

**Prävention einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis
durch den Multikinase-Inhibitor Fexagratinib**

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

vorgelegt von Shirvanchi, Kian
aus Herdecke

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Experimentelle Neurologie

Gutachter: Prof. Dr. Martin Berghoff

Gutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner

Tag der Disputation: 09. Dezember 2025

Sage, was du weißt,
tue, was du musst,
geschehe, was geschehen soll.

Sofja Wassiljewna Kowalewskaja, erste Professorin für Mathematik

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	MULTIPLE SKLEROSE	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2	<i>Ätiologie</i>	3
1.1.3	<i>Pathophysiologie</i>	4
1.1.4	<i>Pathologie</i>	5
1.1.5	<i>Verlaufsformen der MS</i>	7
1.1.6	<i>Symptome</i>	7
1.1.7	<i>Diagnostik</i>	8
1.1.8	<i>Therapie</i>	9
1.1.9	<i>Prognostische Faktoren</i>	11
1.2	EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS	12
1.3	SIGNALKASKADE	14
1.3.1	<i>Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs)</i>	14
1.3.2	<i>Funktion der FGFs</i>	15
1.3.3	<i>Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR)</i>	15
1.3.4	<i>FGF/FGFR-Signalkaskade</i>	16
1.3.5	<i>FGF/FGFR-Signalkaskade im ZNS</i>	18
1.3.6	<i>FGF/FGFR-Signalkaskade in MS und EAE</i>	19
1.3.7	<i>VEGF/VEGFR-Signalkaskade im ZNS sowie in MS und EAE</i>	20
1.3.8	<i>CSF1R-Signalkaskade</i>	21
1.3.9	<i>FGF/FGFR-Inhibitoren</i>	22
1.3.10	<i>VEGFR- und CSF1R-Inhibitoren</i>	23
1.4	DER MULTIKINASE-INHIBITOR FEXAGRATINIB	24
2	ZIELE	27
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	MATERIAL	28
3.1.1	<i>Antikörper</i>	28
3.1.2	<i>Primer</i>	29
3.1.3	<i>Kits</i>	30
3.1.4	<i>Chemikalien</i>	31
3.1.5	<i>Puffer</i>	32
3.1.6	<i>Herstellung von Trenn- und Sammelgelen</i>	33
3.1.7	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	33
3.1.8	<i>Laborinstrumente</i>	34
3.1.9	<i>Software</i>	35

3.2	METHODEN.....	37
3.2.1	<i>Tierversuch</i>	37
3.2.2	<i>Proteinanalyse</i>	43
3.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	48
3.2.4	<i>Histopathologie und Immunhistochemie</i>	52
3.2.5	<i>Statistische Analyse</i>	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	DER ERKRANKUNGSVERLAUF DER EAE.....	56
4.1.1	<i>Der Erkrankungsverlauf der EAE nach Gabe des Placebopräparates</i>	56
4.1.2	<i>Der EAE-Erkrankungsverlauf nach Gabe von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib</i>	56
4.1.3	<i>Der EAE-Erkrankungsverlauf nach Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib</i>	57
4.1.4	<i>Der EAE-Erkrankungsverlauf nach Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich</i>	58
4.2	GEWICHTSVERÄNDERUNGEN NACH GABE VON FEXAGRATINIB.....	60
4.3	IMMUNHISTOCHEMIE.....	61
4.3.1	<i>Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib führt zur Verringerung der Anzahl infiltrierter Immunzellen</i>	61
4.3.2	<i>Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib bewirkt eine Reduktion der Demyelinisierung und erhöht die axonale Dichte in Läsionen</i>	64
4.3.3	<i>Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhöht die Anzahl adulter Oligodendrozyten in Läsionen</i>	67
4.4	PROTEINEXPRESSION.....	70
4.4.1	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die FGF/FGF-Signalkaskade</i>	70
4.4.2	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf pERK und pAkt</i>	70
4.4.3	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die VEGF/VEGFR2-Signalkaskade und CSF1R</i>	71
4.4.4	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf TrkB und BDNF</i>	71
4.4.5	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf Komponenten der Myelinscheide</i>	74
4.4.6	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf mitochondriale Proteine</i>	75
4.4.7	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf CD200</i>	76
4.4.8	<i>Zusammenfassung der Untersuchung der Proteinexpression</i>	76
4.5	GENEXPRESSION.....	78
4.5.1	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression der FGF/FGFR-Signalkaskade</i>	78
4.5.2	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Bdnf und Trkb</i>	78
4.5.3	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Inhibitoren der Remyelinisierung</i> 79	79
4.5.4	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Myelinbestandteilen</i>	79
4.5.5	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Zyto- und Chemokinen</i>	80
4.5.6	<i>Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von CX3CL/CX3CR-Signalkaskade</i>	81
4.5.7	<i>Zusammenfassung der Untersuchung der Genexpression</i>	82

5	DISKUSSION	83
5.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	83
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	84
5.2.1	<i>Fexagratinib schwächt den klinischen Verlauf der EAE ab.....</i>	84
5.2.2	<i>Fexagratinib verhindert den Gewichtsverlust von Versuchstieren</i>	85
5.2.3	<i>Fexagratinib reduziert die Infiltration von Immunzellen in das ZNS.....</i>	85
5.2.4	<i>Wie Fexagratinib die Infiltration von Immunzellen in Läsionen reduziert</i>	87
5.2.5	<i>Fexagratinib erhöht die Anzahl von Oligodendrozyten.....</i>	91
5.2.6	<i>Fexagratinib übt keinen Einfluss auf die Expression von Myelinproteinen oder Remyelinisierungsinhibitoren aus.....</i>	93
5.2.7	<i>Fexagratinib reduziert die Demyelinisierung und schützt vor Neurodegeneration.....</i>	94
5.2.8	<i>Modulation der FGF/FGFR-, VEGF/VEGFR2- und CSF1R-Signalkaskaden</i>	95
5.2.9	<i>Fexagratinib bewirkt Neuroprotektion nicht über die Modulation von Mitochondrien.....</i>	97
5.3	METHODENDISKUSSION.....	98
5.3.1	<i>Die EAE als Tiermodell der MS.....</i>	98
5.3.2	<i>Ausblick</i>	99
6	ZUSAMMENFASSUNG	101
7	SUMMARY	102
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	105
10	TABELLENVERZEICHNIS	106
11	LITERATURVERZEICHNIS.....	107
12	ANHANG	122
13	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	123
14	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	124
15	DANKSAGUNG	125

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie

1.1.1.1 Häufigkeit

Mit einer Anzahl von etwa 2,8 Millionen betroffenen Menschen stellt die Multiple Sklerose (MS), eine chronisch inflammatorische und neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), eine der häufigsten Erkrankungen weltweit dar.¹⁶² Dies entspricht einer Prävalenz von etwa 39,5/100,000 Personen.¹⁶² Die Inzidenz belief sich im Jahr 2020 global betrachtet auf etwa 2,1/100,000 Personen/Jahr.¹⁶² Interessant ist hierbei die ungleiche geographische Verteilung: Häufiger betroffen sind Menschen aus Nordamerika, Europa und Australien (> 100/100,000 Personen), weniger betroffen sind insbesondere südostasiatische und subsaharische afrikanische Länder.^{69,87,162} Doch auch innerhalb der genannten Kontinente besteht eine hohe Variabilität der Prävalenz. Innerhalb Europas besteht ein Nord-Süd-Gefälle im Sinne einer höheren Prävalenz in nordeuropäischen bzw. einer niedrigeren Prävalenz in südeuropäischen Ländern (Abbildung 1).⁸⁷ Bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts ist die Inzidenz der MS über die letzten 70 Jahre weltweit stetig angestiegen, wobei auch die erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber der Erkrankung, die bessere medizinische Versorgung, die erhöhte Anzahl des ärztlichen Personals sowie die ständige Optimierung und breitere Verfügbarkeit bildgebender Verfahren berücksichtigt werden müssen.⁷⁹ Die Prävalenz der MS in Deutschland wird gegenwärtig auf 102-143/100.000 Personen geschätzt, wobei Frauen etwa 2,5 mal häufiger als Männer betroffen sind.⁶⁷ Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 35 Jahre.⁶⁷

1.1.1.2 Schwere

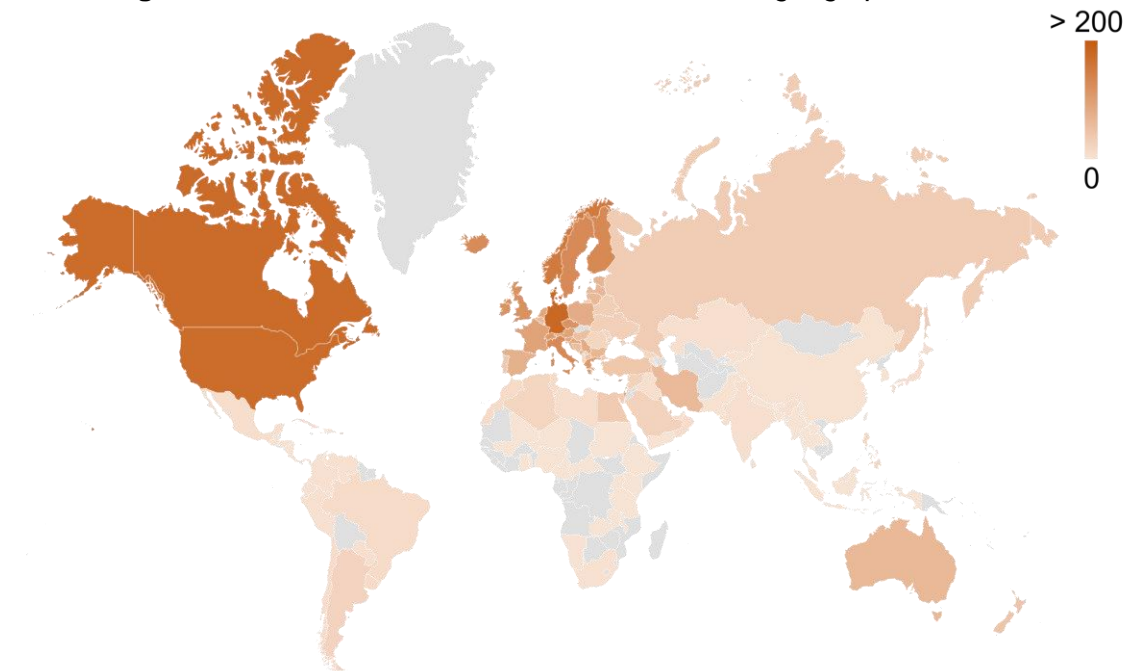
Die MS ist die häufigste neurologische Erkrankung, die bei jungen Menschen zu einer Behinderung führt.²⁴ Die Zeit zwischen der Erstdiagnose einer schubförmig-remittierenden MS und dem Eintreten einer Behinderung, die die Nutzung einer Gehhilfe erforderlich macht, liegt im Median bei 15 - 20 Jahren.¹⁴² 25 Jahre nach der Diagnosestellung benötigen etwa 50 % aller Betroffenen einen Rollstuhl.²⁸ Die derzeitigen, rein immunmo-

dulierenden bzw. immunsuppressiven, Therapieoptionen ermöglichen keine ausreichende Verhinderung der Progression der MS.²⁸ Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass der Anteil an Erkrankten mit Behinderung im Laufe des 20. Jahrhunderts unverändert blieb.¹⁴² Der Beginn der Erkrankung fällt bei vielen Betroffenen mit entscheidenden Berufs- und Familienplanungen zusammen, sodass zusätzlich erhebliche psychosoziale und ökonomische Belastungen entstehen können.²⁸

1.1.1.3 Ökonomische Belastung

Eine Analyse zu den ökonomischen Belastungen durch die MS aus dem Jahr 2017 ergab, dass sich die durch MS verursachten direkten (unmittelbare Krankheitskosten durch ärztliche Versorgung, Rehabilitation, Pflege etc.) und indirekten Kosten (wirtschaftliche Ausfälle durch Krankheitsausfälle, Berufsunfähigkeit oder Frühberentung) in Deutschland auf 28.200 - 62.700 € pro erkrankter Person und Jahr beliefen.³⁶

Abbildung 1 Prävalenz der MS hinsichtlich der geographischen Verteilung



Eigene Darstellung nach Grafik und Daten des *Atlas of MS*.¹⁰⁴ Abgebildet wird die Prävalenz der MS bezogen auf 100.000 Personen. Menschen aus Nordamerika, Europa und Australien sind häufiger, Menschen aus subsaharischen und südostasiatischen Ländern weniger betroffen. Grau hinterlegte Länder stellen fehlende Daten dar.

1.1.2 Ätiologie

Die MS ist eine chronisch inflammatorische und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, deren genaue Ursache bis heute nicht bekannt ist.²⁸ Es wird ein Zusammenspiel genetischer Faktoren und Umweltfaktoren angenommen, welches diverse immunologische Reaktionen nach sich zieht.²⁸ Die MS wird häufig als eine autoimmun verursachte Erkrankung verstanden, da die periphere Initiierung der MS durch Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch ein bisher unbekanntes Antigen eine gängige Theorie darstellt.²⁸ Gemäß dieses Modells gelangen Immunzellen nach peripherer Aktivierung über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins ZNS und verursachen dort Entzündungen.²⁸ Seit geraumer Zeit wird jedoch diskutiert, ob die Infiltration von Immunzellen in das ZNS die primäre Ursache ist (sog. „*outside-in*“-Hypothese), oder nicht eher einen sekundären Prozess darstellt, der durch unbekannte Vorgänge innerhalb des ZNS verursacht wird, beispielsweise durch Schädigung von Oligodendrozyten und Myelinscheiden (sog. „*inside-out*“-Hypothese).^{28,155,168} So kann bspw. eine Schädigung von Oligodendrozyten und Myelinscheiden bei MS-Betroffenen ohne bestehende Inflammation nachgewiesen werden.¹⁵⁵

1.1.2.1 Risikofaktoren

Es sind diverse genetische Prädispositionen bekannt, die im Zusammenhang mit der Entstehung der MS im Sinne einer direkten Aktivierung autoreaktiver Immunzellen oder einer allgemeinen Herabsetzung der Schwelle für deren Aktivierung stehen.²⁸ Hierzu zählen u. a. Veränderungen im Bereich der genetischen Sequenzen, die für den Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor 1 und Proteine der Signalkaskade von Interleukin-2 (IL-2), Interferonen (IFN) und des *nuclear factor-κB* (NF-κB) kodieren („*non-HLA*“).²⁸ Außerdem scheinen Polymorphismen der Genloci HLA-A*02:01 und HLA-DRB1*15:01 eine Rolle einzunehmen.²⁸ Darüber hinaus sind diverse Umwelteinflüsse bekannt, die in die Pathogenese der MS eingebunden zu sein scheinen.²⁸ Mikrobielle und virale Umweltfaktoren könnten durch molekulares Mimikry eine direkte Aktivierung autoreaktiver Immunzellen herbeiführen oder die Schwelle der Aktivierung herabsetzen.²⁸ Zu möglicherweise ursächlichen Umweltfaktoren zählen insbesondere das Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie das Rauchen, aber, neben vielen weiteren Faktoren, auch das Humane Zytomegalie-Virus (CMV), Vitamin-D-Mangel und Störungen des zirkadianen Rhythmus.²⁸ Eine Infektion mit EBV erhöht beispielsweise das Risiko, an einer MS zu erkranken, um das 32-fache.¹¹

1.1.3 Pathophysiologie

In der MS bewirken infiltrierte und ZNS-residente Immunzellen durch direkten Zellkontakt sowie der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und neurotoxischen Substanzen eine Inflammation des ZNS.²⁸ Diese zieht die Zerstörung von Oligodendrozyten, Demyelinisierung, Gliose und Neurodegeneration nach sich und mündet letztlich in der (Zer-)Störung der neuronalen Signalvermittlung.²⁸ Inflammation bedeutet Entzündung und bezeichnet im Kontext der MS die Infiltration von Immunzellen.⁸⁴

Es sind zahlreiche Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in die Pathogenese der MS verstrickt, die durch multizelluläres Zusammenspiel ein enorm komplexes Gebilde darstellen, sodass eine exakte Darstellung der Pathogenese der MS bisher nicht möglich ist.²⁸ Zu den wichtigsten infiltrierenden Zellen gehören CD8+ T-Zellen, CD4+ T-Helferzellen 1 und 17 (Th1 bzw. Th17), B-Zellen, Monozyten und Makrophagen.^{28,145}

Autoreaktive T- und B-Zellen werden in der Peripherie durch Autoantigenpräsentation, Erkennung eines aus dem ZNS abgesonderten Antigens, molekulares Mimikry oder By-standeraktivierung (antigen-unspezifische Aktivierung von T- und B-Zellen, u. a. durch Aktivierung von Korezeptoren, Zyto- und Chemokinen)¹¹² aktiviert.²⁸ Ein spezifisches, die MS auslösendes Autoantigen, ist jedoch nicht bekannt.²⁸ Molekulares Mimikry beschreibt das Konzept, in dem autoreaktive CD4+ T-Zellen durch kreuzreaktive exogene Antigene, bspw. Virusbestandteile, aktiviert werden und kann u. a. die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) auslösen.¹⁴⁵ Die Autoreaktivität der T- und B-Zellen bedingt allerdings eine Dysregulation des Immunsystems, bei der regulatorische T-Zellen (Tregs), die immunsuppressiv wirken, und/oder die Empfänglichkeit von B- und T-Zellen auf immunsuppressive Signale inhibiert sind.²⁸

Zu den CD4+ T-Helferzellen, die in der Pathogenese der MS involviert sind, gehören die Th1 und Th17 Zellen.^{4,28,145} Beide sind an der Aktivierung und Differenzierung von infiltrierenden Monozyten, Makrophagen und Mikroglia beteiligt und attackieren Astrozyten.⁴ Die Myelinproteine basisches Myelinprotein (*myelin basic protein*, MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und Proteolipid-Protein (PLP) sind die Hauptangriffspunkte von CD4+ Th-Zellen.⁴ Th17-Zellen ermöglichen zudem die erhöhte Permeabilität der BHS und tragen so indirekt zur Neuroinflammation bei.⁴ CD8+ T-Zellen sind der dominierende Zelltyp in MS-Läsionen, werden in der Peripherie durch Präsentation von ZNS-Antigenen oder kreuzreaktiven Peptiden aktiviert und aktivieren nach Überque-

ren der BHS wiederum Makrophagen, Mikroglia, dendritische Zellen und Astrozyten.^{4,28,145} Darüber hinaus wirken sie zytotoxisch und können über die MHC-I-Expression von Neuronen direkt neuroaxonalen Schaden verursachen.^{4,74,161}

B-Zellen aktivieren CD4+ T-Zellen auch in Abwesenheit von Antigenen, produzieren Antikörper und können als neurotoxische B-Zellen in der MS fungieren.⁴ Sie gehören außerdem zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und sind daher in der Lage, T-Zellen zu aktivieren.^{145,168} Sie reifen außerhalb des ZNS heran und können sich in *meningealen Lymphoidfollikeln* nach Infiltration des ZNS formieren.^{28,145} Es ist bislang noch ungeklärt, ob sich die von B-Zellen gebildeten Antikörper gegen spezifische Myelinproteine richten oder ein sekundäres Phänomen in der MS-Pathogenese darstellen.¹⁶⁸

Monozyten, Makrophagen und Mikroglia sind myeloide Zellen und gehören dem angeborenen Immunsystem an.⁴ Monozyten können Zelldebris phagozytieren oder chemotaktisch in Gewebe migrieren, wo sie sich in Makrophagen oder in der Antigenpräsentation dienenden dendritische Zellen differenzieren.⁴

ZNS-assoziierte Makrophagen befinden sich nicht direkt im Parenchym, sondern in den Meningen, dem Choroidplexus und perivaskulär.¹²² Makrophagen gelten als hauptverantwortliche Zellen für die Demyelinisierung, phagozytieren Myelindebris und sind außerdem dazu imstande, reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) zu sezernieren.^{4,145,170}

Mikroglia sind geweberesidente Makrophagen des ZNS und erhalten in adulten Lebewesen die Homöostase durch Phagozytose apoptotischer Zellen und nicht-funktionaler Synapsen, schützen als Immunzellen vor bzw. während viraler Infektionen und sind darüber hinaus wichtig für das Überleben und die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPCs).^{13,61} Die Rolle der Mikroglia in der MS und EAE ist außerordentlich komplex: Einerseits bilden Mikroglia durch anhaltende Aktivierung einen proinflammatorischen Phänotyp aus und inhibieren die Differenzierung von OPCs, andererseits können sie während der Remyelinisierung proregenerativ wirken.¹³

1.1.4 Pathologie

Die klassischen pathologischen Korrelate der MS sind Inflammation (vgl. 1.1.3 Pathophysiologie), Demyelinisierung und Neurodegeneration, auf die nun kurz eingegangen wird.⁸⁴

1.1.4.1 Demyelinisierung

Demyelinisierung bezeichnet den Verlust von Myelin und resultiert aus einer Schädigung von Myelinscheiden oder Oligodendrozyten.¹⁴⁶ Sie wird hauptsächlich durch Makrophagen, aber auch durch lösliche Faktoren, Zytokine, direkte Zell-Zell-Kontakte, ROS und reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) von T- und B-Zellen induziert.²⁶ Es ist unklar, ob diese Makrophagen durch infiltrierte Immunzellen zur Schädigung von Myelinscheiden stimuliert werden oder auf einen primären Schaden der Oligodendrozyten reagieren.^{84,121}

1.1.4.2 Definition des Begriffs „MS-Läsion“

MS-Läsionen sind demyelinisierte Regionen im ZNS und werden in aktiv, chronisch-aktiv und chronisch-inaktiv eingeteilt.¹⁶⁸ Akute Läsionen sind durch Immunzellinfiltration, Demyelinisierung und Apoptose von Oligodendrozyten gekennzeichnet.¹⁶⁸ An der Demyelinisierung sind viele MHC-II-exprimierende Zellen beteiligt.¹⁶⁸ Chronische Läsionen sind durch eine geringe Zelldichte und Gliazellen gekennzeichnet.¹⁶⁸ Als chronisch-aktive Läsionen werden solche bezeichnet, deren Rand inflammatorische Aktivität aufweist.¹⁶⁸ Hier finden sich aktivierte Mikroglia, Makrophagen, reaktive Astrozyten und häufig auch Remyelinisierung wieder.¹⁶⁸ Chronisch inaktive Läsionen weisen typischerweise keine Remyelinisierung oder Anwesenheit von OPCs auf und gehen häufig mit einem kompletten Verlust an Oligodendrozyten einher.¹⁶⁸ Die normal-erscheinende weiße Substanz (*normal appearing white matter*, NAWM) beschreibt die weiße Substanz außerhalb von Läsionen.¹⁶⁸ Diese ist allerdings nicht „normal“, da sie ebenso immunpathologische Charakteristika, insb. bei der progredienten MS, aufweist.¹⁶⁸ MS-Läsionen sind nicht auf die weiße Substanz beschränkt, sondern treten auch in der grauen Substanz, insb. bei der progredienten MS, auf.¹⁶⁸ Charakteristischerweise zeigen sich hier weniger Immunzellinfiltrate, Destruktionen der BHS und Komplementreaktionen.¹⁶⁸

1.1.4.3 Neurodegeneration

Neurodegeneration bezeichnet den Verlust von Axonen durch Zerstörung dieser und korreliert stark mit der zunehmenden Behinderung der MS.⁴⁷ Sie gilt als pathologisches Merkmal der späteren MS, ist jedoch schon zu Beginn der Erkrankung präsent. Inflammation und Demyelinisierung tragen zwar zur Neurodegeneration bei, allerdings hängt die Progredienz der Erkrankung nicht von der Anzahl der Schübe und somit nicht von der Immuntherapie ab.⁴⁷ Zudem tritt Neurodegeneration in der NAWM auf, weshalb sie teilweise unabhängig von Demyelinisierung verlaufen muss.⁴⁷ Inflammation scheint die

Neurodegeneration zu initiieren und chronische Inflammation im Sinne meningealer Lymphozyten, Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten führt durch ROS, RNS, Hypoxie und Glutamat zu oxidativem Zellstress, Schädigung von Mitochondrien und Calcium-Einstrom, welche wiederum Energiedefizite und Ionenkanaldysfunktionen und somit die Anschwellung von Axonen, Apoptose und Nekrose bewirken.^{28,47} Neurodegeneration darf demnach nicht einzig als direkte Konsequenz einer peripheren Autoimmunreaktion verstanden werden.²⁸ Deshalb müssen neue Therapien der MS beide Wege, also die periphere Immunzellreaktion und die ZNS-intrinsische Inflammation, attackieren.²⁸

1.1.5 Verlaufsformen der MS

Die MS wird in die schubförmig-remittierende (*relapsing-remitting MS*, RRMS), die sekundär progrediente (SPMS) und die primär progrediente MS (PPMS) eingeteilt.⁶⁵ Diese werden nochmals hinsichtlich ihrer Aktivität (neue Schübe oder Läsionen) und ihrer Progression unterschieden.⁶⁵ Die RRMS ist durch Schübe mit kompletter oder inkompletter Remission charakterisiert.⁶⁵ Die SPMS entsteht aus einer RRMS und ist durch eine Behinderungsprogression mit oder ohne zusätzliche Schübe gekennzeichnet.⁶⁵ Die PPMS hingegen weist von Beginn an eine Behinderungsprogression auf.⁶⁵ In Deutschland sind von allen MS-Erkrankten etwa 85% von der RRMS und 15% von der PPMS betroffen.⁶⁵ Nach 25 Jahren haben etwa 50% aller RRMS-Betroffenen eine SPMS entwickelt.⁶⁵ Als Schub wird hierbei das Auftreten neuer oder eine Reaktivierung bereits zuvor aufgetretener neurologischer Symptome definiert, die mindestens 24 Stunden anhalten, eine Latenzzeit von mindestens 30 Tagen zum Beginn vorheriger Schübe aufweisen und nicht auf einer Änderung der Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen), Infektionen oder etwaige andere physische oder organische Ursachen zurückzuführen sind.⁶⁵

1.1.6 Symptome

Symptome werden in der MS durch Demyelinisierung und axonale Degeneration hervorgerufen, wodurch sich Betroffene mit einer Vielzahl an Symptomen präsentieren können.^{65,95}

Zu den klassischen Symptomen eines Schubes gehören Visusstörungen infolge einer Retrobulbärneuritis, zerebrale Syndrome (Hypästhesie, Paresen, kognitive Defizite), zerebelläre Syndrome (Tremor, Dysarthrie) sowie Hirnstammsyndrome (intranukleäre Ophthalmoplegie, Schwindel, Dysarthrie, Dysphagie) und die partielle Myelitis (Hypästhesie, Paresen, Ataxie).^{24,65} Spastiken, Gangstörungen, Ataxie, Tremor, Sensibilitäts-

störungen, Fatigue, kognitive Einschränkungen, Sexualstörungen, neurogene Dysfunktionen des unteren Harntrakts, Darmfunktionsstörungen, Augenbewegungsstörungen, Visusstörungen, Schmerzen, Dysarthrie, Dysphagie, Depression und epileptische Anfälle stellen Symptome im Krankheitsverlauf dar.^{65,95} Als elektrisierend wahrgenommene Parästhesien entlang der Wirbelsäule bei Flexion des Kopfes werden als Lhermitte-Zeichen bezeichnet, die durch die erhöhte mechanische Sensibilität von demyelinisierten Neuronen entstehen.²⁴

1.1.7 Diagnostik

Zur Diagnosestellung der MS sind zwei Bedingungen zu erfüllen. Zunächst einmal handelt es sich bei der MS um eine Ausschlussdiagnose, sodass keine bessere Erklärung für die Symptome bestehen darf.⁶⁵ Zweitens müssen die sogenannten McDonald-Kriterien 2017 erfüllt sein, welche die erforderliche zeitliche und räumliche Dissemination von Läsionen überprüfen (Tabelle 1 und Tabelle 2).^{65,95}

Tabelle 1 McDonald-Kriterien 2017 für die Diagnose einer schubförmigen MS

Zahl der Schübe	Objektive Läsionen	Zusätzlich erforderliche Kriterien
≥ 2	≥ 2	keine
≥ 2	1	räumliche Dissemination
1	≥ 2	zeitliche Dissemination
1	1	räumliche und zeitliche Dissemination

Tabelle nach ^{65,95}. Die *räumliche Dissemination* wird durch einen weiteren Schub mit klinischer Präsentation, die eine Läsion in einem anderen anatomischen Bereich impliziert **oder** einen MRT-Befund von T2-hyperintensiven Läsionen in mind. zwei der MS-typischen vier Areale (periventrikulär, kortikal/juxtakortikal, infratentoriell oder spinal) nachgewiesen.^{65,95} Die *zeitliche Dissemination* wird durch simultan bestehende Gadolinium-aufnehmende und nicht Gadolinium-aufnehmende Läsionen im MRT **oder** eine neue T2-hyperintense Läsion nachgewiesen **oder** oligoklonale Banden nachgewiesen.^{65,95} Gadolinium-aufnehmende Läsionen gelten als akute, nicht Gadolinium-aufnehmende Läsionen als chronische Läsionen.^{65,95} Ihr simultanes Auftreten weist daher auf eine bereits länger bestehende MS hin. Hinsichtlich des radiologischen Nachweises der Läsionen spielt es keine Rolle, ob diese symptomatisch oder asymptomatisch sind.^{65,95} Die McDonald-Kriterien werden gegenwärtig überarbeitet, die finale Version ist jedoch noch nicht publiziert.²⁹

Tabelle 2 McDonald-Kriterien 2017 für die Diagnose einer primär-progredienten MS

Klinische Progression für mindestens ein Jahr (prospektiv oder retrospektiv)
und zwei der folgenden Kriterien:

- a** mind. eine T2-hyperintense Läsion in mindestens einem der Areale periventrikulär, kortikal/juxtakortikal oder infratentoriell
 - b** mind. zwei T2-hyperintense Läsionen spinal
 - c** Nachweis liquorspezifischer oligoklonaler Banden
-

Tabelle nach ^{65,95}. Hinsichtlich des radiologischen Nachweises der Läsionen spielt es keine Rolle, ob diese symptomatisch oder asymptomatisch sind.

Als klinisch isoliertes Syndrom wird ein Schub mit einem neurologischen Defizit bezeichnet, der mit einer MS vereinbar ist, bei dem aufgrund fehlender zeitlicher Dissemination die Diagnosekriterien nicht jedoch nicht erfüllt sind.⁶⁵ Neben der klinisch-neurologischen Untersuchung und der Aufnahme eines kranialen und spinalen MRT-Bildes sollten eine Liquoruntersuchung und aus differentialdiagnostischen Gründen eine Borrelien und Lues-Serologie, eine Untersuchung auf die intrathekale Synthese von Antikörpern gegen Masern-, Röteln- und Varizella-Zoster-Viren und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden.⁶⁵

1.1.8 Therapie

1.1.8.1 Therapie des MS-Schubs

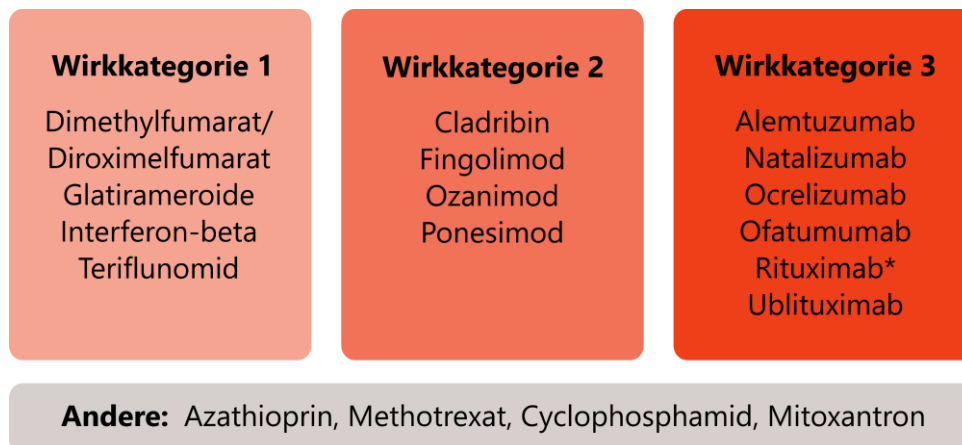
Die intravenöse Applikation von 500-1000 mg Methylprednisolon pro Tag über 3-5 Tage gilt als Goldstandard der MS-Schubtherapie.⁶⁵ Bei unzureichender Wirkung und einem alltagsrelevanten neurologischen Defizit sollte eine Eskalation der Schubtherapie erwogen werden, die mittels intravenöser Applikation von bis zu 2000 mg Methylprednisolon pro Tag über 3-5 Tage durchgeführt wird.⁶⁵ Zudem kann eine Plasmapherese oder eine Immunadsorption durchgeführt werden.⁶⁵

1.1.8.2 Immuntherapie

Bei Personen mit einem klinisch-isolierten Syndrom oder einer MS ist die Durchführung einer Immuntherapie indiziert.⁶⁵ In Deutschland sind zahlreiche Medikamente zur Therapie der RRMS zugelassen. Diese werden als *Immuntherapeutika* bezeichnet und beeinflussen den Krankheitsverlauf der MS durch Modulation des Immunsystems. In der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) werden diese nach

der relativen Reduktion der entzündlichen Aktivität aufsteigend in drei Kategorien eingeteilt (Abbildung 2).⁶⁵ Ein weiterer Therapieansatz ist die autologe Stammzelltransplantation, die zwar hochwirksam zu sein scheint, aber nur unter spezifischen Bedingungen durchgeführt wird.⁶⁵

Abbildung 2 Einteilung von Immuntherapeutika für die schubförmige MS



Eigene Darstellung nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.⁶⁵ Alphabetische Sortierung. *off-label use. Interferon-beta ist ein Typ-I-Interferon und wirkt antiviral, antiproliferativ und immunmodulierend.⁶⁵ Die Wirkungsweise bei der MS ist nicht bekannt.⁶⁵ Glatirameramide setzen sich aus vier Aminosäuren zusammen; auch ihre Wirkweise in der MS ist ungeklärt.⁶⁵ Dimethylfumarat und Diroximelfumarat sind Fumarsäurederivate, die die Zusammensetzung und Migration von Immunzellen beeinflussen.⁶⁵ Teriflunomid inhibiert die De-Novo-Synthese von Pyrimidin.⁶⁵ Fingolimod, Ozanimod und Ponesimod sind Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1PR)-Modulatoren und inhibieren den Austritt von Lymphozyten aus dem lymphatischen System.⁶⁵ Cladribin ist ein Purinnukleosid-Analagon und wirkt durch Inhibition der Proliferation von Lymphozyten.⁶⁵ Natalizumab inhibiert die Infiltration von Lymphozyten durch die BHS.⁶⁵ Ocrelizumab, Ofatumumab, Ublituximab und Rituximab sind Anti-CD20-Antikörper, die die Depletion von B-Zellen bewirken.⁶⁵ Alemtuzumab ist ein monoklonaler Anti-CD52-Antikörper und bewirkt eine Depletion von T-Zellen.⁶⁵ Die Anwendung der unter „Andere“ aufgelisteten Immuntherapeutika erfolgt nur noch in Ausnahmesituationen.⁶⁵

Die Wahl eines geeigneten Medikamentes zur Behandlung der RRMS richtet sich nach der Aktivität der Erkrankung, Nebenwirkungen, Art der Applikation, Wirkdauer, und Komorbiditäten der erkrankten Person.⁶⁵ Die DGN empfiehlt bei therapienaiven Erkrankten die Wahl eines Medikamentes der Wirkkategorie 1 bei *nicht wahrscheinlich hochaktiver RRMS* und der Wirkkategorie 2 oder 3 bei *wahrscheinlich hochaktiver RRMS (treat to target)*.⁶⁵ Eine wahrscheinlich hochaktive RRMS wird u. a. durch ein schweres Defizit oder eine schlechte Erholung charakterisiert.⁶⁵ Falls die MS unter der Behandlung eines

Medikamentes der Wirkkategorie 1 weiterhin als entzündlich-aktiv einzustufen ist, sollte ein Wechsel auf ein Medikament der Wirkkategorie 2 oder 3 erfolgen.⁶⁵ Einen anderen Ansatz stellt die frühzeitige hocheffektive Therapie (sog. Induktionstherapie) dar, die den primären Einsatz hochaktiver Substanzen der Wirkkategorie 2 und 3 verfolgt (*hit hard and early*).⁶⁵ Zur Behandlung der PPMS werden nur CD20-Antikörper (Ocrelizumab oder Rituximab (*off-label*)) eingesetzt.⁶⁵ Die medikamentöse Behandlung der aktiven SPMS erfolgt mit Siponimod, Ponesimod, Beta-Interferonen, Cladribin oder CD20-Antikörpern.⁶⁵

Die Wirkung dieser zahlreichen Immuntherapeutika ist jedoch nicht suffizient.¹¹⁸ In aller erster Linie sind diese Medikamente nicht in der Lage, die MS zu heilen oder die Progredienz aufzuhalten.¹¹⁸ Sie setzen hinsichtlich ihres Wirkmechanismus nicht an der Ursache der MS an, sondern greifen, häufig unspezifisch, grundlegend in das Immunsystem ein.¹¹⁸ Dies hat zahlreiche Nebenwirkungen zur Folge, die von Lymphopenie, Erhöhung von Leberenzymen und kardialen Erregungsleitungsstörungen bis hin zur progressiven multifokale Leukenzephalopathie (PML) reichen.¹¹⁸ Hinzu kommt, dass keine ausreichende Studienlage zum Vergleich von Nutzen-Risiko-Verhältnissen der Immuntherapeutika existiert und keine evidenzbasierte Wahl eines Medikamentes anhand eines auf bestimmte Patientengruppen zugeschnittenen Sicherheitsprofils erfolgen kann.¹¹⁸ Dies führt u. a. auch dazu, dass Medikamente wie bspw. Alemtuzumab erst nach einigen Jahren aufgrund gehäufte schwerer Nebenwirkungen oder Todesfälle in ihrer Indikation eingeschränkt werden.⁶⁵ Ungeachtet der Reduktion der Schubfrequenz durch Immuntherapeutika verläuft die Neurodegeneration teilweise unabhängig von weiterer Immunzellinfiltration.²⁸ Immuntherapeutika ermöglichen es nicht, die Neurodegeneration zu inhibieren und Remyelinisierung zu stimulieren.^{28,118,145} Außerdem sind sie aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht in der Lage, die BHS zu penetrieren, da diese i. d. R. nur von lipophilen und niedermolekularen Substanzen (< 500 Da) passiert werden kann.¹⁷¹ Ausgenommen davon sind S1PR-Inhibitoren, für die Hinweise bzgl. einer Durchgängigkeit durch die BHS in Tiermodellen bestehen.¹⁷¹

1.1.9 Prognostische Faktoren

Als prognostisch ungünstige Faktoren gelten das männliche Geschlecht, ein später und/oder polysymptomatischer Krankheitsbeginn, motorische, zerebelläre oder Sphinktersymptome sowie unvollständig remittierende Schübe und eine hohe Schubfrequenz.⁶⁵

1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Zur Erforschung der Pathologie der MS werden häufig Tiermodelle herangezogen. Zu den wichtigsten zählen die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die Virus-induzierte Demyelinisierung und die toxisch-induzierte Demyelinisierung durch Cuprizone oder Lysophosphatidylcholin.¹³⁰ Die EAE ist das am häufigsten verwendete Tiermodell der MS.²⁶ Sie wird entweder durch die Immunisierung von Myelinpeptiden wie dem basischen Myelinprotein (*myelin basic protein*, MBP), Proteolipid-Protein (PLP) und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (aktive EAE) oder durch den Transfer pathogener, myelinspezifischer CD4+ T-Zellen (passive EAE) induziert.²⁶ Typischerweise beginnt die Symptomatik 9-12 Tage nach der Immunisierung und verläuft dann abhängig vom jeweiligen Modell.²⁶ Die EAE kann sehr heterogene Ausprägungen annehmen, da sie stark von den experimentellen Bedingungen wie Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Alter, Antigen und Adjuvans abgänglich ist.²⁶ Die EAE eignet sich zur Erforschung von MS-Mechanismen und der Entwicklung von Medikamenten.²⁶ Neben MS-spezifischer Forschung findet die EAE zudem große Verwendung in der Betrachtung grundlagenwissenschaftlicher Fragestellungen über das ZNS und das Immunsystem in Zuständen der Inflammation, Demyelinisierung und Remyelinisierung.²⁶ Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57BL/6-Mäusen ist aufgrund der guten Reproduzierbarkeit eines der am häufigsten verwendeten MS-Modelle.¹³⁰ Dabei kommt es nach Immunisierung zu einem monophasischen Verlauf, der nach einer temporären Remission in einen chronischen Verlauf übergeht.¹³⁰ Wie für alle Tiermodelle gelten auch für die EAE Limitationen hinsichtlich der Translation zur humanen Erkrankung.^{26,130} Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57BL/6-Mäusen wird exogen induziert und verläuft ohne Schübe; zudem dominieren CD4+ T-Zellen (im Gegensatz zu den CD8+ T-Zellen bei der MS) die Immunzellinfiltration und die Läsionen treten im Gegensatz zur MS überwiegend im Rückenmark auf.¹³⁰

Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE beschreibt die Induktion von EAE mittels der Injektion der Aminosäuresequenz, die die Positionen 35 bis 55 des MOG-Peptides besetzt.¹⁰ Die Pathophysiologie der EAE basiert auf einer spezifischen Immunreaktion gegen jenes ZNS-spezifische Peptid, die zur Aktivierung von myelinspezifischen T-Zellen führt, die wiederum die BHS überqueren, im ZNS reaktiviert werden und zur Inflammation, Demyelinisierung und Axondegeneration führen.¹⁰ Für die Entwicklung der EAE ist die Gabe des Freund-Adjuvans, welches *Mycobacterium tuberculosis* enthält, und Pertussistoxin am Tag der Induktion notwendig, da diese die Immunreaktion durch Stimulation von APZ, der Zytokinsekretion und der Permeabilität der BHS verstärken.¹⁰ 9-14 Tage später kommt es zu ersten Symptomen, gefolgt von der maximalen Symptomausprägung 3-5 Tage später und einer partiellen Erholung in den nächsten 10-20 Tagen.¹⁰ Die EAE ist

durch motorische Defizite, die von leichten Schwanzspitzenpareesen bis zur Tetraplegie reichen können, und Gewichtsverlust charakterisiert, sodass diese Parameter wichtige Kenngrößen darstellen.¹⁰

1.3 Signalkaskade

1.3.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs)

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors*, FGFs) bilden eine Gruppe aus Wachstumsfaktoren und werden in Wirbeltieren und Wirbellosen exprimiert.¹¹¹ In Säugetieren existieren 22 Gene, die für FGFs kodieren, welche sich nach Wirkweise, Strukturähnlichkeit und phylogenetischen Ursprungs in sieben Familien einteilen lassen.¹¹¹ Diese sieben Familien wiederum lassen sich entsprechend ihrer Wirkweise in sekretorische und intrazelluläre FGFs einteilen.¹¹¹ Fünf der sechs sekretorischen FGF-Familien wirken auto- bzw. parakrin und werden auch als *kanonische* FGFs bezeichnet.¹¹¹ Diese wirken über eine Bindung an FGF-Rezeptoren (FGFRs) mithilfe der Kofaktoren Heparin und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs), welche einerseits die Diffusion der FGFs durch die extrazelluläre Matrix (EZM) limitieren und andererseits eine wichtige Rolle bzgl. der Affinität und der Spezifität zu den jeweiligen FGFRs einnehmen.¹¹¹ HSPGs sind Glykoproteine, an welche eine oder mehrere Heparansulfatketten gebunden sind.¹³⁷

Eine sekretorische Familie, die FGF15/19-Familie, wirkt endokrin.¹¹¹ Diese FGFs binden nicht an HSPGs, sondern nutzen Mitglieder der Klotho-Familie, nämlich α Klotho, β Klotho, und Klotho-LPH related protein (KLPH), als Kofaktoren zur Bindung an FGFRs.¹¹¹ Diese verhindern im Gegensatz zu den HSPGs nicht die Diffusion der FGFs durch die EZM, wodurch die endokrine Wirkung der FGFs ermöglicht wird.¹¹¹

Intrazelluläre FGFs hingegen kommunizieren nicht über Signalkaskaden und besitzen daher auch keine Rezeptoraffinität für FGFRs.¹¹¹ Sie dienen als Kofaktoren für spannungsabhängige Natriumkanäle und einige weitere Moleküle,¹¹¹ auf welche aufgrund fehlender Relevanz für diese Arbeit nicht weiter eingegangen wird. Tabelle 3 bietet eine Übersicht über die sekretorischen FGF-Familien, deren zugehörige FGFs und der jeweiligen Rezeptoraffinität.

