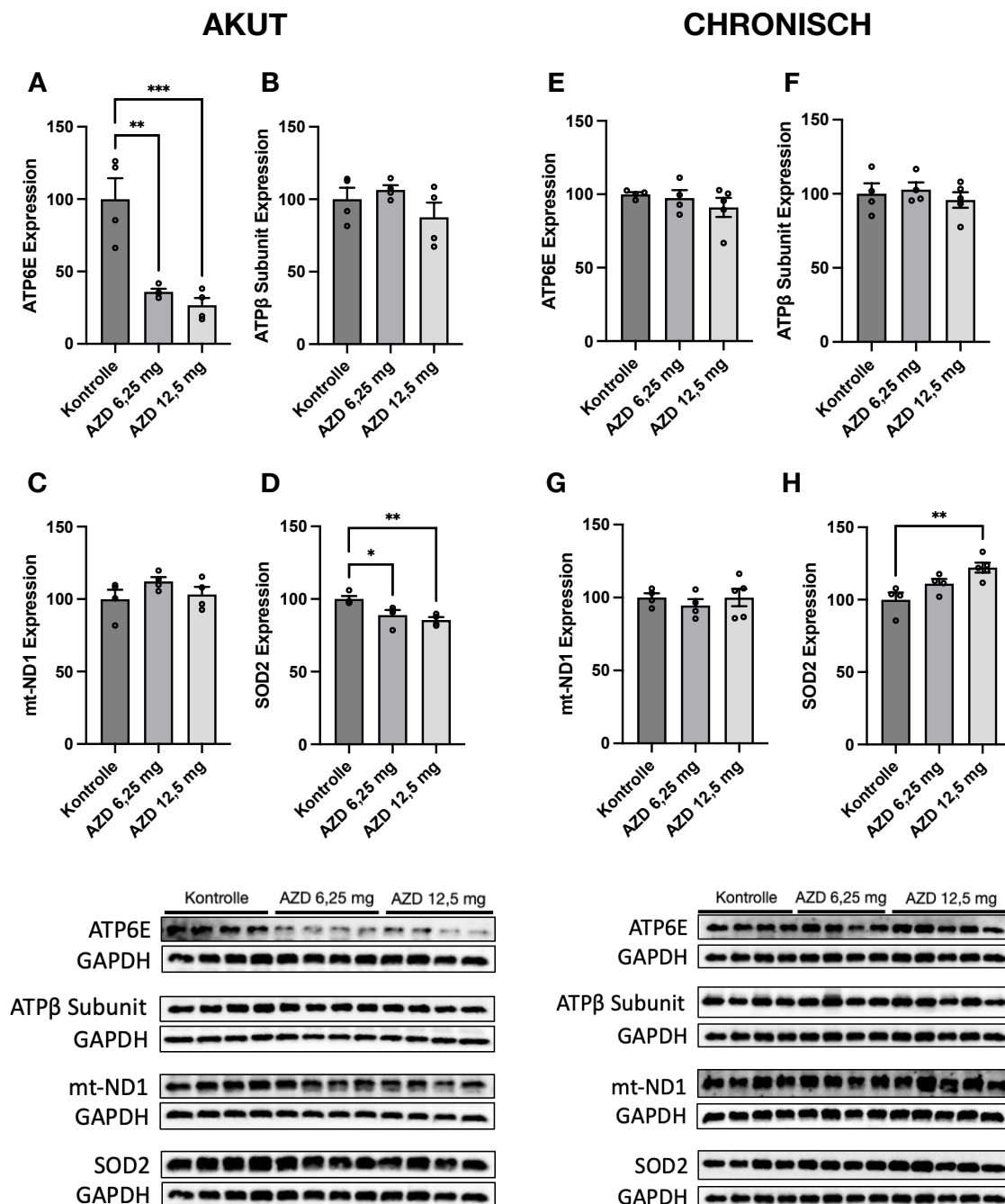
### 3.10 AZD4547 hat einen Einfluss auf mitochondriale Komplexe

Die Funktion und Relevanz von Mitochondrien und ihren an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Proteinkomplexen ist bekannt. Sie sind maßgeblich für die Bereitstellung zellulärer Energieträger verantwortlich und sind ebenso an der Versorgung von Neuronen, Axonen und Oligodendrozyten beteiligt. Neben trophischen Aufgaben nehmen sie eine Rolle in der Kontrolle und dem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies ein, die bei unregulierter Akkumulation zu Zellschäden führen können. Die regulatorische Wirkung von AZD4547 wurde in dieser Studie auf verschiedene Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (ATP6E, ATP $\beta$  Subunit, mt-ND1, SDHD) sowie auf Bestandteile des ROS-Systems (SOD2) untersucht.

### 3. ERGEBNISSE

In der akuten Phase 20 Tage nach EAE-Induktion konnte eine negative Regulation der Proteinexpression von ATP6E in beiden Dosierungen nachgewiesen werden ( $P = 0,0018$  bzw.  $P = 0,0007$ ). Bei SOD2 zeigte sich ein ähnliches Bild der erniedrigten Proteinexpression unter AZD4547-Gabe ( $P = 0,0351$  bzw.  $P = 0,0087$ ). In der chronischen Phase 42 Tage nach EAE-Induktion zeigte sich bei der Proteinexpression von SOD2 eine Hochregulation in der 12,5 mg Interventionsgruppe ( $P = 0,0058$ ), die anderen Proteine unterlagen keiner Regulation (Abb. 27).

Weitere regulatorische Auswirkungen nach der AZD4547-Applikation in der mRNA-Expression zeigten sich zu beiden Zeitpunkten nicht (Abb. 28).



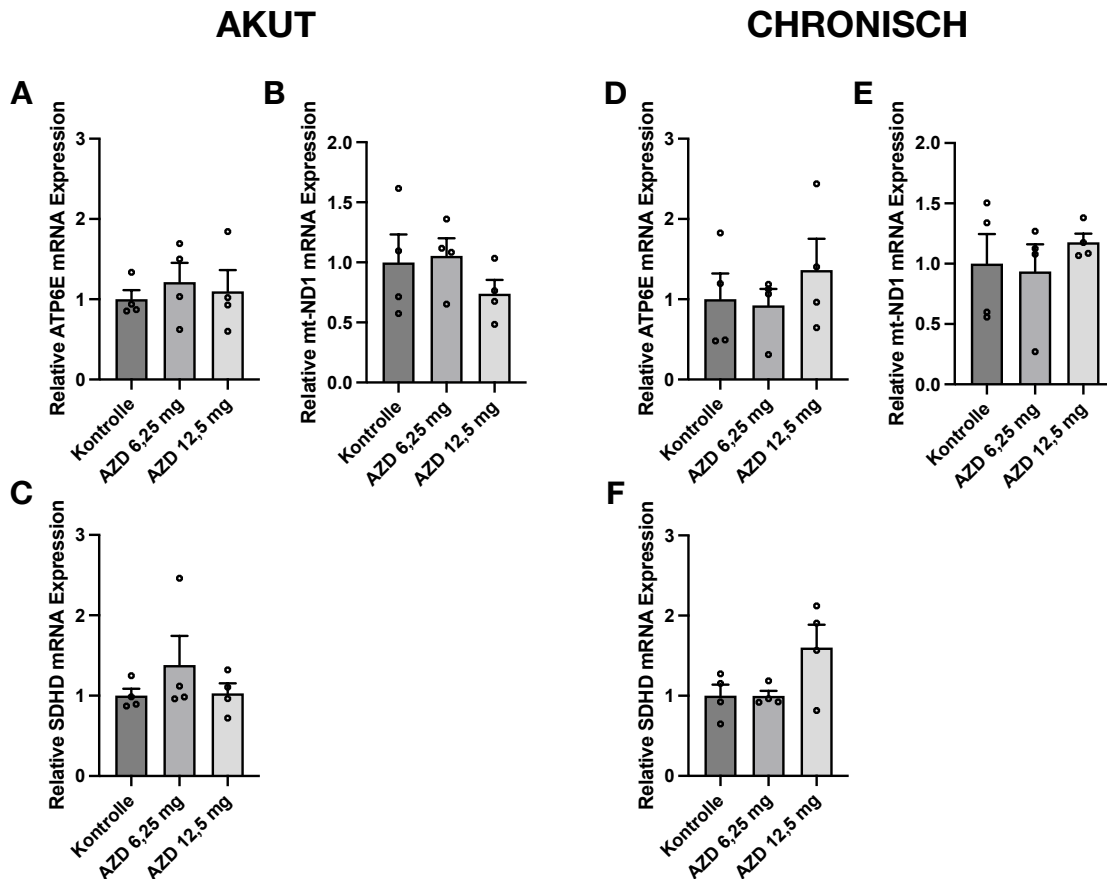
### 3. ERGEBNISSE

**Abbildung 27. Proteinexpression der mitochondrialen Komplexe im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – D: Proteinexpression mitochondrialer Komplexe in der akuten Phase.

E – H: Proteinexpression mitochondrialer Komplexe in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4-5/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001



**Abbildung 28. mRNA-Expression der mitochondrialen Komplexe im Rückenmark in der akuten (20 Tage p.i.) und der chronischen Phase (42 Tage p.i.).**

A – C: mRNA-Expressionen von ATP6E, mt-ND1 und SDHD in der akuten Phase.

D – F: mRNA-Expressionen von ATP6E, mt-ND1 und SDHD in der chronischen Phase.

Akute Phase n = 4/Gruppe. Chronische Phase n = 4/Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,001, \*\*\*\*P  $\leq$  0,0001

## 3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Suppressive Phase					
	Parameter im Rückenmark Applikation von Tag 10 - 19 p.i.	Akute Phase Tag 20 p.i.		Chronische Phase Tag 42 p.i.	
		6,25 mg	12,5 mg	6,25 mg	12,5 mg
Entzündungsaktivität	Inflammatorischer Index		↓		↓
	CD3(+) T-Lymphozyten		↓		↓
Immunzellinfiltration in WML	B220(+) B-Lymphozyten		↓		↓
	Mac3(+) Macrophagen/Micorglia		↓		↓
Demyelinisierung	Demyelinisierung (%)		↓		↓
	Axonale Dichte in WML (%)		↑		↑
Oligodendrozyten Vorläuferzellen	Olig2(+) Oligodendrozyten in WML		↑		↑
	Olig2(+) Oligodendrozyten in NAWM		ns		ns
Reife Oligodendrozyten	P25(+) Oligodendrozyten in WML		ns		↑
	P25(+) Oligodendrozyten in NAWM		ns		ns
Zielrezeptoren von AZD4547	FGFR1	ns	ns	ns	ns
	pFGFR1	ns	↑	ns	ns
	FGFR2	↑	ns	ns	ns
	pFGFR2	ns	ns	ns	ns
	CSF1R	ns	↓	ns	ns
	VEGFR2	ns	ns	ns	↓
FGFR Signalweg assoziierte Proteine	FGF1	ns	ns	ns	ns
	FGF2	↓	↓	ns	ns
	FGF9	ns	ns	ns	ns
	pAkt	ns	ns	ns	ns
	pERK	ns	ns	ns	ns
	TrkB	ns	ns	ns	↓
	BDNF	↑	↑	↑	↑
Myelinproteine	VEGF	ns	ns	ns	ns
	MBP	ns	↑	ns	ns
	PLP1	↑	↑	ns	ns
Mitochondriale Proteine	CNPase	ns	↑	ns	ns
	ATP6E	↓	↓	ns	ns
	ATPβ Subunit	ns	ns	ns	ns
	mt-ND1	ns	ns	ns	ns
	SOD2	↓	↓	ns	↑
Expression proinflammatorischer Zytokine	SDHD	ns	ns	ns	ns
	IL-1β	ns	ns	ns	ns
	IL-6	ns	ns	ns	ns
	IL-12	ns	ns	ns	ns
	iNOS	ns	ns	ns	ns
	TNFα	ns	ns	ns	ns
Expression von Chemokinen	IFNγ	ns	ns	ns	ns
	CX3CR1	ns	ns	ns	ns
Expression von Inhibitoren der Remyelinisierung	CX3CL1	ns	ns	ns	ns
	TGFβ	ns	ns	ns	ns
	SEMA3A	ns	ns	ns	ns
	LINGO-1	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 11.** Zusammenfassung der Ergebnisse nach Untersuchung von Rückenmarksproben mit AZD4547 behandelten Mäusen nach MOG<sub>35-55</sub>-induzierter EAE.

### 4. DISKUSSION

Die hier durchgeführte Studie konnte auf vielfältige Weise das Potential des neuen Pharmakons Fexagratinib, einem unselektiven FGFR-Inhibitor, im Rahmen der Behandlung einer MOG<sub>35-55</sub>-induzierten EAE zeigen. Untersucht wurde die Therapierbarkeit von akuten und chronischen Krankheitsverläufen, die nach Ausbruch erster Symptome, für zehn Tage täglich mit Fexagratinib in zwei Dosierungen (6,25 und 12,5 mg/kg Körpergewicht) behandelt wurden. Die aussagekräftigsten Ergebnisse nach Beendigung des Versuchs sind:

Die signifikante Reduktion der klinischen Krankheitsverläufe bei EAE-induzierten Mäusen über bis zu 42 Tagen, die Identifizierung der vorläufig wirkungsvollsten Dosierung von Fexagratinib von 12,5 mg/kg über zehn Tage im Rahmen einer akuten Medikation. Darüber hinaus die signifikant gesenkte Entzündungsaktivität, eine verringerte Anzahl infiltrierender T- und B-Lymphozyten sowie eine geringere Anzahl von Microglia in demyelinisierenden Läsionen der weißen Substanz des Rückenmarks. Weiter konnte eine signifikant gesteigerte Remyelinisierung in Läsionen der weißen Substanz, mit einer erhöhten Anzahl an Oligodendrozyten samt Vorläuferzellen, bei zeitgleich signifikant reduzierter Demyelinisierung gezeigt werden. Zusätzlich wies der neuroprotektive Faktor BDNF nach Applikation von Fexagratinib eine erhöhte Expression auf.

