

Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten)

in Kooperation mit

KKE Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie
des DKFZ in Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten)

In vivo Darstellung von Immunzellen mittels Eisenoxid-
Nanopartikeln und MRT in einem Modell der Multiplen Sklerose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Klara Kirschbaum

aus
Frankfurt am Main
(2020)

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Doktorvater: Prof. Dr. med. Michael Platten

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
WISSENSCHAFTLICHES ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
TABELLENVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 Multiple Sklerose	5
1.2 Die Pathophysiologie der MS	7
1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	13
1.4 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Mäuse	19
2.2 EAE-Induktion	19
2.3 Generierung von Knochenmarksmakrophagen	20
2.4 Genexpressionsanalyse	20
2.5 Phagozytoseassay	21
2.6 Durchflusszytometrie	21
2.6.1 Gewebeaufbereitung	21
2.6.2 Färbung	22
2.6.3 Datenerfassung.....	22
2.7 Histologie	22
2.7.1 Gewebeaufbereitung.....	22
2.7.2 Neurofilament Protein Färbung	22
2.7.3 Luxol Fast Blue Färbung	23
2.7.4 Eisenfärbung.....	23
2.7.5 Immunhistochemie/Immunfluoreszenz	23
2.7.6 Bilderfassung	23
2.8 Bildverarbeitung und Quantifizierung.....	23
2.9 Magnetresonanztomografie	24
2.10 Graphische Darstellung und statistische Auswertung	25

2.11	Materialien.....	25
2.11.1	Durchflusszytometrie	25
2.11.2	IHC Antikörper und Farbstoffe	26
2.11.3	Puffer.....	26
2.11.4	Zellkulturmedien	27
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Makrophagen und Mikroglia akkumulieren in den EAE-Läsionen	28
3.2	Makrophagen nehmen CLIO <i>in vitro</i> auf	32
3.3	Die Aufnahme von CLIO hat keinen Einfluss auf die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen.....	35
3.4	Von Makrophagen aufgenommene CLIO lassen sich per MRT nachweisen.....	36
3.5	CLIO akkumulieren in den myeloiden Zellen des lymphatischen Gewebes	36
3.6	CLIO akkumulieren in den Makrophagen und Mikroglia der EAE-Läsionen	39
3.7	In EAE-Läsionen akkumulieren CLIO hauptsächlich in Zellen der angeborenen Immunität	41
3.8	Die CLIO-Akkumulation in den EAE-Läsionen geschieht in der akuten Phase	44
3.9	Mikroglia nehmen freie CLIO auf, die über die BHS ins ZNS gelangen	46
3.10	EAE-Läsionen können mit CLIO in der MRT dargestellt werden.....	47
3.11	Das CLIO-Signal korreliert mit der klinischen Schwere der EAE.....	48
3.12	Ein Versuch mit dem zugelassenen Ferumoxylol bestätigte die klinische Anwendbarkeit	51
4	DISKUSSION.....	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	62
7	TABELLARISCHER ANHANG (FALLS ERFORDERLICH) .	83
8	LEBENS LAUF	84
9	DANKSAGUNG	86

WISSENSCHAFTLICHES ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLIO	<i>cross-linked iron oxide nanoparticle</i>
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
DMT	<i>disease-modifying therapy</i>
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FI	Fluoreszenzintensität
FLASH	<i>fast low-angle shot</i>
FSC-A	<i>forward scatter-area</i>
FSC-W	<i>forward scatter-width</i>
GBKM	Gadolinium-basierte Kontrastmittel
GD	Gadolinium
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<i>i.c.</i>	<i>intracardial</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
KFA	komplettes Freund-Adjuvans
KG	Körpergewicht
KMM	Knochenmarksmakrophagen
LFB	Luxol Fast Blue
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphozytenantigen-6-Komplex
MBP	Myelin-basisches Protein
MFI	Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
NFP	Neurofilament Protein Färbung
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NT	Neurotrophin
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	<i>primary progressive multiple sclerosis</i>
PTx	Pertussistoxin
RARE	<i>rapid acquisition with relaxation enhancement</i>
RRMS	<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>
RT-qPCR	<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>

s. siehe

s.c. *subcutan*
SJL..... *Swiss Jim Lambert*
SPION..... *superparamagnetic iron oxide nanoparticle*
SPMS..... *secondary progressive multiple sclerosis*
T2-g T2-gewichteten
TAM Tumor-assoziierte Makrophagen
T_H..... T-Helferzellen
USPION *ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticle*
ZNS..... zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: PTx verursacht isoliert eingesetzt keine BHS-Störung.	29
Abbildung 2: Beurteilung axonaler Schädigung und Demyelinisierung.	30
Abbildung 3: Makrophagen/Mikroglia akkumulieren in EAE-Läsionen.	31
Abbildung 4: Aktivierte Mikroglia zeigen eine veränderte Morphologie.	32
Abbildung 5: KMM können <i>in vitro</i> zu M ₁ -/M ₂ -artigen Makrophagen polarisiert werden.	33
Abbildung 6: Makrophagen nehmen CLIO <i>in vitro</i> auf.	34
Abbildung 7: Makrophagen nehmen CLIO konzentrationsabhängig auf.	35
Abbildung 8: Die Aufnahme von CLIO hat keinen Einfluss auf das Phagozytose- Verhalten der Makrophagen.	36
Abbildung 9: CLIO-markierte Makrophagen zeigen einen MRT-Signalabfall.	36
Abbildung 10: Freie CLIO werden nach 48 h aus dem Blut entfernt.	37
Abbildung 11: CLIO werden aus dem Blut in das lymphatische Gewebe aufgenommen.	38
Abbildung 12: CLIO akkumulieren in den myeloiden Zellen des lymphatischen Gewebes.	39
Abbildung 13: CLIO akkumulieren in den Makrophagen und Mikroglia der EAE- Läsionen.	40
Abbildung 14: B- und T-Zellen zeigen keine CLIO-Akkumulation.	41
Abbildung 15: Der Anteil der Makrophagen in EAE-Läsionen korreliert mit der klinischen Schwere der EAE.	42
Abbildung 16: Die CLIO-Aufnahme der Makrophagen in EAE-Läsionen ist ein Marker der klinischen Schwere der EAE.	43
Abbildung 17: Die CLIO-Akkumulation in EAE-Läsionen geschieht in myeloiden Zellen.	44
Abbildung 18: Die CLIO-Akkumulation beschränkt sich auf die akute Phase der EAE.	45
Abbildung 19: CLIO-Aufnahme in Mikroglia.	46
Abbildung 20: Die CLIO-Akkumulation kann mit Hilfe der MRT dargestellt werden. .	48
Abbildung 21: Das CLIO-MRT-Signal korreliert mit der klinischen Schwere der EAE.	49
Abbildung 22: CLIO-Akkumulation in extrazerebellären Läsionen.	50
Abbildung 23: <i>Ex vivo</i> MRT-Darstellung von EAE-Läsionen mit CLIO.	51
Abbildung 24: EAE-Läsionen können mit Ferumoxytol in der MRT dargestellt werden.	52
Abbildung 25: Ferumoxytol akkumuliert in EAE-Läsionen.	53

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klinischer EAE-Score	19
Tabelle 2: RT-qPCR Primer. Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich gekauft.	21
Tabelle 3: Verwendete Mikroskope.	23
Tabelle 4: MRT-Sequenzen zur Untersuchung des ZNS.	24
Tabelle 5: MRT-Sequenzen zur abdominalen Untersuchung.	24
Tabelle 6: FACS Farbstoffe	25
Tabelle 7: FACS Antikörper	26
Tabelle 8: Primäre Antikörper für IHC	26
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für IHC	26
Tabelle 10: Puffer	26
Tabelle 11: Zellkulturmedien	27

1 EINLEITUNG

Diese wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit dem Nutzen von Eisenoxid-Nanopartikeln in der Bildgebung mittels Magnetresonanztomografie (MRT) und ihrer Bedeutung für die Diagnostik und Therapieüberwachung der Multiplen Sklerose (MS).

1.1 Multiple Sklerose

Die MS ist eine Autoimmunerkrankung, welche das zentrale Nervensystem (ZNS) betrifft und mit Demyelinisierung und Neurodegeneration einhergeht. Ausgelöst durch eine fehlgeleitete, vermutlich T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber den Myelinscheiden der neuronalen Axone, kommt es zur Entzündung und Demyelinisierung der Neurone. Langfristig gehen die betroffenen Nervenzellen unter und werden durch Narbengewebe aus Gliazellen ersetzt (Steinman, 1996). Bei an MS erkrankten Patienten kommt es zu einer Vielzahl von neurologischen Symptomen, von motorischen Ausfällen über sensible Defizite bis hin zu kognitiven Störungen (Noseworthy et al., 2000). Auch bei nach aktuellem Wissensstand angemessener Therapie schreitet die Erkrankung stetig fort und gilt derzeit als unheilbar.

Weltweit sind schätzungsweise 2 bis 5 Millionen Menschen an MS erkrankt (Hemmer et al., 2015). Die durchschnittliche Prävalenz liegt bei 33/100.000, jedoch unterliegt sie starken geografischen Schwankungen – von 2/100.000 in Subsahara-Afrika bis zu 189/100.000 in Nordeuropa (Browne et al., 2014). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren (Garg and Smith, 2015). Frauen sind mehr als doppelt so häufig betroffen wie Männer (Trojano et al., 2012).

Die Ätiologie der Krankheit ist noch ungeklärt. Nichtsdestotrotz ist bekannt, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Auffällig ist die starke geografische Abhängigkeit des Erkrankungsrisikos. Dabei steigt die Prävalenz bis auf einige Ausnahmen mit zunehmendem Abstand zum Äquator an (Kurtzke, 2013). Dieser Einfluss scheint besonders in jungen Jahren von Bedeutung zu sein, da sich im Falle einer Migration vor dem Alter von 15 Jahren das Erkrankungsrisiko der Prävalenz des neuen Wohnorts angleicht (McLeod et al., 2011). Weiterhin zeigten Studien, dass ein Mangel an Vitamin D die Entstehung von MS fördert und analog dazu das Risiko, an MS zu erkranken, durch die Ergänzung von Vitamin D gesenkt werden kann (Hayes, 2007; Munger et al., 2004). Übereinstimmend damit zeigte sich, dass die Exposition gegenüber Sonnenlicht (Ultraviolettstrahlung), welches zur Synthese von Vitamin D benötigt wird, einem Auftreten von MS entgegenwirkt (van der Mei et al., 2001). Als weitere Risikofaktoren wurden sowohl das Tabakrauchen (Hernan et al., 2005; Riise et al., 2003) als auch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus identifiziert (Ascherio and Munch, 2000; Bach, 2002; Levin et al., 2010). Neben den äußeren Einflüssen scheinen genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigten Verwandte ersten Grades von an MS Erkrankten gegenüber der normalen Population ein 20- bis 40-fach erhöhtes, eineiige Zwillinge sogar ein 300-fach erhöhtes Risiko, ebenfalls MS zu entwickeln (Ebers et al., 1986; Sadovnick et al., 1993). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass der HLA DR15 Haplotyp mit dem Auftreten von MS assoziiert sein könnte (Sadovnick, 2012; Schmidt et al., 2007). Mit Hilfe von genomweiten Assoziationsstudien wurden zusätzlich über 100 genetische Regionen aufgedeckt, die mit einem Risiko für MS verbunden sind (Beecham et al., 2013).

80 % der MS-Patienten zeigen einen schubförmigen Verlauf (RRMS, aus dem Engl.: *relapsing-remitting multiple sclerosis*). Dabei wechseln sich Phasen der akuten

Symptomatik (sogenannte Schübe) mit einer Dauer von Tagen bis Wochen mit teils langen symptomfreien Intervallen ab (Noseworthy et al., 2000; Steinman, 2014). In dieser Patientengruppe geht in ca. 65 % der Fälle die Erkrankung langfristig in eine sekundär progrediente MS (SPMS) über (Compston and Coles, 2008). Zum einen heilen nun die Symptome der akuten Phasen klinisch nicht mehr vollständig aus, zum anderen kommt es auch in den Intervallen zwischen zwei Schüben zu einer voranschreitenden Verschlechterung der neurologischen Symptome. Nur ca. 20 % der Patienten sind von der primär progredienten Form der MS (PPMS) betroffen, bei der es von Beginn an zu einer fortschreitenden Verschlechterung des neurologischen Status kommt, ohne dass je eine akute Exazerbation auftritt (Compston and Coles, 2008; Nylander and Hafler, 2012).

MS ist eine vielgestaltige Krankheit. Welche Symptome in den Vordergrund treten, hängt davon ab, welcher Bereich des ZNS betroffen ist (Sospedra and Martin, 2005). Klinisch kann sich die MS mit motorischen Störungen wie Paresen, Spastiken und Koordinationsstörungen, sensorischen Ausfällen und kognitiven Defiziten wie Demenz und Depressionen präsentieren (Noseworthy et al., 2000). Ein häufiges Frühsymptom ist die retrobulbäre Neuritis optica (Shams and Plant, 2009), die mit einer akuten Sehstörung einhergeht und zu einem permanenten Verlust der Sehfähigkeit führen kann. Ist das autonome Nervensystem betroffen, kann es unter anderem zu Blasenfunktions- und Verdauungsstörungen kommen (Haensch and Jorg, 2006). Bei Läsionen im Kleinhirn können eine Ataxie und die Charcot-Trias, bestehend aus Nystagmus, Intentionstremor und skandierter Sprache, auftreten (Katz Sand and Lublin, 2013). Um die klinische Schwere der Erkrankung und die funktionellen Defizite der Patienten zu erfassen und deren Verlauf zu beurteilen, wird die *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) verwendet (Kurtzke, 1983).

Die Diagnose der MS wird mit Hilfe der McDonald Kriterien gestellt (Polman et al., 2011). Dabei finden vor allem der klinische Zustand des Patienten, der zeitliche Verlauf der Symptome und die Ergebnisse der Bildgebung Beachtung. Zusätzlich können Liquoruntersuchungen sowie evozierte Potentiale herangezogen werden (Milo and Miller, 2014). Ein wichtiges Kriterium in der Diagnosestellung ist die zeitliche und räumliche Dissoziation der Läsionen in der MRT (Selchen et al., 2012).

Die MRT wurde im Laufe der Zeit zum wichtigsten apparativen Werkzeug in der MS-Diagnostik (Bakshi et al., 2005). Sie wird in der Diagnosestellung sowie als prognostischer Marker eingesetzt. Weiterhin ermöglicht die MRT, Aktivität und Schwere der Erkrankung einzuschätzen. Sie unterstützt Ärzte darin, die für den Patienten angemessene Behandlung zu eruieren und die Wirksamkeit bereits begonnener Therapien zu überwachen (Miller et al., 1998; Swanton et al., 2014).

Die klinischen MRT-Protokolle setzen sich in der Regel aus verschiedenen Sequenzen zusammen. Anhand einer T2-gewichteten (T2-g) Sequenz lassen sich hyperintense Läsionen detektieren. Sie sind Ausdruck eines erhöhten Wassergehalts und nicht spezifisch für eine bestimmte Pathologie. Sie weisen unter anderem auf Entzündung, Ödem oder Gliose hin (Bakshi et al., 2005). Eine hohe T2 Läsionslast prognostiziert einen ungünstigen Krankheitsverlauf (Brex et al., 2002; O'Riordan et al., 1998). Persistierende hypointense Läsionen in der T1-g Sequenz, sogenannte schwarze Löcher, repräsentieren einen irreversiblen Untergang von Nervengewebe durch Demyelinisierung und Neurodegeneration (Bitsch et al., 2001). Die Last dieser Läsionen korreliert mit der klinischen Beeinträchtigung der Patienten (Truyen et al., 1996). Mit Hilfe des Kontrastmittels (KM) Gadolinium (GD) kann in der T1-g Sequenz

zusätzliche Information gewonnen werden. KM Anreicherungen zeigen eine Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) an (Bruck et al., 1997). Sie sind ein starker Indikator für die Aktivität der MS und ein guter Prädiktor zukünftiger Rückfälle (Kappos et al., 1999). Darüber hinaus kann eine Gehirn- und Rückenmarkatrophie mit Hilfe der MRT festgestellt und quantifiziert werden. Diese hat einen hohen prädiktiven Wert gegenüber der langfristigen körperlichen und kognitiven Beeinträchtigung der Patienten (Bermel and Bakshi, 2006; Zivadinov and Bakshi, 2004).

Trotz ihres weitreichenden Nutzens in der MS hat die MRT-Bildgebung Grenzen. Die verwendeten Techniken stützen sich hauptsächlich auf die Darstellungen sekundärer Effekte der autoimmun-vermittelten Entzündung. Marker wie Gliose und „schwarze Löcher“ sind Gewebedefekte und damit Langzeitfolgen der Immunreaktion gegen das Myelin. Sie sagen nichts über die aktuelle Aktivität der MS aus. Eine GD-Anreicherung hingegen zeigt zwar eine BHS-Störung an, diese ist aber keinesfalls spezifisch für die MS. Auch andere Erkrankungen wie z.B.: Gliome, ischämische Infarkte, Blutungen und Infektionen gehen mit einer erhöhten Permeabilität der BHS einher (Kassner et al., 2009; Singh et al., 2007). Außerdem stellt die BHS-Störung nur einen der vielen bei einer Entzündung ablaufenden Prozesse dar. Es lässt sich mit Hilfe von GD in der MRT-Untersuchung kein Rückschluss auf z.B. die zelluläre Infiltration des ZNS ziehen.

In der Therapie der MS wird zwischen der Behandlung akuter Schübe und der Langzeittherapie und Schubprophylaxe unterschieden. Im Falle einer akuten Exazerbation wird der Patient mit hochdosierten Glukokortikoiden behandelt. Diese beschleunigen die Rückbildung der Symptome und verkürzen die Dauer des Schubes (Brusaferri and Candelise, 2000; Miller et al., 2000). Die für die Langzeittherapie eingesetzten krankheitsmodifizierenden Medikamente (DMT, aus dem Engl.: „*disease-modifying therapies*“) zeigen hauptsächlich bei der RRMS eine gute Wirksamkeit. Sie wirken immunmodulierend oder -supprimierend und unterscheiden sich in Hinblick auf den Wirkmechanismus, ihre Potenz, das Nebenwirkungsprofil, die Applikationsform und die Kosten. Welches für den Patienten das geeignetste Medikament ist, muss individuell nach Aktivität und Schwere der Krankheit sowie persönlichen Aspekten entschieden werden. Das 1966 als erstes DMT für MS zugelassene Interferon (IFN) β wird heute noch regelmäßig in Fällen mit moderater Krankheitsaktivität eingesetzt (Cross and Naismith, 2014; Jacobs et al., 1996; Yong et al., 1998). Ebenso bei geringer Aktivität angewandte Therapeutika umfassen heute Glatirameracetat, Teriflunomid und Dimethylfumarat (Confavreux et al., 2014; Gold et al., 2012; Johnson et al., 1995). Bei schweren Fällen werden zur Eskalation der Therapie vor allem monoklonale Antikörper wie Natalizumab, ein α -Integrin-Antikörper, und Alemtuzumab, ein Anti-CD52-Antikörper, sowie der Rezeptormodulator Fingolimod eingesetzt (Kappos et al., 2006; Kappos et al., 2011; Menge et al., 2014). In Einzelfällen mit sehr aggressivem Krankheitsverlauf werden bei hoher Schubfrequenz und ungenügender Wirksamkeit bzw. Therapieversagen Chemotherapeutika wie z.B. Cyclophosphamid und Mitoxantron genutzt (Fox, 2006; Weiner and Cohen, 2002).

1.2 Die Pathophysiologie der MS

Auf zellbiologischer Ebene existieren zwei verschiedene Theorien über die Entstehung der MS. Das intrinsische Modell geht von einer Aktivierung residenter Mikroglia innerhalb des ZNS als Auslöser aus. Dabei wird angenommen, dass die Mikroglia durch Abfallprodukte neurodegenerativer Prozesse oder im Zuge noch unbekannter Neuroinfektionen aktiviert werden (Heneka et al., 2014; Ransohoff and Engelhardt, 2012).

Bei dem allgemein weiter verbreiteten extrinsischen Ansatz steht die periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im Zentrum. Diese entstehen durch einen Fehler in der negativen Selektion im Thymus und gelangen so in den Kreislauf. Durch Mechanismen wie der molekularen Mimikry zwischen Myelinproteinen und mikrobiellen Peptiden (Harkiolaki et al., 2009; Munz et al., 2009), *epitope spreading* (Engl. für „Epitop-Ausweitung“) und *bystander activation* (Engl. für „Aktivierung Unbeteiligter“) werden diese T-Zellen während einer viralen oder bakteriellen Infektion aktiviert (Katz-Levy et al., 1999; Miller et al., 1997). Daneben wird die konstante Präsentation von ZNS-Antigenen in zervikalen Lymphknoten als Aktivierungsfaktor diskutiert (Furtado et al., 2008; Zhang et al., 2008). Als Ursprung der Autoantigene werden vor allem Myelinproteine diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass zirkulierende CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut von MS-Patienten Myelinbestandteile wie Myelin-basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) und Proteolipid-Protein (PLP) erkennen (Hellings et al., 2001). Diese aktivierten T-Zellen gelangen dann, gefolgt von aktivierten B-Zellen und Monozyten, in das ZNS, wo sie eine Entzündung hervorrufen (Dendrou et al., 2015). Der Eintritt in das ZNS kann entweder über den Subarachnoidalraum, den Plexus Choroideus oder bei bestehender BHS-Störung direkt über die BHS erfolgen (Ransohoff et al., 2003). Dort werden sie durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) reaktiviert und differenzieren unter dem Einfluss von Interleukin (IL) 12 und IL23 zu T-Helferzellen (T_H) 1 und T_H17 (Cua et al., 2003; Gately et al., 1998; Komiyama et al., 2006). Beide Arten von T-Zellen sind von großer Bedeutung in der Pathogenese der MS. Sie schütten eine Vielzahl an Zytokinen aus – die wichtigsten unter ihnen sind IFN γ , IL17 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF, aus dem Engl.: „*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“) (Cao et al., 2015). Durch diese verursachen und unterhalten sie die autoimmune Entzündung und fördern die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC, aus dem Engl.: *major histocompatibility complex*) Klasse II sowie die Präsentation von Antigenen durch APZ (Codarri et al., 2011; Ponomarev et al., 2007). Sie rekrutieren Zellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen und Neutrophile (Hu et al., 2005), aktivierten diese sowie Mikroglia (Kawanokuchi et al., 2008; Murphy et al., 2010) und verursachen bzw. verstärken eine Störung der BHS (Kebir et al., 2007; Onishi and Gaffen, 2010).

Die bereits erwähnten APZ spielen in der Entwicklung der MS eine entscheidende Rolle. Sie sind sowohl für die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten (Furtado et al., 2008; Zhang et al., 2008) sowie für die Reaktivierung innerhalb des ZNS durch die Präsentation von Myelinantigenen verantwortlich (Kivisakk et al., 2009; Serafini et al., 2006; Tompkins et al., 2002). Im späteren Verlauf der Entzündung verstärken sie den Prozess der Pathogenese durch *antigen spreading* (Engl. für „Antigen-Ausweitung“), wodurch T-Zellen anderer Spezifität ebenfalls aktiviert werden können (McRae et al., 1995).

B-Zellen

MS wird klassischerweise als eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung betrachtet. Doch auch B-Zellen scheinen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der MS zu spielen. Hinweise darauf sind das vermehrte Vorkommen von B-Zellen und Autoantikörpern in akuten entzündlichen Läsionen sowie ihre erhöhte Anzahl im zerebrospinalen Liquor von MS-Patienten (Cepok et al., 2001; Esiri, 1980). Daneben wurde bei einigen MS-Patienten die Anwesenheit B-Zell dominierter Lymphfollikel in den Meningen festgestellt (Magliozzi et al., 2007). Bei der Mehrheit der MS-Patienten

ist zudem eine intrathekale Immunglobulinsynthese zu beobachten. Die Immunglobuline, welche in der isoelektrischen Fokussierung sogenannte oligoklonale Banden hervorrufen, werden von intrathekalen B-Zellen sezerniert und können zur Diagnostik der MS herangezogen werden (Obermeier et al., 2008). Die Relevanz von B-Zellen auch in der Therapie der MS wurde eindrücklich in Arbeiten von Hauser et al. (2008) betont. Diese zeigten, dass eine Depletion von B-Zellen mit Hilfe des CD20-Antikörpers Rituximab zu einem Rückgang der entzündlichen Läsionen sowie einer geringeren Rückfallrate der MS-Patienten führte.

Zu den konkreten Funktionen der B-Zellen in der Pathogenese der MS gehört die Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen und deren (Re-)Aktivierung (Molnarfi et al., 2013). Sie schütten pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) α und IL6 aus, die die Entzündung unterhalten und zu einer Reaktivierung der T-Zellen beitragen (Barr et al., 2012; Dang et al., 2014). Die von B-Zellen sezernierten Myelin-spezifischen Antikörper tragen durch Zell-vermittelte und Komplement-abhängige Zytotoxizität zur Zerstörung von Myelinscheiden bei (Esiri, 1977; Genain et al., 1999; Wekerle, 2017).

Makrophagen

Neben T- und B-Zellen spielen Makrophagen und Mikroglia, als Zellen der angeborenen Immunität, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS. In den entzündlichen Läsionen sind sie die vorherrschende Entität und tragen durch vielfältige Mechanismen zur Aufrechterhaltung der autoimmunen Entzündung bei (Ajami et al., 2011; Polman et al., 1986). Die Relevanz von Makrophagen und Mikroglia konnte in verschiedenen Studien belegt werden. So konnte durch eine Depletion von Makrophagen mit Hilfe von Dichloromethylene-Diphosphonate-Liposomen die Invasion des ZNS durch Lymphozyten verhindert und ein Ausbruch der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem häufig verwendeten Tiermodell der MS, unterdrückt werden (Huitinga et al., 1990; Tran et al., 1998). Analog hierzu führte das Blockieren der Mikrogliaaktivierung zu einem verzögerten Auftreten der EAE sowie abgeschwächten Krankheits-assoziierten Symptomen (Bhasin et al., 2007; Heppner et al., 2005).

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten, welche in der Blutbahn zirkulieren. Diese entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Unter dem Einfluss von Chemokinen wie dem monozyten-chemotaktischen Protein 1 und 3 werden sie mit Hilfe des C-C Chemokinrezeptors 2 und dem Komplementrezeptor 3 in Entzündungsgebiete wie u.a. MS-Läsionen rekrutiert. Dort differenzieren sie unter dem Einfluss von Zytokinen und weiteren Faktoren zu Makrophagen aus (Fife et al., 2000; Huang et al., 2001; Rosen and Gordon, 1990; Tsou et al., 2007).

Makrophagen exprimieren auf ihrer Oberfläche große Mengen an MHC II und fungieren im ZNS als die vorherrschende APZ-Population (Boyle and McGeer, 1990). Hierfür werden Bestandteile der Myelinscheiden, welche infolge der Schädigung der Nervenzellen freigesetzt werden, prozessiert und anschließend gegenüber autoreaktiven T-Zellen präsentiert, wodurch es zu einer Reaktivierung und Expansion der T-Zellen kommt (Hickey and Kimura, 1988; Sedgwick et al., 1993).

Durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie dem TNF α , IL1, IL6, IL12 und IL23 sowie zusätzlicher löslicher Mediatoren wie reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies und Glutamat verursachen sie Gewebeschäden und verstärken die

Entzündung (Benveniste, 1992; Hendriks et al., 2005; Piani et al., 1991; Smith and Lassmann, 2002; Steinman, 2001).

TNF α und reaktive Sauerstoffspezies haben eine schädigende Wirkung auf die Myelinscheiden-bildenden Oligodendrozyten und das Myelin selbst. Dadurch kommt es zum Untergang der Oligodendrozyten und schließlich zur Demyelinisierung (Griot et al., 1990; Selmaj and Raine, 1988). Die Makrophagen unterstützen diesen Prozess durch die Phagozytose von Bestandteilen beschädigter Myelinscheiden, aber auch durch die aktive Zerstörung und Ingestion intakter Myelinscheiden (Lampert, 1967; Lampert, 1978; Nikić et al., 2011; Romanelli et al., 2016).

Trotz ihrer weitreichenden schädigenden Wirkung gibt es Hinweise, dass Makrophagen auch eine Rolle in der Regeneration des ZNS spielen. So zeigten Studien, dass eine Depletion von Makrophagen in der chronischen Phase der Erkrankung den Prozess der Remyelinisierung beeinträchtigt (Kotter et al., 2005).

Makrophagen unterstützen die Remyelinisierung durch das Beseitigen von Myelinresten aus dem Bereich der Läsionen – eine notwendige Bedingung für den Wiederaufbau (Triarhou and Herndon, 1985). Zusätzlich schütten aktivierte Makrophagen vermehrt Neurotrophine wie den Nervenwachstumsfaktor (NGF, aus dem Engl. „*nerve growth factor*“), den Wachstumsfaktor BDNF (aus dem Engl.: „*brain-derived neurotrophic factor*“) and Neurotrophin (NT) 3 aus. Diese verhindern den Untergang geschädigter Axone und Neuronen, fördern deren Regeneration und unterstützen Oligodendrozyten in der Synthese von Myelinscheiden (Cohen et al., 1996; Kalinowska-Lyszczarz and Losy, 2012; Linker et al., 2010). Hinzu kommt, dass Makrophagen auch anti-inflammatorische Mediatoren wie IL10 und den transformierenden Wachstumsfaktor β ausschütten (Kiefer et al., 2001). Außerdem scheinen Makrophagen einen begünstigenden Einfluss auf die Apoptose autoreaktiver T-Zellen zu haben. Dieser wird über reaktive Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid und TNF α vermittelt (Aliprantis et al., 1996)

Es wird deutlich, dass die Makrophagen eine ambivalente Rolle in der MS spielen. Einerseits wirken sie pro-inflammatorisch und sind kausal an der Demyelinisierung beteiligt. Auf der anderen Seite haben sie regenerierende Fähigkeiten und unterstützen die Remyelinisierung. Ein Versuch diese Dichotomie zu erklären, ist die M₁/M₂-Theorie. Sie beschreibt, dass Makrophagen auf einem kontinuierlichen Spektrum der Phänotypen ineinander übergehende Funktionszustände annehmen können. Dieses Spektrum reicht von einem Extrem, dem pro-inflammatorischen Phänotyp (M₁), bis hin zum anderen Endpunkt, dem anti-inflammatorischen Typ (M₂) (Mosser and Edwards, 2008).

Welcher Phänotyp angenommen wird, hängt von dem umgebenden Mikromilieu ab. Einfluss nehmen neben autokrine und von anderen Zellen gesendete Signale auch durch Phagozytose aufgenommene Stoffe. Die Übergänge zwischen den Funktionszuständen sind fließend. Der Phänotyp wird nicht abschließend festgelegt, sondern kann sich bei Veränderungen der empfangenen Signale jederzeit ändern (Stout et al., 2005).

In vitro kann eine M₁-Polarisierung mit Hilfe von IFN γ und Lipopolysaccharid (LPS) herbeigeführt werden. Eine Verschiebung in die M₂-Richtung wird durch Chemokine wie IL4 und IL13 erreicht (Mosser and Edwards, 2008).

In vivo spielen CD4⁺ T-Zellen eine dominante Rolle in der M₂-Polarisierung (Chan et al., 2011). Auch der von Makrophagen selbst ausgeschüttete Faktor IL10 begünstigt eine Polarisierung in die M₂-Richtung (Deng et al., 2012), während IFN γ -, und GM-

CSF sowie eine Stimulierung des Toll-ähnlichen Rezeptors (TLR, aus dem Engl.: „*toll-like receptor*“) 4 in die entgegengesetzte Richtung wirken (Martinez and Gordon, 2014). Arbeiten von Boven et al. (2006) zeigten, dass eine Myelinaufnahme in Makrophagen zu einem M₂-artigen Phänotyp führte. Weiterhin implizierte die Studie, dass das selbstlimitierende Verhalten von MS-Läsionen in der RRMS durch diese myelinabhängige Induktion von anti-inflammatorischen Makrophagen zustande kommt, die die Entzündung unterdrücken und eine Remyelinisierung begünstigen. Dem gegenüber steht eine Studie von van der Laan et al. (1996), die zeigte, dass die Aufnahme von Myelin in Makrophagen zu einer erhöhten Expression von TNF α und Stickstoffmonoxid führte. Diese tragen zur Verstärkung der Entzündung bei und werden vermehrt in M₁-artigen Makrophagen exprimiert.

Zur Charakterisierung der polarisierten Makrophagen werden Schlüsselproteine und Oberflächenmarker herangezogen (Mantovani et al., 2004; Mantovani et al., 2002). Ein gängiges System zur Unterscheidung von M₁/M₂ Makrophagen bedient sich des L-Argininmetabolismus. Die in Makrophagen und Mikroglia enthaltene induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin. Diese Reaktion findet vermehrt in pro-inflammatorischen Makrophagen statt, weshalb sich das Enzym zur Darstellung dieser eignet. Eine kompetitive Hemmung findet über den Substratverbrauch durch das Enzym Arginase statt, welches L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff spaltet. Dieses wird vermehrt in M₂-artigen Makrophagen exprimiert (Hesse et al., 2001; Lisi et al., 2017).