Tabelle 3 Einteilung sekretorischer FGFs

		FGF-Familie	FGFs	Kofaktor	Rezeptoraffinität
Sekretorisch	Kanonisch	FGF1-Familie	FGF1		FGFR 1-4
			FGF2		FGFR 1c, 3c > 2c, 1b, 4Δ
		FGF4-Familie	FGF4		FGFR 1c, 2c > 3c, 4Δ
			FGF5		
			FGF6		
		FGF7-Familie	FGF3		FGFR 2b > 1b
			FGF7	Heparansulfat/ Heparin	
			FGF10		
			FGF22		
		FGF8-Familie	FGF8		FGFR 3c > 4Δ > 2c > 1c >> 3b
	FGF17				
	FGF18				
	FGF9-Familie	FGF9		FGFR 3c > 2c > 1c > 3b >> 4Δ	
		FGF16			
		FGF20			
Endokrin	FGF15/19-Familie	FGF15/19	βKlotho	FGFR 1c, 2c, 3c, 4Δ	
		FGF21		FGFR 1c, 3c	
		FGF23	αKlotho	FGFR 1c, 3c, 4	

Adaptiert nach ¹¹¹. FGF15 und FGF19 sind in Wirbeltieren ortholog.¹¹¹ FGFR4Δ ist eine Form von FGFR4 mit zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen.¹¹¹

1.3.2 Funktion der FGFs

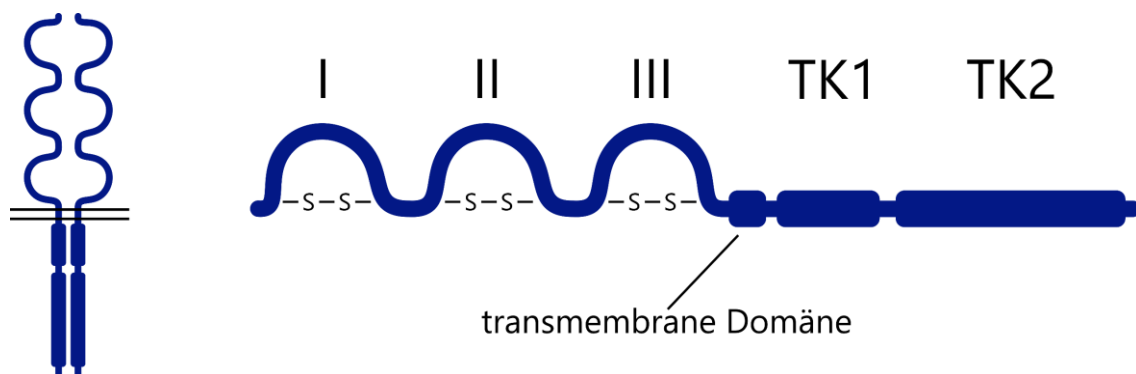
Sekretorische FGFs werden in nahezu allen Gewebearten exprimiert und üben zahlreiche Funktionen in der embryologischen Entwicklung sowie im adulten Organismus aus.¹¹¹ In der embryologischen Entwicklung sind sie zunächst in der Differenzierung von Embryoblasten in Epiblasten und Vorläuferzellen des Entoderms, später in der Organentwicklung von außerordentlicher Bedeutung.¹¹¹ Im adulten Organismus sind sie an der Instandhaltung von Gewebe, Reparaturprozessen und metabolischen Vorgängen beteiligt.¹¹¹ Dies gewährleisten sie durch Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Apoptose.¹¹¹

1.3.3 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR)

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (*fibroblast growth factor receptor*, FGFR) ist eine Rezeptortyrosinkinase und besteht aus etwa 800 Aminosäuren.¹¹¹ Er besteht aus drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (I, II und III), einer Transmembrandomäne sowie zwei intrazellulären Tyrosinkinasedomänen (Abbildung 3 *Der FGF-*

RezeptorAbbildung 3).¹¹¹ Man unterscheidet zwischen vier verschiedenen FGFRs (FGFR1-4).¹¹¹ Zudem gibt es einen fünften FGFR, den *fibroblast growth factor receptor-like 1* (FGFRL1 bzw. FGFR5), dessen Struktur zwar der Struktur von FGFR1-4 ähnelt, der jedoch keine Tyrosinkinasedomäne besitzt und seine Funktion demnach nicht über nachgeschaltete Signalkaskaden ausübt.¹¹¹ Die Immunglobulin-ähnlichen Domänen II und III sowie eine dazwischen befindliche Linkerregion regulieren die Spezifität der Ligandenbindung an FGFR1-4.¹¹¹ FGFR1-3 können darüber hinaus durch alternatives Splei- cing zwei verschiedene Varianten der Immunglobulin-ähnlichen Domäne III (IIIb und IIIc, FGFRb und FGFRc) enthalten, was erheblichen Einfluss auf die Spezifität der Bindung der Liganden ausübt.¹¹¹ Die Immunglobulin-ähnliche Domäne I und eine Aminosäurese- quenz, die sich zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen I und II befindet, inhi- bieren vermutlich die Bindung der Liganden.¹¹¹ Mitglieder der jeweiligen FGF-Subfami- lien scheinen hierbei sehr ähnliche Rezeptorspezifitäten zu haben.¹¹¹

Abbildung 3 Der FGF-Rezeptor

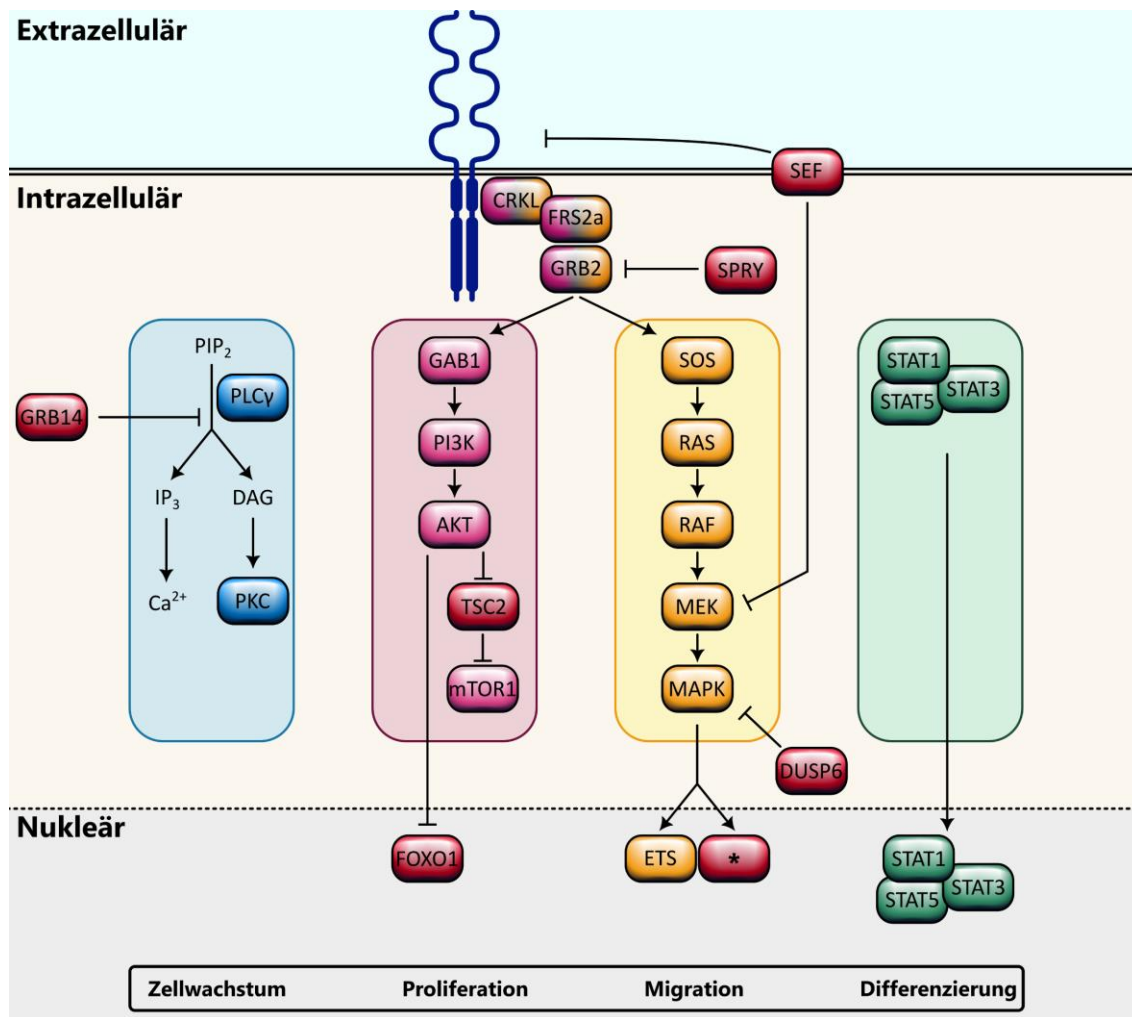


Der FGF-Rezeptor besteht aus drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (I, II und III), einer transmembranen Domäne sowie zwei intrazellulären Tyrosinkinasedomänen (TK1, TK2). Eigene Darstellung nach ¹¹¹.

1.3.4 FGF/FGFR-Signalkaskade

Nach Aktivierung durch Bindung eines FGF werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt (Abbildung 4). Alle FGFRs nutzen die gleichen Signalkaskaden, unterscheiden sich jedoch in der Intensität deren Nutzung.^{111,131} Diese Unterschiede beruhen auf Variationen in der Kinaseaktivität, der Endozytose des Rezeptors, dem subzellulären Transport und der Spezifität wichtiger Adaptorproteine.^{111,131}

Abbildung 4 Die FGF/FGFR-Signalkaskade



Nach Bindung eines FGF kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und Autophosphorylierung von Tyrosinresten der FGFR-Kinasen, wodurch die Kinaseaktivität selbst erhöht wird. Die aktivierte Kinase wiederum bewirkt die Aktivierung der vier intrazellulären Kaskaden: (1) PLC γ (blau), (2) PI3K-AKT (lila), (3) RAS-MAPK (gelb) und (4) *signal transducer and activator of transcription* (STAT) (grün). PLC γ und STAT3 binden dafür direkt an die Kinase, während das kinaseständige Enzym FRS2 α , welches die Anwesenheit von CRKL bedarf, für die Aktivierung von RAS und PI3K benötigt wird. Der PI3K-AKT-Weg bewirkt die Stimulation von *mechanistic Target of Rapamycin 1* (mTOR1) und die Inhibition von FOXO1, das proapoptotisch wirkt. MAP-Kinasen, die von FGFR aktiviert werden, sind u. a. ERK1/2, JNK und p38. Der RAS-MAPK-Weg bewirkt die Aktivierung von *E26 transformation-specific* (ETS) Transkriptionsfaktoren. Verallgemeinert bewirken die verschiedenen Signalkaskaden durch stimulierte Expression von Zielgenen Zellwachstum, Proliferation, Migration und Differenzierung. FGFs und FGFRs können nach Internalisierung auch direkt im Nukleus wirken. Wichtige negative Regulatoren der Signalkaskade sind *Sprouty* (SPRY), SEF, GRB14 und DUSP6 (rot), deren Expression als negative Feedbackschleife durch den RAS-MAPK-Weg stimuliert wird (mit * gekennzeichnet). Abbildung wurde nach ¹¹¹ gestaltet.

1.3.5 FGF/FGFR-Signalkaskade im ZNS

FGFs und FGFRs werden im embryonalen und im adulten ZNS exprimiert und sind hinsichtlich Neurogenese im Sinne einer Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (*neural precursor cells*, NPCs), Differenzierung, Ausbildung von axonalen Fortsätzen und Überleben von Nervenzellen von entscheidender Bedeutung.^{39,131} Die Untersuchungen von FGFs im ZNS haben sich in der Vergangenheit häufig nur auf wenige FGFs, insb. auf FGF1 und FGF2, beschränkt, obwohl 20 FGFs im ZNS exprimiert werden.^{5,39,41} FGF2 wird im ZNS von Neuronen und Gliazellen, FGF1 und FGF9 hingegen werden von Neuronen exprimiert.^{5,131} FGFR1-3 sind im gesamten ZNS zu finden, wobei FGFR1 vor allem in Astrozyten, Oligodendrozyten/OPCs, Neuronen und Mikroglia (in absteigender Reihenfolge) und FGFR2-3 in erster Linie auf Gliazellen im gesamten ZNS exprimiert werden.^{5,85,131,154} FGFR4 hingegen ist vor allem in der embryonalen Entwicklung relevant und im adulten ZNS kaum aufzufinden.^{131,85,131,154}

Zentral ist die Rolle der FGF/FGFR-Signalkaskade dabei in der Entwicklung von OPCs und Oligodendrozyten. FGFR1 wird von OPCs exprimiert, wobei die Expression im Zuge fortschreitender Differenzierung immer weiter zunimmt.⁶ FGF2 stimuliert über FGFR1 die Proliferation und Migration von OPCs und hemmt deren Differenzierung zu adulten Oligodendrozyten.^{5,6} So wird eine ausreichende Generierung von OPCs im Sinne von Zellteilung und Vermehrung und Aufbau eines genügenden Reservoirs für die spätere Differenzierung zu Oligodendrozyten gewährleistet.⁶ FGF2 und FGF9 bewirken eine Hochregulation von FGFR1.⁵ FGFR2 wird hauptsächlich von adulten Oligodendrozyten bzw. OPCs kurz vor der terminalen Differenzierung exprimiert und stimuliert, gegensätzlich zu FGFR1, die Differenzierung von OPCs zu Oligodendrozyten, aber nicht deren Proliferation.^{5,6} Im Einklang damit wird FGFR2 auch ein stimulierender Effekt auf die Myelinisierung zugesprochen.⁵ Im Gegensatz zu FGFR1 wird FGFR2 durch FGF2 und FGF9 herunterreguliert.⁵ Die Expression von FGFR3 erreicht ihren Höhepunkt in OPCs einer späteren Entwicklungsstufe (*late OPCs*) und ist auf adulten Oligodendrozyten kaum nachzuweisen.⁶ Außerdem wird FGFR3 von Astrozyten exprimiert.⁵ FGFR4 wird hingegen nicht auf Oligodendrozyten exprimiert.⁶

FGF2 stimuliert nicht nur die Proliferation und Migration von OPCs über FGFR1 und hemmt deren Differenzierung, sondern übt auch Effekte auf adulte Oligodendrozyten aus^{2,18}: Es bewirkt die Herabregulation der Myelinproteine MBP, PLP und CNPase über FGFR1, stimuliert aber gleichzeitig das Wachstum der Fortsätze von Oligodendrozyten über FGFR2.^{5,18,43} Es gibt mehrere Erklärungsansätze für die widersprüchlich wirkenden Effekte von FGF2: Die Wirkung von FGF2 könnte einerseits zeitabhängig sein,⁵ andererseits ist ihre Ambivalenz möglicherweise auf unterschiedliche Isoformen der FGFRs

zurückzuführen.² Butt und Dinsdale¹⁸ konnten die Wirkungen von FGF2, die bis dato nur *in vitro* gezeigt wurden, *in vivo* reproduzieren. FGF2 induzierte dabei die Destruktion von Myelinscheiden, welche der Demyelinisierung der MS ähnelte, die Akkumulation von unreifen OPCs und die Verringerung der Anzahl an adulten Oligodendrozyten, weshalb FGF2 als fördernd für die Demyelinisierung und behindernd für die Remyelinisierung betrachtet wird.¹⁷

Die simultane Deletion von FGFR1 und FGFR2 in Mäusen führte interessanterweise zu keiner Veränderung von Proliferation oder Differenzierung von OPCs, wohl aber zu einer Hypomyelinisierung durch verminderte Genexpression von Myelinproteinen durch Inhibition der MAPK-Signalkaskade.⁴⁸ Der simultane *knockout* (KO) der *Fgfr1*- und *Fgfr2*-Gene in Mäusen hingegen reduzierte die Anzahl an differenzierten Oligodendrozyten.⁵⁰ KO des *Fgfr2*-Gens resultierte, im Gegensatz zum KO des *Fgfr1*-Gens, zu einer verminderten Myelinisierung und Genexpression von Myelinproteinen.⁴⁹ Andererseits trug FGF2 über FGFR2-induzierte Aktivierung der Wnt-Signalkaskade zur Inhibition von Myelinisierung bei.¹⁵⁴

1.3.6 FGF/FGFR-Signalkaskade in MS und EAE

Die Expression von FGF2 ist in experimentellen und in MS-bedingten Läsionen sowie im Liquor hochreguliert.^{5,136} FGF2 wird in der MS in WML von Makrophagen exprimiert.²³ Die Funktion von FGF2 scheint dabei ambivalent zu sein: Zum einen fördert FGF2 die Expansion und Rekrutierung von OPCs und könnte so als Reaktion auf eine Läsion einer nachfolgenden Remyelinisierung dienen.⁵ Andererseits wurde eine apoptotische Wirkung von FGF2 auf Oligodendrozyten und eine Herabregulation von Myelinproteinen gezeigt, sodass FGF2 auch als Treiber der Demyelinisierung betrachtet werden könnte.⁵ FGF2-defiziente Mäuse zeigten nach experimenteller Demyelinisierung eine deutlich verbesserte Regeneration von Oligodendrozyten.² In MS-Läsionen ist zudem eine gesteigerte Expression von FGF9 durch Astrozyten zu finden, welche auf der Basis von Zellkulturstudien ähnlich wie FGF2 die Remyelinisierung zu inhibieren scheint.⁸⁹ Die Expression von FGF1 hingegen ist in remyelinisierten MS-Läsionen erhöht und weist darüber hinaus eine Fähigkeit zur Stimulation von Remyelinisierung in Zellkulturstudien auf.⁹⁹

Die Remyelinisierung als Reaktion auf Cuprizone-induzierte Demyelinisierung war in FGF2^{-/-}-Versuchstieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich ausgeprägter; zusätzlich konnte eine höhere Anzahl an Oligodendrozyten, aber nicht an OPCs festgestellt werden.¹ Bei Cuprizone-induzierter Demyelinisierung trug ein *knockdown* sowohl von FGF2

als auch von FGFR1 zur Remission motorischer Symptome bei.⁹⁷ Im Gegensatz dazu zeigten FGF2^{-/-}-Versuchstiere in einer anderen Studie eine stärkere Symptomatik in der chronischen Phase der EAE, mehr Neurodegeneration und eine geringere Anzahl an remyelinisierten Axonen.¹³⁴

Eine Reduktion der FGFR1-Expression auf OPCs in Mäusen führte zu vermehrter Differenzierung von OPCs zu Oligodendrozyten und stimulierte die Remyelinisierung von Axonen nach Cuprizone-induzierter Demyelinisierung.¹⁷⁵ Die Oligodendrozyten-spezifische Deletion von FGFR1 führte bei Mäusen mit EAE zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf und verringerte die Immunzellinfiltration deutlich.¹²⁷ Ähnliche Ergebnisse wurden bei Oligodendrozyten-spezifischer Deletion von FGFR2 erhoben.⁷⁷ Zudem führte die pharmakologische Inhibition von FGFR1-3 durch den selektiven Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Infigratinib bei der EAE zu einem signifikant abgeschwächten klinischen Verlauf, einer geringeren Anzahl an infiltrierten B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen/Mikroglia in Läsionen und erhöhte ebenso die Anzahl von OPCs und Oligodendrozyten.¹²⁸ Außerdem ließen sich Hinweise auf eine gesteigerte Remyelinisierung finden.¹²⁸

1.3.7 VEGF/VEGFR-Signalkaskade im ZNS sowie in MS und EAE

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Entstehung neuer Blutgefäße (Angiogenese), bewirkt die Proliferation sowie das Überleben von Endothelzellen und ist außerdem in der Vasodilatation und der Gefäßpermeabilität von Bedeutung.¹⁵ VEGF wirkt durch Bindung an VEGFR1, VEGFR2 und Neuropilin-1 und -2.¹⁵ VEGFR2 ist eine Rezeptortyrosinkinase, wird in Endothelzellen sowie deren Vorläufern exprimiert und vermittelt nach Bindung von VEGF mitogene, angiogene und permeabilitätssteigernde Wirkungen.^{15,40} Ferner wird VEGFR2 im ZNS exprimiert, wo er insb. auf Endothelzellen, Somata und auf Wachstumskegeln von regenerierenden Axonen zu finden ist.¹⁵ VEGF wird von Neuronen und Gliazellen exprimiert.^{15,133} VEGF bewirkt die Verhinderung des hypoxisch bedingten Zelltodes von Neuronen *in vitro* und die Proliferation, Migration und das Wachstum von Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und neuronalen Vorläuferzellen über Bindung an VEGFR2 und Aktivierung der MAPK- und der PI3K/Akt-Signalkaskade.^{15,110} Außerdem stimuliert er die Expression von BDNF, welcher ebenfalls an der Neurogenese beteiligt ist.¹¹⁰ VEGF erhöht zudem die Permeabilität der BHS durch Degradation von *tight junctions* und Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, welche Gefäßwände destruieren.^{132,133,174}

In MS-Läsionen konnte eine erhöhte Expression von VEGF festgestellt werden.¹²³ Zudem wurden erhöhte Serumwerte von VEGF bei MS-Patienten während eines Schubes detektiert.¹⁵¹ Ebenso wird VEGFR2 in MS-Läsionen exprimiert, wo dieser vermutlich durch Freisetzung angiogener Faktoren und Herabregulation von *gap junctions* die Erhöhung der Permeabilität und die Stimulation inflammatorischer Prozesse begünstigen.^{55,138} Eine erhöhte Permeabilität der BHS scheint eine Rolle in der Pathogenese der MS und EAE einzunehmen, da sie die Infiltration von Immunzellen erleichtert.^{133,138} Die Expression von VEGF korreliert mit der Schwere der EAE-Symptome in der akuten Phase.¹³³ Zudem ging die pharmakologische Inhibition von VEGFR2 mit einem abgeschwächten Krankheitsverlauf der EAE einher.¹³³

1.3.8 CSF1R-Signalkaskade

Der Kolonie-stimulierende Faktor-1-Rezeptor (*colony stimulating factor receptor 1*, CSF1R) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher durch die Liganden CSF1 und IL-34 aktiviert wird.^{22,148} CSF1R wird auf Myeloidzellen wie hämatopoetischen Stammzellen, Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und myeloiden dendritischen Zellen exprimiert.¹⁴⁸ Im ZNS wird CSF1R auf Mikroglia und eventuell auch auf Zellen neuronalen Ursprungs exprimiert, aber nicht auf Oligodendrozyten oder OPCs.²² CSF1 und IL-34 werden insbesondere von Neuronen exprimiert.²² CSF1R spielt eine Rolle in der Entwicklung des Gehirnes von Mäusen, wobei dessen genaue Funktion bislang ungeklärt ist.²² Insbesondere ist CSF1R für die Entwicklung und das Überleben von Mikroglia unerlässlich.²² CSF1R scheint außerdem ein wichtiger Einflussfaktor hinsichtlich der Polarisation von Mikroglia in einen pro- oder antiinflammatorischen Zustand zu sein.¹²⁵ Zudem wird vermutet, dass CSF1R die Proliferation von NPCs inhibiert, aber gleichzeitig deren Differenzierung und Überleben stimuliert.²² Diese Funktionen werden u. a. auch durch Aktivierung der PI3K/Akt, RAS/MAPK- und PLC γ /PKC-Signalkaskaden ausgeführt.¹⁴⁸

Es bestehen Hinweise auf eine mögliche Rolle von CSF1R in der Pathogenese der MS und der EAE. So werden CSF1 und CSF1R in Läsionen der progressiven MS vermehrt exprimiert.⁶⁰ Außerdem vermittelt die CSF/CSFR-Signalkaskade die Aktivierung, Proliferation und Chemotaxis von Makrophagen/Mikroglia und ist in der Pathogenese der EAE involviert.^{71,96,166} Die pharmakologische Inhibition von CSF1 und CSF1R führte zu einer Abschwächung des klinischen Verlaufes der EAE durch Reduktion von Makrophagen, Mikroglia und dendritischen Zellen.^{27,60,72,109} In der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung führte die pharmakologische Inhibition von CSF1R zu verminderter Demyelinisierung, vermehrter Remyelinisierung und einer erhöhten Anzahl an Oligodendrozyten.^{7,152}

1.3.9 FGF/FGFR-Inhibitoren

Pathologische Veränderungen der FGF/FGFR-Signalkaskade nehmen aufgrund der Regulation der Zellproliferation insbesondere in der Onkologie eine bedeutende Stellung ein.¹¹¹ So können Mutationen, Rearrangement oder Amplifikationen der FGFRs durch Verstärkung der Signalkaskade die Entstehung diverser Tumorerkrankungen wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), Mammakarzinom, Gliom, intrahepatischem Cholangiokarzinom und dem Urothelkarzinom bewirken. Mutationen der FGFs führen ebenfalls zu diversen Tumorerkrankungen.¹¹¹ Hereditäre Mutationen von FGFs und FGFRs sind darüber hinaus mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert, darunter bspw. die Achondroplasie (FGFR3-Mutation) oder die spinozerebelläre Ataxie Typ 27 (FGF14-Mutation).¹¹¹ Tabelle 4 gibt Aufschluss über FGFR-Inhibitoren, die bereits zugelassen oder Gegenstand aktueller Forschung sind.

Tabelle 4 Anwendungen verschiedener FGFR-Inhibitoren

Medikament	Zielkinase	Erkrankung	Status
Nintedanib	FGFR1-3	Idiopathische interstitielle Lungenfibrose	zugelassen (USA und EU)
Erdafitinib	FGFR1-4	Urothel-Ca	zugelassen (USA)
Infigratinib	FGFR1-3	Cholangio-Ca Urothel-Ca	Zulassung zurückgezogen (USA und EU), Phase III abgebrochen*
Pemigatinib	FGFR1-3	Cholangio-Ca	zugelassen (USA und EU)
Rogaratinib	FGFR1-3	Magen-Ca	Phase II
Futibatinib	FGFR1-4	Cholangio-Ca	zugelassen (USA und EU)
Derazantinib	FGFR1-4	Urothel-Ca	Phase I/II
LY2874455	FGFR1-4	-	Phase I
Fexagratinib	FGFR1-3	NSCLC	Phase II
Debio1347	FGFR1-3	diverse	Phase II
Fisogatinib	FGFR4	-	Phase I
Zotatifin	FGFR1/2	-	Phase I
Anlotinib	FGFR1-3	Hirnmetastasen	Phase II

Daten aus ^{30,33,54,82,83,141,164}. Erdafitinib, Pemigatinib, Futibatinib werden in weiteren Phase III-Studien bei anderen Tumorerkrankungen untersucht. Die unter Zielkinase aufgeführten Kinasen beziehen sich lediglich auf FGFR, andere inhibierte Kinasen sind nicht angegeben. *Die Zulassung für Infigratinib (initial 2020 von der *European Medicines Agency* (EMA) als *orphan drug* und 2021 von der *U.S. Food and Drug Administration* 2024 (FDA) ausgestellt) wurde von der EMA 2022 und der FDA 2024 nach Antrag des Herstellers mit Verweis auf fehlende Profitabilität zurückgezogen.^{31,32,159} Zuvor hatte die EMA Bedenken hinsichtlich des Nutzen-Risiko-Verhältnisses geäußert.³²

1.3.10 VEGFR- und CSF1R-Inhibitoren

Auch VEGFR2 ist in der Kanzerogenese aufgrund der Regulierung der endothelialer Zellproliferation und -migration und der Angiogenese involviert.⁹⁰ Zahlreiche VEGFR2-Inhibitoren zur Behandlung diverser Tumore sind bereits zugelassen (z. B. Sunitinib, Pazopanib, Vandetanib, Axitinib, Regorafenib, Cabozantinib, Lenvatinib, Tivozanib und Fruiquintinib durch die FDA).^{90,169}

Auch CSF1R-Inhibitoren werden aufgrund der regulatorischen Funktion des CSF1R auf Tumor-assoziierten Makrophagen in der Onkologie genutzt.¹⁶⁵ So sind aktuell drei Substanzen in den USA zugelassen, nämlich PLX3387 zur Behandlung des tenosynovialen Riesenzelltumors, HMPL-012, der neben CSF1R auch VEGFR1-3 und FGFR1 inhibiert, zur Behandlung nicht-pankreatischer neuroendokriner Tumore sowie Axatilimab zur Behandlung einer chronischen Graft-versus-Host Erkrankung.^{78,165} Zahlreiche weitere Substanzen werden derzeit in klinischen Studien untersucht, u. a. auch an Personen, die an M. Alzheimer oder der amyotrophen Lateralsklerose erkrankt sind.¹⁶⁵

1.4 Der Multikinase-Inhibitor Fexagratinib

Fexagratinib (AZD4547, N-[5-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2H-pyrazol-3-yl]-4-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)benzamide, C₂₆H₃₃N₅O₃) ist ein niedermolekularer Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor, der reversibel an der ATP-Bindetasche von Rezeptortyrosinkinasen bindet und so die Kinaseaktivität dieser kompetitiv inhibiert (Abbildung 5).¹⁵⁸ Er inhibiert insbesondere FGFR1-3, in geringerer Aktivität FGFR4, CSF1R und VEGFR2 sowie schwach IGFR und weitere (Tabelle 5).^{52,80} Zudem konnte *in vitro* eine Inhibition der Phosphorylierung von FRS2 und PLC γ festgestellt werden.⁵² Das Molekulargewicht von Fexagratinib beträgt 463,6,⁵² die Halbwertszeit etwa 30 Stunden.¹³⁵ Die maximale Plasmakonzentration von Fexagratinib wird etwa 3-4 Stunden nach der Applikation erreicht.¹³⁵ Das Erreichen einer Steady-State-Konzentration nimmt etwa 8 Tage in Anspruch.¹³⁵

Fexagratinib wirkte in Tumorzelllinien mit Wildtyp-FGFR oder mutiertem FGFR je nach Zelllinie antiproliferativ oder apoptotisch. In einem FGFR3-mutiertem Tumor stagnierte das Tumorstadium nach Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg Körpergewicht (KG).⁵² Fexagratinib wird daher zumeist in Forschungsarbeiten zu Tumoren eingesetzt. Bezüglich seiner Wirkung im ZNS wurde Fexagratinib in Forschungsarbeiten hinsichtlich seines Effektes auf das Glioblastom eingesetzt und ermöglichte hier die Reduktion des Tumorstadiums und eine gesteigerte Überlebensrate der Versuchstiere, woraus sich eine Durchgängigkeit von Fexagratinib durch die BHS ableiten lässt.^{9,143} Des Weiteren bewirkte Fexagratinib eine verringerte Zellviabilität, Proliferation und vermehrte Apoptose in Medulloblastom-Zelllinien.⁶⁸ Abseits davon existiert nach bestem Wissen lediglich eine ZNS-bezogene Studie, in der unsere Arbeitsgruppe den Effekt von Fexagratinib auf Oligodendrozyten *in vitro* untersuchte.¹²⁶

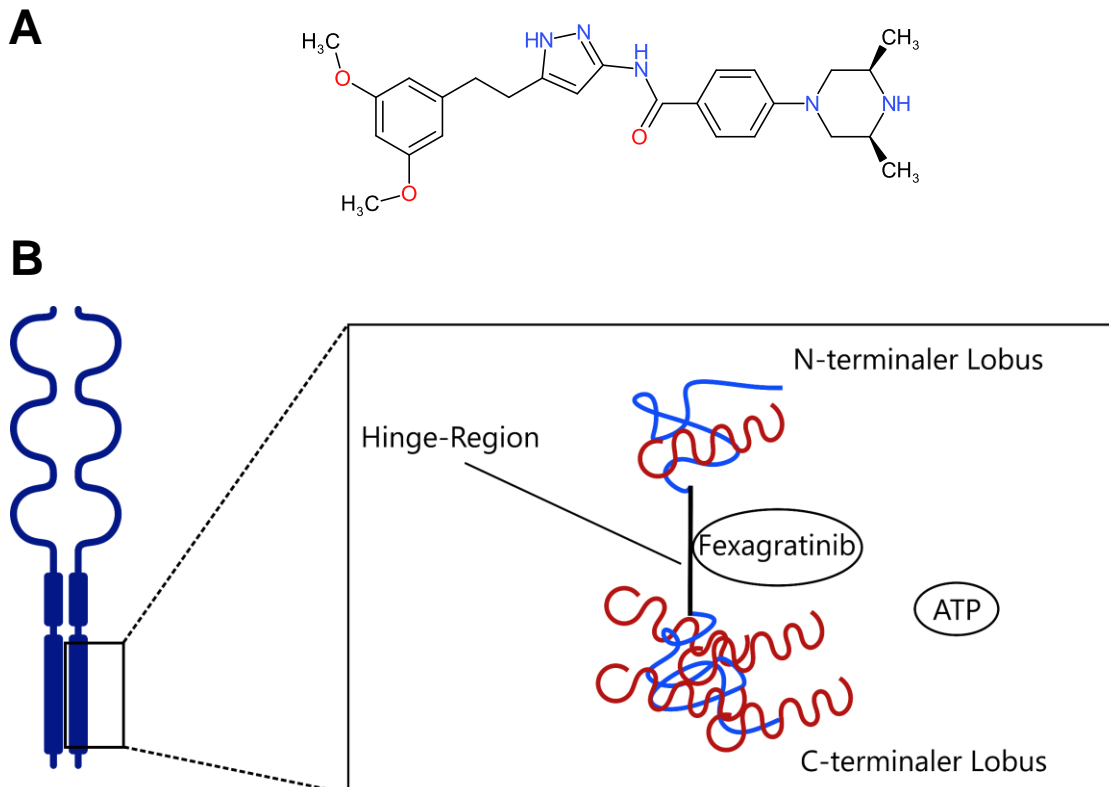
Gegenwärtig existieren 18 klinische Studien der Phase I und II, in denen Fexagratinib an Patienten mit Tumorerkrankungen getestet wird oder wurde.¹⁰⁶ Unerwünschte Wirkungen von Fexagratinib wie gastrointestinale Beschwerden, Mundtrockenheit, Hyperphosphatämie und Sehstörungen treten bei der überwiegenden Anzahl der Patienten auf (94,1%), sind aber überwiegend moderat und reversibel.¹³⁵ In zwei klinischen Studien der Phase I traten bei 23% der Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom bzw. bei 3,33% der Tumorkranken medikamentenbezogene schwere unerwünschte Nebenwirkungen auf, darunter die zentrale seröse Chorioretinopathie, Dehydrierung, Dyspnoe und Übelkeit.^{113,135} Basierend auf zwei klinischen Studien der Phase I wird eine Dosis von 80 mg pro Tag empfohlen, wobei keine dosislimitierenden Nebenwirkungen auftraten und auch 160 mg gut verträglich waren.¹³⁵

Tabelle 5 *Inhibition von Kinaseaktivitäten durch Fexagratinib*

Kinase	IC₅₀ [nmol/L]
FGFR1	0,2
FGFR2	1,8
FGFR3	2,5
CSF1R	9,7
VEGFR2	24
FGFR4	165
IGFR	581
MAP4K5	0,5
MAP4K3	39,3
DDR1	51,9
RET	24,4
MELK	65
FLT3	84,6
AXL, CDK2, FAK, ROCK2, AKT1, ALK1, p38, PI3Ka	*

Daten aus ^{52,80}. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) gibt die Konzentration an, die zur Inhibition der Kinaseaktivität um 50% benötigt wird. *Eine Inhibition wurde bei der Maximaldosis von 0,1 µmol/L Fexagratinib festgestellt, jedoch konnte keine Inhibition der Kinaseaktivität von 50% erreicht werden.

