

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

## Regionale Heterogenität von Gliazellen bei Multipler Sklerose

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

vorgelegt von  
Tim Trobisch

aus  
Weinheim  
(2025)

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Lucas Schirmer

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	6
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1 Multiple Sklerose .....	7
1.1.1 Einführung und Epidemiologie .....	7
1.1.2 Pathophysiologie.....	8
1.1.3 Klinik .....	12
1.1.4 Diagnostik .....	12
1.1.5 Therapie.....	14
1.1.6 Prognose.....	15
1.2 Regionale Heterogenität im zentralen Nervensystem und ihre Bedeutung für die Multiple Sklerose.....	16
1.3 Einzelzellsequenzierung.....	18
1.3.1 Übersicht.....	18
1.3.2 Drop-Seq.....	18
1.3.3 Alternative Methoden .....	19
1.4 Fragestellung und Ziele der Dissertation .....	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Materialtabelle .....	21
2.2 Kriterien der Gewebeauswahl.....	23
2.2.1 Ursprung der humanen Gewebeproben .....	23
2.2.2 Gewebeauswahl .....	24
2.2.3 Histopathologische Untersuchung .....	24
2.3 Analyse der Sequenzierungsdaten.....	26
2.3.1 Generierung der Expressionsmatrix .....	26
2.3.2 Software und Analyseumgebung .....	27
2.3.3 Qualitätskontrolle .....	27
2.3.4 Normalisierung, Skalierung und Selektion hochvariabler Gene.....	29
2.3.5 Dimensionsreduktion und Auswahl der Hauptkomponenten .....	29

2.3.6	Integration des Datensatzes .....	30
2.3.7	Clustering und Visualisierung .....	31
2.3.8	Analyse von Subtypen spezifischer Zellpopulationen .....	31
2.3.9	Identifikation von Markergenen und Annotation von Zelltypen .....	31
2.3.10	Analyse der differentiellen Genexpression (DGE) .....	31
2.3.11	Signalweg- und semantische Ähnlichkeitsanalyse .....	32
2.3.12	<i>Trajectory inference</i> und <i>pseudotime</i> DGE-Analyse .....	33
2.4	Histologie .....	34
2.4.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	34
2.4.2	Mikroskopie, Bilderaufnahme und statistische Analyse .....	34
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
3.1	Analyse der Gewebeproben .....	36
3.2	Sequenzierungsanalyse .....	39
3.2.1	Integration des Datensatzes und Zelltypen-Clustering .....	39
3.2.2	Geteilte Gendysregulation in verschiedenen neuroglialen Zellreihen in Multipler Sklerose .....	41
3.2.3	Regionale Diversität von Astrozyten in Kontroll- und MS-Gewebe ...	43
3.2.4	Regionale Diversität von Oligodendrozyten in Kontrollgewebe .....	46
3.2.5	Transkriptomische Veränderungen in MS-Astrozyten .....	47
3.2.6	Transkriptomische Veränderungen in MS-Oligodendrozyten .....	49
3.2.7	MS-assoziierte Oligodendrozyten der weißen Substanz zeigen eine promyelinisierende Signatur .....	51
3.2.8	Überlappende transkriptomische Antwort von Oligodendrozyten während der Progression von MS-Läsionen .....	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
4.1	Einleitung .....	56
4.2	Regionale Heterogenität des ZNS .....	57
4.2.1	Heterogenität der Astrozyten .....	57
4.2.2	Heterogenität der Oligodendrozyten .....	59
4.3	Gliazell-Reaktivität und deren Bedeutung für die Remyelinisierung bei Multipler Sklerose .....	61
4.3.1	Neurogliale Reaktivität in Multipler Sklerose .....	61
4.3.2	Reaktivität der Astrozyten .....	62

4.3.3	Reaktivität der Oligodendrozyten .....	64
4.3.4	Entzündungsprädiktion mittels Trajektorienanalyse.....	66
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	68
7	TABELLARISCHER ANHANG .....	79
8	LEBENS LAUF .....	81
9	DANKSAGUNG .....	83

### **Hinweis zur geschlechtsneutralen Sprache**

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Formulierungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

*Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>*

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AQP4	Aquaporin 4
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
DAB	3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DGE	Differentielle Genexpression
DIS	Dissemination in space (räumliche Dissemination)
DIT	Dissemination in time (zeitliche Dissemination)
DMGS	Demyelinisierte graue Substanz
DMWS	Demyelinisierte weiße Substanz
GH	Großhirn
GO	Gene ontology
IHC	Immunhistochemie
KD	Krankheitsdauer
KTL	Kontrolle
LR	Läsionsrand
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NEGS	Normal erscheinende graue Substanz
NEWS	Normal erscheinende weiße Substanz
OKB	Oligoklonale Banden
OL	Oligodendrozyten
OVZ	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
PBST	Phosphate-Buffered Saline with Tween-20
PC	Principal Component (Hauptkomponente)
PCA	Principal component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PFA	Paraformaldehyd
PMI	Post mortem Intervall
PPMS	Primär progrediente MS
RIN	RNA integrity number (RNA-Integritätszahl)
RRMS	Relapsing-remitting ms (schubförmig-remittierende MS)
smFISH	Single molecule fluorescence in situ hybridization
snRNA-seq	Single nucleus RNA sequencing
SPMS	Sekundär progrediente MS
SSC	Saline sodium citrate
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI	unique molecular identifier (einzigartiger molekularer Barcode)
VF	Verlaufsform
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Einführung und Epidemiologie

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch eine fehlgeleitete Autoimmunreaktion gegen Myelin gekennzeichnet ist<sup>2</sup>. Dies führt zu Inflammation, Demyelinisierung und schließlich Neurodegeneration<sup>3</sup>. Die resultierenden neurologischen Symptome variieren stark in ihrem Schweregrad und Verlauf, was MS zu einer der Hauptursachen für neurologische Behinderungen bei jungen Erwachsenen macht – nur übertroffen von Unfallverletzungen<sup>3</sup>. Trotz umfangreicher Forschung und deutlicher therapeutischer Fortschritte bleibt die Krankheit unheilbar, und die Mechanismen, die ihrem Beginn und Fortschreiten zugrunde liegen, sind nur partiell verstanden. Die Prävalenz von MS variiert geografisch und demografisch signifikant und betrifft weltweit etwa 2,8 Millionen Menschen. Auffallend ist eine höhere Prävalenz in höheren geografischen Breiten, was auf eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen wie Vitamin-D-Mangel als mögliche Auslöser hinweist. Des Weiteren sind Rauchen und bestimmte virale Infektionen bekannte Risikofaktoren<sup>4</sup>. Frauen sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer, eine Geschlechterdisparität, die sich in den letzten Jahrzehnten noch verstärkt hat. Dies deutet möglicherweise auf Änderungen im Lebensstil und in Umweltfaktoren hin<sup>5,6</sup>. Die Erkrankung beginnt typischerweise im jungen Erwachsenenalter mit einem Diagnosegipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, kann aber auch bei Kindern und älteren Erwachsenen auftreten<sup>3</sup>. In jüngerer Zeit wurde eine weltweite Zunahme der Prävalenz und Inzidenz von MS beobachtet, teilweise bedingt durch Verbesserungen in der Diagnostik, aber auch durch reale Veränderungen in der Krankheitshäufigkeit. Diese Entwicklung unterstreicht die Dringlichkeit einer kontinuierlichen Überwachung der MS-Epidemiologie und einer vertieften Untersuchung ihrer Ursachen<sup>7</sup>. Neuere Studien werfen Licht auf die komplexe Interaktion genetischer und umweltbedingter Faktoren in der MS-Pathogenese<sup>8</sup>. Diese Erkenntnisse sind entscheidend für die Entwicklung zielgerichteter Therapien und Präventionsstrategien, um die Last der MS zu mindern. Insbesondere die Erforschung der geografischen und demografischen Muster bietet wertvolle Einblicke in potenzielle Risikofaktoren und Mechanismen, die zur

Krankheitsentstehung beitragen, und betont die Notwendigkeit einer global koordinierten Anstrengung in Forschung und Gesundheitspolitik.

### 1.1.2 Pathophysiologie

Gewebeschäden bei MS resultieren aus einem komplexen und dynamischen Zusammenspiel zwischen dem Immunsystem, Gliazellen (Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, sowie deren Vorläuferzellen) und Neuronen<sup>3</sup>. Im Rahmen dieser Dissertation soll es vorrangig um die Rolle der Gliazellen gehen, deren Beteiligung an der Pathophysiologie im Folgenden beleuchtet wird.

#### 1.1.2.1 Astrozyten

Astrozyten, die größte Gruppe der Gliazellen im ZNS, spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns<sup>9</sup>. Sie sind essenziell für die Regulation der Blut-Hirn-Schranke, die Aufrechterhaltung des Wasser- und Ionengleichgewichts und die Unterstützung der neuronalen Funktion durch die Regulierung der Neurotransmitterkonzentrationen im synaptischen Spalt<sup>10</sup>. Darüber hinaus tragen Astrozyten zur Bildung der extrazellulären Matrix bei, unterstützen die neuronale Entwicklung und sind an der Reaktion des Gehirns auf Verletzungen und Krankheiten beteiligt<sup>11</sup>. Als eines der häufigsten Moleküle des zentralen Nervensystems spielt hier vor allem der Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP4) eine zentrale Rolle durch seine vielfältige Beteiligung an diesen Prozessen<sup>12,13</sup>. Weiterhin ergibt sich eine bedeutende Rolle von AQP4 als Zielstruktur pathologischer (Auto-) Antikörper bei den Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD), einer der MS verwandten Gruppe weiterer neuroinflammatorischen Erkrankungen des ZNS<sup>14</sup>. In der Pathogenese der MS zeigen Astrozyten eine ausgeprägte funktionelle Plastizität, die sowohl schädigende als auch schützende Rollen im Krankheitsverlauf umfasst. Ihre Reaktivität – oft als Astrogliose bezeichnet – charakterisiert die Antwort auf die entzündlichen Prozesse im ZNS, die mit der MS einhergehen<sup>15,16</sup>. Reaktive Astrozyten können zur Formation gliotischer Narben beitragen, welche typisch für chronische MS-Läsionen sind und potenziell die Regeneration im Gehirn behindern<sup>17</sup>. Einerseits unterstützen die Astrozyten Reparaturprozesse durch die Sekretion von neurotrophen Faktoren und die Aufnahme schädlicher Substanzen aus dem Umfeld. Andererseits können sie durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und die Modulation der Blut-Hirn-Schranke die Entzündung und damit die Progression der MS

verstärken<sup>18</sup>. Darüber hinaus zeigen Studien, dass Astrozyten in MS-Läsionen spezifische strukturelle Veränderungen erfahren. Insbesondere kommt es häufig zu einer Schädigung der Astrozyten-Endfüße, die mit einem Verlust des Wasserkanalproteins AQP4 in perivaskulären Regionen verbunden ist. Verletzungen der Astrozyten können somit die Integrität der Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigen, was den Eintritt von schädlichen Substanzen in das ZNS ermöglicht und zur Entzündungsreaktion beiträgt. Dies unterstreicht die Rolle der Astrozyten nicht nur als passive Teilnehmer, sondern als aktive Treiber der MS-Pathologie, die durch ihre strukturellen Veränderungen die Krankheitsentwicklung beeinflussen<sup>19</sup>.

Neuere Forschungen haben gezeigt, dass Astrozyten eine sehr heterogene Zellpopulation darstellen mit unterschiedlichen Subtypen, die spezifische und manchmal gegensätzliche Funktionen im gesunden Gehirn und bei neurologischen Erkrankungen ausüben<sup>20,21</sup>. Diese Heterogenität ermöglicht es Astrozyten, auf vielfältige Weise auf die MS-Pathologie zu reagieren, und macht sie zu einem interessanten Ziel für therapeutische Ansätze<sup>22</sup>. Die Identifikation und Charakterisierung der verschiedenen Astrozytensubtypen, ihre räumliche und zeitliche Beteiligung an der MS-Pathologie sowie die Klärung ihrer spezifischen Funktionen im Krankheitskontext sind daher von zentraler Bedeutung für ein tieferes Verständnis der MS und die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

Die Untersuchung der Rolle von Astrozyten bei MS steht im Mittelpunkt zahlreicher aktueller Studien<sup>23-25</sup>. Insbesondere die Anwendung moderner Techniken wie der Einzelzellsequenzierung hat neue Einblicke in die komplexe Natur der Astroglie und die spezifischen Veränderungen in Astrozytenpopulationen innerhalb verschiedener Regionen des ZNS bei MS ermöglicht<sup>26,27</sup>. Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis der Krankheitsmechanismen und könnten zur Identifizierung von Biomarkern und Zielmolekülen für innovative Therapien beitragen<sup>20</sup>.

### **1.1.2.2 Mikroglia**

Mikroglia, die primären endogenen Phagozyten des ZNS, spielen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS. Diese spezialisierten Zellen des angeborenen Immunsystems machen etwa 10% der Zellen im ZNS aus und sind durch einen einzigartigen homöostatischen Phänotyp gekennzeichnet, der sie von anderen Gewebemakrophagen unterscheidet<sup>28,29</sup>. Ihre Funktionen umfassen den Schutz des neuronalen Gewebes

vor Infektionen, die Unterstützung bei der Eindämmung und Reparatur von Läsionen sowie Beiträge zur Gesamtentwicklung und Funktion des ZNS<sup>30</sup>.

Die Rolle von Mikroglia bei MS ist sehr vielfältig und stark kontextabhängig. Einerseits können Mikroglia zur Entzündungsreaktion beitragen, indem sie entzündungsfördernde Botenstoffe freisetzen und dadurch reaktive Astrozytensubtypen aktivieren<sup>20,22</sup>. Andererseits spielen sie eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Myelin, indem sie entzündliche Nebenprodukte und Überreste entfernen und die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZs) unterstützen, womit sie maßgeblich an dem Prozess der Remyelinisierung beteiligt sind<sup>31,32</sup>. Darüber hinaus entfernen Mikroglia während der normalen Entwicklung des ZNS dysfunktionale neuronale Synapsen. Dieser Prozess wiederum kann unter pathologischen Bedingungen jedoch auch zu einer Neurodegeneration führen<sup>33</sup>.

Besonders bemerkenswert ist hierbei, dass Mikroglia in histologischen Untersuchungen auch mit einigem Abstand zu bereits demyelinisierten Läsionen in der weißen Substanz von MS-Patienten gefunden wurden, was darauf hindeutet, dass sie bereits in den frühesten Stadien der Läsionsentwicklung eine Rolle spielen könnten<sup>34</sup>. Dies unterstützt die Hypothese, dass Mikroglia aktiv an der Pathogenese und am Krankheitsverlauf von MS beteiligt sind<sup>35</sup>.

Trotz der Herausforderungen, die mit dem Verständnis der komplexen Rolle von Mikroglia in MS verbunden sind, bietet die fortschreitende Forschung und die Entwicklung neuer Technologien – inklusive der Einzelzellsequenzierung – vielversprechende Perspektiven für die Entwicklung Mikroglia-basierter Therapien zur Behandlung der MS<sup>36</sup>. Die Vielfältigkeit der Mikroglia mit sehr unterschiedlichen und teils gegensätzlichen Funktionen – als Förderer der Entzündung und als Unterstützer der Reparatur – macht sie zu einem Schlüsselziel für therapeutische Interventionen, die darauf abzielen, ihre schädlichen Aktivitäten zu minimieren und ihre neuroprotektiven Kapazitäten zu maximieren<sup>37</sup>.