Eine weitere Möglichkeit, Makrophagen nach ihrem Phänotyp zu unterscheiden bietet der Lymphozytenantigen-6-Komplex (Ly6C). Typischerweise exprimieren pro-inflammatorische Monozyten, die Vorgänger der Makrophagen, Ly6C in hohem Maße auf ihrer Oberfläche, während M₂-artige Monozyten Ly6C nur geringfügig aufweisen (Geissmann et al., 2003; Nahrendorf et al., 2007).

Mikroglia

Die im Gehirn residenten Mikroglia sind ebenfalls Teil des mononukleären Phagozyten-Systems und spielen neben den Makrophagen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS. Sie entwickeln sich während der Embryogenese aus den dem Dottersack entstammenden Vorläuferzellen (Schulz et al., 2012). Im physiologischen Zustand zeichnen sie sich durch einen kleinen Zellkörper mit langen verzweigten Ausläufern aus, die das umliegende Gewebe konstant abtasten und auf Zellschäden und Veränderungen des Mikromilieus untersuchen (Davalos et al., 2005; Kreutzberg, 1996; Nimmerjahn et al., 2005). Ihre Aufgabe ist das Aufrechterhalten der ZNS Homöostase. Sie reagieren empfindlich auf pathologische Veränderungen (Kreutzberg, 1996). Störungen der BHS, anfallender Zelldetritus, axonale Schäden, Neurodegeneration und von T-Zellen sezernierte proinflammatorische Zytokine führen zu einer Aktivierung der Mikroglia (Kawanokuchi et al., 2008). Es kommt zu einer Veränderung der Morphologie. Die Zelle geht in einen amöboiden Zustand über, der sich durch einen kompakten Zellkörper mit motilen Protrusionen zur Fortbewegung auszeichnet (Fernández-Arjona et al., 2017; Stence et al., 2001). In diesem Zustand sind Mikroglia lichtmikroskopisch nicht von aus dem Blut stammenden Makrophagen zu unterscheiden (Gautier et al., 2012).

Sehr früh in der Entwicklung der MS finden sich bereits Ansammlungen aktivierter Mikroglia in der normal wirkenden weißen Substanz ohne begleitende BHS-Störung

oder T-Zell-Infiltration. Dies wird als früheste Form der MS beschrieben (van der Valk and Amor, 2009; van Horssen et al., 2012).

Grundsätzlich übernehmen aktivierte Mikroglia in der Pathophysiologie der MS ähnliche Funktionen wie die Makrophagen. Sie fungieren als APZ und Phagozyten (Rezaie and Male, 1999; Ulvestad et al., 1994). Sie schütten pro-inflammatorische Mediatoren wie IL1 und TNF α aus (Luo et al., 2017) und verstärken hierdurch die Entzündung. Es kommt zur Astrozytendysfunktion, welche wiederum zu Oligodendrozytenschäden führt und somit zum Prozess der Demyelinisierung beiträgt (Sharma et al., 2010).

Dem gegenüber stehen Funktionen, die im Dienst der Remyelinisierung und Regeneration stehen. Durch das Beseitigen von Myelinbestandteilen tragen sie zur Resolution entzündlicher Läsionen bei (Neumann et al., 2009). Gleichzeitig unterstützen sie Gliazellen und Neurone in ihrer Regeneration durch das Ausschütten von Wachstumsfaktoren wie Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1, BDNF, NT-3 und NGF (Elkabes et al., 1996).

Auch in Bezug auf Mikroglia wird das M₁/M₂-Paradigma beschrieben. Es können, ähnlich wie bei Makrophagen, verschieden polarisierte Funktionszustände angenommen werden. Dies geschieht ausgelöst durch Zytokine und Chemokine sowie durch phagozytierte Zellbestandteile (Schwartz et al., 2006; Walker and Lue, 2015). So zeigten Studien, dass beispielsweise die Aufnahme von Myelinresten und apoptotischen Lymphozyten zu einer herabregulierten MHC II Expression führt und die Mikroglia einen anti-inflammatorischen Phänotyp annehmen lässt (Chan et al., 2003; Huizinga et al., 2012).

Granulozyten

Obwohl ihre Rolle in der MS noch wenig erforscht ist, suggerierten einige Studien einen wichtigen Beitrag der neutrophilen Granulozyten zur Pathogenese der MS (Carlson et al., 2008; McColl et al., 1998). Untersuchungen von Aube et al. (2014) zeigten, dass eine Depletion der Neutrophilen einen verzögerten Beginn und eine abgeschwächte Symptomatik der EAE zur Folge hatte.

Physiologischerweise machen neutrophile Granulozyten den größten Teil der Leukozyten des Menschen aus. Als Teil der angeborenen Immunabwehr besitzen sie die Fähigkeit zur Leukodiapedese und haben zytotoxische Eigenschaften, welche in der Abwehr bakterieller und fungaler Infektionen zum Einsatz kommen (Nathan, 2006). In der Entstehung autoimmuner Demyelinisierung scheinen Neutrophile besonders in der frühen Phase eine Rolle zu spielen. EAE-Studien zeigten, dass sie unter den ersten Zellen sind, die das ZNS infiltrieren (Brown et al., 1982). Dorthin rekrutiert werden sie mit Hilfe des C-X-C Chemokinligand 1, der auf zerebralem Kapillarendothel exprimiert wird, und dem C-X-C Chemokinrezeptor (CXCR) 2, der auf den Granulozyten zu finden ist (Roy et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Neutrophile einen erhöhten Anteil der Leukozyten im Blut von MS-Patienten ausmachen (Debruyne et al., 1998; Naegele et al., 2012) sowie dass diese vermehrt einen pro-inflammatorischen Phänotyp aufweisen (Kurt-Jones et al., 2002). Neutrophile Granulozyten werden durch den Kontakt mit Mediatoren wie dem Granulozyten-CSF, IL 6 und TNF α aktiviert (Eyles et al., 2006; Lloyds et al., 1995; Nauseef and Borregaard, 2014). Daraufhin zeigen sie eine verringerte Apoptoserate und veränderte Expression von Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmolekülen (Colotta et al., 1992; Condliffe et al., 1996). Beispielsweise werden Moleküle wie TLR2

und CXCR2, welche für die Migration der Neutrophilen und Erkennung pathogener Keime entscheidend sind, hochreguliert (Naegele et al., 2012). Außerdem zeigen sie gesteigerte zytotoxische Effektorfunktionen wie das Freisetzen reaktiver Sauerstoffspezies, Degranulation und Phagozytose (Condliffe et al., 1998; Fittschen et al., 1988; Swain et al., 2002). Diese in der Eliminierung pathogener Keime nützlichen Mechanismen tragen in der Pathogenese der MS/EAE zu Gewebeschäden und Demyelinisierung bei (Weiss, 1989). Hinzu kommt, dass Neutrophile durch das Ausschütten von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α die Reifung von APZ fördern und T-Zellen aktivieren (Steinbach et al., 2013; Tani et al., 2001). Einen wesentlichen Beitrag scheinen sie zur Störung der BHS zu leisten (Giddy et al., 2005). Der Mechanismus dieses Phänomens ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Vermutet wird eine Beteiligung von Metalloproteasen, welche durch Neutrophile freigesetzt werden (Aube et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich die Pathogenese der MS als ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems beschreiben. Viele der Mitspieler sind sowohl an der Entstehung und Aufrechterhaltung der MS als auch an ihrer Resolution beteiligt. Eine klare Zuordnung von Zellpopulation und Funktion bleibt problematisch. Deutlich ist, dass auf diesem Gebiet weiterhin großer Forschungsbedarf besteht.

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Um die zugrundeliegenden Pathomechanismen der MS besser erforschen zu können, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt. Sie ahmen zentrale Punkte der Pathophysiologie der MS weitgehend nach und bieten so die Möglichkeit, diese zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die MS zu ziehen und neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Die EAE ist ein weitverbreitetes Forschungsmodell für MS. Ihre Anfänge reichen weit ins 20. Jahrhundert zurück (Schweinburg, 1925). T-Zellen werden peripher durch das subkutane Einbringen von Peptiden aus Proteine der Myelinscheide wie MBP, PLP und MOG aktiviert (Robinson et al., 2014). Sie werden in einer Emulsion mit Freund's Adjuvans und hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* verabreicht, wodurch die Immunantwort beschleunigt und verstärkt wird (Lebar and Vincent, 1984). Zusätzlich kann eine Injektion mit Pertussistoxin (PTx) die Permeabilität der BHS verstärken und das Einwandern aktivierter T-Zellen ins ZNS durch eine gesteigerte Endotheladhäsion erleichtern (Gold et al., 2006; Hofstetter et al., 2002; Roy et al., 2012). Die Krankheitsverläufe unterscheiden sich je nach gewähltem Antigen, Tierstamm und ob mit oder ohne PTx gearbeitet wird (Gold et al., 2006). Bei einer Immunisierung mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ von SJL (Swiss Jim Lambert) Mäusen kommt es zu einem schubförmigen Verlauf (Tuohy et al., 1988). Dieser ähnelt der häufigsten klinischen Manifestation der MS, der RRMS, und eignet sich daher besonders, um Studien zur MS durchzuführen. Hinzu kommt, dass sich die Hauptlast der Läsionen im Bereich des Zerebellums sowie einige entzündliche Plaques im Großhirn bilden, während bei anderen etablierten Modellen – wie der EAE-Induktion mit MOG₃₅₋₅₅ in C57BL/6 Mäusen – Läsionen vor allem im Rückenmark zu finden sind und ein chronischer Verlauf zu beobachten ist. Solche Läsionen sind beim Menschen selten, während vor allem die Läsionen im Groß- und Kleinhirn für gravierende Symptome wie motorische Ausfälle und kognitive Defizite sorgen. Hinzu kommt, dass sich Läsionen im Kleinhirn bei Versuchstieren auf Grund geringerer Atemartefakte besser in der MRT untersuchen lassen als spinale Infiltrate.

Der Gebrauch von PTx in dieser Konstellation ist umstritten. Während es in einigen Studien heißt, er sei überflüssig, beschreiben andere ihn als notwendig (Miller et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass PTx die klonale Expansion von T-Zellen durch die Aktivierung von APZ unterstützt und dadurch als Adjuvant in der EAE-Induktion dient (Hofstetter et al., 2002; Ryan et al., 1998). Aus diesem Grund und wegen der guten Ergebnissen aus früheren Studien im Sinne von stabilen Krankheitsverläufen und einer hohen Induktionseffizienz unter der Verwendung von PTx (Chen et al., 2008) entschied man sich in dieser Arbeit für dessen Gebrauch in Verbindung mit dem schubförmigen PLP₁₃₉₋₁₅₁/SJL-Modell.

Die ersten Symptome der EAE treten 7 - 12 Tage nach Induktion auf. Dem Ausbruch geht meist ein ausgeprägter Gewichtsverlust der Tiere voraus. Die Krankheit beginnt mit aufsteigenden Paralysen, die zunächst den Schwanz, danach die Hinterbeine und dann die Vorderbeine betreffen. Alternativ dazu kann es auch zu atypischen Symptomen kommen. Dazu zählen unilaterale Ataxie, spastische asymmetrische Paralysen und Kopffrollen bzw. Schwindel bis hin zum unermüdlichen Rollen um die eigene Körperachse (Curtis et al., 2014). Nach einem initialen Peak kommt es zu einem Abflachen der Symptomatik. Im weiteren Verlauf werden schubförmige Rückfälle mit moderaten Symptomen beobachtet (Batoulis et al., 2011; Rao and Segal, 2004).

1.4 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION, aus dem Engl.: „*superparamagnetic iron oxide nanoparticle*“) sind zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Es wurden bereits vielversprechende Ergebnisse mit der Verwendung von SPION als KM in MRT-Untersuchungen von ZNS-Erkrankungen (Weissleder et al., 1990) sowie in der magnetisch geleiteten zielgerichteten Behandlung von Tumorerkrankungen erzielt (Alexiou et al., 2000).

SPION sind aus einem Eisenoxidkern variabler Größe, der in der Regel aus Magnetit (Fe₃O₄) oder Maghemit (Fe₂O₃) besteht, sowie einer Hülle aus Dextran oder ähnlichen Polysacchariden aufgebaut (Wahajuddin and Arora, 2012). Die verschiedenen Partikel unterscheiden sich in ihrer Gesamtgröße und werden entsprechend in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Während kleine SPION eine Größe von 50 – 150 nm aufweisen, bewegen sich ultrakleine SPION (USPION, aus dem Engl.: „*ultrasmall SPION*“) zwischen 10 und 50 nm (Di Marco et al., 2007). Die Größe der Partikel hat Einfluss auf deren biochemische Eigenschaften. Je größer die SPION, desto leichter werden sie durch das retikuloendotheliale System aus dem Kreislauf entfernt. Aus diesem Grund werden Teilchen mit einer Größe von über 100 nm bevorzugt für die Bildgebung von Lebererkrankungen verwendet, während sich USPION besonders für die Darstellung von ZNS-Erkrankungen eignen (Gandhi et al., 2006). Größen unterhalb von 10 nm wirken sich auf die Halbwertszeit der Teilchen im Blut aus, da eine Penetration des Endothels möglich wird. Dadurch kommt es in diesem Fall vermehrt zur Extravasation (Mahmoudi et al., 2011). Auch die Größe des Eisenoxidkerns ist von besonderer Bedeutung, da diese über die magnetischen Eigenschaften der Partikel entscheidet (Weissleder et al., 1990). Eine weitere Variable im Aufbau der SPION ist die Hülle. Meist setzt sie sich zusammen aus Dextranpolymeren oder ähnlichen Polysacchariden. Sie schirmt den Kern gegenüber äußeren Einflüssen ab und sorgt für Stabilität. Je nach Aufbau und Beschaffenheit kann die Hülle unterschiedliche Funktionen erfüllen. Dazu gehören das Beeinflussen der biochemischen Eigenschaften der Partikel wie Kolloidstabilität, Halbwertszeit und Biodistribution, die Regulation der Endozytoseeffizienz durch die Zielzellen sowie die Verbesserung der

Biokompatibilität. Gleichzeitig bietet sie eine Plattform für das Koppeln von Wirkstoffen und Liganden für den zielgesteuerten Einsatz der SPION (Mahmoudi et al., 2011; Wahajuddin and Arora, 2012).

SPION haben superparamagnetische Eigenschaften. Das bedeutet, dass sie aufgrund der geringen Größe des Eisenoxidkerns keine permanenten magnetischen Eigenschaften haben. Erst durch das Anlegen eines externen magnetischen Feldes erlangen sie diese. Nach Abschalten des magnetischen Feldes kehren die Partikel wieder in den relaxierten Zustand zurück (Wahajuddin and Arora, 2012). Diese besondere Eigenschaft der SPION macht man sich vor allem in zwei Bereichen der Medizin zu nutze.

Mit Hilfe von extrakorporalen Magneten können an SPION gekoppelte Medikamente gezielt an den gewünschten Wirkungsort geleitet werden. Durch diesen zielgerichteten Medikamententransport werden lokal höhere Konzentrationen des Wirkstoffs und damit eine verbesserte Effektivität erreicht. Gleichzeitig werden unerwünschte Nebenwirkungen durch hohe Kreislaufkonzentrationen verhindert (Alexiou et al., 2000; Lubbe et al., 1996).

Weiterhin werden SPION auf dem Feld der MRT-Diagnostik als KM eingesetzt. In der MRT führt das in den SPION enthaltene Eisenoxid zu einem starken Abfall der T1-, T2- und T2*-Relaxationszeit. Dieses Phänomen wird auch als Suszeptibilitätsartefakt beschrieben und stellt sich im T2- und T2*-g Bild als Signalauslöschung, also schwarz dar (Bashir et al., 2015; Lawaczeck et al., 2004).

Besonders in der Untersuchung von ZNS-Erkrankungen mit USPION erweist sich dieser Effekt als nützlich. Anwendungsgebiete sind bisher die Visualisierung von Tumorgefäßen, Messungen des relativen zerebralen Blutvolumens, Tumor- und autoimmun-vermittelte Entzündungen, Schlaganfälle sowie Gefäßmalformationen (Christen et al., 2013; Dósa et al., 2011; Dousset et al., 2006; Saleh et al., 2004).

Als KM zeichnen sich USPION durch zwei Funktionen besonders aus. Durch ihre Größe können sie auf physiologischem Wege das Endothel nicht penetrieren. Dadurch zeigen sie eine geringe Extravasation und verbleiben besonders lange im Gefäß. Aus diesem Grund eignen sie sich besonders für den Einsatz als Blutpool-KM in der Angiografie. Gefäße werden in den MRT-Untersuchungen besonders gut und lange dargestellt. Damit sind die USPION in *puncto* Gefäßdarstellung sowie Halbwertszeit den gängigen GD-basierten KM (GBKM) überlegen (Bremerich et al., 2007; Loubeyre et al., 1997; Nolte-Ernsting et al., 1998).

Eine weitere nützliche Eigenschaft der USPION ist die Anreicherung der Teilchen in Bereichen gestörter Homöostase. Mit einer Latenz von 24 – 48 Stunden zeigt sich eine deutliche Konzentrierung der USPION in pathologisch veränderten Gebieten wie z.B. in der Umgebung von malignen Tumoren und entzündlich veränderten Regionen (Stoll and Bendszus, 2010; Tourdias et al., 2012; Varallyay et al., 2002).

Ein Grund für dieses Phänomen ist die gesteigerte Durchlässigkeit der Kapillarwände in Gebieten der Entzündung oder malignen Veränderungen. USPION können extravasieren und reichern sich so im umliegenden Gewebe an (Boerman et al., 1997; Yuan et al., 1994).

Davon abzugrenzen ist die Akkumulation von USPION in Entzündungszellen und ihr passiver Transport durch die Bewegung der Zellen. Nach Einbringen in den Körper durch *intravenöse* (*i.v.*) Injektion werden die Partikel von phagozytären Zellen aufgenommen. In der Blutbahn sind das vor allem zirkulierende Monozyten/Makrophagen und im Gewebe stationäre Makrophagen sowie Mikroglia im ZNS (Beduneau et al., 2009). Anschließend wandern die Immunzellen angezogen von

Chemokinen in entzündlich verändertes Gewebe ein (Korchinski et al., 2015). Die lange Halbwertszeit der USPIO wirkt sich dabei positiv auf deren Aufnahme durch Phagozyten aus, da sie einen längeren Kontakt zwischen zirkulierenden Zellen und Partikeln ermöglicht (Chouly et al., 1996). Dieses Phänomen wird in der Bildgebung für das Markieren und Verfolgen von Zellen eingesetzt. Anhand des MRT-Signals der phagozytierten USPIO werden die Zellen im MRT-Bild sichtbar. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich Aussagen über Lokalisation, Quantität und Dynamik infiltrierender Entzündungszellen in Läsionen treffen. Zusätzlich können entzündliche Herde sichtbar gemacht werden, die beispielsweise nicht mit einer ausgeprägten BHS-Störung einhergehen und somit keine GBKM-Anreicherung zeigen.

In klinischen Studien wurde die Anwendung von USPIO und GBKM in MRT-Untersuchungen von MS-Patienten untersucht. Im Vergleich waren unterschiedliche Anreicherungsmuster der KM zu erkennen. Einerseits zeigten einige entzündliche Läsionen eine Anreicherung mit USPIO, aber nicht mit GBKM. Auf der anderen Seite gab es Läsionen, bei denen es sich genau andersherum verhielt. Durch die kombinierte Anwendung der beiden KM konnten bis zu 51 % mehr Läsionen detektiert werden. Zusätzlich wurde die Erkrankung zweier weiterer Patienten aus einer Kohorte von 24 Patienten als aktiver Krankheitsverlauf klassifiziert (Tourdias et al., 2012). Das Zusammenspiel von USPIO und GBKM in MRT-Untersuchungen von MS-Patienten scheint also eine sinnvolle Erweiterung der Standarduntersuchungsprotokolle zu sein, da es eine differenziertere Beurteilung des aktuellen Zustands und der Prognose dieser Patienten zulässt (Dousset et al., 2006; Farrell et al., 2013; Tourdias et al., 2012).

Einen weiteren Vorteil der USPIO bietet ihre hohe Biokompatibilität und geringe Toxizität. Nach Abbau der Partikel wird das enthaltene Eisen in den körpereigenen Stoffwechsel eingebracht und überschüssige Mengen werden über den Stuhlgang ausgeschieden. Die Gefahr einer Überdosierung ist minimal (Hussain et al., 2005; Kim et al., 2006; Lj Mandarano et al., 2010).

Die weit verbreitete Anwendung von GBKM für MRT-Untersuchungen geht für Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion mit dem Risiko der systemischen nephrogenen Fibrose einher – eine fortschreitende Erkrankung, bei der es zu einer krankhaften Vermehrung des Bindegewebes im gesamten Körper kommt und die mitunter letal verlaufen kann (Yerram et al., 2007). Dieses Risiko besteht bei Anwendung von USPIO nicht. Somit können die Nanopartikel auch bei Patienten mit renaler Dysfunktion eingesetzt werden (Neuwelt et al., 2009).

Ferumoxytol ist ein kommerziell erwerbliches USPIO, das seit 2009 offiziell für die Behandlung der Eisenmangelanämie zugelassen ist (Lu et al., 2010). Es wird *off-label* als KM für MRT-Untersuchungen eingesetzt (Prince et al., 2003). Als Blutpool-KM zählen zu seinen bisherigen Anwendungsgebieten die Magnetresonanztomografie von Aortenaneurysmen, Endoleckagen bei Stentgrafts, Nierenarterienstenosen, Nierentransplantate, tiefe Beinvenenthrombosen und Lebererkrankungen (Bashir et al., 2015; Stabi and Bendz, 2011). Zurzeit wird der mögliche Einsatz Ferumoxytols zum Zelltracking von Makrophagen in der Bildgebung erforscht. Untersucht werden dabei die Immunantwort des Körpers auf maligne Tumore des ZNS, die Infiltration von Makrophagen als Zeichen instabiler Plaques in Gefäßerkrankungen sowie die metastatische Streuung von Tumoren in Lymphknoten (Farrell et al., 2013; Herborn et al., 2006; Koh et al., 2004; Neuwelt et al., 2007). Bisher gibt es keine aussagekräftigen Studien zu dem Thema, ob Ferumoxytol auch auf dem Gebiet der MS einen

diagnostischen Mehrwert hat, obwohl zuvor durchgeführte Studien zum Nutzen des USPIO im Entzündungsimaging vielversprechend waren (Hasan et al., 2012; Stirrat et al., 2017)

Neben Ferumoxytol werden in dieser Arbeit die bisher nur für den experimentellen Gebrauch zugelassenen quervernetzten Eisenoxid-Nanopartikel (CLIO, aus dem Engl.: „*cross-linked iron oxide nanoparticle*“) verwendet. Dabei handelt es sich um USPIO mit quervernetzter Dextranhülle. Diese bietet den Vorteil, dass sie an ihrer Oberfläche mit einem Liganden verknüpft werden kann. In dieser Arbeit werden mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte CLIO verwendet. Dadurch lassen sich die Partikel in immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen unter Verwendung zusätzlicher Marker nachweisen (Tassa et al., 2011; Wunderbaldinger et al., 2002).

In Verbindung mit unterschiedlichen Liganden wurden CLIO bereits in einer Vielzahl von Studien erfolgreich als diagnostisches Mittel eingesetzt. Arbeiten von Sosnovik et al. (2009) identifizierten mit Hilfe von CLIO apoptotische Kardiomyozyten nach einem experimentellen Herzinfarkt in der MRT. In einer Studie von Nahrendorf et al. (2006) wurden CLIO zur nicht-invasiven Darstellung von Inflammation in früher subklinischer Atherosklerose verwendet. Eine weitere Studie zeigte, dass sich CLIO eignen, um eine *in vivo* Untersuchung des Verhaltens von tumorassoziierten Makrophagen durchzuführen (Leimgruber et al., 2009).

Auch außerhalb der MRT-Bildgebung wurden CLIO bereits erfolgreich zur Zellverfolgung eingesetzt. In der Positronen-Emissions-Tomographie konnten Makrophagen als Marker für Entzündung und das Rupturrisiko von Aortenaneurysmen unter Einsatz von CLIO erfolgreich quantifiziert werden (Nahrendorf et al., 2011). In einer weiteren Studie wurden CLIO eingesetzt, um das Verhalten inflammatorischer Makrophagen nach einer arteriellen Verletzung zu untersuchen (Saxena et al., 2013). Zusammenfassend konnte der Nutzen von CLIO für das Zelltracking von insbesondere Makrophagen und damit zur Inflammationsbildgebung gezeigt werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

MS ist eine schwerwiegende ZNS-Erkrankung. Sie ist eines der häufigsten neurologischen Leiden des jungen Erwachsenen und geht mit schweren körperlichen Symptomen einher. Für die stetig fortschreitende Krankheit sind bisher keine Therapiekonzepte vorhanden, die Heilung versprechen. Allerdings kann der Krankheitsverlauf durch eine frühzeitige und adäquate immunmodulatorische Therapie positiv beeinflusst werden. Aus diesem Grund sind eine möglichst frühe Erstdiagnose, eine korrekte Klassifizierung der Krankheitsaktivität sowie ein genaues Therapiemonitoring erstrebenswert.

GD-unterstützte MRT-Bildgebung ist zurzeit der Gold-Standard in der Diagnostik der MS. Nichtsdestotrotz hat diese Methoden Einschränkungen hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität. Die Korrelation mit wichtigen Parametern wie der EDSS und patho-histologischen Merkmalen wie Demyelinisierung und Neurodegeneration ist limitiert. Auch die Neuroinflammation, ein weiteres maßgebliches Merkmal der MS, lässt sich mit GBKM nur bedingt abbilden. Die etablierte Diagnostik verlässt sich hierbei auf die Darstellung einer BHS-Störung als sekundären Effekt. Diese Methode bietet keinen Aufschluss über zelluläre Mediatoren der Entzündung. Dabei wäre gerade dies wünschenswert, um eine differenziertere Aussage über Krankheitsaktivität und Effektivität der häufig zellulär vermittelten Therapien zu treffen.

Der Einsatz von USPIO zur Zellverfolgung und zur Entzündungsbildgebung hat bereits in mehreren Studien in unterschiedlichen Erkrankungsmodellen vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Die Nanopartikel reichern sich in Entzündungszellen an und werden so in entzündlich veränderte Gebiete transportiert. Durch die Veränderung des MRT-Signals, die durch das enthaltene Eisenoxid ausgelöst wird, können die Partikel mittels MRT dargestellt werden. Somit sind eine nicht invasive Verfolgung und Quantifizierung der Entzündungszellen möglich. In dieser Arbeit soll die Anwendbarkeit von USPIO in der MS-Bildgebung untersucht werden. Ziel ist es, eine Methode zu etablieren, mit deren Hilfe entzündliche Läsionen dargestellt und die Entzündungslast anhand von zellulären Mediatoren quantifiziert werden können. Außerdem soll ein Vergleich mit der etablierten GBKM-gestützten Bildgebung erfolgen. Für diesen Zweck wird die EAE, ein experimentelles Modell der MS, herangezogen und im Mausmodell der Erkrankungsverlauf mittels longitudinalen MRT-Messungen untersucht.

Die Hypothese ist, dass sich mit der USPIO-unterstützten Bildgebung entzündliche Läsionen in vollständigerem Umfang darstellen lassen, als dies mit GBKM der Fall wäre. Dadurch wäre eine frühere Diagnose und akkuratere Einschätzung der Krankheitsaktivität der MS möglich. Patienten könnten von einer frühzeitigen Therapie, die sich positiv auf die Langzeitprognose auswirkt, profitieren.

Durch die Quantifizierung der Entzündungslast könnte der Aktivitätsstatus der Erkrankung zutreffender erfasst werden. Dadurch würde dem behandelnden Arzt die Wahl der angemessenen Therapie erleichtert. Auch für die Überwachung der Therapie in Bezug auf Ansprechen und Effektivität verspricht man sich Vorteile dieser Methode, da viele Therapien immunmodulatorisch bzw. -suppressiv wirken und auf zellulärer Ebene ansetzen

Sollte sich die Methode im Bereich der MS etablieren, gäbe es bereits weitere zukünftige Anwendungsgebiete wie die Entwicklung und Überwachung von Immuntherapien im Bereich onkologischer Erkrankungen sowie anderer Autoimmunerkrankungen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Mäuse

Es wurden weibliche SJL-Mäuse im Alter zwischen 6 und 12 Wochen von Janvier und Jackson Laboratory bezogen. Die Versuche wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Karlsruhe (Tierversuchsantrag: G212-13) sowie dem Institutionellen Ausschuss für Tierpflege und -verwendung des Massachusetts General Hospitals genehmigt.

2.2 EAE-Induktion

In Vorbereitung der EAE-Induktion wurden 200 µg PLP₁₃₉₋₁₅₁ Peptid (HSLGKWLGHDPDKF; GenScript) in 50 µl PBS und 50 µl komplettem Freund-Adjuvans (KFA) emulgiert. Zur Herstellung des KFA wurde inkomplettes Freund-Adjuvans (BD Difco, Fisher Scientific) mit 4 mg/ml durch Hitze inaktiviertes *Mykobakterium tuberculosis* H37 Ra (BD Difco, Fisher Scientific) versetzt und gut durchmischt. Zur Immunisierung wurden von dieser KFA-Peptid-Mischung jeweils 50 µl *subcutan* (s.c.) in beide Pektoralregionen injiziert. Zusätzlich wurden an Tag 0 und 2 nach EAE-Induktion 200 ng PTx (List Biological Laboratories; 181) in 200 µl PBS *intrapitoneal* (i.p.) appliziert.

Der klinische Zustand der Tiere wurde täglich nach folgendem Punktesystem bewertet.

Tabelle 1: Klinischer EAE-Score

Score	Symptome	
	typisch	atypisch
0	Keine neurologischen Symptome	Keine neurologischen Symptome
0,5	Partielle Schwanzparese	-
1	Schwanzparalyse	Buckelige Haltung, steifer Schwanz
1,5	Schwanzparalyse + milde Parese eines der hinteren Beine oder milde Ataxie	-
2	Parese eines der hinteren Beine oder starke Ataxie	Wankendes Laufen, ungepflegtes Aussehen
2,5	Parese der hinteren Beine oder Paralyse eines der hinteren Beine	-
3	Paralyse der hinteren Beine	Kopfdrehung, Ataxie, gestörtes Gleichgewicht, „Seitlehnen“
3,5	Paralyse der hinteren Beine + Parese der vorderen Beine	-
4	Tetraparalyse	Aufrechte Körperhaltung nicht möglich, starkes „Seitlehnen“
4,5	Tetraparalyse + eingeschränkte Reaktion	Kontinuierliches seitwärts Rollen
5	Moribund oder tot	Moribund oder tot

2.3 Generierung von Knochenmarksmakrophagen

Um die Aufnahme von Nanopartikeln durch Makrophagen unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* zu beurteilen, wurden Knochenmarksmakrophagen (KMM) naiver SJL-Mäuse gemäß Ying et al. (2013) generiert. Dafür wurden die Tiere durch einen Genickbruch getötet und Tibia und Femur entnommen. Die Enden der Knochen wurden abgeschnitten und das Knochenmark mit „*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*“ (IMDM) (Thermo Fisher Scientific) herausgespült. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde das Knochenmark durch ein 70 µm Nylonzellsieb (EASYStrainer™, Greiner Bio-One) gedrückt und anschließend bei 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Erythrozytenlyse wurden die Zellen in ACK Lyse Puffer resuspendiert. Die Reaktion wurde nach 2 Minuten gestoppt und die Zellen in KMM Differenzierungsmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden sie auf 12-well Platten (MRT; 800 µl; 3 × 10⁵ KMM) oder 24-well Platten mit oder ohne Deckgläser (Immunhistochemie oder Durchflusszytometrie; 400 µl; 1.5 × 10⁵ KMM) ausgesät und über 7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde nach 3 Tagen gegen frisches KMM-Differenzierungsmedium ausgetauscht. Anschließend wurden die *in vitro* differenzierten Makrophagen zu M₁- oder M₂-artigen Makrophagen polarisiert oder zur Kontrolle nicht behandelt (M₀). Dafür wurde das KMM-Differenzierungsmedium durch ein M₁- oder M₂-Polarisierungsmedium ausgetauscht. Für eine Polarisierung zu M₁-artigen Makrophagen wurde KMM-Differenzierungsmedium mit 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) und 10 ng/ml IFN γ (PeproTech) versetzt. Eine Polarisierung zu M₂-artigen Makrophagen wurde mit 10 ng/ml IL4 (PeproTech) und 10 ng/ml IL13 (PeproTech) erreicht. Damit wurden die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 2 Stunden vor der weiteren Verwendung der Zellen wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen von CLIO-FITC (100 µg/ml oder 500 µg/ml) inkubiert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig verworfen und entweder die Deckgläser mit den anhaftenden Makrophagen aus den Platten entnommen oder die Zellen für MRT- und Durchflusszytometrie Untersuchungen geerntet. Hierfür wurden sie mit 100 µl 0,05 %igem Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) für 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor sie vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst wurden.