Abbildung 5 Chemische Struktur und Funktionsweise von Fexagratinib



Chemische Struktur von Fexagratinib (N-[5-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2H-pyrazol-3-yl]-4-(3,5dimethylpiperazin-1-yl)benzamide, $C_{26}H_{33}N_5O_3$). Abbildung nach ⁵² (A). Schematische Darstellung der Kinase und der Wirkweise von Fexagratinib (B). Sie besteht aus einem N-terminalen und einem größeren C-terminalen Lobus, die jeweils aus α -Helices (blau) und β -Faltblättern (rot) zusammengesetzt sind. Fexagratinib bindet in der Hinge-Region, die physiologischer Weise von ATP besetzt wird, und verhindert so die Übertragung des Phosphatrestes von ATP auf das Substrat. Abbildung nach ⁷⁰.

2 Ziele

Derzeit existiert kein Medikament zur Behandlung der MS, welches die Neurodegeneration vermindern und die Remyelinisierung induzieren kann, weshalb ein immenser Bedarf hinsichtlich der Forschung neuer Substanzen mit solchen Eigenschaften besteht. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die selektive Inhibition von FGFR1-3 durch Applikation von Infigratinib einen milderen klinischen Verlauf der EAE durch Verminderung der Immunzellinfiltration, Demyelinisierung und Neurodegeneration und eine Steigerung der Remyelinisierung bewirkte. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Inhibition von VEGFR2 und CSF1R ebenfalls einen abgeschwächten klinischen Verlaufs durch Reduktion von Immunzellinfiltration und Demyelinisierung sowie der Modulation von Oligodendrozyten bewirkten.

Daraus ließ sich die Hypothese formulieren, dass die synergistische Inhibition von FGFR1-3, VEGFR2 und CSF1R durch den Multikinase-Inhibitor Fexagratinib zu einer Reduktion der Schwere des klinischen Verlaufs der EAE, der Immunzellinfiltration, der Demyelinisierung und der Neurodegeneration und einer Steigerung der Remyelinisierung führt und einen erfolgreicherer Ansatz als die selektive Inhibition von FGFR1-3 darstellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen einer präventiven Applikation des Multikinase-Inhibitors Fexagratinib auf die EAE untersucht.

Folgende Punkte galten dabei als Ziele:

1. **Ziel:** Evaluation des Effektes der präventiven Applikation von Fexagratinib auf den klinischen Verlauf der EAE.
2. **Ziel:** Evaluation der Effekte der präventiven Applikation von Fexagratinib auf die Immunzellinfiltration, die Demyelinisierung und die Neurodegeneration in der akuten und chronischen Phase (Tag 18 und 41 p. i.).
3. **Ziel:** Evaluation der Effekte der präventiven Applikation von Fexagratinib auf die FGFR-, VEGFR2- und CSF1R-Signalkaskaden sowie auf die Expression von Myelinproteinen, Zytokinen und mitochondrialen Komponenten in der chronischen Phase (Tag 41 p. i.).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Tabelle 6 Primäre Antikörper

Name	Wirt	Reaktivität	Molekulargewicht [kDa]	Hersteller	Artikelnr.
Anti-FGFR1	Rb	H, M, R, Mk	92, 120, 145	Cell Signaling	9740
Anti-FGFR2	Rb	H, M	92, 145	Cell Signaling	23328
Anti-CSF1R	Rb	M, R	108	Abcam	ab221684
Anti-VEGFR2	Rb	H, M, R	210, 230	Cell Signaling	9698
Anti-VEGF	Rb	B, Dg, C, Hs, Gp, H, M, R	21, 42	Invitrogen	PA1-16948
Anti-pERK	Rb	H, M, R, Hm, Mk, Mi, Dm, Z, B, Dg, Pg, Sc	42, 44	Cell Signaling	4370s
Anti-pAkt	Rb	H, M, R, Hm, Mk, Dm, Z, B	60	Cell Signaling	4060s
Anti-BDNF	Rb	H, M	12-14, 28	Cell Signaling	47808
Anti-TrkB	Rb	H (M, R, Ch)	92	Abcam	ab18987
Anti-MBP	Rb	H, M, R,	12-18	Cell Signaling	78896S
Anti-PLP1	Rb	H, M, R	20-30	Cell Signaling	85971S
Anti-CNPase	M	H, M, R	46 (34-50)	Santa Cruz	sc-166019
Anti-ATP Synthase Beta	M	H, M, R, B, C. elegans, Non-human primate	57	Invitrogen	A-21351
Anti-ATP6E	M	H, M, R	33	Santa Cruz	sc-514143
Anti-SOD2	Rb	H, M, R, Mk	22	Cell Signaling	13194s
Anti-MT-ND1	Rb	H, M	36	Abcam	ab222892
Anti-CD200	G	H, M, R	42	R&D Systems	AF2724
Anti-GAPDH	M	H, M, R	37	Santa Cruz	sc365062

Tabelle 7 Sekundäre Antikörper

Name	Wirtsspezies	Hersteller	Artikelnr.
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	G	Cell Signaling	7074S
Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody	Hs	Cell Signaling	7076S
Anti-Goat IgG, HRP-linked Antibody	M	Santa Cruz	sc-2354

Tabelle 8 Immunhistochemische Antikörper

Name	Wirt	Reaktivität	Molekulargewicht [kDa]	Hersteller	Artikelnr.
Mac3, clone M3/84	R	M	Färbung	BD Pharmingen™	550929
B220, clone RA-36B2	R	H, M	Färbung	BD Pharmingen™	553089
CD3, clone CD3-12	R	M	Färbung	Bio-Rad Laboratories GmbH	MCA 1477
Olig2	M	H, M, R	Färbung	Sigma-Aldrich	MABN50
P25	Rb	H, M, R	Färbung	Abcam B.V.	ab92305

H Mensch, M Maus, R Ratte, Rb Kaninchen, Mk Affe, B Rind, Mi Amerikanischer Nerz, Dm D. melanogaster, Z Zebrafisch, Dg Hund, Pg Schwein, Sc S. cerevisiae, C Huhn, Hm Hamster, Hs Pferd, G Ziege, Gp Meerschweinchen

3.1.2 Primer

Tabelle 9 Primer

Primer	5' → 3' Sequenz
FGF2	Forward GGC TGC TGG CTT CTA AGT GT Reverse ACT GGA GTA TTT CCG TGA CCG
FGFR1	Forward CAG ATG CAC TCC CAT CCT CG Reverse GGG AGC TAC AGG GTT TGG TT
FGFR2	Forward AGC GCC TGT GAG AGA GAA G Reverse CCG AAA CTG TTA CCT GTC TCC
BDNF	Forward AAG GGC CAG GTC TGT TAA GC Reverse GGT AAG AGA GCC AGC CAC TG
TrkB	Forward TGA CGC AGT CGC AGA TGC TG Reverse TTT CCT GTA CAT GAT GCT CTC TGG
MBP	Forward TCC ATC GGG CGC TTC TTT AG Reverse TCT CGT GTG TGA GTC CTT
PLP	Forward GAG CAA AGT CAG CCG CAA AA Reverse CAA GCC CAT GTC TTT GGC AC
IL-1 β	Forward TAC CTG TGG CCT TGG GCC TGA A Reverse GCT TGG GAT CCA CAC TCT CCA GCT
IL-6	Forward CTC TGC AAG AGA CTT CCA Reverse AGT CTC CTC TCC GCA CTT
IL-12	Forward AGA CCA CAG ATG ACA TGG TGA

	Reverse ACG ACG TGG GCT ACA GGC TT
IFN γ	Forward TGG CAT AGA TGT GGA AGA AAA CAG
	Reverse TGC AGG ATT TTC ATG TCA CCA
TGF β	Forward CTC CTG CTG CTT TCT CCC TC
	Reverse GTG GGG TCT CCC AAG GAA AG
iNOS	Forward TTG GAG GCC TTG TGT CAG CCC T
	Reverse AAG GCA GCG GGC AGA TGC AA
Lingo1	Forward TCA TCA GGT CAG CGA GAG GA
	Reverse CAG TAC CAG CAG GAG GAT GG
SEMA3A	Forward GGA TGG GTC CTC ATG CTC AC
	Reverse TGG TGC TGC AAG TCA GAG GC
CX3CL1	Forward GCG ACA AGA TGA CCT CAC GA
	Reverse TGT CGT CTC CAG GAC AAT GG
CX3CR1	Forward CTG CTC AGG ACC TCA CCA TGT
	Reverse ATG TCG CCC AAA TAA CAG GC
GAPDH	Forward TGG CAA AGT GGA GAT TGT TGC C
	Reverse AAG ATG GTG ATG GGC TTC CCG

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics Germany GmbH hergestellt.

3.1.3 Kits

Tabelle 10 Kits

Name	Hersteller	Artikelnr.
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH	1725121
peqGOLD Total RNA Kit	VWR International GmbH	13-6834-01
Pierce™ BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	23225
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V.	205313
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.	46430
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.	34580

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 11 Chemikalien

Name	Hersteller	Artikelnr.
10% SDS; SDS ultrapure	Carl Roth GmbH & Co. KG	2326.4
10x PBS	Lonza	BEBP17-516Q
10x Tris/Glycin/SDS-Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH	1610732
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	63689
2-Propanol	Sigma-Aldrich	33539-1L-M
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG	9592.3
Fexagratinib	Selleck Chemicals	S2801
BSA Standard Grade/Bovinum Serum Albumin	Capricorn Scientific GmbH	BSA-1T
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG	8040,1
Fentanyl (Fentadon®) 50 ug/ml	Albrecht GmbH	-
Freund's Adjuvant, Incomplete	Sigma-Aldrich	F5506
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG	
Glycerin ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH & Co. KG	3783.1
HCl	Sigma-Aldrich	30721-M
HCl zur Titration	Merck KGaA	1.09137
Isofluran	Ecuphar	
Ketamin Inresa 5%	Inresa Arzneimittel GmbH,	
M. Tuberculosis Des. H37 Ra	Becton, Dickinson and Company	231141
Magermilchpulver	Cell Signaling Technology	9999S
Methanol	Sigma-Aldrich	603-001-00-X
MOG ₃₅₋₅₅ (AA: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)	sb-PEPTIDE	SB023
NaN ₃	Merck KGaA	1.06688.0100
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	3957.1
Nonidet-P40 (NP-40)	United States Biological	N3500
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	-
Pertussis Toxin, Bordetella	Millipore	516560-50UG
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich	P5726-5ML
Polyethylenglycol 300 (PEG300)	AppliChem	A2853
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH	05892970001
Proteingrößenmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific Inc.	26616 26619
Resolving gel buffer, 1,5 M Tris (pH = 8,8)	Bio-Rad Laboratories GmbH	1610798

ROTI® Load 1	Carl Roth GmbH & Co. KG	K929.2
Rotiphorese® 10x SDS-Page	Carl Roth GmbH & Co. KG	3060.1
Rotiphorese® Gel 30, Acrylbisacrylamid-Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG	3029.1
Stacking gel buffer, 1,5 M Tris (pH = 6,8)	Bio-Rad Laboratories GmbH	1610799
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG	2367.3
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG	4855.2
Tween® 20	Merck KGaA	9005645
Xylazin 2%	CP-Pharma	1205

3.1.5 Puffer

Tabelle 12 Puffer

Puffer	Komponenten	Menge
10% Ammonium Persulfate (APS)	APS	1 g
	ddH ₂ O	10 ml
10x TBS (1 Liter), pH 7,2 bis 7,6	Tris	24,2 g
	NaCl	87,7 g
	H ₂ O	1000 ml
1x SDS-PAGE Laufpuffer	Rotiphorese® 10x SDS-Page	100 ml
	H ₂ O	900 ml
1x SDS-PAGE Transferpuffer (1 Liter)	Rotiphorese® 10x SDS-Page	100 ml
	Methanol	200 ml
	ddH ₂ O	700 ml
1x TBS-Tween (TBS-T) (1 Liter)	1x TBS	1000 ml
	0,1% Tween®20	1 ml
Blocking buffer (5% BSA)	BSA fraction V	5 g
Bovine Serum Albumin	TBS-T	100 ml
Protein Lysis Buffer (250 ml) pH 7,4	NaCl	2,19 g
	Tris	0,61 g
	EDTA	0,07 g
	Glycerol	25 ml
	Nonidet-P40	2.5 ml
	NaN ₃	0,025 g

3.1.6 Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

Tabelle 13 Herstellung von 10 ml eines 10% Trenngels

Name	Volumen [ml]
ddH ₂ O	4,0
30% Acrybisacrylamid-Mix	3,3
1,5 M Tris (pH = 8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% Ammoniumpersulfat	0,1
TEMED	0,004

Tabelle 14 Herstellung von 3 ml eines 5% Sammelgels

Name	Volumen [ml]
ddH ₂ O	2,1
30% Acrybisacrylamid-Mix	0,5
1,5 M Tris (pH = 6,8)	0,38
10% SDS	0,03
10% Ammoniumpersulfat	0,03
TEMED	0,003

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
3M Durapore surgical tape	3M Deutschland GmbH
Altromin 1324 TPF	Altromin Spezialfultur GmbH
Brozell-Tücher	Brod GmbH & Co. KG
CELLSTAR® Cell Culture Dishes, 60x15 mm	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® TUBES, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® TUBES, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cryo.STM	Greiner Bio-One GmbH
DietGel® Boost	ClearH2O
Ernährungssonde	Linton Instrumentation
Ethanol	Sigma-Aldrich
Extra Thick Blot Filter Paper, Precut, 19 x 18,5 cm	Bio-Rad Laboratories GmbH

GE Healthcare Life Sciences Amersham™ Protran™ Premium NC Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare
GM500 Käfig	TECNIPLAST S:p.A
HydroGel®	ClearH2O
Injekt® Luer Solo Spritze	B. Braun Melsungen AG
Injekt® Luer Solo, 20 ml	B. Braun Melsungen AG
Kanüle (0,4 x 12 mm; Gr. 27; 0,55 x 25 mm; Gr. 17)	B. Braun Melsungen AG
MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor	Applied Biosystems™
MicroAmp™ Fast 48-Well Tray	Applied Biosystems™
MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip Tubes	Applied Biosystems™
MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	Applied Biosystems™
Microcentrifuge tube 1,5 ml	nerbe plus GmbH & Co. KG
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt AG & Co. KG
Minisart® Filter unit	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Nagerhölzer	ABEDD
Nerbe Plus Premium Surface Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	nerbe plus GmbH & Co.KG
Nitril-Untersuchungshandschuhe	BODY PRODUCTS RELAX Pharma und Kosmetik GmbH
Nunclon™ Delta Surface, 35x10 mm	Thermo Fisher Scientific
PCR microcentrifuge tube 0,2 ml	nerbe plus GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen MultiFlex® -Tips	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen ohne Filter (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG
Ratiolab® Kryo-Boxen 136 x 136 x 50 mm	Ratiolab GmbH
Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
RNase-freies Wasser	Millipore
Skalpell	FEATHER Safety Razor Co., Ltd.
Vasco® Nitril Soft White	B. Braun Melsungen AG

3.1.8 Laborinstrumente

Tabelle 16 *Laborinstrumente*

Name	Hersteller
Assistent Rollenmischer RM 5	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Axio Scan Z1 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Biohit Proline Plus Pipetten (100 µl, 1000 µl)	Sartorius
CONSORT Electrophoresis Power Supply	Consort bvba
ELISA-Reader Multiscan EX	Thermo Fisher Scientific Inc.

Eppendorf Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG
Fisherbrand® Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml)	Fisher Scientific GmbH
Gilson Pipetten (20 µl, 100 µl)	Gilson Incorporated
Heizrührplatte	IKA®-Werke GmbH & Co. KG,
Heraeus® Function Line Incubator	Heraeus Holding
HI2002 edge® pH-Tablet-Messgerät	Hanna Instruments, Inc.
INTAS ECL Chemocam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH
Kühlschränke	Robert Bosch Hausgeräte
Labnet Mini Microcentrifuge	Labnet International, Inc.
Medgenix Diagnostics Easia Shaker Unit	Medgenix Diagnostics
Mini-PROTEAN® Casting Frame	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN® Combs, 15-well, 1,5 mm, 40 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN® Short Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN® Spacer Plates 1,5 mm Integrated Spacers	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module	Bio-Rad Laboratories GmbH
Multipipette, 300 µl	Eppendorf AG
Nanophotometer	Implen GmbH
peqTWIST Vortex-Schüttler	peqlab Biotechnologie GmbH
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG
pipetus® Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
StepOne™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block	Applied Biosystems™
TissueRuptor	Qiagen N.V.
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS HD 2070.2	BANDELIN electronic
UNIVERSAL 320R Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Waage	Mettler-Toledo GmbH

3.1.9 Software

Tabelle 17 Software

Software	Hersteller
ImageJ 1.53a (64-bit)	National Institutes of Health, USA
ChemoStar Imager 0.4.18.0	Intas-Science-Imaging Instruments GmbH

MATERIAL UND METHODEN

StepOne™ Software v2.3	Applied Biosystems™
GraphPad Prism 8.3.0	Graphpad Software Inc.
ZEN 3.4.91.00000	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Inkscape 1.2	Inkscape Developers
Microsoft® Excel® 2019	Microsoft Corporation

3.2 Methoden

3.2.1 Tierversuch

EAE-Induktion, medikamentöse Gabe, Scoring und Tötung der Versuchstiere wurden von Dr. rer. nat. Ranjithkumar Rajendran und Dr. rer. nat. Vinothkumar Rajendran (zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung M.Sc.) durchgeführt.

3.2.1.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden an 6 - 8 Wochen alten, weiblichen Mäusen (*Mus musculus*) des Inzuchtstammes C57BL/6J der Firma Charles River Laboratories durchgeführt und zuvor durch das Regierungspräsidium Giessen (Aktenzeichen: V54 - 19 c20 15h 01 GI 20/18 Nr. G38/2020) genehmigt. Die Experimente wurden im Biomedizinischem Forschungszentrum Seltersberg der Justus-Liebig-Universität Gießen (Finger E, Schubertstr. 81, 35392 Gießen, Deutschland) durchgeführt.

Die Versorgung der Versuchstiere erfolgte unter hochstandardisierten Bedingungen in Barrierehaltung unter statischen Filterhauben des Typs II Long. Es bestand ein 15-20facher Luftwechsel bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10\%$. Die Versuchstiere unterlagen einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14:10 Stunden, in der von 5:00 bis 19:00 Uhr Helligkeit, und von 19:00 bis 5:00 Dunkelheit bestand. In einem Käfig wurden vier bis fünf Versuchstiere gehalten. Den Versuchstieren wurde über den gesamten Zeitraum der Versuche freier Zugang zu Futtermitteln in Form einer Zuchtdiät und Wasser ermöglicht.

3.2.1.2 EAE-Induktion

Nach der Lieferung der Versuchstiere erfolgte eine Latenzzeit von einer Woche zur Akklimatisierung an die Versuchsbedingungen.

Zur Induktion der EAE wurde eine aus *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) und MOG₃₅₋₅₅ bestehende Emulsion vorbereitet. CFA ist ein Adjuvans, welches aus *Incomplete Freund's Adjuvant*, einer Wasser-in-Öl-Emulsion, und zugesetztem abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) besteht. *M. tuberculosis* steigert den auf eine Immunisierung folgenden Antikörpertiter, was CFA zu einer geeigneten Trägerlösung für eine MOG₃₅₋₅₅-induzierte Immunisierung macht⁷⁶. Im Rahmen der EAE-Induktion erfolgte auch die intraperitoneale Verabreichung von *Pertussistoxin*, einem Toxin

des Bakteriums *Bordetella pertussis*, welches die Permeabilität der BHS erhöht und die Initiierung der EAE durch vermehrte Infiltration von Immunzellen in das ZNS erleichtert.¹⁰

Zunächst wurde CFA angesetzt, indem 100 mg *M. tuberculosis* zu 10 ml *Incomplete Freund's Adjuvant* beigegeben wurde. 10 ml CFA, 10 ml PBS und 300 µg MOG₃₅₋₅₅ wurden daraufhin miteinander vermengt und mittels eines Ultraschallgebers fünfmal für je 20 s emulgiert. Danach wurde die Emulsion für zusätzliche 20 s in einem Reagenzglaschüttler gemischt und in ein Spritzensystem gefüllt, in welchem durch wiederholtes Bewegen der Spritzen entstandene Luftblasen entfernt worden sind. Ferner wurden 300 ng Pertussistoxin in 100 µl 1x phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) gelöst.

Zuerst erfolgte die gewichtsunabhängige intraperitoneale Verabreichung von 300 ng Pertussistoxin gelöst in 100 µl PBS pro Versuchstier, wofür eine Kanüle der Größe 27 genutzt wurde. Nach einer Latenzzeit von 60 min wurde unter Zuhilfenahme einer Anästhesieglocke die gewichtsspezifische, inhalative Narkose mit Isofluran eingeleitet. Zur Einleitung wurden 3-4%, zur Erhaltung der Narkose 1,5-2% Isofluran genutzt. Unter narkotisiertem Zustand wurde jedem Versuchstier insgesamt 200 µl der MOG₃₅₋₅₅-enthaltenden Emulsion appliziert. Dazu wurden je vier Mal 50 µl der Emulsion in Axillae und Leisten im Bereich der drainierenden Lymphknoten subkutan injiziert. Dafür wurde eine Kanüle der Größe 17 verwendet. 48 h später erfolgte eine weitere Gabe von 100 µl Pertussistoxin pro Versuchstier. Der Tag der EAE-Induktion markierte den Start der Experimente und wird nachfolgend als Tag 0 *post injectionem* (p. i.) bezeichnet.

3.2.1.3 Medikamentöse Gabe

Diese Ausgangssituation vorausgesetzt erfolgte die randomisierte Einteilung der Versuchstiere in drei Gruppen. Eine Gruppe erhielt ein Placebopräparat und bildete somit die Placebogruppe, die die Referenz der vorliegenden Versuchsreihe darstellte. Die anderen beiden Gruppen erhielten das zu untersuchende Medikament Fexagratinib in zwei verschiedenen Dosierungen. Eine Gruppe erhielt eine geringere Dosierung in Form von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib, die andere Gruppe eine höhere Dosierung in Form von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib. Das Placebopräparat bestand aus 4% DMSO, 30% PEG300, 5% Tween 80 und ddH₂O und wurde in einem Verhältnis von 0,1 ml/20 g Körpergewicht appliziert. Zur Verabreichung von Fexagratinib wurde dieses zuvor in PEG300 und 5% Glukose in einem Verhältnis von 2:1 gelöst. Die medikamentöse Gabe des Placebopräparates und Fexagratinib erfolgte *präventiv* von Tag 0 bis zu Tag 9 p. i.

Die Verabreichung von Fexagratinib und des Placebopräparates erfolgte einmal täglich oral per Sonde. Die Applikation von Fexagratinib und dem Placebopräparat wurde verblindet durchgeführt. Die in dieser Dissertationsschrift aufgeführten Resultate entspringen demnach einer randomisierten kontrollierten Versuchsreihe.

3.2.1.4 Semiquantifizierung des Krankheitsverlaufes

Nach Initiierung der EAE folgte eine Latenzzeit von etwa 10 Tagen, bis die Versuchstiere erste Symptome entwickelten. Im klassischen Verlauf der EAE kommt es nach Erkrankungsbeginn zu einer Zunahme der Symptomatik, welche ihren Höhepunkt an etwa Tag 20 p. i. erreicht. Nach einer vorübergehenden Remission des klinischen Verlaufes von wenigen Tagen kommt es anschließend zu einer erneuten Verstärkung der Symptomatik, welche progredient erfolgt. Die Schwere der Symptomatik wurde bis zum Ende des Experimentes an Tag 41 p. i. semiquantitativ bestimmt, indem spezifischen Symptomen ein Score von 0-5 in Schritten von 0,5 zugeordnet wurde. Dabei handelt es sich um ein häufig verwendetes Schema zur Operationalisierung des EAE-Scores.¹¹⁴ Zudem wurden alle Versuchstiere täglich gewogen. Einen genauen Einblick in Definition der Punktwerte gibt Tabelle 18.

Tabelle 18 Operationalisierung des EAE-Scores

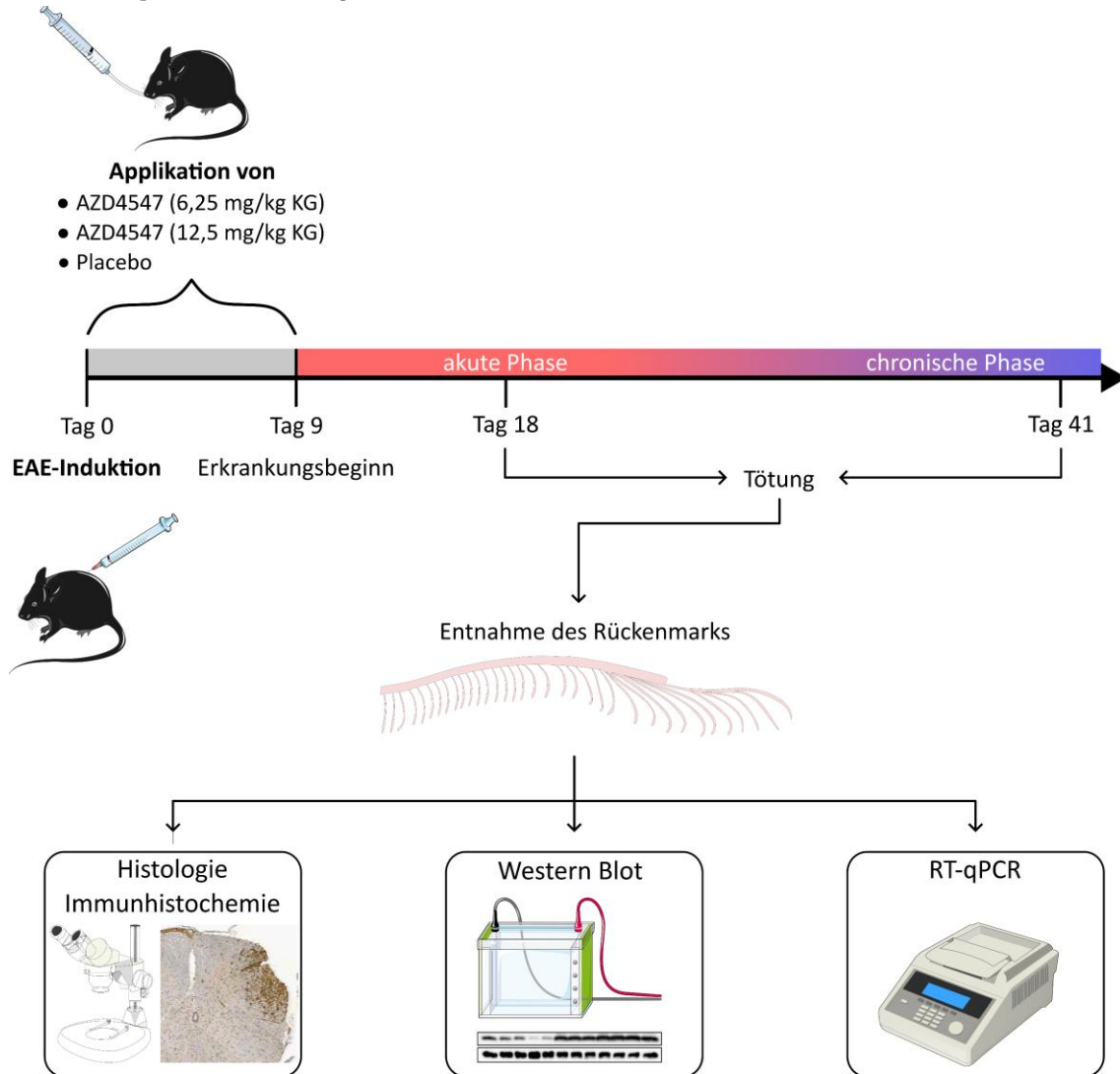
Score	Definition
0	keine erkennbaren Zeichen
0,5	Schwanzspitzenparese
1	Schwanzparese
1,5	leichte Hinterbeinparese
2	mittelschwere Hinterbeinparese
2,5	schwere Hinterbeinparese
3	Hinterbeinplegie
3,5	Hinterbeinplegie und Paresen der Vorderbeine
4	hochgradige Tetraparese
4,5	Tetraparese + Inkontinenz
5	Moribund, Tod

Die Erhebung des EAE-Scores erfolgte täglich, ab einem EAE-Score ≥ 2 oder einem Gewichtsverlust $> 10\%$ zweimal täglich.

3.2.1.5 Studiendesign

Die vorliegende Dissertationsschrift behandelt die Untersuchung der Prävention des Multikinase-Inhibitors Fexagratinib. Das Studiendesign sieht daher die zehntägige präventive Applikation von Fexagratinib bzw. des Placebopräparates von Tag 0 p. i. bis einschließlich Tag 9 p. i. vor, welcher ungefähr den Tag des Erkrankungsbeginnes einer typisch verlaufenden MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE darstellt. Die Gabe von Fexagratinib erfolgte *per os* in zwei verschiedenen, gewichtsabhängigen Dosierungen. Die Versuchstiere erhielten entweder 6,25 oder 12,5 mg/kg KG Fexagratinib über 10 Tage. Die EAE ist eine monophasische Erkrankung, dessen Schub zwischen den Tagen 10 und 20 p. i. verläuft. Dieser Erkrankungsabschnitt wird als *akute Phase* bezeichnet. Die akute Phase der EAE miment den Schubverlauf der MS nach, weshalb dieser Zeitpunkt von großer Bedeutung ist und den ersten Zeitpunkt für weiterführende Analysen darstellt. Im weiteren Verlauf der EAE kommt es zu einer Symptomlinderung für wenige Tage, bis die Erkrankung rezidiert und sich ein chronisch progredienter Verlauf einstellt, welcher als *chronische Phase* betitelt wird. Tag 41 p. i. befindet sich inmitten dieser Phase und stellt für uns daher den zweiten Zeitpunkt für weiterführende Analysen dar. Proteinbiochemische, molekularbiologische und (immun)histologische Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit präsentiert und diskutiert werden, wurden an Rückenmarksproben durchgeführt, die aus an Tag 41 p. i. getöteten Versuchstieren der chronischen Phase entstammen. Das Rückenmark ist für diese Untersuchungen besonders geeignet, da es eine Prädiaktionsstelle für Inflammation, Demyelinisierung und Neurodegeneration in der EAE darstellt.²⁸ Abbildung 6 visualisiert das erläuterte Studiendesign und bietet Aufschluss über erfolgte Analysen an Rückenmarksproben.

Abbildung 6 Studiendesign



Die EAE-Induktion erfolgte mittels Immunisierung durch MOG₃₅₋₅₅ an 6-8 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J-Mäusen, welche definitionsgemäß Tag 0 p. i. darstellt. Daraufhin erfolgte die präventive Applikation von Fexagratinib in einer Dosis von 6,25 oder 12,5 mg/kg KG oder des Placebopräparates von Tag 0 bis 9 p. i. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte an Tag 18 p. i. (akute Phase) oder an Tag 41 p. i. (chronische Phase). Im Anschluss wurde das Rückenmark entnommen und für Histologie, Immunhistochemie, Proteinanalysen (Western Blot) und mRNA-Analysen (RT-qPCR) aufbereitet.

3.2.1.6 Euthanasie und Präparation der Versuchstiere

Für nachfolgende proteinanalytische und molekularbiologische Experimente erfolgte die Tötung der Tiere mittels CO₂-Gas in einer Flussgeschwindigkeit von 7 L/min. Anschließend wurde die Dekapitation der Versuchstiere vorgenommen und Gehirn, Rückenmark und Organe präpariert und entnommen.

Eine immunhistochemische Analyse setzt eine optimale Fixierung des zu untersuchenden Gewebes voraus, weshalb eine Tötung der Versuchstiere, deren Gewebe für diese Analysen eingeplant wurden, mittels kardialer Perfusion von PBS und Paraformaldehyd (PFA) getötet wurden. Zunächst wurden die Versuchstiere unter Zuhilfenahme einer Anästhesieglocke mittels 0,01 ml/10 g KG Fentanyl narkotisiert. Zur Gewährleistung einer tiefen Anästhesie erhielten die Versuchstiere im Anschluss eine intraperitoneale Injektionsnarkose (Tabelle 19). Die ausreichende Tiefe der Narkose wurde durch die Überprüfung der Reflexe an nicht-paretischen Vorderläufen gesichert.

Tabelle 19 *Zusammensetzung der intraperitonealen Injektionsnarkose*

Medikament	Dosis
5% Ketamin	150 - 200 mg/kg KG
Xylazin	10 - 16 mg/kg KG

Die narkotisierten Versuchstiere wurden unter Verwendung von 3M Durapore Kunstseidenpflaster an einen Seziertisch fixiert. Daraufhin wurde die Haut mit einem Skalpell durchtrennt und der Brustkopf vorsichtig eröffnet. Eine Kanüle der Größe 24G wurde in den linken Ventrikel eingeführt, im Anschluss wurde das rechte Atrium durch einen Schnitt eröffnet. Die Öffnung des Herz-Kreislauf-Systems ermöglichte die Perfusion von 10 ml PBS über die in den linken Ventrikel eingeführte Kanüle, welches die Eliminierung des Blutes durch Auslauf aus dem rechten Atrium nach sich zog. Dies erlaubte die Perfusion von 10 ml 4% PFA, welche in einer Perfusionsgeschwindigkeit von 30 ml/min für 10 min über die Kanüle eingebracht wurde. PFA ist eine Fixationssubstanz, welche die Konservierung des Gewebes gewährleistet. Die getöteten Versuchstiere wurden für 7 Tage in 4% PFA postfixiert. Schließlich erfolgte die Präparation des Rückenmarks, das darauffolgend in Paraffin eingebettet wurde. Zur histopathologischen und immunhistochemischen Analyse wurden Schnitte mit einem Durchmesser von 1 µm angefertigt.

3.2.1.7 Abbruchkriterien

Zur Vermeidung einer ethisch bedenklichen Leidenssituation der Versuchstiere wurden im Vorhinein Abbruchkriterien definiert, die nachfolgend aufgelistet sind:

Tabelle 20 Abbruchkriterien

Abbruchkriterien	
1	EAE-Score von 3 und a Veränderung im Verhalten oder b starke Gewichtsabnahme von 20-25% über 2 Tage oder c starke Gewichtsabnahme > 25% oder d Automutilation
2	EAE-Score von 3,5 und a Wegstrecke von 20 cm nicht zurücklegbar, an > 5 aufeinanderfolgenden Tagen oder b eines der Nebenkriterien von 1.
3	Defäkationsunvermögen
4	Paretisch bedingte Abschürfungen und Wunden an Beinen, Bauch oder Pfoten

Ein Versuchstier, welches das Placebopräparat erhielt, wurde aufgrund der Erfüllung der Abbruchkriterien aus dem Versuch entnommen und an Tag 16 p. i. vorzeitig getötet. Von den insgesamt 78 Versuchstieren sind zudem drei vorzeitig tot aufgefunden worden (Tabelle 21).

Tabelle 21 Verstorbene Versuchstiere

Gruppe	Tag (p. i.)	EAE-Score	Veterinärpathologischer Befund
1 6,25 mg/kg KG Fexagratinib	11	0	Mittelgradiges akutes diffuses alveoläres Lungenödem
2 Placebo	38	0,5	unbekannt
3 Placebo	13	0	Megakolon

Tag (p. i.) gibt den Tag an, an dem der Tod der Versuchstiere festgestellt wurde. *EAE-Score* gibt den zuletzt gewerteten Score an.

3.2.2 Proteinanalyse

3.2.2.1 Homogenisieren

Nach der Entnahme der Rückenmarkspalten wurden diese in 2 ml Reagiergefäße überführt, die zuvor mit 200 µl Proteinlysepuffer befüllt wurden. Diese wurden bei 4 °C kurz zwischengelagert und anschließend mithilfe eines Homogenisators für etwa 60 s abgeschlossen. Vor der Homogenisierung der nächsten Probe wurde der Homogenisator gründlich in destilliertem Wasser, Ethanol und Proteinlysepuffer gereinigt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 14.000 x g und 4 °C für 25 min. Danach wurde

der Überstand, der nun alle Proteine der jeweiligen Probe enthielt, entnommen und in sterile Reagiergefäße überführt. Überstände und verbleibender Zelldebris wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte unter Zuhilfenahme des *Pierce™ BCA Assay Kits*, dessen Protokollanweisungen befolgt worden sind. Diese basiert auf der Biuret-Reaktion, im Rahmen derer bei Kontakt mit Proteinen eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in alkalischem Milieu erfolgt. Zwei Moleküle der in dem Assay enthaltenen Bicinchoninsäure gehen mit einem Cu^{1+} -Ion einen lilafarbenen Komplex ein, dessen Absorption von Licht mit einer Wellenlänge $\lambda = 562 \text{ nm}$ in einem festen Verhältnis zur jeweiligen Proteinkonzentration steht.¹⁴⁴

Zunächst wurden 2 μl jeder Probe in 40 μl Proteinlysepuffer verdünnt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden je 10 μl der verdünnten Proben in drei Wells einer 96-Well-Platte überführt, sodass im weiteren Prozedere Triplikate der Proben genutzt worden sind. Zudem wurden vom Hersteller mitgelieferte Standards mit bekannter Proteinkonzentration in die Wells eingeführt, mittels derer sich später die unbekannt Proteinkonzentrationen aus der Absorption herleiten ließen. In jedes befüllte Well wurden nun 200 μl des BCA- und kupferhaltigen Arbeitsreagenzes hinzugegeben. Die 96-Well-Platte wurde für 30 s auf einem Schüttler platziert, um ein gründliches Durchmischen der Proben mit der Arbeitsreagenz zu ermöglichen. Die 96-Well-Platte wurde anschließend bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlungsperiode wurde diese in den *ELISA-Reader Multiscan EX* deponiert und die Absorption von Licht mit einer $\lambda = 540 \text{ nm}$ bestimmt. Mittels der Absorptionsdifferenzen der Standards, deren Proteinkonzentrationen bekannt waren, konnte aufgrund der bestehenden Proportionalität eine Standardgerade gebildet werden, anhand welcher die Konzentrationen der Proben durch die Herstellersoftware berechnet werden konnten. Zuletzt erfolgte die Normalisierung der Proben auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Diese wurden bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Separation von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.⁸¹ SDS ist ein anionisches Detergens, dass die Denaturierung von Proteinen und deren negative Beladung bewirkt.¹⁶ Die

Proteine liegen nach Erhitzen auf 95 °C in ihrer Primärstruktur vor, was eine proportionale Beziehung zwischen Länge und Masse der Proteine unter der Vernachlässigung ihrer Eigenladung erlaubt. Die darauffolgende Separation der Proteine beruht nach Anlegen einer Spannung auf der unterschiedlichen Durchwanderungsgeschwindigkeit, welche nun maßgeblich durch das Molekulargewicht der Proteine bestimmt wird.

3.2.2.3.1 Erstellung der Gele

Die Durchführung der SDS-PAGE setzt die Herstellung eines Trenn- und eines Sammelgels voraus, welche nach obenstehendem Rezept (Tabelle 13 und 14) vorbereitet wurden. Zwei Glasscheiben wurden bündig in ein Gussgestell eingesetzt und bildeten einen nach außen abgeschlossenen Hohlraum mit einem Durchmesser von 1,5 cm, in das zunächst ca. 8 ml des Trenngels und Propanolol zur Verdrängung von Luftblasen überführt wurden. Nach Erhärtung des Trenngels wurde das Propanolol entfernt und ca. 3 ml des Sammelgels auf das Trenngel überführt. Danach wurde ein Kamm eingefügt, der nach Erhärtung des Sammelgels wieder entfernt wurde und 15 Taschen in dem Gel hinterließ. Die Erhärtung der Gele erfolgte durch Polymerisation des Acrylamids, die durch Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert wurde, und nahm ca. 20 min in Anspruch. Das Gel wurde aus dem Gussgestell entnommen und in einem Elektrodenständer fixiert, welcher in einer Gelelektrophoresekammer platziert wurde. Diese wurde zur Hälfte mit Laufpuffer befüllt.