### 1.1.2.3 Oligodendrozyten

Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen sind essenziell für die Bildung und Erhaltung der Myelinscheide im ZNS, die für die schnelle Signalübertragung zwischen Neuronen und die axonale Integrität unerlässlich ist<sup>38</sup>. Sie sind maßgeblich an der Pathologie von demyelinisierenden Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose beteiligt<sup>3</sup>. OVZs, die im gesunden Zustand kontinuierlich zu Oligodendrozyten

differenzieren können, zeigen bei MS eine beeinträchtigte Fähigkeit, reife Oligodendrozyten zu bilden, die effektiv Myelin um Axone wickeln. Dieses Versagen kann durch eine Vielzahl von Faktoren bedingt sein, einschließlich einer arrestierten Differenzierung am Rand von Läsionen, einer Unterdrückung der Reparaturkapazität durch kontaktabhängige Hemmung mit reaktiven Astrozyten oder durch Alterungsprozesse, die die Regenerationsfähigkeit einschränken<sup>39</sup>.

Interessanterweise können OVZs in einem reaktiven, pro-entzündlichen Zustand Chemokine freisetzen, Phagozytose durchführen und als antigenpräsentierende Zellen fungieren, was ihre Rolle in der Immunantwort und bei der Entfernung von Schädigungen im ZNS unterstreicht<sup>40,41</sup>. Jedoch kann diese Kapazität in chronisch entzündlichen Zuständen wie bei MS schädliche Konsequenzen haben, einschließlich der Zerstörung von OVZs durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, was die Fähigkeit zur Remyelinisierung weiter verringert<sup>13</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass Oligodendrozyten und OVZs bei MS entzündungsassoziierte Marker exprimieren, was darauf hindeutet, dass sie nicht nur Ziele des Entzündungsprozesses sind, sondern möglicherweise auch eine aktive Rolle in dessen Förderung und Fortschreiten spielen. Die Forschung hat auch eine hohe Diversität unter reifen Oligodendrozyten aufgezeigt, was auf verschiedene spezifische Funktionen dieser Zellen im ZNS hinweist. Störungen in diesen Prozessen, wie die Herabregulierung wichtiger Kanäle für die Aufrechterhaltung der axonalen Integrität in chronischen MS-Läsionen, verdeutlichen die Komplexität der OL-Pathologie bei MS<sup>40,42</sup>. Zu nennen ist hier beispielsweise das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), welches ein essenzielles Strukturprotein von Oligodendrozyten ist und in der Myelinscheide exprimiert wird<sup>43</sup>. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Stabilität und Funktion des Myelins und ist bei MS ein wichtiges Ziel der Autoimmunreaktion<sup>44</sup>. Darüber hinaus ist MOG die zentrale Zielstruktur bei der MOG-Antikörper-assoziierten Erkrankung (MOGAD), einer MS-verwandten, entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung, die durch Antikörper gegen MOG charakterisiert ist. Während MOGAD klinisch mit MS überlappen kann, unterscheidet sie sich durch ihre Pathogenese, die spezifischen Immunmechanismen und den klinischen Verlauf der Erkrankung<sup>14,45</sup>.

Die Herausforderung besteht darin, die unterschiedlichen Rollen von Oligodendrozyten und OVZs im gesunden Zustand und bei MS vollständig zu verstehen, um gezielte Therapien entwickeln zu können, die auf die Förderung der Remyelinisierung abzielen. Solche Behandlungen könnten die Progression der

Krankheit verlangsamen und potenziell die neurologische Funktion wiederherstellen, indem sie innovative Ansätze zur Überwindung der Blockade der Differenzierung und zur Unterstützung der regenerativen Kapazitäten dieser Zellen anbieten.

### 1.1.3 Klinik

Das klinische Erscheinungsbild der Multiplen Sklerose ist außerordentlich vielfältig, was der Erkrankung den Beinamen „Krankheit der 1000 Gesichter“ eingebracht hat. Die Symptomatik hängt stark von der Lokalisation und dem Ausmaß der Läsionen im ZNS ab. Häufige Erstsymptome umfassen eine Optikusneuritis, die sich durch Sehstörungen äußert, Sensibilitätsstörungen, die von Taubheitsgefühlen bis zu Schmerzen reichen können, sowie chronische Ermüdbarkeit, bekannt als „Fatigue“, die die Lebensqualität der Betroffenen erheblich beeinträchtigt<sup>46</sup>. Die Erkrankung manifestiert sich zunächst meist in einer schubförmig-remittierenden Verlaufsform (RRMS, engl. *relapsing-remitting ms*), gekennzeichnet durch klar definierte Krankheitsschübe mit neurologischen Defiziten, die mindestens 24 Stunden anhalten und von vollständigen oder teilweisen Remissionen gefolgt sind<sup>47</sup>. In einigen Fällen führt MS jedoch zu einer stetigen Progression der Behinderung ohne deutliche Schübe, bekannt als primär progrediente MS (PPMS). Bei einem Teil der anfangs schubförmig erkrankten Patienten entwickelt sich im weiteren Verlauf eine sekundär progrediente MS (SPMS), bei der die Krankheit unabhängig von Schüben fortschreitet<sup>48</sup>. Darüber hinaus können kognitive Beeinträchtigungen, emotionale Veränderungen wie Depressionen, sowie Störungen der Blasen- und Darmfunktionen und der Sexualfunktion auftreten. Die Mobilität kann durch Spastik, Ataxie und Schwäche der Gliedmaßen eingeschränkt werden, was häufig zu einer eingeschränkten Gehfähigkeit führt<sup>49</sup>.

### 1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose der Multiplen Sklerose basiert auf einer umfassenden klinischen Evaluation, die sowohl die Symptomatik und die Anamnese des Patienten als auch eine Reihe paraklinischer Befunde umfasst. Zentrale Elemente sind die kraniale und spinale Magnetresonanztomographie (MRT), die es ermöglicht, entzündliche Läsionen im Gehirn und Rückenmark zu visualisieren sowie laborchemische Untersuchungen des Liquors, die spezifische Entzündungsmarker identifizieren. Die Diagnosekriterien, bekannt als die McDonald-Kriterien, sind international anerkannt und ermöglichen eine

standardisierte Diagnosestellung. Sie integrieren bildgebende, klinische und laborchemische Daten, um eine MS mit hoher Zuverlässigkeit zu diagnostizieren<sup>47</sup>. Die Kriterien umfassen:

Zahl der Schübe	Klinisch objektivierbare Läsionen	Zusätzlich erforderliche Kriterien
2 oder mehr	2 oder mehr	Keine
2 oder mehr	1	Weiterer klinisch objektiver Schub an anderer Lokalisation oder DIS-MRT
1	2 oder mehr	Weiterer Schub oder DIT-MRT oder OKB
1	1	DIS und DIT

**Tabelle 1: Die revidierten McDonald-Kriterien.** DIS, räumliche Dissemination (engl. *dissemination in space*); DIT, zeitliche Dissemination (engl. *dissemination in time*); OKBs, Oligoklonale Banden (liquorspezifisch)  
Tabelle modifiziert nach Thompson et al., 2018<sup>47</sup>.

Eine kernspintomographische zeitliche Dissemination liegt vor, wenn entweder sowohl kontrastmittelaufnehmende als auch nicht kontrastmittelaufnehmende Läsionen nachweisbar sind oder wenn eine neue Läsion in einem Verlaufs-MRT nachgewiesen werden kann. Für eine kernspintomographische räumliche Dissemination muss mindestens eine T2-hyperintense Läsion in mindestens zwei MS-spezifischen Lokalisationen nachgewiesen werden. MS-spezifische Lokalisationen sind hierbei: periventrikulär, spinal, infratentoriell und kortikal/juxtakortikal<sup>47</sup>.

Für die Diagnose einer primär progredienten MS muss neben einer kontinuierlichen Krankheitsprogression über mindestens ein Jahr der Nachweis von zwei der folgenden drei Kriterien erbracht werden<sup>47</sup>:

- Mindestens eine T2-hyperintense Läsion in einer für MS typischen Lokalisation
- Mindestens zwei T2-hyperintense spinale Läsionen
- Der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor

Wichtig ist die Erkenntnis, dass MS eine Ausschlussdiagnose darstellt, was bedeutet, dass andere mögliche Ursachen für die Symptome systematisch ausgeschlossen

werden müssen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen und umfassenden diagnostischen Evaluation.

Die kontinuierliche Weiterentwicklung der Diagnosekriterien und -techniken, wie z.B. der Einsatz neuer MRT-Protokolle oder biomarkerbasierter Tests, bietet die Möglichkeit, die Genauigkeit der Diagnose weiter zu verbessern und den Krankheitsverlauf effektiver zu überwachen.

### **1.1.5 Therapie**

Die Behandlung der Multiplen Sklerose erfordert einen differenzierten Ansatz, der sowohl akute Krankheitsschübe adressiert als auch langfristig den Krankheitsverlauf modifiziert. Ein MS-Schub, definiert durch das Auftreten neuer neurologischer Defizite, die länger als 24 Stunden anhalten, mindestens 30 Tage nach einem vorherigen Schub auftreten und nicht durch externe Faktoren wie Fieber oder anderweitige Erhöhung der Körpertemperatur (sog. Uhthoff-Phänomen) erklärbar sind, erfordert eine unmittelbare Intervention, insbesondere wenn das neurologische Defizit funktionseinschränkend für die Patienten ist<sup>47,50</sup>.

#### **1.1.5.1 Schubtherapie**

Die Standardtherapie von akuten MS-Schüben besteht aus einer hochdosierten Steroid-Stoßtherapie. Meistens wird hierzu Methylprednisolon in einer Dosierung von 500-1000 mg täglich über drei bis fünf Tage verordnet<sup>51</sup>. Prinzipiell kann die Verabreichung sowohl oral als auch intravenös erfolgen, wobei aufgrund häufig eingesetzter Begleitmedikation zur Vermeidung Steroid-assoziiertes Nebenwirkungen (Protonenpumpeninhibitoren, niedermolekulares Heparin und Calciumpräparate), des besseren klinischen Monitorings sowie des teils funktionell einschränkenden neurologischen Defizits eine intravenöse Therapie im stationären Setting bevorzugt wird<sup>52</sup>.

Ergibt sich nach der initialen Therapie keine (ausreichende) Besserung der Symptomatik, kann eine weitere Eskalation erwogen werden. Hierzu gehören eine Ultrahochdosis-Stoßtherapie mit 2000 mg Methylprednisolon pro Tag über fünf Tage oder eine Apherese-Therapie wie die Immunadsorption oder Plasmapherese<sup>53,54</sup>. Die aktuelle Studienlage stützt sich hierbei vor allem auf retrospektive Auswertungen, sodass zu einer eventuellen Überlegenheit einer der Therapieformen aktuell keine endgültige Antwort gegeben werden kann.

### 1.1.5.2 Verlaufsmodifizierende Therapie

Die Entwicklung von Therapeutika für MS hat in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte gemacht, insbesondere durch die Zulassung zahlreicher Medikamente, die spezifisch das Immunsystem modulieren. Ursprünglich wurden nur unspezifische Immuntherapien wie Interferon- $\beta$  und Glatirameracetat verwendet. Mittlerweile sind jedoch spezifischere Immuntherapeutika verfügbar, die in einem Stufenmodell nach ihrer Wirksamkeit kategorisiert werden:

- Kategorie 1 (mild wirksam): Interferone, Glatirameracetat, Dimethylfumarat, Diroximelfumarat, Teriflunomid
- Kategorie 2: Cladribin, Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulatoren (Fingolimod, Ponesimod und Ozanimod)
- Kategorie 3 (hoch wirksam): CD52-Antikörper (Alemtuzumab), CD20-Antikörper (Ocrelizumab, Ofatumumab und Ublituximab), Integrin- $\alpha$ 4-Antikörper (Natalizumab)

Mitoxantron wird aufgrund seines ungünstigen Risiko-Nutzen-Verhältnisses nur noch in Ausnahmefällen empfohlen<sup>55</sup>. Siponimod, ein selektiver Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulator, stellt eine neuere Therapieoption speziell für die sekundär progrediente Verlaufsform dar<sup>55</sup>.

Die Auswahl der geeigneten Therapie hängt von mehreren Faktoren ab, darunter der Krankheitsverlauf, das Nebenwirkungsprofil der Medikamente und individuelle Präferenzen. Eine frühzeitige und an den jeweiligen Krankheitsverlauf angepasste Therapie ist entscheidend, um die Langzeitprognose der Patienten zu verbessern und die Lebensqualität zu erhalten.

### 1.1.6 Prognose

Die Prognose der MS ist individuell sehr unterschiedlich und hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, einschließlich des Krankheitsverlaufs, des Alters bei Krankheitsbeginn, des Geschlechts, der anfänglichen Symptome sowie dem Zeitpunkt des Therapiebeginns, der Schnelligkeit des Wirkungseintritts und der Wirksamkeit der Behandlung. Dank des Fortschritts in der medizinischen Forschung und der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden hat sich die Prognose für MS-Patienten in

den letzten Jahrzehnten jedoch signifikant verbessert<sup>56,57</sup>. Im Allgemeinen haben Patienten mit einem schubförmig remittierenden Krankheitsverlauf, bei denen die Erkrankung in jüngeren Jahren beginnt und initial mit sensiblen Symptomen oder Optikusneuritis einsetzt, tendenziell eine bessere Prognose. Schwere motorische Einschränkungen oder zerebelläre Symptome zu Beginn der Erkrankung können hingegen auf eine ungünstigere Prognose hinweisen<sup>58,59</sup>.

Die zunehmende Fülle an effektiven verlaufsmodifizierenden Medikamenten hat die MS-Behandlung revolutioniert, indem sie die Häufigkeit und Schwere von Schüben reduziert, die Zunahme der Beeinträchtigungen verlangsamt und bei einigen Patienten den Krankheitsverlauf stabilisiert. Ein frühzeitiger Therapiebeginn, noch bevor signifikante Behinderungen bestehen, ist dabei ein kritischer Faktor, der die Langzeitprognose verbessern kann<sup>60</sup>.

Trotz der deutlichen Unterschiede im Verlauf der MS, bei dem manche Betroffene über lange Zeiträume nur geringfügig beeinträchtigt sind, während andere schnell fortschreitende Beeinträchtigungen erfahren, ist eine Tendenz zur Angleichung der Lebenserwartung an die der Gesamtbevölkerung erkennbar<sup>61</sup>. Dies wird durch fortschrittliche Behandlungsmöglichkeiten und verbesserte Betreuungsstandards ermöglicht, insbesondere bei Patienten mit ausgeprägten Behinderungen oder schnell voranschreitender MS. Es ist entscheidend, die Prognose der MS als höchst individuell zu betrachten, wobei eine kontinuierliche Überwachung und Anpassung der Therapie durch das medizinische Fachpersonal erforderlich ist. Die aktive Mitwirkung der Patienten, darunter Anpassungen im Lebensstil und die Teilnahme an physiotherapeutischen Programmen, ist fundamental für ein erfolgreiches Krankheitsmanagement und die Aufrechterhaltung der Lebensqualität<sup>62</sup>.