Das hier verwendete MOG<sub>35-55</sub>-EAE-Modell ist eines der geläufigsten Modelle bei Forschungsfragen zu experimentellen Therapieansätzen der MS, da es die immunologischen Aspekte der Pathophysiologie besser modelliert als alternative Ansätze<sup>85</sup>. Demyelinisierte Entmarkungsherde manifestieren sich bei der MOG-EAE überwiegend im Rückenmark und Hirnstamm<sup>107</sup>. Dabei liegt zumeist eine axonale Degeneration vor, die primär auf eine Schädigung der Myelinscheiden im Rahmen einer CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten vermittelten Zellreaktion zurückgeht<sup>107</sup>. Die einseitige Aktivität der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten limitiert das MOG-EAE-Modell, da die Beteiligung von CD8<sup>+</sup>-T- und B-Zellen, wie sie in der Referenzerkrankung beobachtet wird, nur vernachlässigt modelliert wird<sup>107</sup>. Im MOG-EAE-Modell finden demyelinisierende Prozesse eher als Folge der Immunreaktion auf das MOG-Antigen statt, bei der die Myelinscheiden überwiegend selbst Ort der Schädigung sind, weniger die Myelin-bildenden Oligodendrozyten<sup>165</sup>. Klassischerweise schließt sich nach Induktion und dem Ausbruch erster Krankheitssymptome ein progredienter Krankheitsverlauf an<sup>81</sup>. Durch Verwendung niedrigerer Dosierungen des MOG-Antigens und von Pertussis-Toxin kann

das Modell hin zu einem schubförmigen Verlauf angepasst werden<sup>14</sup>. Höhere Dosierungen des Pertussis-Toxins verstärken die Krankheitsintensität am ehesten durch eine gesteigerte Permeabilität der Bluthirnschranke und einer gesteigerten Infiltration der MOG-Antigene und nachfolgend weiteren Entzündungszellen ins ZNS<sup>81</sup>. Darüber hinaus wirken sich ein niedriges Gewicht der Versuchstiere, ein jüngeres Alter bei Versuchsbeginn sowie höhere MOG-Konzentrationen verstärkend auf den EAE-Verlauf aus<sup>81</sup>. Alternative MS-Modelle wie die toxisch- oder Virus-vermittelten Modelle zeichnen sich durch eine Demyelinisierung aus, die zunächst die Oligodendrozyten selbst betrifft. Dadurch sollen Remyelinisierungsprozesse, laut einigen Forschenden, mit Hilfe von diesen Modellen besser beurteilt werden können als durch Antigen-vermittelte Modelle<sup>85</sup>. Dabei gilt es jedoch anzumerken, dass der Ursprung der Schädigungen der Oligodendrozyten bei den toxischen Modellen nicht auf eine autoimmun-bedingte Ursache zurückgeht, sondern zu großen Teilen durch eine Störung der mitochondrialen Aktivität bedingt ist und sich so von der MS unterscheidet<sup>126</sup>.

Die Übertragbarkeit von Studienergebnissen aus Versuchen mit Nagetieren auf klinische Studien an Patienten ist durch Limitierungen der verwendeten Krankheitsmodelle üblicherweise nur eingeschränkt möglich. Neben den pathophysiologischen Aspekten, auf die im Verlauf eingegangen wird, unterscheidet sich zusätzlich der zeitliche Ablauf zwischen Krankheitsentstehung und Diagnostik. Eine MS-Erkrankung bleibt meist über Monate bis Jahre unerkannt<sup>218</sup>; bei einer ersten ärztlichen Konsultation befindet sich die Erkrankung meist im chronischen Stadium. Der Verlauf und die Therapie einer EAE umfasst dagegen einen zeitlichen Rahmen von Tagen bis Wochen, wodurch degenerative Prozesse womöglich weniger weit fortgeschritten sind und Therapiekonzepte somit besser anschlagen könnten als beim Menschen<sup>85</sup>. Es zeigte sich, dass bereits das alleinige Entfernen der auslösenden Antigene in einigen MS-Modellen zum Abflachen von Krankheitssymptomen führt und kein chronisches Krankheitsstadium erreicht wird<sup>107</sup>. Für medizinische Modelle werden darüber hinaus meist Tiere aus Inzuchtstämmen genutzt, primär um die interindividuellen Störfaktoren zu minimieren und vergleichbare Versuchsreihen durchzuführen. Tiere aus Inzuchtstämmen akkumulieren jedoch genetische Mutationen, die mitunter die Übertragbarkeit auf den Menschen weiter einschränken<sup>85</sup>. Weiterführend kann die Frage gestellt werden, inwiefern sich die Immunsysteme von Nagetieren von denen ihrer menschlichen Vergleichsgruppen unterscheiden und ob die Abläufe der Immunantworten durch T- und B-Zellen bei diesen verändert sind. Bezogen auf die Modellierung der MS-Erkrankung, könnten ebenfalls mögliche speziesbedingte Unterschiede bei der Regulierung und Entwicklung von Oligodendrozyten und

(Re-)Myelinisierungsprozessen von Interesse sein. Der Umstand der anatomischen Unterschiede zwischen Nagetieren und Menschen in Kombination mit Variationen bei den Dosierungen der Antigene und Toxine, dem Gewicht und dem Alter der Tiere kann als eine mögliche Erklärung der Unterschiede und teils mangelnden Übertragbarkeit von Studienergebnissen auf andere Modelle oder auf klinische Studien am Menschen herangezogen werden. Die Notwendigkeit einheitlicher Protokolle und sorgsamer Dokumentation wird hierbei deutlich, um Versuchsreihen vergleichbarer zu gestalten und Ergebnissen eine höhere Validität zu verleihen.

Die in dieser Versuchsreihe erprobte Substanz war Fexagratinib, die als Multikinase-Inhibitor beschrieben werden kann und in absteigender Affinität FGFR1, FGFR3, FGFR2, CSF1R und VEGFR2 reversibel hemmt<sup>60</sup>. Eine besondere Relevanz im ZNS haben FGFR1 und 2, die auf Oligodendrozyten und Astrozyten exprimiert sind und während verschiedener Entwicklungsstufen an der Myelinisierung beteiligt sind<sup>33,95</sup>. Weiter wirkt der CSF1R unter anderem über I $\kappa$ B und NF $\kappa$ B auf die Immunaktivität, Proliferation und Reifung von Monozyten und Microglia/Makophagen und beeinflusst so indirekt Oligodendrozyten sowie deren Myelinisierungsprozesse<sup>144,190</sup>. VEGFR2 hingegen ist in MS-Plaques exprimiert und ein Regulator der Permeabilität der Bluthirnschranke, weiter wirkt VEGFR2 über Zytokine wie TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  oder IFN $\gamma$  modulatorisch auf infiltrierende Immunzellen<sup>63,178</sup>. Nach Gabe von Fexagratinib konnte eine Hochregulierung des FGFR1 und 2 in der akuten Erkrankungsphase beobachtet werden, in der chronischen Phase zeigten sich keine Veränderungen. CSF1R wurde bei akut erkrankten Versuchstieren gehemmt und herunterreguliert, im Verlauf konnten in der chronischen Phase keine Veränderung der Expressionsmuster nachgewiesen werden. Eine reduzierte Expression des VEGFR2 wurde erst im chronischen Krankheitsverlauf nach Applikation von Fexagratinib beobachtet, im akuten Stadium waren keine signifikanten regulatorischen Veränderungen festzustellen. Für die in der akuten Phase der Erkrankung gesteigerte Expression der FGFR1 und 2 trotz Gabe des Multikinase-Inhibitors Fexagratinib lassen sich einige Erklärungsansätze finden: FGF-Rezeptoren sind eine weitverbreitete und hoch redundante Rezeptorfamilie, die von zahlreichen Zelltypen exprimiert wird und in ihre Aktivität dem Einfluss zahlreicher weiterer Signalwege und Zell-Interaktionen unterliegt<sup>61</sup>. Die Anzahl von Rezeptoren auf Zelloberflächen wird größtenteils von einem System aus Endosomen und Lysosomen reguliert, welche durch Ubiquitinierung eine Internalisierung von Rezeptoren erreichen und so die Sensibilität der Zelle gegenüber den entsprechenden Liganden anpassen können<sup>9</sup>. Insbesondere beim FGFR konnte ein Mechanismus beobachtet werden, bei dem die klassische Clathrin-vermittelte Endozytose bei erhöhten Konzentrationen von

Wachstumsfaktoren ausgeschöpft ist und durch eine Clathrin-unabhängige Endozytose ersetzt wird, die wesentlich langsamer abläuft<sup>64</sup>. Die Endozytose wird größtenteils durch die Ubiquitinierung der Rezeptoren reguliert. Insbesondere bei RTKs wie EGFR, IGF1R und FGFR konnte beobachtet werden, dass diese Ubiquitinierungsstellen oft Veränderungen und Mutationen unterliegen, wodurch die Internalisierungsrate drastisch reduziert sein kann<sup>64</sup>. Dieses System unterliegt natürlicherweise einer Regulierung durch intra- und extrazelluläre Einflussfaktoren, darunter der Konzentration von Zytokinen wie TNF $\alpha$  oder der Aktivität des MAPK-Signalweges<sup>131</sup>, wodurch eine Beeinflussung im Rahmen der entzündlichen Aktivität einer EAE und durch Applikation von Fexagratinib denkbar ist.

Die Funktions- und Wirkungsweise der FGF-Rezeptoren wurde in zahlreichen Tierversuchen in Hinblick auf neurologische Erkrankungsbilder und insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt der Multiplen Sklerose in MS-Modellen untersucht. Es findet sich mittlerweile eine gemischte Datenlage zu diesem Thema mit unterschiedlichen Standpunkten zu einer Inhibierung und Blockade von FGFRs. Eine Forschungsgruppe konnte nach einem künstlich-induzierten Knock-out des FGFR1 und 2 bei gesunden Mäusen in der Versuchsgruppe eine reduzierte Menge an Myelin-bildenden Proteinen und dünneren Myelinscheiden beobachten. Eine Beeinflussung der Proliferation oder Differenzierung von Oligodendrozyten wurde von ihnen hingegen nicht festgestellt<sup>53</sup>. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine weitere Studie, deren Versuchstiere nach einem FGFR1/2-knock-out neben verminderten Myelinproteinen eine verstärkte axonale Degeneration aufwiesen<sup>83</sup>. Bei Versuchen am Cuprizone-Modell führte ein Knock-out der FGFR1 und FGFR2 zu weniger differenzierten Oligodendrozyten und einer geringeren Expression von myelinbildenden Proteinen. Negative Auswirkungen hatte die FGFR-Blockade auch auf Astrozyten im Telencephalon postnataler Mäuse. Die Astrozyten behandelter Mäuse differenzierten und proliferierten weniger gut, als Astrozyten von Versuchstieren der Kontrollgruppe und waren darüber hinaus in ihrer nutritiven Funktionsfähigkeit gegenüber Neuronen eingeschränkt<sup>183</sup>. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Untersuchung zur Rolle von FGF2 und FGFR1 bei der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen und Astrozyten im Bulbus olfactorius in der embryonalen- und frühen postnatalen Entwicklungsphase von Ratten<sup>56</sup>. Mittels eines *in vitro* Versuchs an OPCs von neugeborenen Ratten und Mäusen am ersten postnatalen Tag wurde die Relevanz einer intakten FGF-FGFR-Signalkaskade untersucht und die FGF2-vermittelte Aktivierung des FGFR1 mit einer regelrechten Migration von OPCs assoziiert<sup>137</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe stieß nach der Untersuchung postmortaler ZNS-Proben von MS-Patienten auf erhöhte FGF2-Konzentrationen in aktiven Läsionen