3.2.2.3.2 Gelelektrophorese

Derweil wurden 15 µl der Proben in neue Reagenzgefäße überführt und 5 µl eines Ladefarbstoffes zugesetzt. Der Ladefarbstoff diente einerseits der Visualisierung, andererseits stabilisierte er die Peptidbindungen während des Erhitzens und ermöglichte die Spaltung von Disulfidbrücken durch enthaltenes Beta-Mercaptoethanol. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und gemischt, wodurch das Vorliegen der Proteine in ihrer Primärstruktur ermöglicht werden konnte. Danach wurden 15 µl der Proben sowie, die Proben flankierend, Proteingrößenmarker in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Gelelektrophoresekammer wurde vollständig mit Laufpuffer befüllt und an eine *CONSORT Electrophoresis Power Supply* angeschlossen, sodass die Gelelektrophorese unter den in Tabelle 22 aufgelisteten Bedingungen initiiert werden konnte:

Tabelle 22 *Einstellungen im Rahmen der Gelelektrophorese*

Phase	Spannung	Stromstärke	Leistung	Dauer
1. Phase	90 V	300 mA	150 W	30 min
2. Phase	120 V	1000 mA	150 W	150 min

3.2.2.3.3 Transfer

Nach der Separation der Proteine erfolgte der Transfer dieser von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurde nach Ende der Gelelektrophorese das Gel aus der Gelelektrophoresekammer entnommen, aus den Glasscheiben herausgelöst und für 15 min in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale eingelegt, sodass das gesamte Gel mit dem Transferpuffer bedeckt wurde. Dieses Prozedere wurde ebenso mit zwei Filterpapieren sowie einer Membran aus Nitrocellulose durchgeführt. Anschließend wurden ein Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, das Gel und ein zweites Filterpapier in aufsteigender Reihenfolge im *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* aufeinandergelegt. Nach Auflegen der Filterpapiere und des Gels wurden mithilfe einer Rolle Luftblasen ausgestrichen, um einen komplikationslosen Transfer zu gewährleisten. Nach Anschluss der *Transfer Cell* an den *CONSORT Electrophoresis Power Supply* erfolgte die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran unter den in Tabelle 23 geschilderten Bedingungen:

Tabelle 23 *Einstellungen im Rahmen des Transfers*

Spannung	Stromstärke	Leistung	Dauer
25 V	354 mA	150 W	70 min

Nach Beendigung des Transfers wurde das Gel verworfen und Überstände der Membran mit einem Skalpell entfernt. Die präparierte Membran wurde vorsichtig in einem 50 ml Röhrchen platziert und auf einem Rollenmischer für 70 min in 10 ml 5% BSA bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen des im nächsten Schritt verwendeten primären Antikörpers zu verhindern.

3.2.2.3.4 Proteindetektion

Das Prinzip der Proteindetektion beruht auf einer Immunmarkierung des zu untersuchenden Proteins, bei dem zunächst ein spezifischer primärer Antikörper an ein Epitop des

Proteins bindet. An die F_c-Region des primären Antikörpers kann anschließend ein sekundärer Antikörper binden, an welchen das Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert ist, sodass ein Enzym-Antikörper-Konjugat gebildet wird. In Präsenz von Wasserstoffperoxid katalysiert die Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol unter Emission von Licht, dessen Intensität, welche folglich abhängig von der membrangebundenen Proteinmenge ist, mittels CCD-Kameras visualisiert werden kann.^{53,64}

Zur Proteindetektion wurde die Membran mit dem primären Antikörper in 5 ml 5% *bovinem Serumalbumin* (BSA) benetzt und bei 4 °C für mindestens 14 h inkubiert. BSA diente dabei der Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Danach wurde die Membran drei Mal mit 10 ml 1x TBS-T zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine für je 5 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer gewaschen. Trockenes Magermilchpulver wurde in TBS-T aufgelöst (c = 1 g/20 ml), von dem 5 ml zur Vermengung mit dem sekundären Antikörper genutzt wurden. Dieses diente der weiteren Verhinderung von unspezifischen Bindungen zwischen dem sekundären Antikörper und der Membran. Die Membran wurde mit dem sekundären Antikörper benetzt und inkubiert für 100 min auf einem Rollenmischer bei Raumtemperatur, welche im Anschluss erneut dreimal mit 10 ml 1x TBS-T für je 5 min bei Raumtemperatur gewaschen wurde. Eine luminolhaltige und eine peroxidhaltige Lösung, Komponenten des *SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate Kits*, bildeten das Substrat für die enzymatische Reaktion, indem je 1 ml beider Lösungen in einem 1:1 Verhältnis in ein lichtgeschütztes 50 ml Röhrchen überführt, vorsichtig geschwenkt, und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Membran wurde auf einer Folie platziert, vollständig mit dem angesetzten Substrat benetzt und für 5 min in Dunkelheit inkubiert. Bei der Detektion von MBP und CNPase betrug die Inkubationszeit aufgrund der überreichlichen Proteinmenge lediglich 3 min. Anschließend wurde eine weitere Folie auf die Membran gelegt und mithilfe einer Rolle Luftblasen ausgestrichen. Die Visualisierung der Lichtemission sowie die Aufnahme von Fotos erfolgte mittels *INTAS ECL Chemocam Imager* zu unterschiedlichen Belichtungszeiten.

3.2.2.3.5 Semiquantitative Auswertung des Western Blots

Die semiquantitative densitometrische Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels ImageJ. Hierbei wurden die Banden unter Zuhilfenahme des Rechteck-Werkzeugs der Software markiert, worauf eine Intensitätsmessung initiiert wurde. Diese generierte eine

Intensitätskurve, deren Flächeninhalt der Bandenintensität entsprach und semiquantifiziert wurde. Die Intensität des jeweils zu untersuchenden Proteins wurde mit GAPDH als Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt und durch den Mittelwert der Intensitätsverhältnisse der Placebogruppe dividiert.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 RNA-Extraktion

Zunächst erfolgte der Aufschluss der Rückenmarksproben mittels eines Rotor-Stator-Homogenisators (*TissueRuptor*, Qiagen) unter Zugabe von 350 µl TRK Lysis Buffer, welcher Bestandteil des verwendeten RNA-Isolations-Kits ist. Dem TRK Lysis Buffer wurde zur Spaltung von Disulfidbrücken zuvor β-Mercaptoethanol (β-ME) zugesetzt (20 µl β-ME/1 ml TRK Lysis Buffer).⁵³ Anschließend wurden die homogenisierten Proben bei 14000 x g für 5 min zentrifugiert und auf eine mitgelieferte Säule übertragen, welche bei 13000 x g für 1 min zentrifugiert wurde und überständigen Zelldebris abfing. Das Filtrat wurde nach Zugabe von 350 µl 70 % Ethanol auf eine weitere mitgelieferte Säule, die der Bindung von RNA diente, übertragen, welche bei 10000 x g für 1 min zentrifugiert wurde. Da die RNA nun an die Säule gebunden war, konnte das Filtrat verworfen werden. Es folgten weitere Waschschriffe, zunächst durch Hinzufügen von 500 µl des mitgelieferten RNA Waschpuffers I und Zentrifugation bei 10000 x g für 30 s und anschließend, zweimalig, durch die Zugabe von 500 µl 80 % Ethanol und Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min. Die Säule, an der nun lediglich RNA gebunden war, wurde zur Trocknung bei 14000 x g für 2 min zentrifugiert. Durch Zugabe von 30 µl Nuklease-freiem Wasser und abschließender Zentrifugation bei 14000 x g für 2 min wurde die RNA eluiert und bei -70 °C gelagert.

3.2.3.2 RNA-Quantifikation

Die RNA-Konzentration der Proben wurde photometrisch bestimmt. Es folgte eine anschließende Verdünnung der Proben mit RNase-freiem Wasser, sodass jede Probe eine RNA-Konzentration von 1 µg/30 µl aufwies.

3.2.3.3 Reverse Transkription und Synthese von cDNA

Mittels reverser Transkription sollte nun eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Dies erfolgte mithilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, 205313). Zunächst wurden 30 µl jeder Probe in Reagiergefäße überführt und 3 µl *genomic DNA wipeout buffer* hinzugegeben, welches der Eliminierung genomischer DNA diene und für die Durchführung einer korrekten RT-qPCR unabdingbar ist. Im Anschluss wurden die Proben für 2 min bei 42 °C inkubiert und 6 µl eines Mastermixes jeder Probe hinzugegeben (Tabelle 24).

Tabelle 24 Mastermix Reverse Transkription

Komponenten	Volumen
Reverse Transkriptase Primer Mix	1 µl
Reverse Transkriptase Buffer	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Daraufhin erfolgte die cDNA-Synthese bei 42 °C für 30 min und anschließend die Inkubation bei 95 °C für 3 min. Nach Abschluss dieser wurden jeder cDNA-Probe 160 µl RNase-freies Wasser zugefügt.

3.2.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten und ermöglicht die Detektion dieser bei geringster Mengen. Grundprinzip dieser Methode ist die Trennung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) durch Erhitzen auf 95 °C, woraufhin sich Oligonukleotid-Primer an den zu untersuchenden Genabschnitt binden (*Annealing*) und eine Kopie der DNA-Matrize durch Anschluss von Nukleosidtriphosphaten bei 60 °C am 3'-Ende des besagten Primers gebildet wird (Elongation). Die Präsenz eines *reverse primers* begrenzt dabei den Genabschnitt, der vervielfältigt werden soll. Diese Schritte entsprechen einem Zyklus, der 40-mal wiederholt wurde. Die hier verwendete Reverse-Transkriptase-qPCR (RT-qPCR) ermöglicht die Quantifizierung der zuvor synthetisierten cDNA, indem die Menge der generierten Produkte, die sich direkt proportional zur ursprünglichen Menge der DNA-Matrize verhält, in jedem Zyklus gemessen wird. Dies erfolgt über eine Interkalation des SYBR-Green-I-Farbstoffes in die dsDNA, welcher fluoresziert und gemessen werden kann. Da durch die fortschreitende Amplifikation immer

mehr Kopien gebildet werden, steigt die Intensität der Fluoreszenz, die sich proportional zur Menge der Kopien verhält. So kann der sog. CT-Wert (*cycle of threshold*) bestimmt werden, der die Zyklenzahl angibt, bei dem die Fluoreszenzintensität einen bestimmten, sich am Hintergrund orientierenden Schwellenwert überschreitet.^{3,153}

Zu Beginn wurden dazu 20 µl der verwendeten Primer in 180 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt, der SYBR Green I supermix, RNase freies Wasser und Primer enthielt (Tabelle 25). Der kommerziell erworbene SYBR Green I supermix enthielt bereits die DNA-Polymerase, Nukleotide und den SYBR-Green-I-Farbstoff.

Tabelle 25 *Mastermix RT-qPCR*

Komponenten	Volumen/Well
SYBR Green supermix	10 µl
H ₂ O	7 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl

Der Mastermix wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt, bis jegliche Schlieren aufgelöst waren. Anschließend wurden 19 µl des Mastermix und 1 µl cDNA in die Wells einer 48 Well-Platte pipettiert und erneut vorsichtig gemischt. Nach dem Befüllen der Wells wurden diese mit Kappen verschlossen und für etwa 10 s zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis keine Luftblasen mehr vorhanden waren. Zuletzt wurde die 48-Well-Platte in der PCR-Maschine platziert und die Amplifikation gestartet. Sowohl die zu untersuchenden cDNA-Sequenzen jeder Probe als auch GAPDH, das als Haushaltsgen in sämtlichen Experimenten diente, wurden zweimal amplifiziert. Dabei galten die in der Tabelle 26 dokumentierten Einstellungen.

Tabelle 26 Verlauf der RT-qPCR

Phase	Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Holding Stage		95 °C	10 min	1 x
Cycling Stage	Schritt 1	95 °C	15 s	40 x
	Schritt 2	60 °C	1 min	
Melt Curve Stage	Schritt 1	95 °C	15 s	
	Schritt 2	60 °C	1 min	
	Schritt 3	95 °C	15 s	
Infinite Holding Stage		4 °C	∞	

1 µl eines Blank wurden mit 19 µl des Mastermixes vermengt und zu jeder PCR überprüft. Dies diente dem Ausschluss von Verunreinigungen der Primer und der cDNA-Proben. Eine Schmelzkurvenanalyse zu jeder PCR diente der Bestätigung, dass in jeder Probe der gleiche Genabschnitt amplifiziert wurde.

3.2.3.5 Auswertung

Zur Auswertung wurde die ΔCT -Methode herangezogen. Da Duplikate amplifiziert wurden, wurde zunächst der Mittelwert der CT-Werte des Haushaltsgens GAPDH gebildet und vom CT-Wert des zu untersuchenden Genes subtrahiert.

$$\Delta CT = CT_{Gen} - MW \text{ der } CT_{GAPDH}$$

Mithilfe der ΔCT konnte die sog. *fold change*, also die Änderung der Expression des Genes bestimmt werden. Da das zu untersuchende Gen zweimal amplifiziert wurde, wurde hieraus der Mittelwert gebildet und zur Normalisierung anschließend durch den Mittelwert aller mittleren *fold changes* der Placebogruppe dividiert, um die relative Genexpression zu bestimmen.

$$fold\ change = 2^{-\Delta CT}$$

$$relative\ Genexpression = \frac{mittlere\ fold\ change\ des\ Gens}{MW(mittlerer\ fold\ change\ der\ GAPDH)}$$

3.2.4 Histopathologie und Immunhistochemie

Die Aufbereitung der histopathologischen und immunhistochemischen Präparate erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen.

In der immunhistochemischen Analyse wurden die Effekte von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib mit denen des Placebopräparates auf das Rückenmark verglichen. Untersucht wurden der semiquantitative Inflammationsindex, die Anzahl infiltrierter Immunzellen, genauer CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen und MAC3(+) Makrophagen/Mikroglia, das Ausmaß der Demyelinisierung und die axonale Dichte.

3.2.4.1 Histopathologische Anfärbung

Zur Anfärbung der Präparate mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) wurden diese zur Entparaffinierung zunächst in Xylen eingelegt und anschließend mittels Ethanol rehydratisiert. Die Schnitte wurden daraufhin mit Hämatoxylin für 5 Minuten angefärbt, ehe sie mit ddH₂O gewaschen und zuletzt für 5 Minuten mit Eosin angefärbt und dehydratisiert wurden.

Die Anfärbung der Präparate mit LFB/PAS setzte die Entparaffinierung und Entwässerung mittels Ethanol voraus. Im Anschluss wurden die Präparate in LFB bei 56 °C über Nacht eingelegt. Danach wurde diese für 30 - 40 Sekunden in Kristallviolett angefärbt und zuletzt gewaschen und dehydratisiert.

Zur Silberimprägnation der Präparate nach *Bielschowsky* wurden diese zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Die Silberimprägnation erfolgte durch Inkubation mit Silbernitrat (AgNO₃) für 20 Minuten in Dunkelheit. Anschließend wurden die Präparate in 2% Natriumthiosulfat für 2 Minuten eingelegt, gewaschen und dehydratisiert.

3.2.4.2 Immunhistochemische Anfärbung

Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Präparate zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Im Anschluss wurden diese drei Mal in einer Citratpufferlösung (10 mM, pH 6) für 5 Minuten inkubiert. Zur Inhibition von Peroxidasen erfolgte daraufhin die Inkubation der Präparate mit 3% Wasserstoffperoxid für 10 Minuten. Danach wurden die Präparate in 10% fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) für 1 Stunde eingelegt. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Präparate mit dem jeweiligen primären Antikörper. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate mit einem Biotin-konjugierten Se-

kundärantikörper versehen. Biotin, Avidin und Peroxidasen bilden Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe, welche die Markierung von Antigen-Antikörper-Konjugationen nach Hinzufügen von 3,3'-Diaminobenzidin mit einer braunen Farbe ermöglichen.¹⁴

3.2.4.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden zunächst mikroskopische Aufnahmen mittels eines Axio Scan Z1 Mikroskopes (Carl Zeiss Microscopy GmbH) generiert. Die gesamte Auswertung der immunhistologischen und immunhistochemischen Aufnahmen erfolgte digital mittels der Software *ZEN 3.4.91.00000 (blue edition)* der Carl Zeiss Microscopy GmbH unter steter Verblindung.

3.2.4.3.1 Inflammationsindex

Zunächst wurde der sogenannte *Inflammationsindex* in den Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H&E) der Präparate nach Steinbach und Merkle¹⁵⁰ bestimmt. Die H&E-Färbung bewirkt ein Anfärben von Zellkernen und von Zytoplasma, sodass Zellen unabhängig ihres Zelltyps visualisiert werden.³⁵ Anhand der Anzahl der Zellen konnte ein semiquantitativer Index von 0 bis 5 gebildet werden, welcher einen ersten Eindruck von der Ausprägung Zellinfiltration und somit des inflammatorischen Geschehens schuf. Jede Zellakkumulation eines Querschnittes wurde ihrer Ausprägung nach mit einem Punktwert von 0 bis 5 versehen (Tabelle 27). Anschließend wurde der Inflammationsindex eines Versuchstiers aus dem Mittelwert aller Punktwerte des jeweiligen Versuchstiers bestimmt. Ein geringer Inflammationsindex entspricht demnach einer geringen Zellinfiltration und deutet auf eine geringere Inflammation hin, ein hoher Inflammationsindex hingegen weist auf ein ausgeprägtes inflammatorisches Geschehen und somit auf eine *Läsion* hin.

Tabelle 27 *Inflammationsindex*

Punktwert	Zellanzahl
0	< 8
1	8 - 15
2	16 - 23
3	24 - 31
4	32 - 39
5	< 39

3.2.4.3.2 CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen und MAC3(+) Makrophagen/Mikroglia

Zur Quantifizierung von CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen und MAC3(+) Makrophagen/Mikroglia wurden pro Rückenmarksquerschnitt zehn Bereiche von einer Fläche von je 10.000 μm^2 ausgewählt, die ausgeprägtes inflammatorisches Geschehen aufwiesen, und alle darin enthaltene immunhistochemisch markierte Zellen gezählt. Pro Versuchstier wurden mindestens fünf Querschnitte aus dem gesamten Rückenmark quantifiziert, woraufhin der Mittelwert bestimmt und auf eine Fläche von 1 μm^2 normiert wurde.

3.2.4.3.3 LFB/PAS-Färbung

Die immunhistochemische Färbung mittels *luxol fast blue/periodic acid-Schiff (LFB/PAS)* dient der Identifizierung demyelinisierter Bereiche. Softwareanalytisch wurde die Fläche demyelinisierter Bereiche ausgemessen und in Relation zur Fläche der gesamten weißen Substanz gesetzt.

$$\text{Demyelinisierung [\%]} = \frac{\text{Demyelinisierte Fläche } [\mu^3]}{\text{Fläche der weißen Substanz } [\mu^3]} \times 100$$

Dies wurde in mindestens fünf Querschnitten pro Versuchstier durchgeführt, gefolgt von der Bestimmung der mittleren Demyelinisierung eines jeden Versuchstieres.

3.2.4.3.4 Silberimprägnation nach Bielschowsky

Die Silberimprägnation nach *Bielschowsky* dient der Anfärbung von Axonen und Nervenfasern und erlaubt dadurch die Erfassung der axonalen Dichte.¹³⁹ Dazu wurden zehn Bereiche mit einer Fläche von 5.000 μm^2 innerhalb der WML bestimmt und anschließend alle Axone innerhalb des Bereiches gezählt. Daraufhin wurde der Mittelwert zur Anzahl aller Axone eines Bereiches mit einer Fläche von 5.000 μm^2 innerhalb der NAWM in Relation gesetzt.

$$\text{Axonale Dichte [\%]} = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\text{Axonanzahl in WML})_i}{\text{Axonanzahl in NAWM}}$$

Die axonale Dichte wurde in mindestens fünf Querschnitten pro Versuchstier bestimmt, woraus der Mittelwert gebildet wurde.

3.2.4.3.5 OLIG2(+) OPCs und P25(+) Oligodendrozyten

OLIG2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in OPCs exprimiert wird, eine wichtige Rolle in der Differenzierung von OPCs in Oligodendrozyten spielt und als immunhistochemischer Marker für OPCs dient.¹⁰⁸ P25 wird überwiegend in adulten Oligodendrozyten exprimiert und wurde daher als Marker für diese genutzt.¹²⁰ Die Anzahl an Olig2(+) OPCs und P25(+) Oligodendrozyten wurde pro Rückenmarksquerschnitt in je fünf Bereichen mit einer Fläche von 10.000 μm^2 in WML und der NAWM bestimmt. Wie bei der Quantifizierung infiltrierter Immunzellen erfolgte die Erhebung der Zellanzahl in mindestens fünf Rückenmarksquerschnitten pro Maus, aus denen der Mittelwert bestimmt wurde.

3.2.5 Statistische Analyse

Alle Mäuse und Proben wurden in die Auswertung inkludiert. Die statistische Auswertung der EAE-Scores erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunns-Test für Mehrfachvergleiche. Zur statistischen Auswertung der immunhistologischen und immunhistochemischen Schnitte wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede in Western Blots und der RT-qPCR wurden durch eine einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und anschließendem Bonferroni-Test detektiert. Zur statistischen Analyse wurde die Software GraphPad Prism 8.3.0 genutzt. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, **** $P < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Der Erkrankungsverlauf der EAE

Zuallererst war die Auswirkung der präventiven Gabe von Fexagratinib auf die Symptomausprägung der EAE von Interesse, welche durch ein Bewertungssystem von 0 - 5 festgehalten wurde. Hierzu wurden drei Gruppen inkludiert: Die Mäuse erhielten an den Tagen 0 bis 9 p. i. ein Placebopräparat oder Fexagratinib in einer Dosis von 6,25 mg/kg KG bzw. 12,5 mg/kg KG.

4.1.1 Der Erkrankungsverlauf der EAE nach Gabe des Placebopräparates

Der Symptomverlauf der Mäuse, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden, spiegelte den Verlauf der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in C57BL-Mäusen wider, der in der Literatur beschrieben ist.¹⁰ Erste leichte Symptome traten zwischen den Tagen 9 bis 12 p. i. auf und nahmen weiter zu, bis der Höhepunkt des klinischen Verlaufs zwischen den Tagen 14 bis 18 p. i. erreicht wurde. Im Verlauf der folgenden 10 Tage kam es zu einem Rückgang der Symptome, bis zwischen den Tagen 28 bis 30 p. i. ein Umschlagspunkt erreicht wurde. Hierauf konnte ein Anstieg des EAE-Scores betrachtet werden, welcher für die EAE typisch ist und die nachfolgende Progredienz der Erkrankung ohne weitere Besserung der Symptome widerspiegelt. Aus diesem Grund wird in dieser Phase der Erkrankung auch von der chronischen Phase gesprochen. Alle Versuchstiere, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden, entwickelten im Laufe des Experiments Symptome (Abbildung 7B).

4.1.2 Der EAE-Erkrankungsverlauf nach Gabe von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib

Die Applikation von 6,25 mg/kg KG verzögerte den Krankheitsbeginn der EAE im Vergleich zur Applikation des Placebopräparates nicht (Abbildung 7A). Mäuse, die mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden, wiesen zwischen den Tagen 11 und 18 p. i. geringere mittlere EAE-Scores auf, wobei zwischen den Tagen 13 und 18 p. i. eine statistische Signifikanz zu verzeichnen war (vgl. Tabelle 32 für *P*-Werte) (Abbildung 7B). An Tag 18 p. i., welcher den Höhepunkt der Erkrankung markiert, betragen die mittleren EAE-Scores von Mäusen, die mit Fexagratinib behandelt wurden, $0,71 \pm 0,19$, und von Mäusen, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden, $2,13 \pm 0,16$ (Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler, $P = 0,001$). Mäuse, die mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib behandelt

wurden, wiesen in 4,00 % der Fälle einen schweren Verlauf (EAE-Score $\geq 2,5$) auf, wohingegen 50,00 % der Mäuse, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden, einen schweren Krankheitsverlauf erlitten (Tabelle 28, Abbildung 7C).

Zwischen den Tagen 19 und 41 p. i. erhoben wir im Vergleich zur Placebogruppe stets niedrigere EAE-Scores bei Mäusen, die mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden (Abbildung 7B). Die Unterschiede waren zwar nicht signifikant, jedoch ließen sich an den Tagen 24, 30, 33 und 35 p. i. eindeutige Trends ($P = 0,1$) nachweisen. An Tag 41 p. i. waren 7,69 % der Mäuse, die mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden, von einem schweren Verlauf der EAE betroffen, wohingegen 45,46 % aller Mäuse, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden, einen schweren Verlauf erlitten (Tabelle 28, Abbildung 7D). 80,00 % der Mäuse, die mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden, entwickelten im Laufe des Experiments Symptome. Dies entspricht einem Anteil von 20,00 % an Mäusen, bei denen die EAE nicht ausbrach. Die relative Risikoreduktion beträgt bei vollständiger Penetranz innerhalb der Placebogruppe demnach 20,00%. Der mittlere EAE-Maximalscore war in Mäusen, die 6,25 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, im Vergleich zur Placebogruppe signifikant reduziert. (Tabelle 28, Abbildung 7E).

4.1.3 Der EAE-Erkrankungsverlauf nach Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib

Hinsichtlich des Erkrankungsbeginns ließ sich kein signifikanter Unterschied, jedoch ein Trend feststellen: Mäuse, die 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, erkrankten im Durchschnitt an Tag 12, Mäuse, die das das Placebopräparat erhielten, an Tag 11 (Tabelle 28, Abbildung 7A). Zwischen den Tagen 13 und 19 p. i. führte die Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zur Placebogruppe zu einer signifikanten Reduktion der mittleren EAE-Scores (vgl. Tabelle 32 für P -Werte) (Tabelle 28, Abbildung 7B). An Tag 18 p. i. war der mittlere EAE-Score von Mäusen, die 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, im Vergleich zum mittleren EAE-Score der Placebogruppe signifikant geringer ($0,33 \pm 0,1$ vs. $2,13 \pm 0,16$; $P = 0,001$). Zu diesem Zeitpunkt war keine der Mäuse, die 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, von einem schweren Krankheitsverlauf betroffen (vs. 50,0% in der Placebogruppe) (Tabelle 28, Abbildung 7C).

Von Tag 19 bis Tag 41 p. i. waren die mittleren EAE-Scores der Mäuse, die 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, stets geringer als die mittleren EAE-Scores der Mäuse, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden. Die Unterschiede waren an den Tagen 23, 31, 32, 36 und 38 - 41 p. i. signifikant. Trends hinsichtlich einer Reduktion des mittleren EAE-Scores nach Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib konnten an den Tagen 24, 30, 33 und 35 p. i. verzeichnet werden (vgl. Tabelle 32 für P -Werte) (Abbildung 7B). An Tag

41 p. i. wurden signifikant geringere EAE-Scores bei Mäusen, die 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, im Vergleich zur Placebogruppe erhoben ($0,5 \pm 0,18$ vs. $1,83 \pm 0,21$; $P = 0,038$) (Tabelle 28, Abbildung 7B). Zu diesem Zeitpunkt war, wie schon an Tag 18 p. i., kein Versuchstier von einem schweren Krankheitsverlauf betroffen (vs. 45,46% in der Placebogruppe) (Tabelle 28, Abbildung 7D). 19,23% aller Mäuse, die mit 12,5 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden, entwickelten im Verlauf des Experiments keine EAE. Bei vollständiger Penetranz der EAE in der Placebogruppe beträgt die relative Risikoreduktion durch die Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib 19,23%. Der mittlere EAE-Maximalscore war in Mäusen, die mit 12,5 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden, im Vergleich zur Placebogruppe signifikant reduziert (Tabelle 28, Abbildung 7E).

4.1.4 Der EAE-Erkrankungsverlauf nach Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich

Ab Tag 14 p. i. waren die mittleren EAE-Werte der Mäuse, die mit 12,5 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden, stets niedriger als die der Mäuse, die mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib behandelt wurden. Diese Unterschiede waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant (Tabelle 32, Abbildung 7).

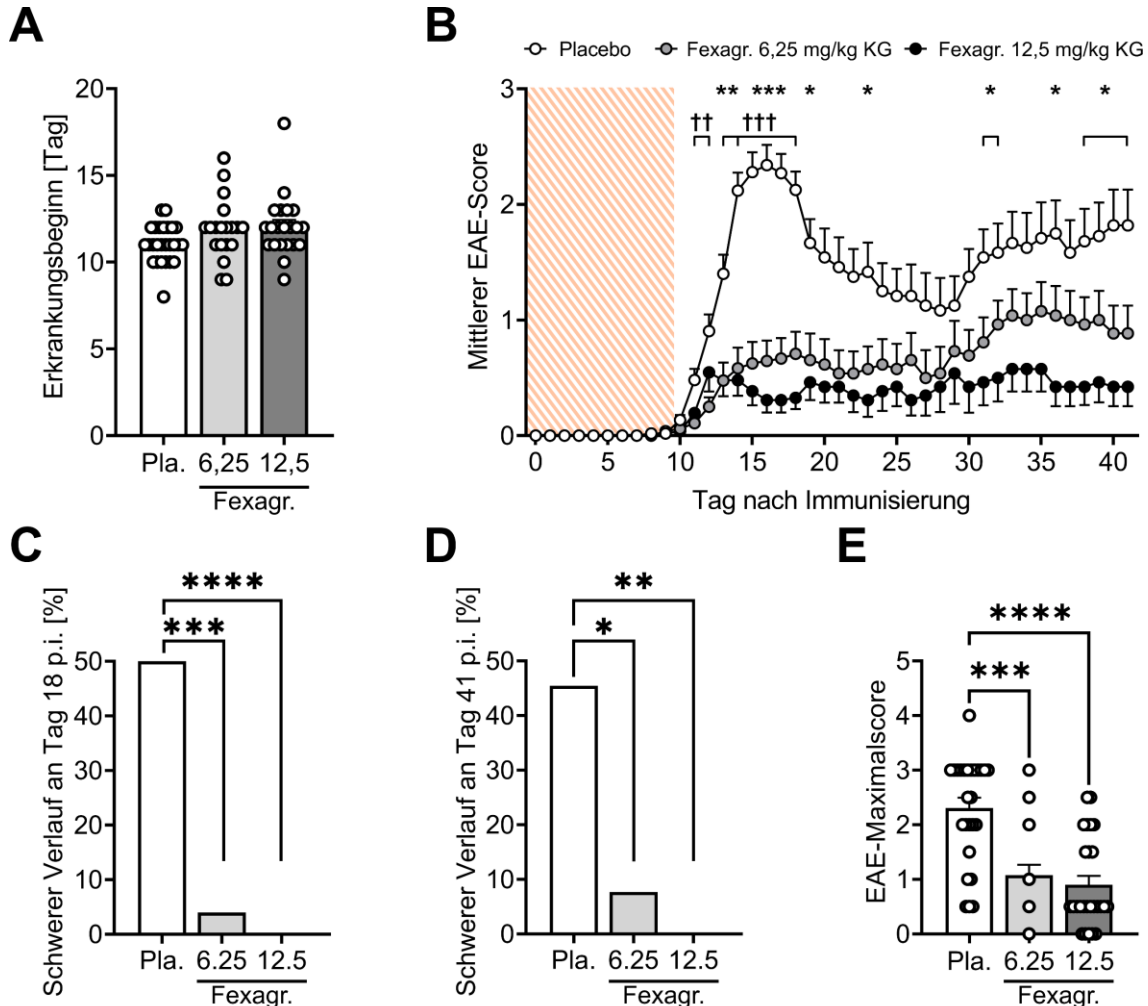
Tabelle 28 Kerndaten des klinischen Verlaufs der EAE

		Pla.	Fexagratinib		P	
			6,25	12,5	6,25	12,5
Tag 18 p.i.	Mittlerer Erkrankungsbeginn [Tag]	$11,08 \pm 0,21$	$11,89 \pm 0,40$	$12,05 \pm 0,39$	0,21	0,0894
	Kein Krankheitsausbruch [%]	0,00%	20,00%	19,23%		
	Mittlerer EAE-Maximalscore	$2,31 \pm 0,19$	$1,10 \pm 0,19$	$0,90 \pm 0,16$	0,0002	<0,0001
	Mittlerer EAE-Score	$2,13 \pm 0,16$	$0,71 \pm 0,19$	$0,33 \pm 0,1$	< 0,001	< 0,001
	Schwerer Verlauf	50,00%	4,00%	0,00%	< 0,0001	< 0,0001
Tag 41 p.i.	Mittlerer EAE-Score	$1,82 \pm 0,31$	$0,89 \pm 0,24$	$0,42 \pm 0,17$	0,442	0,038
	Schwerer Verlauf	45,46%	7,69%	0%	0,0409	0,009

Abk.: Placebo (Pla.), 6,25 bzw. 12,5 (6,25 bzw. 12,5 mg/kg KG). Kruskal-Wallis-Tests mit anschließendem Dunns-Test für Mehrfachvergleiche. Mittlerer Erkrankungsbeginn exkludiert nicht-erkrankte Versuchstiere. $N_{\text{Placebo}} = 26$, $N_{6,25} = 19$, $N_{12,5} = 21$. Darstellung der mittleren EAE-Scores \pm mittleren Standardfehler. Tag 18 p. i.: $N_{\text{Placebo}} = 24$, $N_{6,25} = 25$,

$N_{12,5} = 26$. Tag 41 p. i.: $N_{\text{Placebo}} = 11$, $N_{6,25} = 13$, $N_{12,5} = 13$. Der jeweilige P -Wert bezieht sich auf den Vergleich mit der Placebogruppe. Als schwerer Verlauf galt ein EAE-Score $\geq 2,5$.

Abbildung 7 Erkrankungsbeginn und Krankheitsverlauf

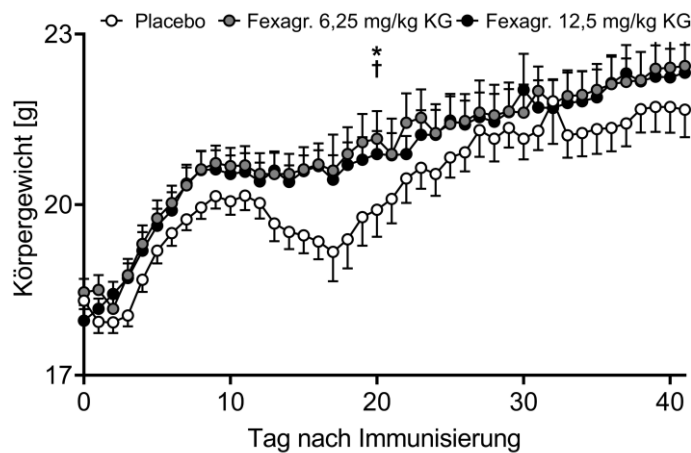


Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.) 6,25 bzw. 12,5 (6,25 bzw. 12,5 mg/kg KG). Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Erkrankungsbeginnes (A). Darstellung des Krankheitsverlaufs anhand der mittleren EAE-Scores \pm mittleren Standardfehler aller Versuchstiere einer Gruppe über den gesamten Krankheitsverlauf. Die orange schraffierte Fläche entspricht dem Zeitpunkt der Medikamentengabe. * gibt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Placebopräparat und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib an. † gibt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Placebopräparat und 6,25 mg/kg KG Fexagratinib an (B). An Tag 18 und 41 p. i. erlitten im Vergleich zur Placebogruppe weniger bzw. keine der Mäuse, die 6,25 bzw. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, einen schweren Krankheitsverlauf (EAE-Score $\geq 2,5$) (C-D). Der EAE-Maximalscore war in Mäusen, die 6,25 oder 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhielten, im Vergleich zum Placebopräparat signifikant reduziert. Darstellung der EAE-Maximalscores + mittlerer Standardfehler (E). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Tag 18 p. i.: $N_{\text{Placebo}} = 24$, $N_{6,25} = 25$, $N_{12,5} = 26$. Tag 41 p. i.: $N_{\text{Placebo}} = 11$, $N_{6,25} = 13$, $N_{12,5} = 13$.

4.2 Gewichtsveränderungen nach Gabe von Fexagratinib

Die Beobachtung möglicher Gewichtsveränderungen nimmt als Hinweis auf eine medikamentös bedingte Toxizität in pharmakologischen Untersuchungen eine wichtige Rolle ein,²⁰ zudem ist Gewichtsverlust ein charakteristisches Symptom der EAE.¹⁰ Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib gegenüber dem Placebopräparat zeigte sich dabei lediglich an Tag 20 p. i. ($P_{6,25} = 0,041$; $P_{12,5} = 0,014$) (Abbildung 8).

Abbildung 8 Gewichtsveränderungen nach Gabe von Fexagratinib



Abk.: Fexagratinib (Fexagr.). Darstellung des mittleren Körpergewichtes \pm mittleren Standardfehler aller Versuchstiere einer Gruppe über den gesamten Krankheitsverlauf. * gibt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Placebopräparat und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib an. † gibt einen Unterschied zwischen dem Placebopräparat und 6,25 mg/kg KG Fexagratinib an. * $P < 0,05$. Tag 18 p. i.: $N_{\text{Placebo}} = 24$, $N_{6,25} = 25$, $N_{12,5} = 26$. Tag 41 p. i.: $N_{\text{Placebo}} = 11$, $N_{6,25} = 13$, $N_{12,5} = 13$.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib führt zur Verringerung der Anzahl infiltrierter Immunzellen

Die Infiltration von Immunzellen in das ZNS nimmt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der MS und der EAE ein. Daher erfolgte zunächst die semiquantitative Bestimmung des Inflammationsindex (0-5) im Rückenmark mittels histologischer Analyse, welcher eine Auskunft über das Ausmaß der Immunzellinfiltration gibt. Darauf folgte mittels immunhistochemischer Analysen die quantitative Bestimmung infiltrierter T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen/Mikroglia in Läsionen des Rückenmarks von Versuchstieren, die mit 12,5 mg/kg KG Fexagratinib oder mit dem Placebopräparat behandelt wurden.

An Tag 18 p. i. zeigte sich eine signifikante Reduktion des Inflammationsindex durch die Applikation von Fexagratinib. Diese Reduktion spiegelte sich auch in der quantitativen Analyse spezifischer Immunzellen wieder. Sowohl CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen, als auch Mac3(+) Makrophagen/Mikroglia waren durch die Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib in ihrer Anzahl deutlich reduziert (Tabelle 29, Abbildung 9).