2.4 Genexpressionsanalyse

Um die Effizienz der Makrophagenpolarisation zu überprüfen, wurde die Expression relevanter Markergene in den KMM überprüft. Hierzu wurde die Gesamt-Ribonukleinsäure mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) wurde nach dem Protokoll des Herstellers komplementäre Desoxyribonukleinsäure (kDNS) synthetisiert. Die Genexpressionsanalyse wurden anhand von technischen Duplikaten unter Verwendung von zwei verschiedenen kDNS Verdünnungen durchgeführt. Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR, aus dem Engl.: „*real time quantitative polymerase chain reaction*“) wurde in einem ABI 7000 Thermozykler mit SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die korrekte Vervielfältigung der kDNS wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die relative Quantifizierung der Genexpression fand durch Vergleiche mit Schwellenwerten statt. Alle Ct-Werte (aus dem Engl.: „*cycle threshold*“; etwa: „Schwellenwert-Zyklus“) wurden gegenüber einem Haushaltsgen (*Gapdh*) normalisiert und als 2^{-ΔCt} in einem Diagramm dargestellt. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Jana Sonner und Lara Wolf (KKE Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie; DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: RT-qPCR Primer. Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich gekauft.

Ziel	Vorwärts 5' – 3'	Rückwärts 3' – 5'
<i>Arg 1</i>	AATCTGCATGGGCAACCTGT	GTCTACGTCTCGCAAGCCAA
<i>eCAD</i>	AACGCTCCTGTCTTCAACCC	GGTCACTTTGAGTGTGGCGA
<i>Gapdh</i>	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTG
<i>IL1β</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>IL6</i>	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
<i>IL10</i>	ACTGCACCCACTTCCCAGT	GTCCAGCTGGTCTTTTGT
<i>iNOS</i>	TGGAGACTGTCCCAGCAATG	CAAGGCCAAACACAGCATACC
<i>TNFα</i>	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAATTCT
<i>Ym1</i>	CCAGCAGAAGCTCTCCAGAAGCA	GGCCTGTCTTAGCCCAACTGGT

2.5 Phagozytoseassay

Zunächst wurden Erythrozyten aus menschlichem Vollblut isoliert. Dazu wurden 2 ml Blut mit einer heparinisierten Spritze (S-Monovette®, Sarstedt) aus der Vene entnommen. Das Blut wurde bei 270 xg für 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma und die Leukozytenschicht wurden verworfen. Das Erythrozytenpellet wurde zweifach mit Erythrozytenwaschpuffer (150mM NaCl, 50 MM Glucose) gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten gezählt und mit dem PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit MINI26 (Sigma-Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt. Währenddessen wurden M₀-, M₁- und M₂-Makrophagen getrennt in KMM-Differenzierungsmedium mit oder ohne 100 µg/ml CLIO-FITC für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Makrophagen mit einem APC-markierten F4/80 Antikörper (BioLegend) gefärbt. Für den Phagozytoseassay wurden Makrophagen und Erythrozyten in einem Verhältnis von 1:10 für 1, 2 oder 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Ablösen wurden die Makrophagen mit 0,05 %igem Trypsin-EDTA für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine 96-well Platte transferiert. Freie Erythrozyten wurden mit 50 µl ACK Lyse Puffer lysiert. Eine Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Kurz vorher wurden die Zellen mit Hoechst Farbstoff gefärbt, um kernhaltige Zellen zu identifizieren.

2.6 Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie wurde verschiedene Zellpopulationen identifiziert und ihre jeweilige CLIO-Aufnahme bestimmt. Untersucht wurden Zellen aus dem Gehirn, Knochenmark, Leber, Blut, Milz und Lymphknoten.

2.6.1 Gewebeaufbereitung

Die SJL-Mäuse wurden in eine tiefe Narkose durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 20 mg/kg KG Xylazin versetzt. Bei Bedarf wurde mittels Herzpunktion terminal Blut entnommen und die Tiere anschließend durch *intracardiale* (*i.c.*) Perfusion mit PBS getötet. Gehirn, Knochenmark, Leber, Milz und Lymphknoten wurden entnommen.

Um infiltrierende Leukozyten und Mikroglia aus dem Gehirn zu gewinnen, wurde dieses in Kleinhirn und Großhirn aufgeteilt und getrennt homogenisiert. Das Gewebe wurde mit 10 ml HBSS (Sigma-Aldrich) ergänzt mit 0,05 % Kollagenase D (Roche), 0,1 µg/ml Tosyl-L-lysyl-chloromethane Hydrochlorid (TLCK) Trypsin Inhibitor (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml DNase I (Sigma-Aldrich) und 10 mM Hepes (pH 7.4) (Sigma-Aldrich) für 1 Stunde bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das verdaute Gewebe durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt, bei 500 xg für 10 Minuten zentrifugiert und in einer Percolllösung (Dichte 1,008 mg/ml) resuspendiert. Mit Hilfe eines 4-schichtigen Percoll Dichtegradienten (1 mg/ml, 1,072 mg/ml, 1,088 mg/ml, 1,124 mg/ml) (Easycoll; Biochrom; L 6145) wurde die Einzelzellsuspension in der Zentrifuge entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Die myeloiden und lymphatischen Effektorzellen wurden entnommen und auf 96-well Platten transferiert.

Leber, Milz, Lymphknoten, Herzblut und Knochenmark wurden mit Hilfe eines 70 µm Zellsiebs zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Diese wurde nach einer Erythrozytolysen mit ACK Lyse Puffer auf eine 96-well Platte übertragen.

2.6.2 Färbung

Oberflächenfärbungen wurden für 30 Minuten bei 4°C in FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) Puffer oder PBS versetzt mit anti-Maus CD16/CD32 (Klon 93, eBioscience) in einer Konzentration von 1:100 durchgeführt. Teilweise wurden die Zellen im Anschluss 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % PFA in PBS fixiert.

2.6.3 Datenerfassung

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem BD FACSCanto II (BD Biosciences) oder LSR II (BD Biosciences) Durchflusszytometer durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der FlowJo V8.7, V9 und X Software (Treestar) analysiert.

Zell-Dubletten wurden durch die Analyse des Vorwärtsstreuung-Breite („*forward scatter-width*“, FSC-W) gegen Vorwärtsstreuung-Fläche („*FSC-area*“, FSC-A) ausgeschlossen. Tote Zellen wurden durch einen Lebend/Tot-Farbstoff ausgeschlossen.

2.7 Histologie

2.7.1 Gewebeaufbereitung

Die Versuchstiere wurden in tiefer Narkose mit 100 mg/kg KG Ketamin und 20 mg/kg KG Xylazin durch *i.c.* Perfusion mit PBS gefolgt von 4,5 %igem Paraformaldehyd (PFA, Roti-Histofix; Carl Roth) getötet. Die Gehirne wurden entnommen und entweder in Tissue-Tek® *O.C.T. compound* (Sakura® Finetek, VWR) schockgefroren oder dehydriert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 5 – 10 µm Schnitte mit dem Kryostat oder dem Mikrotom angefertigt. In Vorbereitung der Färbungen wurden die Tissue-Tek Kryoschnitte luftgetrocknet. Die Paraffinschnitte wurden durch Inkubation mit Roti®-Histol (Carl Roth; 6640.2) entparaffinisiert und in einer absteigende Ethanolreihe (100% EtOH, 96% EtOH, 70 % EtOH, dH₂O) rehydriert.

2.7.2 Neurofilament Protein Färbung

Um axonale Strukturveränderungen darzustellen, wurde die Neurofilament Protein Färbung (NFP) verwendet. Gewebeschnitte wurden mit einem Anti-NFP Antikörper (Klon 2F11; Dako) gefärbt. An Meerrettichperoxidase gebundenes Streptavidin

(VECTASTAIN Elite ABC kit; Vector Laboratories) wurde verwendet, um den biotinylierten sekundären Antikörper zu visualisieren. Danach wurden die Schnitte nach dem Protokoll des Herstellers mit dem *ultraView Universal DAB Detection Kit* (Dako) behandelt und die Zellkerne durch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin angefärbt.

2.7.3 Luxol Fast Blue Färbung

Um Veränderungen des Myelins darzustellen, wurden Gewebeschnitte über Nacht mit 0,1 %iger Luxol Fast Blue (LFB) Lösung gefärbt. Im Anschluss wurden sie mit 0,05%igem Lithiumcarbonat und 70 %igem Ethylalkohol differenziert. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten mit 1%iger Periodsäure und 30 Minuten in Schiffs Reagenz gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

2.7.4 Eisenfärbung

Um Eisenpartikel darzustellen, wurden Gewebeschnitte mit dem *Prussian blue iron staining kit* (HT20; Sigma-Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt. Anschließend wurden sie mit *DAB enhancement* (Sigma-Aldrich) und *Fast Red counterstain* (Sigma-Aldrich) behandelt.

2.7.5 Immunhistochemie/Immunfluoreszenz

ZNS-Gewebe und KMM wurden nach einem Standard-Immunhistochemie-Protokoll in 4% igem PFA fixiert und anschließend, um unspezifischen Antikörperbindungen vorzubeugen, mit einer Blockierungslösung 30 - 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der erste Antikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C belassen. Nach mehreren Waschvorgängen wurde der zweite Antikörper bei Raumtemperatur für 45 Minuten aufgetragen und die Proben schließlich mit Histomount mit DAPI (Vectashield) montiert.

2.7.6 Bilderfassung

Die Schnitte wurden mit Hilfe der folgenden Mikroskope betrachtet und Einzel- und Übersichtsaufnahmen in 20-, 40- und 60-facher Vergrößerung angefertigt:

Tabelle 3: Verwendete Mikroskope.

Modell	Typ
Zeiss Cell Observer	Weitfeld-Mikroskop
Olympus FV 100	Konfokales Mikroskop
Zeiss LSM700	Konfokales Mikroskop

2.8 Bildverarbeitung und Quantifizierung

Für die Quantifizierung der CLIO-Aufnahme der KMM wurde ein semiautomatisches Makro mit Hilfe der FIJI Software entworfen. F4/80 positive (F4/80⁺) Zellen wurden auf repräsentativen Ausschnitten der Präparate manuell definiert. Anschließend wurden die F4/80⁺ Zellen gezählt und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (FI) im CLIO-Kanal innerhalb der Zellen quantifiziert.

Zur Quantifizierung der CLIO-Aufnahme auf den mit einem Iba-1 Antikörper gefärbten Schnitten wurde mit dem Software FIJI ein automatisiertes Makro generiert. Pro Übersichtsaufnahme des Zerebellums wurden jeweils 3 repräsentative „*high-power*“ Felder in der grauen und weißen Substanz ausgewählt. Es wurde ein Schwellenwert festgelegt und die Bilder binarisiert. Die Iba-1 positiven (Iba-1⁺) Zellen wurden mit Hilfe des FIJI Plugins „*Analyze particles*“ gezählt. Um die Aufnahme von CLIO in die Zellen zu quantifizieren, wurde, nach einer Hintergrundsubtraktion, die gemittelte Intensität der Fluoreszenz im CLIO-Kanal innerhalb der Iba-1⁺ Zellen gemessen.

2.9 Magnetresonanztomografie

Die MRT-Bildgebung wurde mit einem 9,4 Tesla Kleintierscanner mit horizontaler Bohrung (BioSpec 94/20 USR; Bruker BioSpin GmbH) und einer 4-Kanalphasen-Reihenempfängerspulen durchgeführt.

Das Protokoll, mit dem die Versuchstiere untersucht wurden, umfasste eine axiale T2-g *rapid acquisition with relaxation enhancement* (RARE) Sequenz, mit welcher sich Ödeme darstellen lassen, eine axiale T1-g *fast low-angle shot* (FLASH) Sequenz, die es möglich macht, BHS-Störungen nach KM-Gabe darzustellen sowie eine axiale T2*-g FLASH Sequenz, welche verwendet wurde, um die USPION-Anreicherungen darstellen zu können. Die Parameter der Sequenzen waren wie folgt:

Tabelle 4: MRT-Sequenzen zur Untersuchung des ZNS.

Parameter	T2-g	T1-g	T2*-g
3D-Sequenz	Ja	Ja	Ja
Echozeit	33 ms	1,9 ms	18 ms
Repetitionszeit	1800 ms	5 ms	50 ms
Anregungswinkel	90°	60°	12°
Matrix	200x200	128x128	400x188x100
# der Messungen	1	4	1
Flächenauflösung	100 µm	156 µm	80 µm
Laufzeit	10 min 48 s	5 min 28 s	15 min 40 s

Das abdominale MRT-Protokoll setze sich aus einer koronaren und einer transversalen T2-g Sequenz zusammen. Die Parameter der Sequenzen waren wie folgt:

Tabelle 5: MRT-Sequenzen zur abdominalen Untersuchung.

Parameter	Koronare T2-g	Transversale T2-g
2D-Sequenz	Ja	Ja
Echozeit	23,5 ms	23 ms
Repetitionszeit	500 ms	1508 ms
Anregungswinkel	90°	90°
Matrix	384x384	320x320
# der Messungen	1	9
Flächenauflösung	208x156 µm	125 µm
Schichtdicke	0,625 mm	1 mm
Laufzeit	9 min 36 s	9 min 2 s

Zur Untersuchung der USPION-Anreicherung in verschiedenen Geweben wurden Versuchstiere mit 15 mg/kg KG CLIO-FITC, CLIO-TAMRA (freundlicherweise zur

Verfügung gestellt von R. Weissleder, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston) oder Ferumoxytol (Feraheme; AMAG Pharmaceuticals Inc.) in 150 µl PBS *i.v.* injiziert.

Die Spezifikationen des CLIO-Partikels sind wie folgt: Partikelgröße: 32 nm; Zeta-Potential: 6,62; R1: 27,34 mM/s; R2: 72,17 mM/s; 15,5 fluoreszierende Moleküle pro Partikel.

Um die Integrität der BHS zu untersuchen, wurde den Versuchstieren vor der T1-g Sequenz 0,2 mmol/kg KG Gadodiamid (Omniscan; Nycomed) *i.p.* injiziert.

Die erste MRT-Untersuchung wurde am Tag des Ausbruchs der EAE durchgeführt, also als die Tiere das erste Mal symptomatisch wurden (akuter Zeitpunkt; Tag 6 - 12 nach Induktion). Nach der Messung wurden den Tieren die USPIO verabreicht. Der zweite Messdurchgang geschah 24 Stunden (Ferumoxytol) bzw. 48 Stunden (CLIO) später. Zur Untersuchung der Remissionsphase der Erkrankung wurden die MRT-Bildgebung und CLIO-Gabe 10 - 14 Tage nach Ausbruch der Krankheit wiederholt.

Für die MRT-Untersuchung wurden die Mäuse mit initial 3 % Isofluran anästhesiert und anschließend die Narkose mit 0,5 - 1,5 % Isofluran aufrechterhalten. Die Tiere wurden auf einem Wärmekissen gelagert. Mit Hilfe eines Sensors und einem im Haus entwickelten *LabVIEW* Programm (National Instruments Corporation) wurde die Atmung extern überwacht.

Für die *ex vivo* Bildgebung wurden Versuchstiere in tiefer Narkose mit 100 mg/kg KG Ketamin und 20 mg/kg KG Xylazin durch *i.c.* Perfusion mit PBS getötet. Die Gehirne wurden entnommen und in PBS in einem 15 ml Falcon Röhrchen (Corning) in der MRT untersucht. Es wurde eine 4-Kanalphasen-Reihenempfängerspule und die zuvor beschriebene T2*-g Sequenz verwendet.

Um die *in vitro* generierten KMM im MRT darzustellen, wurde eine Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und mit der zuvor beschriebenen T2*-g Sequenz untersucht.

Die MR Bilder wurden als DICOM Dateien exportiert und mit der OsiriX Imaging Software (Version 4.12; Pixmeo) dargestellt. Zur Quantifizierung der MRT-Daten wurden die T2* hypointensen und GD-verstärkten Areale mit Hilfe der AMIRA Software (FEI) semiautomatisch segmentiert.

2.10 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler gezeigt. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde ein ungepaarter Zweistichproben-t-Test verwendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, aus dem Engl.: „*analysis of variance*“) mit Bonferroni's oder Tukey's Korrektur durchgeführt. Zur Analyse der Korrelation wurde der Spearman's Rangkorrelationskoeffizient bestimmt. $P \leq 0,05$ galt als signifikant. (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

2.11 Materialien

2.11.1 Durchflusszytometrie

Tabelle 6: FACS Farbstoffe

Farbstoffe	Spezifikationen
Fixable viability dye eFluor450	eBioscience; 65-0864

Hoechst Farbstoff

Thermo Fisher, 33342

Tabelle 7: FACS Antikörper

Zielstruktur	Farbstoff	Klon	Spezifikationen
B220	PE	RE3-6B2	BioLegend
CD3	APC-eFluor780	17A2	eBioscience
CD3e	PE/ Cy7	145-2C11	BioLegend
CD4	APC	GK1.5	BioLegend
CD8a	PE/Cy5	53-6.7	BioLegend
CD11b	APC/Cy7	M1/70	BioLegend
CD11b	PE-Cy7	M1/70	BioLegend
CD19	APC	6D5	BioLegend
CD45	BV 510	30-F11	BioLegend
CD45	Pacific Blue	30-F11	BioLegend
CD45	Pacific Orange	30-F11	Thermo Fisher
F4/80	APC-eFluor780	BM8	eBioscience
F4/80	APC	BM8	BioLegend
Ly6C	PerCP/Cy5.5	HK1.4	BioLegend
Ly6G	PE	1A8	BioLegend

2.11.2 IHC Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 8: Primäre Antikörper für IHC

Zielstruktur	Darstellung von	Klon	Spezifikationen
CD3	T-Zellen	polyklonal	Dako, A0452
CD45R	B-Zellen	RA3-6B2	eBioscience
F4/80	Makrophagen/ Mikroglia	BM8	eBioscience
Iba-1	Makrophagen/ Mikroglia	polyklonal	WAKO; 019-19741
NFP	Neurone, Axone	2F11	Dako

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für IHC

Label	Reaktivität	Spezifikationen
Alexa Fluor 546	Ratte	Thermo Fisher; A11081
Alexa Fluor 594	Hase	Abcam; ab150080

2.11.3 Puffer

Tabelle 10: Puffer

Name	Bestandteile	Spezifikationen
ACK Lyse-Puffer, pH 7,2	VE H ₂ O > 0.15 M NH ₄ Cl >10 mM KHCO ₃ >0.1mM Na ₂ EDTA	Carl Roth; 5470 Carl Roth; P748.1 AppliChem; A2937
FACS-Puffer	PBS > 3 % FBS > 2 mM EDTA	Sigma-Aldrich; D8537 Sigma-Aldrich; F0804 AppliChem; A3562.1000

Erythrozyten-Waschpuffer	VE H ₂ O > 150 mM NaCl > 50 mM Glucose	Carl Roth; 6367.2 Sigma-Aldrich; G7021
--------------------------	---	---

2.11.4 Zellkulturmedien

Tabelle 11: Zellkulturmedien

Medium	Bestandteile	Spezifikationen
IMDM		ThermoFisher; 12440061
KMM-Medium	IMDM >10 % FBS >100 U/ml Penicillin	ThermoFisher; 12440061 Sigma-Aldrich; F0804 Sigma-Aldrich; P4333
KMM-Differenzierungsmedium	IMDM >10 % FBS >100 U/ml Penicillin >0,1 mg/ml Streptomycin >5 ng/ml M-CSF	ThermoFisher; 12440061 Sigma-Aldrich; F0804 Sigma-Aldrich; P4333 Sigma-Aldrich PeproTech
M ₁ -Medium	KMM-Differenzierungsmedium >100 ng/ml LPS >10 ng/ml IFN γ	Sigma-Aldrich PeproTech
M ₂ -Medium	KMM-Differenzierungsmedium >10 ng/ml IL4 >10 ng/ml IL13	PeproTech PeproTech

3 ERGEBNISSE

3.1 Makrophagen und Mikroglia akkumulieren in den EAE-Läsionen

Um einen unspezifischen Effekt des PTx auf die BHS auszuschließen, erhielten gesunde Kontrollmäuse im Abstand von zwei Tagen zwei *i.p.* PTx-Injektionen. Anschließend wurden sie 7 und 9 Tage später einer T2-g, einer GD-gestützten T1-g und einer T2*-g MRT-Sequenz unterzogen. 48 Stunden vor der zweiten Messung erfolgte eine *i.v.* CLIO-Injektion. Im Anschluss wurden das Gewebe der Kleinhirne der Tiere mit einer Iba-1 Färbung histologisch untersucht.

Die MRT-Aufnahmen der PTx-behandelten Tiere zeigten keine Hinweise auf eine zerebrale GD- oder CLIO-Anreicherung. Eine unspezifische BHS-Störung konnte somit ausgeschlossen werden (Abb. 1a und b). In Übereinstimmung damit konnten immunhistochemisch keine Infiltrate CLIO-markierter Immunzellen nachgewiesen werden (Abb. 1c).

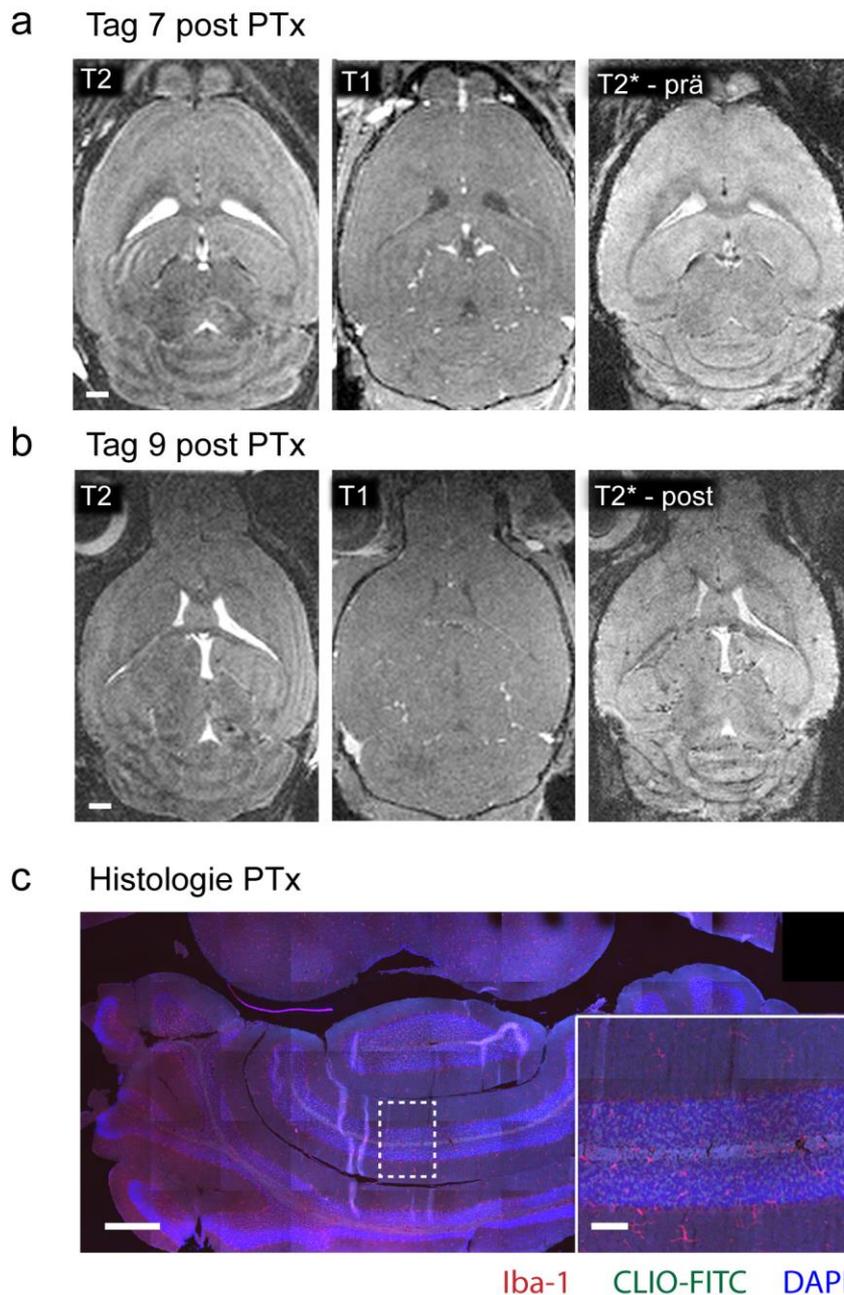


Abbildung 1: PTx verursacht isoliert eingesetzt keine BHS-Störung. Repräsentative T2-g, GD-gestützte T1-g und T2*-g Sequenzen einer Maus an (a) Tag 7 und (b) Tag 9 *post* PTx-Injektion. Die zweite Messung erfolgt 48 h nach CLIO-Gabe (Maßstab: 1 mm). (c) Repräsentativer Tile-Scan des Iba-1 gefärbten Kleinhirns einer PTx-injizierten Maus. n = 2 (Maßstab: 500 µm; 100 µm in Vergrößerung). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Zur Darstellung und Lokalisierung von EAE-Läsionen wurden Gewebeschnitte aus dem Gehirn von EAE-Mäusen histologisch untersucht. Unter Verwendung von NFP- und LFB-Färbungen wurden Demyelinisierungsherde und Bereiche axonaler Schädigung, zwei histopathologische Kernmerkmale der EAE-Läsionen, dargestellt. Läsionen zeigten sich vor allem in der weißen Substanz des Kleinhirns. Dort fand man ausgedehnte Bereiche der Demyelinisierung (Abb. 2 a) und gestörter Axonstruktur (Abb. 2b).

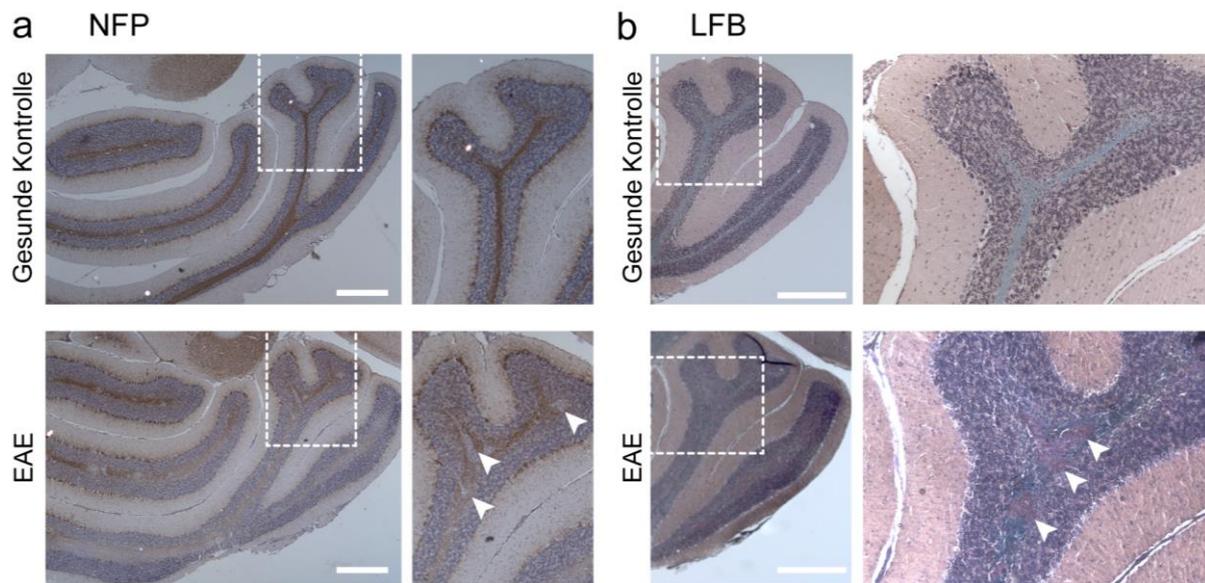
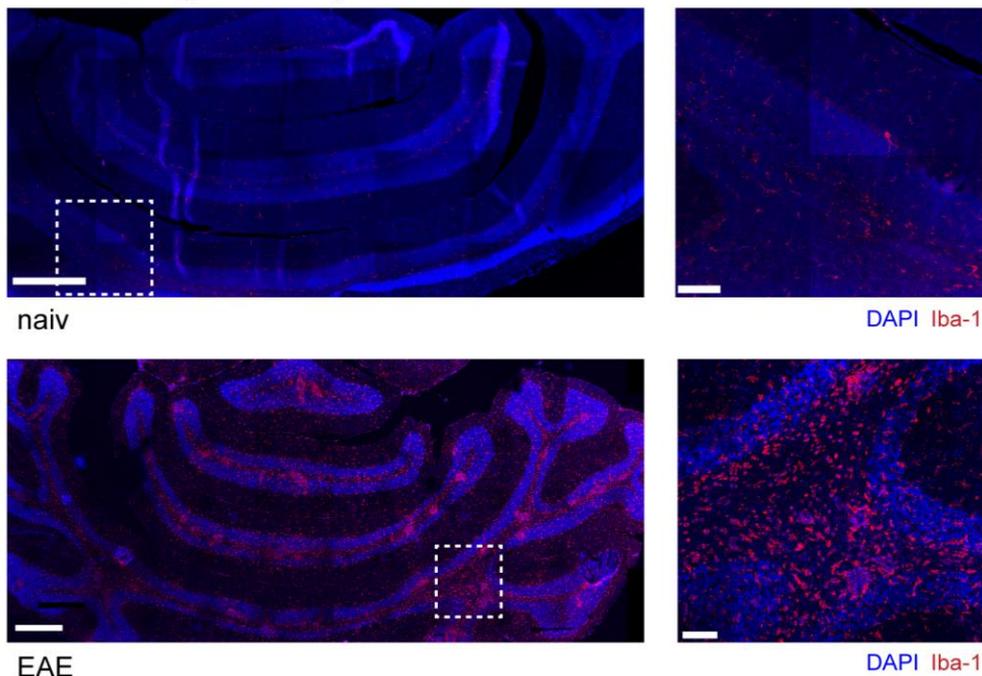


Abbildung 2: Beurteilung axonaler Schädigung und Demyelinisierung. (a) Repräsentative NFP-Färbung zur Beurteilung der axonalen Integrität des Kleinhirns einer naiven Kontrolle und einer EAE-Maus. (b) Myelinfärbung mit LFB zur Darstellung von Demyelinisierung im Kleinhirn einer repräsentativen EAE-Maus und Kontrolle. $n = 3$ (Maßstab: $500 \mu\text{m}$ in a und b). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

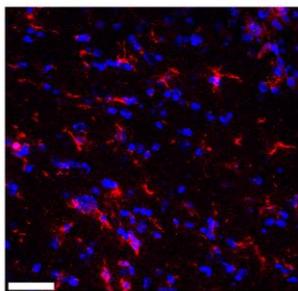
Zur Darstellung von Makrophagen und Mikroglia wurden Schnitte aus den Gehirnen von naiven und EAE-Mäusen mit einem Iba-1 Antikörper gefärbt. Es zeigte sich eine vermehrte Akkumulation von Iba-1⁺ Zellen in der weißen Substanz der Kleinhirne. Insbesondere um Gefäße herum waren dichte Infiltrate zu beobachten. Im Vergleich dazu konnten in den gesunden Kontrollen nur vereinzelt Iba-1⁺ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3a). Auch in der grauen Substanz der Kleinhirne der EAE-Tiere sowie weiteren Hirnregionen, wie dem Mittelhirn und dem Kortex, fanden sich vereinzelt Ansammlungen Iba-1⁺ Zellen (Abb. 3b).

Eine Quantifizierung der Iba-1⁺ Zellen bestätigte, dass sich der Großteil der Makrophagen- und Mikroglia-Infiltrate in der weißen Substanz der Kleinhirne der EAE-Mäuse fand (7.0×10^2 Iba-1⁺ Zellen/ mm^2). Dem gegenüber zeigte sich in der Grauen Substanz der Kleinhirne eine signifikant geringere Anzahl an Iba-1⁺ Zellen (4.6×10^2 Iba-1⁺ Zellen/ mm^2 , $P < 0,05$). Gegenüber den naiven Kontrollen waren beide Werte signifikant erhöht (Abb. 3c).