### **1.2 Regionale Heterogenität im zentralen Nervensystem und ihre Bedeutung für die Multiple Sklerose**

Das ZNS, ein komplexes Netzwerk aus neuronalen und glialen Zellen, zeigt eine beeindruckende regionale Heterogenität, die für seine Funktionen entscheidend ist und zugleich seine Anfälligkeit für Erkrankungen wie MS beeinflusst<sup>1,63-65</sup>. MS ist durch Demyelinisierung, neurodegenerative Prozesse und eine variable Immunantwort gekennzeichnet, wobei die Pathologie in unterschiedlichen Regionen des ZNS variieren kann<sup>3</sup>. Diese regionale Heterogenität hat weitreichende Auswirkungen auf die Pathogenese, Symptomatik und Behandlung der MS, unterstreicht die Bedeutung

eines differenzierten Ansatzes in Forschung und Therapie und wirft Licht auf die zentrale Rolle der Gliazellen und ihrer Heterogenität. MS-Läsionen treten bevorzugt in spezifischen Bereichen des ZNS auf, wie der periventrikulären und juxtakortikalen weißen Substanz, dem Hirnstamm, dem Kleinhirn sowie dem Rückenmark<sup>3,17</sup>. Diese regionale Präferenz lässt auf lokale Faktoren schließen, die die Entwicklung und Progression der MS beeinflussen. Unterschiede in der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, im lokalen Immunmilieu und in der mikrovaskulären Architektur sind dabei nur einige der möglichen Erklärungen für die regionsspezifische Vulnerabilität. Die Heterogenität innerhalb des ZNS spiegelt sich auch in den Gliazellen wider, insbesondere in Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, die in der Pathogenese der MS eine entscheidende Rolle spielen<sup>1,66-68</sup>. Die verschiedenen Gliazelltypen zeigen nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb der ZNS-Regionen eine erhebliche funktionelle und molekulare Diversität<sup>1</sup>. Diese gliale Heterogenität ist ein Schlüsselfaktor für die unterschiedlichen Reaktionen auf entzündliche und degenerative Prozesse bei MS. Beispielsweise können Astrozyten je nach Region und pathologischem Kontext neuroprotektive oder neurotoxische Funktionen übernehmen, während Oligodendrozyten in bestimmten Bereichen des ZNS anfälliger für Schäden sein können und Mikroglia regionsspezifische Immunantworten zeigen<sup>20,68,69</sup>.

Neue Technologien wie die Einzelzellsequenzierung haben es ermöglicht, die komplexe zelluläre Landschaft des ZNS in beispielloser Detailtiefe zu erforschen. Durch diese Ansätze konnte eine bislang unerreichte Einsicht in die regionale und zelltypspezifische Heterogenität gewonnen werden, was neue Perspektiven für die Identifizierung spezifischer pathologischer Mechanismen und potenzieller therapeutischer Ziele eröffnet. Insbesondere das tiefere Verständnis der regionalen Unterschiede in der glialen Heterogenität und Reaktivität hat das Potenzial, zu maßgeschneiderten Behandlungsstrategien zu führen, die auf die spezifischen Bedürfnisse der betroffenen ZNS-Regionen abgestimmt sind<sup>1</sup>.

Insgesamt unterstreicht die Erkenntnis der regionalen Heterogenität im ZNS und der Rolle der Gliazellen die Notwendigkeit eines differenzierten Verständnisses der MS-Pathologie. Die Entwicklung von Therapien, die auf die besonderen Eigenschaften der Läsionen in verschiedenen ZNS-Regionen abzielen, könnte entscheidend sein, um den Verlauf der MS zu beeinflussen und die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern. Die fortschreitende Forschung in diesem Bereich verspricht, das Rätsel

der MS weiter zu entschlüsseln und den Weg für innovative Behandlungsansätze zu ebnen.

### 1.3 Einzelzellsequenzierung

#### 1.3.1 Übersicht

Die Einzelzellsequenzierung markiert eine revolutionäre Entwicklung in der molekularen Biologie, die es Forschern ermöglicht, genetische und epigenetische Informationen auf der Ebene einzelner Zellen zu analysieren<sup>70</sup>. Diese Technik unterscheidet sich grundlegend von traditionellen *bulk*-Ansätzen (Gesamtansätze), die Durchschnittswerte der Genexpression von Zellpopulationen liefern, indem sie die gesamte genetische Diversität und dynamischen Expressionsmuster innerhalb einzelner Zellen eines Gewebes oder einer Zellpopulation aufdeckt<sup>71</sup>. Die Fähigkeit, die molekulare Signatur einzelner Zellen zu erfassen, hat das Verständnis zellulärer Heterogenität, Entwicklungsbiologie, Gewebekomöostase und der molekularen Mechanismen von Krankheiten drastisch erweitert<sup>72,73</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 10X Genomics Chromium Plattform genutzt, die im Wesentlichen auf der Methodik *Drop-Seq* basiert, welche im Folgenden genauer erläutert wird.

#### 1.3.2 Drop-Seq

Mit der Entwicklung von *Drop-Seq*, einer innovativen *droplet*-basierten (dt. tröpfchenbasierten) Einzelzellsequenzierungstechnologie, wurde ein signifikanter Fortschritt in der Skalierbarkeit und Effizienz der Einzelzellanalyse erzielt<sup>70</sup>. *Drop-Seq* erlaubt die parallele Verarbeitung tausender bis zehntausender einzelner Zellen in einem einzigen Experiment. Dies wird durch den Einschluss jeder Zelle in ein Mikrofluidik-Tröpfchen (sogenanntes *droplet*) erreicht. In diesem *droplet* sind neben der Zelle ein einzigartiger molekularer Barcode (UMI, engl. *unique molecular identifier*) und eine Poly(dT)-Sequenz enthalten, die zur Erfassung und reversen Transkription der mRNA (mRNA, engl. *messenger RNA*) dient. Der Prozess beginnt mit der Suspension der Zellen in einer Lösung, die einzelne Zelltröpfchen erzeugt, wobei jede Zelle zufällig mit einem Mikrotröpfchen gepaart wird, welches eine eindeutige Barcode-Sequenz (UMI) trägt. Diese Barcodes ermöglichen die Zuordnung der RNA-Sequenzen zu ihren Ursprungszellen nach der Sequenzierung. Nach der Isolierung

der Tröpfchen erfolgt die Lyse der Zellen, gefolgt von der Synthese der komplementären DNA (cDNA, engl. *complementary DNA*) mittels reverser Transkription und der Amplifikation. Die resultierende cDNA wird dann sequenziert und die Daten werden mittels bioinformatischer Methoden analysiert, um die Genexpression auf Einzelzellebene zu bestimmen<sup>70</sup>. Ein entscheidender Vorteil von *Drop-Seq* liegt in seiner Fähigkeit, auch aus Zellkernen RNA-Sequenzen zu gewinnen, was die Anwendung auf *fresh frozen* Gewebeproben und damit postmortalem Material ermöglicht<sup>71</sup>. Dies eröffnet insbesondere für die Untersuchung von humanen Gewebeproben neue Möglichkeiten, da diese oftmals erst post mortem gewonnen werden können. *Drop-Seq* hat die genetische und transkriptomische Forschung erheblich vorangebracht, indem es detaillierte Einblicke in die molekulare Komplexität von Geweben ermöglicht<sup>1,27,74</sup>. Diese Methode hat wesentlich zur Identifizierung neuer Zelltypen und zur Aufklärung der zellulären Dynamik in Gesundheit und Krankheit beigetragen und ist ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung biologischer Systeme.

### 1.3.3 Alternative Methoden

Neben *Drop-Seq* existieren weitere Verfahren zur Einzelzellsequenzierung, wie *Fluidigm C1*<sup>75,76</sup>, *SMART-seq/SMART-seq2*<sup>77,78</sup> und *CEL-seq/CEL-seq2*<sup>79,80</sup>, die sich in Sensitivität, Durchsatz, Kosten und Komplexität unterscheiden. Die Wahl der Methode richtet sich nach den spezifischen Anforderungen des Forschungsvorhabens, einschließlich der geforderten Detailtiefe, der Anzahl der zu untersuchenden Zellen und dem verfügbaren Budget. Jede dieser Techniken trägt auf eigene Weise dazu bei, die genetische Landschaft auf der Ebene einzelner Zellen zu entschlüsseln und liefert wertvolle Einblicke in die Biologie gesunder und krankhafter Zustände<sup>81</sup>.

### 1.4 Fragestellung und Ziele der Dissertation

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der regionsübergreifenden Analyse der Pathologie bei Multipler Sklerose, um die Lücke im Verständnis der zellulären Heterogenität und der spezifischen Mechanismen der MS weiter zu schließen. Dabei soll es konkret um folgende Schwerpunkte gehen:

- Gibt es Unterschiede in den Genexpressionssignaturen von Gliazellen zwischen verschiedenen ZNS-Regionen?
- Unterscheidet sich die Reaktivität dieser Gliazellen hinsichtlich der MS-Pathologie zwischen den unterschiedlichen ZNS-Regionen?

Hierbei wird durch die Anwendung moderner Techniken wie der Einzelzellsequenzierung versucht, die Dynamik der Zellpopulationen im Kontext der MS genau zu charakterisieren und die Rolle spezifischer Zelltypen bei der Entstehung und Progression der Krankheit zu klären. Ferner sollen die gewonnenen Erkenntnisse genutzt werden, um neue therapeutische Ziele zu identifizieren, die eine maßgeschneiderte Behandlung der MS ermöglichen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialtabelle

Material	Firma	Katalognummer
3' -Diaminobenzidin (DAB) ImmPACT Substrat	Biozol	VEC-SK_4105
Avidin/Biotin Komplex	Vector Labs	PK-4000
Deckgläschen Langenbrinck, 24 x 60 mm, Stärke: Stärke 1 (01-2460/1), Glasdicke 0,13-0,16	Häberle	9161060
Eosin Y Lösung, 0.5% alkoholisch 1L	Millipore Sigma	102439
Ethanol vergällt, 2.5 l, Kunststoff	Carl Roth	K928.3
Eukitt 500ml	O.Kindler/ Orsatec	6272069
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III für die Mikroskopie	VWR	1051740500
Handschuhe Shield skin nitrile M	Häberle	7930704
ImmEdge® Hydrophobic Barrier (PAP) Pen, 2-Pen Set	Vector Labs	VEC-H-4000
Invitrogen Fluoromount-G with DAPI	Thermo Fisher Scientific	00-4959-52
Kaninchen anti-IBA1 polyklonal, 1:500	Wako	RRID: AB_839504
Maus anti-CD68 Klon 514H12, 1:100	Biorad	RRID: AB_2074721
Maus anti-MOG Klon 8- 18C5, 1:1000	Millipore Sigma	RRID: AB_1587278
Maus anti-CD45 Klon H130, 1:200	BioLegend	RRID: AB_314390
Objektträger Superfrost Plus weiß	VWR	631-0108

## Material und Methoden

Paraformaldehyd granuliert	reinst	Carl Roth	60000930
PBS, pH 7.4		Thermo Fisher Scientific	10010056
ProLong Gold reagent	antifade	Thermo Fisher Scientific	P36930
Ratte anti-CD3 1:200	Klon CD3-12,	Biorad	RRID: AB_321245
RNA 6000 Pico Kit		Agilent	5067-1513
RNAscope® Control Probe DapB	Negative	ACD Biotechne	310043
RNAscope® Probe HS-PPIB	Positive Control	ACD Biotechne	313901
RNAscope® Reagents RED	2.5 HD	ACD Biotechne	322360
RNAscope® Control Probe	3-plex Negative	ACD Biotechne	320871
RNAscope® Control Probe- Hs	3-plex Positive	ACD Biotechne	320861
RNAscope® Fluorescent Reagent Kit V2	Multiplex	ACD Biotechne	323100
RNAscope® ADGRV1 Probe	Probe - Hs-	ACD Biotechne	525761
RNAscope® AQP4-C2	Probe - Hs-	ACD Biotechne	482441-C2
RNAscope® CHRM5	Probe - Hs-	ACD Biotechne	402421
RNAscope® CPAMD8	Probe - Hs-	ACD Biotechne	872071
RNAscope® GNA14-C3	Probe - Hs-	ACD Biotechne	1123401-C3
RNAscope® GRIA1	Probe- Hs-	ACD Biotechne	472441
RNAscope® LINC00685	Probe- Hs-	ACD Biotechne	853471
RNAscope® LINC01608-C2	Probe- Hs-	ACD Biotechne	1047141-C2

RNAscope® Probe- MAG-C2	Hs-	ACD Biotechne	864691-C2
RNAscope® Probe- PITPNC1-C3	Hs-	ACD Biotechne	872081-C3
RNAscope® Probe- PLP1-C3	Hs-	ACD Biotechne	564571-C3
RNAscope® Probe- SLC5A11-C1	Hs-	ACD Biotechne	1047131-C1
RNAscope® Probe- SYT1-C2	Hs-	ACD Biotechne	525791-C2
RNeasy Kit Mini		Qiagen	74104
Tissue Tek OCT compound		VWR chemicals	361603E
Triton X		Carl Roth	3881.2
TRIzol Reagenz		ThermoFisher	15596026
TSA Plus Cyanine 3, 1:750		Akoya Biosciences	NEL745001KT
TSA Plus Cyanine 5, 1:750		Akoya Biosciences	NEL744001KT
TSA Plus Fluorescein, 1:500		Akoya Biosciences	NEL741001KT
Xylol (Isomere), 2.5l, Glas		Carl Roth	K928.3
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Biotin		Thermo Fisher	RRID: AB_2533949
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Superklonaler Antikörper Alexa 488, 1:500		Invitrogen	RRID: AB_2536161
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Sekundärantikörper Alexa 555, 1:500		Invitrogen	RRID: AB_2535849
Ziege anti-Ratte IgG (H+L) Sekundärantikörper Alexa 647, 1:500		Invitrogen	RRID: AB_141778
Ziegenserum		Gibco	16210-064

## 2.2 Kriterien der Gewebeauswahl

### 2.2.1 Ursprung der humanen Gewebeproben

Die Akquisition postmortaler menschlicher Gewebeproben wurde durch die *UK Multiple Sclerosis Tissue Bank* am Imperial College London ermöglicht und erfolgte im

Rahmen eines prospektiven Spenderprogramms, welches nach sorgfältiger Prüfung und Genehmigung durch das *National Research Ethics Committee* im Vereinigten Königreich (Genehmigungsnummer 08/MRE09/31) initiiert wurde. Der Pool der Gewebeproben umfasste Spenden von insgesamt 41 Menschen, unterteilt in 21 Frauen und 20 Männer. Die Auswahl der Proben beinhaltete Gewebe von 21 Spendern ohne nachweisbare pathologische Veränderungen in den analysierten Bereichen sowie ergänzend dazu Proben von 20 Spendern, bei denen zu Lebzeiten MS diagnostiziert worden war. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich zwischen Gewebeproben mit und ohne MS-Läsionen. Um eine hohe Qualität der Forschungsdaten sicherzustellen, wurden zusätzliche klinische und pathologische Informationen zu den Spendern erhoben und für weiterführende Analysen dokumentiert. Diese Daten sind in der Zusatztabelle 1 einsehbar.