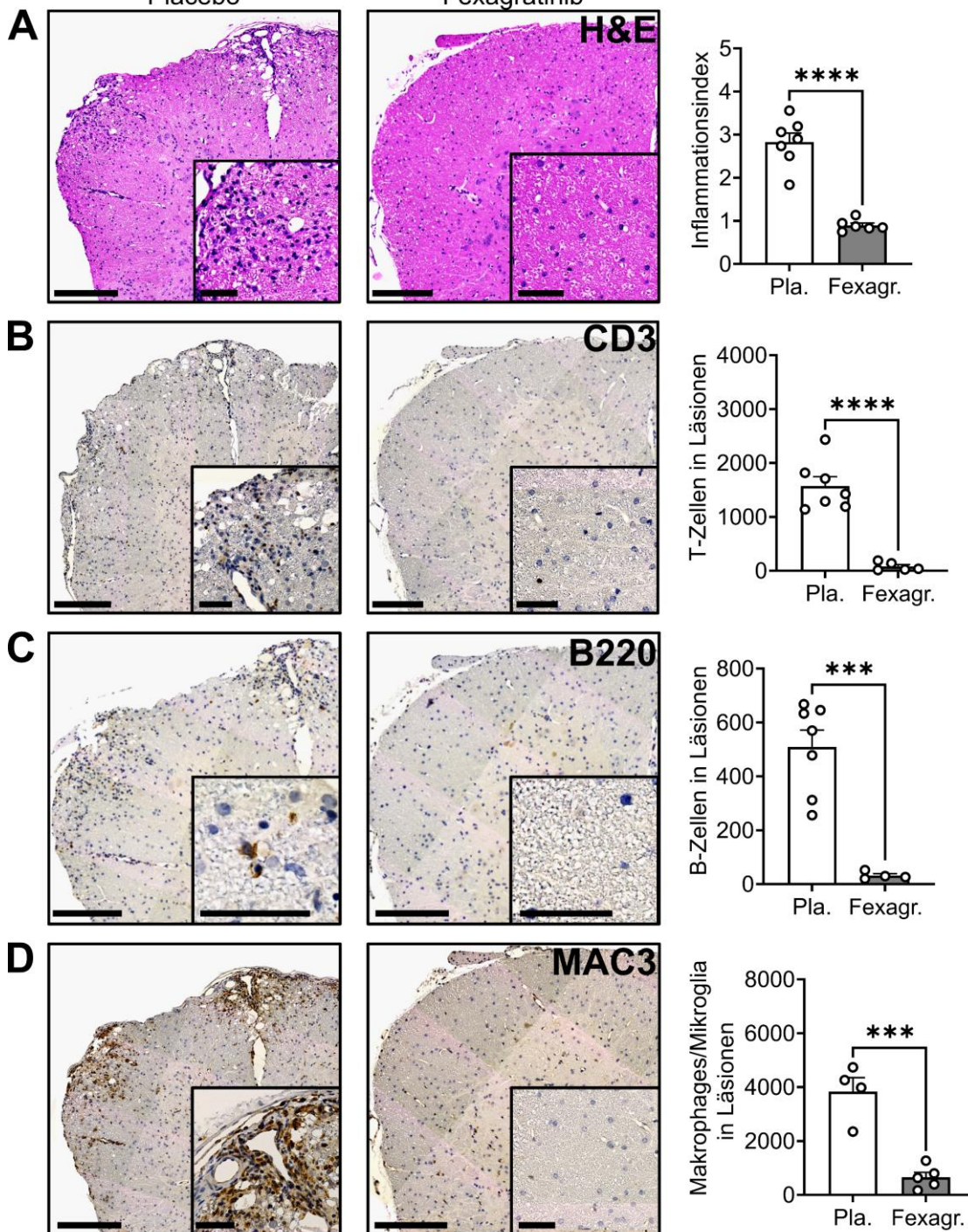
An Tag 41 p. i. konnten ähnliche Ergebnisse verzeichnet werden. Auch hier führte die Applikation von Fexagratinib zu einem verringerten Inflammationsindex. Zudem wurde eine signifikant geringere Anzahl an CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen und Mac3(+) Makrophagen/Mikroglia in den Mäusen, die mit Fexagratinib behandelt wurden, verzeichnet (Tabelle 29, Abbildung 10).

Tabelle 29 *Inflammationsindex und Immunzellinfiltration*

	Tag 18 p. i.			Tag 41 p. i.		
	Pla.	Fexagratinib	P	Pla.	Fexagratinib	P
Inflammationsindex	2,83 ± 0,21	0,90 ± 0,06	< 0,0001	2,86 ± 0,13	1,12 ± 0,21	0,0003
CD3(+) T-Zellen	1573,00 ± 173,10	80,76 ± 35,16	< 0,0001	1236,00 ± 452,50	165,40 ± 51,84	0,0290
B220(+) B-Zellen	509,00 ± 63,70	32,00 ± 7,00	0,0003	386,40 ± 76,74	103,20 ± 17,42	0,0007
MAC(+) Makrophagen/Mikroglia	3834,00 ± 518,00	652,80 ± 187,30	0,0004	4698,00 ± 598,5	622,80 ± 248,20	0,0001

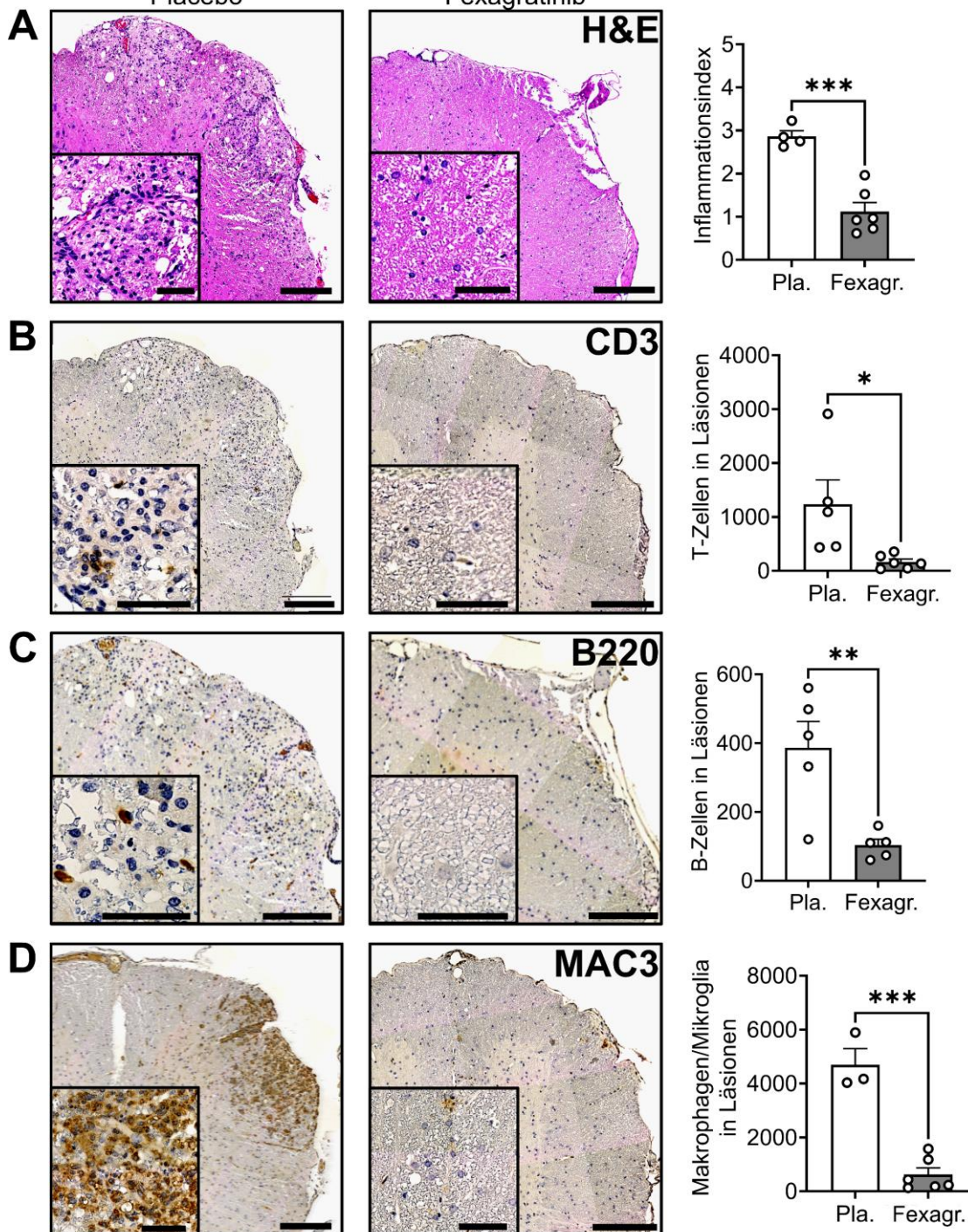
Abk.: Placebo (Pla.). Angegeben ist die Anzahl der CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen und MAC3(+) Makrophagen/Mikroglia in Läsionen bezogen auf eine Fläche von 1 µm². Präsentation der Mittelwerte ± des Standardfehlers.

Abbildung 9 Inflammationsindex und Immunzellinfiltration in Läsionen an Tag 18 p. i. Placebo Fexagratinib



Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.). Der Inflammationsindex **(A)** wurde semi-quantitativ in der H&E-Färbung von Querschnitten des Rückenmarks bestimmt und wurde durch die Gabe von Fexagratinib an Tag 18 p. i. deutlich reduziert. Ebenso war die Anzahl CD3(+) T-Zellen **(B)**, B220(+) B-Zellen **(C)** und MAC3(+) Makrophagen/Mikroglia **(D)** in Läsionen an Tag 18 p. i. signifikant reduziert. Die Zellzahl bezieht sich auf eine Fläche von 1 mm². Die Skala der Übersichtsaufnahme (großes Quadrat) beträgt 200 µm, die der Vergrößerung (kleines Quadrat) 50 µm. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Querschnitten des Rückenmarks und die jeweiligen Mittelwerte + mittleren Standardfehler. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *****P* < 0,0001. *N* = 4 - 7.

Abbildung 10 Inflammationsindex und Immunzellinfiltration Läsionen an Tag 41 p. i. Placebo Fexagratinib



Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.). Der Inflammationsindex **(A)** wurde semi-quantitativ in der H&E-Färbung von Querschnitten des Rückenmarks bestimmt und durch die Gabe von Fexagratinib an Tag 41 p. i. signifikant reduziert. Die Anzahl an CD3(+) T-Zellen **(B)**, B220(+) B-Zellen **(C)** und MAC3(+) Makrophagen/Mikroglia **(D)** in Läsionen an Tag 41 p. i. zeigte sich ebenfalls signifikant reduziert. Die Anzahl der Zellen wurde auf eine Fläche von 1 mm² berechnet. Die Skala der Übersichtsaufnahme (großes Quadrat) beträgt 200 µm, die der Vergrößerung (kleines Quadrat) 50 µm. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Querschnitten des Rückenmarks und die jeweiligen Mittelwerte + mittleren Standardfehler. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *****P* < 0,0001. *N* = 4 - 7.

4.3.2 Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib bewirkt eine Reduktion der Demyelinisierung und erhöht die axonale Dichte in Läsionen

Neben der Inflammation sind die Demyelinisierung und die Neurodegeneration die neuropathologischen Hauptmerkmale der MS und der EAE. Deshalb wurde der Effekt von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib auf die Fläche demyelinisierter Areale und der axonalen Dichte in immunhistochemischen Analysen im Rückenmark untersucht.

Rückenmarksproben von Mäusen, die mit Fexagratinib behandelt wurden, zeigten signifikant kleinere demyelinisierte Areale an Tag 18 p. i. im Vergleich zur Placebogruppe (Tabelle 30, Abbildung 11A). Zudem ließ sich eine signifikant erhöhte axonale Dichte in Mäusen, die mit Fexagratinib behandelt wurden, detektieren (Tabelle 30, Abbildung 11B). Ein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der Läsionen zwischen beiden Gruppen ließ sich nicht detektieren (Tabelle 30, Abbildung 11C). Die Anzahl der Axone in der NAWM war nach Gabe von Fexagratinib ebenfalls signifikant erhöht (Tabelle 30, Abbildung 11D).

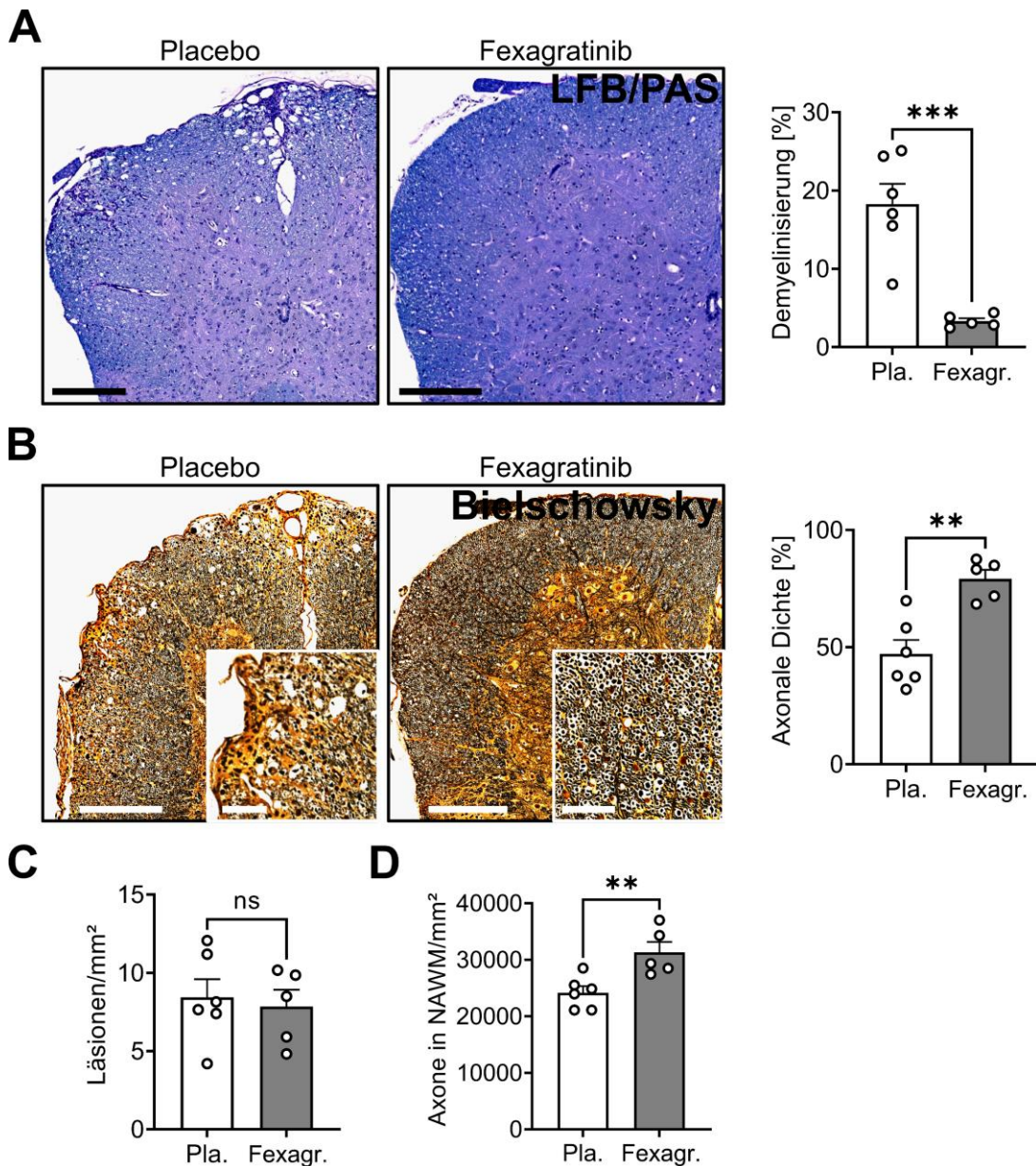
Die Untersuchungen an Tag 41 p. i. erbrachten ähnliche Ergebnisse wie an Tag 18 p. i.: Die Flächen demyelinisierter Areale wurden durch die Applikation von Fexagratinib deutlich reduziert (Tabelle 30, Abbildung 12A). Ferner erhöhte die Applikation von Fexagratinib die axonale Dichte signifikant (Tabelle 30, Abbildung 12B). Die Anzahl der Läsionen wurde nach Applikation von Fexagratinib signifikant reduziert (Tabelle 30, Abbildung 12C). Im Gegensatz zu Tag 18 p. i. zeigte sich hier jedoch kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl an Axonen in der NAWM zwischen beiden Gruppen (Tabelle 30, Abbildung 12).

Tabelle 30 Demyelinisierung und axonale Dichte

	Tag 18 p. i.			Tag 41 p. i.		
	Pla.	Fexagratinib	P	Pla.	Fexagratinib	P
Demyelinisierung [%]	18,28 ± 2,58	3,32 ± 0,35	0,0006	22,87 ± 1,97	2,56 ± 0,99	< 0,0001
Axonale Dichte [%]	47,17 ± 5,92	79,20 ± 3,80	0,0019	26,99 ± 3,65	68,04 ± 5,43	0,0006
Anzahl der Läsionen/mm ²	8,44 ± 1,16	7,85 ± 2,39	0,7217	6,17 ± 0,33	2,78 ± 1,29	0,0343
Anzahl der Axone in NAWM/mm ²	24178 ± 1158	31317 ± 1844	0,0079	20741 ± 2319	25284 ± 2598	0,2452

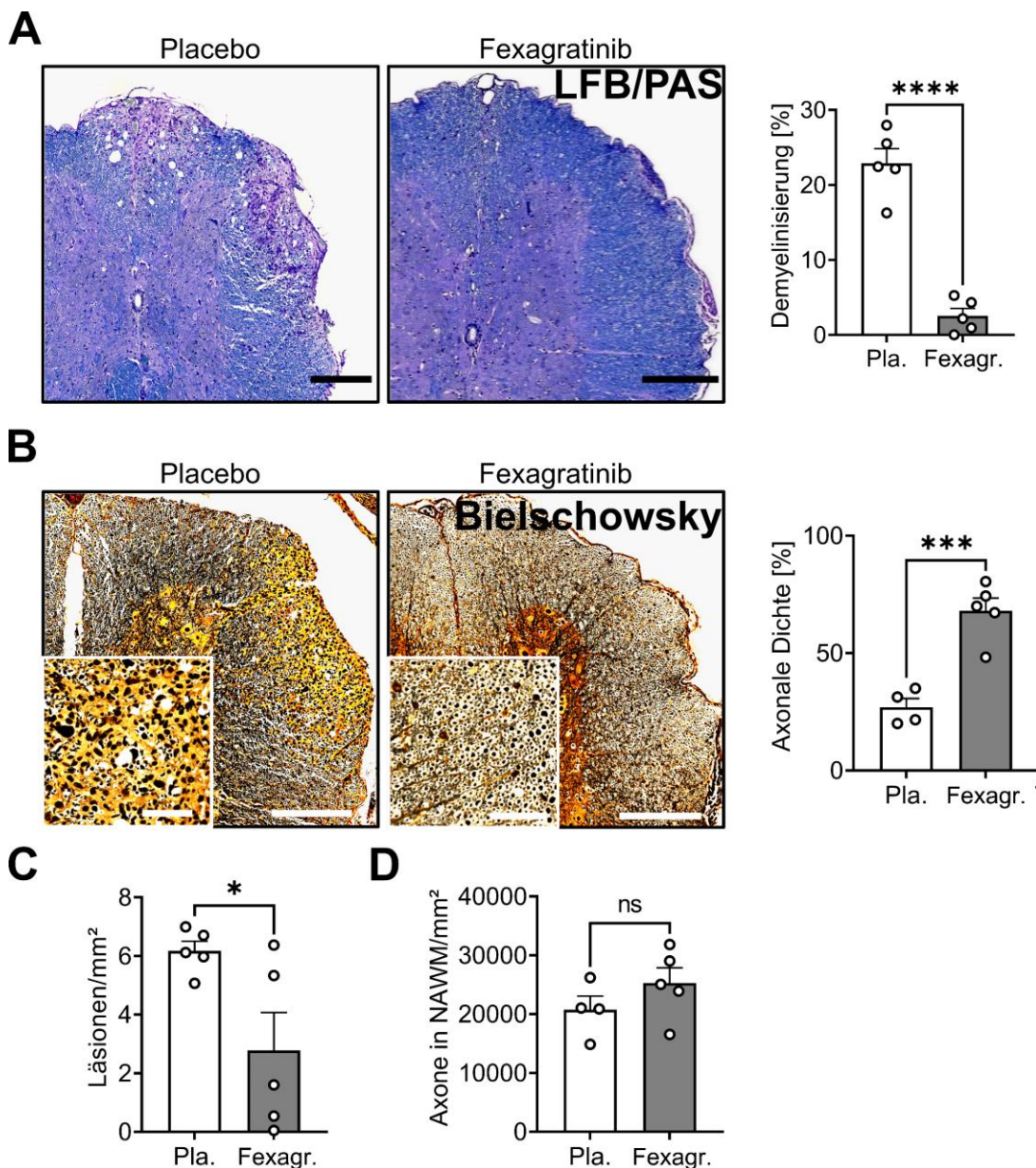
Abk.: Placebo (Pla.). Die Demyelinisierung [%] ergibt sich aus der Relation demyelinisierter Flächen zur Fläche der gesamten weißen Substanz [%]. Die axonale Dichte [%] ergibt sich aus der Relation der Axonanzahl in Läsionen zur Axonanzahl in der NAWM. Die Daten werden als Mittelwerte ± mittleren Standardfehler präsentiert. N = 5 - 6.

Abbildung 11 Demyelinisierung und axonale Dichte an Tag 18 p. i.



Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.). Mithilfe der LFB/PAS-Färbung wurden demyelinisierte Areale an Tag 18 p. i. kenntlich gemacht (**A, C**). Es zeigte sich eine signifikante Flächenreduktion demyelinisierter Areale durch die Applikation von Fexagratinib (**A**). Die Anzahl der Läsionen bezogen auf eine Fläche von 1 mm² blieb unverändert (**C**). Axone wurden mit der Silberfärbung nach Bielschowsky an Tag 18 p. i. kenntlich gemacht (**B, D**). Die axonale Dichte in Läsionen bezogen zur jeweiligen axonalen Dichte in der NAWM war nach Gabe von Fexagratinib erhöht (**B**). Dabei zeigte sich auch eine Erhöhung der Anzahl der Axone in der NAWM bezogen auf eine Fläche von 1 mm² in der Gruppe, die mit Fexagratinib behandelt wurde (**D**). Die Skala der Übersichtsaufnahme (großes Quadrat) beträgt 200 µm, die der Vergrößerung (kleines Quadrat) 50 µm. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Querschnitten des Rückenmarks und die jeweiligen Mittelwerte ± mittleren Standardfehler. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. $N = 5 - 6$.

Abbildung 12 Demyelinisierung und axonale Dichte an Tag 41 p. i.



Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.). Demyelinisierte Areale wurden durch die LFB/PAS-Färbung an Tag 41 p. i. kenntlich gemacht (**A, C**). Die Flächen demyelinisierter Areale wurden durch die Applikation von Fexagratinib signifikant reduziert (**A**). Die Anzahl der Läsionen bezogen auf eine Fläche von 1 mm² zeigte sich nach Applikation von Fexagratinib ebenfalls geringer (**C**). Durch die Silberfärbung nach Bielschowsky wurden Axone an Tag 41 p. i. visualisiert (**B, D**). Die axonale Dichte in Läsionen bezogen zur jeweiligen axonalen Dichte in der NAWM war nach Gabe von Fexagratinib erhöht (**B**). Die Anzahl der Axone in der NAWM (bezogen auf eine Fläche von 1 mm²) zeigte keinen signifikanten Unterschied (**D**). Die Skala der Übersichtsaufnahme (großes Quadrat) beträgt 200 µm, die der Vergrößerung (kleines Quadrat) 50 µm. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Querschnitten des Rückenmarks und die jeweiligen Mittelwerte ± mittleren Standardfehler. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. $N = 4 - 5$.

4.3.3 Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erhöht die Anzahl adulter Oligodendrozyten in Läsionen

Um die Wirkungen von Fexagratinib auf adulte Oligodendrozyten und deren Vorläufer zu untersuchen, wurden diese mittels immunhistochemischer Analysen in Läsionen sowie in der NAWM im Rückenmark quantifiziert.

An Tag 18 p. i. war die Anzahl an Olig2(+) OPCs in Mäusen, die mit Fexagratinib behandelt wurden, sowohl in Läsionen als auch in der NAWM erhöht (Tabelle 31, Abbildung 13A und B). Diese Unterschiede haben zwar keine Signifikanz vorzuweisen, jedoch besteht ein eindeutiger Trend. Die Anzahl an P25(+) adulten Oligodendrozyten in Läsionen wurde durch die Applikation von Fexagratinib signifikant erhöht (Tabelle 31, Abbildung 13A). In der NAWM konnte kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl an P25(+) adulten Oligodendrozyten festgestellt werden (Tabelle 31, Abbildung 13B).

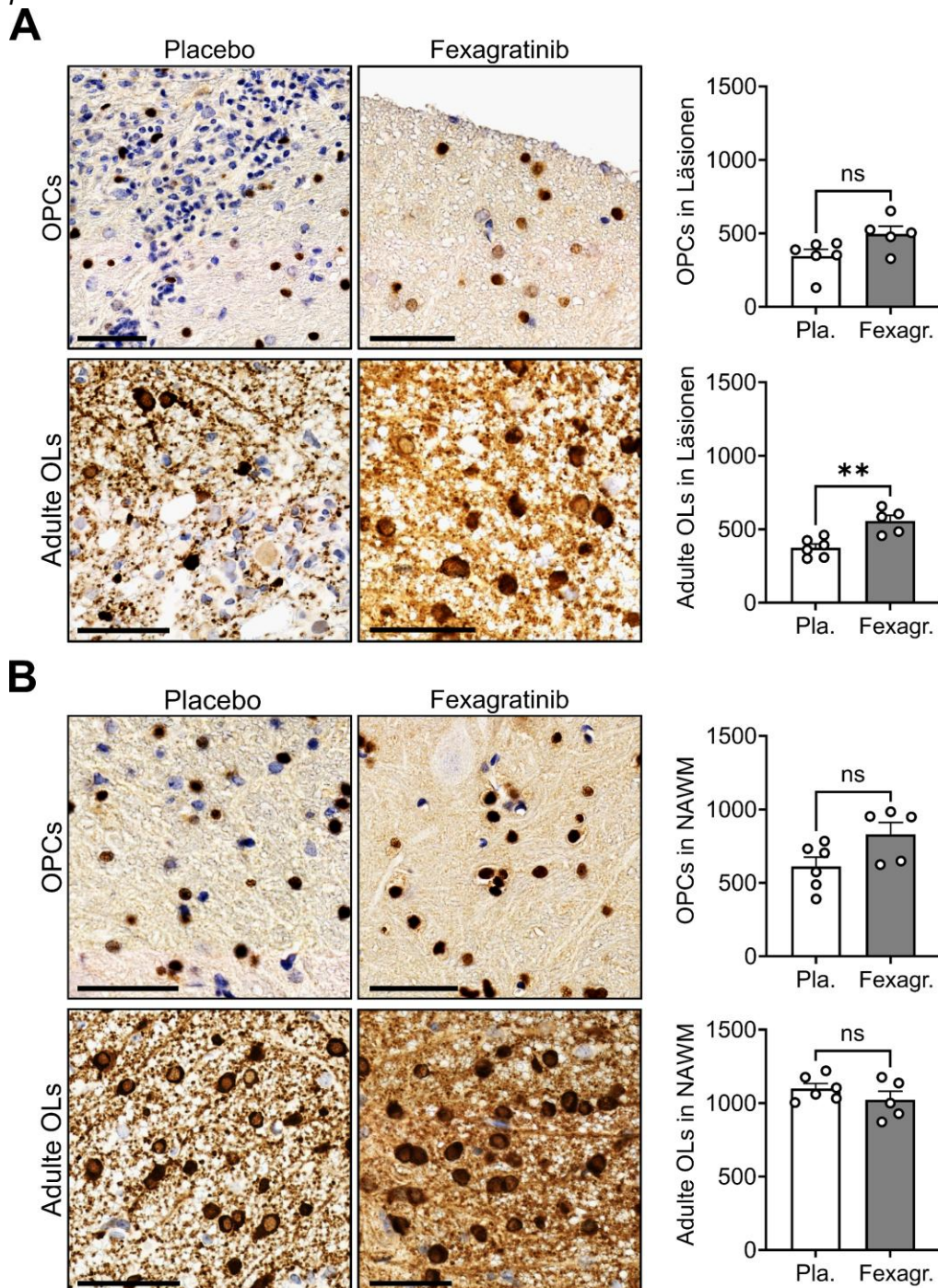
An Tag 41 p. i. war die Anzahl an Olig2(+) OPCs weder in Läsionen noch in der NAWM durch die Gabe von Fexagratinib verändert (Tabelle 31, Abbildung 14A und B). Ebenso rief die Applikation von Fexagratinib keine Änderung der Anzahl an P25(+) adulten Oligodendrozyten in Läsionen oder der NAWM hervor (Tabelle 31, Abbildung 14A und B).

Tabelle 31 Quantifizierung von Olig2(+) OPCs und P25(+) adulten Oligodendrozyten

		Tag 18 p. i.			Tag 41 p. i.		
		Pla.	Fexagratinib	P	Pla.	Fexagratinib	P
Läsionen	Olig2(+) OPCs	345,6 ± 45,40	496,8 ± 51,87	0,055	272,8 ± 29,57	206 ± 27,63	0,134
	P25(+) adulte Oligodendrozyten	374 ± 25,98	556,8 ± 37,60	0,0026	544,0 ± 77,28	503,3 ± 60,58	0,684
NAWM	Olig2(+) OPCs	611,9 ± 62,88	831,2 ± 80,02	0,0565	557,6 ± 28,02	552,8 ± 91,73	0,9613
	P25(+) adulte Oligodendrozyten	1099 ± 34,46	1022 ± 58,54	0,2679	1094 ± 38,55	1006 ± 18,96	0,0747

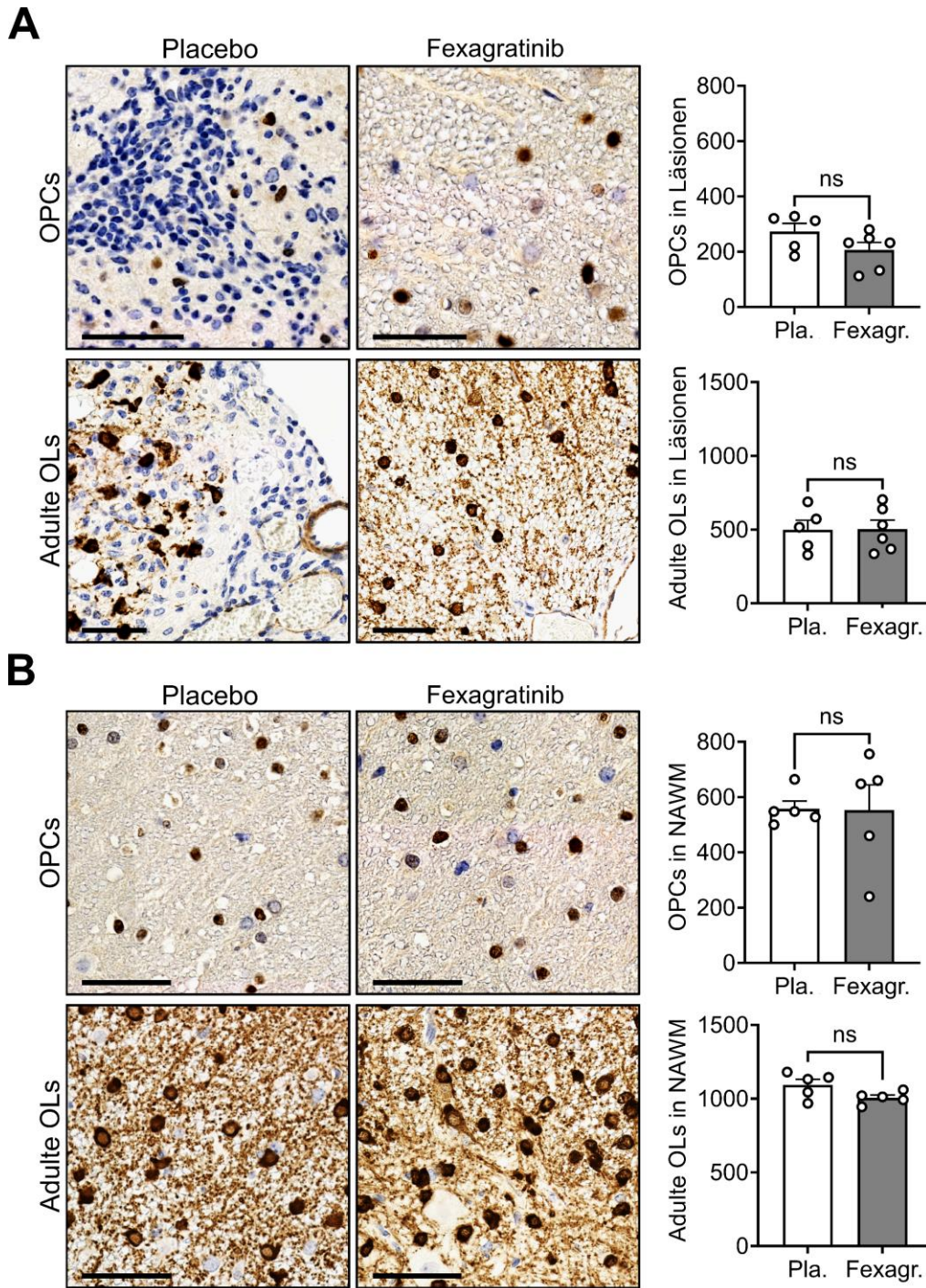
Abk.: Placebo (Pla.) Es wird die Anzahl der Oligodendrozyten normiert auf eine Fläche von 1 mm² angegeben. Dargestellt werden diese als Mittelwert ± mittleren Standardfehler. N = 5 - 6.

Abbildung 13 Oligodendrozyten und Vorläuferzellen in Läsionen und NAWM an Tag 18 p. i.



Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.). P25(+) adulte Oligodendrozyten (OLs) und Olig2(+) OPCs wurden an Tag 18 p. i. in Läsionen **(A)** und in der NAWM **(B)** quantifiziert. Die Anzahl an Olig2(+) OPCs blieb nach Gabe von Fexagratinib in Läsionen unverändert. Die Anzahl an P25(+) OLs war nach Applikation von Fexagratinib in Läsionen erhöht **(A)**. In der NAWM blieb die Anzahl an P25(+) OLs oder Olig2(+) OPCs nach Applikation von Fexagratinib unverändert **(B)**. Die Skala beträgt 50 µm. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Querschnitten des Rückenmarks. Die jeweiligen Mittelwerte ± mittlerer Standardfehler beziehen sich auf eine Fläche von 1 mm². * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. $N = 5 - 6$.

Abbildung 14 Oligodendrozyten und Vorläuferzellen in Läsionen und NAWM an Tag 41 p. i.



Abk.: Placebo (Pla.), Fexagratinib (Fexagr.). P25(+) adulten Oligodendrozyten (OLs) und Olig2(+) OPCs wurden an Tag 41 p. i. in Läsionen **(A)** und in der NAWM **(B)** quantifiziert. Olig2(+) OPCs und P25(+) OLs blieben hinsichtlich ihrer Anzahl nach Applikation von Fexagratinib in Läsionen unverändert **(A)**. Auch in der NAWM zeigte sich die Anzahl an P25(+) OLs und Olig2(+) OPCs nach Applikation von Fexagratinib ohne signifikante Veränderung **(B)**. Die Skala beträgt 50 µm. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Querschnitten des Rückenmarks. Die jeweiligen Mittelwerte ± mittlerer Standardfehler beziehen sich auf eine Fläche von 1 mm². *N* = 5 - 6.

4.4 Proteinexpression

Nachfolgend geschildert werden die Ergebnisse der Proteinanalyse, im Rahmen derer die Expression von Proteinen der FGF/FGFR-Signalkaskade, VEGFR2, CSF1R, Komponenten der Myelinscheide sowie mitochondrialen Proteinen an Tag 41 p. i. im Rückenmark untersucht wurde.

4.4.1 Wirkungen von Fexagratinib auf die FGF/FGF-Signalkaskade

Da es sich bei Fexagratinib um einen FGFR-Inhibitor handelt, interessierte uns zunächst dessen Einfluss auf die Expression von Proteinen, die in der FGF/FGFR-Signalkaskade von Bedeutung sind.

Hinsichtlich der Expression von FGFR1 zeigte sich kein Unterschied zwischen den Versuchstieren, die das Placebopräparat oder 6,25 mg/kg KG Fexagratinib erhielten ($P = 0,5993$). Die Expression von FGFR2 blieb nach der Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zur Placebogruppe unverändert ($P = 0,3596$) (Abbildung 15).

Die Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib führte im Vergleich zur Placebogruppe zu keiner Veränderung der Expression von FGFR1 ($P = 0,7816$). Allerdings ließ sich eine signifikant verminderte Expression von FGFR2 durch Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zur Placebogruppe nachweisen ($P = 0,0096$) (Abbildung 15).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass 12,5 mg/kg KG Fexagratinib eine Reduktion der Expression von FGFR2 bewirkt. Die Expression von FGFR1 blieb stets unverändert.

4.4.2 Wirkungen von Fexagratinib auf pERK und pAkt

ERK und Akt sind wichtige Kinasen in der FGF/FGFR-Signalkaskade. Diese werden im Verlauf der Signalkaskade durch Phosphorylierung aktiviert, weshalb die Expression von phosphoryliertem ERK und Akt (pERK und pAkt) untersucht wurde (Abbildung 15).

Die Gabe von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib führte zu keiner Veränderung der Expression von pERK im Vergleich zur Placebogruppe ($P = 0,8384$). Ebenso war kein Unterschied bezüglich der Expression von pAkt festzustellen ($P = 0,5087$) (Abbildung 15).

Ferner blieb die Expression von pERK durch Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib in Relation zur Placebogruppe unverändert ($P = 0,2554$). 12,5 mg/kg KG Fexagratinib übte zudem keinen Einfluss auf die Expression von pAkt aus ($P = 0,4448$) (Abbildung 15).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder pERK noch pAkt hinsichtlich des Ausmaßes ihrer Expression durch Fexagratinib beeinflusst wurden.

4.4.3 Wirkungen von Fexagratinib auf die VEGF/VEGFR2-Signalkaskade und CSF1R

Fexagratinib inhibiert neben FGFR1-3 auch VEGFR2 und CSF1R, weshalb wir dessen Effekte auf diese und auf VEGF, den wichtigsten Liganden von VEGFR2, untersuchten.

Die Expression von VEGF verblieb durch die Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zur Placebogruppe unverändert ($P = 0,9702$). Auch dessen zugehöriger Rezeptor VEGFR2 zeigte keine Veränderung des Expressionsausmaßes durch die Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib ($P = 0,6041$). Auch hinsichtlich der Expression von CSF1R konnte kein Unterschied zwischen der Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib und des Placebopräparates festgestellt werden ($P = 0,1128$) (Abbildung 15).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bzgl. der Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib erfasst. Die Expression von VEGF wurde durch 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat nicht reguliert ($P = 0,9998$). 12,5 mg/kg KG Fexagratinib bewirkte keine Veränderung der Expression des zugehörigen Rezeptors VEGFR2 ($P = 0,3246$). Außerdem hatte die Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib keinen Einfluss auf die Expression von CSF1R ($P = 0,6341$) (Abbildung 15).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass kein Einfluss von Fexagratinib auf die Expression von VEGF, VEGFR2 und CSF1R detektiert wurde.

4.4.4 Wirkungen von Fexagratinib auf TrkB und BDNF

BDNF ist ein Neurotrophin, welches als Ligand der auf den meisten Neuronen exprimierten Rezeptortyrosinkinase TrkB neuroprotektiv wirkt.