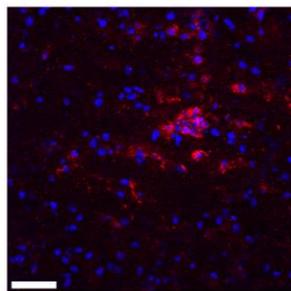
a Makrophagen/Mikroglia im Kleinhirn



b Kortex



Mittelhirn



DAPI Iba-1

c

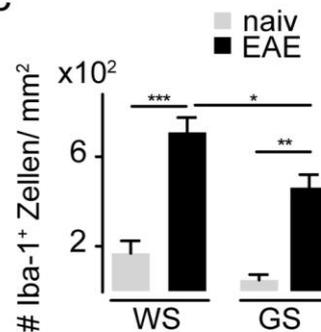


Abbildung 3: Makrophagen/Mikroglia akkumulieren in EAE-Läsionen. (a) Repräsentative konfokale Tile-Scans einer Immunfluoreszenzfärbung mit Iba-1-Antikörper des Kleinhirns einer naiven Kontrolle und einer EAE-Maus (Maßstab: 500 µm in Übersichtsaufnahmen; 100 µm in Vergrößerung). (b) Repräsentative Aufnahmen von Läsionen im Kortex und Mittelhirn einer EAE-Maus (Maßstab: 50 µm). (c) Quantitative Auswertung der Iba-1⁺ Zellen in der zerebellären weißen und grauen Substanz. Die Daten werden als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). $n = 7$ EAE-Mäuse und $n = 3$ naive Kontrollen. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Werden Mikroglia durch pathologische Veränderungen des Mikromilieus aktiviert, ändern sie ihre Morphologie (Stence et al., 2001). Dies war anschaulich in dem angewandten Modell zu beobachten. Naive Tiere zeigten nicht nur deutlich weniger Iba-1⁺ Zellen, sondern waren diese, der Morphologie nach zu urteilen, in einem ruhenden Zustand. Sie zeigten kleine Zellkörper mit langen, verzweigten Ausläufern (Abb. 4a, links). Bei Tieren in der akuten Phase der EAE zeigten die Mikroglia einen aktivierten Phänotyp mit einem kompakten Zellkörper und kurzen verdickten Protrusionen, der eine Unterscheidung von eingewanderten Makrophagen nicht mehr zu ließ (Abb. 4a, rechts).

a Morphologie der Mikroglia

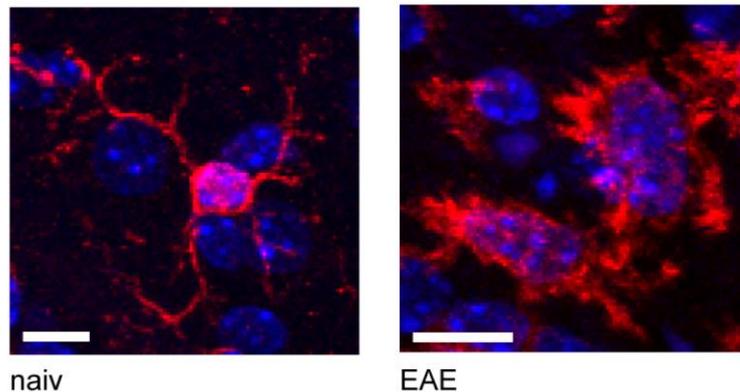


Abbildung 4: Aktivierte Mikroglia zeigen eine veränderte Morphologie. (a) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen Iba-1 gefärbter Mikroglia einer naiven gegenüber einer EAE-Maus (Maßstab: 10 μ m).

3.2 Makrophagen nehmen CLIO *in vitro* auf

Um Makrophagen später mit Hilfe von CLIO *in vivo* darstellen zu können, wurde zunächst die Aufnahmekapazität verschiedener Makrophagenpopulationen gegenüber CLIO *in vitro* untersucht. Dazu wurden Myeloide Zellen aus dem Knochenmark naiver SJL-Mäuse isoliert und unter dem Einfluss von Makrophagen-CSF zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Zytokine zu M₁- oder M₂-artigen Makrophagen polarisiert. Diese wurden mit verschiedenen Konzentrationen von CLIO (0, 100, 500 μ g/ml) inkubiert. Die Auswertung und Quantifizierung der CLIO-Aufnahme erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie.

Mit Hilfe von RT-qPCR wurde zunächst die Genexpression etablierter M₁- und M₂-Marker quantifiziert, um den Erfolg der Polarisierung der KMM zu validieren. TNF α , IL6, iNos und IL1b dienten als M₁-Marker. Arg1, chitinase-like 3/Ym1, IL10 und E-Cadherin (Ecad) wurden als M₂-Marker verwendet (Mantovani et al., 2004).

Es zeigte sich eine erhöhte Expression der M₁-Marker (*Tnfa*, *Il6*, *Nos2*, *Il1b*) in den M₁-artig polarisierten Makrophagen. Unter den M₂-polarisierten Makrophagen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der M₂-Marker *Ym1* und *Ecad* ($p < 0,05$). Die Expression von *Arg1* ergab keine eindeutige Zuordnung, während *Il10* entgegen den Erwartungen in den M₁-artigen Makrophagen vermehrt exprimiert wurde (Abb. 5).

a Genexpression der Makrophagen

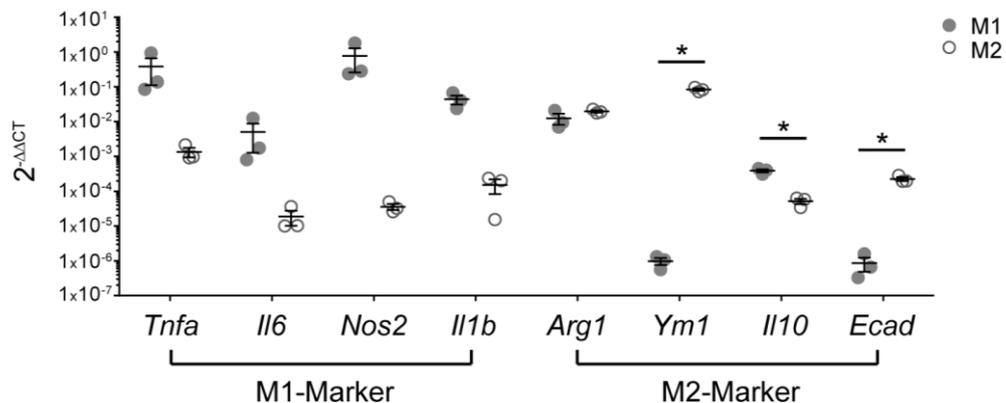
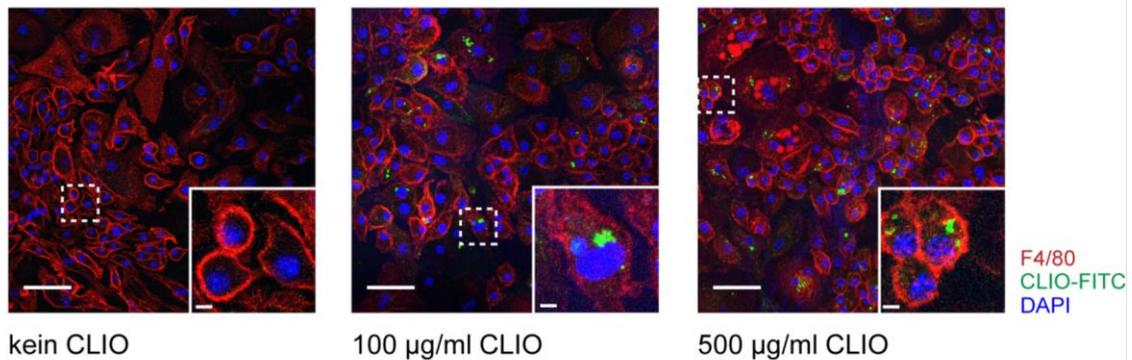


Abbildung 5: KMM können *in vitro* zu M₁-/M₂-artigen Makrophagen polarisiert werden. (a) Anhand von qPCR analysierte Genexpression der KMM nach erfolgter Polarisierung in M₁-/M₂-artige Makrophagen. Die Ct-Werte sind gegenüber dem Haushaltsgen *Gapdh* normalisiert und als 2^{-ΔCt} dargestellt. (*p<0,05). n = 3. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Jana Sonner und Lara Wolf).

Immunhistochemisch konnte eine Akkumulation der FITC-markierten CLIO in den Makrophagen bestätigt werden (Abb. 6a). Eine semiautomatische quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität zeigte eine signifikante Akkumulation der USPIO gegenüber der Kontrolle ($p > 0,001$). Eine konzentrationsabhängige Steigerung der CLIO-Aufnahme war hier nicht zu beobachten. Weiterhin ließ sich kein signifikanter Unterschied in der CLIO-Akkumulation zwischen den verschiedenen Makrophagenpopulationen feststellen (Abb. 6b).

a *in vitro* Makrophagen

b CLIO Aufnahme

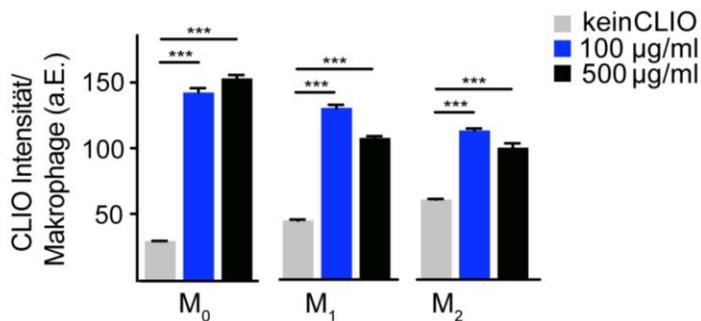


Abbildung 6: Makrophagen nehmen CLIO *in vitro* auf. (a) Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahme von F4/80 gefärbten M₀-Makrophagen, die mit verschiedenen CLIO-Konzentrationen inkubiert wurden (Maßstab: 50 µm; 5 µm in Vergrößerung). (b) Quantitative Analyse der CLIO-Aufnahme anhand der Fluoreszenzintensität im FITC Kanal pro manuell definierter Makrophage für die unterschiedlich polarisierten Makrophagen und CLIO-Konzentrationen. Die Quantifizierung wurde anhand von technischen Replikaten durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten t-Tests bestimmt (**p<0,001). (a.E.: arbiträre Einheit). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Auch in der Durchflusszytometrie konnte die Akkumulation von CLIO in Makrophagen nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der CLIO-Aufnahme (Abb. 7a). Je mehr CLIO bei der Inkubation zugesetzt wurde, desto höher war der Prozentsatz der CLIO⁺ Zellen unter den Makrophagen (Abb. 7b). Zudem zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der absoluten aufgenommenen CLIO-Menge (Abb. 7c).

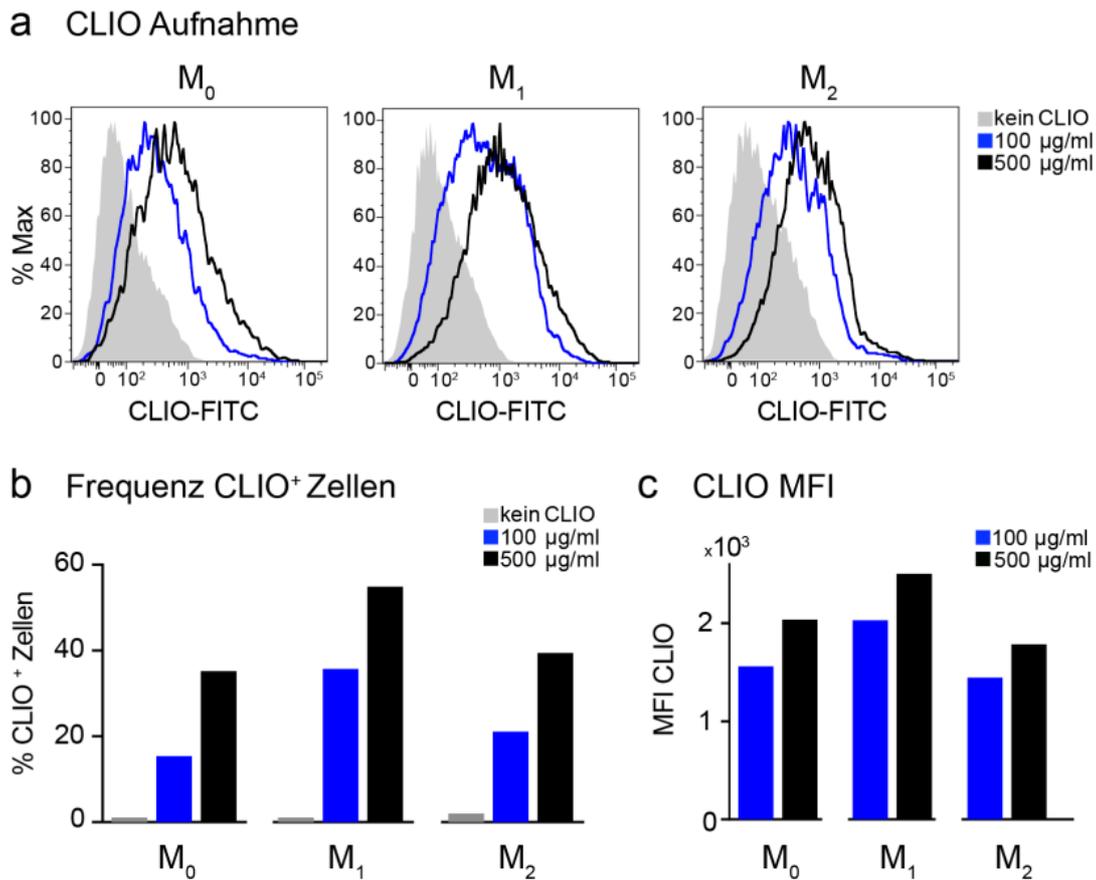


Abbildung 7: Makrophagen nehmen CLIO konzentrationsabhängig auf. Die Aufnahme von CLIO durch Makrophagen wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. (a) Repräsentative Graphen der Frequenz der CLIO⁺ Zellen unter den unterschiedlich polarisierten Makrophagen je nach CLIO-Konzentration gegeneinander normiert. (b) Frequenz der CLIO⁺ Zellen. (c) Menge der aufgenommenen CLIO gemessen anhand der MFI. n = 1. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.3 Die Aufnahme von CLIO hat keinen Einfluss auf die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen

Die Phagozytose-Fähigkeit von Makrophagen und Mikroglia ist eine wichtige Funktion sowohl in der Entstehung als auch in der Resolution der MS. Ein Einfluss der CLIO-Aufnahme auf das Phagozytose-Verhalten der Zellen ist denkbar, weshalb ein *in vitro* Experiment zu diesem Thema durchgeführt wurde. Es wurden M₀-, M₁- und M₂-polarisierte Makrophagen *in vitro* mit CLIO inkubiert oder unbehandelt belassen. Erythrozyten wurden mit dem Membranfarbstoff PKH26 markiert und für unterschiedliche Zeitspannen (1, 2 oder 3 h) mit den Makrophagen inkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme der Erythrozyten in die Makrophagen per Durchflusszytometrie untersucht. Die aufgenommene Menge wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt.

Die Auswertung zeigte erwartungsgemäß eine Zunahme der Makrophagen, die Erythrozyten aufgenommen hatten, sowie der aufgenommenen Menge an Erythrozyten mit steigender Inkubationszeit. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit CLIO behandelten und den naiven Makrophagen, weder in der Frequenz der PKH26⁺ Zellen, noch in der Aufnahmemenge (Abb. 8a und b). Gegenüber den M₁-polarisierten Makrophagen war eine gesteigerte Aufnahmemenge unter den M₀- und M₂-artigen Makrophagen zu beobachten (Abb. 8b).

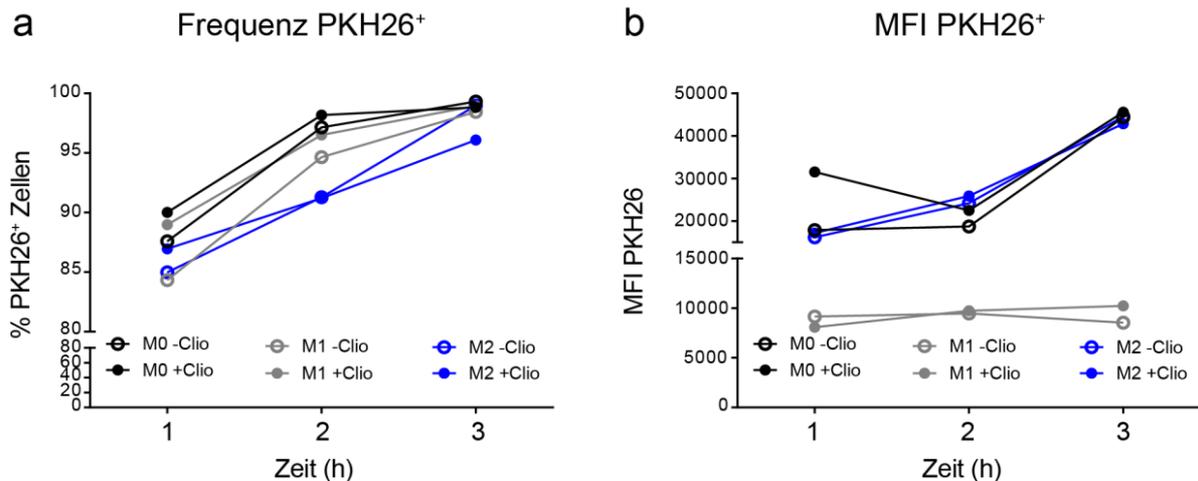


Abbildung 8: Die Aufnahme von CLIO hat keinen Einfluss auf das Phagozytose-Verhalten der Makrophagen. Mit Hilfe von mit PKH26 markierten Erythrozyten wurde der Einfluss der CLIO-Aufnahme auf das Phagozytose-Verhalten von Makrophagen *in vitro* untersucht. (a) Frequenz der PKH26⁺ Zellen in den verschiedenen Makrophagenpopulationen gemessen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (b) Menge der aufgenommenen Erythrozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, gemessen anhand der MFI von PKH26. n = 1.

3.4 Von Makrophagen aufgenommene CLIO lassen sich per MRT nachweisen

Die Nachweisbarkeit von durch Makrophagen aufgenommenen CLIO in der MRT wurde zunächst *in vitro* untersucht. Hierzu wurden KMM generiert und mit CLIO in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 100, 500 µg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte eine MRT-Untersuchung der Zellen mit einer T2*-g Sequenz. Die MRT-Aufnahmen zeigten einen deutlichen Signalabfall bei steigenden CLIO-Konzentrationen (Abb. 9a).

a *in vitro* MRT

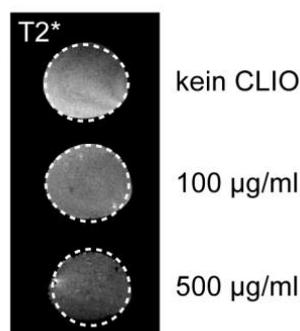


Abbildung 9: CLIO-markierte Makrophagen zeigen einen MRT-Signalabfall. (a) T2*-g Sequenz von *in vitro* mit CLIO markierten Mo-Makrophagen. n = 1. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.5 CLIO akkumulieren in den myeloiden Zellen des lymphatischen Gewebes

Um zunächst die Biodynamik von CLIO besser verstehen zu können, wurde im Gesunden untersucht, wie sich CLIO im Körper verteilen und welche Zellen die USPIO hauptsächlich aufnehmen. Nach einer Baseline-MRT-Messung wurde naiven

Versuchstieren CLIO *i.v.* verabreicht. Weitere MRT-Untersuchungen erfolgten 10 Minuten und 48 Stunden später. Das MRT-Protokoll umfasste koronare und transversale T2g-Sequenzen des Abdomens, um die Verteilung von CLIO in die verschiedenen Organe darstellen zu können. Für Leber, Milz, Blut, Knochenmark und Lymphknoten wurde das MR-Signal quantifiziert und die Signalintensität für die verschiedenen Zeitpunkte bestimmt. Um zu untersuchen, ob 48 h nach Injektion noch freie CLIO im Blut zu finden waren, wurden außerdem Ausstriche des Leukozytenfilms angefertigt. Immunhistochemisch ließen sich in den Ausstrichen keine freien CLIO mehr nachweisen. Dafür konnte die Akkumulation in einem Teil der Immunzellen gezeigt werden (Abb. 10).

a Leukozytenfilm

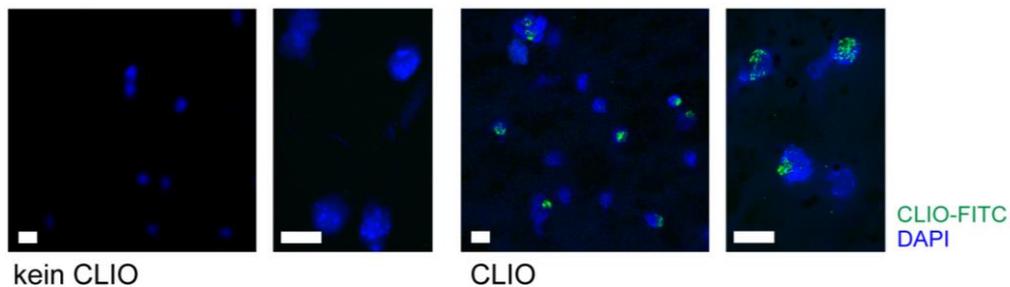
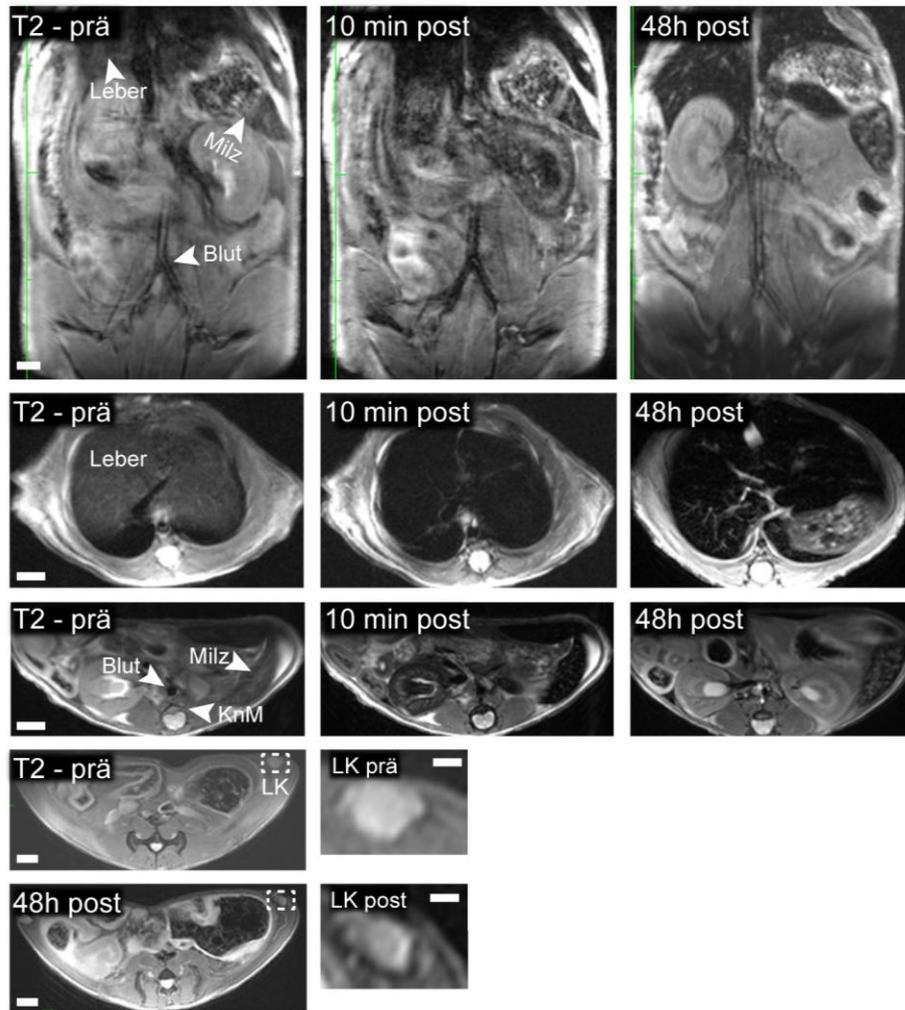


Abbildung 10: Freie CLIO werden nach 48 h aus dem Blut entfernt. (a) Repräsentative konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Leukozytenfilms einer gesunden Maus 48 h nach *i.v.* CLIO-Gabe gegenüber einer naiven Kontrollmaus. $n = 4$ CLIO-injizierte Tiere, $n = 3$ naive Kontrollen (Maßstab: 20 μm). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Die MRT-Aufnahmen zeigten 10 Minuten nach der CLIO-Injektion eine Auslöschung des Signals durch die freien Partikel in der Blutbahn. Die Gefäße grenzten sich hypointens vom umliegenden Gewebe ab. Auch in Milz, Leber, Knochenmark und Lymphknoten kam es zu einem Abfall des MR-Signals gegenüber den Voraufnahmen (Abb. 11a, *prä* und 10 min *post*). Die Quantifizierung des MR-Signals vor gegenüber nach der CLIO-Gabe zeigte die größte Veränderung in der Leber. Eine deutliche Verminderung des Signals zeigte sich auch in Milz und Knochenmark. Hingegen im Blut und den Lymphknoten zeigte sich nur eine geringe Veränderung des MR-Signals (Abb. 11b). 48 Stunden später normalisierte sich das Signal der Blutbahn und Milz weitgehend, während die Verminderung des Signals in Leber und Knochenmark weiterhin anhielt. In den Lymphknoten war ein weiterer Abfall des Signals gegenüber der ersten *post* CLIO-Messung zu sehen (Abb. 11a+b).

a CLIO Verteilung



b MRT Signal

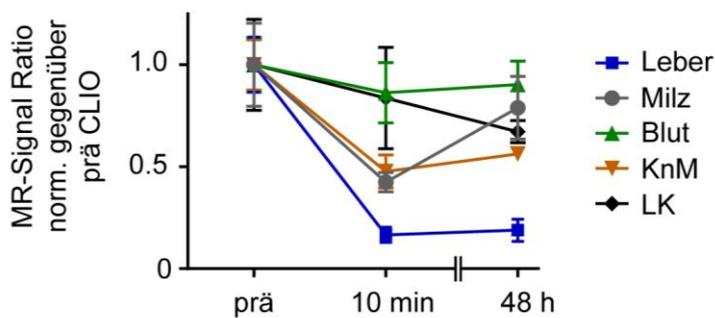
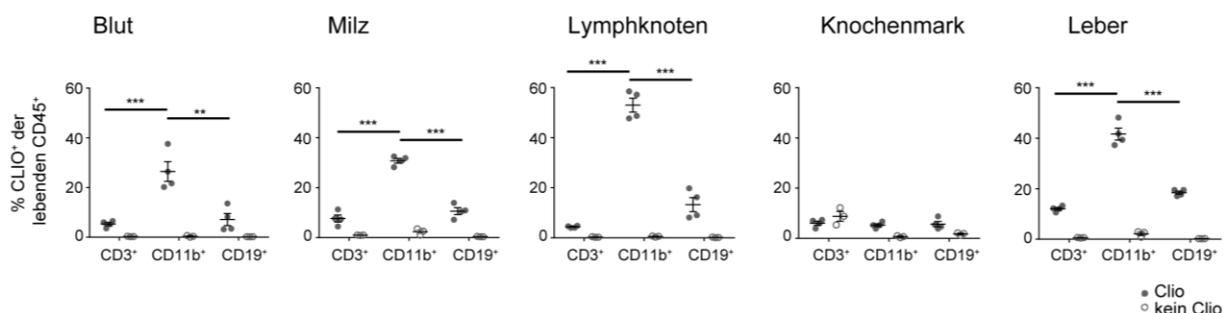


Abbildung 11: CLIO werden aus dem Blut in das lymphatische Gewebe aufgenommen. Um die Biodistribution von CLIO im Gesunden zu analysieren, wurden naive Tiere mit CLIO injiziert. (a) Repräsentative koronare und transversale T2-g Sequenz des Abdomens vor (prä) sowie 10 min und 48 h nach CLIO-Gabe (Maßstab: 2 mm; 1 mm in Vergrößerung der Lymphknoten). (b) Quantifizierung des MR-Signals verschiedener Organe gegenüber dem Zustand vor CLIO-Gabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Gemessen wurde das Signal der Leber, der Milz, des Bluts (Aorta), des Knochenmarks (thorakaler Wirbelkörper) und der inguinalen Lymphknoten. Daten sind \pm SEM dargestellt. n = 4 CLIO-injizierte Tiere, n = 3 naive Kontrollen. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

In der Durchflusszytometrie wurde die CLIO-Akkumulation in den Immunzellen der verschiedenen Organe analysiert. Dabei wurde untersucht, welche Zellen CLIO bevorzugt aufnehmen und damit am meisten zur Signalveränderung in der MRT beitragen. Die mit CLIO injizierten Versuchstiere wurden nach der letzten MRT-Messung getötet und die betroffenen Organe entnommen. Die Leukozyten wurden isoliert und mit Hilfe verschiedener Antikörper gefärbt. In der Durchflusszytometrie wurden Makrophagen (CD11b⁺) sowie T- (CD3⁺) und B-Zellen (CD19⁺) identifiziert und ihre CLIO-Aufnahme quantifiziert. Die Auswertung zeigte eine signifikant erhöhte Aufnahmefrequenz von CLIO unter den myeloiden Zellen gegenüber den T- und B-Zellen aus Blut, Milz, Lymphknoten und Leber. Die höchste Aufnahme fand sich unter den Makrophagen der Lymphknoten mit ca. 53 % CLIO⁺ Zellen. T- und B-Zellen zeigten in allen Organen eine signifikant geringere CLIO-Aufnahme mit maximal 18 % CLIO⁺ Zellen unter den B-Zellen der Leber. Für die untersuchten Leukozyten des Knochenmarks ließ sich keine signifikante CLIO-Aufnahme feststellen (Abb. 12a). Die jeweils aufgenommene Menge an CLIO wurde anhand der MFI gemessen. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte aufgenommene Menge von CLIO unter den Makrophagen aus Blut, Milz, Lymphknoten und Leber gegenüber den T- und B-Zellen (Abb. 12b).

a CLIO Aufnahme der Leukozyten



b MFI CLIO

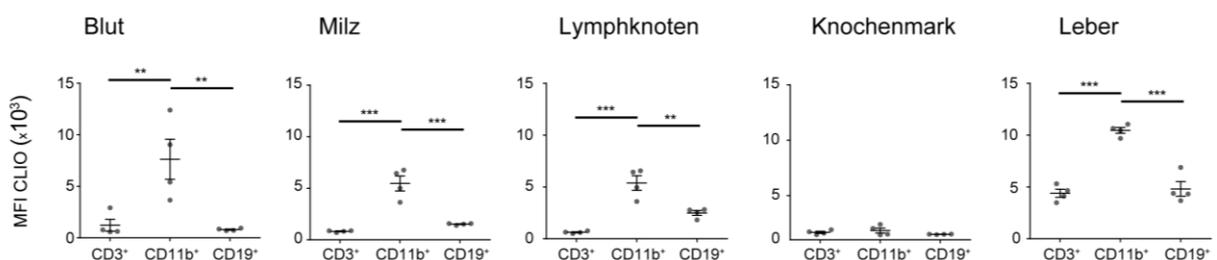


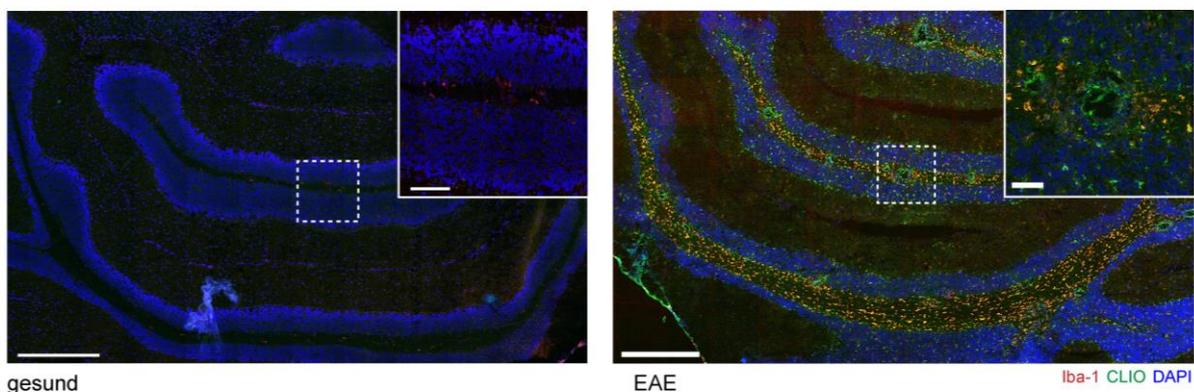
Abbildung 12: CLIO akkumulieren in den myeloiden Zellen des lymphatischen Gewebes. Die CLIO-Aufnahme unterschiedlicher Immunzellen wurde für verschiedene Organe in der Durchflusszytometrie untersucht. (a) Dargestellt ist die Frequenz der CLIO⁺ Zellen der T-Zellen (CD3⁺), myeloide Zellen (CD11b⁺) und B-Zellen (CD19⁺) in den verschiedenen Organen 48 h nach CLIO-Gabe gegenüber naiver Kontrollen. (b) Menge der aufgenommenen CLIO gemessen anhand der MFI. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA bestimmt (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). $n = 4$ CLIO-injizierte Tiere, $n = 3$ naive. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.6 CLIO akkumulieren in den Makrophagen und Mikroglia der EAE-Läsionen

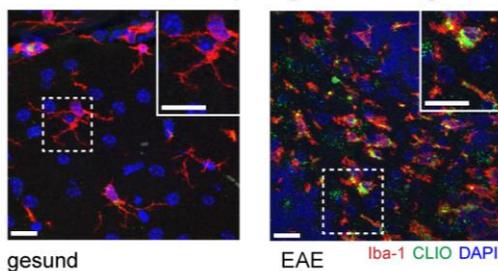
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob CLIO auch in den myeloiden Zellen innerhalb der EAE-Läsionen akkumulieren. SJL-Mäuse wurden mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ immunisiert, um

eine EAE auszulösen. Zum Zeitpunkt des Symptombeginns wurden ihnen CLIO verabreicht. 48 Stunden später wurden die Tiere getötet und ihre Gehirne histologisch untersucht. Makrophagen und Mikroglia wurden mit Hilfe eines Iba-1 Antikörpers angefärbt. In den Gewebeschnitten der EAE-Tiere konnten vor allem in der weißen Substanz des Kleinhirns dichte CLIO-Infiltrate beobachtet werden. Dem gegenüber war in der gesunden Kontrollgruppe kaum Influx von CLIO festzustellen. Der Großteil der Nanopartikel war in Iba-1⁺ Zellen lokalisiert. Besonders im Kleinhirn war die Mehrheit der Makrophagen und Mikroglia positiv für CLIO (Abb. 13a und b). Auch in EAE-Läsionen außerhalb des Kleinhirns konnte eine CLIO-Akkumulation in den Iba-1⁺ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13c). Eine quantitative Auswertung bestätigte die signifikant höhere CLIO-Aufnahme in die Makrophagen und Mikroglia der EAE-Läsionen sowohl der weißen als auch grauen Substanz des Kleinhirns gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 13d).