und in Plaque-umgebenden Arealen. Daraufhin wurde eine gesteigerte Migration von OPCs unter dem Einfluss von FGF2 in Zellkulturen beobachtet, was die Autoren letztlich schlussfolgern ließ, dass FGF2 einen positiven Einfluss auf die Remyelinisierung und die Integrität der Bluthirnschranke habe <sup>34</sup>. Die Inhibierung von FGF-Rezeptoren und ihrer Liganden wurde allerdings auch in einer Vielzahl unterschiedlicher Studien mit protektiven und regenerativen Auswirkungen in Verbindung gebracht. So konnte nach einem Rezeptor-knock-out eine erhöhte Remyelinisierung, gesteigerte axonale Dichte und verminderte MS-assoziierte Symptome im Rückenmark von EAE-induzierten Mäusen beobachtet werden <sup>86,158</sup>. Des Weiteren wiesen Proben vom Rückenmark EAE-induzierter Mäuse in perivaskulären Läsionsarealen höhere mRNA-Mengen von FGF2 und FGFR1 auf, was die Autoren als einen nachteiligen Effekt auf das Krankheitsgeschehen werteten <sup>118</sup>. In einem alternativen Modell für MS, dem Cuprizone-Modell, konnten die motorischen Einschränkungen bei Mäusen mit einem FGFR1/2 knock-out im Vergleich zur Kontrollgruppe abgemildert und eine gesteigerte Remyelinisierung gemessen werden <sup>134</sup>. Diese Beobachtungen konnten in einem weiteren Versuch am Cuprizone-Modell bestätigt werden, in dem die Versuchsgruppe mit einem FGFR1 knock-out mehr reife Oligodendrozyten, eine vermehrte Remyelinisierung und eine gesteigerte Axonintegrität aufwies, als die Vergleichsgruppe <sup>215</sup>. Die Intensität der Aktivierung des FGFR-Signalweges scheint ein möglicher relevanter Faktor für dessen Wirkungsweise darzustellen. Eine starke Hochregulierung der Signal-abwärts befindlichen ERK1/2-Kinase bewirkt eine massive Axondegeneration, führt zu Demyelinisierung und resultiert in einer erhöhten inflammatorischen Aktivität in Axonen sowie in Myelinscheiden von zuvor gesunden Mäusen <sup>84</sup>. In einer *in vitro* Versuchsreihe wurden OPCs und reife OLs FGF2 ausgesetzt, um die Wirkung der FGFR1-3 in unterschiedlichen Entwicklungsstufen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass FGF2 über die FGFR1 und 3 auf OPCs stimulierend auf Proliferation und Differenzierung wirkt. Bei ausgereiften Oligodendrozyten bewirkt eine Stimulation der FGF-Rezeptoren 1 und 2 die Verlängerung der Zellausläufer bei gleichzeitig verringerter Expression der Myelinproteine <sup>48</sup>. Positive Auswirkungen eines FGF2-knock-outs konnten in alternativen MS-Modellen, wie dem Cuprizone- oder dem murinen Hepatitis Virus-A59 Modell (MHV-A59) nachgewiesen werden: Dort zeigten K.O.-Mäuse im Vergleich zu den nicht-genetisch veränderten Versuchstieren eine verstärkte Remyelinisierung sowie eine gesteigerte Regenerationsfähigkeit von Oligodendrozyten <sup>5</sup>. Die *ex vivo* Applikation von FGF1 an Rückenmarksschnitten von vier Wochen alten Ratten führte zur akuten ATP-assoziierten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie zu gesteigerten Expression des CX3CR1 auf Mikroglia <sup>59</sup>. Mittels intrathekaler Injektion eines retroviralen Vektors wurde

bei Mäusen am 7. postnatalen Tag eine FGFR1-Defizienz induziert, die mit einer vermehrten Proliferation von Oligodendrozyten am 28. postnatalen Tag einherging und in einer separat durchgeführten Versuchsreihe bestätigt werden konnte <sup>214</sup>. Die Vielzahl von Publikationen, die auf Ergebnisse dieser Arbeit bezogen werden können zeigt, dass die Wirkung von Wachstumsfaktoren je nach Zelldifferenzierung teils gegensätzliche Effekte haben kann und die Entwicklungsstadien der Versuchstiere bei der Interpretation Berücksichtigung finden sollte. Weiter könnte der Verweis auf unterschiedliche Studiendesigns eine mögliche Erklärung für die variierenden Resultate bei Versuchen mit FGFR-Inhibitoren liefern. Einflussfaktoren wie das Entwicklungsstadium des ZNS der Tiere, uneinheitliche Versuchsprotokolle mit abweichenden Dosierungen der genutzten Reagenzien und die Verwendung unterschiedlicher MS-Modelle könnten zu einer veränderten inflammatorischen Umgebung und Signalweg-Aktivität beigetragen haben. Ein weiterer Aspekt, der hinsichtlich der hier durchgeführten Versuchsreihe zu beachten ist, ist die Eigenschaft von Fexagratinib mehrere Rezeptorsysteme in unterschiedlichen Affinitäten zu blockieren. So finden sich ebenfalls Studien, die eine mögliche Beteiligung des VEGFR2 und CSF1R an der MS und MS-Modellen nahelegen: In Untersuchungen bei MS-Patienten konnten während akuter Schübe erhöhte Serumwerte von VEGF gemessen werden, die positiv mit der Symptomlast sowie verkürzten Remissionsphasen und dem Ausmaß MR-tomografisch sichtbarer Rückenmarksläsionen, korrelieren <sup>3,192</sup>. Darüber hinaus fanden sich in humanen MS-Plaques höhere VEGF- und VEGFR2-Konzentrationen, verglichen mit gesundem Gewebe <sup>178</sup>. In mehreren Studien zur Wirkung verstärkter VEGF/VEGFR2-Aktivitäten wurden je nach Aktivitätsstadium der MS/EAE, pro-inflammatorische Effekte mit Ausschüttung von Interleukinen, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  oder IFN $\gamma$  im ZNS beobachtet <sup>63</sup>. Im EAE-Modell resultierte aus einer Erhöhung von VEGF ein schwererer Krankheitsverlauf, eine gesteigerte Anzahl von Astrozyten und eine verstärkte entzündliche Aktivität im Rückenmark <sup>155</sup>. Folge einer gesteigerten VEGF-Konzentration war in einer weiteren Studie eine vermehrte Permeabilität der BBB samt einer höheren Gefäßdichte <sup>178</sup>. Ein Versuch zur therapeutischen Applikation des VEGFR2-Inhibitors Semaxinib in der akuten Krankheitsphase des MOG-EAE-Modells erzielte eine signifikante Reduktion des EAE-Scores, reduzierte die Inflammation und milderte die Demyelinisierung im Rückenmark von Mäusen <sup>166</sup>.

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Studien, die die Auswirkungen verschiedener CSF1R-Inhibitoren, wie Ki20227 oder PLX3397, auf den klinischen Verlauf von EAE-Modellen prüften <sup>36,200</sup>. In allen Versuchen milderten die Substanzen den EAE-Verlauf und die Symptome ab, darüber hinaus verringerte sich die Anzahl von zentralen Läsionen und Entzündungsherden sowie die Aktivität und Proliferation von T-

Lymphozyten, Astrozyten und Microglia<sup>36,69,126,200</sup>. Die Inhibitoren waren außerdem im Stande die Freisetzung von Zytokinen wie TNF $\alpha$  zu reduzieren und den Verlust von Oligodendrozyten sowie das Ausmaß der Demyelinisierung und der axonalen Degeneration zu vermindern<sup>69,126</sup>. Umgekehrt führt die experimentelle Injektion des Liganden CSF1 in einer Studie zu einer gesteigerten Demyelinisierung der weißen Substanz im ZNS<sup>126</sup>. In Autopsie-Studien konnten erhöhte Expressionsmuster des CSF1-Rezeptors im Umkreis von demyelinisierten Läsionen im Hirngewebe von an RRMS und PMS erkrankten Patienten gefunden werden<sup>69</sup>. So gibt es Hinweise, dass ein verändertes Milieu im Rahmen chronisch-entzündlicher ZNS-Erkrankungen, die Funktionsweise des CSF1-Rezeptors nachteilig beeinflusst. Es scheint Einfluss auf die feine Regulation des Rezeptors zu haben und über diesen Makrophagen/Microglia in pathologischer Weise verstärkt zu aktivieren<sup>69</sup>. Wie auch bei der Beeinflussung der Aktivität der FGFRs und des VEGFR2, scheint ebenfalls beim CSF1R der Zeitpunkt einer Inhibition einen relevanten Einfluss zu haben: Es ist anzunehmen, dass eine Blockade des CSF1R während einer Entwicklungsphase negative Auswirkungen auf die Anzahl von Neuronen und die Regulation der Mikroglia-Aktivität hat. Unter Krankheitsbedingungen hingegen scheint die Suppression einer pathologischen Immunreaktion vorteilhaft zu sein, um die Krankheitsintensität abzumildern.

Zu den oben diskutierten Rezeptorsystemen werden schon seit längerer Zeit in klinischen Studien experimentelle Inhibitoren erprobt. Aktuell (06/24) sind rund 104 Studien auf ClinicalTrials.gov gelistet, die VEGFR2-Inhibitoren fast ausschließlich zur Therapie von fortgeschrittenen Karzinomerkrankungen erproben. Sechs Studien befinden sich in Phase III bzw. IV, davon sind vier bereits abgeschlossen, jedoch ohne publizierte Ergebnisse. Inhalt der Studien war der Vergleich von VEGFR2-Inhibitoren wie Apatinib, Cabozantinib oder Pazopanib mit den Standardtherapien bei B-Zell-Lymphomen, Lungen-, Nieren- und Leberkarzinomen. Zur Verwendung von CSF1R-Inhibitoren finden sich momentan (06/24) rund 24 Studien auf ClinicalTrials.gov, überwiegend zur Therapie solider Tumore. Davon sind zwei Studien in der Phase III, in einer davon wurden Tumore des Bewegungsapparates erfolgreich mittels PLX3397 behandelt. In zwei weiteren Studien wurden die Inhibitoren darüber hinaus im Rahmen der Reduktion der immunologischen Graft-Versus-Host-Reaktion nach Stammzelltransplantation sowie zur Behandlung des Morbus Crohn erprobt. Über den Einsatz von FGFR-Inhibitoren sind aktuell (06/24) laut ClinicalTrials.gov 111 Studien gelistet, die Probanden rekrutieren, sich in der Datenerhebung befinden oder abgeschlossen wurden. In 19 Studien davon wurde AZD4547 bzw. Fexagratinib verwendet. Eine Studie befand sich in Phase III, die die Behandlung mit Fexagratinib als

Zweitlinientherapie bei Lungenkarzinomen im Stadium IV untersuchten. Patienten wurden dort insgesamt 21 Tage lang oral mit Fexagratinib behandelt, rund 25% schilderten stärkere Nebenwirkungen, wie Anämien, Konjunktividen und andere Reizungen der Augen sowie des Gastrointestinaltrakts und generelle Fatigue. Aufgrund von vorzeitigem Versterben beendete keiner der Probanden der Interventions- oder Vergleichsgruppe mit Docetaxel die Studie.

Nach der Applikation von 12,5 mg/kg Fexagratinib konnte eine signifikant verminderte Entzündungsaktivität in Rückenmarksschnitten EAE-induzierter Mäuse sowohl in der akuten Krankheitsphase am 20. Tag p.i., als auch in Proben chronisch-erkrankter Mäuse am 42. Tag p.i., beobachtet werden. Das Ausmaß infiltrierender inflammatorischer Zellen, ist zu beiden Zeitpunkten um den Faktor 2,5 reduziert gewesen. Die immunhistochemischen Analysen von T- und B-Lymphozyten sowie von Makrophagen/Microglia waren in Läsionsarealen der weißen Substanz zu beiden Zeitpunkten signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe. Die genetischen Untersuchungen zur mRNA-Expression von Zytokinen und Interleukinen blieben ohne Auffälligkeiten zwischen den Kontroll- und Interventionsgruppen. Ein Erklärungsansatz für diesen Umstand könnte unter anderem sein, dass die Regulation von mRNA nicht nur auf transkriptioneller Ebene, messbar durch eine PCR, sondern auch zu großen Teilen durch posttranskriptionelle Modifikationen stattfindet. Insbesondere bei Produkten wie Zytokinen, die zeitlich abgestimmt synthetisiert und ausgeschüttet werden, ist eine tiefergehende und längerfristige Aussage auf Grundlage einer Bestimmung der mRNA-Konzentrationen nur eingeschränkt bis nicht möglich. Bekannt ist, dass an den pathophysiologischen Prozessen einer MS unter anderem CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Lymphozyten, B-Zellen sowie Macrophagen/Mikroglia und Astrozyten beteiligt sind <sup>101</sup>. T- und B-Lymphozyten bilden die autoreaktive bzw. autoimmune Basis der Erkrankung, von der eine kombinierte Infiltration mittels Antikörper, zytotoxischer Zellen und Komplementfaktoren ausgeht <sup>101</sup>. Die B-Zell/T-Zell-Interaktion sorgt maßgeblich für eine ZNS-Infiltration mit Immunzellen nach vorheriger Präsentation von Antigenbestandteilen durch B-Gedächtniszellen gegenüber T-Zellen <sup>85</sup>. B-Zellen sorgen ebenfalls für die Produktion spezifischer Antikörper im ZNS, die gegen Myelinbestandteile gerichtet sind und zur Demyelinisierung führen. Beobachtungen nach Anwendung des B-Zell-depletierenden Anti-CD20-Antikörpers Rituximab zeigten, dass die Schubintensität verkürzt werden konnte, sich jedoch die Zusammensetzung der Antikörper im Liquor nicht änderte, was Rückschlüsse auf einen pathoimmunologisch relevanten Faktor abseits der reinen Antikörperproduktion von B-Zellen zulässt <sup>87,133</sup>. So weisen knapp 60% aller Läsionen von MS-Patienten neben einer T-Zell-Infiltration und einer

Antikörperproduktion ebenfalls eine Komplement-Aktivierung auf, welche durch Antigen-präsentierende B-Zellen ermöglicht wird<sup>87</sup>. Eine Regulation der Immunantwort geschieht über die Ausschüttung von Zytokinen und Interleukinen wie IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6 und IL-12, welche für die Polarisierung und Differenzierung naiver Lymphozyten zu entsprechenden Subtypen der T-Helferzellen verantwortlich sind<sup>101</sup>. Störungen dieser Differenzierung führen zu einer pathologischen Überexpression der T<sub>H</sub>-Subtypen 1 und 17 und bilden einen weiteren Faktor bei der Ausprägung der MS, da sie Studien zufolge mit einer erhöhten Permeabilität der Hirnschranke und mit der verlangsamten Differenzierung von Oligodendrozyten einhergehen<sup>101</sup>. Um das Ausmaß einer Immunantwort richtig zu adjustieren, kommt den regulatorischen T- und B-Zellen eine wichtige Rolle zu. Da sie über TGF $\beta$  und IL-10 hemmend auf die Aktivität inflammatorischer CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wirken, ermöglichen sie die Initiierung regenerativer Prozesse<sup>85</sup>. Darüber hinaus wird ihnen eine positive Rolle im Rahmen der Remyelinisierung zugesprochen<sup>50</sup>. Eine gestörte Funktion von T<sub>reg</sub>-Zellen, in Form einer verminderten Produktion anti-inflammatorischer Interleukine, wird bei MS Patienten als ein wesentlicher Faktor für den Krankheitsprogress verantwortlich gemacht<sup>85</sup>. Die Relevanz von Microglia/Makrophagen ist seit längerem bekannt, sie besiedeln akute MS-Läsionen und besitzen gegensätzliche Funktionen; neben einer gewebeschädigenden Aktivierung von Immunzellen, wirken sie nach der Phagozytose von Myelinrückständen entzündungshemmend<sup>128</sup>. Experimentell zeigt sich, dass die Inhibition des Microglia-spezifischen CSF1R mit PLX5622 eine reduzierte Entzündungsaktivität bewirkt und zum Erhalt intakter Myelinscheiden und reifer Oligodendrozyten beiträgt<sup>67</sup>. Therapeutisch wird mittels DMTs, wie Interferon-beta, Glatirameracetat oder Fingolimod, Einfluss auf TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie die S1P-Rezeptoren genommen, um die Aktivität von Microglia während eines aktiven MS-Schubs effektiv zu vermindern<sup>67</sup>.