### 2.2.2 Gewebeauswahl

Für die Auswahl der Gewebeproben wurde unter anderem die Integrität der mRNA als wichtiges Kriterium festgelegt, wodurch gewährleistet wird, dass nur Proben mit hochwertiger Gewebe-RNA in die Studie aufgenommen wurden. Zur Vorbereitung der Proben für die RNA-Isolierung wurden mithilfe eines CM3050S Kryostats (Leica) Schnitte von 100 µm Dicke angefertigt, um aus jedem Gewebeblock etwa 10 mg Material zu gewinnen. Die Isolierung der RNA erfolgte anschließend mittels TRIzol in Kombination mit dem Qiagen RNeasy Kit, wobei streng die Vorgaben der Hersteller beachtet wurden. Um die Qualität der extrahierten RNA zu bewerten, wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer mit dem RNA 6000 Pico Kit entsprechend den Herstelleranweisungen verwendet. Nur Proben, die eine RNA-Integritätszahl (RIN, engl. *RNA integrity number*) von 6,5 oder höher aufwiesen, qualifizierten sich für die nachfolgende Sequenzierungsanalyse. Dieses strenge Auswahlverfahren stellte sicher, dass die analysierten Daten von hoher Zuverlässigkeit sind.

### 2.2.3 Histopathologische Untersuchung

Vor der weiterführenden Analyse wurden alle Gewebeschnitte einer detaillierten histopathologischen Untersuchung unterzogen. Die Färbungen umfassten Hämatoxylin/Eosin zur allgemeinen Beurteilung der Gewebebeschaffenheit sowie spezifische Immunhistochemie-Verfahren zur Bewertung der Demyelinisierung und Entzündungsaktivität. Hierfür wurde zunächst gegen MOG gefärbt, um Aufschluss

über Demyelinisierungsprozesse zu erlangen. Die Evaluation der Entzündungsaktivität erfolgte mittels Färbungen gegen die Marker CD45 und CD68.

### **2.2.3.1 Immunhistochemischer Ablauf:**

Zunächst wurden die Gewebeschnitte direkt aus dem Tiefkühlschrank bei -80 °C in 4% Paraformaldehyd (PFA) transferiert und dort für 10 Minuten fixiert. Ein Serum-Block wurde mittels Ziegenerum (10 % Ziegenerum in 90 % PBST [1X PBS, 0.01 % Triton X-100]) für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Primärantikörper in PBST (Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tensid, engl. *Phosphate-Buffered Saline with Tween-20*) verdünnt und zur Inkubation über Nacht bei 4 °C auf die Schnitte aufgetragen. Folgende Primärantikörper kamen zum Einsatz: Maus anti-MOG, Maus anti-CD45, Kaninchen anti-IBA1, Maus anti-CD68 und Ratte anti-CD3.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte für chromogene Färbungen mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für 2 Stunden inkubiert und anschließend zweimal mit 0,1M PBS gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Komplex für eine Stunde mit erneutem Waschen mit 0,1M PBS. Schließlich erfolgte eine Einfärbung mit DAB entsprechend den Herstellerempfehlungen mit anschließender Hämatoxylingegenfärbung. Es erfolgte eine Dehydratation mit aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% für jeweils fünf Minuten sowie in Xylol für zehn Minuten) und Eindeckeln mit Eukitt.

Für fluoreszierende Färbungen wurden die Primärantikörper anschließend mit sekundären Antikörpern markiert, die spezifisch gegen verschiedene Spezies (Maus, Kaninchen, Ratte) gerichtet waren und an verschiedene Fluorophore (Alexa Fluor Plus 488, 555 und 647) gekoppelt sind und anschließend mit Fluoromount eingedeckelt.

### **2.2.3.2 Immunhistochemische Beurteilung**

Alle in die Untersuchung eingeschlossenen Proben von MS-Patienten zeigten demyelinisierte Läsionen mit angrenzenden Läsionsrändern sowie normal erscheinende graue und weiße Substanzbereiche mit variabler Entzündungsaktivität. Die Läsionsareale wurden weiter in akute, chronisch-aktive und chronisch-inaktive Läsionen klassifiziert. Akute Läsionen wiesen einen undeutlichen Rand auf und zeigten aktive Demyelinisierung mit dem Vorkommen von myeloiden Schaumzellen (MOG<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD68<sup>high</sup>) in den Zentren der Läsionen sowie perivaskuläre Infiltrate von

T-Zellen (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD45<sup>+</sup>/IBA1<sup>low</sup>/CD68<sup>high</sup>). Chronisch-aktive Läsionen waren durch einen abgegrenzten demyelinisierten Läsionskern und einen hyperzellulären Läsionsrand mit vermehrtem Vorkommen von Makrophagen und aktivierten Mikroglia (CD45<sup>+</sup>/IBA1<sup>high</sup>/CD68<sup>low</sup>) charakterisiert. Inaktive Läsionen zeigten vollständig demyelinisierte Läsionskerne ohne Makrophagen; in normal erscheinenden und peri-plaque Bereichen wurde eine Fülle von verzweigten Mikroglia (CD45<sup>+</sup>/IBA1<sup>high</sup>) beobachtet.

### 2.3 Analyse der Sequenzierungsdaten

*ANMERKUNG: Die Zellkerninsolation sowie Sequenzierung wurden im Rahmen dieses Projekts nicht von mir, sondern von Kollegen des Labors durchgeführt. Für weitere, methodisch verwandte Projekte, habe ich dieselbe Methodik bereits ebenfalls angewandt.*

#### 2.3.1 Generierung der Expressionsmatrix

Nach dem Erhalt der Sequenzierungsdaten, vorliegend als bcl-Dateien, erfolgte zunächst deren Umwandlung in FASTQ-Dateien. Diese Demultiplexing-Prozedur wurde unter Einsatz der Funktion `cellranger mkfastq` der 10x Genomics Cell Ranger Software Version 3.0.2 mit Standardparametern durchgeführt. Aufgrund der anspruchsvollen technischen Spezifikationen der Cell Ranger Software wurde diese Analyse auf dem bwHPC-Cluster des Landes Baden-Württemberg realisiert. Für jede einzelne Gewebeprobe wurde anschließend eine Expressionsmatrix erstellt. Dieser Schritt umfasste das Alignment der Sequenzen, das Filtern, die Zählung der Barcodes sowie der UMIs. Als Referenz diente hierbei eine modifizierte Version des GRCh38 prä-mRNA-Transkriptoms, die es ermöglichte, auch *counts* – also abgelesene Gene – zu erfassen, die Introns enthielten. Die Expressionsmatrix des gesamten Datensatzes wurde durch Anwendung der Funktion `cellranger aggr` generiert. Dabei wurden die Daten aller 20 Gewebeproben zusammengeführt. In diesem Schritt wurde keine Normalisierung bezüglich der Sequenzierungstiefe vorgenommen. Eine entsprechende Normalisierung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt, wie in Abschnitt 2.3.4 detailliert beschrieben.

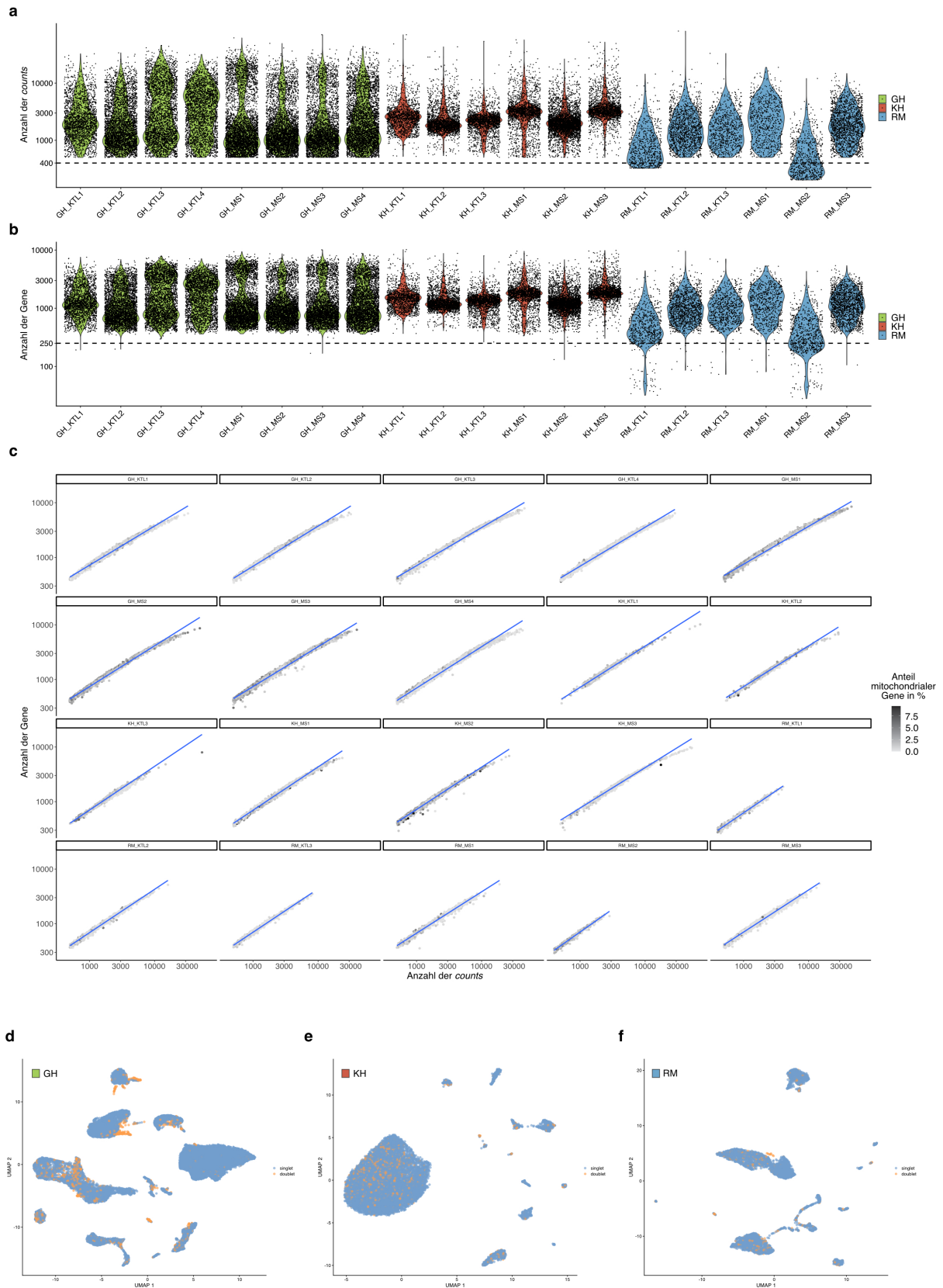
### 2.3.2 Software und Analyseumgebung

Die weitere Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mittels der open-source Software R Version 4.0.3. Für die detaillierte Auswertung und spezifische Fragestellungen wurden für R entwickelte Softwarepakete genutzt (siehe folgende Kapitel).

### 2.3.3 Qualitätskontrolle

Im Rahmen der Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten wurde eine initiale Filterung der Zellkerne vorgenommen. Zellkerne, die weniger als 250 Gene und 400 *counts* aufwiesen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Darüber hinaus erfolgte eine Selektion basierend auf dem Anteil mitochondrialer Gene. Es wurde sichergestellt, dass 99% der in die Analyse einbezogenen Zellkerne weniger als 5% mitochondrial codierte Gene enthielten.

Zur Identifikation von *doublets*, also Fällen, in denen zwei oder mehr Zellkerne in einem einzigen Öl-Tropfen eingefangen wurden (in diesem Kontext auch als *multiplets* bezeichnet), kam die Software scDbFinder Version 1.4.0<sup>82</sup> zum Einsatz. Die Anwendung dieser Software folgte den Empfehlungen des offiziellen Tutorials, wobei die erwartete Rate an *doublets* auf 5% angepasst wurde. Diese Modifikation berücksichtigte die erwartete Wahrscheinlichkeit von *doublets* bei der Analyse von Zellkernen<sup>74</sup>. Die spezifische Untersuchung auf *doublets* wurde separat für jede der drei ZNS-Regionen durchgeführt (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1: Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten.** **a** Violin-Plots für die Anzahl an *counts*. Jeder Punkt stellt einen Zellkern dar. Die gestrichelte Linie zeigt den unteren Grenzwert (400). **b** Violin-Plots für die Anzahl an Genen. Die gestrichelte Linie zeigt den unteren Grenzwert (250). **c** Streudiagramm zur Darstellung der Qualitätsmerkmale nach

entsprechender Filterung der Zellkerne. Zusätzlich zu der Anzahl an *counts* und Genen ist der Prozentsatz an mitochondrialen Genen dargestellt. **d,e,f** UMAP-Plots für die Analyse möglicher *doublets* in jeder der drei ZNS-Regionen. Dargestellt sind der zerebrale (d), zerebelläre (e) und spinale (f) Datensatz. Orange markiert sind alle Zellkerne, die als *doublet* erkannt und klassifiziert wurden. GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark; KTL, Kontrolle; MS, Multiple Sklerose.

Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

### 2.3.4 Normalisierung, Skalierung und Selektion hochvariabler Gene

Die weitere Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mittels der R Software Seurat Version 3.2.3<sup>83</sup>. Für die Normalisierung, Skalierung und Identifikation hochvariabler Gene kam die Funktion `SCTransform()` zur Anwendung. Diese Funktion basiert auf einem Modell der negativen Binomialregression, welches speziell für die Verarbeitung von UMI-basierten Datensätzen konzipiert wurde.

In der ersten Phase der Analyse, die sich auf jede ZNS-Region separat bezog, wurde `SCTransform()` mit den voreingestellten Standardparametern genutzt. Für die kombinierte Analyse des gesamten Datensatzes, der alle drei ZNS-Regionen umfasste, erfolgte eine Anpassung des Parameters `variable.features.n` auf den Wert 5000. Diese angepasste Einstellung diente zur besseren Analyse des hoch komplexen und aus mehreren Regionen bestehenden Datensatzes. Durch diesen methodischen Ansatz wurde sichergestellt, dass die Daten nicht nur effektiv normalisiert und skaliert, sondern auch hinsichtlich der biologischen Variabilität zwischen den Zellpopulationen sorgfältig analysiert wurden, da die Selektion der variablen Gene eine essentielle Grundlage für die tiefgehende Charakterisierung zellulärer Heterogenität innerhalb der untersuchten ZNS-Regionen bildet.

### 2.3.5 Dimensionsreduktion und Auswahl der Hauptkomponenten

Für die Dimensionsreduktion der Sequenzierungsdaten wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) herangezogen, welche als Funktion (`RunPCA()`) im Seurat-Paket verfügbar ist. Die Berechnung bezog sich auf die ersten 50 Hauptkomponenten (PCs, engl. *principal components*), um die multidimensionale Datenstruktur auf wesentliche Muster zu reduzieren. Zur Bestimmung der Anzahl signifikanter Hauptkomponenten für die nachfolgenden Analysen wurde ein objektives, datengetriebenes Verfahren angewendet, um subjektive Entscheidungen zu minimieren. Zunächst wurde ein PC-Grenzwert festgelegt, bei dem die kumulative erklärte Varianz mehr als 90% beträgt.