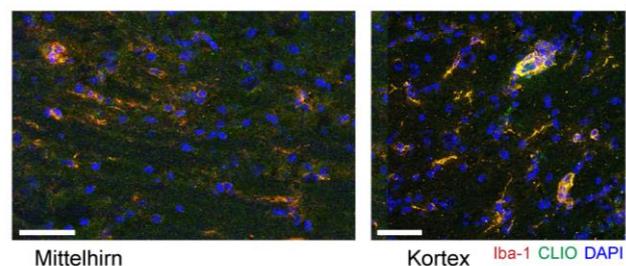
a CLIO im Kleinhirn



b CLIO in Makrophagen/Mikroglia



c Extrazerebelläre Läsionen



d CLIO Signal

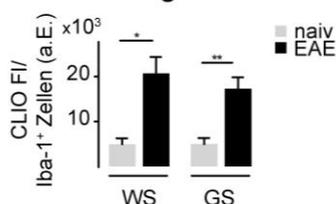


Abbildung 13: CLIO akkumulieren in den Makrophagen und Mikroglia der EAE-Läsionen. Immunhistochemische Untersuchung der CLIO-Akkumulation in Iba-1⁺ Zellen von EAE-Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren 48 h nach CLIO-Injektion. (a) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Tile-Scans Iba-1 gefärbter Schnitte des Kleinhirns einer EAE- und einer gesunden Kontrollmaus 48 h post CLIO-Gabe. Die Vergrößerung zeigt ein zentrales Gefäß mit perivaskulärer Region (Maßstab: 500 µm in der Übersichtsaufnahme; 100 µm für die Vergrößerung). (b) Repräsentativer Ausschnitt aus der weißen Substanz des Kleinhirns mit Vergrößerung einer Iba-1⁺ Zelle (Maßstab: 20 µm). (c) Repräsentative Aufnahmen von EAE-Läsionen im Mittelhirn und Kortex (Maßstab: 50 µm). (d) Quantitative Auswertung der CLIO-Aufnahme in Makrophagen/Mikroglia anhand

der Fluoreszenzintensität des CLIO-Signals in der weißen und grauen Substanz des Kleinhirns von EAE-Mäusen und gesunden Kontrollen. Daten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Test bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). $n = 7$ EAE-Mäuse und $n = 3$ naive Kontrollen. (a.E. = arbiträre Einheit). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Mit Hilfe von CD3- und CD45R-Antikörpern wurde die CLIO-Aufnahme in B- und T-Zellen in EAE-Läsionen immunhistochemisch untersucht. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen zeigten sie keine CLIO-Akkumulation (Abb. 14a und b).

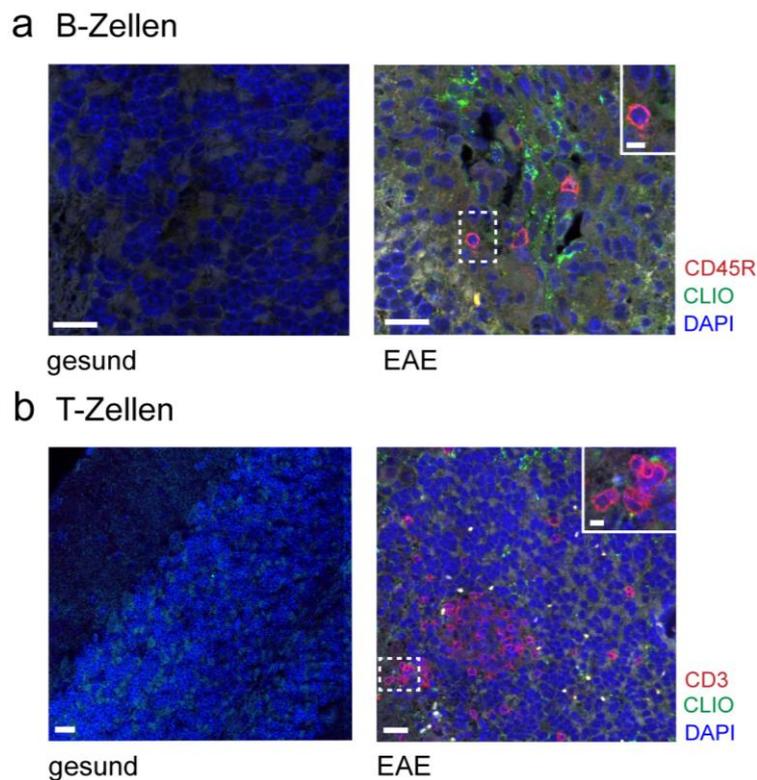


Abbildung 14: B- und T-Zellen zeigen keine CLIO-Akkumulation. (a) Repräsentative konfokale Aufnahmen einer CD45R-Färbung für B-Zellen und (b) einer CD3-Färbung für T-Zellen von Kleinhirngewebe einer gesunden gegenüber einer EAE-Maus (Maßstab: 20 μm ; 5 μm in Vergrößerung). $n = 3$ Mäuse. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.7 In EAE-Läsionen akkumulieren CLIO hauptsächlich in Zellen der angeborenen Immunität

Um die Ergebnisse aus der Histologie bestätigen und genauer differenzieren zu können, welche Immunzellen in EAE-Läsionen insbesondere an der CLIO-Aufnahme beteiligt sind, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Immunzellen aus Groß- und Kleinhirn von EAE- und gesunden Kontrollmäusen wurden isoliert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Anhand von Markerkombinationen wurde zwischen eingewanderten Makrophagen (CD11b^+ , $\text{CD45}^{\text{hoch}}$, Ly-6G^-), residenten Mikroglia (CD11b^+ , $\text{CD45}^{\text{mittel/niedrig}}$), neutrophilen Granulozyten (Ly-6G^+ , CD45^+), T-Zellen ($\text{CD45}^{\text{hoch}}$, CD11b^- , CD3^+ , CD4^+ oder CD8^+) und B-Zellen ($\text{CD45}^{\text{hoch}}$, CD11b^- , B220^+) unterschieden. Weiterhin wurden M_1 -artige ($\text{Ly6C}^{\text{hoch}}$) und M_2 -artige ($\text{Ly6C}^{\text{niedrig}}$) Makrophagen unterschieden (für eine beispielhafte Gating-Strategie s. Anhang 1).

Zunächst wurde untersucht, in welchen Anteilen die verschiedenen Leukozytenpopulationen vertreten waren. Der Anteil der Makrophagen und Mikroglia an den Leukozyten (CD45⁺ Zellen) des Kleinhirns war in der Gruppe der EAE-Tiere signifikant höher als in der naiven Kontrollgruppe (Abb 15a). Im Großhirn ergab sich nur für die Makrophagen ein signifikanter Unterschied zwischen EAE- und naiven Tieren (Abb. 15b). Im Kleinhirn waren die Neutrophilen mit einem Anteil von fast 12 % der Leukozyten vertreten (Abb. 15a). Das Verhältnis von M₁-/M₂-Makrophagen war sowohl im Klein- als auch Großhirn zugunsten der M₁-artigen Makrophagen verschoben (Abb. 15c). Gemäß Ergebnissen aus vorherigen Studien (Berger et al., 1997) konnte eine Korrelation des Anteils der Makrophagen in den EAE-Läsionen und der klinischen Ausprägung der EAE (gemessen am EAE-Score) festgestellt werden (Abb. 15d).

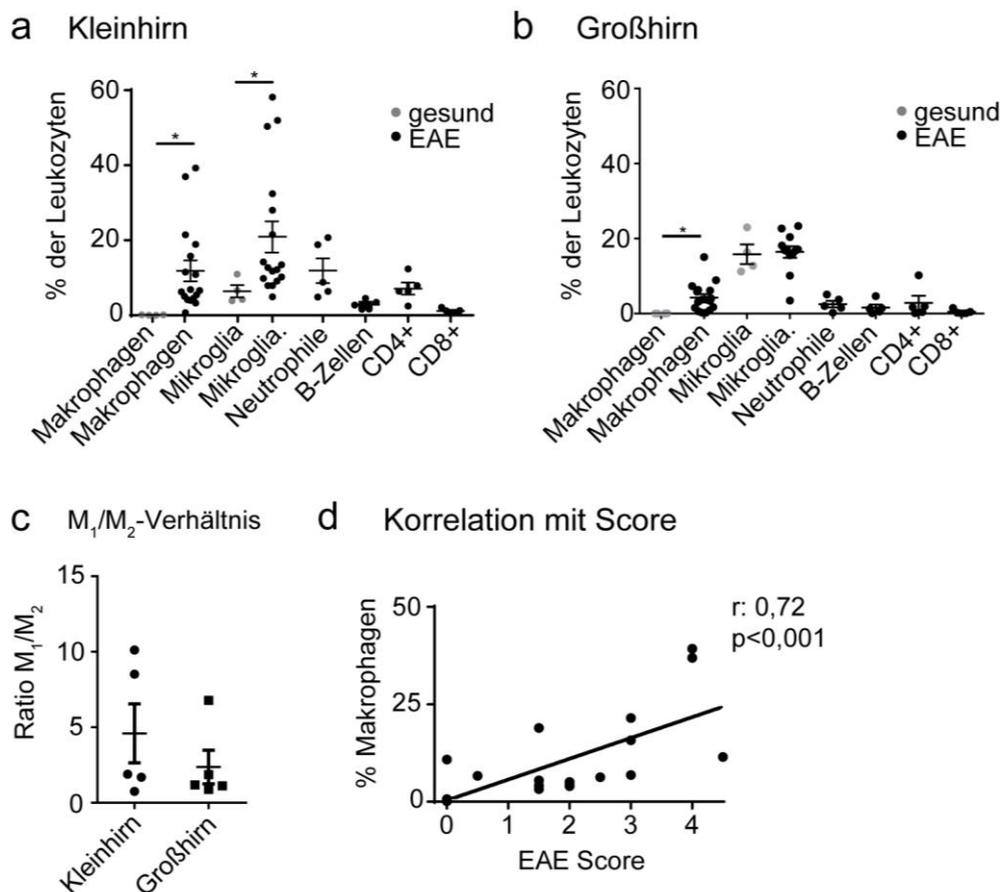


Abbildung 15: Der Anteil der Makrophagen in EAE-Läsionen korreliert mit der klinischen Schwere der EAE. Leukozytensubpopulationen im ZNS von EAE-Mäusen und gesunden Kontrollen wurden in der Durchflusszytometrie untersucht. Unterschieden wurde zwischen Makrophagen (CD11b⁺, CD45^{hoch}, Ly-6G⁻), Mikroglia (CD11b⁺, CD45^{mittel/niedrig}), neutrophilen Granulozyten (Ly-6G⁺, CD45⁺), T-Zellen (CD45^{hoch}, CD11b⁻, CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺) und B-Zellen (CD45^{hoch}, CD11b⁻, B220⁺) (s. Anhang 2). (a) Anteile der verschiedenen Leukozytensubgruppen an den CD45⁺ Zellen im Kleinhirn und (b) Großhirn. (c) Ratio der M₁- (Ly6C^{hoch}) und M₂- (Ly6C^{niedrig}) Makrophagen für Klein- und Großhirn in EAE-Mäusen. Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA bestimmt (*p<0,05). (d) Spearman's Korrelationsanalyse des Makrophagenanteils des Kleinhirns und dem EAE-Score der Tiere. n = 4 gesunde Mäuse und n = 5 - 19 EAE-Mäuse. Die Daten wurden aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Die Quantifizierung des CLIO-Signals mittels Durchflusszytometrie bestätigte die Ergebnisse aus der Histologie. Vor allem myeloiden Zellen nahmen in EAE-Tieren

CLIO auf. Insbesondere Makrophagen und Neutrophile zeigten im Groß- und Kleinhirn hohe Anteile von CLIO⁺ Zellen, von bis zu 49 % unter den Makrophagen und bis zu 67 % unter den Neutrophilen. Diese war gegenüber der naiven Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auch die Mikroglia zeigten im Kleinhirn eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte CLIO-Aufnahme. B- und T-Zellen zeigten insgesamt eine geringe Frequenz an CLIO⁺ Zellen (Abb. 16a und b). Unter den M₁- und M₂-artigen Makrophagen waren sowohl im Groß- als auch im Kleinhirn hohe Anteile an CLIO⁺ Zellen zu verzeichnen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Phänotypen (Abb. 16c und d). Interessanterweise ließ sich eine Korrelation zwischen dem Anteil der CLIO⁺ Makrophagen des Kleinhirns und dem klinischen Score der EAE Tiere nachweisen (Abb. 16e).

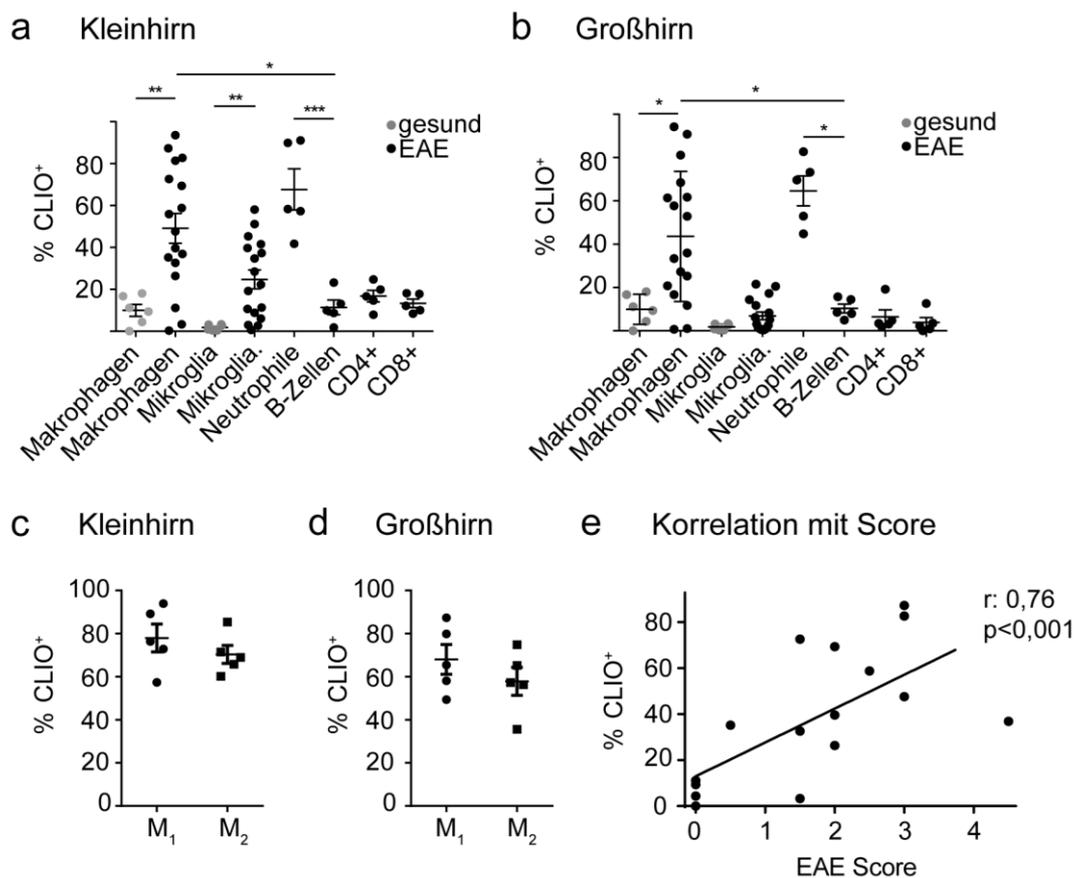


Abbildung 16: Die CLIO-Aufnahme der Makrophagen in EAE-Läsionen ist ein Marker der klinischen Schwere der EAE. Durchflusszytometrisch gemessene Frequenz von CLIO⁺ Zellen der verschiedenen Leukozytensubpopulationen in (a) Kleinhirn und (b) Großhirn für EAE-Tiere und gesunde Kontrollen. Frequenz der CLIO⁺ M₁- und M₂-artigen Makrophagen in (c) Kleinhirn und (d) Großhirn. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (e) Korrelationsanalyse der CLIO-Aufnahme der Makrophagen des Kleinhirns und des EAE-Scores der Versuchstiere. $n = 4$ gesunde Mäuse und $n = 5 - 19$ EAE-Mäuse. Die Daten wurden aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Bei genauer Betrachtung aller CLIO⁺ Zellen im ZNS der EAE-Mäuse, wurde nochmals deutlich, dass vor allem myeloide Zellen für die CLIO-Akkumulation in EAE-Läsionen verantwortlich sind, während B- und T-Zellen kaum an der CLIO-Akkumulation beteiligt sind (Abb. 17a und b). Zwischen den Anteilen der M₁- und M₂-artigen Makrophagen konnte auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 17c und d).

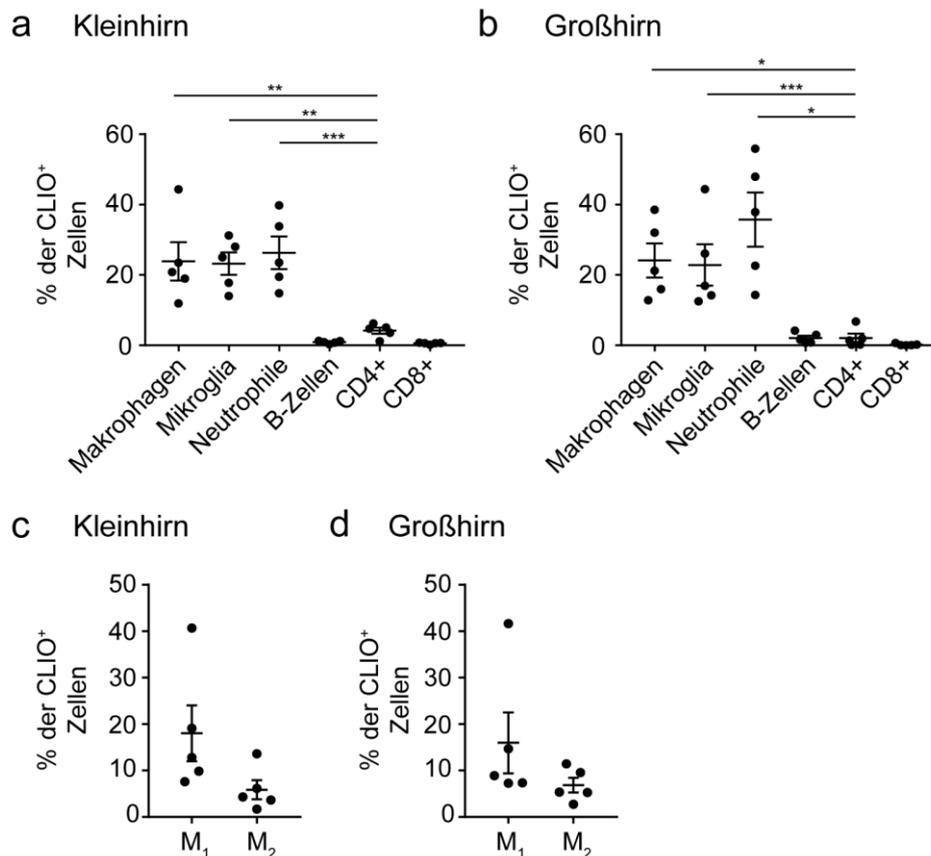


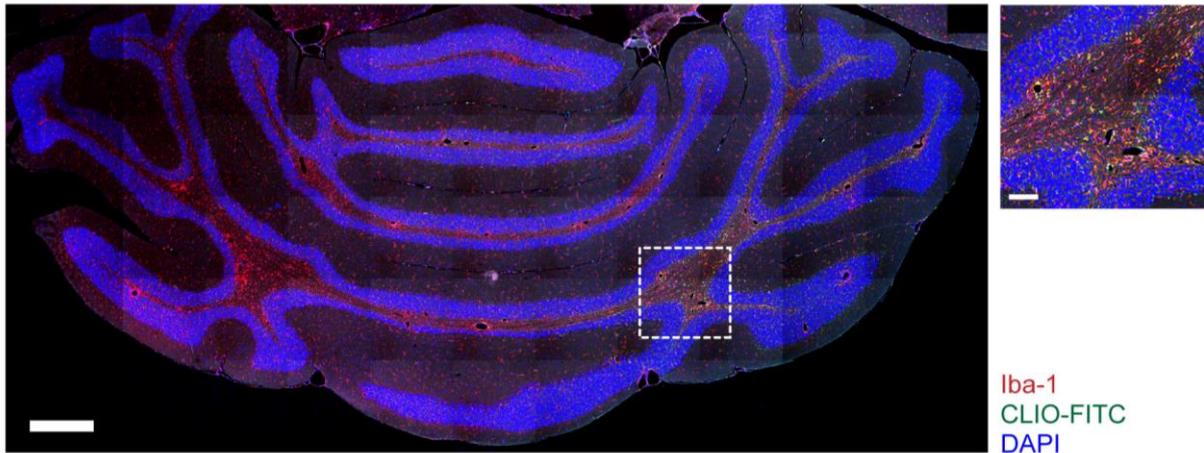
Abbildung 17: Die CLIO-Akkumulation in EAE-Läsionen geschieht in myeloiden Zellen. Durchflusszytometrische Analyse des CLIO⁺ Infiltrats des (a) Kleinhirns und (b) Großhirns von EAE-Mäusen. Anteile der M₁- und M₂-artigen Makrophagen an den CLIO⁺ Zellen des (c) Kleinhirns und (d) Großhirns. Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA bestimmt (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). n = 5. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.8 Die CLIO-Akkumulation in den EAE-Läsionen geschieht in der akuten Phase

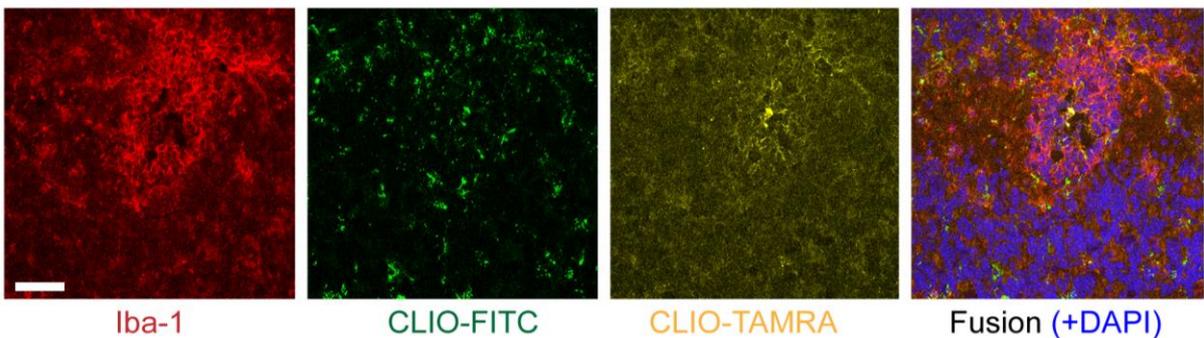
Nachdem gezeigt werden konnte, dass CLIO in den EAE-Läsionen akkumuliert, wurde untersucht, wie sich der CLIO-Einstrom in der chronischen Phase der Erkrankung verhält. Um eine zeitliche Aufschlüsselung zu erhalten, wurden EAE-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs verschieden markierte CLIO verabreicht. Zum Zeitpunkt des Symptombeginns wurde CLIO-FITC verwendet. In der Remissionsphase, 10 bis 14 Tage nach Symptombeginn, wurden CLIO-TAMRA verabreicht. 48 h später wurden die Tiere getötet und die Gehirne histologisch untersucht (für ein Schema des Versuchsablaufs s. Anhang 2). Es fiel eine reduzierte Menge an Iba-1⁺ Zellen im Vergleich zu den Gewebeproben aus der akuten Phase der EAE auf. Makrophagen und aktivierte Mikroglia waren hauptsächlich um die großen Gefäße herum zu finden. Fokale Läsionen hatten sich weitgehend aufgelöst (Abb. 18a). Es fielen unterschiedliche Verteilungsmuster der verschieden markierten CLIO auf. Die in der akuten Phase injizierten CLIO-FITC waren weitgehend in den Iba-1⁺ Zellen lokalisiert. Diese fanden sich verteilt über die gesamte weiße Substanz. TAMRA-markierte CLIO waren hingegen nur spärlich vorhanden und beschränkten sich auf perivaskuläre Bereiche (Abb. 18b). Eine Quantifizierung der Iba-1⁺ Zellen zeigte, dass sich trotz des Rückgangs auch in der chronischen Phase noch signifikant

mehr Makrophagen und Mikroglia in der weißen Substanz des Kleinhirns von EAE-Tieren finden ließen, während sich ihre Zahl in der grauen Substanz gegenüber den gesunden Kontrollen bereits normalisiert hatte (Abb. 18c). Die Menge der aufgenommenen CLIO-FITC in den Iba-1⁺ Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tieren in der Remissionsphase und der Kontrollgruppe (Abb. 18d).

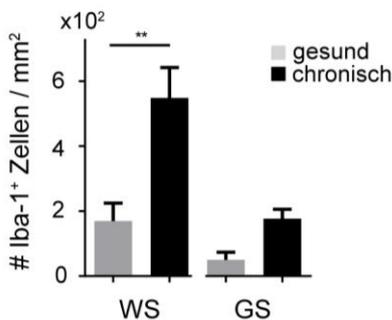
a Makrophagen/Mikroglia in der Remissionsphase



b Perivaskuläre Region



c Iba-1⁺ Zellen



d CLIO-FITC Aufnahme

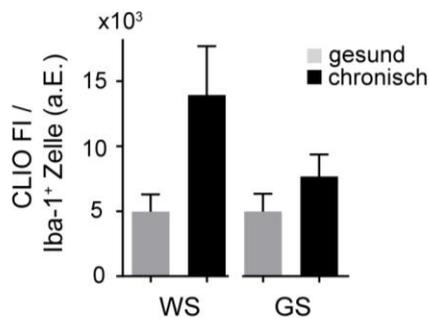


Abbildung 18: Die CLIO-Akkumulation beschränkt sich auf die akute Phase der EAE. Iba-1 Färbung von Kleinhirnschnitten von EAE-Tieren in der chronischen Phase. (a) Repräsentativer Tile-Scan von Iba-1 gefärbtem Kleinhirngewebe einer EAE-Maus 12 Tage *post* Symptombeginn und CLIO-Gabe (Maßstab: 500 µm; 100 µm in Vergrößerung). (b) Repräsentative Iba-1 Färbung einer perivaskulären Region aus dem Kleinhirn einer EAE-Maus 12 Tage *post* CLIO-FITC-Gabe und 2 Tage *post* CLIO-TAMRA-Gabe (Maßstab: 50 µm). (c) Quantifizierung der Iba-1⁺ Zellen und (d) der CLIO-FITC Aufnahme in Iba-1⁺ Zellen anhand der Fluoreszenzintensität in der weißen und grauen Substanz des Kleinhirns von EAE-Tieren in der chronischen Phase gegenüber gesunden Kontrollen. Daten werden

als Mittelwert + SEM dargestellt. Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests bestimmt (** $p < 0,01$). $n = 3$. (a.E. = arbiträre Einheit). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.9 Mikroglia nehmen freie CLIO auf, die über die BHS ins ZNS gelangen

Um besser zu verstehen, wie CLIO in den im ZNS sesshaften Mikroglia akkumulieren, wurde untersucht, wie es zum Kontakt zwischen den Nanopartikeln und den Immunzellen kommt. Es wurde die Hypothese geprüft, dass CLIO über eine gestörte BHS in das ZNS gelangen und dort von Mikroglia aufgenommen werden. Dazu wurden EAE-Mäuse zum Zeitpunkt des Symptombeginns mit Hilfe einer GD-gestützten T1-g Sequenz untersucht und eine BHS-Störung nachgewiesen. Im Anschluss wurden CLIO-FITC *i.v.* injiziert. Zwei Stunden später wurden die Tiere getötet und Schnitte des Kleinhirns histologisch untersucht. Histologisch konnte gezeigt werden, dass zu diesem frühen Zeitpunkt noch keine Aufnahme von CLIO in die Iba-1⁺ Zellen stattgefunden hatte. Jedoch waren freie CLIO-Partikel bereits in unmittelbarer Nähe von Mikrogliafortsätzen zu sehen (Abb. 19a). Bei einer isolierten Betrachtung der CLIO-Verteilung wurde deutlich, dass sich die Nanopartikel teils als freie Partikel im Parenchym des Kleinhirns, teils als Konglomerate, welche die Innenseite der Gefäße auskleideten, darstellten (Abb. 19b). Um eine CLIO-Akkumulation in den Endothelzellen auszuschließen, wurden Kleinhirnschnitte mit einem CD31-Antikörper gefärbt. Hier waren CLIO in unmittelbarer Nachbarschaft der CD31⁺ Zellen zu sehen, jedoch zeigte sich keine Überlappung der beiden Kanäle, so dass eine Aufnahme der CLIO in die Endothelzellen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 19c).

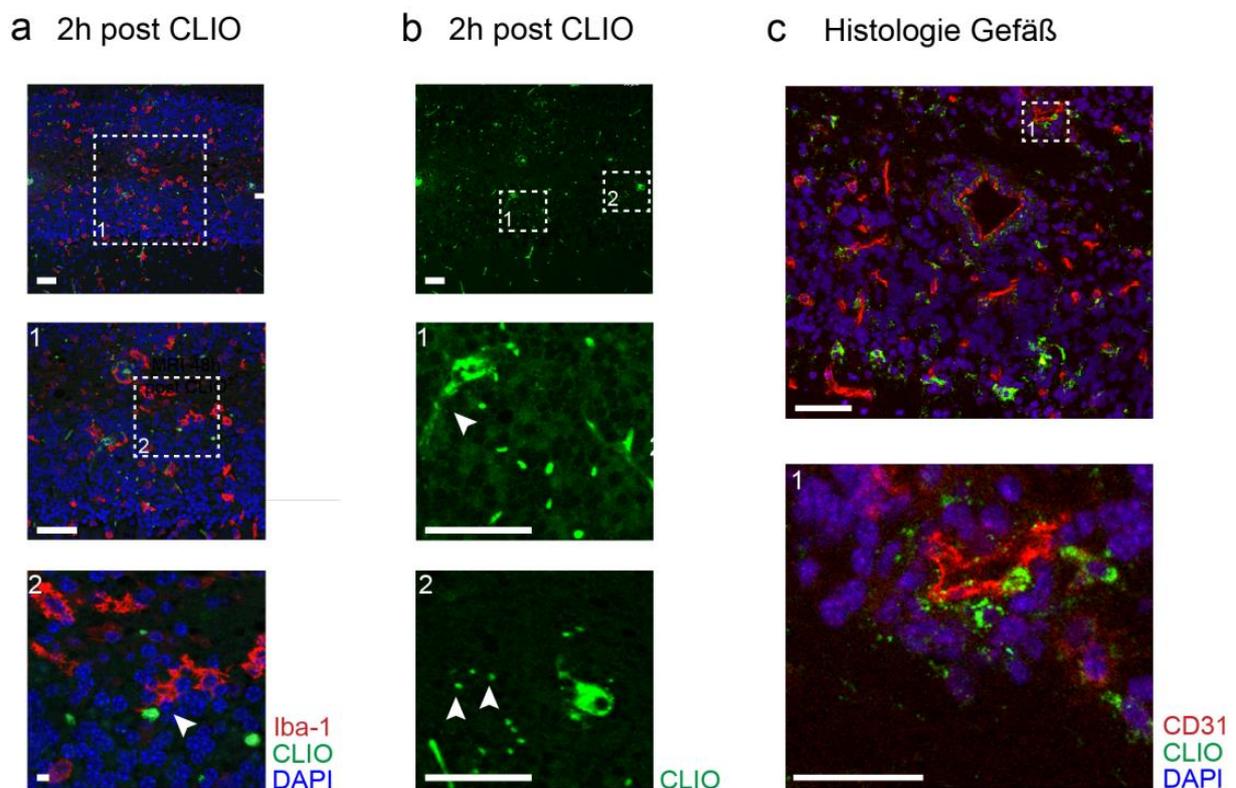


Abbildung 19: CLIO-Aufnahme in Mikroglia. (a) Repräsentative Iba-1 Färbung des Kleinhirns einer EAE-Maus 2 h *post* CLIO-Administration in verschiedenen Vergrößerungen. Pfeilspitze markiert freies CLIO in unmittelbarer Nähe eines Mikrogliafortsatzes (Maßstab: 50 µm in oberem und mittlerem Bild; 5 µm in unterem Bild). (b) Repräsentative Aufnahme aus dem Kleinhirn einer EAE-Maus 2 h *post* CLIO-Gabe. Dargestellt ist nur der CLIO-Kanal. Pfeilspitze im mittleren Bild zeigt ein CLIO-Konglomerat.