Neben den Effekten von Fexagratinib auf Immunzellen und relevante Immunmodulatoren, konnten Auswirkungen auf das BDNF/TrkB-System beobachtet werden. Dieses neuroprotektiv wirkende System reagierte auf die Applikation von Fexagratinib mit einer Überexpression von BDNF in der akuten und chronischen Phase und einer Hemmung der TrkB Expression im chronischen Verlauf der Versuche. BDNF gehört neben NGF zu den neurotrophen Faktoren und ist essenziell für die Funktionalität, Differenzierung und Wachstum der Neurone und somit auch für den Erhalt neuronaler Plastizität<sup>172</sup>. BDNF wirkt über die Suppression der Cyclooxygenase-2 (COX2) und NF $\kappa$ B sowie durch eine gehemmte Synthese proinflammatorischer Zytokine insgesamt antiinflammatorisch und neuroprotektiv<sup>145</sup>. BDNF bindet an TrkB und NGFR (auch

bekannt als p75NTR), darüber hinaus umfasst die Trk-Familie noch die Rezeptoren TrkA und TrkC<sup>172</sup>. Allesamt gehören sie der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren an und besitzen eine ähnliche Signalkaskade wie andere relevante Rezeptoren dieser Studie. Eine Herabregulierung des Rezeptors, wie er in der chronischen Phase der Studie auftrat, kann beispielsweise durch ein Überangebot an Liganden, in dem Fall BDNF oder anderen Co-stimulierenden neurotrophen Faktoren wie NT3, im Sinne der Receptor-Down-Theorie erklärt werden. Experimentell konnte in dieser Hinsicht bereits ein solches Verhalten von TrkB nach übermäßiger Zufuhr von BDNF beobachtet werden<sup>7</sup>. Im Mausmodell mit BDNF-knock-out zeigte sich eine signifikant reduzierte Größe des Gehirns, jedoch eine mit Wildtypen vergleichbare neuronale Organisation<sup>6</sup>. Funktionell wurde allerdings eine stark ausgeprägte Bewegungsunfähigkeit beobachtet<sup>6</sup>. Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen legen neuere Studien an postmortalem Gewebe von Alzheimer Patienten ein Zusammenhang zwischen geringen BDNF/TrkB-Konzentrationen und einer erhöhten Gefahr für Alzheimer nahe<sup>6</sup>. Dieser Effekt kann ebenfalls auf weitere neurologische Krankheitsbilder wie ALS, M. Parkinson und MS ausgeweitet werden. Ursache für einen pathologischen Einfluss auf eine MS-Erkrankung können an mehreren Stellen des Transport- und Signalwegs von BDNF auftreten: Dazu zählen die gestörte proteolytische Umwandlung von pro-BDNF in wirksames mBDNF sowie eine Missense-Mutation die zum Wechsel der Aminosäure Valin zu Methionin führt und einen Polymorphismus erzeugt<sup>6,115</sup>. Eine experimentelle therapeutische Aktivierung von TrkB durch den Agonisten 7,8-DHF führte im MOG-EAE-Modell zu einer verminderten Krankheitsausprägung und geringeren Demyelinisierung<sup>124</sup>. Ähnliche Wirkungen zeigen sich auch bei der Anwendung von BDNF, welcher ebenfalls für die Remyelinisierung benötigt wird. Einschränkungen ergeben sich allerdings bei der therapeutischen Anwendung, da BDNF ein hohes molekulares Gewicht besitzt und unfähig ist, die Bluthirnschranke zu überqueren, was eine intravenöse Applikation ausschließt<sup>115</sup>. Die Arbeitsgruppe um Kopec et al. applizierte erfolgreich intravenös eine modifizierte Variante des BDNF zusammen mit ADTC5, einem Modulator der Bluthirnschranke, um eine zentralnervöse Wirkung sicherzustellen<sup>97</sup>. Die Versuche an EAE-induzierten Mäusen zeigten reduzierte Krankheitsverläufe, abgemilderte Entzündungswerte und eine verstärkte Aktivierung von Oligodendrozyten und einer gesteigerten Demyelinisierung<sup>97</sup>.

Störungen des mitochondrialen Stoffwechsels sind laut aktuellen Studien mit einer erhöhten Inzidenz degenerativer neurologischer Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson und MS assoziiert. Schäden führen zu einem zellulären Energiedefizit, einem Sauerstoffmangel und einer Akkumulation von Eisen sowie zu höheren Konzentrationen

von freien Radikalen. Die Aufrechterhaltung eines suffizienten zellulären Energiestoffwechsels und die Regulation von oxidativem Stress sind Voraussetzungen für die physiologische Funktion von Neuronen, Axonen und Oligodendrozyten. In unserer Studie hatte Fexagratinib in der akuten Erkrankungsphase einen negativen regulatorischen Einfluss auf die mitochondrialen Komplexe ATP6E und SOD2. Im Verlauf der chronischen Erkrankung wiesen Mäuse nach der Behandlung mit Fexagratinib jedoch gesteigerte Konzentrationen von SOD2 auf, ATP6E schien zu diesem Zeitpunkt nicht reguliert zu werden. SOD2 und ATP6E sind, neben weiteren Proteinkomplexen, Bestandteil des mitochondrialen Redoxsystems und für eine Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase an freien Radikalen und oxidativem Stress zuständig. SOD2-defiziente Mäuse weisen eine gesteigerte Demyelinisierung, eine erhöhte Degeneration von Axonen und stärkere motorische Einschränkungen auf, deren klinische Ausprägung einer EAE bzw. einer MS ähnelt <sup>16</sup>. In derselben Studie war ebenfalls die inflammatorische Aktivität bei einem Mangel an SOD2 gesteigert und ging mit einer herabgesetzten Integrität der BBB einher <sup>16</sup>. Hohe Mengen an ROS und ein entzündliches Milieu können zur reduzierten Expression mitochondrialer Komplexe führen und zelluläre Differenzierungsprozesse von Oligodendrozyten hemmen, da die Bereitstellung ausreichender Energieressourcen nicht gegeben ist <sup>187,197</sup>. Warum die mitochondrialen Komplexe SOD2 und ATP6E in der akuten Phase der AZD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert waren, obwohl sich die inflammatorische Aktivität reduzierte und die Remyelinisierung bereits begann, kann nicht abschließend geklärt werden. Einen Hinweis könnte die Beobachtung geben, dass gesteigerte Konzentrationen von ROS mit ebenfalls erhöhten Expressionsmustern von Mitochondrien einhergehen, um oxidativ-wirksame Stoffe zu reduzieren <sup>10</sup>. Eine mögliche Hypothese würde so lauten, dass reduzierte ROS-Level, wie sie nach der akuten Fexagratinib-Gabe wahrscheinlich waren, zu einer Reduktion der mitochondrialen Komplexe führen, da diese in einer geringeren Anzahl benötigt werden, um eine physiologische Konzentration freier Radikale aufrecht zu erhalten. Erst in der chronischen Erkrankungsphase konnte eine erhöhte Expression von SOD2 nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt scheint die Remyelinisierung und Differenzierung von reifen Oligodendrozyten schon weit fortgeschritten gewesen zu sein, wie man in den immunhistochemischen Analysen beobachten konnte. Diese Annahme wird durch Befunde aus Hirngewebe von MS-Patienten gestützt, in denen remyelinisierte Axone mehr Mitochondrien und eine gesteigerte zelluläre Aktivität als unbeschädigte Axone aufwiesen, was auf einen erhöhten Energiebedarf im Rahmen der Regeneration zurückzuführen ist <sup>210</sup>. Abschließend lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass Fexagratinib einen über die gesamte Versuchsdauer anhaltenden supprimierenden

Effekt auf die Intensität der Immunreaktion und die Zellaktivität infiltrierender Lymphozyten und Microglia hatte, was unter anderem zu einer signifikant kürzeren Schubdauer und Schubintensität führte. Die Relevanz dieser beiden Parameter für MS Patienten wird deutlich, wenn man das Ausmaß der körperlichen und kognitiven Einschränkungen betrachtet, die aus einer entzündlich bedingten Verringerung der kortikalen Plastizität resultieren und zu großen Teilen die individuellen Krankheitsburden prägen<sup>125,198</sup>. Bei einer langfristigen und konsequenten Therapie könnte die gesteigerte Remyelinisierungsrate für eine verbesserte neuronale Plastizität sorgen und künftig einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf sowie die späteren Krankheitsfolgen haben.

Fexagratinib hat eine anti-inflammatorische Wirkung und ein remyelinisierendes Milieu geschaffen, in dem größere Populationen reifer und unreifer Oligodendrozyten in Läsionen der weißen Substanz gefunden wurden. Diese führten im Rahmen der Remyelinisierung zu einer höheren axonalen Dichte und somit zu einer Regeneration der Myelinscheiden. Den größten Anteil demyelinisierter Areale bilden die chronisch-inaktiven Plaques bei MS Patienten, diese haben ein zellarmes Zentrum ohne regenerative Aktivität und eine aufgehobene zelluläre Struktur, wodurch die Neubesiedlung und eine spätere Remyelinisierung nach aktuellem Wissensstand nicht möglich ist<sup>2</sup>. Fexagratinib scheint durch seine konsequente anti-entzündliche Wirkung einen großen Einfluss auf die Entwicklung der Plaques zu haben und bereits in einem frühen Stadium zellulär-destruktiven Prozessen entgegenzuwirken, um die Regenerationsfähigkeit zu erhalten und zu verstärken. Ein Faktor könnte der positive Effekt auf die Differenzierung von OPCs in reife Oligodendrozyten sein<sup>49</sup>: Die verminderte Remyelinisierung in chronischen Plaques hängt mit einer Störung der Differenzierung von OPCs zu reifen Oligodendrozyten zusammen, welche unter anderem durch Rückstände von Myelinbestandteilen hervorgerufen wird, die darüber hinaus pro-inflammatorisch auf das umliegende Gewebe sowie auf Axone wirken<sup>50</sup>. Darüber hinaus sind Oligodendrozyten zytotoxischen T-Zellen, auto-reaktiven Antikörpern und Zytokin-aktivierten Astrozyten ausgesetzt, die diese ebenfalls funktionell hindern<sup>101</sup>. Fexagratinib ist ein Multikinase-Inhibitor des FGFR1/2, CSF1R und VEGFR2, insbesondere über die Wirkung der FGFR-Familie gibt es kontroverse Diskussionen, bei denen die zeitliche Entwicklung des ZNS berücksichtigt werden muss. Negative und entwicklungshemmende Ergebnisse über die FGFR-Inhibition wurden häufig in embryonalen oder frühen postnatalen Phasen erhoben. In unserem Experiment waren die Versuchstiere bereits 8 – 12 Wochen alt; jedoch soll bei Mäusen die Myelinisierung des Rückenmarks innerhalb von 15 – 20 Tagen ihren Höhepunkt

erreichen, die des Kortex nach rund 50 Tagen<sup>12,53</sup>. Dies könnte die ausbleibenden negativen Effekte auf Entwicklung und Differenzierung der Versuchstiere unter Einfluss einer FGFR-Inhibition erklären. Die Ergebnisse der Untersuchung unterstreichen eine potentielle Wirksamkeit von Fexagratinib bei der Behandlung einer MS. Fexagratinib bzw. AZD4547 wird bereits in klinischen Studien an Patienten mit malignen Tumorerkrankungen erprobt. Im Falle einer Anwendung bei Patienten mit MS, würde die Äquivalenzdosierung zu unserer Empfehlung von 12,5 mg/kg im Tiermodell, rund 1 mg/kg im Menschen entsprechen<sup>143</sup>. Bei einer bereits erprobten Dosierung von bis 160 mg/kg pro Tag, bei einem akzeptablen Nebenwirkungsspektrum scheint dies eine vertretbare Dosierung zu sein<sup>191</sup>. Über die Dauer und Regelmäßigkeit einer möglichen Einnahme lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur schwer eine Aussage treffen; eine zehntägige Einnahme führte zu den beschriebenen Effekten im Untersuchungszeitraum. Wie sich der Krankheitsverlauf über den Beobachtungszeitraum hinaus entwickelt, ist Spekulation. Da bei einer chronischen Erkrankung wie der MS die Schubprophylaxe entscheidend ist, um Residuen möglichst zu verhindern, könnte eine dauerhaft-fortlaufende Einnahme oder eine monatliche wiederkehrende Einnahme über jeweils zehn Tage erprobt werden.