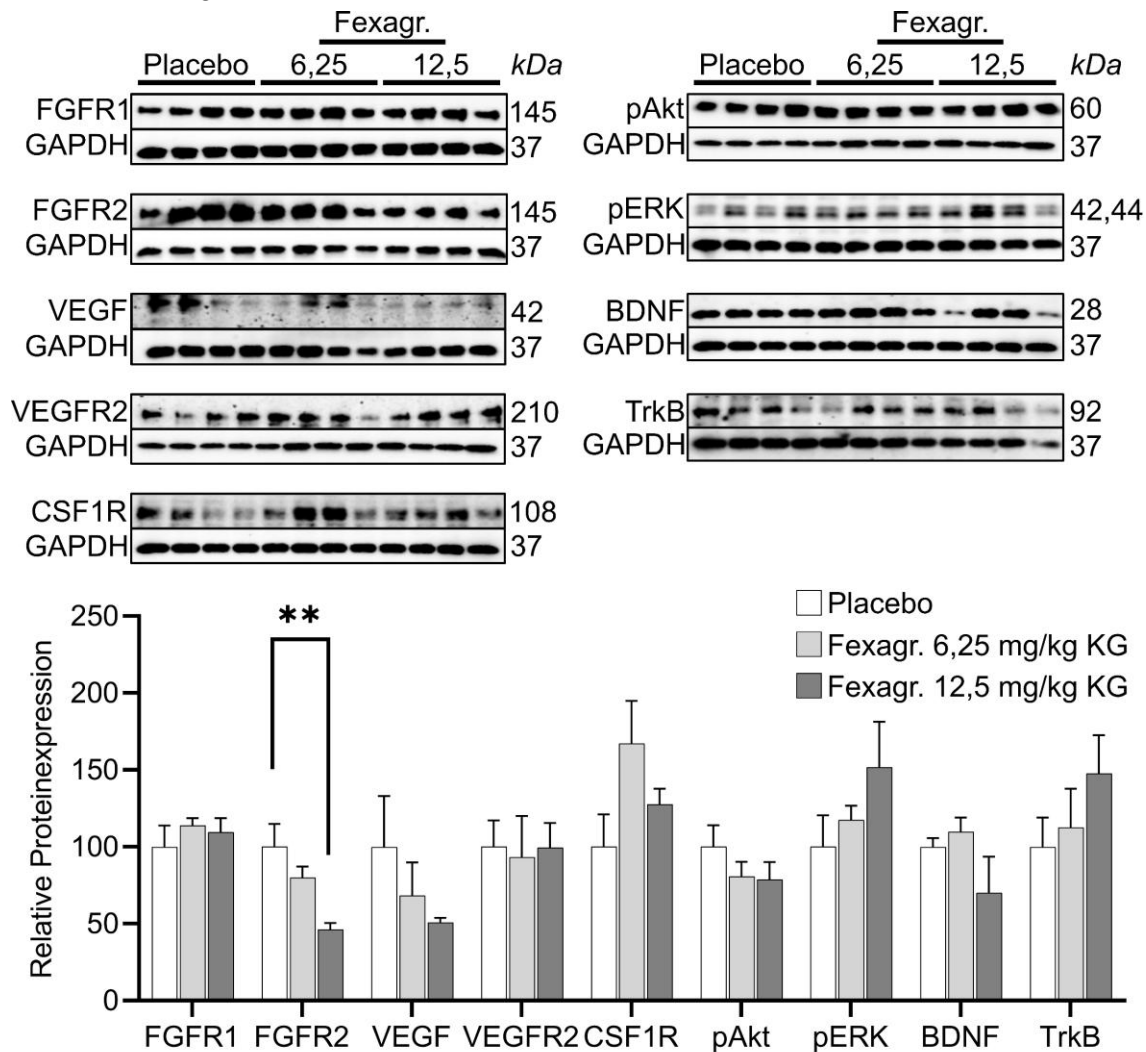
Die Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib resultierte in keiner Veränderung der Expression von BDNF im Vergleich zur Placebogruppe ($P = 0,8945$). Auch die Expression des zugehörigen Rezeptors TrkB verblieb bei Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib unverändert ($P = 0,9234$) (Abbildung 15).

Wir detektierten entsprechende Ergebnisse bei der Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib. Im Vergleich zur Placebogruppe konnte kein Einfluss von 12,5 mg/kg KG

Fexagratinib auf die Expression von BDNF ($P = 0,3767$) oder TrkB ($P = 0,3630$) festgestellt werden (Abbildung 15).

Alles in allem konnte weder nach Applikation von 6,25 noch von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib ein Einfluss auf die Expression von BDNF und TrkB beobachtet werden.

Abbildung 15 Relative Proteinexpression der FGF/FGFR-, VEGFR2-, CSF1R- und BDNF/TrkB-Signalkaskade



Abk.: Fexagratinib (Fexagr.). In der Untersuchung der relativen Expression von Proteinen, die in die FGF/FGFR-, VEGFR2-, CSF1R- und BDNF/TrkB-Signalkaskaden eingebunden sind, konnte eine signifikante Reduktion der Expression von FGFR2 durch die Applikation von 12,5 mg/kg KG FGFR2 festgestellt werden. FGFR1, VEGF, VEGFR2, CSF1R, pAkt, pERK, BDNF und TrkB blieben durch Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG unreguliert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte + mittlerer Standardfehler in Relation zur normierten Proteinexpression bei Applikation des Placebopräparates. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. $N = 4$.

4.4.5 Wirkungen von Fexagratinib auf Komponenten der Myelinscheide

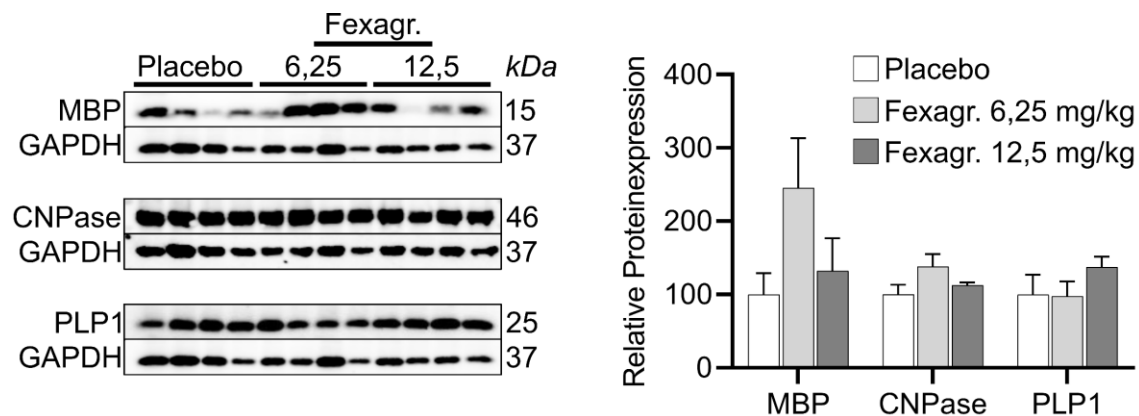
MBP, PLP1 und CNPase sind wichtige Bestandteile der Myelinscheide im ZNS, weshalb wir die Effekte von Fexagratinib auf das Ausmaß ihrer Expression untersuchten.

Zwischen der Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib und des Placebopräparates fanden wir keinen Unterschied in der Expression von MBP ($P = 0,1542$), PLP1 ($P = 0,9959$) oder CNPase ($P = 0,1420$) (Abbildung 16).

Ebenso wenig Einfluss übten 12,5 mg/kg KG Fexagratinib auf die Expression von MBP ($P = 0,8928$), PLP1 ($P = 0,4604$) oder CNPase ($P = 0,7776$) im Vergleich zum Placebopräparat aus (Abbildung 16).

In der Zusammenschau der Ergebnisse kann somit festgehalten werden, dass die Gabe von Fexagratinib unabhängig von der gewählten Dosis keine Veränderung der Expression der untersuchten Myelinbestandteilen bewirkt.

Abbildung 16 Relative Proteinexpression von Komponenten der Myelinscheide



Abk.: Fexagratinib (Fexagr.). Die relative Expression von MBP, CNPase und PLP1 wurde durch Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib nicht reguliert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte + mittlerer Standardfehler in Relation zur normierten Proteinexpression bei Applikation des Placebopräparates. $N = 4$.

4.4.6 Wirkungen von Fexagratinib auf mitochondriale Proteine

Mitochondriale Prozesse nehmen eine bedeutende Rolle in der in MS und EAE festzustellenden Neurodegeneration ein. Daher untersuchten wir den Einfluss von Fexagratinib auf wesentliche mitochondriale Proteine, namentlich ATP-Synthase Subunit β , ATP6E, mt-ND1, SOD-2 und SDHD.

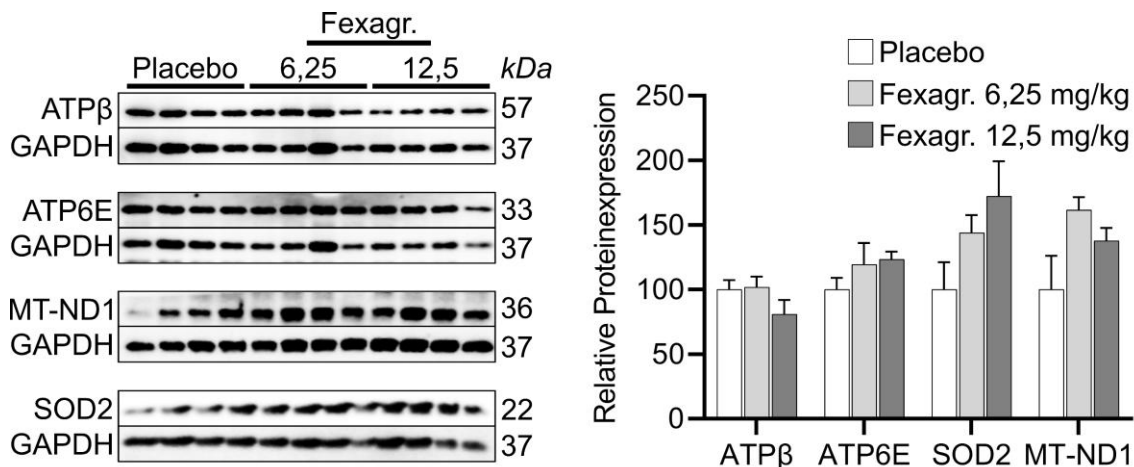
Die Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib bewirkte keine Regulation der ATP-Synthase Subunit β ($P = 0,9885$), ATP6E ($P = 0,4901$), MT-ND1 ($P = 0,0727$) und SOD-2 ($P = 0,3560$) im Vergleich zur Placebogruppe (Abbildung 17).

Desgleichen beobachteten wir keine Unterschiede in der Expression der ATP-Synthase Subunit β ($P = 0,3333$), ATP6E ($P = 0,3682$), MT-ND1 ($P = 0,3081$) und SOD-2 ($P = 0,0922$) zwischen der Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib und des Placebopräparates (Abbildung 17).

Die Expression von SDHD konnte im Western Blot in keiner Gruppe nachgewiesen werden.

Insgesamt wies demnach keines der untersuchten mitochondrialen Proteine eine veränderte Expression durch eine Behandlung der Versuchstiere mit Fexagratinib auf.

Abbildung 17 Relative Proteinexpression mitochondrialer Proteine



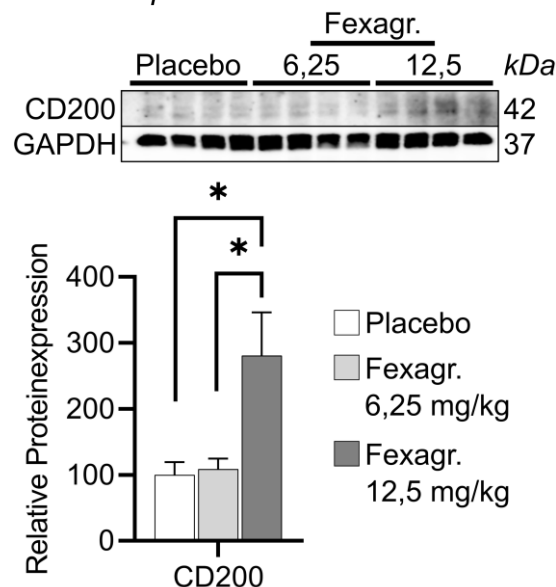
Abkürzungen: Fexagratinib (Fexagr.), ATP-Synthase Subunit β (ATP β). Die relative Expression mitochondrialer Proteine blieb durch Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib unreguliert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte + mittlerer Standardfehler in Relation zur normierten Proteinexpression bei Applikation des Placebopräparates. $N = 4$.

4.4.7 Wirkungen von Fexagratinib auf CD200

CD200, auch *OX-2 membrane glycoprotein*, ist ein immunsuppressives Glykoprotein, das die Aktivierung proinflammatorischer Mikroglia inhibiert und in der MS und der EAE vermindert exprimiert wird.⁹³

Es konnte kein Unterschied bezüglich der Expression von CD200 zwischen der Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib und des Placebopräparates festgestellt werden ($P = 0,9877$). Die Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib hingegen erhöhte die Expression von CD200 im Vergleich zur Placebogruppe ($P = 0,0283$). Auch im Vergleich mit 6,25 mg/kg KG Fexagratinib war die Expression von CD200 durch 12,5 mg/kg KG Fexagratinib gesteigert ($P = 0,0357$) (Abbildung 18).

Abbildung 18 Relative Proteinexpression von CD200



Abk.: Fexagratinib (Fexagr.). Die relative Expression von CD200 zeigte sich nach Applikation von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zur Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib und des Placebopräparates signifikant verstärkt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte + mittlerer Standardfehler in Relation zur normierten Proteinexpression bei Applikation des Placebopräparates. $N = 4$.

4.4.8 Zusammenfassung der Untersuchung der Proteinexpression

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Gabe von Fexagratinib die Modulation der FGF/FGFR-Signalkaskade bewirkt. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib bewirkte eine **verminderte Expression von FGFR2**. Ein Einfluss von Fexagratinib auf VEGF, VEGFR2 und CSF1R wurde nicht detektiert. Ebenso verblieben die in der FGF/FGFR-Signal-

kaskade bedeutenden Kinasen pERK und pAkt durch die Gabe von Fexagratinib unreguliert. Ferner wurden keine Unterschiede in der Expression von BDNF und TrkB beobachtet. Die Expression von Myelinkomponenten sowie mitochondrialen Proteinen blieb durch die Applikation von Fexagratinib unverändert. Das immunsupprimierende Glykoprotein **CD200** wurde durch die Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib **vermehrt exprimiert**.

4.5 Genexpression

Um den Effekt von Fexagratinib auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen, wurden die Genexpressionen der FGF/FGFR-Signalkaskade, Remyelinisierungsinhibitoren, Myelinkomponenten und Zyto- und Chemokine mittels RT-qPCR an Tag 41 p. i. bestimmt.

4.5.1 Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression der FGF/FGFR-Signalkaskade

Zur Evaluation des Effektes von Fexagratinib auf die FGF/FGFR Signalkaskade wurde die Genexpression von *Fgfr1*, *Fgfr2* und *Fgf2* untersucht.

Dabei zeigte sich keine Veränderung des mRNA-Levels von *Fgfr1* durch die Applikation von 6,25 oder 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat (Pla. vs. Fexagratinib 6,25 mg: $P = 0,9999$; Pla. vs. Fexagratinib 12,5 mg: $P = 0,9999$). Desgleichen blieb die Genexpression von *Fgfr2* durch Behandlung mit Fexagratinib unverändert (Pla. vs. Fexagratinib 6,25 mg: $P = 0,1429$; Pla. vs. Fexagratinib 12,5 mg: $P > 0,9999$). Die Genexpression von *Fgf2* unterschied sich nach Applikation von Fexagratinib ebenso nicht von dem Placebopräparat (Pla. vs. Fexagratinib 6,25 mg: $P > 0,9999$; Pla. vs. Fexagratinib 12,5 mg: $P > 0,9999$) (Abbildung 19A).

4.5.2 Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von *Bdnf* und *Trkb*

Um einen möglichen Einfluss von Fexagratinib auf die transkriptionelle Regulation von *Bdnf* und seinem zugehörigen Rezeptor *TrkB* näher zu beleuchten, wurde die Genexpression dieser untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Genexpression von *Bdnf* bei Behandlung mit Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat unbeeinflusst blieb (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$). Auch die Genexpression von *Trkb* unterlag durch Behandlung mit Fexagratinib keiner Veränderung (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,5079$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$) (Abbildung 19A).

4.5.3 Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Inhibitoren der Remyelinisierung

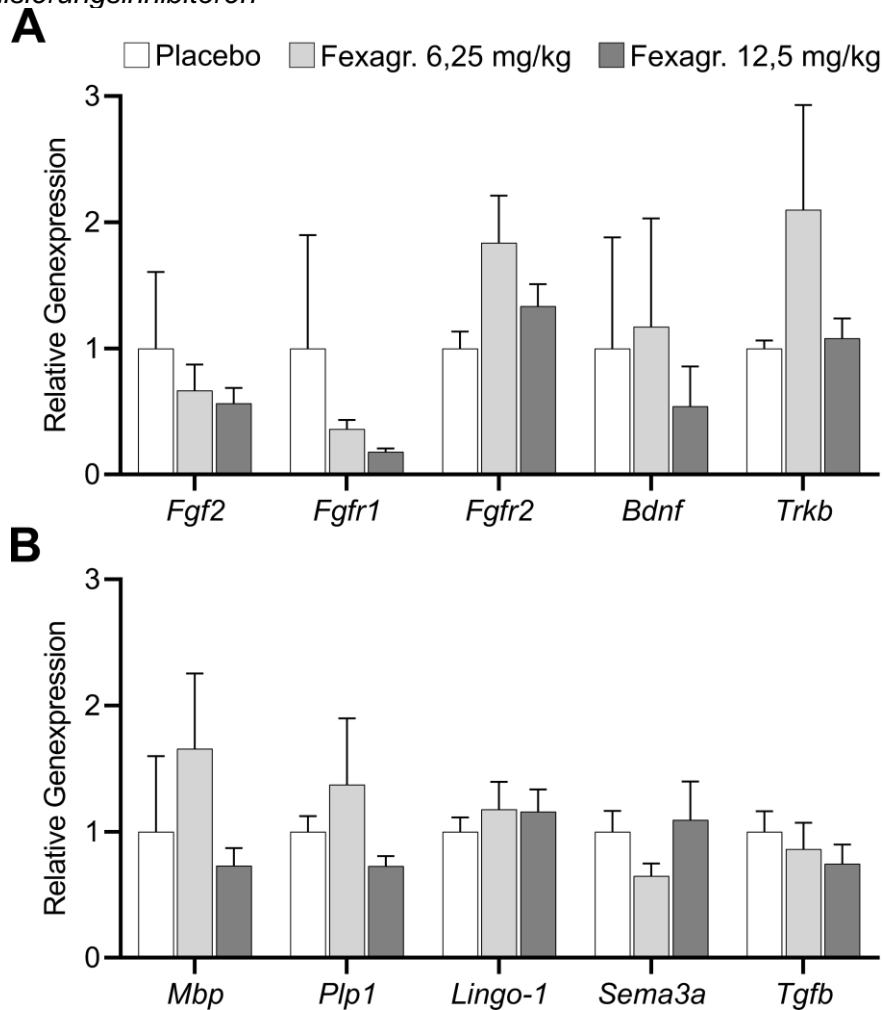
Da Remyelinisierung bzw. dessen Inhibierung einen wichtigen Aspekt in der Pathogenese der MS einnimmt, wurde die relative Genexpression der Remyelinisierungsinhibitoren *Lingo1*, *Tgfb* und *Sema3a* bestimmt.

Die Genexpression von *Lingo1* blieb durch Applikation von Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat unreguliert (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$). Ebenso wies die Genexpression von *Tgfb* keinen Unterschied zwischen der Behandlung mit Fexagratinib und dem Placebopräparat auf (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,8434$). Es konnte zudem keine Differenz der Genexpression von *Sema3a* in den Versuchstieren, die mit Fexagratinib behandelt wurden, im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,7877$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$) (Abbildung 19B).

4.5.4 Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Myelinbestandteilen

Zur Evaluation von Komponenten der Myelinscheide wurde die relative Genexpression von *Mbp* und *Plp1* bestimmt. Dabei konnte im Vergleich zur Placebogruppe keine veränderte Genexpression von *Mbp* in den Versuchstieren, die mit Fexagratinib behandelt wurden, beobachtet werden (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$). Ebenso blieb die Genexpression von *Plp1* durch Applikation von Fexagratinib im Vergleich zur Placebogruppe unbeeinflusst (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$) (Abbildung 19B).

Abbildung 19 Relative Genexpression der Signalkaskade, Myelinkomponenten und Remyelinisierungsinhibitoren



Abk.: Fexagratinib (Fexagr.). Die relative Genexpression von Komponenten der Signalkaskade blieb durch die Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib unreguliert (**A**). Die relative Genexpression von Komponenten der Myelinscheide (*Mbp* und *Plp1*) sowie von Remyelinisierungsinhibitoren (*Lingo-1*, *Sema3a* und *Tgfb*) blieb durch die Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG ebenfalls unverändert (**B**). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte + mittlerer Standardfehler in Relation zur normierten Genexpression bei Applikation des Placebopräparates. $N = 3 - 4$.

4.5.5 Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von Zyto- und Chemokinen

Zytokine nehmen in inflammatorischen Prozessen eine zentrale Rolle ein, weshalb die relative Genexpression von *Il-1b*, *Il-6*, *Il-12*, *Ifng* und *Nos2* untersucht wurde.

Es konnte kein Unterschied der Genexpression von *Il-1b* durch Applikation von Fexagratinib verglichen zur Placebogruppe festgestellt werden (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,5478$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,3759$). Desgleichen kam es hinsichtlich der Genexpression von *Il-6* zu keiner Veränderung zwischen Fexagratinib

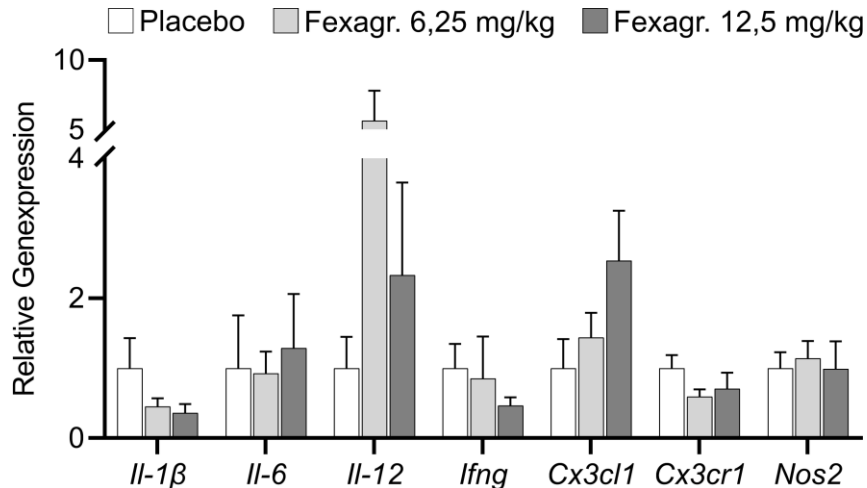
und dem Placebopräparat (Pla. vs. Fexagratinib 6,25 mg: $P > 0,9999$; Pla. vs. Fexagratinib 12,5 mg: $P > 0,9999$). Ebenso blieb die Genexpression von *Il-12* zwischen Fexagratinib und dem Placebopräparat unverändert (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,1621$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$). Die Applikation von Fexagratinib führte zu keiner Regulation der Genexpression von *Ifng* (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,9139$). Außerdem wies die Genexpression von *Nos2* keinen Unterschied im Vergleich von Fexagratinib und dem Placebopräparat auf (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$) (Abbildung 20).

4.5.6 Wirkungen von Fexagratinib auf die Genexpression von CX3CL/CX3CR-Signalkaskade

Das Gen *C-X3-C motif chemokine ligand 1 (Cx3cl1)* kodiert CX3CL1, welches zur Gruppe der Chemokine gehört und über seinen zugehörigen Rezeptor CX3CR1 die Chemotaxis diverser Immunzellen in der MS und der EAE bewirkt.⁷³

Die Genexpression von *Cx3cl1* wurde durch Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat nicht reguliert (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P > 0,9999$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,2212$). Ebenso ließen sich keine Unterschiede hinsichtlich der Genexpression von *Cx3cr1* durch die Applikation von Fexagratinib verglichen zur Placebogruppe aufzeigen (Pla. vs. 6,25 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,5735$; Pla. vs. 12,5 mg/kg KG Fexagratinib: $P = 0,8947$) (Abbildung 20).

Abbildung 20 Relative Genexpression von Zyto- und Chemokinen



Abk.: Fexagratinib (Fexagr.). Die relative Genexpression der Zytokine (*Il-1b*, *Il-6*, *Il-12*, *Ifng*), der Chemokine (*Cx3cl1*, *Cx3cr1*) und *Nos2* blieb durch die Applikation von 6,25 und 12,5 mg/kg KG Fexagratinib unreguliert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte + mittlerer Standardfehler in Relation zur normierten Genexpression bei Applikation des Placebopräparates. *N* = 3 - 4.

4.5.7 Zusammenfassung der Untersuchung der Genexpression

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder 6,25 noch 12,5 mg/kg KG Fexagratinib eine Veränderung der Genexpression hinsichtlich der FGF/FGFR- und BDNF/Trkb-Signalkaskaden (*Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Bdnf*, *Trkb*), Myelinkomponenten (*Mbp*, *Plp1*), Remyelinisierungsinhibitoren (*Lingo-1*, *Sema3a*, *Tgfb*), Zytokine (*Il-1b*, *Il-6*, *Il-12*, *Ifng*, *Nos2*) oder Chemokine (*Cx3cl1*, *Cx3cr1*) im Vergleich zur Applikation des Placebopräparates bewirkten.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation behandelt die Untersuchung des präventiven Effektes von Fexagratinib auf die EAE in Mäusen. Fexagratinib ist ein Multikinase-Inhibitor, der FGFR1-3, VEGFR2 und CSF1R inhibiert. Hierzu wurde Fexagratinib in einer Dosierung von 6,25 oder 12,5 mg/kg KG bzw. ein Placebopräparat über 10 Tage vor Krankheitsbeginn verabreicht. In den randomisiert-kontrollierten Versuchen wurde im Tierexperiment der Einfluss von Fexagratinib auf den klinischen Verlauf der EAE untersucht und im Rückenmark laboranalytisch dessen Auswirkungen auf die Infiltration von Immunzellen, das Ausmaß der Demyelinisierung, die Neurodegeneration, OPCs und Oligodendrozyten, (Re-)Myelinisierung, Signalkaskaden der Zielrezeptoren, proinflammatorische Zyto- und Chemokine sowie Mitochondrien untersucht. In den Versuchen zeigte sich durch die Applikation von Fexagratinib eine deutliche Reduktion der Symptome über den gesamten Erkrankungsverlauf und eine relative Risikoreduktion von 77 % (6,25 mg/kg KG) bzw. 100 % (12,5 mg/kg KG), an einem schweren Verlauf der EAE zu erkranken. Die Behandlung mit 12,5 mg/kg KG Fexagratinib führte darüber hinaus zu einer verminderten Infiltration von T-Zellen, B-Zellen, und Makrophagen/Mikroglia in Läsionen, einer verringerten Demyelinisierung und einer erhöhten axonalen Dichte in der akuten und in der chronischen Phase. Zudem beobachteten wir eine erhöhte Anzahl an Oligodendrozyten in demyelinisierten Läsionen zum Zeitpunkt des Erkrankungshöhepunktes. Die Expression von Myelinbestandteilen, Remyelinisierungsinhibitoren, proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen und mitochondrialen Proteinen blieb durch Fexagratinib unbeeinflusst.

Die Wirkweise von Fexagratinib auf den Krankheitsverlauf der EAE lässt sich zunächst wie folgt konstruieren: Fexagratinib inhibiert FGFR1-3 oder VEGFR2 oder CSF1R (oder eine Kombination dieser) und vermindert dadurch die Immunzellinfiltration. Die verminderte Immunzellinfiltration wiederum führt zu geringerem Schaden von Myelinscheiden, Axonen und Oligodendrozyten und trägt so zu verminderter Demyelinisierung bei.²⁶ Verminderte Demyelinisierung wiederum trägt zu einer reduzierten Neurodegeneration bei. Außerdem bewirkt die chronische Inflammation durch Produktion von ROS und mitochondriale Dysfunktion Neurodegeneration.²⁸ Des Weiteren ließen sich mehr Oligodendrozyten auffinden, was entweder auf die verminderte Inflammation und die dadurch geringere Destruktion bestehender Oligodendrozyten oder auf einen möglichen direkten Einfluss von Fexagratinib auf die Proliferation und/oder Differenzierung von Oligodendrozyten zurückzuführen ist. Ebenso könnte eine Stimulation der Remyelinisie-

nung zu einem Erhalt bzw. zu einer Wiederherstellung der Funktion der Oligodendrozyten geführt haben. Das entscheidende Puzzleteil dieser Konstruktion ist daher, wie Fexagratinib zu einer verminderten Immunzellinfiltration beiträgt. Zudem ist zu klären, auf welchem Wege Fexagratinib die Oligodendrozyten und die Remyelinisierung verstärkt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Fexagratinib schwächt den klinischen Verlauf der EAE ab

Zur Untersuchung der Prävention der EAE durch den Multikinase-Inhibitor Fexagratinib erfolgte die Applikation von Fexagratinib vor Erkrankungsausbruch vom Tag der EAE-Induktion über 10 Tage. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Symptomausprägung von Krankheitsbeginn an bis zum Erreichen der chronischen Phase. Diese Wirkung auf den Krankheitsverlauf konnte sowohl für die Gabe von 6,25 also auch von 12,5 mg/kg KG beobachtet werden. Die Gabe von Fexagratinib führte darüber hinaus zu einer deutlichen Risikoreduktion, an einem schweren Verlauf der EAE (EAE-Wert $\geq 2,5$) zu erkranken. Zum Zeitpunkt des Erkrankungshöhepunktes reduzierte die Gabe von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib das Auftreten eines schweren Krankheitsverlaufes um 92%. Unter der Behandlung von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib entwickelte keines der Versuchstiere einen schweren Krankheitsverlauf. Dieser Effekt kam auch in der chronischen Phase zum Vorschein: Während die Gabe von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib eine relative Risikoreduktion von 77% in der chronischen Phase bewirkte, war kein einziges Versuchstier, das mit 12,5 mg/kg KG AZD4574 behandelt wurde, schwer erkrankt. Ein signifikanter Unterschied des klinischen Verlaufs zwischen beiden Dosierungen lässt sich zwar nicht erheben, jedoch führte die Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat an mehr Tagen zu einer signifikanten Reduktion von Symptomen. Außerdem verhinderte die Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib, wie auch schon zum Zeitpunkt des Erkrankungshöhepunktes, das Auftreten eines schweren Krankheitsverlaufes in der chronischen Phase vollständig. Daher ist anzunehmen, dass im Sinne einer bestehenden Dosis-Wirkungs-Relation eine höhere Dosierung von Fexagratinib gegenüber einer niedrigen Dosierung zu bevorzugen ist.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang zu den Beobachtungen, die bei der Gabe von Infigratinib, einem selektiven Inhibitor für FGFR1-3, getätigt wurden: Die präventive Gabe von Infigratinib schwächte ebenso den klinischen Verlauf bis hin zur chronischen Phase der EAE ab und ermöglichte eine absolute Risikoreduktion hinsichtlich

der Entwicklung eines schweren Krankheitsverlaufes um 40%.¹²⁸ Weiterhin konnte durch pharmakologische Inhibition von CSF1R durch verschiedene Medikamente ein abgeschwächter klinischer Verlauf der EAE erreicht werden.^{12,27,60,72,109} Die medikamentöse Inhibition von VEGFR2 durch SU5416 führte in der akuten Phase der EAE ebenfalls zu einer Linderung der Symptomatik.¹³³

Da Fexagratinib neben FGFR1-3 auch VEGFR2 und CSF1R inhibiert, ist es möglich, dass die Inhibition von VEGFR2 und CSF1R zu der hier beobachteten Abschwächung des klinischen Verlaufes beitrug. Insgesamt scheint Fexagratinib durch synergistische Inhibition ein effektives Mittel zur Prävention der EAE zu sein.

5.2.2 Fexagratinib verhindert den Gewichtsverlust von Versuchstieren

Charakteristischerweise geht die EAE mit einem Gewichtsverlust einher, wobei der Gewichtsverlust und die Schwere der Symptomatik miteinander korrelieren.^{98,100} Die Bestimmung des Körpergewichtes der Versuchstiere ist in pharmakologischen Studien im Hinblick auf eine mögliche Toxizität der zu untersuchenden Substanz von Bedeutung.²⁰ In unseren Untersuchungen zeigte sich über nahezu den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg eine Reduktion des Körpergewichtes von Versuchstieren, die mit dem Placebopräparat behandelt wurden, im Vergleich zu den Versuchstieren, die mit Fexagratinib behandelt wurden. Dies zeigt zum einen, dass Fexagratinib den charakteristischen Gewichtsverlust der EAE verhindert, zum anderen auch, dass kein Hinweis auf einen toxisch bedingten Gewichtsverlust besteht.

5.2.3 Fexagratinib reduziert die Infiltration von Immunzellen in das ZNS

Die Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib führte zu einer signifikanten Reduktion infiltrierter CD3(+) T-Zellen, B220(+) B-Zellen und Mac3(+) Makrophagen/Mikroglia in WML am Höhepunkt der Erkrankung und in der chronischen Phase.

T-Zellen spielen eine herausragende Rolle in der Pathogenese der MS und der EAE.²⁸ Nach ihrer Aktivierung in der Peripherie durch Präsentation von ZNS-Antigenen oder kreuzreaktiven Peptiden durch MHC-I-präsentierende DC und der Migration ins ZNS über die BHS aktivieren sie Makrophagen und Mikroglia, welche die Degeneration von Myelinscheiden und die Apoptose von Oligodendrozyten bewirken.^{28,59,59,160} CD4+ Th1- und Th17-Zellen sind die prädominanten Immunzellen in der Pathogenese der EAE.²⁸ Sie können nicht nur durch Aktivierung von Makrophagen, sondern auch durch Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , IL-17, IL-21 und IL-23 zur Demyelinisierung führen.^{4,28} CD8+

T-Zellen sezernieren ebenfalls zytotoxische Substanzen und können durch die MHC-I-Präsentation von Neuronen durch direkten Zell-Zell-Kontakt neuroaxonalen Schaden verursachen.⁴ Eine verminderte Infiltration von CD3(+) T-Zellen konnte bereits durch Infigratinib und Oligodendrozyten-spezifische Deletion von *Fgfr1* und *Fgfr2* in der EAE erzielt werden.^{77,127,128} Die medikamentöse Depletion von Makrophagen/Mikroglia mittels CSF1R-Inhibition bewirkte durch verminderte Antigenpräsentation eine deutlich geringere Infiltration und Proliferation von T-Zellen im ZNS in der akuten Phase der EAE, was wiederum zu einer Verzögerung des EAE-Ausbruchs führte.¹⁰¹ Die Applikation des anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab reduzierte die Infiltration von T-Zellen ins ZNS in der EAE, was für andere VEGF-Inhibitoren jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.⁹² Mit VEGF behandelte T-Zellen verstärkten nach Injektion in Ratten die klinische Ausprägung der EAE.¹⁰²

Auch die Infiltration von **B-Zellen** in das ZNS ist ein Charakteristikum in der MS. Die Rolle der B-Zellen ist vielfältig: Zum einen produzieren sie Antikörper, die gegen Myelinbestandteile gerichtet sind und durch Aktivierung des Komplementsystems zu Demyelinisierung und axonalem Schaden führen, andererseits können sie als APZ T-Zellen in der Peripherie aktivieren.¹⁶⁰ Es gilt jedoch zu beachten, dass die Rolle der B-Zellen ambivalent ist, da sie sowohl proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , Lymphotoxin- α , IL-6 und GM-CSF, als auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF- β als *regulatorische B-Zellen* (Bregs) in der MS produzieren.¹⁶⁰ Die hier beschriebene Reduktion infiltrierter B-Zellen kann in Zusammenschau mit dem abgeschwächten klinischen Verlauf der EAE entweder in einem direktem Zusammenhang stehen, sodass der abgeschwächte Erkrankungsverlauf teilweise direkt auf die Reduktion von B-Zellen zurückzuführen ist. Andererseits kann der Zusammenhang auch indirekt sein, indem die antiinflammatorische Aktivität der B-Zellen als kompensierende Maßnahme in diesem Falle nicht benötigt ist, da Fexagratinib auf anderem Wege, bspw. durch Reduktion infiltrierender T-Zellen oder Makrophagen/Mikroglia, eine Symptomreduktion erreicht, und eine Rekrutierung antiinflammatorischer B-Zellen ausbleibt. Generell sollte die Reduktion infiltrierter B-Zellen im Zusammenhang mit der Symptomreduktion nicht überbewertet werden, da B-Zellen keine dominierende Rolle in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE einnehmen.¹³⁰ Auch die Infiltration von B-Zellen konnte durch Infigratinib und durch Oligodendrozyten-spezifische Deletion von *Fgfr1* bzw. *Fgfr2* in der EAE reduziert werden.^{77,127,128}

Makrophagen phagozytieren Komponenten der Myelinscheiden durch direkten Kontakt mit diesen und gelten daher als ursächliche Zellen für die Demyelinisierung.¹²¹ **Mikroglia**

werden in der MS mehrheitlich eine schädigende Rolle zugeschrieben.¹⁷¹ Sie exprimieren durch übermäßige Aktivierung Zytokine, freie Radikale, Glutamat und Proteasen und schädigen so OPCs, Oligodendrozyten, Myelinscheiden und Neurone.¹⁷¹ Eine Reduktion der Makrophagen/Mikroglia wurde ebenfalls durch Infigratinib und Oligodendrozyten-spezifische Deletion von *Fgfr1* bzw. *Fgfr2* in der EAE erreicht.^{77,127,128} Ihr Überleben hängt insbesondere von der Aktivierung von CSF1R ab, sodass in der Forschung häufig CSF1R-Inhibitoren zur Depletion von Mikroglia eingesetzt werden.¹³ Die reduzierte Ausprägung der klinischen Symptomatik der EAE durch Inhibition von CSF1R ist dabei auf die Depletion von Mikroglia zurückzuführen, die zu geringerer Demyelinisierung und erhöhter Anzahl von Oligodendrozyten führte.^{12,27,60,72,94,109,152} Die Inhibition von CSF1R durch Fexagratinib könnte daher zu einer zusätzlichen Reduktion der Anzahl an Makrophagen/Mikroglia beigetragen haben.

Es lässt sich festhalten, dass T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen/Mikroglia für Inflammation, Demyelinisierung und Neurodegeneration und somit auch für die Symptomausprägung der MS und EAE von großer Bedeutung sind. Die hier erläuterte reduzierte Infiltration der Immunzellen erklärt daher die signifikant reduzierte klinische Ausprägung der EAE.

5.2.4 **Wie Fexagratinib die Infiltration von Immunzellen in Läsionen reduziert**

Die beobachtete Reduktion infiltrierter Immunzellen durch Fexagratinib steht im Einklang mit den Effekten von Infigratinib, dessen präventive, aber auch suppressive Applikation ebenfalls zu einer Reduktion von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen/Mikroglia in Läsionen während des Höhepunkts der Erkrankung und in der chronischen Phase führte.¹²⁸ Sie ist des Weiteren kongruent zu den Resultaten, die in Mäusen mit Oligodendrozyten-spezifischer Deletion von *Fgfr1* bzw. *Fgfr2* erhoben wurden.^{77,127} Es stellt sich folglich die Frage, *wie* Fexagratinib eine Reduktion infiltrierter Immunzellen in Läsionen herbeiführt. Dafür kann es drei Ursachen geben:

1. Fexagratinib inhibiert die Aktivierung von Immunzellen in der Peripherie

Es mehren sich derzeit die Hinweise darauf, dass FGFRs an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, indem sie die Migration von Immunzellen stimulieren und die Produktion von Zytokinen modulieren.⁹¹ So kann FGFR1 über Aktivierung von NFκB proinflammatorisch wirken.^{75,91} FGF2 trägt gemeinsam mit IL-17 durch verstärkte Expression

proinflammatorischer Zytokine zu autoimmun-induzierter Inflammation bei und wird dabei in Th1 und Treg-Zellen sezerniert.¹⁴⁰

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie zeigten während des Höhepunkts der Erkrankung und in der chronischen Phase weder im Blut noch in der Milz eine Veränderung des prozentualen Anteils peripherer Immunzellen (CD19(+) B-Zellen, CD3(+) T-Zellen, CD8(+) T-Zellen, CD4(+) T-Zellen, CD11b(+) Makrophagen, CD11c(+) dendritische Zellen und GR1(+) Granulozyten) durch die präventive Applikation von Fexagratinib.⁵⁹ Dies steht im Widerspruch zu Infigratinib, das bei präventiver Gabe die Anzahl peripherer Immunzellen, genauer CD19(+) B-Zellen, CD3(+) T-Zellen und CD8a(+) T-Zellen und verringerte und den Anteil an Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen erhöhte.¹²⁸ Fexagratinib scheint daher im Gegensatz zur selektiven FGFR-Inhibition keinen bzw. nur einen geringfügigen Einfluss auf die periphere Immunreaktion zu haben, was mit der Multikinase-Inhibition durch Fexagratinib zusammenhängen könnte. Ein möglicher Wirkmechanismus von Fexagratinib in der Peripherie könnte lediglich die Verminderung der Aktivierung, z. B. durch Einfluss auf die Antigenpräsentation und/oder die Migration der Immunzellen sein. So führte die Behandlung mit anti-CSF1-Antikörpern in Mäusen mit EAE zu einer verminderten Antigenpräsentation in der Peripherie, wobei diese letztlich auf die Depletion antigenpräsentierender Zellen zurückzuführen ist.⁷² Die CSF1R-Inhibition mittels PLX5622 hingegen führte zu einer Reduktion der Immunzellinfiltration, ohne dabei Einfluss auf die periphere Immunantwort zu nehmen.¹⁰¹

2. Fexagratinib hindert Immunzellen an der Überquerung der BHS

VEGF und VEGFR2 sind in der MS und EAE durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen an der Destruktion der BHS beteiligt und erlauben durch erhöhte Permeabilität die Infiltration von Immunzellen.¹³² VEGF ist zudem der potenteste Stimulator der Angiogenese, welche durch Formierung neuer Blutgefäße und nachfolgender Infiltration von Immunzellen eine Rolle in der MS und der EAE spielt.⁵⁵ Ein möglicher Mechanismus wäre daher, dass Fexagratinib durch Inhibition von VEGFR2 die Infiltration von Immunzellen reduziert. Dies entspräche der Wirkweise von Natalizumab, das die Diapedese von Immunzellen durch Inhibition des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins (VLA-4) verhindert.⁸⁶ Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss auf die BHS nicht untersucht wurde, handelt es sich um eine rein spekulative Annahme, die im Zuge weiterer Forschung aber Beachtung verdient. Zudem würde dies nur einen zusätzlichen Mechanismus zur FGFR-Inhibition von Fexagratinib darstellen, da bisher von keinem Einfluss des selektiven FGFR-Inhibitors

Infigratinib auf die BHS berichtet wurde. Generell existieren nur wenige Untersuchungen zum Einfluss der FGF/FGFR-Signalkaskade auf die BHS. FGF2 scheint durch Reduktion der Permeabilität der BHS einen protektiven Einfluss auf Schädel-Hirn-Traumata auszuüben.²¹ Montilla et al.¹⁰¹ zeigten zudem, dass eine CSF1R-Inhibition in der EAE die Reduktion der Immunzellinfiltration bewirkt, ohne dabei einen Einfluss auf die BHS zu nehmen.