Pfeilspitzen in unterem Bild zeigen freie CLIO-Partikel im Parenchym. n = 3 (Maßstab: 50 µm). (c) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme der Gefäße (CD31⁺ Endothel) im Kleinhirn einer EAE-Maus 48 h *post* CLIO-Injektion. n = 3 (Maßstab: 50 µm). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.10 EAE-Läsionen können mit CLIO in der MRT dargestellt werden

Nachdem gezeigt wurde, dass CLIO in den Makrophagen und Mikroglia der EAE-Läsionen akkumulieren, wurde untersucht, ob sich EAE-Läsionen mit Hilfe von CLIO in der MRT darstellen lassen. Dazu wurden EAE-Mäuse zum Zeitpunkt des Symptombeginns mit einem standardisierten MRT-Protokoll untersucht. Dieses umfasst eine T2-g Sequenz zur Darstellung von Ödemen, eine GD-unterstützte T1-g Sequenz zur Darstellung von BHS-Störungen und eine T2*-g Sequenz zur Erfassung des CLIO-Signals. Im Anschluss an die Basalmessung wurden den Tieren CLIO injiziert und das Protokoll 48 Stunden später wiederholt. In der *prä* CLIO T2-g Sequenz waren ausgeprägte Ödeme, das gesamte Kleinhirn betreffend, erkennbar (Abb. 20a links). Mit Hilfe von Gadolinium traten in der T1-g Sequenz ausgedehnte BHS-Störungen, vor allem im Kleinhirn, aber auch entlang der Meningen zum Vorschein (Abb. 20a mittig). Die T2*-g Sequenz stellte sich weitgehend unauffällig dar. Aufgrund des vom Blutsauerstoffgehalt abhängigen Kontrasts stellten sich hier vor allem die Venolen gut abgrenzbar dar (Abb. 20a rechts). 48 Stunden später waren sowohl Ödeme als auch BHS-Störungen weitgehend verschwunden (Abb. 20b links und mittig). In der T2*-g Sequenz stellten sich neuauftretene Suszeptibilitätsartefakte dar. Diesen waren als hypointense Läsionen vor allem in der weißen Substanz des Kleinhirns deutlich zu erkennen (Abb. 20b rechts). Bei einem Vergleich mit den histologischen Auswertungen der CLIO-Akkumulation im Kleinhirn ließ sich erkennen, dass die Lokalisation der hypointensen Läsionen mit der der CLIO-Akkumulation übereinstimmte (Vergleich Abb. 13).

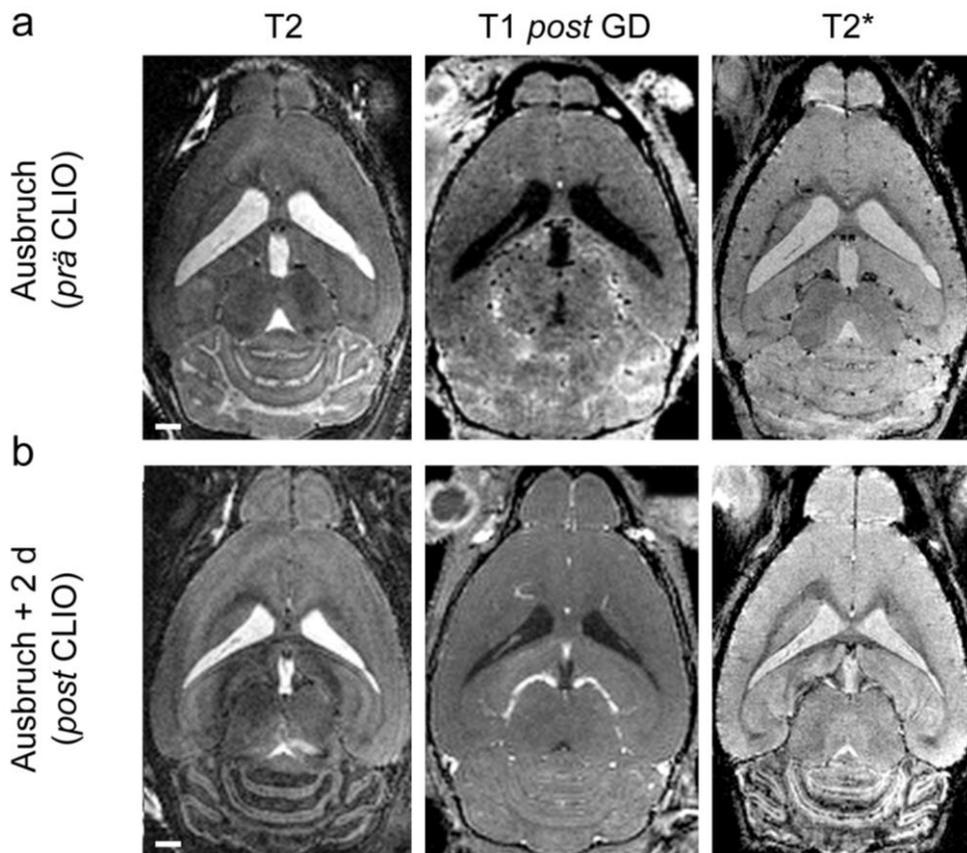


Abbildung 20: Die CLIO-Akkumulation kann mit Hilfe der MRT dargestellt werden. EAE-Mäusen wurden zum Zeitpunkt des Symptombeginns CLIO verabreicht. Diese wurden vorher sowie 48 h später mit einem MRT-Protokoll untersucht. (a) Dargestellt sind eine T2-g, eine GD-gestützte T1-g und eine T2*-g Sequenz einer repräsentativen EAE-Maus vor CLIO-Gabe und (b) 48 h später (Maßstab: 1 mm). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.11 Das CLIO-Signal korreliert mit der klinischen Schwere der EAE

Zur besseren optischen Darstellung und Quantifizierung des CLIO-Signals wurde eine Subtraktion der *prä* und *post* CLIO-Aufnahmen angefertigt (Abb. 21a). Der Anstieg des CLIO-Signals (entspricht dem Suszeptibilitätssignal) zwischen der *prä* und *post* CLIO T2*-g Aufnahme wurde quantifiziert. Eine Gegenüberstellung zeigte einen signifikanten Anstieg des Suszeptibilitätssignals, um das 4,6-fache, im Kleinhirn der EAE-Tiere. In der gesunden Kontrollgruppe ließ sich demgegenüber kein Anstieg des CLIO-Signals nachweisen (Abb. 21b). Wie zuvor spekuliert, konnte eine Korrelation zwischen dem Abfall des CLIO-Signals und dem klinischen Score der EAE-Tiere festgestellt werden ($r = 0,83$) (Abb. 21c). Die gleiche Analyse wurden mit *prä* und *post* GD-Aufnahmen durchgeführt. Es wurde ebenfalls eine Korrelation mit dem klinischen Score der Tiere festgestellt ($r = 0,71$). Allerdings war diese Korrelation im Vergleich schwächer als die des CLIO-Signals (Abb. 21d).

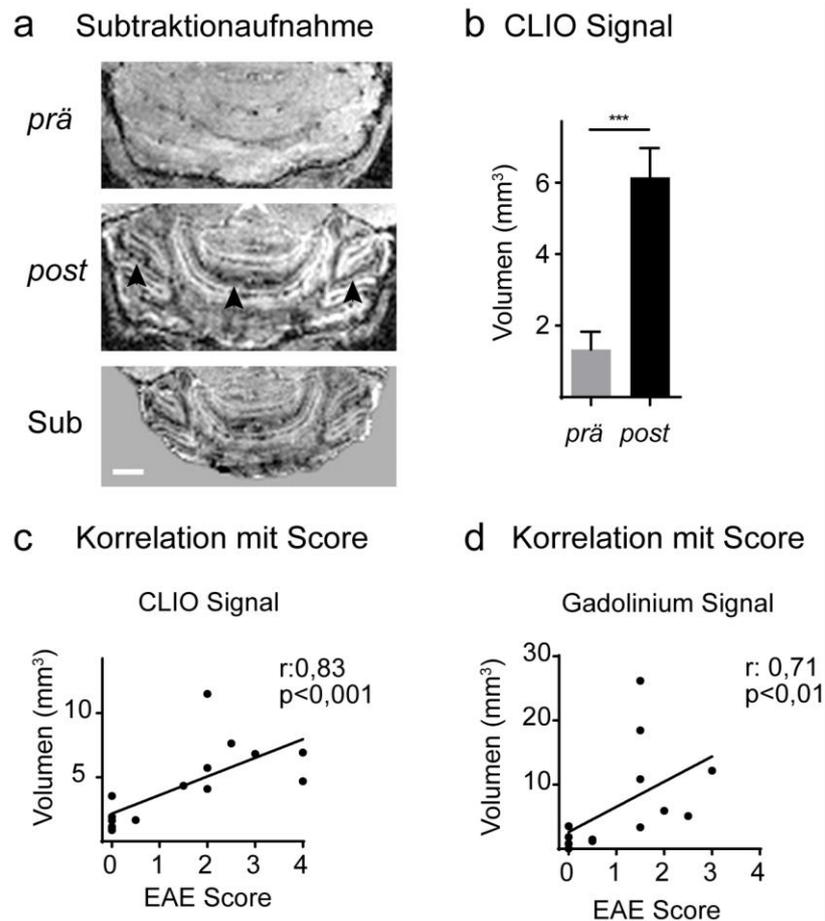


Abbildung 21: Das CLIO-MRT-Signal korreliert mit der klinischen Schwere der EAE. Darstellung und Quantifizierung des CLIO- und GD-Signals. (a) Repräsentative Subtraktion der *prä* und *post* CLIO-Aufnahme zur besseren Darstellung des CLIO-Signals der T2*-g Sequenzen einer EAE-Maus. Pfeilspitzen markieren hypointense Läsionen (Maßstab: 1 mm). (b) Quantifizierung des CLIO-Signals *prä* und 48 h *post* CLIO-Administration im Kleinhirn von EAE-Mäusen. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests bestimmt (** $p < 0,001$). (c) Korrelationsanalyse zwischen CLIO-Signal und EAE-Scores der Versuchstiere. (d) Korrelationsanalyse zwischen GD-Signal, bestimmt anhand der T1-g Sequenzen, und EAE-Scores. $n = 14$. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Aus den bisherigen Versuchen wurde deutlich, dass die Hauptlast der Läsionen im Kleinhirn lokalisiert ist. Dennoch konnten in der Histologie auch Läsionen mit CLIO-Akkumulation in weiteren Teilen des ZNS, wie dem Mittelhirn und dem Kortex, dargestellt werden (s. Abb. 3). Auch in der MRT ließen sich diese Läsionen anhand von GD- und CLIO-Anreicherung darstellen (Abb.22 a+b).

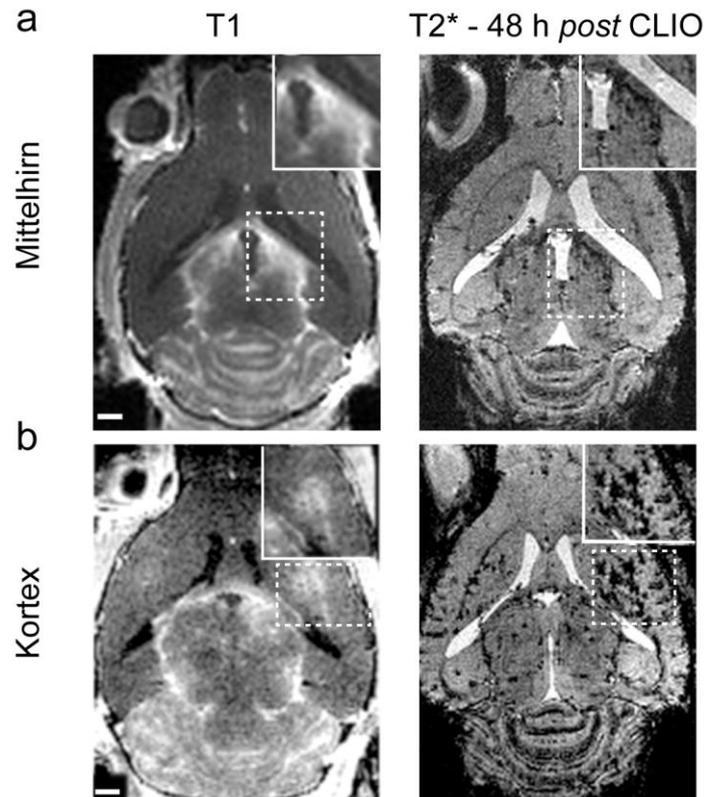


Abbildung 22: CLIO-Akkumulation in extrazerebellären Läsionen. (a) Dargestellt sind eine GD-gestützte T1-g zum Zeitpunkt der CLIO-Gabe (linke Spalte) und eine T2*-g Sequenz einer repräsentativen EAE-Maus 48 h später (rechte Spalte) zur exemplarischen Darstellung von EAE-Läsionen mit Mittelhirn und (b) im Kortex (Maßstab: 1 mm). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Hoch auflösende MRT-Sequenzen, wie die hier verwendeten, sind anfällig für Bewegungsartefakte (Havsteen et al., 2017). Da es bei den Messungen durch beispielsweise die Atmung der Tiere zu Bewegungsartefakten kommt, wurden die vorherigen Ergebnisse in einer *ex vivo* Messung wiederholt. Dazu wurden die Gehirne einer EAE- und einer gesunden Maus 48 Stunden nach EAE-Ausbruch und CLIO-Gabe entnommen und mit dem zuvor beschriebenen MRT-Protokoll untersucht. Die Bilder zeigten gegenüber den *in vivo* Messungen eine bessere Auflösung. Zu erkennen waren deutliche Suszeptibilitätsartefakte an verschiedenen Stellen des Gehirns der EAE-Maus. Besonders betroffen war das Kleinhirn, aber auch der Kortex und die weiße Substanz des Großhirns (Abb. 23, rechts). Die gesunde Kontrolle zeigte kein CLIO-Signal (Abb. 23, links).

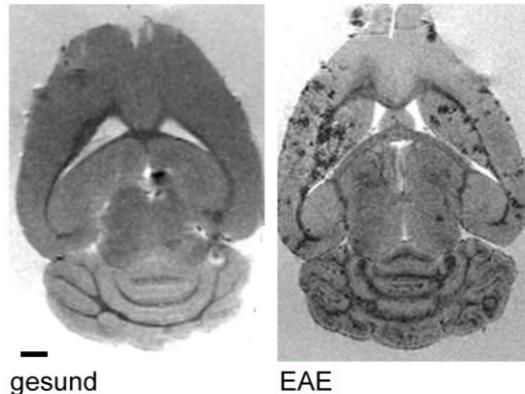
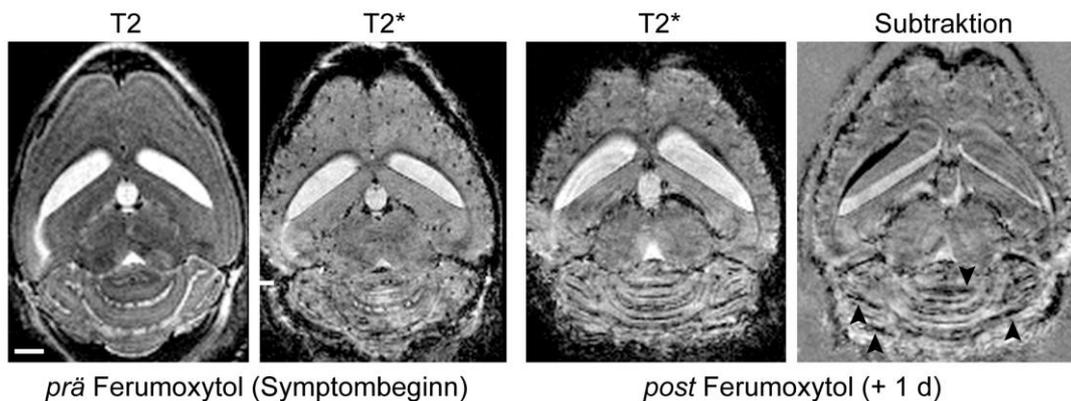
a *Ex vivo* MRT-Darstellung des CLIO-SignalsAusbruch + 2 d - T2* *post* CLIO

Abbildung 23: *Ex vivo* MRT-Darstellung von EAE-Läsionen mit CLIO. *Ex vivo* MRT-Messung zum Ausschluss von Bewegungsartefakten (a) T2*-g Sequenzen eines Gehirns einer EAE-Maus (Score: 2,5 unmittelbar vor der Messung) und einer gesunden Kontrolle 48 h nach CLIO-Administration. n = 2 (Maßstab: 1 mm). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

3.12 Ein Versuch mit dem zugelassenen Ferumoxytol bestätigte die klinische Anwendbarkeit

Um das klinische Potential dieser Methode der Entzündungsbildgebung zu evaluieren, wurde ein Versuch mit dem bereits für die klinische Anwendung zugelassenen Ferumoxytol durchgeführt. Analog zu den vorherigen Versuchen wurden EAE-Mäuse zum Zeitpunkt des Symptombeginns mit einem standardisierten MRT-Protokoll untersucht. Anschließend wurde ihnen Ferumoxytol *i.v.* injiziert. 24 Stunden später wurden die MRT-Messungen wiederholt. Daraufhin wurden die Tiere getötet und ihre Gehirne histologisch untersucht. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen, zeigten die EAE-Mäuse in den *post* Ferumoxytol-Bildern gegenüber den *prä* Ferumoxytol-Aufnahmen neu aufgetretene hypointense Läsionen, vor allem im Bereich des Kleinhirns, als Zeichen der Anreicherung der Nanopartikel (Abb. 24a, 2. und 3. Bild von links). In einer Subtraktionsanalyse konnten diese Läsionen gut dargestellt und quantifiziert werden (Abb. 24a, rechts, Pfeile). Die Quantifizierung des Ferumoxytol-Signals zeigte einen signifikanten Anstieg in den *post* Ferumoxytol-Messungen gegenüber den *prä* Aufnahmen ($p=0,01$) (Abb. 24b).

a Ferumoxytol im MRT



b Ferumoxytol-Signal

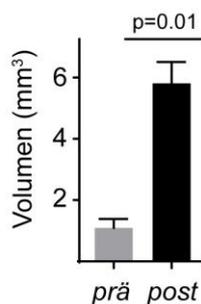


Abbildung 24: EAE-Läsionen können mit Ferumoxytol in der MRT dargestellt werden. (a) T2-g und eine T2*-g Sequenz einer repräsentativen EAE-Maus vor Ferumoxytol-Gabe (links und Mitte links). T2*-g Sequenz 24 h nach Ferumoxytol-Administration derselben Maus (Mitte rechts). Subtraktionsdarstellung der *prä* und *post* Ferumoxytol T2*-g Sequenz (rechts) (Maßstab: 1 mm). (b) Quantifizierung des Ferumoxytol-Signals im Kleinhirn von EAE-Tieren *prä* und 24 h *post* Ferumoxytol-Gabe. Daten werden als Mittelwert + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests bestimmt (** $p \leq 0,01$). $n = 4$. Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

Um die Ergebnisse der MRT-Untersuchung auf zellulärer Ebene zu bestätigen, wurde Kleinhirngewebe von mit Ferumoxytol behandelten EAE-Mäuse histologisch untersucht. Hierzu wurden EAE-Mäuse unmittelbar nach der 24 h *post* Ferumoxytol-MRT-Messung getötet und eine Färbung mit Berliner Blau angefertigt. Als Positivkontrolle dienten Schnitte von EAE-Mäusen 48 h *post* CLIO-Injektion. Es bestätigte sich die Anwesenheit eisenhaltiger Zellen in der weißen Substanz des Kleinhirns (Abb. 25a, Mitte). Demgegenüber waren keine eisenhaltigen Zellen in der gesunden Kontrolle nachweisbar (Abb. 25a, links). Auch CLIO-haltige Zellen ließen sich mit dieser Färbung nachweisen (Abb. 25a, rechts).

a Ferumoxytol Histologie

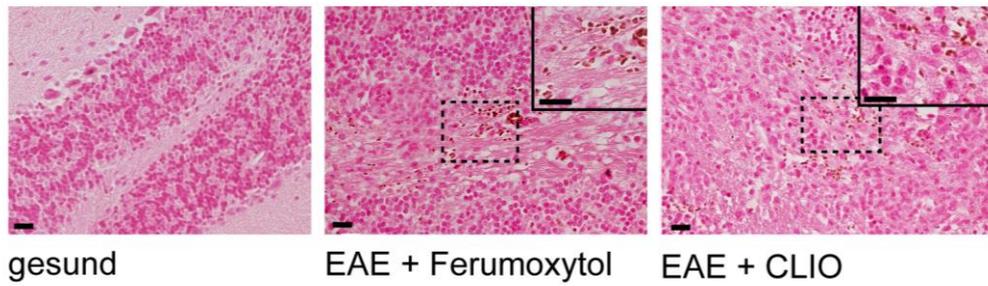


Abbildung 25: Ferumoxytol akkumuliert in EAE-Läsionen. (a) Repräsentative Färbungen mit Berliner Blau von Kleinhirngewebe einer gesunden Kontrolle (links) gegenüber einer EAE-Maus 24 h *post* Ferumoxytol-Gabe (Mitte) und einer 48 h *post* CLIO-Gabe (rechts) (Maßstab: 20 µm). Modifiziert nach Kirschbaum*, Sonner* et al, 2016.

4 DISKUSSION

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die Entwicklung und Anwendung einer Methode der Entzündungsbildgebung, die es ermöglicht, mit Hilfe von Eisenoxid-Nanopartikeln Entzündung nicht invasiv darzustellen, zu quantifizieren und eine Aussage über zelluläre Mechanismen der Entzündung zu treffen sowie deren klinischen Nutzen in einem Modell der MS zu evaluieren.

Die Motivation für dieses Projekt stammt unter anderem aus den Unzulänglichkeiten der bisher angewandten Methoden der MRT Bildgebung in der MS. Diese stützen sich hauptsächlich auf die Darstellung sekundärer Effekte der Entzündung sowie langfristig auftretende Defekt, also unspezifische Marker. Die Entwicklung einer Methode, welche histopathologische Kernmerkmale der MS direkt darstellen könnte, ist wünschenswert. Bisherige Studien zum Einsatz von USPIO in der Bildgebung der MS erbrachten bereits vielversprechende Ergebnisse. So zeigten Studien, dass unter dem Einsatz von USPIO gegenüber der GD-gestützten Methode entzündliche Läsionen in vollständigerem Maße dargestellt werden konnte (Dousset et al., 2006). Hierdurch konnte zum Teil eine genauere Klassifizierung des Erkrankungsstadiums erfolgen, was unter anderem Einfluss auf die Behandlungsstrategie hat (Tourdias et al., 2012). Diese bereits bestehenden Ergebnisse versprachen einen hohen Nutzen des Einsatzes von USPIO in der MS-Bildgebung und waren Anlass, den Funktionsmechanismus auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen sowie die klinische Relevanz der Methode zu evaluieren.

Sollte sich hier eine Methode zur spezifischen Entzündungsbildgebung in der MS etablieren lassen, hätte dies Vorteile für Diagnostik und Therapie der Erkrankung. Eine früher gestellte Erstdiagnose, eine adäquate Einordnung der Krankheitsaktivität sowie die Möglichkeit des präziseren Therapiemonitoring würden sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken. Neben der MS würden auch weitere Gebiete der Medizin von einer Methode zur spezifischen Entzündungsbildgebung profitieren. Hierzu gehört unter anderem die Anwendung im Rahmen von Immuntherapien in der Onkologie sowie in der Diagnostik und Therapie weiterer autoimmuner und entzündlicher Erkrankungen.

In dieser Arbeit konnte in einem Modell der MS gezeigt werden, dass CLIO von myeloiden Immunzellen aufgenommen werden und in den entzündlichen Läsionen im ZNS akkumulieren. Dadurch können EAE-Läsionen in der MRT dargestellt und die Entzündungslast des ZNS quantifiziert werden. Es konnte eine Korrelation zwischen nicht nur der Anzahl der Makrophagen in den EAE-Läsionen sowie der Menge der akkumulierten CLIO, sondern insbesondere auch zwischen dem CLIO-MRT-Signal und dem klinischen Zustand der EAE-Mäuse nachgewiesen werden. CLIO konnte also als ein Marker für den klinischen Verlauf der EAE etabliert werden. In einem Vergleich zeigte sich zudem, dass die CLIO-gestützte Bildgebung der etablierte GD-gestützten Bildgebung hinsichtlich der Korrelation mit der Klinik der Erkrankung überlegen ist.

Ein Grund für die verschiedenen Funktionsweisen und die damit verknüpfte Spezifität der beiden KM scheint ihr unterschiedlicher Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene zu sein. GD kann durch seine geringe Größe und Struktur leicht ins Gewebe diffundieren. Bei einer BHS-Störung reichert es sich deshalb im ZNS-Gewebe an (Hesselink and Press, 1988). Die BHS-Störung ist eines der Kennzeichen von Neuroinflammation. Sie entsteht durch verschiedene Mediatoren und tritt in der akuten Phase der Entzündung

auf. Mit GD lassen sich also entzündliche Läsionen der akuten Phase darstellen. Jedoch stellt die BHS-Störung in dem komplexen Geschehen der Entzündung nur einen einzelnen Aspekt dar. Weitere wichtige Komponenten, wie z.B. die zelluläre Infiltration, können mit dieser Methode nicht dargestellt werden. Hinzukommt, dass eine BHS-Störung auch bei einer Vielzahl weiterer ZNS-Erkrankungen auftritt und nicht spezifisch für die MS ist.

USPION hingegen reichern sich vor allem in zirkulierenden Monozyten an und werden mit den Zellen in die entzündlichen Läsionen transportiert. In Bereichen mit einer gestörten BHS gelangen die Nanopartikel ins Gewebe und akkumulieren dort in den stationären Makrophagen und Mikroglia (Beduneau et al., 2009). Das heißt, unter Verwendung von USPION werden myeloide Zellen in den Läsionen direkt dargestellt. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der MS. Makrophagen wandern in großen Zahlen in das ZNS ein, während Mikroglia lokal aktiviert werden. In den ZNS-Läsionen machen sie den größten Anteil der Immunzellen aus. Dort tragen sie entscheidend zur Aufrechterhaltung der Entzündung bei und sind mitverantwortlich für die Demyelinisierung der Axone (Benveniste, 1997).

USPION stellen also im Gegensatz zu GD vor allem zelluläre Mechanismen des Entzündungsgeschehens dar. Mit ihrer Hilfe lassen sich myeloide Zellen markieren und in der MRT verfolgen. Dadurch sind sie als KM als spezifischer Marker für die Entzündungslast geeignet. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Überlegenheit dieser Methode hinsichtlich der Korrelation mit dem klinischen Verlauf der EAE lässt mutmaßen, dass die zelluläre Infiltration des ZNS eine größere klinische Relevanz hat als unspezifische Mechanismen, wie die BHS-Störung. Insbesondere unter diesem Aspekt wird deutlich, dass ein Ansatz, der sich auf zelluläre Mechanismen fokussiert, zur diagnostischen Präzision in der Bildgebung der MS beitragen würde.

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass auch die BHS-Störung zur Anreicherung der USPION in stationären Mikroglia und Makrophagen beiträgt. Zeitlich gesehen geschieht dies vor dem aktiven Transport der Nanopartikel in die Läsionen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich in Läsionen des Großhirns, welche sich durch eine deutlich geringer ausgeprägte bis gar keine BHS-Störung auszeichneten, gegenüber den Kleinhirnläsionen deutlich weniger CLIO in den stationären Mikroglia akkumulierten. In den eingewanderten Makrophagen war hingegen eine deutliche Akkumulation zu verzeichnen. Dort entstand das MRT-Signal also hauptsächlich durch den zellulären Einstrom. Diese Art der Läsion wäre mit der GD-basierten Bildgebung nicht nachweisbar gewesen. Gemäß Ergebnissen aus vorherigen Studien konnten also mit Hilfe von CLIO-Läsionen detektiert werden, die sich nicht durch eine BHS-Störung auszeichnen und somit mit Hilfe von GBKM nicht sichtbar gewesen wären (Dousset et al., 2006; Tourdias et al., 2012).

Ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsarbeiten wäre zu untersuchen, zu welchem Anteil die CLIO-Akkumulation und das MRT-Signal durch die passive Diffusion der Partikel über die gestörte BHS oder durch das Einwandern myeloider Zellen entstehen. Diese Information könnte helfen, Läsionen in unterschiedliche Aktivitätsstadien einzuteilen und verschiedene histopathologische Typen zu differenzieren. Ein möglicher Ansatz könnte dabei eine Oberflächenmodifikation der USPION sein, die zu einer selektiven Aufnahme durch Monozyten/Makrophagen führt.

Ein Faktor, der die Aussagekraft der USPION-Bildgebung limitiert, ist die selektive Darstellung myeloider Zellen. MS und EAE sind klassische T-Zell-vermittelte Erkrankungen. T-Zellen spielen als Initiatoren der Pathogenese eine wichtige Rolle.

Sie rekrutieren weitere Entzündungszellen wie Makrophagen und Neutrophile in die Läsionen und halten durch das Ausschütten pro-inflammatorischer Zytokine die Entzündung aufrecht. Außerdem tragen sie zur BHS-Störung bei und steigern die Expression von MHC II. Daneben sind auch B-Zellen an wichtigen Prozessen der MS/EAE beteiligt. Sie tragen durch Antikörperproduktion zur Demyelinisierung und durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sowie ihre Funktion als APZ zur Aufrechterhaltung der Entzündung bei. Sowohl B- als auch T-Zellen werden von der CLIO-basierten Bildgebung nicht erfasst, da sie die Nanopartikel nicht aufnehmen. Da sie aber zentrale Rollen in der Pathophysiologie der MS/EAE spielen, wäre eine ganzheitliche Darstellung der an den Läsionen beteiligten Zellen wünschenswert.

Es gab bereits erfolgreiche Versuche, B- und T-Zellen im EAE-Modell nicht invasiv darzustellen. Diese beschränkten sich bisher auf einen Zelltyp. B-Zellen und ihre Rekrutierung in ZNS-Läsionen ließen sich unter Verwendung von mit radioaktivem Kupfer markiertem Rituximab in der Positronen-Emissions-Tomographie darstellen (James et al., 2017). Die Anwendung von Rituximab hatte jedoch den Nachteil, dass sie gleichzeitig zu einer Depletion der B-Zellen führte. Ein weiterer limitierender Faktor war die schlechte ZNS-Penetration von Rituximab.

Anderson et al. (2004) gelang es T-Zellen mit einem Eisenoxid-Nanopartikel in der MRT zu verfolgen. Er verwendete an poly-L-Lysin (PLL), einem Verbindungsprotein, gekoppelte SPION, um autoreaktive T-Zellen vor einem adoptiven Transfer in gesunde Versuchstiere zu markieren. Die T-Zellen konnten so später in Läsionen des Rückenmarks dargestellt werden. In einer anderen Studie wurden mit PLL-SPION markierte autoreaktive T-Zellen in EAE-Mäuse transferiert und diese dann nicht nur im Rückenmark, sondern im gesamten ZNS dargestellt (Baeten et al., 2010).

Es bleibt zu untersuchen, ob das Markieren der T-Zellen auch durch eine *i.v.* Applikation der SPION möglich ist. Ein Transfer von *in vitro* markierten T-Zellen in MS-Patienten wäre nicht bedenkenlos möglich, da eine Aggravation der Erkrankung hierdurch nicht auszuschließen wäre. Sollte das *in vivo* Markieren und Verfolgen von T-Zellen in Zukunft möglich sein, wäre eine kombinierte Anwendung mit CLIO als Ansatz zur ganzheitlichen Darstellung der MS-Läsionen denkbar.