Abschließend lässt sich aus den dargelegten Resultaten eine insgesamt gute Wirksamkeit von Fexagratinib gegenüber den Placebogruppen bei der Behandlung einer EAE schlussfolgern, die sowohl molekularbiologisch als auch histopathologisch bestätigt wurde. Neben klinisch mildereren Krankheitsverläufen konnten erste Symptome direkt nach Ausbruch der Erkrankung im Rahmen der zehntägigen oralen Applikation von Fexagratinib wirksam reduziert und teils gänzlich verhindert werden. Darüber hinaus wiesen die Versuchstiere in Abhängigkeit der verabreichten Dosis von Fexagratinib eine reduzierte Infiltration von Immunzellen sowie eine verminderte Demyelinisierung und Neurodegeneration in Läsionen des Rückenmarks auf. Parallel zeigte sich eine gesteigerte Remyelinisierung samt erhöhter axonaler Dichte, was in Hinblick auf die Reduktion langfristiger Krankheitsfolgen positiv zu werten ist. Im akuten Therapiearm (20 Tage p.i.) zeigte sich eine stärkere Wirksamkeit, verglichen mit der chronischen Gruppe (42 Tage p.i.), die durch einen möglichst akuten Therapiebeginn mit Fexagratinib erreicht werden kann. Letztlich stellte sich die Dosierung mit 12,5 mg/kg als wirksamer heraus, verglichen mit 6,25 mg/kg. Im Falle einer Anwendung bei MS-Patienten entspräche dies einer empfohlenen Äquivalenzdosis von 1 mg/kg. Der Multikinase Ansatz von Fexagratinib verspricht synergistische Effekte zu nutzen, um den Krankheitsprogress zu verlangsamen und regenerative Prozesse zu unterstützen, sodass es ein potentiell wirkungsvolles neues Pharmakon zur Therapie der MS darstellt.

### 5. ZUSAMMENFASSUNG

**Einleitung:** Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmune entzündlich-demyelinisierende Krankheit, die weltweite Inzidenz liegt bei rund 3 Millionen Menschen im mittleren Alter und weist eine meist progressiv verlaufende Symptomatik auf, die neben schweren motorischen Einschränkungen auch psychische Komplikationen beinhaltet. Im Rahmen vorausgegangener Untersuchungen zeigte sich eine mögliche Beteiligung der FGFR, VEGFR2 und CSF1R Signalwege an der Pathogenese der autoimmunen experimentellen Enzephalopathie (EAE), einem Modell für MS. Vorarbeiten mit dem selektiven FGFR-Inhibitor Infigratinib erzielten bereits gute Resultate und stellten die Frage nach einer wirkungsvolleren Substanz und einem Therapieregime samt einer möglichen Dosierung für den Einsatz im Menschen. **Versuchsansatz:** Fexagratinib (AZD4547) ist ein Multikinase-Inhibitor für den FGFR1 und 2, VEGFR2 und CSF1R. In diesem Versuch wurde ab dem Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome Fexagratinib in einer Dosierung von 6,25 bzw. 12,5 mg/kg über zehn Tage oral an EAE-induzierte Mäuse verabreicht. Die Wirksamkeit wurde jeweils in einer akuten Phase am Höhepunkt der Symptome (20 Tage p.i.) und in einer chronischen Phase der EAE (42 Tage p.i.) untersucht. Ziel war es, die Symptomlast und den Krankheitsprogress abzumildern und darüber hinaus neuroregenerative Prozesse wie die Remyelinisierung zu unterstützen. **Ergebnisse:** In der akuten Phase zeigte sich eine Reduktion schwerer Symptome von 89% bzw. 100% in der 6,25 und 12,5 mg Gruppe. In der chronischen Phase konnte niedrig dosiertes AZD4547 die Symptomatik um 68% reduzieren, in der Hochdosis-Gruppe wurden schwere Symptome erneut komplett verhindert. Immunhistochemisch zeigte sich eine signifikant reduzierte Entzündungsaktivität von T- und B-Lymphozyten sowie von Macrophagen/Microglia in Läsionen der weißen Substanz des Rückenmarks in beiden Phasen des Experiments. Gleichzeitig steigerte AZD4547 die Anzahl Myelinproduzierender Oligodendrozyten und ihrer Vorläuferzellen und erhöhte die Dichte myelinisierter Axone im Rückenmark. **Fazit:** Der Einsatz des Multikinase-Inhibitors Fexagratinib stellt eine potentiell gut wirksame neue Therapieoption zur Abmilderung krankheitsbezogener Symptome und der Verlangsamung des Krankheitsprogresses bei MS dar. Darüber hinaus unterstützt er die Remyelinisierung von Axonen und wirkt neuroregenerativ. Der Einsatz von Fexagratinib in einer klinischen Studie mit einer Äquivalenzdosis von 1 mg/kg im Menschen würde weitere wichtige Erkenntnisse zur Verträglichkeit und Wirksamkeit einer möglichen künftigen Anwendung bei MS-Patienten liefern.

## 6. SUMMARY

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory demyelinating disease with a worldwide incidence of approximately 3 million middle-aged individuals, typically manifesting as progressive symptoms including severe motor impairment and psychological complications. Previous studies have indicated the potential involvement of the FGFR, VEGFR2 and CSF1R signalling pathways in the pathogenesis of autoimmune experimental encephalopathy (EAE), a model for MS. Early work with the selective FGFR inhibitor Infigratinib has yielded promising results, prompting the exploration of more effective substances and therapeutic regimens, including potential dosages for human use. **Experimental approach:** Fexagratinib (AZD4547) is a multikinase inhibitor targeting FGFR1 and 2, VEGFR2, and CSF1R. In the present trial, Fexagratinib was orally administered to mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) at a dose of 6.25 or 12.5 mg/kg for a period of ten days, beginning at the onset of the first symptoms. The efficacy of the treatment was investigated in two distinct phases: the acute phase, which occurred at the peak of symptoms (20 days p.i.), and the chronic phase of the disease (42 days p.i.). The objective was to alleviate the symptom burden and disease progression, while also supporting neuroregenerative processes such as remyelination. **Results:** In the acute phase, there was a reduction in severe symptoms of 89% and 100% in the 6.25 and 12.5 mg groups respectively. In the chronic phase, low-dose AZD4547 was able to reduce symptoms by 68%, while severe symptoms were again completely prevented in the high-dose group. Immunohistochemistry showed significantly reduced inflammatory activity of T and B lymphocytes as well as macrophages/microglia in white matter lesions of the spinal cord in both phases of the experiment. At the same time, AZD4547 increased the number of myelin-producing oligodendrocytes and their precursor cells and increased the density of myelinated axons in the spinal cord. **Conclusion:** The use of the multikinase inhibitor fexagratinib may represent a potentially effective new therapeutic option for the alleviation of disease-related symptoms and the slowing of disease progression in MS. Furthermore, it facilitates the remyelination of axons and exerts a neuroregenerative effect. The utilisation of fexagratinib in a clinical trial with an equivalent dose of 1 mg/kg in humans would facilitate the acquisition of further crucial insights into the tolerability and efficacy of a prospective future application in MS patients.

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$  – Alpha  
 $\beta$  – Beta  
 $\gamma$  – Gamma  
 $\Delta$  – Delta

A <sub>2A</sub> R	Adenosin-2A-Rezeptor
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ATP	Adenosintriphosphat
ATP6(E)	Mitochondrially encoded ATP synthase membrane subunit 6 (E)
ATP $\beta$ subunit	ATP synthase $\beta$ subunit
AUC	Bioverfügbarkeit ( <i>engl. area under the curve</i> )
BBB	Bluthirnschranke ( <i>engl. blood brain barrier</i> )
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CFA	Komplette Freund'sches Adjuvanz
CIS	Klinisch-isoliertes Syndrom ( <i>engl. clinically isolated syndrome</i> )
C <sub>max</sub>	Maximale Plasmakonzentration
CNPase	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CX3CL1	Chemokine C-X3-C ligand 1 (aka Fractalkine)
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
DIS	Dissemination in space
DIT	Dissemination in time
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FGFR <sub>x</sub>	Fibroblast growth factor receptor
FGF <sub>x</sub>	Fibroblast growth factor
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GML	Läsionen der grauen Substanz ( <i>engl. grey matter lesions</i> )
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

HNSCC	Kopf-Hals-Tumore (engl. Head neck squamous cell carcinoma)
HSPG	Heparansulfat-haltige Proteoglykane
IFN $\gamma$	Interferone $\gamma$
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IL-x	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JC-Virus	John Cunningham-Virus
LINGO-1	Leucine rich repeat and Immunoglobulin-like domain-containing protein 1
MBP	Myelin basic protein
miRNA	microRNA
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MT-ND1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1, mitochondrial
MYRF	Myelin regulatory factor
NMOSD	Neuromyelitits-optica-Spektrum-Erkrankung
NO	Stickstoffmonoxid
NPCs	Neuronale Vorläuferzellen (engl. neural progenitor cells)
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (engl. non-small-cell lung carcinoma)
OKB	Oligoklonale Banden
OLIG1/2	Oligodendrocyte transcription factor 1/2
OLs	Reife Oligodendrozyten
OPC	Oligodendrocyte progenitor cell
OPCs	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (engl. oligodendrocyte progenitor cells)
pAkt	Phosphorylated Akt (aka PKB; Protein kinase B)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
pErk	Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (aka MAPK; mitogen-activated protein kinases)
pFGFR $\alpha$	Phosphorylated fibroblast growth factor receptor
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PLP1	Myelin proteolipid protein 1

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	Primär progressive Multiple Sklerose ( <i>engl.</i> primary progressive multiple sclerosis)
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose ( <i>engl.</i> relapsing-remitting multiple sclerosis)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S1P-Rezeptor	Sphingosine 1-Phosphate-Rezeptor
SDHD	Succinate dehydrogenase complex subunit D
SDI	Socio-demographic index
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEMA3A	Semaphorin-3A
SOD2	Superoxide dismutase 2
SOX-10	SRY-box-10
SPMS	Sekundär progressive Multiple Sklerose ( <i>engl.</i> secondary progressive multiple sclerosis)
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
$T_H$ -Zellen	T-Helfer-Zellen
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TMEV	Theiler's Murine Enzephalomyelitis Virus
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
WML	Läsionen der weißen Substanz ( <i>engl.</i> white matter lesions)
YLD	Years lived with disability

## 8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

1. Weltweite Verteilung der Prävalenz der MS	Seite 2
2. Verlaufsformen der MS	Seite 7
3. Therapieschema der MS	Seite 12
4. Molekülstruktur von AZD4547 bzw. Fexagratinib	Seite 14
5. Signalkaskade der FGF-Rezeptoren	Seite 16
6. Struktur eines Axons mit Myelinscheide	Seite 21
7. Ausstattung der im Tierversuch verwendeten Käfige	Seite 34
8. Schema des Versuchsablaufs	Seite 36
9. Zusammenfassung der Methodik und der Targets	Seite 45
10. Schema des suppressiven Versuchsablaufs	Seite 47
11. Ergebnisse der klinischen Krankheitsverläufe nach EAE-Induktion	Seite 48
12. Ergebnisse der Inflammation von ZNS-Arealen (H&E)	Seite 50
13. Ergebnisse der Inflammation von ZNS-Arealen (Immunhistochemie)	Seite 51
14. Ergebnisse der Proteinexpression (FGFR)	Seite 53
15. Ergebnisse der Genexpression (FGFR)	Seite 54
16. Ergebnisse der Proteinexpression (pAkt/pErk)	Seite 55
17. Ergebnisse der Protein- und Genexpression (CSF1R)	Seite 56
18. Ergebnisse der Genexpression (Zytokine/Chemokine)	Seite 57
19. Ergebnisse der Protein- und Genexpression (VEGFR2)	Seite 59
20. Ergebnisse der Demyelinisierung (Immunhistochemie)	Seite 61
21. Ergebnisse der Olig2(+) Oligodendrozyten (Immunhistochemie)	Seite 62
22. Ergebnisse der P25(+) Oligodendrozyten (Immunhistochemie)	Seite 63
23. Ergebnisse der Protein- und Genexpression (Myelinproteine)	Seite 65
24. Ergebnisse der Genexpression (Myelinproteine)	Seite 66
25. Ergebnisse der Protein- und Genexpression (TrkB/BDNF)	Seite 67
26. Ergebnisse der Genexpression (Myelininhibitoren)	Seite 69
27. Ergebnisse der Proteinexpression (Mitochondrien)	Seite 70
28. Ergebnisse der Genexpression (Mitochondrien)	Seite 71