Anschließend wurde die erste PC bestimmt, bei der der Abfall der erklärten Varianz zwischen aufeinanderfolgenden PCs unter 0,1% liegt. Die endgültige Anzahl der für die Analyse verwendeten PCs wurde als Minimum dieser beiden Kriterien gewählt. Dieser Ansatz gewährleistet, dass die ausgewählten PCs den Großteil der Varianz erfassen, ohne unnötig viele PCs zu berücksichtigen, die nur noch minimalen zusätzlichen Informationsgewinn liefern. Durch die Anwendung objektiver Kriterien wird sichergestellt, dass die Auswahl der PCs die Variabilität der Daten bestmöglich repräsentiert und nicht subjektiv beeinflusst ist.

R-Code:

```
get_sig_pcs <- function(SeuratObject, reduction = "pca"){
  pct <- SeuratObject[[reduction]]@stdev /
  sum(SeuratObject[[reduction]]@stdev) * 100
  cumu <- cumsum(pct)
  col <- which(cumu > 90 & pct < 5)[1]
  co2 <- sort(which((pct[1:length(pct) - 1] -
  pct[2:length(pct)]) > 0.1), decreasing = T)[1] + 1
  pcs <- min(col, co2)
  return(pcs)}
```

### 2.3.6 Integration des Datensatzes

Um sicherzustellen, dass die Clusteranalyse des Datensatzes auf Zelltypunterschieden basiert und nicht durch Stichprobenvarianz oder *batch*-Effekte (systematische Abweichungen zwischen verschiedenen Versuchsdurchläufen) verzerrt wird, erfolgte die Integration des Datensatzes unter Verwendung der Harmony-Software<sup>84</sup>. Hierbei wurde die in Seurat implementierte Funktion `RunHarmony()` basierend auf den von `SCTransform()` korrigierten Daten mit Standardparametern berechnet, jede Gewebeprobe als *batch* gewertet und `max.iter.harmony = 30` gesetzt. Die Anzahl an ausgewählten Hauptkomponenten wurde ebenso berechnet wie im obigen Abschnitt erklärt, mit Ausnahme des integrierten Datensatzes, bei dem die ersten 31 Hauptkomponenten für die weitere Analyse genutzt wurden.

### 2.3.7 Clustering und Visualisierung

Die Clusteranalyse wurde entsprechend der offiziellen Vignette der Seurat-Entwickler durchgeführt. Konkret wurden die Funktionen `RunUMAP()`, `FindNeighbors()` und `FindClusters()` basierend auf den von Harmony korrigierten Koordinaten durchgeführt. Es wurden hierbei die Standardparameter genutzt, außer im Falle von `FindClusters()` – hier wurde die Auflösung auf 2.5 gesetzt, um der hohen Komplexität des Datensatzes gerecht zu werden.

### 2.3.8 Analyse von Subtypen spezifischer Zellpopulationen

Für das Subclustering spezifischer Zellpopulationen, wie beispielsweise Astrozyten oder Oligodendrozyten, wurde jeweils nur ein Teil der Zellkerne des integrierten Datensatzes verwendet. Diese Anteile wurden basierend auf ihrer Genexpression als der jeweilige Zelltyp von Interesse annotiert. Anschließend wurde der bereits beschriebene Analyseworkflow (siehe 2.3.4 - 2.3.7) ausschließlich für den jeweiligen Subtyp durchgeführt. Allgemein wurde hierbei der Auflösungsparameter (*resolution parameter*) reduziert, da nur ein einziger Zelltyp untersucht wurde. Diese Anpassung berücksichtigt die geringere Heterogenität innerhalb der Subtypen im Vergleich zum gesamten Datensatz.

### 2.3.9 Identifikation von Markergenen und Annotation von Zelltypen

Zelltypen-Markergene wurden identifiziert mittels der `findMarkers()` Funktion der R Software `scrn` Version 1.18.5<sup>85</sup>. Hierbei wurden Standardparameter genutzt mit Ausnahme von `pval.type="all"`. Nach der Identifizierung wurden die Markergene hinsichtlich ihrer Spezifität und ihrer Expressionsstärke in den jeweiligen Clustern näher betrachtet. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchung wurden die Zelltypen den entsprechenden Clustern zugeordnet. Die Zuweisung erfolgte auf Grundlage der Expression der identifizierten Marker, wobei besonderes Augenmerk auf diejenigen Gene gelegt wurde, die eine hohe Sensitivität, Spezifität und ein hohes Expressionslevel für bestimmte Zellpopulationen aufwiesen.

### 2.3.10 Analyse der differentiellen Genexpression (DGE)

Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde mit der DESeq2-Software Version 1.30.0 durchgeführt<sup>86</sup>. Dabei kam der sogenannte *pseudobulk*-Ansatz zur Anwendung,

bei dem die unprozessierten *counts* für jedes Gen innerhalb jeder Gewebeprobe aufsummiert wurden, um einen *Bulk-Sequencing*-Datensatz zu simulieren. Eine initiale Filterung schloss dabei Gene aus, die weniger als zwei *counts* in mindestens 30 verschiedenen Zellkernen aufwiesen. Nach der Aufsummierung der *counts* wurden Gene, die nicht mindestens zehn *counts* in mindestens zwei Gewebeproben erreichten, ausgeschlossen. Vor der Ermittlung der differentiell exprimierten Gene erfolgte eine zusätzliche Qualitätskontrolle mit der Funktion `plotPCA()` aus DESeq2. Diese Überprüfung diente der Bestätigung, dass die Hauptvarianz in den Daten durch die Diagnose (Kontrollen vs. MS) erklärt wird. Auf Basis der PCA-Ergebnisse wurden Ausreißer von der Analyse ausgenommen, was nie mehr als eine Gewebeprobe betraf. Die Analyse selbst wurde gemäß der offiziellen Entwicklervignette von DESeq2 durchgeführt, wobei der Wald-Test zur Identifikation differentiell exprimierter Gene eingesetzt und das Geschlecht als Regressionsvariable berücksichtigt wurde. Die resultierenden Log2-Fold-Change-Werte wurden für eine präzisere Interpretation mit der `apeglm`-Software Version 1.12.0 transformiert<sup>87</sup>. Für den Vergleich aller drei ZNS-Regionen wurden die differentiellen Genexpressionsanalysen paarweise durchgeführt. Die Schnittmenge dieser paarweisen Vergleiche diente zur Identifikation von Genen, die als spezifisch für die jeweiligen Regionen angesehen werden können.

### 2.3.11 Signalweg- und semantische Ähnlichkeitsanalyse

Die Analyse zugrundeliegender Signalwege der zuvor identifizierten differentiell exprimierten Gene wurde mit Hilfe der GO-Term-Implementierung (GO-Terme = Gene Ontology-Begriffe zur Klassifizierung von Genfunktionen) in der R Software ClusterProfiler Version 3.18.0 durchgeführt<sup>88</sup>. Von dieser Analyse ausgeschlossen wurden sowohl mitochondrial kodierte als auch im Zellkern kodierte ribosomale Transkripte. Als Referenzliste wurden alle Gene verwendet, die in dem untersuchten Zelltyp exprimiert werden. Mithilfe der `bitr()` Funktion wurden alle Gene in Entrez-IDs umgewandelt. Als zugrundeliegende Datenbank wurde die R Software `org.Hs.eg.db` Version 3.8.2<sup>89</sup> verwendet. Gene ohne korrespondierende Entrez-ID wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Signalweganalyse wurde anschließend mittels der `enrichGO()` Funktion durchgeführt. Hierbei wurden *biological processes* als Datenbank, ein p- und q-Grenzwert von 0.05 und die Benjamini-Hochberg-Korrektur für adjustierte p-Werte genutzt. Basierend auf den ermittelten Ergebnissen wurde eine semantische Ähnlichkeitsanalyse unter

Verwendung der GoSemSim-Software Version 2.16.1<sup>90</sup> durchgeführt. Die semantische Ähnlichkeit wurde zwischen den Gensets berechnet, die aus zuvor als differentiell exprimiert identifizierten Genen bestanden und mit bestimmten Signalwegen (GO-Termen) assoziiert waren. Für die Korrelationsberechnung wurde die Funktion `mclusterSim()` mit *biological processes* als Datenbank, der Wang-Methode für die Berechnung und der Best-Match-Average-Strategie als Kombinationsmethode genutzt. Abschließend wurde eine Heatmap der Korrelationsmatrix mittels der pheatmap-Software Version 1.0.12<sup>91</sup> erstellt. Durch das Schneiden des Dendrogramms auf Höhe 3 konnten die Daten in biologisch aussagekräftige Cluster unterteilt werden.

### 2.3.12 *Trajectory inference* und *pseudotime* DGE-Analyse

Die *pseudotime trajectory inference* ist ein Rechenalgorithmus, die bei Einzelzellanalysen angewendet wird, um Muster von dynamischen Entwicklungsprozessen, die die untersuchten Zellen durchlaufen, zu identifizieren und anschließend die Zellen entlang dieses Prozesses anzuordnen. Die *trajectory inference* Analyse erfolgte mittels der R Software slingshot Version 1.8.0<sup>92</sup>. Hierbei wurde die *trajectory* anhand der UMAP-Koordinaten des jeweiligen Seurat Datensatzes mittels der Funktion `slingshot()` berechnet. Es wurden die Standard-Parameter genutzt, sodass weder ein Start- noch ein Endpunkt der *trajectory* vorgegeben wurde, um eine möglichst unüberwachte Analyse zu ermöglichen. Die zugrunde liegenden Datensätze wurden gemäß den vorherigen Beschreibungen mittels Seurat analysiert, allerdings mit dem Unterschied, dass auf eine Integration durch Harmony verzichtet wurde. Dieser Schritt sollte sicherstellen, dass die transkriptionellen Unterschiede zwischen MS- und Kontrollgewebeprobe in den UMAP-Koordinaten erhalten bleiben. Für die Analyse der differentiellen Genexpression entlang der *trajectory* kam die Software tradeSeq Version 1.4.0<sup>93</sup> zum Einsatz. Orientiert am offiziellen Tutorial der Entwickler wurde die Funktion `diffEndTest()` genutzt, um die differentielle Genexpression zwischen den beiden Endpunkten der *trajectory* zu vergleichen. In die Analyse einbezogen wurden nur Gene, die in den durch `SCTransform()` korrigierten Daten in mindestens 100 Zellkernen jeweils mindestens zwei *counts* aufwiesen. Die Auswahl von sieben Knotenpunkten (*knots*) für die Berechnung basierte auf der Funktion `evaluateK()`.

### 2.4 Histologie

#### 2.4.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden gefrorene Gewebeschnitte der humanen Spender genutzt (für die Vorbereitung der Schnitte siehe Abschnitt 2.2.3). Die Färbung wurde auf repräsentativen Schnitten der jeweiligen Gewebeproben mittels des ACD RNAscope 2.5 HD Red und des Multiplex Fluorescent V2 assays durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zur Fixierung direkt aus dem -80 °C-Tiefkühlschrank in 4% PFA bei 4 °C für 15 Minuten überführt. Anschließend wurde das PFA verworfen und die Gewebeschnitte erneut mit PFA bedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung erfolgte eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für zehn Minuten und dann ein Kochen der Schnitte in *Target Retrieval Solution* (ACD) für fünf Minuten. Die Gewebeschnitte wurden dann in destilliertem Wasser gewaschen und mittels 100% Ethanol dehydriert für 3 Minuten. Es folgte eine Behandlung mit Protease (Protease IV, ACD) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die zu färbenden Proben wurden im Falle des Multiplex Assays dann gemischt, bzw. im Falle des 2.5 HD Red Assays einzeln für zwei Stunden bei 40 °C auf den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend gewaschen und in 5X SSC über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Amplifikation und Färbung der Probe entsprechend den offiziellen Empfehlungen der Hersteller. Für die Färbung der Proben im Multiplex Assay wurden die Farbstoffe TSA plus Cyanine 3, TSA plus Cyanine 5 und TSA plus Fluorescein (alle Akoya Biosciences) benutzt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mittels Fluoromount (2.5 HD Red) bzw. ProLong Gold antifade Reagent (Multiplex Assay) eingedeckelt.

#### 2.4.2 Mikroskopie, Bilderaufnahme und statistische Analyse

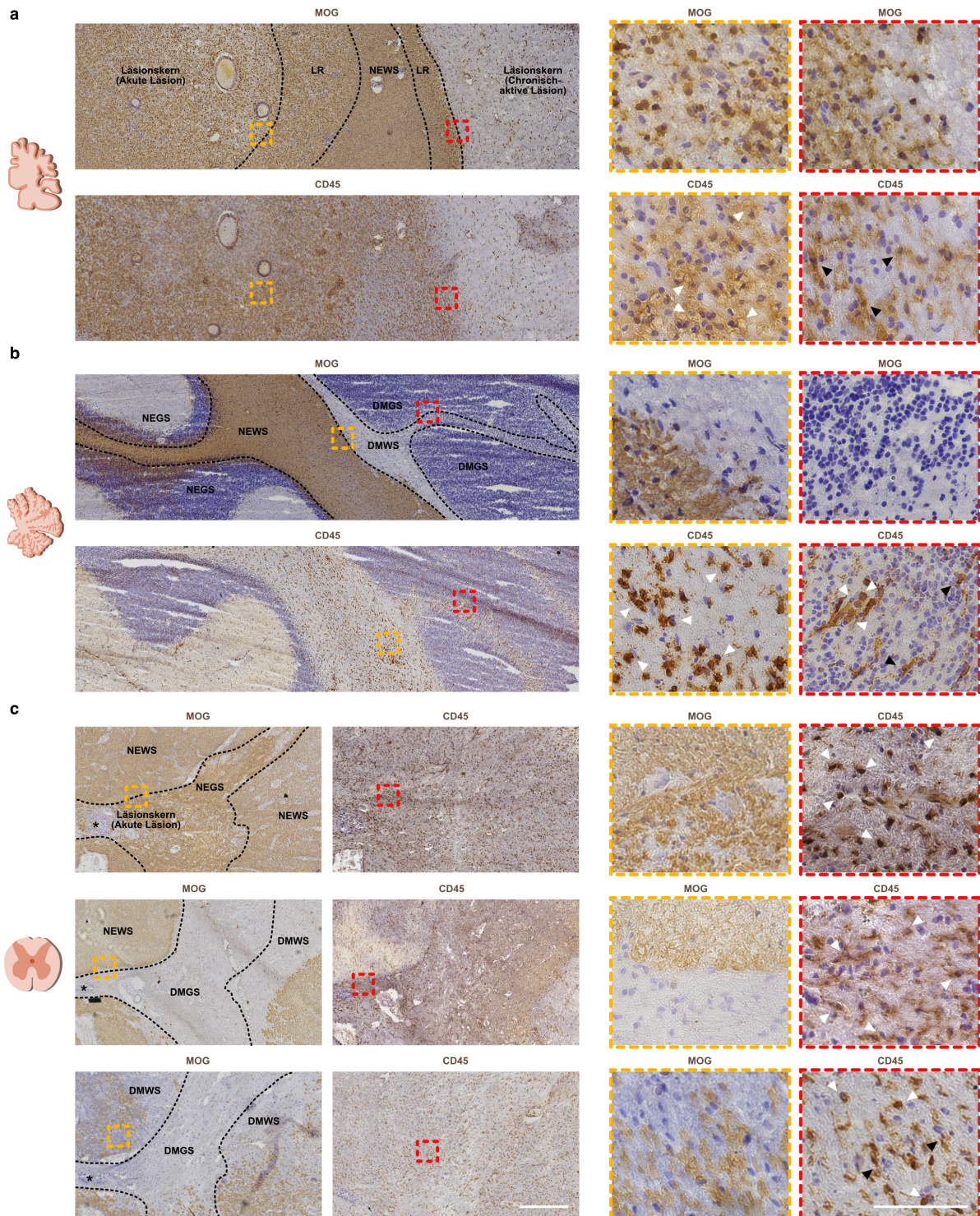
Alle Lichtfeld Bildaufnahmen wurden mittels eines Leica DMI 8 Mikroskop mit einer Leica DFC 7000 GT Kamera aufgenommen. Die Fluoreszenz-Bilder wurden entweder mit einem Leica TCS SP8, einem Nikon AX R mit einem Nikon Plan Apo  $\lambda$  40x NA 0.95 Objektiv oder einem Nikon A1 mit einem Nikon Plan Fluor 40x NA 1.3 Objektiv aufgenommen. Alle Fluoreszenz-Bilder wurden als *z-stack* Bilder mit 10 - 20 Ebenen und einer Schichtdicke von 0.5 - 0.7  $\mu$ m aufgenommen. Die Bestimmung der Höhe für die *z-Stacks* wurde anhand der DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-phenylindol) der aufzunehmenden Stelle durchgeführt. Jede Ebene wurde für drei bis vier Kanäle

aufgenommen (entsprechend der Anzahl der gefärbten Proben). Die weitere Verarbeitung der Bilder erfolgte in der open-source Software FIJI ImageJ Version 2.0.0. Die Bilder, welche mit den Nikon Mikroskopen aufgenommen wurden, wurden vorher mittels der Nikon NIS-Elements AR Software Version 5.40.01 bearbeitet (*denoised* und *deconvolved*), was eine Reduktion des Hintergrundes und eine Verstärkung des Signals ermöglichte. Zur Quantifizierung ausgewählter Signale wurden mindestens zwei repräsentative Regionen von Interesse eines Gewebeschnittes von mindestens vier verschiedenen Gewebeproben analysiert. Die statistische Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mittels der open-source Software R Version 4.0.3.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Analyse der Gewebeproben**