Ein weiteres Problem bei der Anwendung von USPIO stellt die Limitierung ihrer Bioverfügbarkeit durch die Aufnahme in das retikuloendotheliale System (RES) dar. Die Nanopartikel werden durch stationäre phagozytierende Zellen in Leber und Milz aus dem Kreislauf entfernt und stehen dann nicht mehr zur Aufnahme in zirkulierenden Entzündungszellen und deren Darstellung zur Verfügung. Über das Ausmaß der Aufnahme in das RES entscheiden vor allem die Größe der USPIO und die Beschaffenheit ihrer Oberfläche. Größere Partikel werden bevorzugt aufgenommen, während kleinere den Phagozyten eher entgehen (Gaur et al., 2000). Auch in dieser Arbeit kam es, trotz einer geringen Partikelgröße der CLIO von 32 nm, zu einer deutlichen Anreicherung in Leber und Milz (s. Abb. 11 u. 12). Die verminderte Bioverfügbarkeit von CLIO erfordert höhere Dosen, um den gewünschten Effekt zu erreichen. Bisher gab es in Studien keine Hinweise auf eine Unverträglichkeitsreaktion oder Nebenwirkungen durch Überdosierung mit USPIO. Dennoch wäre ein selektiverer Einsatz wünschenswert, um unnötige Gefahren zu vermeiden und um eine bessere Bildqualität zu erreichen.

Gleichzeit ist damit das Problem verbunden, dass durch die Eisendepots in Leber und Milz eine MRT-Bildgebung dieser Organe für bis zu mehrere Monate erschwert wird (Toth et al., 2017). Vor einem Einsatz von USPIO sollten daher andere Erkrankungen berücksichtigt werden und in die Entscheidung, welches KM eingesetzt wird, mit einfließen. Es wäre sinnvoll, die Frage, inwiefern der Einsatz von USPIO spätere

Bildgebung von Leber und Milz erschwert und wie lange dieser Effekt anhält, in praktischen Versuchen zu adressieren. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob Oberflächenmodifikationen helfen könnten, das RES zu umgehen und die Bioverfügbarkeit von CLIO zu steigern.

Die MS ist eine chronische Erkrankung, die mit akuten Exazerbationen einhergeht. Bisherige Ergebnisse in Bezug auf die Bildgebung mit USPIO beschränkten sich auf die akute Phase der Erkrankung. In dieser Arbeit wurde der Einsatz der Nanopartikel in der Remissionsphase getestet. Hier konnte jedoch keine Akkumulation von CLIO im ZNS nachgewiesen werden. Dies lässt sich am ehesten darauf zurückführen, dass weder eine BHS-Störung für den passiven Einstrom besteht noch ein aktives Einwandern myeloider Zellen zu diesem Zeitpunkt stattfindet. Hiermit ist der diagnostische Nutzen der USPIO außerhalb der akuten Exazerbationen begrenzt. Die Eisenoxid-Nanopartikel sind als reiner Marker akuter Entzündung zu betrachten. Um auch schubfreie Phasen sowie die primär und sekundär progressiven Formen der MS abzudecken, besteht hier Bedarf eine Bildgebung zu entwickeln, die auch in diesen Phasen den Progress der Erkrankung und Therapieerfolge überwachen kann.

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung eines neuartigen Diagnostikums ist das Verständnis, ob und inwiefern Interaktionen mit bestehenden Körperfunktionen und der zu untersuchenden Erkrankung existieren. Insbesondere bei der Aufnahme eines Stoffes in Zellen des Immunsystems, wie bei den USPIO, ist eine Beeinflussung deren Funktion und damit der Immunantwort denkbar. Makrophagen und Mikroglia, die Zielzellen der USPIO, werden durch das sie umgebende Mikromilieu und die von ihnen aufgenommenen Stoffe beeinflusst. So zeigten Studien von de Oliveira Fulco (2014), dass die Anwesenheit und Phagozytose apoptotischer Zellen einen Einfluss auf den Phänotyp der Makrophagen hat. Ähnlich verhält es sich mit der Aufnahme von anderen Stoffen, wie dem LDL- und HDL-Cholesterin (Medbury, 2015) sowie weiterer Lipide (Lovaszi et al., 2017). Nimmt man diese Erkenntnisse zusammen, ergibt sich die Frage, ob auch die Aufnahme von USPIO den Phänotyp der Makrophagen verändert. Sollte dies eine M₁- oder M₂-Verschiebung zu Folge haben, könnte die Anwendung von USPIO über eine Veränderung der Makrophagenaktivität einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der MS/EAE haben. Eine Veränderung hin zum M₁-Typ könnte zu mehr Entzündung im ZNS und damit zu einer Aggravation der Erkrankung führen. Eine Verschiebung in Richtung der anti-inflammatorischen Makrophagen hingegen könnte die Entzündung bremsen und zu einer Resolution der Läsionen beitragen. Dies würde neben dem Einsatz als Diagnostikum auch eine therapeutische Anwendung der USPIO denkbar machen.

In der Literatur finden sich hierzu widersprüchliche Informationen. In diversen Studien wurde gezeigt, dass das Markieren von Zellen mit SPION in der Blutbahn keinen Einfluss auf Zellfunktionen wie Viabilität, Proliferationsrate, den Immunphänotyp, migratorischen Fähigkeiten sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen hat (Lewin et al., 2000; Oude Engberink et al., 2007; Zhang et al., 2009) Dem gegenüber stehen Studien, die zeigten, dass Eisenoxid-Nanopartikel bei Makrophagen im Tumormikromilieu einen pro-inflammatorischen Phänotyp induzieren. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) zeigen in der Regel einen anti-inflammatorischen Phänotyp und unterstützen das Tumorstadium durch Unterdrücken der körpereigenen Immunantwort. Arbeiten von Costa da Silva et al. (2017) zeigten, dass TAM nach der Aufnahme von CLIO ihren Phänotyp hin zu einem pro-inflammatorischen veränderten. Diese M₁-artigen TAM schütteten vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies aus und konnten so das

Tumorwachstum erfolgreich verringern. Im Einklang damit zeigten Studien von Zanganeh et al. (2016), dass die Anwendung von Ferumoxyl Makrophagen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu pro-inflammatorischen Makrophagen polarisierte und das Wachstum verschiedener Tumorentitäten deutlich verringerte. Sogar die Entstehung von Lebermetastasen konnte durch die *i.v.* Gabe von Ferumoxyl eingedämmt werden. Auch in Gebieten außerhalb der Tumorforschung konnte ein M₁-Shift der Makrophagen durch die Anwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln gezeigt werden. Dies führte in anderen Erkrankungen wie der Sichelzellanämie, Ulcus cruris und Rückenmarksverletzungen zu vermehrter Entzündung und ausgedehnteren Gewebeschäden (Kroner et al., 2014; Sindrilaru et al., 2011; Vinchi et al., 2016). Inwiefern sich diese Ergebnisse auf die MS/EAE übertragen lassen, bleibt zunächst unklar. Gegen eine klinische Relevanz einer eventuellen Beeinflussung der Makrophagenphänotypen durch CLIO spricht allerdings, dass sowohl bei den behandelten als auch naiven Versuchstieren kein Unterschied in dem klinischen Verlauf der EAE, gemessen am EAE-Score, gezeigt werden konnte. Jedoch wurden zu diesem Thema keine spezifischen Versuche durchgeführt, so dass hier weiterhin Forschungsbedarf besteht. Interessant wäre es hierbei, Augenmerk auf die Funktion der Makrophagen, histopathologische Merkmale der Entzündung und den klinischen Verlauf der Erkrankung zu legen.

Eine wichtige Funktion der Makrophagen und Mikroglia, die unter anderem vom Phänotyp der Makrophagen abhängt, ist die Phagozytose-Aktivität. In der Pathogenese der MS spielt diese Funktion eine entscheidende Rolle. Makrophagen und Mikroglia nehmen Myelin und seine Bestandteile aktiv auf und sind so maßgeblich an dem Prozess der Demyelinisierung beteiligt. Gleichzeitig tragen sie durch das Phagozytieren von apoptotischen Zellen und Myelinreste zur Resolution der Entzündung und Abheilen der Läsionen bei.

Frühere Studien zu dem Thema zeigten, dass sich M₂-artig polarisierte Makrophagen durch eine hohe Phagozytose-Aktivität auszeichnen, während M₁-polarisierte Makrophagen eine reduzierte Phagozytose zeigen (Kapellos et al., 2016; Sica and Mantovani, 2012). Demgegenüber steht eine Studie von Qie et al. (2016), in der M₁-Makrophagen eine vermehrte Phagozytose gegenüber Nanopartikeln aufwiesen.

Um die Thematik zu adressieren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Aufnahme von CLIO einen Einfluss auf die Phagozytose-Aktivität von Makrophagen hat und ob sich M₁- und M₂-artige Makrophagen darin unterscheiden. Es konnte kein Unterschied zwischen den mit CLIO behandelten Makrophagen gegenüber der naiven Kontrolle hinsichtlich der Phagozytose-Aktivität festgestellt werden. Auch M₁- und M₂-artige Makrophagen unterschieden sich nicht in Bezug auf die Phagozytose-Frequenz. Allerdings sind die Versuche nur bedingt aussagekräftig, da sie sich auf ein *in vitro* Setting beschränkten und dadurch von Ergebnissen *in vivo* abweichen können. Weiterhin wurde die Hypothese nur exemplarisch an einem Set Zellen getestet. Es ließen sich keine Rückschlüsse auf die statistische Signifikanz ziehen. Die Frage, ob die Aufnahme von USPIO einen Einfluss auf die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen hat, ist essenziell unter anderem für die Frage, ob die Nanopartikel für den klinischen Gebrauch in der Diagnostik von MS-Patienten zugelassen werden sollten. Aus diesem Grund besteht auf diesem Gebiet weiterhin Forschungsbedarf. Weiterhin wäre es interessant, zu untersuchen, ob die Aufnahme von USPIO-Einfluss auf weitere Funktionen der Makrophagen hat. Als möglicher Ansatz wären hier ein T-Zell Suppressionstest oder eine Analyse der Zytokinsekretion als funktionelle Tests denkbar.

Es existieren eine Reihe verschiedener Marker, die zur Darstellung und Unterscheidung der M₁- und M₂-artigen Makrophagen verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der Antigenkomplex Ly6C verwendet. Dieser wird nachweislich in hohen Mengen auf pro-inflammatorischen Monozyten exprimiert, während er auf anti-inflammatorischen Monozyten nur in geringerem Ausmaß vorhanden ist (Geissmann et al., 2003; Nahrendorf et al., 2007). Da Monozyten direkte Vorläuferzellen der Makrophagen sind, geht man davon aus, dass die Einteilung der M₁-/M₂-artigen Makrophagen anhand der Expression von Ly6C ebenfalls zulässig ist. Weitere in anderen Studien verwendete Marker sind unter anderem MHC II und CD206 (Martinez and Gordon, 2014; Stein et al., 1992) sowie die intrazellulären Marker iNOS und Arg (Stempin et al., 2010). Daneben wird eine Reihe weiterer Moleküle zur Charakterisierung der M₁-/M₂-Makrophagen diskutiert. Diese stehen teilweise in Wechselwirkung miteinander und sind nur in Zusammenschau mit weiteren Markern aussagekräftig (Chávez-Galán et al., 2015).

Für die Darstellung kommt erschwerend hinzu, dass unklar ist, wie stabil die verschiedenen Phänotypen der Makrophagen sind. *In vitro* können Makrophagen bei Veränderungen des sie umgebenden Milieus fließend zwischen den Phänotypen wechseln. Inwiefern dies auch während der Prozessierung von Gewebe und Zellen zur Analyse geschieht, ist unklar. Hier besteht Bedarf an weiteren Versuchen, die das Thema der Makrophagenphänotypisierung adressieren.

Der Einsatz von USPIO in der Entzündungsbildgebung erscheint vielversprechend. Nichtsdestotrotz bietet die praktische Umsetzung der neuen Methode einige Hindernisse. So steht dem zusätzlichen Informationsgewinn auf der einen Seite ein erhöhter Aufwand im klinischen Alltag gegenüber. Statt der üblichen einmaligen MRT-Untersuchung müssten sich Patienten bei einer Verwendung der Nanopartikel zwei getrennten Untersuchungen im Abstand von 24 bis 48 Stunden unterziehen. Dies bedeutet einen erheblichen Mehraufwand für Patienten und betreuendes medizinisches Personal. Neben dem zeitlichen und personellen Aufwand entstünden zusätzliche Kosten für Krankenhäuser und Krankenkassen. Solche logistischen und ökonomischen Faktoren sollten bei der Planung klinischer Studien berücksichtigt werden.

Bisher ist unter den USPIO nur Ferumoxytol in den USA für den klinischen Gebrauch und als off-label KM zugelassen. Seine Anwendbarkeit zur Entzündungsdarstellung im MS-Modell wurde in dieser wissenschaftlichen Arbeit erfolgreich getestet.

Wie in dem Artikel von Toth et al. (2017) diskutiert, wurde Ferumoxytol bereits erfolgreich in einer Vielzahl von klinischen Studien zur MRT-Bildgebung eingesetzt. Die Einsatzgebiete reichen von viszeralen Organen über vaskuläre Applikationen bis zu ZNS-Pathologien. Bisherige klinische Studien auf dem Gebiet der MS beschränkten sich allerdings auf kleinere Pilot- oder Machbarkeitsstudien (Bashir et al., 2015). Es wäre wünschenswert und vielversprechend den diagnostischen Mehrwert von USPIO in größeren klinischen Studien zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Entzündungsbildgebung mit USPIO eine aussichtsreiche Methode ist, um Einblicke in die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der MS zu gewinnen. Sie verspricht eine verbesserte Diagnostik und ein verbessertes Therapiemonitoring in der klinischen Praxis. Es bestehen jedoch weiterhin ungeklärte Fragen zum Thema Wechselwirkungen mit der körpereigenen Immunabwehr und Beeinflussung des Krankheitsgeschehens, die zukünftiger Forschung bedürfen. Vor einer praktischen Umsetzung der Methode wird

es nötig sein, klinische Studien in größerem Maßstab durchzuführen, um Sicherheit sowie diagnostische Sensitivität und Spezifität zu adressieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde der Nutzen von USPIO als KM in der MRT-Bildgebung für die Darstellung und Quantifizierung von Entzündungsaktivität in einem Maus-Modell der MS untersucht.

MS ist eine schwerwiegende autoimmune ZNS-Erkrankung, die mit Demyelinisierung und Neurodegeneration einhergeht. Ausgelöst durch eine fehlgeleitete, vermutlich T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber den Myelinscheiden der neuronalen Axone, kommt es zur Entzündung und Demyelinisierung der Neurone. Die weitverbreitete, bisher als Gold-Standard geltende Methode der GD-unterstützten MRT-Bildgebung beschränkt sich auf die Darstellung einer BHS-Störung als Indikator für MS Läsionen und weist hierdurch bedingt Einschränkungen hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität auf. Relevante Aspekte der Erkrankung wie Neuroinflammation und zelluläre Mediatoren werden nicht erfasst. SPION sind Nanopartikel mit superparamagnetischen Fähigkeiten, die als neuartiges KM für MRT-Untersuchungen verwendet werden. Sie reichern sich in Entzündungszellen an und eignen sich somit für die Zellverfolgung und zur Entzündungsbildgebung. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass CLIO, ein in experimentellen Studien etabliertes SPION, sich nachweisbar in entzündlichen MS-Läsionen anreichert. Durchflusszytometrie und histochemische Untersuchungen bestätigten, dass die Aufnahme von CLIO im Wesentlichen durch Zellen der angeborenen Immunität, also Makrophagen und Mikroglia, erfolgt. B- und T-Zellen phagozytieren CLIO nicht in relevantem Maße. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass myeloide Zellen CLIO direkt aus der Blutstrombahn aufnehmen, während Mikroglia freie CLIO phagozytieren, die im Rahmen einer BHS-Störung ins ZNS gelangen. Die Aufnahme geschieht in der akuten Phase der Erkrankung. In chronischen Läsionen ließ sich keine signifikante Akkumulation von CLIO mehr nachweisen. Die mit CLIO angereicherten MS Läsionen ließen sich mittels MRT-Untersuchung darstellen. Dabei korrelierte das gemessene MRT-Signal mit der klinischen Krankheitsaktivität der MS. In einem Vergleich mit dem etablierten GB-KM ließ sich eine Überlegenheit von CLIO hinsichtlich der Korrelation mit dem klinischen Krankheitsbild belegen. Um auch die klinische Anwendbarkeit der neuen Methode zu prüfen, führten wir einen Versuch mit dem bereits für die klinische Anwendung zugelassenem SPION, Ferumoxytol durch. Hier ließen sich die Ergebnisse reproduzieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine Methode der nicht invasiven Entzündungsbildgebung mit USPIO etabliert werden. Sie liefert wichtige Informationen hinsichtlich der Entzündungsaktivität und bietet die Möglichkeit der nicht invasiven Zellverfolgung. Ergänzend zur etablierten GB-KM basierten Bildgebung ist somit eine umfassendere Charakterisierung der MS möglich, welche Vorteile für die Diagnosestellung, Wahl der Therapie und das Therapiemonitoring mit sich bringt. Neben der MS gibt es weitere mögliche Anwendungsgebiete, wie die Entzündungsbildgebung im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen sowie die Entwicklung und Überwachung von Immuntherapien auf dem Gebiet der Onkologie.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M., and Rossi, F.M. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature neuroscience* 14, 1142-1149.

Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., and Lubbe, A.S. (2000). Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer research* 60, 6641-6648.

Aliprantis, A.O., Diez-Roux, G., Mulder, L.C.F., Zychlinsky, A., and Lang, R.A. (1996). Do macrophages kill through apoptosis? *Immunology Today* 17, 573-576.

Anderson, S.A., Shukaliak-Quandt, J., Jordan, E.K., Arbab, A.S., Martin, R., McFarland, H., and Frank, J.A. (2004). Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 55, 654-659.

Ascherio, A., and Munch, M. (2000). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 11, 220-224.

Aube, B., Levesque, S.A., Pare, A., Chamma, E., Kebir, H., Gorina, R., Lecuyer, M.A., Alvarez, J.I., De Koninck, Y., Engelhardt, B., *et al.* (2014). Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 193, 2438-2454.

Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* 347, 911-920.

Baeten, K., Adriaensens, P., Hendriks, J., Theunissen, E., Gelan, J., Hellings, N., and Stinissen, P. (2010). Tracking of myelin-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animals using small particles of iron oxide and MRI. *NMR in biomedicine* 23, 601-609.

Bakshi, R., Minagar, A., Jaisani, Z., and Wolinsky, J.S. (2005). Imaging of multiple sclerosis: role in neurotherapeutics. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2, 277-303.

Barr, T.A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R.A., Anderton, S.M., Bar-Or, A., *et al.* (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 1001-1010.

Bashir, M.R., Bhatti, L., Marin, D., and Nelson, R.C. (2015). Emerging applications for ferumoxytol as a contrast agent in MRI. *Journal of magnetic resonance imaging : JMIR* 41, 884-898.

Batoulis, H., Recks, M.S., Addicks, K., and Kuerten, S. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 119, 819-830.

Beduneau, A., Ma, Z., Grotepas, C.B., Kabanov, A., Rabinow, B.E., Gong, N., Mosley, R.L., Dou, H., Boska, M.D., and Gendelman, H.E. (2009). Facilitated Monocyte-

Macrophage Uptake and Tissue Distribution of Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles. *PloS one* 4, e4343.

Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., *et al.* (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics* 45, 1353-1360.

Benveniste, E.N. (1992). Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *The American journal of physiology* 263, C1-16.

Benveniste, E.N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Molecular Medicine* 75, 165-173.

Berger, T., Weerth, S., Kojima, K., Lington, C., Wekerle, H., and Lassmann, H. (1997). Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 76, 355-364.

Bermel, R.A., and Bakshi, R. (2006). The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 5, 158-170.

Bhasin, M., Wu, M., and Tsirka, S.E. (2007). Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC immunology* 8, 10.

Bitsch, A., Kuhlmann, T., Stadelmann, C., Lassmann, H., Lucchinetti, C., and Bruck, W. (2001). A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology* 49, 793-796.

Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., van Bloois, L., Koenders, E.B., van der Meer, J.W.M., Corstens, F.H.M., and Storm, G. (1997). Optimization of Technetium-99m-Labeled PEG Liposomes to Image Focal Infection: Effects of Particle Size and Circulation Time. *Journal of Nuclear Medicine* 38, 489-493.

Boven, L.A., Van Meurs, M., Van Zwam, M., Wierenga-Wolf, A., Hintzen, R.Q., Boot, R.G., Aerts, J.M., Amor, S., Nieuwenhuis, E.E., and Laman, J.D. (2006). Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 129, 517-526.

Boyle, E.A., and McGeer, P.L. (1990). Cellular immune response in multiple sclerosis plaques. *The American Journal of Pathology* 137, 575-584.

Bremerich, J., Bilecen, D., and Reimer, P. (2007). MR angiography with blood pool contrast agents. *European radiology* 17, 3017-3024.

Brex, P.A., Ciccarelli, O., O'Riordan, J.I., Sailer, M., Thompson, A.J., and Miller, D.H. (2002). A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 346, 158-164.

Brown, A., McFarlin, D.E., and Raine, C.S. (1982). Chronologic neuropathology of relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the mouse. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 46, 171-185.

Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., and Thompson, A.J. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83, 1022-1024.

Bruck, W., Bitsch, A., Kolenda, H., Bruck, Y., Stiefel, M., and Lassmann, H. (1997). Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Annals of neurology* 42, 783-793.

Brusaferri, F., and Candelise, L. (2000). Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Journal of neurology* 247, 435-442.

Cao, Y., Goods, B.A., Raddassi, K., Nepom, G.T., Kwok, W.W., Love, J.C., and Hafler, D.A. (2015). Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Science Translational Medicine* 7, 287ra274-287ra274.

Carlson, T., Kroenke, M., Rao, P., Lane, T.E., and Segal, B. (2008). The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 811-823.

Cepok, S., Jacobsen, M., Schock, S., Omer, B., Jaekel, S., Boddeker, I., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2001). Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 124, 2169-2176.

Chan, A., Seguin, R., Magnus, T., Papadimitriou, C., Toyka, K.V., Antel, J.P., and Gold, R. (2003). Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43, 231-242.

Chan, T., Pek, E.A., Huth, K., and Ashkar, A.A. (2011). CD4(+) T-cells are important in regulating macrophage polarization in C57BL/6 wild-type mice. *Cellular immunology* 266, 180-186.

Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Frontiers in Immunology* 6, 263.

Chen, J.W., Breckwoldt, M.O., Aikawa, E., Chiang, G., and Weissleder, R. (2008). Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain : a journal of neurology* 131, 1123-1133.

Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J., and Jallet, P. (1996). Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of microencapsulation* 13, 245-255.

Christen, T., Ni, W., Qiu, D., Schmiedeskamp, H., Bammer, R., Moseley, M., and Zaharchuk, G. (2013). High-resolution cerebral blood volume imaging in humans using

the blood pool contrast agent ferumoxytol. *Magnetic resonance in medicine* 70, 705-710.

Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 12, 560-567.

Cohen, R.I., Marmur, R., Norton, W.T., Mehler, M.F., and Kessler, J.A. (1996). Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and survival of developing rat brain oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 6433-6442.

Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012-2020.

Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* 372, 1502-1517.

Condliffe, A.M., Chilvers, E.R., Haslett, C., and Dransfield, I. (1996). Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology* 89, 105-111.

Condliffe, A.M., Kitchen, E., and Chilvers, E.R. (1998). Neutrophil Priming: Pathophysiological Consequences and Underlying Mechanisms. *Clinical Science* 94, 461-471.

Confavreux, C., O'Connor, P., Comi, G., Freedman, M.S., Miller, A.E., Olsson, T.P., Wolinsky, J.S., Bagulho, T., Delhay, J.L., Dukovic, D., *et al.* (2014). Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 13, 247-256.

Costa da Silva, M., Breckwoldt, M.O., Vinchi, F., Correia, M.P., Stojanovic, A., Thielmann, C.M., Meister, M., Muley, T., Warth, A., Platten, M., *et al.* (2017). Iron Induces Anti-tumor Activity in Tumor-Associated Macrophages. *Frontiers in Immunology* 8, 1479.

Cross, A.H., and Naismith, R.T. (2014). Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *Journal of internal medicine* 275, 350-363.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.

Curtis, A.D., Taslim, N., Reece, S.P., Grebenciucova, E., Ray, R.H., Rosenbaum, M.D., Wardle, R.L., Van Scott, M.R., and Mannie, M.D. (2014). The Extracellular Domain of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Elicits Atypical Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rat and Macaque Species. *PloS one* 9, e110048.

Dang, V.D., Hilgenberg, E., Ries, S., Shen, P., and Fillatreau, S. (2014). From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Current opinion in immunology* 28, 77-83.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8, 752-758.

de Oliveira Fulco, T. (2014). Effect of Apoptotic Cell Recognition on Macrophage Polarization and Mycobacterial Persistence. 82, 3968-3978.

Debruyne, J., Philippe, J., Dereuck, J., Willems, A., and Leroux-Roels, G. (1998). Relapse markers in multiple sclerosis: are in vitro cytokine production changes reflected by circulatory T-cell phenotype alterations? *Multiple sclerosis* 4, 193-197.

Dendrou, C.A., Fugger, L., and Friese, M.A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews Immunology* 15, 545-558.

Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S.A., Wang, Y., and Tidball, J.G. (2012). IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 189, 3669-3680.

Di Marco, M., Sadun, C., Port, M., Guilbert, I., Couvreur, P., and Dubernet, C. (2007). Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. *International Journal of Nanomedicine* 2, 609-622.

Dósa, E., Tuladhar, S., Muldoon, L.L., Hamilton, B.E., Rooney, W.D., and Neuwelt, E.A. (2011). Magnetic resonance imaging using ferumoxytol improves the visualization of central nervous system vascular malformations. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42, 1581-1588.

Dousset, V., Brochet, B., Deloire, M.S., Lagoarde, L., Barroso, B., Caille, J.M., and Petry, K.G. (2006). MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultra-small-particle iron oxide and compared with gadolinium. *AJNR American journal of neuroradiology* 27, 1000-1005.

Ebers, G.C., Bulman, D.E., Sadovnick, A.D., Paty, D.W., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J., Seland, T.P., Duquette, P., Grey, T., *et al.* (1986). A population-based study of multiple sclerosis in twins. *The New England journal of medicine* 315, 1638-1642.

Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., and Black, I.B. (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 2508-2521.

Esiri, M.M. (1977). Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet (London, England)* 2, 478.

Esiri, M.M. (1980). Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system. *Neuropathology and applied neurobiology* 6, 9-21.

Eyles, J.L., Roberts, A.W., Metcalf, D., and Wicks, I.P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2, 500.

Farrell, B.T., Hamilton, B.E., Dosa, E., Rimely, E., Nasser, M., Gahramanov, S., Lacy, C.A., Frenkel, E.P., Doolittle, N.D., Jacobs, P.M., *et al.* (2013). Using iron oxide nanoparticles to diagnose CNS inflammatory diseases and PCNSL. *Neurology* 81, 256-263.

Fernández-Arjona, M.d.M., Grondona, J.M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., and López-Ávalos, M.D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in cellular neuroscience* 11, 235.

Fife, B.T., Huffnagle, G.B., Kuziel, W.A., and Karpus, W.J. (2000). Cc Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 899-906.

Fittschen, C., Sandhaus, R.A., Worthen, G.S., and Henson, P.M. (1988). Bacterial Lipopolysaccharide Enhances Chemoattractant-Induced Elastase Secretion by Human Neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 43, 547-556.

Fox, E.J. (2006). Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: A review. *Clinical Therapeutics* 28, 461-474.

Furtado, G.C., Marcondes, M.C., Latkowski, J.A., Tsai, J., Wensky, A., and Lafaille, J.J. (2008). Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 181, 4648-4655.

Gandhi, S.N., Brown, M.A., Wong, J.G., Aguirre, D.A., and Sirlin, C.B. (2006). MR contrast agents for liver imaging: what, when, how. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 26, 1621-1636.

Garg, N., and Smith, T.W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and behavior* 5, e00362.

Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., and Presky, D.H. (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual review of immunology* 16, 495-521.

Gaur, U., Sahoo, S.K., De, T.K., Ghosh, P.C., Maitra, A., and Ghosh, P.K. (2000). Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *International Journal of Pharmaceutics* 202, 1-10.

Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., *et al.* (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology* 13, 1118-1128.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19, 71-82.

Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L., and Raine, C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature medicine* 5, 170-175.

Gidday, J.M., Gasche, Y.G., Copin, J.C., Shah, A.R., Perez, R.S., Shapiro, S.D., Chan, P.H., and Park, T.S. (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 289, H558-568.

Gold, R., Linington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain : a journal of neurology* 129, 1953-1971.

Gold, R., Linker, R.A., and Stangel, M. (2012). Fumaric acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis with antioxidative mechanism of action. *Clinical immunology* 142, 44-48.

Griot, C., Vandeveld, M., Richard, A., and Peterhans, E. (1990). Selective Degeneration of Oligodendrocytes Mediated by Reactive Oxygen Species. *Free Radical Research Communications* 11, 181-193.

Haensch, C.A., and Jorg, J. (2006). Autonomic dysfunction in multiple sclerosis. *Journal of neurology* 253 *Suppl* 1, I3-9.

Harkiolaki, M., Holmes, S.L., Svendsen, P., Gregersen, J.W., Jensen, L.T., McMahon, R., Friese, M.A., van Boxel, G., Etzensperger, R., Tzartos, J.S., *et al.* (2009). T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348-357.

Hasan, D.M., Amans, M., Tihan, T., Hess, C., Guo, Y., Cha, S., Su, H., Martin, A.J., Lawton, M.T., Neuwelt, E.A., *et al.* (2012). Ferumoxytol-Enhanced MRI to Image Inflammation Within Human Brain Arteriovenous Malformations: a Pilot Investigation. *Translational Stroke Research* 3, 166-173.

Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., *et al.* (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 358, 676-688.

Havsteen, I., Ohlhues, A., Madsen, K.H., Nybing, J.D., Christensen, H., and Christensen, A. (2017). Are Movement Artifacts in Magnetic Resonance Imaging a Real Problem?—A Narrative Review. *Frontiers in neurology* 8, 232.

Hayes, C.E. (2007). Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proceedings of the Nutrition Society* 59, 531-535.

Hellings, N., Baree, M., Verhoeven, C., D'Hooghe M, B., Medaer, R., Bernard, C.C., Raus, J., and Stinissen, P. (2001). T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of neuroscience research* 63, 290-302.

- Hemmer, B., Kerschensteiner, M., and Korn, T. (2015). Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 14, 406-419.
- Hendriks, J.J.A., Teunissen, C.E., de Vries, H.E., and Dijkstra, C.D. (2005). Macrophages and neurodegeneration. *Brain Research Reviews* 48, 185-195.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews Immunology* 14, 463-477.
- Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., Waisman, A., Rulicke, T., Prinz, M., Priller, J., *et al.* (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature medicine* 11, 146-152.
- Herborn, C.U., Vogt, F.M., Lauenstein, T.C., Dirsch, O., Corot, C., Robert, P., and Ruehm, S.G. (2006). Magnetic resonance imaging of experimental atherosclerotic plaque: comparison of two ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 24, 388-393.
- Hernan, M.A., Jick, S.S., Logroscino, G., Olek, M.J., Ascherio, A., and Jick, H. (2005). Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 128, 1461-1465.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., and Wynn, T.A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 167, 6533-6544.
- Hesselink, J.R., and Press, G.A. (1988). MR contrast enhancement of intracranial lesions with Gd-DTPA. *Radiologic clinics of North America* 26, 873-887.
- Hickey, W.F., and Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science (New York, NY)* 239, 290-292.
- Hofstetter, H.H., Shive, C.L., and Forsthuber, T.G. (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 169, 117-125.
- Hu, X., Park-Min, K.H., Ho, H.H., and Ivashkiv, L.B. (2005). IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175, 3637-3647.
- Huang, D.R., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B.J., and Ransohoff, R.M. (2001). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 713-726.

Huitinga, I., van Rooijen, N., de Groot, C.J., Uitdehaag, B.M., and Dijkstra, C.D. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 172, 1025-1033.

Huizinga, R., van der Star, B.J., Kipp, M., Jong, R., Gerritsen, W., Clarner, T., Puentes, F., Dijkstra, C.D., van der Valk, P., and Amor, S. (2012). Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis. *Glia* 60, 422-431.

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., and Schlager, J.J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 19, 975-983.

Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., *et al.* (1996). Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Annals of neurology* 39, 285-294.

James, M.L., Hoehne, A., Mayer, A.T., Lechtenberg, K., Moreno, M., Gowrishankar, G., Ilovich, O., Natarajan, A., Johnson, E.M., Nguyen, J., *et al.* (2017). Imaging B Cells in a Mouse Model of Multiple Sclerosis Using (64)Cu-Rituximab PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58, 1845-1851.

Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., and Schiffer, R.B. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45, 1268-1276.

Kalinowska-Lyszczarz, A., and Losy, J. (2012). The role of neurotrophins in multiple sclerosis-pathological and clinical implications. *International journal of molecular sciences* 13, 13713-13725.

Kapellos, T.S., Taylor, L., Lee, H., Cowley, S.A., James, W.S., Iqbal, A.J., and Greaves, D.R. (2016). A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochemical Pharmacology* 116, 107-119.

Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C.H., Haas, T., Korn, A.A., Karlsson, G., and Radue, E.W. (2006). Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 355, 1124-1140.

Kappos, L., Bates, D., Edan, G., Eraksoy, M., Garcia-Merino, A., Grigoriadis, N., Hartung, H.P., Havrdova, E., Hillert, J., Hohlfeld, R., *et al.* (2011). Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *The Lancet Neurology* 10, 745-758.