## 8.2 Tabellenverzeichnis

1. Primäre Antikörper für WB und IHC	Seite 25
2. Sekundäre Antikörper für WB und ICH	Seite 25
3. Primer für die RT-PCR	Seite 26
4. Puffer, Reagenzien und Enzyme	Seite 27
5. Molekularbiologische Kits	Seite 29
6. Verbrauchsmaterialien	Seite 29
7. Laborgeräte	Seite 31
8. Software	Seite 32
9. EAE-Scoring	Seite 37
10. Punkteskala für die Entzündungsaktivität	Seite 44
11. Zusammenfassung der Ergebnisse	Seite 72

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. 000664 - C57BL/6J. Accessed September 22, 2021. <https://www.jax.org/strain/000664>
2. Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, et al. A lymphocyte–microglia–astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. *Nature*. 2021;597(7878):709-714. doi:10.1038/s41586-021-03892-7
3. Amini Harandi A, Siavoshi F, Shirzadeh Barough S, et al. Vascular Endothelial Growth Factor as a Predictive and Prognostic Biomarker for Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation*. 2022;29(4):476-485. doi:10.1159/000525600
4. Amiri H, de Sitter A, Bendfeldt K, et al. Urgent challenges in quantification and interpretation of brain grey matter atrophy in individual MS patients using MRI. *Neuroimage Clin*. 2018;19:466-475. doi:10.1016/j.nicl.2018.04.023
5. Armstrong RC, Le TQ, Frost EE, Borke RC, Vana AC. Absence of fibroblast growth factor 2 promotes oligodendroglial repopulation of demyelinated white matter. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(19):8574-8585. doi:10.1523/jneurosci.22-19-08574.2002
6. Ateaque S, Merkouris S, Barde Y-A. Neurotrophin signalling in the human nervous system. *Front Mol Neurosci*. 2023;16. doi:10.3389/FNMOL.2023.1225373
7. Ateaque S, Merkouris S, Wyatt S, et al. Selective activation and down-regulation of Trk receptors by neurotrophins in human neurons co-expressing TrkB and TrkC. *J Neurochem*. 2022;161(6):463. doi:10.1111/JNC.15617
8. Aytatli A, Barlak N, Sanli F, et al. AZD4547 targets the FGFR/Akt/SOX2 axis to overcome paclitaxel resistance in head and neck cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2022;45(1):41-56. doi:10.1007/S13402-021-00645-6
9. Bache KG, Slagsvold T, Stenmark H. Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J*. 2004;23(14):2707. doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7600292
10. Barcelos IP de, Troxell RM, Graves JS. Mitochondrial Dysfunction and Multiple Sclerosis. *Biology* 2019, Vol 8, Page 37. 2019;8(2):37. doi:10.3390/BIOLOGY8020037
11. Batoulis H, Addicks K, Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. *Ann Anat*. 2010;192(4):179-193. doi:10.1016/J.AANAT.2010.06.006
12. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001;81(2):871-927. doi:10.1152/PHYSREV.2001.81.2.871

13. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(11):904-912. doi:10.1038/NRI2190
14. Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S. Characterization of relapsing–remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia.* 2010;58(4):434-445. doi:10.1002/GLIA.20935
15. Berg R van den, Hoogenraad CC, Hintzen RQ. Axonal transport deficits in multiple sclerosis: spiraling into the abyss. *Acta Neuropathol.* 2017;134(1):1. doi:10.1007/S00401-017-1697-7
16. Bhaskaran S, Kumar G, Thadathil N, et al. Neuronal deletion of MnSOD in mice leads to demyelination, inflammation and progressive paralysis that mimics phenotypes associated with progressive multiple sclerosis. *Redox Biol.* 2023;59. doi:10.1016/J.REDOX.2022.102550
17. Biernacki T, Kokas Z, Sandi D, et al. Emerging Biomarkers of Multiple Sclerosis in the Blood and the CSF: A Focus on Neurofilaments and Therapeutic Considerations. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3383. doi:10.3390/IJMS23063383
18. Blauth K, Soltys J, Matschulat A, et al. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol.* 2015;130(6):765-781. doi:10.1007/s00401-015-1500-6
19. Bö L, Geurts JJG, Mörk SJ, van der Valk P. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2006;183(SUPPL. 183):48-50. doi:10.1111/J.1600-0404.2006.00615.X
20. Bø L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mørk SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62(7):723-732. doi:10.1093/JNEN/62.7.723
21. Bonnan M. Intrathecal IgG synthesis: a resistant and valuable target for future multiple sclerosis treatments. *Mult Scler Int.* 2015;2015:1-15. doi:10.1155/2015/296184
22. Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, et al. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PLoS One.* 2009;4(11). doi:10.1371/journal.pone.0007638
23. Calabrese M, Favaretto A, Martini V, Gallo P. Grey matter lesions in MS From histology to clinical implications. In: *Prion.* Vol 7. ; 2013:20-27. doi:10.4161/pri.22580

24. Calabrese M, Magliozzi R, Ciccarelli O, Geurts JJG, Reynolds R, Martin R. Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(3):147-158. doi:10.1038/nrn3900
25. Campbell G, Mahad DJ. Mitochondrial dysfunction and axon degeneration in progressive multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2018;592(7):1113-1121. doi:10.1002/1873-3468.13013
26. Campbell GR, Worrall JT, Mahad DJ. The central role of mitochondria in axonal degeneration in multiple sclerosis: <http://dx.doi.org/10.1177/1352458514544537>. 2014;20(14):1806-1813. doi:10.1177/1352458514544537
27. Capuano R, Zubizarreta I, Alba-Arbalat S, et al. Oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing MS to inform long-term MS disability. *Multiple Sclerosis Journal*. 2021;27(11):1706-1716. doi:10.1177/1352458520981910
28. Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, et al. Cell-Surface Receptors Transactivation Mediated by G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):19700. doi:10.3390/IJMS151119700
29. Chen S Der, Wu CL, Hwang WC, Yang DI. More insight into BDNF against neurodegeneration: Anti-apoptosis, anti-oxidation, and suppression of autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3). doi:10.3390/ijms18030545
30. Chisari CG, Sgarlata E, Arena S, Toscano S, Luca M, Patti F. Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review. *J Neurol*. 2022;269(1):159. doi:10.1007/S00415-020-10362-Z
31. Chitu V, Gokhan Ş, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER. Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends Neurosci*. 2016;39(6):378-393. doi:10.1016/J.TINS.2016.03.005
32. Choi EH, Xu Y, Medynets M, et al. Activated T cells induce proliferation of oligodendrocyte progenitor cells via release of vascular endothelial cell growth factor-A. *Glia*. 2018;66(11):2503-2513. doi:10.1002/glia.23501
33. Choubey L, Collette JC, Smith KM. Quantitative assessment of fibroblast growth factor receptor 1 expression in neurons and glia. *PeerJ*. 2017;2017(4). doi:10.7717/peerj.3173
34. Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, de Castro F. FGF-2 and anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(42):14899-14909. doi:10.1523/JNEUROSCI.1158-11.2011

35. Collette JC, Choubey L, Smith KM. Glial and stem cell expression of murine fibroblast growth factor receptor 1 in the embryonic and perinatal nervous system. *PeerJ*. 2017;2017(6). doi:10.7717/peerj.3519
36. Crespo O, Kang SC, Daneman R, et al. Tyrosine kinase inhibitors ameliorate autoimmune encephalomyelitis in a mouse model of multiple sclerosis. *J Clin Immunol*. 2011;31(6):1010-1020. doi:10.1007/s10875-011-9579-6
37. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10(APR):726. doi:10.3389/FIMMU.2019.00726
38. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(Suppl 6):s53-s59. doi:10.7861/clinmedicine.16-6-s53
39. Elbaz B, Popko B. Molecular Control of Oligodendrocyte Development. *Trends Neurosci*. 2019;42(4):263. doi:10.1016/J.TINS.2019.01.002
40. Engl C, Tiemann L, Grahl S, et al. Cognitive impairment in early MS: contribution of white matter lesions, deep grey matter atrophy, and cortical atrophy. *J Neurol*. 2020;267(8):2307-2318. doi:10.1007/s00415-020-09841-0
41. Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):312-325. doi:10.1038/s41593-020-00783-4
42. Facchinetti F, Hollebecque A, Bahleda R, et al. Facts and new hopes on selective FGFR inhibitors in solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(4):764-774. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2035
43. Feigin VL, Krishnamurthi R V., Theadom AM, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol*. 2017;16(11):877-897. doi:10.1016/S1474-4422(17)30299-5
44. Fernández-Velasco JI, Kuhle J, Monreal E, et al. Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(2). doi:10.1212/NXI.0000000000000940
45. Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, et al. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain*. 2019;142(7):1858-1875. doi:10.1093/brain/awz144
46. Flajolet M, Wang Z, Futter M, et al. FGF acts as a co-transmitter through Adenosine A2A receptor to regulate morphological and physiological synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2008;11(12):1402. doi:10.1038/NN.2216

47. Flanagan EP, Cabre P, Weinshenker BG, et al. Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. *Ann Neurol.* 2016;79(5):775-783. doi:10.1002/ana.24617
48. Fortin D, Rom E, Sun H, Yayon A, Bansal R. Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *Journal of Neuroscience.* 2005;25(32):7470-7479. doi:10.1523/JNEUROSCI.2120-05.2005
49. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(12):753-769. doi:10.1038/NRN.2017.136
50. Franklin RJM, Simons M. CNS remyelination and inflammation: From basic mechanisms to therapeutic opportunities. *Neuron.* 2022;110(21):3549-3565. doi:10.1016/J.NEURON.2022.09.023
51. Fuhr P, Borggreffe-Chappuis A, Schindler C, Kappos L. Visual and motor evoked potentials in the course of multiple sclerosis. *Brain.* 2001;124(11):2162-2168. doi:10.1093/BRAIN/124.11.2162
52. Fujimori J, Fujihara K, Wattjes M, Nakashima I. Patterns of cortical grey matter thickness reduction in multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2021;11(4). doi:10.1002/brb3.2050
53. Furusho M, Dupree JL, Nave KA, Bansal R. Fibroblast growth factor receptor signaling in oligodendrocytes regulates myelin sheath thickness. *Journal of Neuroscience.* 2012;32(19):6631-6641. doi:10.1523/JNEUROSCI.6005-11.2012
54. Furusho M, Roulois AJ, Franklin RJM, Bansal R. Fibroblast growth factor signaling in oligodendrocyte-lineage cells facilitates recovery of chronically demyelinated lesions but is redundant in acute lesions. *Glia.* 2015;63(10):1714-1728. doi:10.1002/glia.22838
55. Gaetani L, Prosperini L, Mancini A, et al. 2017 revisions of McDonald criteria shorten the time to diagnosis of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *J Neurol.* 2018;265(11):2684-2687. doi:10.1007/s00415-018-9048-8
56. García-González D, Clemente D, Coelho M, Esteban PF, Soussi-Yanicostas N, de Castro F. Dynamic roles of FGF-2 and Anosmin-1 in the migration of neuronal precursors from the subventricular zone during pre- and postnatal development. *Exp Neurol.* 2010;222(2):285-295. doi:10.1016/j.expneurol.2010.01.006
57. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2015;5(9). doi:10.1002/brb3.362

58. Garré JM, Retamal MA, Cassina P, et al. FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(52):22659-22664. doi:10.1073/pnas.1013793107
59. Garré JM, Yang G, Bukauskas FF, Bennett MVL. FGF-1 Triggers Pannexin-1 Hemichannel Opening in Spinal Astrocytes of Rodents and Promotes Inflammatory Responses in Acute Spinal Cord Slices. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(17):4785. doi:10.1523/JNEUROSCI.4195-15.2016
60. Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, et al. AZD4547: An orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res*. 2012;72(8):2045-2056. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3034
61. Giacomini A, Chiodelli P, Matarazzo S, Rusnati M, Presta M, Ronca R. Blocking the FGF/FGFR system as a two-compartment antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy. *Pharmacol Res*. 2016;107:172-185. doi:10.1016/J.PHRS.2016.03.024
62. Giovannoni G, Soelberg Sorensen P, Cook S, et al. Safety and efficacy of cladribine tablets in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Results from the randomized extension trial of the CLARITY study. *Mult Scler*. 2018;24(12):1594-1604. doi:10.1177/1352458517727603
63. Girolamo F, Coppola C, Ribatti D, Trojano M. Angiogenesis in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2(1). doi:10.1186/S40478-014-0084-Z
64. Goh LK, Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5). doi:10.1101/cshperspect.a017459
65. Goldschmidt C, McGinley MP. Advances in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin*. 2021;39(1):21-33. doi:10.1016/j.ncl.2020.09.002
66. Gong SG. Isoforms of Receptors of Fibroblast Growth Factors. *J Cell Physiol*. 2014;229(12):1887-1895. doi:10.1002/JCP.24649
67. Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00374
68. Habek M, Pavičić T, Ruška B, et al. Establishing the diagnosis of multiple sclerosis in Croatian patients with clinically isolated syndrome: 2010 versus 2017 McDonald criteria. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;25:99-103. doi:10.1016/J.MSARD.2018.07.035
69. Hagan N, Kane JL, Grover D, et al. CSF1R signaling is a regulator of pathogenesis in progressive MS. *Cell Death Dis*. 2020;11(10). doi:10.1038/s41419-020-03084-

70. Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-889. doi:10.1038/nature04724
71. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *American Journal of Medicine*. 2020;133(12):1380-1390.e2. doi:10.1016/j.amjmed.2020.05.049
72. Häusler D, Hajjyeva Z, Traub JW, et al. Glatiramer acetate immune modulates B-cell antigen presentation in treatment of MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(3):698. doi:10.1212/NXI.0000000000000698
73. Hemmer B. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen Entwicklungsstufe: S2k 1. Aktualisierung als Living Guideline 2023 Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Published online 2023. Accessed April 6, 2023. [www.awmf.org](http://www.awmf.org)
74. Hemmer B. *Diagnose Und Therapie Der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-Optica-Spektrum-Erkrankungen Und MOG-IgG-Assoziierten Erkrankungen Entwicklungsstufe: S2k Leitlinien Für Diagnostik Und Therapie in Der Neurologie.*; 2021. [www.awmf.org](http://www.awmf.org)
75. Højsgaard Chow H, Schreiber K, Magyari M, et al. Progressive multiple sclerosis, cognitive function, and quality of life. *Brain Behav*. 2018;8(2). doi:10.1002/brb3.875
76. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;64:13-25. doi:10.1016/j.jaut.2015.06.010
77. Holman SP, Lobo AS, Novorolsky RJ, et al. Neuronal mitochondrial calcium uniporter deficiency exacerbates axonal injury and suppresses remyelination in mice subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol*. 2020;333:113430. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113430
78. van Horssen J, Witte ME, Ciccarelli O. The role of mitochondria in axonal degeneration and tissue repair in MS. *Mult Scler*. 2012;18(8):1058-1067. doi:10.1177/1352458512452924
79. Hottenrott T, Schorb E, Fritsch K, et al. The MRZ reaction and a quantitative intrathecal IgG synthesis may be helpful to differentiate between primary central nervous system lymphoma and multiple sclerosis. *J Neurol*. 2018;265(5):1106-1114. doi:10.1007/s00415-018-8779-x

80. Hu XY, Rajendran L, Lapointe E, et al. Three-dimensional MRI sequences in MS diagnosis and research. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;25(13):1700-1709. doi:10.1177/1352458519848100
81. Huntemann N, Vogelsang A, Groeneweg L, et al. An optimized and validated protocol for inducing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice. *J Neurosci Methods*. 2022;367:109443. doi:10.1016/J.JNEUMETH.2021.109443
82. Ingle GT, Sastre-Garriga J, Miller DH, Thompson AJ. Is inflammation important in early PPMS? A longitudinal MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(9):1255-1258. doi:10.1136/jnnp.2004.036590
83. Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R. Role of ERK1/2 MAPK signaling in the maintenance of myelin and axonal integrity in the adult CNS. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(48):16031-16045. doi:10.1523/JNEUROSCI.3360-14.2014
84. Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R. Strength of ERK1/2 MAPK activation determines its effect on myelin and axonal integrity in the adult CNS. *Journal of Neuroscience*. 2016;36(24):6471-6487. doi:10.1523/JNEUROSCI.0299-16.2016
85. Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, Yang G, Wu L. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(6):531-539. doi:10.1038/S41423-019-0221-5
86. Kamali S, Rajendran R, Stadelmann C, et al. Oligodendrocyte-specific deletion of FGFR2 ameliorates MOG35-55-induced EAE through ERK and Akt signalling. *Brain Pathology*. Published online 2021. doi:10.1111/bpa.12916
87. Kanatas P, Stouras I, Stefanis L, Stathopoulos P. B-Cell-Directed Therapies: A New Era in Multiple Sclerosis Treatment. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2023;50(3):355-364. doi:10.1017/CJN.2022.60
88. Kang W, Hébert JM. Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol*. 2011;43(3):147-154. doi:10.1007/s12035-011-8163-7
89. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*. 2018;391(10127):1263-1273. doi:10.1016/S0140-6736(18)30475-6
90. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector t cells in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(4). doi:10.1101/cshperspect.a029025

91. Katoh M. FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). *Int J Mol Med*. 2016;38(1):3-15. doi:10.3892/ijmm.2016.2620
92. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology* 2018 14:10. 2018;14(10):577-589. doi:10.1038/s41582-018-0058-z
93. Khoy K, Mariotte D, Defer G, Petit G, Toutirais O, Le Mauff B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/FIMMU.2020.549842
94. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology*. 2017;27(2):123-137. doi:10.1111/bpa.12454
95. Klimaschewski L, Claus P. Fibroblast Growth Factor Signalling in the Diseased Nervous System. *Mol Neurobiol*. 2021;58(8):3884. doi:10.1007/S12035-021-02367-0
96. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-884. doi:10.1038/nature04723
97. Kopec BM, Kiptoo P, Zhao L, Rosa-Molinar E, Siahaan TJ. Noninvasive Brain Delivery and Efficacy of BDNF to Stimulate Neuroregeneration and Suppression of Disease Relapse in EAE Mice. *Mol Pharm*. 2020;17(2):404-416. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00644
98. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler*. 2015;21(8):1013-1024. doi:10.1177/1352458514568827
99. Kuhlmann T, Lassmann H, Brück W. Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. *Acta Neuropathol*. 2008;115(3):275-287. doi:10.1007/S00401-007-0320-8
100. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2017;133(1):13-24. doi:10.1007/S00401-016-1653-Y
101. Kunkl M, Frascolla S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2020;9(2). doi:10.3390/cells9020482
102. Kurtzke JF. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain*. 2013;136(9):2904-2917. doi:10.1093/brain/awt220

103. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452. doi:10.1212/WNL.33.11.1444
104. Landsteiner K, Chase MW. Experiments on Transfer of Cutaneous Sensitivity to Simple Compounds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1942;49(4):688-690. doi:10.3181/00379727-49-13670
105. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3). doi:10.1101/cshperspect.a028936
106. Lassmann H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10(JAN). doi:10.3389/fimmu.2018.03116
107. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):223-244. doi:10.1007/S00401-016-1631-4
108. Lecler A, Bouzad C, Deschamps R, et al. Optimizing 3D FLAIR to detect MS lesions: pushing past factory settings for precise results. *J Neurol*. 2019;266(11):2786-2795. doi:10.1007/s00415-019-09490-y
109. Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS. Deciphering the role of B cells in multiple sclerosis—towards specific targeting of pathogenic function. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10). doi:10.3390/ijms18102048
110. Leist TP, Weissert R. Cladribine: mode of action and implications for treatment of multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*. 2011;34(1):28-35. doi:10.1097/WNF.0B013E318204CD90
111. Leray E, Yaouanq J, le Page E, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010;133(7):1900-1913. doi:10.1093/brain/awq076
112. LeVine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2016;16(1). doi:10.1186/S12883-016-0564-9
113. Li X. The FGF metabolic axis. *Front Med*. 2019;13(5):511-530. doi:10.1007/s11684-019-0711-y
114. Li X, Wang C, Xiao J, McKeehan WL, Wang F. Fibroblast growth factors, Old kids on the new block. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;53:155-167. doi:10.1016/j.semcdb.2015.12.014
115. Li Y, Li F, Qin D, et al. The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Front Aging Neurosci*. 2022;14. doi:10.3389/fnagi.2022.986443
116. di Liberto V, Mudò G, Belluardo N. Crosstalk between receptor tyrosine kinases (RTKs) and G protein-coupled receptors (GPCR) in the brain: Focus on heteroreceptor complexes and related functional neurotrophic effects.

- Neuropharmacology*. 2019;152:67-77.  
doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2018.11.018
117. Linker RA, Lee DH, Ryan S, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(3):678-692. doi:10.1093/BRAIN/AWQ386
118. Liu X, Mashour GA, Webster HD, Kurtz A. *Basic FGF and FGF Receptor 1 Are Expressed in Microglia During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Temporally Distinct Expression of Midkine and Pleiotrophin*. Vol 24.; 1998.
119. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
120. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, et al. Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(23):2188-2197. doi:10.1056/nejmoa1100648
121. Mabeta P, Steenkamp V. The VEGF/VEGFR Axis Revisited: Implications for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24). doi:10.3390/ijms232415585
122. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):183-193. doi:10.1016/S1474-4422(14)70256-X
123. Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1161. doi:10.1093/BRAIN/AWP046
124. Makar TK, Nimmagadda VKC, Singh IS, et al. TrkB agonist, 7,8-dihydroxyflavone, reduces the clinical and pathological severity of a murine model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2016;292:9-20. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.01.002
125. Manjaly ZM, Harrison NA, Critchley HD, et al. Pathophysiological and cognitive mechanisms of fatigue in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(6):642-651. doi:10.1136/jnnp-2018-320050
126. Marzan DE, Brügger-Verdon V, West BL, Liddelow S, Samanta J, Salzer JL. Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia*. 2021;69(6):1583. doi:10.1002/GLIA.23980
127. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2021;325(8):765-779. doi:10.1001/jama.2020.26858
128. McNamara NB, Munro DAD, Bestard-Cuche N, et al. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature*. 2023;613(7942):120-129. doi:10.1038/s41586-022-05534-y

129. Mentis AFA, Dardiotis E, Grigoriadis N, Petinaki E, Hadjigeorgiou GM. Viruses and endogenous retroviruses in multiple sclerosis: From correlation to causation. *Acta Neurol Scand.* 2017;136(6):606-616. doi:10.1111/ane.12775
130. Mi S, Miller RH, Lee X, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):745-751. doi:10.1038/nn1460
131. Miaczynska M. Effects of membrane trafficking on signaling by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11). doi:10.1101/cshperspect.a009035
132. Michaličková D, Šíma M, Slanař O. New insights in the mechanisms of impaired redox signaling and its interplay with inflammation and immunity in multiple sclerosis. *Physiol Res.* 2020;69:1-19. doi:10.33549/physiolres.934276
133. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front Immunol.* 2015;6(DEC). doi:10.3389/FIMMU.2015.00636
134. Mierzwa AJ, Zhou YX, Hibbits N, Vana AC, Armstrong RC. FGF2 and FGFR1 signaling regulate functional recovery following cuprizone demyelination. *Neurosci Lett.* 2013;548:280-285. doi:10.1016/j.neulet.2013.05.010
135. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* 2013;16(9):1211-1218. doi:10.1038/nn.3469
136. Morrow SA, Conway D, Fuchs T, et al. Quantifying cognition and fatigue to enhance the sensitivity of the EDSS during relapses. *Multiple Sclerosis Journal.* 2021;27(7):1077-1087. doi:10.1177/1352458520973618
137. Murcia-Belmonte V, Medina-Rodríguez EM, Bribián A, de Castro F, Esteban PF. ERK1/2 signaling is essential for the chemoattraction exerted by human FGF2 and human anosmin-1 on newborn rat and mouse OPCs via FGFR1. *Glia.* 2014;62(3):374-386. doi:10.1002/glia.22609
138. Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL. Silencing MicroRNA-155 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology.* 2011;187(5):2213-2221. doi:10.4049/jimmunol.1003952
139. Mycko MP, Baranzini SE. microRNA and exosome profiling in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal.* 2020;26(5):599-604. doi:10.1177/1352458519879303
140. Mycko MP, Cichalewska M, Cwiklinska H, Selmaj KW. miR-155-3p drives the development of autoimmune demyelination by regulation of heat shock protein 40. *Journal of Neuroscience.* 2015;35(50):16504-16515. doi:10.1523/JNEUROSCI.2830-15.2015

141. Mycko MP, Cichalewska M, Machlanska A, Cwiklinska H, Mariasiewicz M, Selmaj KW. MicroRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20). doi:10.1073/pnas.1114325109
142. Na YR, Kim JY, Song CH, et al. The FGFR Family Inhibitor AZD4547 Exerts an Antitumor Effect in Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19). doi:10.3390/IJMS221910817
143. Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016;7(2):27. doi:10.4103/0976-0105.177703
144. Nandi S, Gokhan S, Dai XM, et al. The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev Biol*. 2012;367(2):100. doi:10.1016/J.YDBIO.2012.03.026
145. Nociti V, Romozzi M. The Role of BDNF in Multiple Sclerosis Neuroinflammation. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9). doi:10.3390/IJMS24098447
146. Ochoa-Repáraz J, Kirby TO, Kasper LH. The gut microbiome and multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(6). doi:10.1101/cshperspect.a029017
147. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2012;11(6):535-544. doi:10.1016/S1474-4422(12)70133-3
148. Paredes I, Vieira JR, Shah B, et al. Oligodendrocyte precursor cell specification is regulated by bidirectional neural progenitor–endothelial cell crosstalk. *Nat Neurosci*. Published online 2021. doi:10.1038/s41593-020-00788-z
149. Patel SA, Nilsson MB, Le X, Cascone T, Jain RK, Heymach J V. Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2023;29(1):30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-1366
150. Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4). doi:10.3390/IJMS19041264
151. Pérez-Jeldres T, Alvarez-Lobos M, Rivera-Nieves J. Targeting Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune-Mediated Diseases: Beyond Multiple Sclerosis. *Drugs*. 2021;81(9):985. doi:10.1007/S40265-021-01528-8
152. Ponath G, Park C, Pitt D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9(FEB). doi:10.3389/fimmu.2018.00217
153. Pröbstel AK, Sanderson NSR, Derfuss T. B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16576-16592. doi:10.3390/ijms160716576

154. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:182-191. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.042
155. Proescholdt MA, Jacobson S, Tresser N, Oldfield EH, Merrill MJ. Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflammatory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(10):914-925. doi:10.1093/JNEN/61.10.914
156. Pryce G, Baker D. Oligoclonal bands in multiple sclerosis; Functional significance and therapeutic implications. Does the specificity matter? *Mult Scler Relat Disord.* 2018;25:131-137. doi:10.1016/J.MSARD.2018.07.030
157. Racke MK. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Curr Protoc Neurosci.* 2001;14(1):9.7.1-9.7.11. doi:10.1002/0471142301.NS0907S14
158. Rajendran R, Giraldo-Velásquez M, Stadelmann C, Berghoff M. Oligodendroglial fibroblast growth factor receptor 1 gene targeting protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis through ERK/AKT phosphorylation. *Brain Pathology.* 2018;28(2):212-224. doi:10.1111/bpa.12487
159. Rajendran R, Rajendran V, Giraldo-velasquez M, et al. Oligodendrocyte-specific deletion of fgfr1 reduces cerebellar inflammation and neurodegeneration in mog35-55-induced eae. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17). doi:10.3390/ijms22179495
160. Rasouli J, Casella G, Ishikawa LLW, et al. IFN- $\beta$  Acts on Monocytes to Ameliorate CNS Autoimmunity by Inhibiting Proinflammatory Cross-Talk Between Monocytes and Th Cells. *Front Immunol.* 2021;12:1. doi:10.3389/FIMMU.2021.679498/FULL
161. Ratzka A, Baron O, Grothe C. FGF-2 Deficiency Does Not Influence FGF Ligand and Receptor Expression during Development of the Nigrostriatal System. *PLoS One.* 2011;6(8):23564. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0023564
162. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. Longo DL, ed. *New England Journal of Medicine.* 2018;378(2):169-180. doi:10.1056/NEJMra1401483
163. Riccio P, Rossano R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2018;15(1):75-91. doi:10.1007/s13311-017-0581-4
164. Rigau V, Morin M, Rousset MC, et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2007;130(Pt 7):1942-1956. doi:10.1093/BRAIN/AWM118
165. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:173. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X

166. Roscoe WA, Welsh ME, Carter DE, Karlik SJ. VEGF and angiogenesis in acute and chronic MOG(35-55) peptide induced EAE. *J Neuroimmunol.* 2009;209(1-2):6-15. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.01.009
167. Rottlaender A, Villwock H, Addicks K, Kuerten S. Neuroprotective role of fibroblast growth factor-2 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology.* 2011;133(3):370-378. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03450.x
168. Roy R, Alotaibi AA, Freedman MS. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 2021 35:4. 2021;35(4):385-402. doi:10.1007/S40263-021-00798-W
169. Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, et al. Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell Stem Cell.* 2012;10(1):96-103. doi:10.1016/j.stem.2011.11.019
170. Sadeghian M, Mastrolia V, Haddad AR, et al. Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/SREP33249
171. Saka H, Kitagawa C, Kogure Y, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of the fibroblast growth factor receptor inhibitor AZD4547 in Japanese patients with advanced solid tumours: a Phase I study. *Invest New Drugs.* 2017;35(4):451-462. doi:10.1007/S10637-016-0416-X
172. Sandhya VK, Raju R, Verma R, et al. A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. *J Cell Commun Signal.* 2013;7(4):301-307. doi:10.1007/S12079-013-0200-Z
173. Sanmarco LM, Polonio CM, Wheeler MA, Quintana FJ. Functional immune cell-astrocyte interactions. *Journal of Experimental Medicine.* 2021;218(9). doi:10.1084/jem.20202715
174. Sati P, Oh J, Todd Constable R, et al. The central vein sign and its clinical evaluation for the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement from the North American Imaging in Multiple Sclerosis Cooperative. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(12):714-722. doi:10.1038/nrneurol.2016.166
175. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011;476(7359):214-219. doi:10.1038/nature10251
176. Scalfari A, Lederer C, Daumer M, Nicholas R, Ebers GC, Muraro PA. The relationship of age with the clinical phenotype in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis.* 2016;22(13):1750-1758. doi:10.1177/1352458516630396

177. Scudamore O, Ciossek T. Increased oxidative stress exacerbates  $\alpha$ -synuclein aggregation in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(6):443-453. doi:10.1093/jnen/nly024
178. Seabrook TJ, Littlewood-Evans A, Brinkmann V, Pöllinger B, Schnell C, Hiestand PC. Angiogenesis is present in experimental autoimmune encephalomyelitis and pro-angiogenic factors are increased in multiple sclerosis lesions. *J Neuroinflammation.* 2010;7:95. doi:10.1186/1742-2094-7-95
179. SenthilKumar G, Fisher MM, Skiba JH, et al. FGFR inhibition enhances sensitivity to radiation in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(6):1255-1265. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0931
180. Sentilhes L, Marret S, Leroux P, Gonzalez BJ, Laquerrière A. Vascular-endothelial growth factor and its high affinity receptor VEGFR-2 in the normal versus destructive lesions human forebrain during development: An immunohistochemical comparative study. *Brain Res.* 2011;1385:77-86. doi:10.1016/j.brainres.2011.01.111
181. Sheykhansari S, Kozielski K, Bill J, et al. Redox metals homeostasis in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis: A review review. *Cell Death Dis.* 2018;9(3). doi:10.1038/s41419-018-0379-2
182. Siger M. Magnetic Resonance Imaging in Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients. *Clinical Neuroradiology 2022.* Published online March 8, 2022:1-17. doi:10.1007/S00062-022-01144-3
183. Smith KM, Maragnoli ME, Phull PM, Tran KM, Choubey L, Vaccarino FM. Fgfr1 Inactivation in the Mouse Telencephalon Results in Impaired Maturation of Interneurons Expressing Parvalbumin. *PLoS One.* 2014;9(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0103696
184. Sobhani N, Fassel A, Mondani G, Generali D, Otto T. Targeting aberrant FGFR signaling to overcome CDK4/6 inhibitor resistance in breast cancer. *Cells.* 2021;10(2):1-14. doi:10.3390/cells10020293
185. Sofroniew M v. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(5):249-263. doi:10.1038/nrn3898
186. Sofroniew M v. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(2). doi:10.1101/cshperspect.a020420
187. Spaas J, Veggel L van, Schepers M, et al. Oxidative stress and impaired oligodendrocyte precursor cell differentiation in neurological disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2021;78(10):4615. doi:10.1007/S00018-021-03802-0

188. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiol Rev.* 2019;99(3):1381-1431. doi:10.1152/PHYSREV.00031.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0031929070008.JPEG
189. Stankoff B, Louapre C. Can we use regional grey matter atrophy sequence to stage neurodegeneration in multiple sclerosis? *Brain.* 2018;141(6):1580-1583. doi:10.1093/brain/awy114
190. Stanley ER, Chitu V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(6). doi:10.1101/cshperspect.a021857
191. Study Details | Efficacy and Safety of AZD4547 Versus Paclitaxel in Patients With Advanced Gastric or Gastro-oesophageal Cancer | ClinicalTrials.gov. Accessed May 29, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01457846#study-plan>
192. Su JJ, Osoegawa M, Matsuoka T, et al. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: Correlation with MRI findings. *J Neurol Sci.* 2006;243(1-2):21-30. doi:10.1016/j.jns.2005.11.006
193. Tarlinton RE, Martynova E, Rizvanov AA, Khaiboullina S, Verma S. Role of viruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Viruses.* 2020;12(6). doi:10.3390/v12060643
194. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
195. Tiane A, Schepers M, Rombaut B, et al. From OPC to Oligodendrocyte: An Epigenetic Journey. *Cells.* 2019;8(10). doi:10.3390/CELLS8101236
196. Timmler S, Simons M. Grey matter myelination. *Glia.* 2019;67(11):2063-2070. doi:10.1002/glia.23614
197. Tobore TO. Oxidative/Nitroxidative Stress and Multiple Sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience* 2020 71:3. 2020;71(3):506-514. doi:10.1007/S12031-020-01672-Y
198. Tomassini V, d'Ambrosio A, Petsas N, et al. The effect of inflammation and its reduction on brain plasticity in multiple sclerosis: MRI evidence. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(7):2431-2445. doi:10.1002/hbm.23184
199. Tsouki F, Williams A. Multifaceted involvement of microglia in gray matter pathology in multiple sclerosis. *Stem Cells.* 2021;39(8):993-1007. doi:10.1002/STEM.3374

200. Uemura Y, Ohno H, Ohzeki Y, et al. The selective M-CSF receptor tyrosine kinase inhibitor Ki20227 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2008;195(1-2):73-80. doi:10.1016/J.JNEUROIM.2008.01.015
201. Wallin MT, Culpepper WJ, Campbell JD, et al. The prevalence of MS in the United States: A population-based estimate using health claims data. *Neurology.* 2019;92(10):e1029. doi:10.1212/WNL.0000000000007035
202. Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(3):269-285. doi:10.1016/S1474-4422(18)30443-5
203. Walton C, King R, Rechtman L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal.* 2020;26(14):1816-1821. doi:10.1177/1352458520970841
204. Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS, et al. 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2021;20(8):653-670. doi:10.1016/S1474-4422(21)00095-8
205. Xie Y, Su N, Yang J, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1). doi:10.1038/s41392-020-00222-7
206. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *Nature.* 1992;356(6364):63-66. doi:10.1038/356063a0
207. Yeh BK, Igarashi M, Eliseenkova A v., et al. Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2266. doi:10.1073/PNAS.0436500100
208. Yu T, Yaguchi Y, Echevarria D, Martinez S, Basson MA. Sprouty genes prevent excessive FGF signalling in multiple cell types throughout development of the cerebellum. *Development.* 2011;138(14):2957-2968. doi:10.1242/dev.063784
209. Yuan A, Rao M v., Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(14):3257-3263. doi:10.1242/JCS.104729/-/DC1
210. Zambonin JL, Zhao C, Ohno N, et al. Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134(7):1901. doi:10.1093/BRAIN/AWR110
211. Zeydan B, Kantarci OH. Progressive Forms of Multiple Sclerosis: Distinct Entity or Age-Dependent Phenomena. *Neurol Clin.* 2018;36(1):163-171. doi:10.1016/J.NCL.2017.08.006

212. Zhou B, Zhu Z, Ransom BR, Tong X. Oligodendrocyte lineage cells and depression. *Mol Psychiatry*. 2021;26(1):103-117. doi:10.1038/S41380-020-00930-0
213. Zhou Y, Wang Z, Li J, Li X, Xiao J. Fibroblast growth factors in the management of spinal cord injury. *J Cell Mol Med*. 2018;22(1):25. doi:10.1111/JCMM.13353
214. Zhou YX, Flint NC, Murtie JC, Le TQ, Armstrong RC. Retroviral lineage analysis of fibroblast growth factor receptor signaling in FGF2 inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation. *Glia*. 2006;54(6):578-590. doi:10.1002/glia.20410
215. Zhou YX, Pannu R, Le TQ, Armstrong RC. Fibroblast growth factor 1 (FGFR1) modulation regulates repair capacity of oligodendrocyte progenitor cells following chronic demyelination. *Neurobiol Dis*. 2012;45(1):196-205. doi:10.1016/j.nbd.2011.08.004
216. Zhu X, Lee K, Asa SL, Ezzat S. Epigenetic Silencing through DNA and Histone Methylation of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Neoplastic Pituitary Cells. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1618. doi:10.2353/AJPATH.2007.061111
217. Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1). doi:10.1186/S12974-019-1674-2
218. Zürrer WE, Cannon AE, Ilchenko D, et al. Misdiagnosis and underdiagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. <https://doi.org/10.1177/13524585241274527>. Published online September 8, 2024. doi:10.1177/13524585241274527

## 10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Publikationen

**Gurski, F.**, Shirvanchi, K., Rajendran, V., Rajendran, R., Megalofonou, F.-F., Böttiger, G., Stadelmann, C., Bhushan, S., Ergün, S., Karnati, S., & Berghoff, M. (2024). Anti-inflammatory and remyelinating effects of fexagratinib in experimental multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 1–20. <https://doi.org/10.1111/bph.17341>

Rajendran, R., Rajendran, V., Giraldo-Velasquez, M., Megalofonou, F. F., **Gurski, F.**, Stadelmann, C., Karnati, S., & Berghoff, M. (2021). Oligodendrocyte-Specific Deletion of FGFR1 Reduces Cerebellar Inflammation and Neurodegeneration in MOG<sub>35-55</sub>-Induced EAE. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9495. <https://doi.org/10.3390/ijms22179495>

### Poster

Annual Meeting der American Academy of Neurology, Denver, CO, USA, April 2024: Shirvanchi, K., **Gurski, F.**, Rajendran, V., Rajendran, R., Megalofonou, FF., Stadelmann, C., Karnati, S. & Berghoff, M. The multi-kinase inhibitor AZD4547 decreases inflammation and neurodegeneration, and enhances remyelination in a mouse model of multiple sclerosis.

### Poster Vortrag

Science Day der Justus-Liebig-Universität Gießen, Oktober 2021: **Gurski, F.**, Rajendran, R. & Berghoff M. Effects of multi-kinase inhibitor with AZD4547 on experimental autoimmune encephalomyelitis model in mice.

### Wöchentliche Vorträge

Arbeitsgruppe im Forschungszentrum Medizin (ForMED) der Justus-Liebig-Universität Gießen.

## 11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/Datum

---

Unterschrift