Für die vorliegende Studie wurden gezielt MS-Proben ausgewählt, die deutliche Anzeichen einer Demyelinisierung aufwiesen. Hierfür wurden zunächst alle Gewebeproben mittels Immunhistochemie auf das jeweilige Läsionsausmaß untersucht. Als Zielstruktur wurde MOG verwendet. Sofern eindeutige Läsionen nachgewiesen werden konnten, wurden diese in einem nächsten Schritt auf ihre entzündliche Aktivität mittels Antikörper gegen CD45, IBA1, CD68 and CD3 untersucht (Abb. 2, 3).

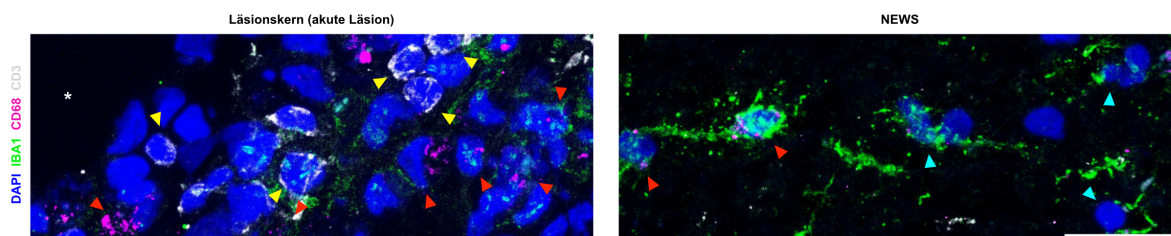


**Abbildung 2: Charakterisierung der Gewebeläsionen mittels Lichtfeld-Immunhistochemie.** **a** MOG- und CD45-Immunhistochemie eines repräsentativen subkortikalen MS-Läsionsgewebeschnitts. Eine akute Läsion mit aktiver Demyelinisierung und dem Vorhandensein von Schaumzellen (weiße Pfeilspitzen) im Zentrum sowie am Rand der Läsion wird neben einer chronisch-aktiven Läsion mit abgegrenztem Kern und hyperzellulärem Läsionsrand mit hohen Mikroglia-Leveln (schwarze Pfeilspitzen) gezeigt. **b** MOG- und CD45-Immunhistochemie für einen repräsentativen zerebellären MS-Läsionsgewebeschnitt. Eine chronisch-aktive zerebelläre Läsion mit abgegrenztem Kern und hyperzellulärem Läsionsrand mit Anwesenheit von Makrophagen (weiße Pfeilspitzen) und Mikroglia (schwarze Pfeilspitzen) wird gezeigt. **c** MOG- und CD45-Immunhistochemie für repräsentative Rückenmark-MS-Läsionsgewebeschnitte. Die obere Reihe zeigt eine akute Rückenmark-MS-Läsion mit aktiver

Demyelinisierung und Anwesenheit von Makrophagen (weiße Pfeilspitzen). Die unteren zwei Reihen zeigen chronisch-aktive Läsionen mit abgegrenzten Läsionskernen in grauer und weißer Substanz mit hyperzellulären Läsionsrändern und Anwesenheit von einigen Makrophagen (weiße Pfeilspitzen) sowie Mikroglia (schwarze Pfeilspitzen). Die Übersichtsbilder für MOG und CD45 in **a**, **b** und **c** wurden von entsprechenden MS-Läsionsbereichen auf seriellen Schnitten aufgenommen. Die Maßstabsbalken zeigen 500  $\mu\text{m}$  auf Übersichtsbildern und 100  $\mu\text{m}$  auf Vergrößerungen. LR, Läsionsrand; NEWS, normal erscheinende weiße Substanz; NEGS, normal erscheinende graue Substanz; DMWS, demyelinisierte weiße Substanz; DMGS, demyelinisierte graue Substanz. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Von den untersuchten Proben wurden bis auf drei Ausnahmen, die als chronisch-inaktiv eingestuft wurden, sämtliche Proben als akut/chronisch-aktiv klassifiziert. Diese Klassifizierung basierte auf dem Vorhandensein partieller Anzeichen für eine fortlaufende aktive Demyelinisierung entlang der Ränder der Läsionen sowie in angrenzenden Kernbereichen (Abb. 2).

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl der Proben für die nachfolgende Einzelkern-RNA-Sequenzierung war die RNA-Integrität. Es wurden ausschließlich Proben mit einer RIN von 6,5 oder höher in die Analyse einbezogen, um die Zuverlässigkeit der gewonnenen transkriptomischen Daten zu gewährleisten. Die Details zu allen verwendeten Gewebeproben sind in Zusatztable 1 aufgelistet und umfassen insgesamt zehn zerebelläre, neunzehn zerebrale sowie zwölf spinale Proben.



**Abbildung 3: Charakterisierung der Gewebeläsionen mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie.** Fluoreszenz-Immunhistochemie für IBA1, CD68 und CD3. Auf der linken Seite wird der Läsionskern einer akuten Läsion dargestellt. T-Zellen ( $\text{CD3}^+$ , gelbe Pfeilspitzen) werden neben gewebeinfiltrierenden Makrophagen ( $\text{IBA1}^+/\text{CD68}^+$ , rote Pfeilspitzen) gezeigt, die von einem nahegelegenen Gefäß (\*) stammen. Auf der rechten Seite wird NEWS mit Makrophagen ( $\text{IBA1}^+/\text{CD68}^+$ , rote Pfeilspitzen) und ansässiger verzweigter Mikroglia ( $\text{CD68}^+$ , cyanfarbene Pfeilspitzen) gezeigt. Der Maßstabsbalken zeigt 20  $\mu\text{m}$  an. NEWS, normal erscheinende weiße Substanz.

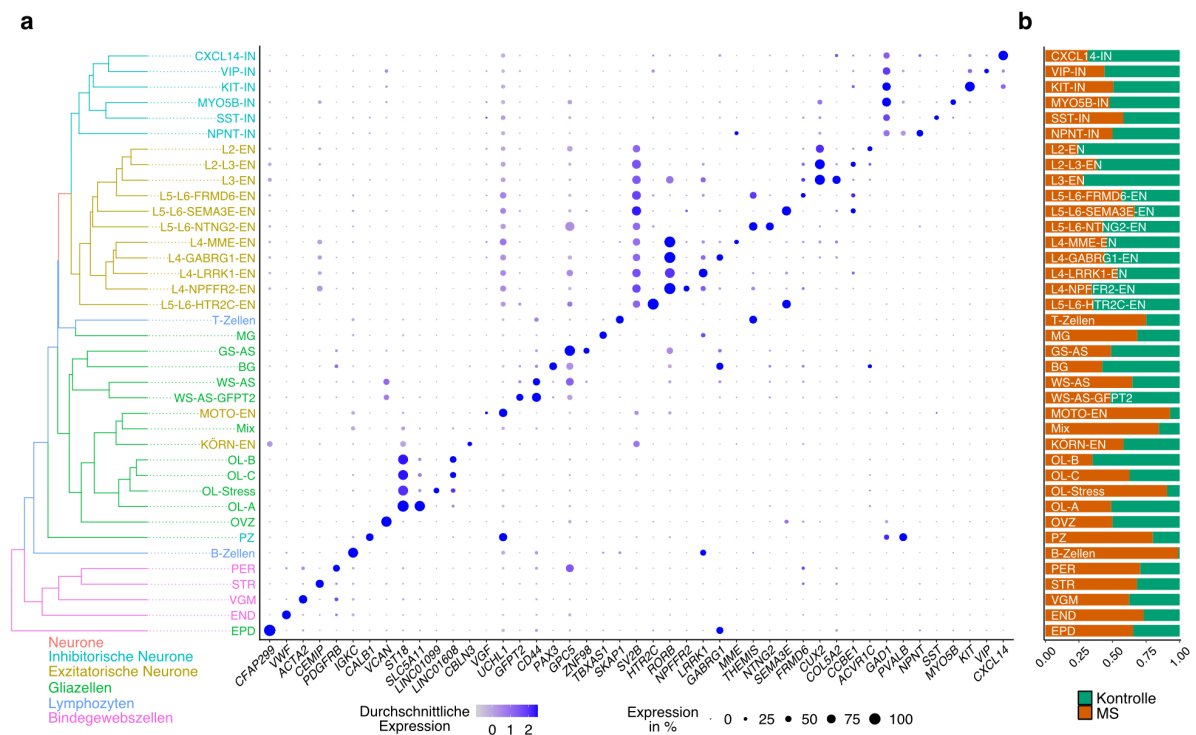
Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.



konnte, ergab sich ein kleines Cluster an exzitatorischen Neuronen mit sowohl zerebralem als auch spinalem Ursprung, die anhand ihrer spezifischen Genexpression als große Motorneurone charakterisiert werden konnten (z.B. Expression des Markergens *UCHL1*, aber nicht *CALB1*).

Eine unüberwachte hierarchische Clusteranalyse konnte zeigen, dass verwandte Zelltypen in gemeinsamen Clustern gruppiert wurden. So wurden beispielsweise exzitatorische und inhibitorische Neurone sowie nicht-neuronale Zellen wie Gliazellen und Endothelzellen zusammengefasst, was auf konservierte transkriptomische Eigenschaften innerhalb dieser Zellsubtypgruppen hinweist.

Betrachtet man die Verteilung der Zelltypen basierend auf ihrem Ursprung von gesunden Spendern oder Spendern mit MS, bestehen in einigen Zelltypen erhebliche Unterschiede. Während Immunzelltypen (B- und T-Zellen) erwartungsgemäß fast ausschließlich von MS Proben stammten, zeigte sich insbesondere für Neurone der oberen kortikalen Schichten des Großhirns ein überwiegender Ursprung von gesunden Spendern, was auf eine besondere Vulnerabilität dieser neuronalen Subtypen hindeutet<sup>27</sup>.

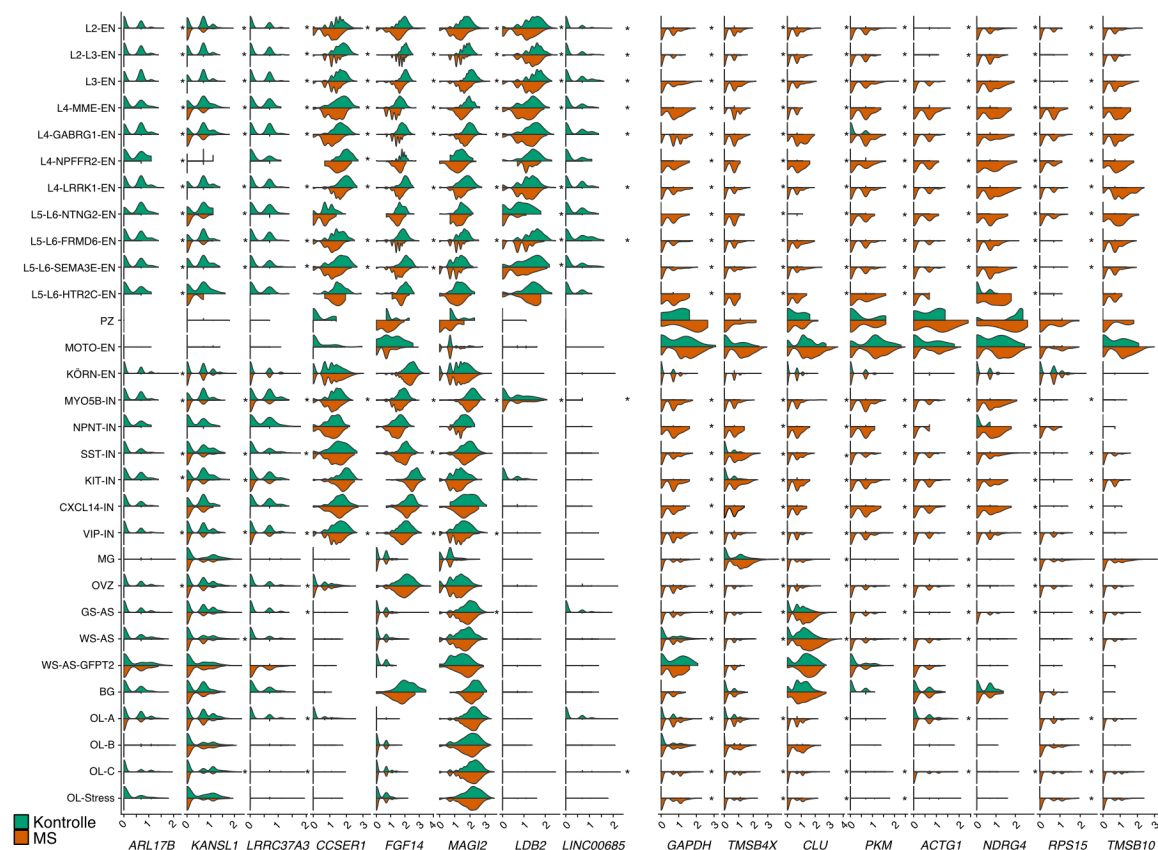


**Abbildung 5: Zelltypspezifische Analyse.** **a** Dotplot zur Darstellung der zelltypspezifischen Expression von Markergenen. Das Dendrogramm zeigt die hierarchische Clusteranalyse zwischen den verschiedenen Zelltypen. Berechnet wurde dieses anhand der durchschnittlichen Genexpression pro Cluster basierend auf den normalisierten und skalierten counts. **b** Balkendiagramm für den proportionalen Ursprung der Cluster basierend auf Kontroll- und MS-Spendern. EN, exzitatorische Neurone; L, Lamina; KÖRN-EN, Körnerzellen; IN, inhibitorische Neurone; PZ, Purkinje-Zellen; PER, Perizyten; STR, Stromazellen; EPD,