Kappos, L., Moeri, D., Radue, E.W., Schoetzau, A., Schweikert, K., Barkhof, F., Miller, D., Gutmman, C.R., Weiner, H.L., Gasperini, C., *et al.* (1999). Predictive value of gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging for relapse rate and changes in disability or impairment in multiple sclerosis: a meta-analysis. Gadolinium MRI Meta-analysis Group. *Lancet (London, England)* 353, 964-969.

- Kassner, A., Roberts, T.P., Moran, B., Silver, F.L., and Mikulis, D.J. (2009). Recombinant tissue plasminogen activator increases blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke: an MR imaging permeability study. *AJNR American journal of neuroradiology* 30, 1864-1869.
- Katz-Levy, Y., Neville, K.L., Girvin, A.M., Vanderlugt, C.L., Pope, J.G., Tan, L.J., and Miller, S.D. (1999). Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *The Journal of clinical investigation* 104, 599-610.
- Katz Sand, I.B., and Lublin, F.D. (2013). Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Continuum (Minneapolis, Minn)* 19, 922-943.
- Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2008). Production and functions of IL-17 in microglia. *Journal of neuroimmunology* 194, 54-61.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine* 13, 1173-1175.
- Kiefer, R., Kieseier, B.C., Stoll, G., and Hartung, H.-P. (2001). The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 64, 109-127.
- Kim, J.S., Yoon, T.J., Yu, K.N., Kim, B.G., Park, S.J., Kim, H.W., Lee, K.H., Park, S.B., Lee, J.K., and Cho, M.H. (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 89, 338-347.
- Kivisakk, P., Imitola, J., Rasmussen, S., Elyaman, W., Zhu, B., Ransohoff, R.M., and Houry, S.J. (2009). Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology* 65, 457-469.
- Koh, D.M., Brown, G., Temple, L., Raja, A., Toomey, P., Bett, N., Norman, A.R., and Husband, J.E. (2004). Rectal cancer: mesorectal lymph nodes at MR imaging with USPIO versus histopathologic findings--initial observations. *Radiology* 231, 91-99.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 177, 566-573.
- Korchinski, D.J., Taha, M., Yang, R., Nathoo, N., and Dunn, J.F. (2015). Iron Oxide as an MRI Contrast Agent for Cell Tracking. *Magnetic Resonance Insights* 8, 15-29.
- Kotter, M.R., Zhao, C., van Rooijen, N., and Franklin, R.J. (2005). Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. *Neurobiology of disease* 18, 166-175.

Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19, 312-318.

Kroner, A., Greenhalgh, A.D., Zarruk, J.G., Passos Dos Santos, R., Gaestel, M., and David, S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron* 83, 1098-1116.

Kurt-Jones, E.A., Mandell, L., Whitney, C., Padgett, A., Gosselin, K., Newburger, P.E., and Finberg, R.W. (2002). Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100, 1860-1868.

Kurtzke, J.F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452.

Kurtzke, J.F. (2013). Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain : a journal of neurology* 136, 2904-2917.

Lampert, P. (1967). Electron microscopic studies on ordinary and hyperacute experimental allergic encephalomyelitis. *Acta neuropathologica* 9, 99-126.

Lampert, P.W. (1978). Autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. A review. *Am J Pathol* 91, 176-208.

Lawaczeck, R., Menzel, M., and Pietsch, H. (2004). Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Applied Organometallic Chemistry* 18, 506-513.

Lebar, R., and Vincent, C. (1984). Participation of encephalitogen in incomplete Freund's adjuvant in the induction of experimental allergic encephalomyelitis in Hartley guinea pigs. *Journal of neuroimmunology* 6, 187-196.

Leimgruber, A., Berger, C., Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A.P., Waterman, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Elpek, N., Mempel, T.R., *et al.* (2009). Behavior of Endogenous Tumor-Associated Macrophages Assessed In Vivo Using a Functionalized Nanoparticle. *Neoplasia (New York, NY)* 11, 459-468.

Levin, L.I., Munger, K.L., O'Reilly, E.J., Falk, K.I., and Ascherio, A. (2010). Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 67, 824-830.

Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C.H., Tang, X.W., Cory, D., Scadden, D.T., and Weissleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature biotechnology* 18, 410-414.

Linker, R.A., Lee, D.H., Demir, S., Wiese, S., Kruse, N., Siglienti, I., Gerhardt, E., Neumann, H., Sendtner, M., Luhder, F., *et al.* (2010). Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 133, 2248-2263.

Lisi, L., Ciotti, G.M.P., Braun, D., Kalinin, S., Currò, D., Dello Russo, C., Coli, A., Mangiola, A., Anile, C., Feinstein, D.L., *et al.* (2017). Expression of iNOS, CD163 and

ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neuroscience letters* 645, 106-112.

Lj Mandarano, G., Lodhia, J., Eu, P., Ferris, N., Davidson, R., and Cowell, S.F. (2010). Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 2): The application of iron oxide contrast agents in MRI, Vol 6.

Lloyds, D., Brindle, N.P., and Hallett, M.B. (1995). Priming of human neutrophils by tumour necrosis factor-alpha and substance P is associated with tyrosine phosphorylation. *Immunology* 84, 220-226.

Loubeyre, P., Zhao, S., Canet, E., Abidi, H., Benderbous, S., and Revel, D. (1997). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (AMI 227) as a blood pool contrast agent for MR angiography: experimental study in rabbits. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 7, 958-962.

Lovaszi, M., Mattii, M., Eyerich, K., Gacsi, A., Csanyi, E., Kovacs, D., Ruhl, R., Szegedi, A., Kemeny, L., Stahle, M., *et al.* (2017). Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. *The British journal of dermatology* 177, 1671-1682.

Lu, M., Cohen, M.H., Rieves, D., and Pazdur, R. (2010). FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease. *American journal of hematology* 85, 315-319.

Lubbe, A.S., Bergemann, C., Riess, H., Schriever, F., Reichardt, P., Possinger, K., Matthias, M., Dorken, B., Herrmann, F., Gurtler, R., *et al.* (1996). Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer research* 56, 4686-4693.

Luo, C., Jian, C., Liao, Y., Huang, Q., Wu, Y., Liu, X., Zou, D., and Wu, Y. (2017). The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 13, 1661-1667.

Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology* 130, 1089-1104.

Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., and Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews* 63, 24-46.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23, 549-555.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* 6, 13.

- McColl, S.R., Staykova, M.A., Wozniak, A., Fordham, S., Bruce, J., and Willenborg, D.O. (1998). Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 161, 6421-6426.
- McLeod, J.G., Hammond, S.R., and Kurtzke, J.F. (2011). Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: a reassessment. I. Risk of MS by age at immigration. *Journal of neurology* 258, 1140-1149.
- McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 75-85.
- Medbury, H.J. (2015). The Bidirectional Relationship between Cholesterol and Macrophage Polarization. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 06.
- Menge, T., Stuve, O., Kieseier, B.C., and Hartung, H.P. (2014). Alemtuzumab: the advantages and challenges of a novel therapy in MS. *Neurology* 83, 87-97.
- Miller, D.H., Grossman, R.I., Reingold, S.C., and McFarland, H.F. (1998). The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 121 (Pt 1), 3-24.
- Miller, D.M., Weinstock-Guttman, B., Bethoux, F., Lee, J.C., Beck, G., Block, V., Durelli, L., LaMantia, L., Barnes, D., Sellebjerg, F., *et al.* (2000). A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Multiple sclerosis* 6, 267-273.
- Miller, S.D., Karpus, W.J., and Davidson, T.S. (2007). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Current protocols in immunology Chapter, Unit-15.11.*
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., and Kim, B.S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. 3, 1133.
- Milo, R., and Miller, A. (2014). Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews* 13, 518-524.
- Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M.S., Patarroyo, J.C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A.J., Hidalgo, J., *et al.* (2013). MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 2921-2937.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 8, 958-969.
- Munger, K.L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., Hernan, M.A., Olek, M.J., Willett, W.C., and Ascherio, A. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62, 60-65.

Munz, C., Lunemann, J.D., Getts, M.T., and Miller, S.D. (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature reviews Immunology* 9, 246-258.

Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A., and Mills, K.H. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, behavior, and immunity* 24, 641-651.

Naegele, M., Tillack, K., Reinhardt, S., Schippling, S., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *Journal of neuroimmunology* 242, 60-71.

Nahrendorf, M., Jaffer, F.A., Kelly, K.A., Sosnovik, D.E., Aikawa, E., Libby, P., and Weissleder, R. (2006). Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* 114, 1504-1511.

Nahrendorf, M., Keliher, E., Marinelli, B., Leuschner, F., Robbins, C.S., Gerszten, R.E., Pittet, M.J., Swirski, F.K., and Weissleder, R. (2011). Detection of macrophages in aortic aneurysms by nanoparticle positron emission tomography-computed tomography. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 750-757.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 3037-3047.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology* 6, 173-182.

Nauseef, W.M., and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature immunology* 15, 602.

Neumann, H., Kotter, M.R., and Franklin, R.J. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain : a journal of neurology* 132, 288-295.

Neuwelt, E.A., Hamilton, B.E., Varallyay, C.G., Rooney, W.R., Edelman, R.D., Jacobs, P.M., and Watnick, S.G. (2009). Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney international* 75, 465-474.

Neuwelt, E.A., Varallyay, C.G., Manninger, S., Solymosi, D., Haluska, M., Hunt, M.A., Nesbit, G., Stevens, A., Jerosch-Herold, M., Jacobs, P.M., *et al.* (2007). The potential of ferumoxytol nanoparticle magnetic resonance imaging, perfusion, and angiography in central nervous system malignancy: a pilot study. *Neurosurgery* 60, 601-611; discussion 611-602.

Nikić, I., Merkler, D., Sorbara, C., Brinkoetter, M., Kreutzfeldt, M., Bareyre, F.M., Brück, W., Bishop, D., Misgeld, T., and Kerschensteiner, M. (2011). A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 17, 495-499.

- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, NY)* 308, 1314-1318.
- Nolte-Ernsting, C., Adam, G., Bucker, A., Berges, S., Bjornerud, A., and Gunther, R.W. (1998). Abdominal MR angiography performed using blood pool contrast agents: comparison of a new superparamagnetic iron oxide nanoparticle and a linear gadolinium polymer. *AJR American journal of roentgenology* 171, 107-113.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2000). Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 343, 938-952.
- Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 122, 1180-1188.
- O'Riordan, J.I., Thompson, A.J., Kingsley, D.P., MacManus, D.G., Kendall, B.E., Rudge, P., McDonald, W.I., and Miller, D.H. (1998). The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. *Brain : a journal of neurology* 121 (Pt 3), 495-503.
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kumpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature medicine* 14, 688-693.
- Onishi, R.M., and Gaffen, S.L. (2010). Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129, 311-321.
- Oude Engberink, R.D., van der Pol, S.M., Dopp, E.A., de Vries, H.E., and Blezer, E.L. (2007). Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labeling of human monocytes: MR detection and cell function. *Radiology* 243, 467-474.
- Piani, D., Frei, K., Do, K.Q., Cuenod, M., and Fontana, A. (1991). Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neuroscience letters* 133, 159-162.
- Polman, C.H., Dijkstra, C.D., Sminia, T., and Koetsier, J.C. (1986). Immunohistological analysis of macrophages in the central nervous system of Lewis rats with acute experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 11, 215-222.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., *et al.* (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology* 69, 292-302.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D., and Dittel, B.N. (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 39-48.
- Prince, M.R., Zhang, H.L., Chabra, S.G., Jacobs, P., and Wang, Y. (2003). A pilot investigation of new superparamagnetic iron oxide (ferumoxytol) as a contrast agent for cardiovascular MRI. *Journal of X-ray science and technology* 11, 231-240.

- Qie, Y., Yuan, H., von Roemeling, C.A., Chen, Y., Liu, X., Shih, K.D., Knight, J.A., Tun, H.W., Wharen, R.E., Jiang, W., *et al.* (2016). Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Scientific Reports* 6, 26269.
- Ransohoff, R.M., and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 12, 623-635.
- Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 3, 569-581.
- Rao, P., and Segal, B.M. (2004). Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods in molecular medicine* 102, 363-375.
- Rezaie, P., and Male, D. (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microscopy research and technique* 45, 359-382.
- Riise, T., Nortvedt, M.W., and Ascherio, A. (2003). Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 61, 1122-1124.
- Robinson, A.P., Harp, C.T., Noronha, A., and Miller, S.D. (2014). The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handbook of clinical neurology* 122, 173-189.
- Romanelli, E., Merkler, D., Mezydlo, A., Weil, M.-T., Weber, M.S., Nikić, I., Potz, S., Meinl, E., Matznick, F.E.H., Kreutzfeldt, M., *et al.* (2016). Myelinosome formation represents an early stage of oligodendrocyte damage in multiple sclerosis and its animal model. *Nature Communications* 7, 13275.
- Rosen, H., and Gordon, S. (1990). The role of the type 3 complement receptor in the induced recruitment of myelomonocytic cells to inflammatory sites in the mouse. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 3, 3-10.
- Roy, M., Richard, J.-F., Dumas, A., and Vallières, L. (2012). CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation* 9, 18.
- Ryan, M., McCarthy, L., Rappuoli, R., Mahon, B.P., and Mills, K.H. (1998). Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *International immunology* 10, 651-662.
- Sadovnick, A.D. (2012). Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews* 11, 163-166.
- Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Hader, W., Murray, T.J., *et al.* (1993). A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of neurology* 33, 281-285.
- Saleh, A., Schroeter, M., Jonkmanns, C., Hartung, H.P., Modder, U., and Jander, S. (2004). In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain : a journal of neurology* 127, 1670-1677.

- Saxena, A., Kessinger, C.W., Thompson, B., McCarthy, J.R., Iwamoto, Y., Lin, C.P., and Jaffer, F.A. (2013). High-resolution Optical Mapping of Inflammatory Macrophages Following Endovascular Arterial Injury. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 15, 282-289.
- Schmidt, H., Williamson, D., and Ashley-Koch, A. (2007). HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *American journal of epidemiology* 165, 1097-1109.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., *et al.* (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* 336, 86-90.
- Schwartz, M., Butovsky, O., Brück, W., and Hanisch, U.-K. (2006). Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends in neurosciences* 29, 68-74.
- Schweinburg, K.a. (1925). Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Ther* 42, 217-283.
- Sedgwick, J.D., Schwender, S., Gregersen, R., Dorries, R., and ter Meulen, V. (1993). Resident macrophages (ramified microglia) of the adult brown Norway rat central nervous system are constitutively major histocompatibility complex class II positive. *The Journal of Experimental Medicine* 177, 1145-1152.
- Selchen, D., Bhan, V., Blevins, G., Devonshire, V., Duquette, P., Grand'Maison, F., Kremenutzky, M., Lapierre, Y., Li, D., von Riedemann, S.J., *et al.* (2012). MS, MRI, and the 2010 McDonald criteria: a Canadian expert commentary. *Neurology* 79, S1-15.
- Selmaj, K.W., and Raine, C.S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Annals of neurology* 23, 339-346.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Capello, E., Mancardi, G.L., and Aloisi, F. (2006). Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65, 124-141.
- Shams, P.N., and Plant, G.T. (2009). Optic neuritis: a review. *International MS journal* 16, 82-89.
- Sharma, R., Fischer, M.T., Bauer, J., Felts, P.A., Smith, K.J., Misu, T., Fujihara, K., Bradl, M., and Lassmann, H. (2010). Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta neuropathologica* 120, 223-236.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 122, 787-795.
- Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., *et al.* (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 985-997.

Singh, A., Haris, M., Rathore, D., Purwar, A., Sarma, M., Bayu, G., Husain, N., Rathore, R.K., and Gupta, R.K. (2007). Quantification of physiological and hemodynamic indices using T(1) dynamic contrast-enhanced MRI in intracranial mass lesions. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 26, 871-880.

Smith, K.J., and Lassmann, H. (2002). The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 1, 232-241.

Sosnovik, D.E., Garanger, E., Aikawa, E., Nahrendorf, M., Figueredo, J.-L., Dai, G., Reynolds, F., Rosenzweig, A., Weissleder, R., and Josephson, L. (2009). Molecular MRI of Cardiomyocyte Apoptosis with Simultaneous Delayed Enhancement MRI Distinguishes Apoptotic and Necrotic Myocytes In Vivo: Potential for Midmyocardial Salvage in Acute Ischemia. *Circulation Cardiovascular imaging* 2, 460-467.

Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 23, 683-747.

Stabi, K.L., and Bendz, L.M. (2011). Ferumoxytol use as an intravenous contrast agent for magnetic resonance angiography. *The Annals of pharmacotherapy* 45, 1571-1575.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine* 176, 287-292.

Steinbach, K., Piedavent, M., Bauer, S., Neumann, J.T., and Friese, M.A. (2013). Neutrophils Amplify Autoimmune Central Nervous System Infiltrates by Maturing Local APCs. *The Journal of Immunology* 191, 4531-4539.

Steinman, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature immunology* 2, 762.

Steinman, L. (2014). Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annual review of immunology* 32, 257-281.

Steinman, M.D.L. (1996). Multiple Sclerosis: A Coordinated Immunological Attack against Myelin in the Central Nervous System. *Cell* 85, 299-302.

Stempin, C.C., Dulgerian, L.R., Garrido, V.V., and Cerban, F.M. (2010). Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 683485.

Stence, N., Waite, M., and Dailey, M.E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33, 256-266.

Stirrat, C.G., Alam, S.R., MacGillivray, T.J., Gray, C.D., Dweck, M.R., Raftis, J., Jenkins, W.S., Wallace, W.A., Pessotto, R., Lim, K.H., *et al.* (2017). Ferumoxytol-enhanced magnetic resonance imaging assessing inflammation after myocardial infarction. *Heart*.

Stoll, G., and Bendszus, M. (2010). New approaches to neuroimaging of central nervous system inflammation. *Current opinion in neurology* 23, 282-286.

Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175, 342-349.

Swain, S.D., Rohn, T.T., and Quinn, M.T. (2002). Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxidants & redox signaling* 4, 69-83.

Swanton, J., Fernando, K., and Miller, D. (2014). Early prognosis of multiple sclerosis. *Handbook of clinical neurology* 122, 371-391.

Tani, K., Murphy, W.J., Chertov, O., Oppenheim, J.J., and Wang, J.M. (2001). The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific IG production in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 971-976.

Tassa, C., Shaw, S.Y., and Weissleder, R. (2011). Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy. *Accounts of chemical research* 44, 842-852.

Tompkins, S.M., Padilla, J., Dal Canto, M.C., Ting, J.P., Van Kaer, L., and Miller, S.D. (2002). De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 168, 4173-4183.

Toth, G.B., Varallyay, C.G., Horvath, A., Bashir, M.R., Choyke, P.L., Daldrup-Link, H.E., Dosa, E., Finn, J.P., Gahramanov, S., Harisinghani, M., *et al.* (2017). Current and potential imaging applications of ferumoxytol for magnetic resonance imaging. *Kidney International* 92, 47-66.

Tourdias, T., Roggerone, S., Filippi, M., Kanagaki, M., Rovaris, M., Miller, D.H., Petry, K.G., Brochet, B., Pruvo, J.P., Radue, E.W., *et al.* (2012). Assessment of disease activity in multiple sclerosis phenotypes with combined gadolinium- and superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. *Radiology* 264, 225-233.

Tran, E.H., Hoekstra, K., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., and Owens, T. (1998). Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 161, 3767-3775.

Triarhou, L.C., and Herndon, R.M. (1985). Effect of macrophage inactivation on the neuropathology of lysolecithin-induced demyelination. *British journal of experimental pathology* 66, 293-301.

Trojano, M., Lucchese, G., Graziano, G., Taylor, B.V., Simpson, S., Jr., Lepore, V., Grand'maison, F., Duquette, P., Izquierdo, G., Grammond, P., *et al.* (2012). Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PloS one* 7, e48078.

Truyen, L., van Waesberghe, J.H., van Walderveen, M.A., van Oosten, B.W., Polman, C.H., Hommes, O.R., Ader, H.J., and Barkhof, F. (1996). Accumulation of hypointense

lesions ("black holes") on T1 spin-echo MRI correlates with disease progression in multiple sclerosis. *Neurology* 47, 1469-1476.

Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* 117, 902-909.

Tuohy, V.K., Sobel, R.A., and Lees, M.B. (1988). Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 140, 1868-1873.

Ulvestad, E., Williams, K., Bjerkvig, R., Tiekotter, K., Antel, J., and Matre, R. (1994). Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology* 56, 732-740.

van der Laan, L.J., Ruuls, S.R., Weber, K.S., Lodder, I.J., Dopp, E.A., and Dijkstra, C.D. (1996). Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *Journal of neuroimmunology* 70, 145-152.

van der Mei, I.A., Ponsonby, A.L., Blizzard, L., and Dwyer, T. (2001). Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology* 20, 168-174.

van der Valk, P., and Amor, S. (2009). Preactive lesions in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 22, 207-213.

van Horssen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J.L., Peferoen, L., Gerritsen, W., Kooi, E.J., Witte, M.E., Geurts, J.J., *et al.* (2012). Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of neuroinflammation* 9, 156.

Varallyay, P., Nesbit, G., Muldoon, L.L., Nixon, R.R., Delashaw, J., Cohen, J.I., Petrillo, A., Rink, D., and Neuwelt, E.A. (2002). Comparison of Two Superparamagnetic Viral-Sized Iron Oxide Particles Ferumoxides and Ferumoxtran-10 with a Gadolinium Chelate in Imaging Intracranial Tumors. *American Journal of Neuroradiology* 23, 510.

Vinchi, F., Costa da Silva, M., Ingoglia, G., Petrillo, S., Brinkman, N., Zuercher, A., Cerwenka, A., Tolosano, E., and Muckenthaler, M.U. (2016). Hemopexin therapy reverts heme-induced proinflammatory phenotypic switching of macrophages in a mouse model of sickle cell disease. *Blood* 127, 473-486.

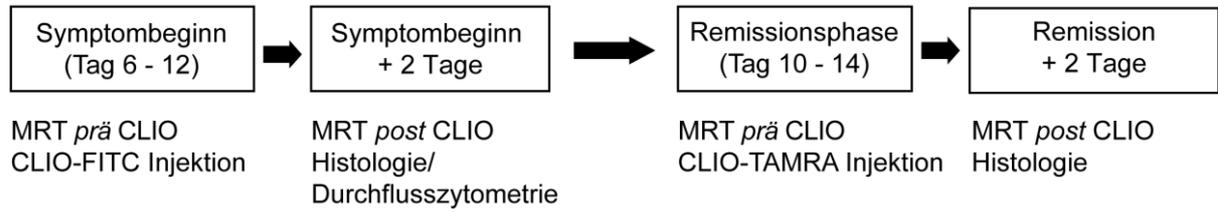
Wahajuddin, and Arora, S. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine* 7, 3445-3471.

Walker, D.G., and Lue, L.F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's research & therapy* 7, 56.

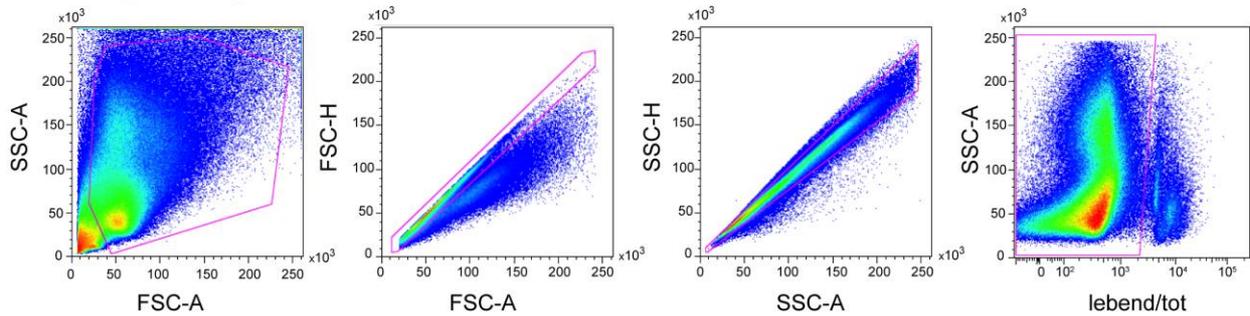
- Weiner, H.L., and Cohen, J.A. (2002). Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Multiple Sclerosis Journal* 8, 142-154.
- Weiss, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine* 320, 365-376.
- Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C.A., Bengele, H.H., and Josephson, L. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 175, 489-493.
- Wekerle, H. (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 50, 57-60.
- Wunderbaldinger, P., Josephson, L., and Weissleder, R. (2002). Crosslinked iron oxides (CLIO): a new platform for the development of targeted MR contrast agents. *Academic radiology* 9 Suppl 2, S304-306.
- Yerram, P., Saab, G., Karuparthi, P.R., Hayden, M.R., and Khanna, R. (2007). Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Mysterious Disease in Patients with Renal Failure—Role of Gadolinium-Based Contrast Media in Causation and the Beneficial Effect of Intravenous Sodium Thiosulfate. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2, 258-263.
- Ying, W., Cheruku, P.S., Bazer, F.W., Safe, S.H., and Zhou, B. (2013). Investigation of Macrophage Polarization Using Bone Marrow Derived Macrophages. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 50323.
- Yong, V.W., Chabot, S., Stuve, O., and Williams, G. (1998). Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 51, 682-689.
- Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D., and Jain, R.K. (1994). Microvascular Permeability and Interstitial Penetration of Sterically Stabilized (Stealth) Liposomes in a Human Tumor Xenograft. *Cancer research* 54, 3352-3356.
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J.S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., *et al.* (2016). Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology* 11, 986.
- Zhang, H., Podojil, J.R., Luo, X., and Miller, S.D. (2008). Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181, 4638-4647.
- Zhang, Z., Dharmakumar, R., Mascheri, N., Fan, Z., Wu, S., and Li, D. (2009). Comparison of Superparamagnetic and Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Cell Labeling for Tracking Green Fluorescent Protein Gene Marker with Negative and Positive Contrast Magnetic Resonance Imaging. *Molecular imaging* 8, 148-155.
- Zivadinov, R., and Bakshi, R. (2004). Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging* 14, 27s-35s.

7 TABELLARISCHER ANHANG (FALLS ERFORDERLICH)

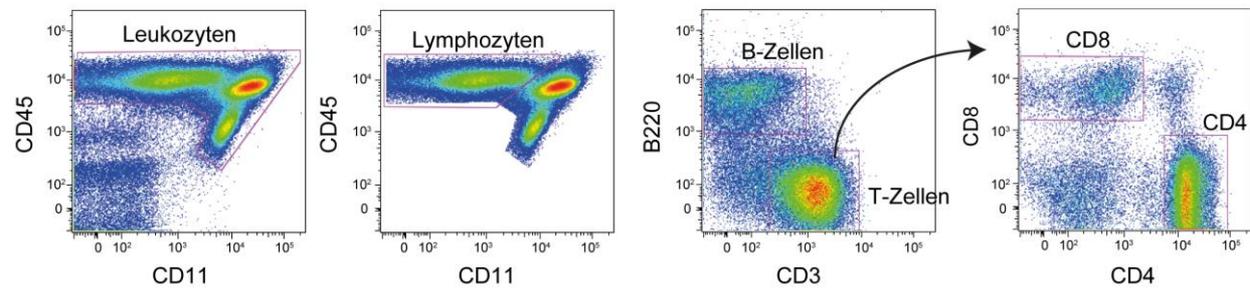
a Ablauf



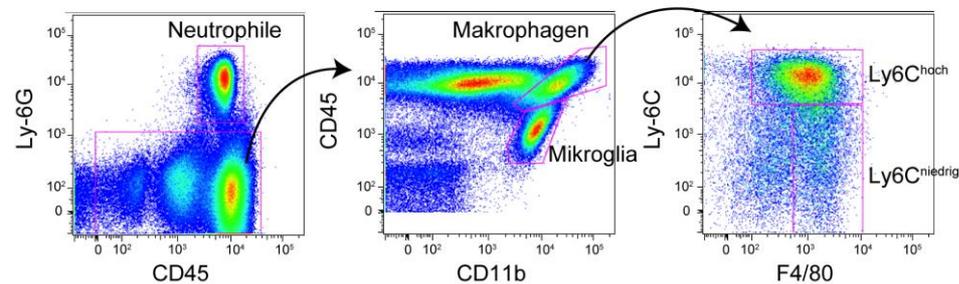
a Gating-Strategie



b Lymphozyten



c Myeloide Zellen



8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Klara Kirschbaum
Geburtsdatum: 11.12.1992
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Vater: Gerhard Kirschbaum (geb. 26.12.1965)
Mutter: Anja Bilow (geb. 08.12.1965)

SCHULISCHER WERDEGANG

1998 – 2002 Textorschule (Grundschule), Frankfurt a. M.
2002 – 2007 Schillerschule (Gymnasium), Frankfurt a. M.
2007 – 2010 Internatsschule Schloss Hansenberg (Oberstufenschule),
Geisenheim, Allgemeine Hochschulreife, Note 1,5

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10/2010 – 05/2017 Studium der Humanmedizin,
Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
10/2013 – 06/2014 Austausch im Rahmen des Erasmus Stipendiums,
Universidad Autónoma de Barcelona
3. Staatsexamen 05/2017, Note 1,0
2. Staatsexamen 04/2016, Note 2,0
1. Staatsexamen 09/2012, Note 2,0

PUBLIKATIONEN

1. **Kirschbaum K**, Sonner JK, Zeller MW, Deumelandt K, Bode J, Sharma R, Krüwel T, Fischer M, Hoffmann A, Costa da Silva M, Muckenthaler MU, Wick W, Tews B, Chen JW, Heiland S, Bendszus M, Platten M, Breckwoldt MO. In vivo nanoparticle imaging of innate immune cells can serve as a marker of disease severity in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, 113(46):13227-13232. IF 10,16
2. Breckwoldt MO, Bode J, Kurz FT, Hoffmann A, Ochs K, Ott M, Deumelandt K, Krüwel T, Schwarz D, Fischer M, Helluy X, Milford D, **Kirschbaum K**, Solecki G, Chiblak S, Abdollahi A, Winkler F, Wick W, Platten M, Heiland S, Bendszus M, Tews B. Correlated magnetic resonance imaging and ultramicroscopy (MR-UM) is a tool kit to assess the dynamics of glioma angiogenesis. *Elife* 2016, 5:e11712. doi: 10.7554/eLife.11712. IF 7,72

9 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinen besonderen Dank an Prof. Michael Platten richten, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor in einem sehr interessanten und fruchtbaren Umfeld durchführen zu dürfen.

Ich danke Prof. Martin Bendszus und Prof. Sabine Heiland dafür, dass ich für meine Forschung auf die Ressourcen der Neuroradiologie, insbesondere das 9,4 Tesla MRT Gerät, zurückgreifen durfte.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Michael Breckwoldt, der mich in die Welt der Wissenschaft einführte, dieses Projekt mit mir plante und mir bei jedem Schritt unterstützend und wegweisend zur Seite stand. Danke, für die lehrreichen Monate, interessanten Diskussionen und lustigen Abende mit dem ganzen Team.

Bei den Versuchen zu meiner Doktorarbeit wurde ich von vielen Personen unterstützt. Ich möchte an dieser Stelle besonders Prof. Ralph Weissleder für die Bereitstellung von CLIO danken. Ein weiterer Dank geht an Edward A. Neuwelt, der mir Ferumoxylol für die Versuche zur Verfügung stellte, und Damir Kronic, für die Unterstützung in der Mikroskopie. Auch möchte ich Prof. John W. Chen, Dr. Matthias W. Zeller und Dr. Martina U. Muckenthaler für die gute Zusammenarbeit danken.

Meine tiefe Dankbarkeit geht an Dr. Jana Sonner, ohne deren tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche, weisen Ratschläge und moralischen Unterstützung auf Durststrecken, ich wahrscheinlich heute noch an meiner Doktorarbeit säße. Vielen Dank für deinen Einsatz bei den Revisionsexperimenten. Ein riesiger Dank gilt Jana für die guten und verrückten Zeiten in und außerhalb des Labors. Ich werde sie nie vergessen.

Ein besonderer Dank geht an Manuel Fischer, der mir am MRT in langen Stunden unter der Erde zur Seite stand. Danke auch an Simon Becker für die technische Hilfe bei einigen Versuchen.

Vielen Dank an die Laborcrew, insbesondere an Katrin, Carina, Katha, Khwab und Ed, dafür, dass ihr zu jeder Zeit hilfsbereit wart, immer ein Ohr für meine Fragen hattet und durch viele lustige Stunden zusammen die Zeit im Labor auch persönlich zu einer unvergesslichen Zeit gemacht habt.

Danke an meine Frankfurter Crew, Felix, Fabian, Hanna und Marion, die mich insbesondere im Schreibprozess unterstützt haben. Ohne euch wären die Kaffeepausen trostlos gewesen.

Ein großer Dank geht an meine Tante Uta, für die stilistische Korrektur und den Schubs in die richtige Richtung. Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich in dieser Zeit nicht nur finanziell, sondern auch durch ihr Interesse für mein Projekt und ihre motivierenden Worte unterstützt haben. Danke sehr!