3. Fexagratinib wirkt im ZNS durch Inhibition der Migration oder Aktivität von Immunzellen

Eine notwendige Bedingung dafür ist zunächst, dass Fexagratinib eine ZNS-wirksame Substanz ist. Rezeptortyrosinkinasen sind häufig nicht in der Lage, die BHS zu überqueren, allerdings zeigte eine Studie die Tumorreduktion des Glioblastoms durch Fexagratinib in Mäusen, was auf eine Wirksamkeit von Fexagratinib im ZNS hinweist.⁹

Die Überlegung, dass Fexagratinib eine Reduktion der Immunzellinfiltration durch Wirkung im ZNS bewirkt, steht im Einklang mit der Reduktion von Immunzellen in Läsionen, die bei Oligodendrozyten-spezifischem knockout von *Fgfr1* bzw. *Fgfr2* erhoben worden sind.^{77,127} Dies zeigt, dass Oligodendrozyten eine Funktion in der Immunzellmodulation in der EAE haben und dass FGFR1 und FGFR2 die Immunzellinfiltration zentral modulieren.^{77,127} Derzeit wird **eine immunmodulative Funktion von Oligodendrozyten** diskutiert.³⁴ So konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten und OPCs in der EAE in Anwesenheit von IFN- γ , welches von CD4+ T-Zellen sezerniert wird, MHC-I und II exprimieren, was eine mögliche Rolle in der Aktivierung von CD4+ T-Zellen suggeriert.³⁴ Außerdem besitzen sie die Fähigkeit zur Phagozytose von Myelindebris.³⁴ Ferner sind Oligodendrozyten in der Lage, diverse Zyto- und Chemokine und andere proinflammatorische Proteine zu sezernieren (IL-17, IL-1 β , IL-6, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10, CD200), die u. a. an der Migration und Differenzierung von T- und B-Zellen, Makrophagen und Mikroglia beteiligt sind.¹⁷³ Interessant ist außerdem die Expression von CD200 durch Oligodendrozyten, welches die Aktivierung von Mikroglia supprimieren kann.¹⁷³ In der Proteinanalyse konnte nach Gabe von 12,5 mg/kg KG Fexagratinib eine erhöhte Expression von CD200 beobachtet werden, sodass ein Einfluss von Fexagratinib auf die Aktivierung von Mikroglia möglich wäre.

Abseits davon wird diskutiert, ob ein primärer Schaden des ZNS, z. B. der Verlust von Oligodendrozyten nicht eher die Ursache der MS sein könnte, zur Demyelinisierung führt und erst sekundär die Infiltration von Immunzellen nach sich zieht („*inside-out*“-Hypothese).^{84,121} So führt der induzierte Verlust von Oligodendrozyten in Mäusen zu einer

Infiltration von CD4+ T-Zellen in das ZNS, enormer Demyelinisierung und Axondegeneration, wobei in der Peripherie MOG₃₅₋₅₅-spezifische T-Zellen nachweisbar waren.¹⁵⁵ Zwar erfolgte in dem von uns verwendeten Modell der EAE eine periphere Induktion der Inflammation, es wäre aber denkbar, dass der Verlust von Oligodendrozyten als eine Art Katalysator zu einer Verstärkung inflammatorischer Prozesse führt. Ein Erklärungsansatz für die beobachteten Effekte durch Fexagratinib wäre daher, dass Fexagratinib den Schutz von OPCs und adulten Oligodendrozyten gewährleistet und so die Stimulation weiterer Inflammation und die Infiltration von Immunzellen verhindert (vgl. 5.2.5 Fexagratinib erhöht die Anzahl von Oligodendrozyten).

FGFR, VEGFR2 und CSF1R agieren im ZNS immunmodulierend. **Die FGF/FGFR-Signalkaskade** spielt eine Rolle hinsichtlich Infektionen und der Immunantwort. So führt die Infektion von Astrozyten mit dem Zika-Virus zu einer proviralen Hochregulation der FGF2-Expression, zudem lassen sich erhöhte FGF-Serumwerte in Menschen mit Zika-Virus-Infektion und Hepatitis C feststellen.⁸⁸ Mikroglia exprimieren vermehrt FGFR1-3 nach Kontakt mit *Borrelia Burgdorferi* und agieren proinflammatorisch.¹¹⁵ **VEGF und VEGFR** haben im ZNS nicht nur einen Einfluss auf die Angiogenese und die Destruktion der BHS, sondern auch auf die Proliferation, Migration und das Überleben von Mikroglia, Astrozyten und neuronalen Stammzellen.^{15,110} VEGF induziert darüber hinaus antiinflammatorische Effekte, die Herabregulation von inflammatorischen Zyto- und Chemokinen in Makrophagen/Mikroglia und wirkt chemotaktisch auf T-Zellen und Makrophagen.^{55,63,66} Die Inhibition von VEGFR2 durch Fexagratinib könnte demnach zu der verringerten Chemotaxis von T-Zellen und Makrophagen/Mikroglia beigetragen haben. Mikroglia wirken chemotaktisch und tragen zur Immunzellinfiltration bei.⁵⁷ Die Depletion von Makrophagen/Mikroglia mittels medikamentöser Inhibition von **CSF1R** in EAE reduzierte die MHC-II- und CD80-Expression auf APZ im ZNS, wodurch ihre antigenpräsentierende Funktion inhibiert wurde und es folglich zu einer reduzierten T-Zell-Infiltration und verminderter klinischer Symptomatik kam.¹⁰¹ Zudem können sie T-Zellen reaktivieren und kontrollieren im Kontext der Inflammation deren Proliferation.¹⁷¹ Die reduzierte Immunzellinfiltration könnte demnach auch durch eine zentrale Inhibition der Chemotaxis durch Mikroglia bedingt sein.

Trotz deutlich verringerter Präsenz infiltrierter Immunzellen in Läsionen durch Fexagratinib blieben proinflammatorische **Zyto- und Chemokine** im Rückenmark unverändert. Diese Beobachtung lässt sich nicht mit den Ergebnissen der Untersuchung von Infigratinib in Einklang bringen, welches bei präventiver Applikation zu einer Reduktion von *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-12*, *Tnfa* und *Nos2* im Rückenmark in der chronischen Phase führte.¹²⁸ Dies

ließe sich darauf zurückführen, dass Zytokine im Rahmen eines äußerst komplexen Systems agieren, in dem sie sowohl pro- als auch inflammatorisch wirken, sich gegenseitig beeinflussen und Redundanzen hinsichtlich ihrer Funktionen aufweisen.^{56,59} Zudem inhibiert Fexagratinib mehrere Rezeptortyrosinkinasen, die miteinander in Relation stehen, sodass sich Effekte evtl. annullieren könnten.⁵⁹ Daraus lässt sich jedoch nicht schließen, dass die Genexpression von Zyto- und Chemokinen durch Fexagratinib unverändert hoch blieb, da diese auch in der Placebogruppe nur knapp über der Nachweisgrenze waren und daher möglicherweise eher ein methodisches Problem besteht.

5.2.5 Fexagratinib erhöht die Anzahl von Oligodendrozyten

Ungenügende Remyelinisierung durch Oligodendrozyten ist ein zentrales Problem in der MS, wobei insbesondere eine Störung der Differenzierung im Vordergrund steht.¹⁹

In der immunhistochemischen Analyse konnte in der akuten Phase eine signifikant gesteigerte Anzahl an adulten Oligodendrozyten in Läsionen des Rückenmarks nach Applikation von Fexagratinib beobachtet werden. Ferner war die Anzahl an OPCs erhöht, wobei dieser Unterschied keine statistische Signifikanz verzeichnet und daher als Trend zu betrachten ist. In der chronischen Phase konnten keine Wirkung von Fexagratinib auf die Anzahl von OPCs und adulten Oligodendrozyten festgestellt werden.

Dies deutet darauf hin, dass Fexagratinib die Apoptose von OPCs und adulten Oligodendrozyten im Rahmen der Inflammation verhindert und/oder deren Regeneration durch Stimulation der Proliferation, Migration und/oder Differenzierung fördert. Oligodendrozyten werden in der MS im Rahmen der Inflammation durch CD8(+) T-Zellen, Zytokine, Antikörper, Komplementsystem und Mikroglia geschädigt, was zur Demyelinisierung und durch verminderte metabolische Unterstützung der Neurone zur Neurodegeneration führt.^{46,116} Zudem kommt es zum Fehlschlagen der Remyelinisierung, da das inflammatorische Milieu und die in der Myelindebris enthaltenen Remyelinisierungsinhibitoren an der Inhibierung der Differenzierung der OPCs beteiligt sind.⁴⁵

Zunächst stimmen die Ergebnisse mit der selektiven FGFR-Inhibition durch Infgratinib überein, durch die die Anzahl von OPCs und adulten Oligodendrozyten erhöht wurde.¹²⁸ Der *KO* von *Fgfr1* und *Fgfr2* in Mäusen mit und ohne EAE führte jeweils zu keiner Veränderung der Anzahl der Oligodendrozyten oder OPCs in Läsionen.^{48,77,127} Interessanterweise führte die Behandlung von Oligodendrozyten mit Fexagratinib *in vitro* zu einer verringerten Proliferation und erhöhten Zytotoxizität.¹²⁶ Da sich Proliferation und Differenzierung von OPCs reziprok zueinander verhalten, um ein funktionierendes Zu-

sammenspiel in der Remyelinisierung zu gewährleisten, wäre es möglich, dass ein Inhibitor der Proliferation zugleich ein Stimulator der Differenzierung ist.⁴⁶ So stimuliert FGF2 die Proliferation von OPCs über FGFR1 und inhibiert deren Differenzierung über FGFR1 und FGFR3 *in vitro*.⁴³ Diese Effekte konnten durch FGFR-Inhibition verhindert werden.⁴³ Gleichzeitig bewirkt FGF2 den Wiedereintritt von adulten Oligodendrozyten in den Zellzyklus und reduziert die Myelinisierung über FGFR1 *in vitro*, letztlich zur Depletion von myelinisierenden Oligodendrozyten *in vivo* führend.^{18,43} *Fgfr1*-Deletion führte in Cuprizone-induzierter Demyelinisierung zu einer vermehrten Differenzierung von OPCs.¹⁷⁵ Derzeit wird aufgrund der bestehenden Präsenz von OPCs in Läsionen davon ausgegangen, dass eine Störung der Differenzierung der OPCs ausschlaggebend für die ungenügende Remyelinisierung ist.⁸⁹ Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich erschließen, dass Fexagratinib zu einer vermehrten Differenzierung der OPCs beitragen könnte.

In einer Studie, in der eine Depletion von Mikroglia mittels pharmakologischer Inhibition von CSF1R durch PLZ3379 erfolgte, konnte in Cuprizone-induzierter Demyelinisierung der Verlust von Oligodendrozyten verhindert werden.⁹⁴ Auch die Anzahl an OPCs konnte durch PLZ3379 in der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung erhöht werden.¹⁵² Vermutet wird, dass Mikroglia durch Sezernierung proinflammatorischer Zytokine Oligodendrozyten schädigen.⁹⁴ Die hier erfolgte Applikation von Fexagratinib könnte daher durch Inhibition von CSF1R zu einer Verringerung der Anzahl von Mikroglia und somit zu einem Erhalt von OPCs und Oligodendrozyten beigetragen haben. Da diese Effekte auch bei dem selektiven FGFR-Inhibitor Infigratinib zu beobachten waren, ist es wahrscheinlich, dass die CSF1R-Inhibition nicht der einzige Mechanismus ist, den Fexagratinib zur Erhöhung der OPCs und Oligodendrozyten bedient.

VEGFR2 wird auf OPCs exprimiert und scheint *in vitro* einen Einfluss auf deren Migration und Proliferationsverhalten zu haben.⁶² Der selektive VEGFR2-Inhibitor SU5416 hatte in MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE keinen Einfluss auf T-Zellen, Makrophagen, Demyelinisierung oder Oligodendrozyten, konnte jedoch auch nicht die Abschwächung der klinischen Symptomatik reproduzieren,¹⁴⁹ die Roscoe et al.¹³³ zuvor mit SU5416 erreicht haben. Die destruktive Rolle von VEGF und VEGFR2 in der MS und EAE wurde bisher jedoch noch nicht in einen Zusammenhang mit Oligodendrozyten gebracht, sondern basiert vielmehr auf deren Einfluss auf die Angiogenese und die Permeabilität der BHS (vgl. 5.2.4 Wie Fexagratinib die Infiltration von Immunzellen in Läsionen reduziert).

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der akuten und der chronischen Phase könnten daraus resultieren, dass Remyelinisierung generell in einem frühen Stadium

stattfindet und die Halbwertszeit von Fexagratinib lediglich 30 Stunden beträgt.¹³⁵ Migration und Proliferation von OPCs in Modellen der fokalen Demyelinisierung finden innerhalb der ersten 10 Tage und in Modellen der axonalen Transsektion mit einem Maximum von 14 Tagen nach Auftreten des Schadens statt.^{44,156}

5.2.6 Fexagratinib übt keinen Einfluss auf die Expression von Myelinproteinen oder Remyelinisierungsinhibitoren aus

Trotz des abgeschwächten klinischen Verlaufs und der verminderten Demyelinisierung in der chronischen Phase zeigte sich zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung von Myelinproteinen und Remyelinisierungsinhibitoren. Dies lässt sich aufgrund der Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt auch keine Veränderung hinsichtlich der Anzahl an OPCs und Oligodendrozyten bestand, erklären. Andererseits zeigt die immunhistochemische Analyse eine signifikante Reduktion der Demyelinisierung durch Fexagratinib, sodass dies im Rückschluss eine Reduktion des Myelinverlustes und somit eine erhöhte Präsenz von Myelin bedeuten müsste. Diese Divergenz könnte methodisch bedingt sein, da die immunhistochemische Analyse das Ausmaß der Demyelinisierung der Läsionen erfasst, während die Analyse der Proteinexpression jedoch in einem gesamten homogenisierten Rückenmarksabschnitt erfolgte und daher möglicherweise nicht sensitiv genug war. Generell stehen diese Ergebnisse im Kontrast zu Infigratinib, dessen präventive Applikation zur einer erhöhten Expression von Myelinproteinen und einer Erniedrigung des Remyelinisierungsinhibitors SEMA3A in der chronischen Phase führte.¹²⁸ SEMA3A wirkt, wie auch u. a. VEGF, über Neuropilin-1, sodass es durch die VEGFR2-Inhibition durch Fexagratinib zu Interaktionen gekommen sei könnte.^{15,117} Zweitens wirkt SEMA3A durch Inhibition der Migration von OPCs als Remyelinisierungsinhibitor und stellt dabei einen Antagonisten zu SEMA3F dar, welches die Migration von OPCs stimuliert.¹¹⁷ Für eine exaktere Interpretation ist demnach auch eine Untersuchung von SEMA3F notwendig. Letzten Endes gilt es ebenso zu beachten, dass Semaphorine die Funktion von T-Zellen modulieren und eine Interpretation in der T-Zell-vermittelten EAE nur eingeschränkt zu beurteilen ist.¹¹⁷ Die Behandlung von Oligodendrozyten mit Fexagratinib *in vitro* führte jedenfalls zu einer erhöhten Expression von CNPase und einem Anstieg der mRNA von *Pip1* und *CNPase*.¹²⁹

5.2.7 Fexagratinib reduziert die Demyelinisierung und schützt vor Neurodegeneration

Querschnitte des Rückenmarks von Versuchstieren, die mit Fexagratinib behandelt wurden, zeigten sowohl während des Höhepunktes der Erkrankung als auch in der chronischen Phase deutlich reduzierte demyelinisierte Flächen. Die beobachtete Reduktion der Demyelinisierung steht in Einklang mit den Effekten von Infigratinib.¹²⁸ CSF1R-Inhibition mittels BLZ945 reduzierte durch Depletion von antigenpräsentierenden Zellen ebenfalls die Demyelinisierung in EAE.⁷² VEGF ist in der MS in akuten sowie in aktiven und inaktiven chronischen Läsionen präsent,¹²³ zudem führte die Inhibition von VEGFR2 mittels SU5416 zu einer Reduktion der Demyelinisierung in der akuten und chronischen Phase der EAE.^{123,133} Demyelinisierung ist ein charakteristisches pathologisches Merkmal in der MS und der EAE und wird vermutlich durch die inflammatorische Prozesse verursacht, die in der MS und der EAE beobachtet werden können.¹⁴⁷ Die durch Inflammation entstehende Demyelinisierung ist insb. in MS-Schüben durch Unterbrechung der saltatorischen Erregungsleitung für die Symptombildung verantwortlich.²⁵ Daher ist es wahrscheinlich, dass die Applikation von Fexagratinib durch Reduktion der Immunzellinfiltration zu einer Reduktion der Demyelinisierung führte, welche wiederum den abgeschwächten klinischen Verlauf ermöglichte.

Die Applikation von Fexagratinib führte zudem zu einer höheren axonalen Dichte in der akuten und in der chronischen Phase. Diese erhaltene axonale Dichte ist ein Hinweis darauf, dass Fexagratinib vor axonalem Schaden, also vor Neurodegeneration, schützt. Neurodegeneration ist eines der typischen pathologischen Charakteristika der MS und der EAE und wird für die Progression der Erkrankung und der im Zuge der Erkrankung zunehmenden Behinderung verantwortlich gemacht.²⁸ Chronisch inflammatorische Prozesse stehen im Verdacht, im späteren Erkrankungsverlauf der MS und EAE zu axonalem Schaden und Neurodegeneration zu führen¹⁴⁷. Dies geschieht durch die Bildung von NO und ROS, die mitochondriale Schäden verursachen.^{28,147} Die Prävention von Neurodegeneration muss daher stets mit dem Schutz vor Inflammation einhergehen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Fexagratinib die Infiltration inflammatorischer Immunzellen in Läsionen deutlich reduziert und könnte daher mitunter die erhöhte axonale Dichte im Rückenmark bedingen, die einem Schutz vor Neurodegeneration gleichkäme.

Neurodegeneration als alleinige Konsequenz einer Immunzellinfiltration zu betrachten, ist allerdings unzutreffend. Ein Blick auf die Erschöpfbarkeit gegenwärtiger therapeutischer Möglichkeiten genügt dabei: Trotz effektiver Immunmodulation und Prävention weiterer Schübe der MS, die aus der Immunzellinfiltration resultieren, gelingt es nicht,

die Krankheitsprogression und weitere Behinderung aufzuhalten, was auf eine fortlaufende, von Schüben unabhängig verlaufende Neurodegeneration zurückzuführen ist.^{28,145} Gerade im chronischen Verlauf der MS nimmt die Immuzellinfiltration ab, die Progression jedoch zu, wobei ZNS-residenten Zellen wie Mikroglia und Astrozyten sowie intrinsischem Axonschaden, z. B. durch Fehlfunktion von Mitochondrien, die größte Bedeutung zukommt.²⁸ Neben der direkten axonalen Degeneration durch NO und ROS spielt die Degeneration von Myelinscheiden eine wichtige Rolle in der Neurodegeneration.¹⁰⁷ So bilden intakte Myelinscheiden eine physische Schutzbarriere, bewirken zusätzlich einen geringeren Energieverbrauch der Axone durch die saltatorische Erregungsleitung und gewähren Axonen metabolische Unterstützung.¹⁰⁷ Fallen diese Funktionen weg, kommt es zur Umstrukturierung von Ionenkanälen, die eine Störung der metabolischen Homöostase und somit die Degeneration der Axone bewirkt.¹⁰⁷ Wie bereits weiter oben spekuliert, könnte Fexagratinib den Schutz von OPCs und Oligodendrozyten bewirken bzw. die Differenzierung dieser stimulieren, sodass diese weiterhin intakte Myelinscheiden bilden und der Neurodegeneration entgegenwirken könnten. In der chronischen Phase der EAE wurde die Neurodegeneration durch Fexagratinib reduziert, was für einen von der Immuzellinfiltration unabhängigen Effekt auf die ZNS-intrinsische Neurodegeneration durch Fexagratinib spricht. Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass die Immuzellinfiltration in der chronischen Phase in der Placebogruppe dennoch stark erhöht war, sodass die Neurodegeneration sicherlich nicht gänzlich unabhängig von dieser stattfand. Abseits davon, ob die Reduktion der Immuzellinfiltration oder die Wirkung auf Oligodendrozyten einen größeren Beitrag zum Schutz vor Neurodegeneration beiträgt, kann festgehalten werden, dass Fexagratinib neuroprotektiv wirkt.

5.2.8 Modulation der FGF/FGFR-, VEGF/VEGFR2- und CSF1R-Signalkaskaden

Im Rahmen der Proteinanalyse konnte in der chronischen Phase eine signifikante Reduktion von FGFR2, jedoch nicht von FGFR1, durch 12,5 mg/kg KG Fexagratinib detektiert werden. Dies spricht für eine Herabregulation von FGFR2 durch Inhibition mit Fexagratinib. Fexagratinib inhibiert neben FGFR1-3 auch CSF1R und VEGFR2, deren Expression durch die Gabe von Fexagratinib unbeeinflusst blieb. Dies weist auf einen stärkeren Effekt von Fexagratinib auf FGFR2 als auf FGFR1, VEGFR2 und CSF1R hin. Daher ist die Vermutung naheliegend, dass die Abschwächung des Erkrankungsverlaufes durch Fexagratinib am ehesten auf eine Inhibition von FGFR2 zurückzuführen ist. Allerdings führte auch die niedrigere Dosierung in Form von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib zu einem signifikant abgeschwächten Krankheitsverlaufes im Vergleich zur Place-

bogruppe, ohne dass durch die Applikation von 6,25 mg/kg KG Fexagratinib eine Veränderung der Expression von FGFR1 und 2, CSF1R und VEGFR2 nachgewiesen werden konnte. Die Verminderung der klinischen Symptomatik durch Fexagratinib über FGFR1, VEGFR2 und CSF1R lässt sicher daher trotz nicht beobachteter Wirkung auf die Proteinexpression nicht ausschließen.

Die FGF/FGFR-Signalkaskade wirkt über die Aktivierung der MAP-Kinase-, PI3K/Akt-, STAT-, und der IP3-Signalkaskade.¹¹¹ In der MAP-Kinase-Signalkaskade wird die MAP-Kinase ERK, in der PI3K/Akt-Signalkaskade die Proteinkinase Akt durch Phosphorylierung aktiviert.¹¹¹ ERK und Akt spielen eine wichtige Rolle in der Myelinisierung im Sinne einer Steigerung der Myelinisierung in Mäusen.^{37,49} ERK1/2 ist darüber hinaus die Remyelinisierung nach fokaler Demyelinisierung.⁵¹ Guardiola-Diaz et al.⁵⁸ zeigten ferner die Bedeutung von ERK und Akt in der Stimulation der Differenzierung von OPCs bzw. Oligodendrozyten. Auch in der EAE konnten mehrfach über die ERK- bzw. Akt-Signalkaskaden vermittelte protektive Effekte nachgewiesen werden: Nach *Fgfr1*-Deletion zeigte sich ein abgeschwächter klinischer Verlauf der EAE über die Hochregulation von pERK und pAkt, die wiederum zu einer Hochregulation von BDNF und einer reduzierten Neurodegeneration führte.¹²⁷ Auch in *Fgfr2*^{-/-} Mäusen mit EAE konnte eine Hochregulation von pAkt und eine Reduktion des klinischen Verlaufs gezeigt werden.⁷⁷ Außerdem bestehen Hinweise für protektive Funktionen von Akt1 und Akt3 in der EAE durch Modulation von Treg-Zellen.^{119,157} Des Weiteren konnte über eine Hochregulierung von ERK and Akt durch Deletion von *Cd226* eine verminderte klinische Symptomatik der EAE aufgrund stimulierter Differenzierung und Proliferation von Treg-Zellen detektiert werden.¹⁶³

Die Untersuchung der relativen Proteinexpression von pERK und pAkt in der chronischen Phase zeigte keine Veränderungen durch die Applikation von Fexagratinib im Vergleich zum Placebopräparat. Dies steht im Widerspruch zu Infigratinib, welches die gesteigerte Phosphorylierung von ERK und Akt bewirkte.¹²⁸ Für die im Vergleich zur Therapie mit Infigratinib nicht festgestellte Modulation der ERK-bzw. Akt-Signalkaskaden kommen zwei Erklärungen in Betracht: Einerseits könnte die Wirkung auf pERK und pAkt durch Fexagratinib bereits nachgelassen haben, da der Untersuchungszeitpunkt 32 Tage nach der letzten Applikation stattgefunden hat. Andererseits ist es denkbar, dass Fexagratinib über den STAT- oder die IP3-Signalkaskade wirkt, welche hier nicht untersucht wurden. Außerdem ließ sich Inhibition der Phosphorylierung von Akt durch Fexagratinib in einigen Zelllinien nicht nachweisen, wohingegen sich eine Inhibition der Phosphorylierung von FRS2 und PLC γ zeigte.⁵²

Eine andere Erklärung für die Wirkweise von Fexagratinib wäre die Inhibition anderer Rezeptoren und Signalwege. Gavine et al.⁵² zeigten, dass zusätzlich zu den hier untersuchten Rezeptoren beispielsweise IGFR durch Fexagratinib schwach inhibiert wurde (Tabelle 5). Fexagratinib könnte auch auf Rezeptoren und Signalwege wirken, von denen bisher nicht bekannt ist, dass sie durch Fexagratinib inhibiert werden. Außerdem haben wir an dieser Stelle die Herabregulation der Rezeptorexpression, durch bspw. Internalisierung des Rezeptors, untersucht, und nicht das Phosphorylierungsprofil der Rezeptoren, welche auf eine Veränderung der Aktivierung oder Deaktivierung hinweisen würde. Die Untersuchung der Expression *phosphorylierter* Rezeptoren wäre daher für zukünftige Untersuchungen eine sinnvolle Ergänzung.

Außerdem gilt es, die Tatsache zu berücksichtigen, dass die medikamentöse Gabe von Fexagratinib in der kritischen Phase der EAE-Pathogenese an den Tagen 0 - 9 p. i. erfolgte, die Analysen des Rückenmarkgewebes jedoch an Tag 41 p. i. durchgeführt wurden. Es ist wahrscheinlich, dass Fexagratinib nachhaltige Effekte über Modifikation erwähnter Signalkaskaden auf den Krankheitsverlauf der EAE ausübt, sich die Expression der in der Signalkaskade involvierten Proteine zum Zeitpunkt der Analyse, also 32 Tage nach der letzten medikamentösen Gabe, allerdings wieder normalisiert hat. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Inhibition von Tyrosinkinase-Rezeptoren nicht zwangsweise mit einer Herabregulation dieser einhergehen muss, sondern lediglich die Autophosphorylierung der Rezeptoren inhibieren könnte. Da CSF1R und VEGFR2 in der Pathogenese der EAE involviert sind,^{27,60,133} lässt sich vielmehr die Hypothese der synergistischen Reduktion des klinischen Verlaufes durch die mittels Fexagratinib erfolgte Multi-kinase-Inhibition aufstellen.

5.2.9 Fexagratinib bewirkt Neuroprotektion nicht über die Modulation von Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen, die die Energieversorgung eukaryotischer Zellen gewährleisten und neben weiterer Funktionen den Na⁺-Haushalt der Zellen und die Apoptose regulieren.¹⁶⁷ Das ZNS reagiert aufgrund des hohen metabolischen Umsatzes sensibel auf Schäden von Mitochondrien, was zu neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson oder M. Alzheimer führen kann.¹⁶⁷ Mitochondriale Defekte werden zudem für die Neurodegeneration im Rahmen der Progression der MS verantwortlich gemacht.¹⁶⁷ Defekte Mitochondrien sind in akuten und chronischen Läsionen der MS und der EAE präsent.¹⁶⁷ Sie werden durch Sezernierung von ROS und RNS durch Makrophagen und Mikroglia geschädigt, wodurch die Zellhomöostase destabilisiert wird, nicht

genügend ATP synthetisiert werden kann und Axone degenerieren.¹⁶⁷ Im Zuge der Proteinanalyse wurde der Einfluss von Fexagratinib auf mt-ND1, SOD2, ATP6E und ATP Synthase Subunit Beta untersucht. mt-ND1 ist eine Subeinheit der NADH-Dehydrogenase, dessen Defekt zur Leberschen hereditären Optikusneuropathie führt.¹⁷² ATP6E ist eine Untereinheit der vakuolären Protonen-ATPase, welche als Protonenpumpe den pH-Wert von Zellorganellen reguliert.⁴² SOD2 ist das wichtigste antioxidant wirkende Enzym in Mitochondrien und katalysiert freie Radikale zu Wasserstoffperoxid.³⁸ Die Depletion von SOD2 in Mäusen führte zur Inflammation und Demyelinisierung.⁸ ATP Synthase Beta Subunit (ATP5F1B, ATP5B) ist eine Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase.¹⁰³ Es konnte in der chronischen Phase keine Veränderung der Expression genannter mitochondrialer Proteine durch Fexagratinib festgestellt werden. Die Inhibition der Neurodegeneration durch Fexagratinib in der chronischen Phase scheint daher nicht durch Modulation der mitochondrialen Funktion moduliert zu werden.

5.3 Methodendiskussion

5.3.1 Die EAE als Tiermodell der MS

Die EAE wird als Tiermodell für Autoimmunerkrankungen des ZNS, insb. der MS, genutzt, welche durch Immunisierung mit Myelinproteinen unter Stimulation des Immunsystems induziert wird.²⁶ Für die EAE bestehen wie für jedes Tiermodell Limitationen. Allen voran wird die EAE im Gegensatz zur MS durch ein bestimmtes, als Antigen wirkendes Myelinprotein exogen induziert, während für die MS kein spezifisches Autoantigen bekannt ist und diese offensichtlich nicht durch exogene Immunisierung entsteht.²⁶ Zudem besteht eine immense Heterogenität innerhalb der EAE, die sich je nach Tierart (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Primaten), Stamm, Antigen und Art der Immunisierung (aktiv, passiv) hinsichtlich Symptomatik und zugrundeliegender Pathophysiologie unterscheidet, weshalb die Auswahl eines geeigneten EAE-Modells von der Forschungshypothese abhängt.²⁶ Die von uns gewählte MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in C57BL/6J Mäusen gehört zu den am häufigsten verwendeten EAE-Modellen, verläuft monophasisch und chronisch und ähnelt am ehesten der SPMS.²⁶ Da wir einerseits das immunmodulierende als auch das neuroprotektive und remyelinisierende Potenzial von Fexagratinib evaluieren wollten, entschieden wir uns für dieses Modell.²⁶ C57BL/6J bezeichnet einen Inzuchtstamm von Mäusen, der die genetische Uniformität der Versuchstiere gewährleistet und daher Untersuchungen unter hochstandardisierten Bedingungen

ermöglicht.¹⁷⁶ Zudem verwendeten wir lediglich weibliche Versuchstiere, da die MS einerseits ein Übergewicht an weiblichen Erkrankten aufweist,¹²⁴ dies andererseits die Homogenität unseres Studiendesigns gewährt. Die hier präsentierten Resultate zeugen daher von hoher interner Validität. Interne und externe Validität verhalten sich gewissermaßen reziprok zueinander, sodass unsere Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können. Fakt ist auch, dass gewonnene Erkenntnisse in einem verwendeten EAE-Modell nicht automatisch für ein anderes beliebiges EAE-Modell gelten, da Faktoren wie Art, Stamm, EAE-Induktion sowie Geschlecht und Alter der Versuchstiere die EAE maßgeblich beeinflussen.²⁶

Neben der Heterogenität der EAE stellt die nicht immer realisierbare Reproduktion erfolgreicher Therapeutika in klinischen MS-Studien, bspw. anti-TNF-Antikörper, IFN- γ , Anakinra oder anti-Lingo, einen weiteren Kritikpunkt dar.²⁶ Dies bedeutet jedoch nicht, dass die EAE nur genutzt wird, weil keine bessere Option zur Verfügung steht: MS- und EAE-Forschung gehen Hand in Hand, und zahlreiche etablierte MS-Therapeutika wurden entweder durch oder in enger Beziehung zur EAE-Forschung entwickelt (u. a. Natalizumab, IFN-beta, Glatirameracetat, Azathioprin, Mitoxantron, Laquinimod, Fingolimod).²⁶ Außerdem ermöglichen sich MS- und EAE-Forschung gegenseitig den Gewinn neuer pathophysiologischer Erkenntnisse.²⁶

Des Weiteren fehlen einige Puzzleteile, die eine detailliertere Interpretation der Daten ermöglichen hätten. Die Proteinexpression von FGF2 und FGF9 bspw. konnte trotz mehrmaliger Versuche und verschiedener verwendeter Antikörper nicht detektiert werden.

5.3.2 Ausblick

Die zur Behandlung der MS verwendeten Medikamente genügen nicht, um die Progression der MS zu verhindern, da ihre Wirkung nicht im ZNS ansetzt und sie daher Remyelinisierung und Neuroregeneration nicht wirkungsvoll stimulieren können.^{28,118,145} Die vorliegende Arbeit weist auf die antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkung der synergistischen Multikinase-Inhibition durch Fexagratinib hin und böte damit einen effektiven Ansatz zur Behandlung der MS. Nach Infigratinib stellt Fexagratinib darüber hinaus bereits den zweiten niedermolekularen FGFR-Inhibitor da, der den klinischen Verlauf der EAE effektiv unterdrücken kann.¹²⁸ Aufgrund der erfolgreichen Reproduktion der Besserung des klinischen Verlaufes durch Inhibition der FGF/FGFR-Signalkaskade wäre die Durchführung einer klinischen Studie der Phase II an MS-Erkrankten die logische Konsequenz. Gegenwärtig existieren 18 klinische Studien der Phase I und II, in denen

Fexagratinib an Patienten mit Tumorerkrankung getestet wird oder wurde.¹⁰⁶ Unerwünschte Wirkungen von Fexagratinib wie gastrointestinale Beschwerden, Mundtrockenheit, Hyperphosphatämie und Sehstörungen sind überwiegend moderat und reversibel.¹³⁵ Basierend auf zwei klinischen Studien der Phase I wird eine Dosis von 80 mg pro Tag empfohlen, wobei keine dosislimitierenden Nebenwirkungen bei einer Applikation von 160 mg pro Tag auftraten.¹³⁵ Die hier verwendete Dosis von 12,5 mg/kg KG entspricht einer *human equivalent dose* von 1 mg/kg KG für den Menschen.¹⁰⁵

Vor der Durchführung einer klinischen Studie der Phase II wäre es jedoch sinnvoll, den Effekt von Fexagratinib auf die Demyelinisierung, Neurodegeneration und Oligodendrozyten in einem MS-Tiermodell ohne inflammatorische Komponente zu untersuchen, um die immunmodulierende Komponente Fexagratinib auszuschließen. Hierzu käme beispielsweise die Cuprizone-induzierte Demyelinisierung infrage. Trotz der zahlreichen erfolgreichen Rückschlüsse, die sich von der EAE auf die MS ziehen lassen konnten, existieren zahlreiche Medikamente, die in der EAE, aber nicht in der MS erfolgreich waren.²⁶ Um eine erfolgreiche Translation von Ergebnissen aus der EAE-Forschung zur MS so gut wie möglich zu gewährleisten, empfehlen Constantinescu et al.²⁶ die Validierung der Ergebnisse durch Reproduktion in verschiedenen EAE-Modellen in beiden Geschlechtern und in Tiermodellen für andere immunologische und/oder neurodegenerative Erkrankungen.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch inflammatorische und neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. Trotz immunmodulierender Medikamente kann die Progression und die damit einhergehende Behinderung von Patienten nicht aufgehalten werden. Daher ist die Entwicklung neuer Medikamente erforderlich, die neurodegenerative Prozesse aufhalten und die Remyelinisierung stimulieren. Die FGF/FGFR-, VEGF/VEGFR2- und CSF1/CSF1R-Signalkaskaden nehmen eine zentrale Stellung in der Pathogenese der MS und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem gängigsten Tiermodell der MS, ein. Unsere Arbeitsgruppe zeigte zuvor, dass die selektive Inhibition von FGFR1-3 durch Infigratinib zu einer Reduktion der klinischen Symptomatik der EAE durch Immunmodulation, Verminderung von Neurodegeneration und Verstärkung von Remyelinisierung führte. Arbeiten anderer Institute zeigten, dass die Inhibition von VEGFR2 durch Verminderung der Permeabilität der BHS eine Reduktion der klinischen Symptomatik der EAE bewirkte. Die Inhibition von CSF1R ermöglichte durch Depletion von Mikroglia und dendritischen Zellen die Reduktion der klinischen Symptomatik der EAE. Fexagratinib ist ein Multikinase-Inhibitor, welcher FGFR1-3, VEGFR2 und CSF1R inhibiert und findet vor allem in der onkologischen Forschung Verwendung. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Auswirkungen der synergistischen Inhibition von FGFR1-3, VEGFR2 und CSF1R durch präventive Applikation von Fexagratinib in Dosierungen von 6,25 oder 12,5 mg/kg KG in MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE in C57BL/6-Mäusen zu untersuchen. Dabei zeigte sich über den gesamten klinischen Verlauf eine Reduktion der Symptomatik durch Applikation von Fexagratinib. Kein Versuchstier, das mit 12,5 mg/kg KG behandelt wurde, präsentierte dabei eine schwere Symptomatik. In histologischen und immunhistochemischen Färbungen von Querschnitten des Rückenmarks ließ sich eine signifikante Reduktion der Immunzellinfiltration, der Demyelinisierung und der Neurodegeneration in der akuten und der chronischen Phase nachweisen. Des Weiteren bewirkte Fexagratinib einen signifikanten Anstieg der Anzahl adulter Oligodendrozyten in Läsionen in der akuten Phase. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die synergistische Inhibition von FGFR1-3, VEGFR2 und CSF1R durch Immunmodulation und verstärkter Neuroregeneration einen effektiven Ansatz zur Behandlung der EAE darstellt und der selektiven Inhibition überlegen sein könnte. Nach Überprüfung des Effektes von Fexagratinib in einer Cuprizone-induzierter Demyelinisierung sollte der Einsatz der Substanz in einer klinischen Studie der Phase II an Patienten mit MS in Erwägung gezogen werden.

7 Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and neurodegenerative disease of the central nervous system. Available immunomodulatory medication cannot halt the disease progression or disability. Therefore, the development of novel drugs that halt neurodegenerative processes and stimulate remyelination is necessary. The FGF/FGFR-, VEGF/VEGFR2- and CSF1/CSF1R signaling pathways play a pivotal role in the pathogenesis of MS and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is the most common animal model of MS. Our research group previously showed that selective inhibition of FGFR1-3 by infigratinib led to a reduction of clinical symptoms through immunomodulation, reduction of neurodegeneration and enhancement of remyelination in EAE. Other groups showed that inhibition of VEGFR2 caused a reduction of the clinical course of EAE by reducing the permeability of the blood-brain barrier. Inhibition of CSF1R enabled the reduction of the clinical course of EAE by depleting microglia and dendritic cells. Fexagratinib is a multi-kinase inhibitor that inhibits FGFR1-3, VEGFR2 and CSF1R and is mainly used in oncology research. The aim of the present study was to investigate the effects of synergistic inhibition of FGFR1-3, VEGFR2 and CSF1R by preventive application of Fexagratinib at doses of 6.25 or 12.5 mg/kg in MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in C57BL/6 mice. Application of Fexagratinib caused a reduction of symptoms until the chronic phase. Mice treated with 12.5 mg/kg did not present severe symptoms. Histological and immunohistochemical staining of cross-sections of the spinal cord showed a significant reduction of immune cell infiltration, demyelination, and neurodegeneration in both the acute and chronic phase. Furthermore, Fexagratinib induced a significant increase in the number of adult oligodendrocytes in lesions in the acute phase. Our results suggest that synergistic inhibition of FGFR1-3, VEGFR2 and CSF1R by immunomodulation, enhanced neuroregeneration, and inhibition of disease progression could be an effective approach for the treatment of MS and may be superior to selective inhibition. After testing the effect of Fexagratinib in cuprizone-induced demyelination, it should be considered in a phase II clinical trial in patients with MS.

8 Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATP6E	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit E1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CNPase	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
CSF1R	Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EMA	European Medicines Agency
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, fibroblast growth factor
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LFB/PAS	luxol fast blue/periodic acid-Schiff
MAD	Mittlere absolute Abweichung vom Median
MBP	basisches Myelinprotein, Myelin Basic Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MT-ND1	mitochondrially encoded NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 1
NF-κB	nuclear factor-κB
NPCs	Neuronale Vorläuferzellen, neural precursor cells
OPCs	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, oligodendrocyte precursor cells
p. i.	post injectionem
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein 1
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SDHD	succinate dehydrogenase complex subunit D
SOD2	Superoxide dismutase 2
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkB	Tropomyosin-Rezeptorkinase B
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, vascular endothelial growth factor
NAWM	normal-erscheinende weiße Substanz, normal appearing white matter
OKB	Oligoklonale Banden
WML	Läsionen innerhalb der weißen Substanz, white matter lesions

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, reactive oxygen species
RNS	Reaktive Stickstoffspezies, reactive nitrogen species
Nos2, iNOS	Nitrogen oxide synthase 2, inducible
Cx3cl1	C-X3-C motif chemokine ligand 1
Cx3cr1	C-X3-C motif chemokine receptor 1

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prävalenz der MS hinsichtlich der geographischen Verteilung..... 2

Abbildung 2 Einteilung von Immuntherapeutika für die schubförmige MS..... 10

Abbildung 3 Der FGF-Rezeptor..... 16

Abbildung 4 Die FGF/FGFR-Signalkaskade 17

Abbildung 5 Chemische Struktur und Funktionsweise von Fexagratinib 26

Abbildung 6 Studiendesign..... 41

Abbildung 7 Erkrankungsbeginn und Krankheitsverlauf..... 59

Abbildung 8 Gewichtsveränderungen nach Gabe von Fexagratinib..... 60

Abbildung 9 Inflammationsindex und Immunzellinfiltration in Läsionen an Tag 18 p. i. 62

Abbildung 10 Inflammationsindex und Immunzellinfiltration Läsionen an Tag 41 p. i. . 63

Abbildung 11 Demyelinisierung und axonale Dichte an Tag 18 p. i. 65

Abbildung 12 Demyelinisierung und axonale Dichte an Tag 41 p. i. 66

Abbildung 13 Oligodendrozyten und Vorläuferzellen in Läsionen und NAWM an Tag 18 p. i. 68

Abbildung 14 Oligodendrozyten und Vorläuferzellen in Läsionen und NAWM an Tag 41 p. i. 69

Abbildung 15 Relative Proteinexpression der FGF/FGFR-, VEGFR2-, CSF1R- und BDNF/TrkB-Signalkaskade..... 73

Abbildung 16 Relative Proteinexpression von Komponenten der Myelinscheide 74

Abbildung 17 Relative Proteinexpression mitochondrialer Proteine 75

Abbildung 18 Relative Proteinexpression von CD200..... 76

Abbildung 19 Relative Genexpression der Signalkaskade, Myelinkomponenten und Remyelinisierungsinhibitoren 80

Abbildung 20 Relative Genexpression von Zyto- und Chemokinen 82

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>McDonald-Kriterien 2017 für die Diagnose einer schubförmigen MS</i>	8
Tabelle 2 <i>McDonald-Kriterien 2017 für die Diagnose einer primär-progredienten MS...</i>	9
Tabelle 3 <i>Einteilung sekretorischer FGFs</i>	15
Tabelle 4 <i>Anwendungen verschiedener FGFR-Inhibitoren</i>	22
Tabelle 5 <i>Inhibition von Kinaseaktivitäten durch Fexagratinib</i>	25
Tabelle 6 <i>Primäre Antikörper</i>	28
Tabelle 7 <i>Sekundäre Antikörper</i>	28
Tabelle 8 <i>Immunhistochemische Antikörper</i>	29
Tabelle 9 <i>Primer</i>	29
Tabelle 10 <i>Kits</i>	30
Tabelle 11 <i>Chemikalien</i>	31
Tabelle 12 <i>Puffer</i>	32
Tabelle 13 <i>Herstellung von 10 ml eines 10% Trenngels</i>	33
Tabelle 14 <i>Herstellung von 3 ml eines 5% Sammelgels</i>	33
Tabelle 15 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	33
Tabelle 16 <i>Laborinstrumente</i>	34
Tabelle 17 <i>Software</i>	35
Tabelle 18 <i>Operationalisierung des EAE-Scores</i>	39
Tabelle 19 <i>Zusammensetzung der intraperitonealen Injektionsnarkose</i>	42
Tabelle 20 <i>Abbruchkriterien</i>	43
Tabelle 21 <i>Verstorbene Versuchstiere</i>	43
Tabelle 22 <i>Einstellungen im Rahmen der Gelelektrophorese</i>	46
Tabelle 23 <i>Einstellungen im Rahmen des Transfers</i>	46
Tabelle 24 <i>Mastermix Reverse Transkription</i>	49
Tabelle 25 <i>Mastermix RT-qPCR</i>	50
Tabelle 26 <i>Verlauf der RT-qPCR</i>	51
Tabelle 27 <i>Inflamationsindex</i>	53
Tabelle 28 <i>Kerndaten des klinischen Verlaufs der EAE</i>	58
Tabelle 29 <i>Inflamationsindex und Immunzellinfiltration</i>	61
Tabelle 30 <i>Demyelinisierung und axonale Dichte</i>	64
Tabelle 31 <i>Quantifizierung von Olig2(+) OPCs und P25(+) adulten Oligodendrozyten</i>	67
Tabelle 32 <i>Statistische Auswertung des klinischen Verlaufs der EAE</i>	122

11 Literaturverzeichnis

1. Armstrong RC, Le TQ, Flint NC, Vana AC, Zhou Y-X. Endogenous cell repair of chronic demyelination. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2006;65(3):245-256. doi:10.1097/01.jnen.0000205142.08716.7e
2. 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
3. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-219. doi:10.1586/14737159.5.2.209
4. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(12):734-750. doi:10.1038/s41577-022-00718-z
5. Bansal R. Fibroblast growth factors and their receptors in oligodendrocyte development: implications for demyelination and remyelination. *Dev Neurosci*. 2002;24(1):35-46. doi:10.1159/000064944
6. Bansal R, Pfeiffer SE. Regulation of oligodendrocyte differentiation by fibroblast growth factors. *Adv Exp Med Biol*. 1997;429:69-77. doi:10.1007/978-1-4757-9551-6_5
7. Beckmann N, Giorgetti E, Neuhaus A, et al. Brain region-specific enhancement of remyelination and prevention of demyelination by the CSF1R kinase inhibitor BLZ945. *Acta Neuropathologica Communications*. 2018;6(1):9. doi:10.1186/s40478-018-0510-8
8. 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;59:102550. doi:10.1016/j.redox.2022.102550
9. Bi Y, Zheng R, Hu J, et al. A novel FGFR1 inhibitor CYY292 suppresses tumor progression, invasion, and metastasis of glioblastoma by inhibiting the Akt/GSK3 β /snail signaling axis. *Genes Dis*. 2024;11(1):479-494. doi:10.1016/j.gendis.2023.02.035
10. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp*. 2014;(86). doi:10.3791/51275
11. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375(6578):296-301. doi:10.1126/science.abj8222

12. Borjini N, Fernández M, Giardino L, Calzà L. Cytokine and chemokine alterations in tissue, CSF, and plasma in early presymptomatic phase of experimental allergic encephalomyelitis (EAE), in a rat model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):291. doi:10.1186/s12974-016-0757-6
13. Borst K, Dumas AA, Prinz M. Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*. 2021;54(10):2194-2208. doi:10.1016/j.immuni.2021.09.014
14. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol*. 1999;115:203-214. doi:10.1385/1-59259-213-9:203
15. Brockington A, Lewis C, Wharton S, Shaw PJ. Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30(5):427-446. doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00600.x
16. Brunelle JL, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol*. 2014;541:151-159. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4
17. Butt AM, Dinsdale J. Fibroblast growth factor 2 induces loss of adult oligodendrocytes and myelin in vivo. *Experimental Neurology*. 2005;192(1):125-133. doi:10.1016/j.expneurol.2004.11.007
18. Butt AM, Dinsdale J. Opposing actions of fibroblast growth factor-2 on early and late oligodendrocyte lineage cells in vivo. *Journal of Neuroimmunology*. 2005;166(1-2):75-87. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.05.015
19. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002;346(3):165-173. doi:10.1056/NEJMoa010994
20. Chapman K, Sewell F, Allais L, et al. A global pharmaceutical company initiative: an evidence-based approach to define the upper limit of body weight loss in short term toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013;67(1):27-38. doi:10.1016/j.yrtph.2013.04.003
21. Chen P, Tang H, Zhang Q, et al. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Protects the Blood-Brain Barrier by Binding of FGFR1 and Activating the ERK Signaling Pathway After Intra-Abdominal Hypertension and Traumatic Brain Injury. *Med Sci Monit*. 2020;26:e922009. doi:10.12659/MSM.922009
22. 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
23. Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, Castro F de. FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*. 2011;31(42):14899-14909. doi:10.1523/JNEUROSCI.1158-11.2011

24. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-1231. doi:10.1016/S0140-6736(02)08220-X
25. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2008;372(9648):1502-1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7
26. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1079-1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
27. 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
28. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-558. doi:10.1038/nri3871
- 29.ECTRIMS 2024 – Oral Presentations. *Multiple Sclerosis Journal*. 2024;30(3_suppl):4-124. doi:10.1177/13524585241269218
30. European Medicines Agency. Accessed April 29, 2024.
31. European Medicines Agency. *Public Summary of Opinion on Orphan Designation: Infigratinib for the Treatment of Cholangiocarcinoma*. [EMADOC-628903358-2757]. 13.11.2020.
32. European Medicines Agency. *Withdrawal of Application for the Marketing Authorisation of Febseltiq (Infigratinib)*. [EMA/870501/2022]. 11.11.2022.
33. Facchinetti F, Hollebecque A, Bahleda R, et al. Facts and New Hopes on Selective FGFR Inhibitors in Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2020;26(4):764-774. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2035
34. Falcão AM, van Bruggen D, Marques S, et al. Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nature Medicine*. 2018;24(12):1837-1844. doi:10.1038/s41591-018-0236-y
35. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3
36. Flachenecker P, Kobelt G, Berg J, Capsa D, Gannedahl M. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe: Results for Germany. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017;23(2_suppl):78-90. doi:10.1177/1352458517708141
37. Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, et al. Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(28):7174-7183. doi:10.1523/JNEUROSCI.0150-08.2008
38. Flynn JM, Melov S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:4-12. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027

39. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, et al. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol.* 2010;24(10):2050-2064. doi:10.1210/me.2010-0142
40. Fontanella C, Ongaro E, Bolzonello S, Guardascione M, Fasola G, Aprile G. Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Ann Transl Med.* 2014;2(12):123. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.14
41. Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(7):493-503. doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03477.x
42. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):917-929. doi:10.1038/nrm2272
43. 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. *J Neurosci.* 2005;25(32):7470-7479. doi:10.1523/JNEUROSCI.2120-05.2005
44. Franklin RJ, Hinks GL. Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *J Neurosci Res.* 1999;58(2):207-213.
45. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(11):839-855. doi:10.1038/nrn2480
46. 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
47. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(4):225-238. doi:10.1038/nrneurol.2014.37
48. Furusho M, Dupree JL, Nave K-A, 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
49. Furusho M, Ishii A, Bansal R. Signaling by FGF Receptor 2, Not FGF Receptor 1, Regulates Myelin Thickness through Activation of ERK1/2-MAPK, Which Promotes mTORC1 Activity in an Akt-Independent Manner. *Journal of Neuroscience.* 2017;37(11):2931-2946. doi:10.1523/JNEUROSCI.3316-16.2017
50. 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

51. Fyffe-Maricich SL, Schott A, Karl M, Krasno J, Miller RH. Signaling through ERK1/2 controls myelin thickness during myelin repair in the adult central nervous system. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(47):18402-18408. doi:10.1523/JNEUROSCI.2381-13.2013
52. 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
53. Gavini K, Parameshwaran K. *StatPearls: Western Blot*. 2021.
54. Gerson-Gurwitz A, Young NP, Goel VK, et al. Zotatifin, an eIF4A-Selective Inhibitor, Blocks Tumor Growth in Receptor Tyrosine Kinase Driven Tumors. *Front Oncol*. 2021;11:766298. doi:10.3389/fonc.2021.766298
55. Girolamo F, Coppola C, Ribatti D, Trojano M. Angiogenesis in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica Communications*. 2014;2:84. doi:10.1186/s40478-014-0084-z
56. Göbel K, Ruck T, Meuth SG. Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018;24(4):432-439. doi:10.1177/1352458518763094
57. Goldmann T, Wieghofer P, Müller PF, et al. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1618-1626. doi:10.1038/nn.3531
58. Guardiola-Diaz HM, Ishii A, Bansal R. Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation. *Glia*. 2012;60(3):476-486. doi:10.1002/glia.22281
59. Gurski F, Shirvanchi K, Rajendran V, et al. Anti-inflammatory and remyelinating effects of fexagratinib in experimental multiple sclerosis. *British journal of pharmacology*. 2025;182(1):142-161. doi:10.1111/bph.17341
60. Hagan N, Kane JL, Grover D, et al. CSF1R signaling is a regulator of pathogenesis in progressive MS. *Cell Death Dis*. 2020;11(10):904. doi:10.1038/s41419-020-03084-7
61. Hagemeyer N, Hanft K-M, Akriditou M-A, et al. Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathologica*. 2017;134(3):441-458. doi:10.1007/s00401-017-1747-1
62. Hayakawa K, Pham L-DD, Som AT, et al. Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(29):10666-10670. doi:10.1523/JNEUROSCI.1944-11.2011

63. Heil M, Clauss M, Suzuki K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *Eur J Cell Biol.* 2000;79(11):850-857. doi:10.1078/0171-9335-00113
64. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. *Löffler/Petrides Biochemie Und Pathobiochemie.* Springer Berlin Heidelberg; 2014.
65. Hemmer B. et al. *Diagnose Und Therapie Der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-Optica-Spektrum-Erkrankungen Und MOG-IgG-Assoziierten Erkrankungen: Entwicklungsstufe: S2k 2. Aktualisierung Als Living Guideline 2023;* 2023. Accessed April 5, 2024. www.dgn.org/leitlinien.
66. Herz J, Reitmeir R, Hagen SI, et al. Intracerebroventricularly delivered VEGF promotes contralesional corticorubral plasticity after focal cerebral ischemia via mechanisms involving anti-inflammatory actions. *Neurobiology of Disease.* 2012;45(3):1077-1085. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.026
67. Höer A, Schiffhorst G, Zimmermann A, et al. Multiple sclerosis in Germany: data analysis of administrative prevalence and healthcare delivery in the statutory health system. *BMC Health Serv Res.* 2014;14:381. doi:10.1186/1472-6963-14-381
68. Holzhauser S, Lukoseviciute M, Andonova T, et al. Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) and Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) Signaling Pathways in Medulloblastoma Cell Lines. *Anticancer Res.* 2020;40(1):53-66. doi:10.21873/anticancer.13925
69. Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin.* 2016;34(4):919-939. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.016
70. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry.* 2000;69(Volume 69, 2000):373-398. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.373
71. Hulkower K, Brosnan CF, Aquino DA, et al. Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 1993;150(6):2525-2533.
72. Hwang D, Seyedsadr MS, Ishikawa LLW, et al. CSF-1 maintains pathogenic but not homeostatic myeloid cells in the central nervous system during autoimmune neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2022;119(14):e2111804119. doi:10.1073/pnas.2111804119
73. Iemmolo M, Ghersi G, Bivona G. The Cytokine CX3CL1 and ADAMs/MMPs in Concerted Cross-Talk Influencing Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(9). doi:10.3390/ijms24098026

74. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α 4 integrin. *Brain*. 2011;134(Pt 12):3560-3577. doi:10.1093/brain/awr268
75. Im JH, Buzzelli JN, Jones K, et al. FGF2 alters macrophage polarization, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy. *Nat Commun*. 2020;11(1):4064. doi:10.1038/s41467-020-17914-x
76. Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(3):173-186. doi:10.1016/S0169-409X(98)00009-X
77. Kamali S, Rajendran R, Stadelmann C, et al. Oligodendrocyte-specific deletion of FGFR2 ameliorates MOG35-55 -induced EAE through ERK and Akt signalling. *Brain Pathol*. 2020:e12916. doi:10.1111/bpa.12916
78. Keam SJ. Axatilimab: First Approval. *Drugs*. 2024;84(11):1475-1480. doi:10.1007/s40265-024-02109-1
79. Koch-Henriksen N, Magyari M. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2021;17(11):676-688. doi:10.1038/s41582-021-00556-y
80. Kwak Y, Cho H, Hur W, Sim T. Antitumor Effects and Mechanisms of AZD4547 on FGFR2-Deregulated Endometrial Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(10):2292-2302. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0032
81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
82. Lamarca A, Vogel A. Futibatinib: second EMA approval for FGFR inhibitor in cholangiocarcinoma. *ESMO Open*. 2023;8(6):102049. doi:10.1016/j.esmoop.2023.102049
83. Lamb YN. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs*. 2021;81(5):575-586. doi:10.1007/s40265-021-01487-0
84. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(3):a028936. doi:10.1101/cshperspect.a028936
85. Latko M, Czyrek A, Porębska N, et al. Cross-Talk between Fibroblast Growth Factor Receptors and Other Cell Surface Proteins. *Cells*. 2019;8(5). doi:10.3390/cells8050455
86. Léger OJ, Yednock TA, Tanner L, et al. Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis. *Hum Antibodies*. 1997;8(1):3-16.
87. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):3-13. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.006

88. Limonta D, Jovel J, Kumar A, et al. Fibroblast Growth Factor 2 Enhances Zika Virus Infection in Human Fetal Brain. *J Infect Dis.* 2019;220(8):1377-1387. doi:10.1093/infdis/jjz073
89. Lindner M, Thümmler K, Arthur A, et al. Fibroblast growth factor signalling in multiple sclerosis: inhibition of myelination and induction of pro-inflammatory environment by FGF9. *Brain.* 2015;138(Pt 7):1875-1893. doi:10.1093/brain/aww102
90. Liu X-J, Zhao H-C, Hou S-J, et al. Recent development of multi-target VEGFR-2 inhibitors for the cancer therapy. *Bioorg Chem.* 2023;133:106425. doi:10.1016/j.bioorg.2023.106425
91. Lottini G, Plicanti E, Lai M, Quaranta P, Pistello M, Freer G. Canonical fibroblast growth factors in viral infection. *Rev Med Virol.* 2023;33(4):e2452. doi:10.1002/rmv.2452
92. MacMillan CJ, Doucette CD, Warford J, Furlong SJ, Hoskin DW, Easton AS. Murine experimental autoimmune encephalomyelitis is diminished by treatment with the angiogenesis inhibitors B20-4.1.1 and angiostatin (K1-3). *PLoS One.* 2014;9(2):e89770. doi:10.1371/journal.pone.0089770
93. Manich G, Recasens M, Valente T, Almolda B, González B, Castellano B. Role of the CD200-CD200R Axis During Homeostasis and Neuroinflammation. *Neuroscience.* 2019;405:118-136. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.10.030
94. Marzan DE, Brügger-Verdon V, West BL, Liddelow S, Samanta J, Salzer JL. Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia.* 2021;69(6):1583-1604. doi:10.1002/glia.23980
95. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA.* 2021;325(8):765-779. doi:10.1001/jama.2020.26858
96. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine.* 2001;194(7):873-882. doi:10.1084/jem.194.7.873
97. Mierzwa AJ, Zhou Y-X, Hibbits N, Vana AC, Armstrong RC. FGF2 and FGFR1 signaling regulate functional recovery following cuprizone demyelination. *Neuroscience Letters.* 2013;548:280-285. doi:10.1016/j.neulet.2013.05.010
98. Miyamura S, Matsuo N, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 (MOG 35-55)-induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Model of Chronic Multiple Sclerosis. *Bio Protoc.* 2019;9(24):e3453. doi:10.21769/BioProtoc.3453
99. Mohan H, Friese A, Albrecht S, et al. Transcript profiling of different types of multiple sclerosis lesions yields FGF1 as a promoter of remyelination. *Acta Neuropathologica Communications.* 2014;2(1):168. doi:10.1186/s40478-014-0168-9

100. Montgomery IN, Rauch HC. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice: primary control of EAE susceptibility is outside the H-2 complex. *The Journal of Immunology*. 1982;128(1):421-425. doi:10.4049/jimmunol.128.1.421
101. Montilla A, Zabala A, Er-Lukowiak M, et al. Microglia and meningeal macrophages depletion delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis*. 2023;14(1):16. doi:10.1038/s41419-023-05551-3
102. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol*. 2004;172(7):4618-4623. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4618
103. Mota MVB, Zaidan BC, do Canto AM, et al. ATP Synthase Subunit Beta Immunostaining is Reduced in the Sclerotic Hippocampus of Epilepsy Patients. *Cell Mol Neurobiol*. 2019;39(1):149-160. doi:10.1007/s10571-018-0641-2
104. Multiple Sclerosis International Federation. *Atlas of MS 3rd Edition: Mapping Multiple Sclerosis Around the World*; 2020. Accessed November 26, 2025. <https://www.atlasofms.org/map/united-kingdom/epidemiology/number-of-people-with-ms>.
105. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016;7(2):27-31. doi:10.4103/0976-0105.177703
106. National Library of Medicine. Accessed April 5, 2024. <https://clinicaltrials.gov/search?intr=AZD4547>
107. Nave K-A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(4):275-283. doi:10.1038/nrn2797
108. Nishiyama A, Serwanski DR, Pfeiffer F. Many roles for oligodendrocyte precursor cells in physiology and pathology. *Neuropathology*. 2021;41(3):161-173. doi:10.1111/neup.12732
109. Nissen JC, Thompson KK, West BL, Tsirka SE. Csf1R inhibition attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes recovery. *Experimental Neurology*. 2018;307:24-36. doi:10.1016/j.expneurol.2018.05.021
110. Nowacka MM, Obuchowicz E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. *Neuropeptides*. 2012;46(1):1-10. doi:10.1016/j.npep.2011.05.005
111. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3):215-266. doi:10.1002/wdev.176
112. Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Chang C, Gershwin ME, Anaya J-M. Bystander activation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2019;103:102301. doi:10.1016/j.jaut.2019.06.012

113. Paik PK, Shen R, Berger MF, et al. A Phase Ib Open-Label Multicenter Study of AZD4547 in Patients with Advanced Squamous Cell Lung Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(18):5366-5373. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0645
114. Palle P, Ferreira FM, Methner A, Buch T. The more the merrier? Scoring, statistics and animal welfare in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Lab Anim*. 2016;50(6):427-432. doi:10.1177/0023677216675008
115. Parthasarathy G, Pattison MB, Midkiff CC. The FGF/FGFR system in the microglial neuroinflammation with *Borrelia burgdorferi*: likely intersectionality with other neurological conditions. *J Neuroinflammation*. 2023;20(1):10. doi:10.1186/s12974-022-02681-x
116. Patel J, Balabanov R. Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(8):10647-10659. doi:10.3390/ijms130810647
117. Piaton G, Aigrot M-S, Williams A, et al. Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain*. 2011;134(Pt 4):1156-1167. doi:10.1093/brain/awr022
118. Piehl F. Current and emerging disease-modulatory therapies and treatment targets for multiple sclerosis. *J Intern Med*. 2021;289(6):771-791. doi:10.1111/joim.13215
119. Pierau M, Engelmann S, Reinhold D, Lapp T, Schraven B, Bommhardt UH. Protein kinase B/Akt signals impair Th17 differentiation and support natural regulatory T cell function and induced regulatory T cell formation. *The Journal of Immunology*. 2009;183(10):6124-6134. doi:10.4049/jimmunol.0900246
120. Preusser M, Lehotzky A, Budka H, Ovádi J, Kovács GG. TPPP/p25 in brain tumours: expression in non-neoplastic oligodendrocytes but not in oligodendroglioma cells. *Acta Neuropathol*. 2007;113(2):213-215. doi:10.1007/s00401-006-0173-6
121. Prineas JW, Parratt JDE. Multiple Sclerosis: Microglia, Monocytes, and Macrophage-Mediated Demyelination. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2021;80(10):975-996. doi:10.1093/jnen/nlab083
122. Prinz M, Masuda T, Wheeler MA, Quintana FJ. Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. *Annual review of immunology*. 2021;39:251-277. doi:10.1146/annurev-immunol-093019-110159
123. Proescholdt MA, Jacobson S, Tresser N, Oldfield EH, Merrill MJ. Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflam-

- matory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2002;61(10):914-925. doi:10.1093/jnen/61.10.914
124. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol*. 2006;13(7):700-722. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x
125. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine*. 2013;19(10):1264-1272. doi:10.1038/nm.3337
126. Rajendran R, Böttiger G, Dentzien N, et al. Effects of FGFR Tyrosine Kinase Inhibition in OLN-93 Oligodendrocytes. *Cells*. 2021;10(6). doi:10.3390/cells10061318
127. 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 Pathol*. 2018;28(2):212-224. doi:10.1111/bpa.12487
128. Rajendran R, Rajendran V, Böttiger G, et al. The small molecule fibroblast growth factor receptor inhibitor infigratinib exerts anti-inflammatory effects and remyelination in a model of multiple sclerosis. *British journal of pharmacology*. 2023. doi:10.1111/bph.16186
129. Rajendran R, Rajendran V, Giraldo-Velasquez M, et al. Oligodendrocyte-Specific Deletion of FGFR1 Reduces Cerebellar Inflammation and Neurodegeneration in MOG35-55-Induced EAE. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(17). doi:10.3390/ijms22179495
130. Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*. 2012;15(8):1074-1077. doi:10.1038/nn.3168
131. Reuss B, Bohlen und Halbach O von. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 2003;313(2):139-157. doi:10.1007/s00441-003-0756-7
132. Rigau V, Morin M, Rousset M-C, 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
133. Roscoe WA, Welsh ME, Carter DE, Karlik SJ. VEGF and angiogenesis in acute and chronic MOG((35-55)) peptide induced EAE. *Journal of Neuroimmunology*. 2009;209(1-2):6-15. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.01.009
134. 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

135. 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
136. Sarchielli P, Di Filippo M, Ercolani MV, et al. Fibroblast growth factor-2 levels are elevated in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neuroscience Letters*. 2008;435(3):223-228. doi:10.1016/j.neulet.2008.02.040
137. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7). doi:10.1101/cshperspect.a004952
138. 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
139. Segura-Anaya E, Flores-Miranda R, Martínez-Gómez A, Dent MAR. A novel histochemical method of simultaneous detection by a single- or double-immunofluorescence and Bielschowsky's silver staining in teased rat sciatic nerves. *J Neurosci Methods*. 2018;304:46-51. doi:10.1016/j.jneumeth.2018.03.007
140. Shao X, Chen S, Yang D, et al. FGF2 cooperates with IL-17 to promote autoimmune inflammation. *Sci Rep*. 2017;7(1):7024. doi:10.1038/s41598-017-07597-8
141. Shen G, Zheng F, Ren D, et al. Anlotinib: a novel multi-targeting tyrosine kinase inhibitor in clinical development. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):120. doi:10.1186/s13045-018-0664-7
142. Shirani A, Zhao Y, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. Temporal trends of disability progression in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada (1975-2009). *Multiple Sclerosis Journal*. 2012;18(4):442-450. doi:10.1177/1352458511422097
143. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*. 2012;337(6099):1231-1235. doi:10.1126/science.1220834
144. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
145. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2016;36(2):115-127. doi:10.1055/s-0036-1579739
146. 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

147. Stadelmann C, Wegner C, Brück W. Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):275-282. doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.007
148. Stanley ER, Chitu V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(6). doi:10.1101/cshperspect.a021857
149. Stanojlovic M, Pang X, Lin Y, Stone S, Cvetanovic M, Lin W. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Exacerbates Loss of Lower Motor Neurons and Axons during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE*. 2016;11(7):e0160158. doi:10.1371/journal.pone.0160158
150. Steinbach K, Merkler D. Neuropathological Techniques to Investigate CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Methods Mol Biol*. 2016;1304:189-209. doi:10.1007/7651_2014_110
151. Su JJ, Osoegawa M, Matsuoka T, et al. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. *Journal of the Neurological Sciences*. 2006;243(1-2):21-30. doi:10.1016/j.jns.2005.11.006
152. Tahmasebi F, Pasbakhsh P, Mortezaee K, Madadi S, Barati S, Kashani IR. Effect of the CSF1R inhibitor PLX3397 on remyelination of corpus callosum in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):10576-10586. doi:10.1002/jcb.28344
153. Thermo Fisher Scientific. Essentials of Real Time PCR. Accessed September 15, 2021. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
154. Thümmeler K, Rom E, Zeis T, et al. Polarizing receptor activation dissociates fibroblast growth factor 2 mediated inhibition of myelination from its neuroprotective potential. *Acta Neuropathologica Communications*. 2019;7(1):212. doi:10.1186/s40478-019-0864-6
155. Traka M, Podojil JR, McCarthy DP, Miller SD, Popko B. Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):65-74. doi:10.1038/nn.4193
156. Tripathi R, McTigue DM. Prominent oligodendrocyte genesis along the border of spinal contusion lesions. *Glia*. 2007;55(7):698-711. doi:10.1002/glia.20491
157. Tsperson V, Gruber RC, Goldberg MF, et al. Suppression of inflammatory responses during myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is regulated by AKT3 signaling. *The Journal of Immunology*. 2013;190(4):1528-1539. doi:10.4049/jimmunol.1201387

158. Tucker JA, Klein T, Breed J, et al. Structural insights into FGFR kinase isoform selectivity: diverse binding modes of AZD4547 and ponatinib in complex with FGFR1 and FGFR4. *Structure*. 2014;22(12):1764-1774. doi:10.1016/j.str.2014.09.019
159. U.S. Food and Drug Administration, HHS. *Helsinn Healthcare SA; Withdrawal of Approval of New Drug Application for TRUSELTIQ (Infigratinib Phosphate) Capsules, 25 Milligrams and 100 Milligrams*. [FDA–2024–N–2178]. 16.05.2024.
160. 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
161. van Nierop GP, van Luijn MM, Michels SS, et al. Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathologica*. 2017;134(3):383-401. doi:10.1007/s00401-017-1744-4
162. 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
163. Wang N, Yi H, Fang L, et al. CD226 Attenuates Treg Proliferation via Akt and Erk Signaling in an EAE Model. *Front Immunol*. 2020;11:1883. doi:10.3389/fimmu.2020.01883
164. Weaver A, Bossaer JB. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitors: A review of a novel therapeutic class. *J Oncol Pharm Pract*. 2021;27(3):702-710. doi:10.1177/1078155220983425
165. Wen J, Wang S, Guo R, Liu D. CSF1R inhibitors are emerging immunotherapeutic drugs for cancer treatment. *Eur J Med Chem*. 2023;245(Pt 1):114884. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114884
166. Werner K, Bitsch A, Bunkowski S, Hemmerlein B, Brück W. The relative number of macrophages/microglia expressing macrophage colony-stimulating factor and its receptor decreases in multiple sclerosis lesions. *Glia*. 2002;40(1):121-129. doi:10.1002/glia.10120
167. Witte ME, Mahad DJ, Lassmann H, van Horssen J. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Trends Mol Med*. 2014;20(3):179-187. doi:10.1016/j.molmed.2013.11.007
168. Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2011;29(2):257-278. doi:10.1016/j.ncl.2010.12.009
169. Xu D, Zeng S, Qiu W, et al. Fruquintinib in refractory metastatic colorectal cancer: a multicenter real-world study. *ESMO Open*. 2024;9(11):103702. doi:10.1016/j.esmoop.2024.103702

170. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*. 2014;211(8):1533-1549. doi:10.1084/jem.20132477
171. Yong VW. Microglia in multiple sclerosis: Protectors turn destroyers. *Neuron*. 2022;110(21):3534-3548. doi:10.1016/j.neuron.2022.06.023
172. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. *GeneReviews®: Leber Hereditary Optic Neuropathy*. 1993.
173. Zeis T, Enz L, Schaeren-Wiemers N. The immunomodulatory oligodendrocyte. *Brain Research*. 2016;1641(Pt A):139-148. doi:10.1016/j.brainres.2015.09.021
174. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000;106(7):829-838. doi:10.1172/JCI9369
175. Zhou Y-X, Pannu R, Le TQ, Armstrong RC. Fibroblast growth factor 1 (FGFR1) modulation regulates repair capacity of oligodendrocyte progenitor cells following chronic demyelination. *Neurobiology of Disease*. 2012;45(1):196-205. doi:10.1016/j.nbd.2011.08.004
176. Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res*. 2011;20(3):481-489. doi:10.1007/s11248-010-9403-8

12 Anhang

Tabelle 32 Statistische Auswertung des klinischen Verlaufs der EAE

Tag (p. i.)	<i>P</i> (6,25 vs. Pla.)	<i>P</i> (12,5 vs. Pla.)	<i>P</i> (12,5 vs. 6,25)
11	0,025	0,135	1
12	0,019	0,106	1
13	< 0,001	0,002	1
14	< 0,001	< 0,001	1
15	< 0,001	< 0,001	1
16	< 0,001	< 0,001	0,972
17	< 0,001	< 0,001	0,878
18	< 0,001	< 0,001	0,915
19	0,059	0,023	1
20	0,127	0,066	1
21	0,137	0,109	1
22	0,179	0,069	1
23	0,213	0,044	1
24		0,095	ns
25	ns	ns	ns
26	ns	ns	ns
27	ns	ns	ns
28	ns	ns	ns
29	ns	ns	ns
30		0,054	ns
31	0,325	0,046	1
32	0,549	0,046	0,763
33		0,073	ns
34	ns	ns	ns
35		0,099	ns
36	0,746	0,027	0,393
37	ns	ns	ns
38	0,663	0,036	0,515
39	0,679	0,045	0,581
40	0,442	0,038	0,797
41	0,442	0,038	0,797

Abk.: Placebo (Pla.), 6,25 bzw. 12,5 mg/kg KG (6,25 bzw. 12,5), nicht signifikant (ns). Angegebene *P*-Werte beziehen sich auf den jeweiligen paarweisen Einzelvergleich der Gruppen nach Dunns-Test nach signifikantem Ergebnis im Kruskal-Wallis-Test.

13 Publikationsverzeichnis

Publikationen, die aus den Daten dieser Dissertationsschrift generiert wurden:

Gurski, F.*, **Shirvanchi, K.***, Rajendran, V., Rajendran, R., Megalofonou, F.-F., Böttiger, G., Stadelmann, C., Bhushan, S., Ergün, S., Karnati, S., & Berghoff, M. (2025). Anti-inflammatory and remyelinating effects of fexagratinib in experimental multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 182(1), 142–161. <https://doi.org/10.1111/bph.17341>

* geteilte Erstautorenschaft

Shirvanchi, K., Gurski, F., Rajendran, V., Rajendran, R., Megalofonou, F.-F., Stadelmann-Nessler, C., Karnati, S., & Berghoff, M. (2024). The Multi-kinase Inhibitor AZD4547 Reduces Inflammation and Neurodegeneration, and Enhances Remyelination in a Mouse Model of Multiple Sclerosis (P7-6.008). *Neurology*, 102(7_supplement_1), Article 3287. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000205039>. Poster Presentation. AAN Annual Meeting 2024, Denver, USA.

Weitere Publikationen und Kongressbeiträge:

Rajendran, R., Rajendran, V., Böttiger, G., Stadelmann, C., **Shirvanchi, K.**, Au, L. von, Bhushan, S., Wallendszus, N., Schunin, D., Westbrock, V., Liebisch, G., Ergün, S., Karnati, S., & Berghoff, M. (2023). The small molecule fibroblast growth factor receptor inhibitor infigratinib exerts anti-inflammatory effects and remyelination in a model of multiple sclerosis. *British Journal of Pharmacology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/bph.16186>

Rajendran, R., Rajendran, V., Gupta, L., **Shirvanchi, K.**, Schunin, D., Karnati, S., Giraldo-Velásquez, M., & Berghoff, M. (2022). Interferon Beta-1a versus Combined Interferon Beta-1a and Oligodendrocyte-Specific FGFR1 Deletion in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012183>

Shirvanchi, K., Rajendran, V., Rajendran, R., Karnati, S., & Berghoff, M. (2021): Ultrastructural analysis of the effects of Infigratinib, a Selective pan-FGFR-Inhibitor, on Myelination in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. Presentation. Science Day 2021, Gießen, Germany

14 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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

15 Danksagung

Meinen allerersten Dank möchte ich an Herrn Professor Berghoff richten, der mir eine Doktorarbeit in der Neurologie, dem Fach, für das ich seit Jahren brenne, erst ermöglicht hat. Seine stets höfliche und ruhige Art gepaart mit unermüdlicher Unterstützung während der Versuche und des Schreibens der Dissertation und des Manuskriptes haben dies alles erst möglich gemacht. Er hatte immer einen guten Rat parat, ein Ohr offen und einen Blick dafür, wie man etwas noch besser machen kann.

Ich möchte zudem Dr. Ranjithkumar Rajendran und Dr. Vinothkumar Rajendran für ihre Unterstützung in meiner Zeit im Labor danken.

Außerdem möchte ich Herrn Professor Karnati und der gesamten elektronenmikroskopischen Abteilung der Universität Würzburg für die herzliche Aufnahme und die Einbindung ins Team danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Sieglinde Schenk, die sich die Mühe gemacht hat, immense Mengen an elektronenmikroskopischen Präparaten zuzubereiten.

Ich danke Herrn Dr. Gärtner aus dem Institut für Anatomie der Universität Gießen, der mir - ohne mit der Wimper zu zucken - die Nutzung seines Elektronenmikroskopes gestattet hat und Hilfe und Scherze bot, wo es nur ging.

Ich möchte mich bei all meinen Kollegen und Kolleginnen bedanken, die mich so wunderbar im Labor aufgenommen und eingearbeitet haben. Insbesondere möchte ich dabei Natascha, Victor, Gregor, Laureen, Foivi und natürlich Fynn danken.

Ich danke Mama, Baba und Aref für ihre unbegrenzte Liebe und Unterstützung. Zudem danke ich meiner Freundin Imogen für ihren unendlichen Support und dafür, dass ich Teil ihres Lebens sein darf.

Ich danke all meinen Freunden, Freundinnen und meinem Verein, die aus den letzten sieben Jahren die beste Zeit meines Lebens gemacht haben.