Ependymzellen; VGM, vaskuläre glatte Muskelzellen; END, Endothelzellen; MG, Mikroglia, BG, Bergmann-Glia; AS, Astrozyten; GS, graue Substanz; WS, weiße Substanz; OVZ, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen; OL, Oligodendrozyten; MS, Multiple Sklerose. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

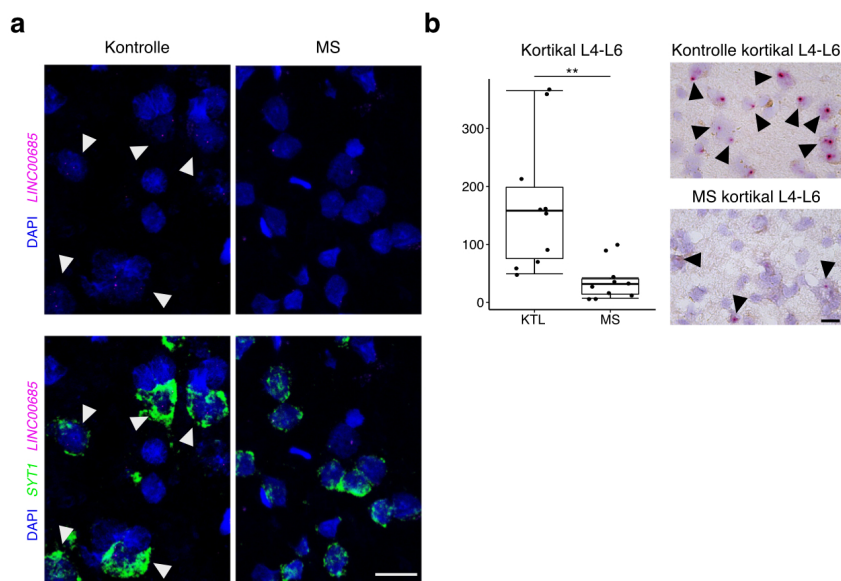
### 3.2.2 Geteilte Gendysregulation in verschiedenen neuroglialen Zellreihen in Multipler Sklerose

Um „globale“, also regionsübergreifende, einheitliche Effekte von MS in den verschiedenen ZNS-Regionen zu untersuchen, wurde zunächst eine differentielle Genexpressionsanalyse zwischen Kontroll- und MS-Gewebeproben für jeden Zelltyp durchgeführt. Die hieraus resultierenden Gene wurden anhand der Häufigkeit ihrer Dysregulation in verschiedenen Zelltypen geordnet und in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Global-dysregulierte Genmuster in neuroglialen Zellen in MS.** Die Expression der am häufigsten dysregulierten Gene in MS wird mittels Violin-Plots dargestellt, wobei die Markierung mit dem Stern angibt, ob diese für den jeweiligen Zelltyp statistisch signifikant war ( $p < 0,05$ ). EN, exzitatorische Neurone; L, Lamina; KÖRN-EN, Körnerzellen; IN, inhibitorische Neurone; PZ, Purkinje-Zellen; PER, Perizyten; STR, Stromazellen; EPD, Ependymzellen; VGM, vaskuläre glatte Muskelzellen; END, Endothelzellen; MG, Mikroglia, BG, Bergmann-Glia; AS, Astrozyten; GS, graue Substanz; WS, weiße Substanz; OVZ, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen; OL, Oligodendrozyten; MS, Multiple Sklerose. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Obwohl es vor allem zwischen neuronalen Zelltypen eine hohe Diversität zwischen den ZNS-Regionen zu geben scheint (Abb. 4c), zeigten sich in der DGE-Analyse große Überlappungen an dysregulierten Genen. *ARL17B* war vor *KANSL1* das am häufigsten herunterregulierte Transkript. Beide Gene sind auf dem 17q.21.31-Genlocus lokalisiert, welcher bereits in Zusammenhang mit verschiedenen anderen neurologischen Erkrankungen beschrieben wurde<sup>94,95</sup>. Weitere in MS herunterregulierte Transkripte waren zudem einige *long non-coding RNAs*, also RNA-Transkripte, die nicht in Proteine translatiert werden und deren Funktion zu großen Teilen noch unbekannt ist. Hierbei fiel besonders *LINC00685* auf, welche ebenfalls in verschiedenen neuroglialen Zelltypen herunterreguliert ist mit bisher unbekannter Funktion<sup>96</sup>. Um deren Expressionsmuster im Gewebe genauer zu untersuchen, wurde eine RNA in-situ Hybridisierung ergänzt (Abb. 7a, b). Hier zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung von *LINC00685* besonders in tiefen kortikalen Schichten (Lamina 4-6, Abb. 7b).



**Abbildung 7: In-situ-Validierung von *LINC00685*.** **a** Fluoreszenz-multiplex in-situ Hybridisierung von *LINC00685* und *SYT1*. Die weißen Pfeilspitzen markieren Neurone, die *LINC00685* exprimieren. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm. **b** RNA in-situ Hybridisierung von *LINC00685* für Kontroll- und MS-Proben in der tiefen grauen Substanz. Die Ordinate zeigt die Anzahl an RNA-Signalen pro mm<sup>2</sup>. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm. Zur statistischen Analyse wurden die Daten zunächst mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde schließlich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet, um zu prüfen, ob eine unterschiedliche Verteilung der Expression von *LINC00685* zwischen Kontroll- und MS-Proben vorliegt (\*\* $p < 0,01$ ). MS, Multiple Sklerose; KTL, Kontrolle.

Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Dem gegenüber stehen die am häufigsten hochregulierte Transkripte wie *GAPDH*, *CLU* und *PKM*, die mit erhöhtem Zellstress und metabolischer Erschöpfung assoziiert sind, was bereits zuvor im Zusammenhang mit der MS-Pathologie beschrieben wurde.

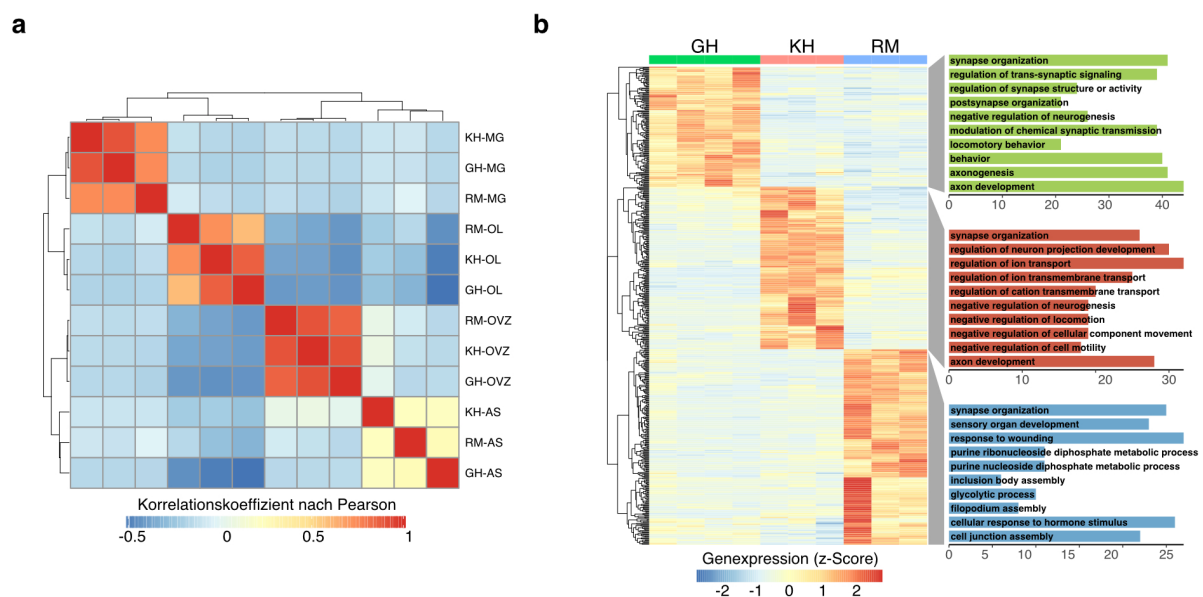
### 3.2.3 Regionale Diversität von Astrozyten in Kontroll- und MS-Gewebe

Um die regionale Diversität von Gliazellen entlang der drei ZNS-Regionen zu untersuchen, wurden zunächst lediglich die Zellkerne untersucht, welche von Kontrollproben stammen, um einen möglicherweise verzerrenden Einfluss der MS-Pathologie auf die Analyse zu vermeiden. Für einen Vergleich der vier großen Gliazellcluster des Datensatzes (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen) wurde die durchschnittliche Expression für jedes Gen der jeweiligen Zelltypen für jede der drei ZNS-Regionen berechnet. Anschließend erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Pearson, um die Ähnlichkeit zwischen den ZNS-Regionen zu untersuchen (Abb. 8a). Hier zeigte sich jeweils eine hohe Korrelation zwischen den gleichen Zelltypen aus unterschiedlichen ZNS-Regionen, aber eine niedrige Korrelation zwischen verschiedenen Zelltypen. Die größte Heterogenität zeigte sich zwischen den Astrozytenpopulationen der verschiedenen ZNS-Regionen in Einklang mit der Hypothese, dass regionale Unterschiede in Astrozytenpopulationen zur Gewebheterogenität entlang des gesamten zentralen Nervensystems beitragen<sup>10,97</sup>.

Innerhalb der Mikroglia und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wurde im Kontrollgewebe nur eine sehr geringe Heterogenität festgestellt (Abb. 8a). Um diese regionalen Unterschiede in den Astrozytenpopulationen genauer zu untersuchen, wurde eine regionale DGE-Analyse durchgeführt. Hier ergaben sich eine Vielzahl regionsspezifischer Gene (Großhirn: 132, Kleinhirn: 179, Rückenmark: 215), deren regionale Expression in Abb. 8b dargestellt ist.

Um tiefere Einblicke in die funktionelle Diversität der Astrozyten-Subtypen zu erhalten, führten wir eine GO-Term-Anreicherungsanalyse durch. Diese Analyse offenbarte, dass regionsspezifische biologische Prozesse, die von Astrozyten ausgeführt werden, stark mit deren regionsabhängigen Bedürfnissen der benachbarten Neuronenpopulationen korrespondieren und somit eine ausgeprägte funktionelle Vielfalt unter den Astrozytensubtypen aufzeigen. GO-Terme, die mit der Organisation von Synapsen in Verbindung stehen, waren unter den wichtigsten Astrozyten-GO-Termen in allen drei Regionen. Mit Astrozyten des Großhirns waren insbesondere

Signalwege assoziiert, die die Regulation der transsynaptischen Signalübertragung und Neurotransmission betreffen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Astrozyten des Kleinhirns, hauptsächlich bestehend aus Bergmann-Glia, vorrangig eine Fokussierung auf Signalwege, welche für die Entwicklung von Neuronenprojektionen und den Transport von Ionen, insbesondere von Kationen, wichtig sind. Bei den Rückenmarksastrozyten wurden mehrere Gene identifiziert, die zu metabolischen Prozessen wie anaerober Glykolyse und katabolen Prozessen beitragen, was auf spezifische Prozesse hinweist, die große Motorneurone im Rückenmark unterstützen (Abb. 8b).

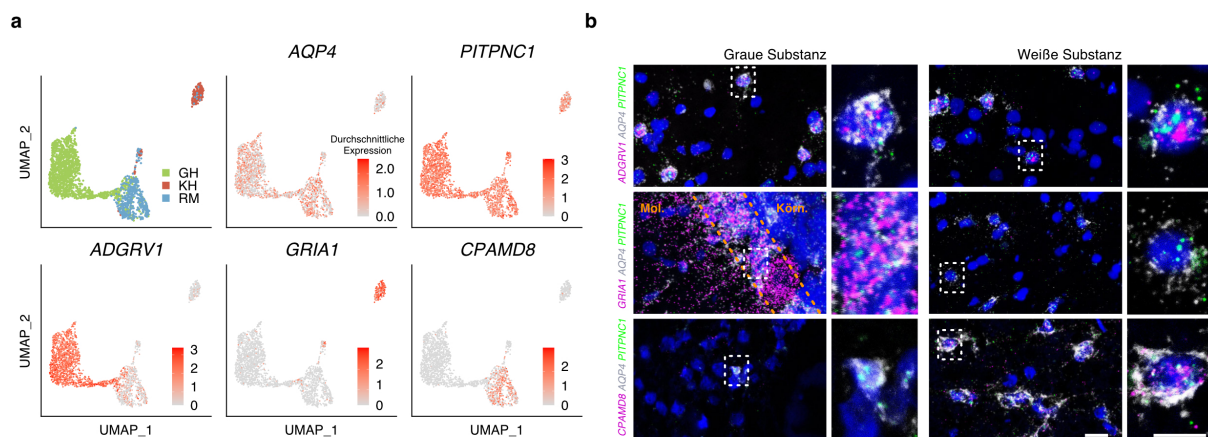


**Abbildung 8: Regionale gliale Diversität hebt Astrozyten-Heterogenität hervor.** **a** Pearson-Korrelationsanalyse zwischen Gliazellpopulationen aus Kontrollspendern. Die Berechnung erfolgte basierend auf den durchschnittlichen Expressionswerten eines Gens pro Zelltyp und Region. **b** Heatmap für die regionsspezifischen Gene der DGE-Analyse. Alle signifikanten Gene sind enthalten ( $p < 0,05$ ). Das Balkendiagramm rechts zeigt die basierend auf den regionsspezifischen Genen errechneten GO-Terme. Die Abszisse gibt an, wie viele Gene dem jeweiligen GO-Term zugerechnet wurden. GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark; MG, Mikroglia; OL, Oligodendrozyten; OVZ, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen; AS, Astrozyten.

Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Basierend auf der DGE-Analyse zeigte sich *PITPNC1*, kodierend für ein zytoplasmatisches Phosphatidylinositol-Transferprotein, als neu identifizierter Marker für Astrozyten aller ZNS-Regionen<sup>98</sup>. Im Vergleich zu dem bereits etablierten Markergen *AQP4* zeigte *PITPNC1* höhere Expressionslevel bei immer noch hoher Spezifität für Astrozyten (Abb. 9a). Anschließend wurde basierend auf den

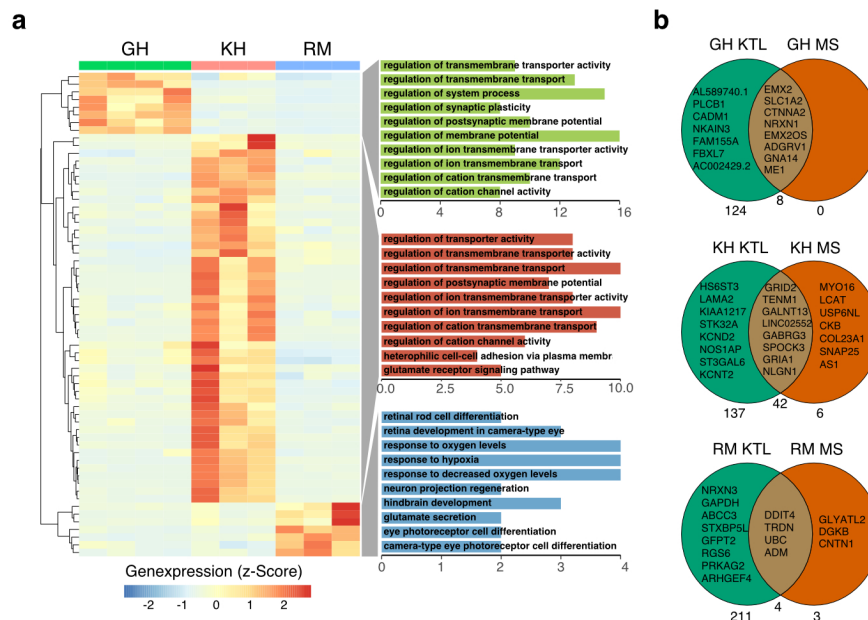
regionsspezifischen Genen für jede der drei ZNS-Regionen ein spezifisches Markergen ausgesucht, welches zum einen eine hohe Spezifität und zum anderen ein hohes Expressionslevel für die entsprechende Region aufweist. Als Markergene gewählt wurden *ADGRV1* für zerebrale, *GRIA1* für zerebelläre und *CPAMD8* für spinale Astrozyten. Mittels in-situ-Hybridisierung wurde die regionale Expression dieser Gene weiter klassifiziert. *GRIA1* zeigte eine spezifische Expression in Bergmann-Glia des Kleinhirns und *CPAMD8* in spinalen Astrozyten der weißen Substanz. *ADGRV1* zeigte dagegen hohe Expressionslevel sowohl in zerebralen Astrozyten der grauen als auch der weißen Substanz (Abb. 9b).



**Abbildung 9: Regionsspezifische Markergenexpression in Astrozyten.** **a** Expression der regionsspezifischen Marker *ADGRV1*, *GRIA1* und *CPAMD8* im Vergleich zu den globalen Astrozytenmarkern *AQP4* und *PITPNC1* in Kontroll-Astrozyten aller drei ZNS-Regionen. **b** RNA in-situ-Hybridisierung für die regionsspezifischen Markergene in Kombination mit *AQP4* und *PITPNC1*. Obere Reihe: zerebrales Gewebe, *ADGRV1*. Mittlere Reihe: zerebelläres Gewebe, *GRIA1*. Untere Reihe: spinale Gewebe, *CPAMD8*. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$  in den Übersichtsbildern und 10  $\mu\text{m}$  in den Vergrößerungen. GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark; Mol., Molekularschicht; Körn., Körnerzellschicht. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Die Untersuchung der regionalen Unterschiede in MS-Gewebe offenbarte hingegen eine signifikante Reduktion der Anzahl an regionsspezifischen Astrozytengen (Abb. 10a). Eine Gruppe von Genen besaß hierbei regionsübergreifende Spezifität sowohl in Kontroll- als auch in MS-Gewebe, und stellt damit vermutlich homöostatische "Kerngene" der Astrozyten in den jeweiligen ZNS-Regionen dar (Abb. 10b). Die GO-Term-Anreicherungsanalyse für die regionsspezifischen Gene in Astrozyten aus MS Gewebe zeigte nun veränderte Signalwege an, wobei vor allem zwischen zerebralen und zerebellären Signalwegen eine Überschneidung zu erkennen war. Hier ergaben

sich vorrangig Signalwege, die im Transmembrantransport von Ionen involviert sind (Abb. 10a).



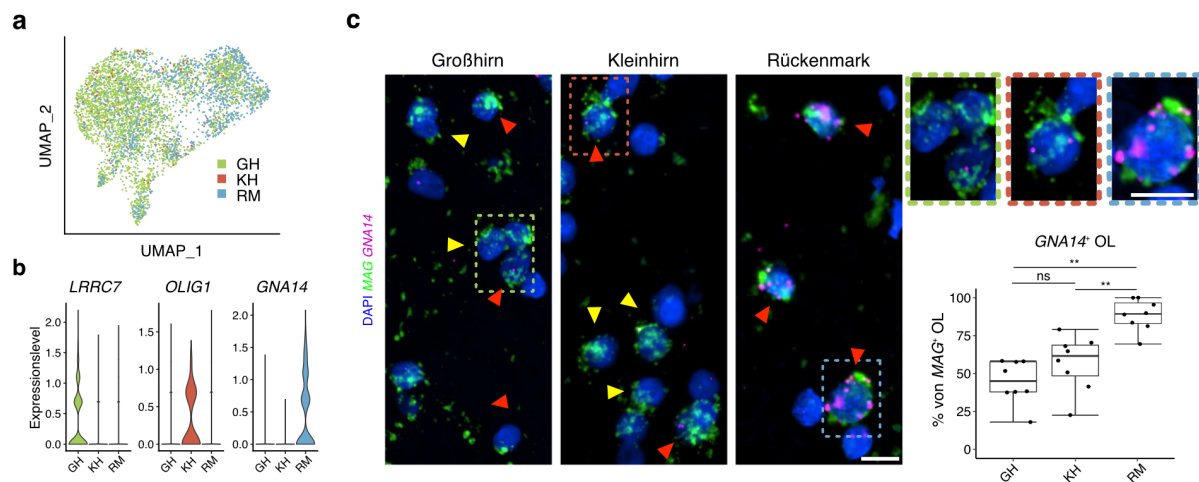
**Abbildung 10: Regionale Diversität in MS-Astrozyten.** **a** Heatmap für die regionsspezifischen Gene der DGE-Analyse in MS-Astrozyten. Alle signifikanten Gene sind enthalten ( $p < 0,05$ ). Das Balkendiagramm rechts zeigt die basierend auf den regionsspezifischen Genen errechneten GO-Terme. Die Abszisse gibt an, wie viele Gene dem jeweiligen GO-Term zugerechnet wurden. **b** Venn-Diagramm, welches die Schnittmenge der regionsspezifischen Gene für Astrozyten in Kontroll- und MS-Gewebe zeigt. GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark; KTL, Kontrolle; MS, Multiple Sklerose. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

### 3.2.4 Regionale Diversität von Oligodendrozyten in Kontrollgewebe

Die Untersuchung der Oligodendrozyten in Kontrollgewebe ergab im Vergleich zu den Astrozyten deutlich weniger regionale Unterschiede, was sich in einer begrenzten Anzahl regionsspezifischer Gene basierend auf einer DGE-Analyse zeigte: Vier für das Großhirn, zwei für das Kleinhirn und 83 für das Rückenmark. Als die spezifischsten und gleichzeitig am stärksten exprimierten Gene wurden *LRRC7* für die Oligodendrozyten des Großhirns, *OLIG1* für die des Kleinhirns und *GNA14* für die des Rückenmarks identifiziert (Abb. 11 a, b).

Die spezifische Expression von *GNA14* in den Oligodendrozyten der weißen Substanz des Rückenmarks wurde mittels In-situ-Hybridisierung bestätigt. Obwohl *GNA14* auch in anderen ZNS-Regionen nachweisbar war, zeigte sich die stärkste

Expression dieses Gens in *MAG*-exprimierenden Oligodendrozyten der weißen Substanz des Rückenmarks (Abb. 11c).



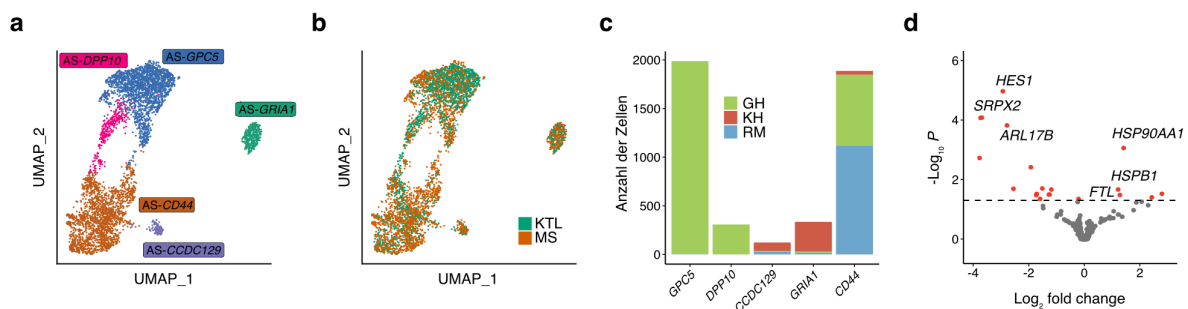
**Abbildung 11: Regionale Diversität in Kontroll-Oligodendrozyten.** **a** UMAP-Plot für Oligodendrozyten aus Kontrollgewebe aller drei ZNS-Regionen. Die Farbkennzeichnung stellt den regionalen Ursprung der Zellen dar. **b** Expression der regionsspezifischen Marker *LRRC7*, *OLIG1* und *GNA14* in Kontroll-Oligodendrozyten aller drei ZNS-Regionen. **c** RNA in-situ-Hybridisierung für *GNA14* in Kombination mit dem bekannten Oligodendrozyten-Marker *MAG*. Gelbe Pfeilspitzen markieren Oligodendrozyten, die *MAG* exprimieren, aber nicht *GNA14* (*MAG*<sup>+</sup>). Rote Pfeilspitzen markieren Oligodendrozyten, die zusätzlich *GNA14* exprimieren (*GNA14*<sup>+</sup>/*MAG*<sup>+</sup>). Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m (sowohl Übersichtsbild wie auch Vergrößerung). Der Box-Plot zeigt die Ergebnisse der regionalen Quantifizierungsdaten. Die Daten sind dargestellt als Prozentsatz der doppelt-positiven (*GNA14*<sup>+</sup>/*MAG*<sup>+</sup>) im Vergleich zu allen Oligodendrozyten (*MAG*<sup>+</sup>). Es wurde zunächst auf Vorliegen einer Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Anschließend wurde der Kruskal-Wallis-Test zur weiteren Analyse genutzt. Der Vergleich der einzelnen Gruppen wurde mittels des paarweisen Wilcoxon-Tests mit Bonferroni-Korrektur berechnet (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark; OL, Oligodendrozyten; ns, nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

### 3.2.5 Transkriptomische Veränderungen in MS-Astrozyten

Als nächstes erfolgte eine Analyse der transkriptomischen Reaktivität in Gliazellen in MS. Hierfür wurden die Zellkerne von Kontroll- und MS-Gewebe gemeinsam untersucht, was eine Differenzierung in homöostatische (Zellen von Kontrollgewebe sowie aus dem läsionsfreien Teil des MS-Gewebes) und reaktive Zellen (hauptsächlich Zellen aus dem Läsionsgebiet in MS-Gewebe) ermöglichte. Fünf unterschiedliche Astrozytenpopulationen wurden hierbei unterschieden (Abb. 12a, b). Manche der gefundenen Subtypen waren bereits in anderen Projekten verschiedenen Subregionen zugeordnet worden. AS-*GPC5* zeigte beispielsweise hohe Expressionslevel an bekannten Markergenen von Astrozyten der grauen Substanz wie *GPC5* und *SLC1A2*<sup>27</sup>. AS-*GRIA1* beinhaltete hohe Expressionslevel an *PAX3*, *ADAMTSL1* und

*GRIA1*, wobei *GRIA1* bekanntermaßen mit Bergmann Glia assoziiert ist<sup>99</sup>. *AS-CD44* zeigte hohe Expressionslevel an *CPAMD8* und *CD44*, welches ein bekanntes Markergen für subkortikale Astrozyten der weißen Substanz ist<sup>27</sup>. Zusätzlich wurden zwei weitere Astrozytenpopulationen identifiziert (*AS-DPP10* und *AS-CCDC219*), für die eine Zuordnung zu einer genaueren Funktion oder Region basierend auf der aktuellen Literatur nicht möglich war. Während das *AS-CD44* Cluster hauptsächlich aus subkortikalen und spinalen Astrozyten konfiguriert war, zeigten *AS-GPC5* und *AS-DPP10* größtenteils einen Ursprung der zerebralen grauen Substanz an. Die beiden letzten Cluster *AS-GRIA1* und *AS-CCDC219* hatten einen zerebellären Ursprung (Abb. 12c).

Zur Untersuchung der transkriptomischen Reaktivität von Astrozyten in MS Gewebe wurde eine DGE-Analyse für das Cluster *AS-CD44* durchgeführt. Hierbei wurden 16 DEGs in subkortikalen Astrozyten identifiziert, sowie 21 DEGs in spinalen Astrozyten. Gene wie *ARL17B*, *HES1* und *SRPX2* zeigten niedrigere Expressionslevel in spinalen MS Astrozyten des Subtyps *AS-CD44*, wohingegen sich für *HSP90AA1*, *HSPB1* und *FTL* erhöhte Expressionslevel in spinalen Astrozyten aus MS Gewebe ergaben (Abb. 12d). In zerebralen Astrozyten zeigten sich Gene wie *TUBA1B* und *ACTB* erhöht sowie *AL589740.1* erniedrigt exprimiert in MS.

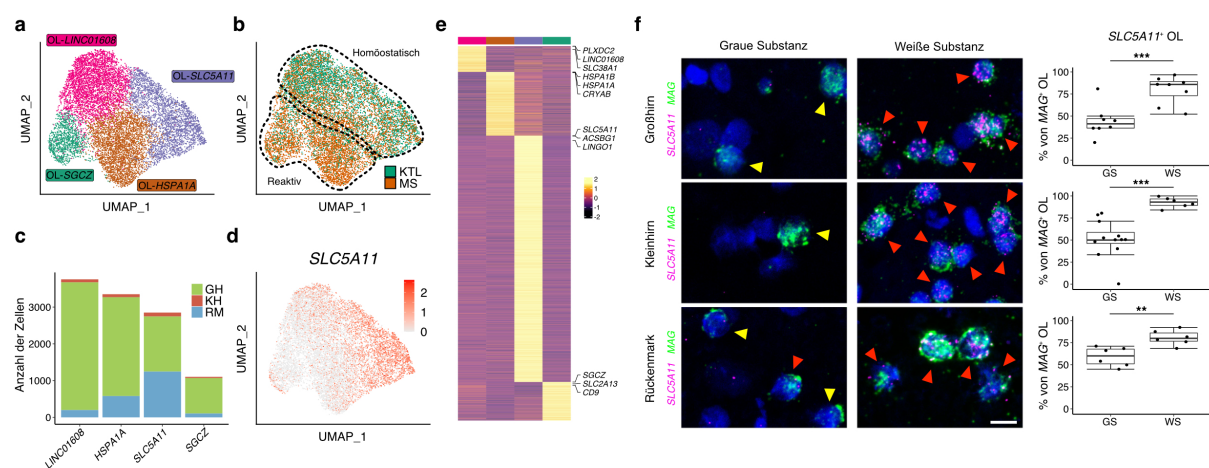


**Abbildung 12: Subtypdiversität in Kontroll- und MS-Astrozyten.** **a** Astrozyten-Subtypen im Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark von Kontroll- und MS-Gewebe. **b** Gleiche Darstellung wie in (a), wobei die Farbkennzeichnung die Herkunft aus Kontroll- oder MS-Proben darstellt. **c** Astrozyten-Subtyp-Fractionen je nach ZNS-Region. **d** Vulkanplot mit DEGs zwischen Kontroll- und MS-Proben. Die DEGs sind für *CD44*<sup>+</sup> Astrozyten-Subtypen aus dem Rückenmark dargestellt. Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene sind rot eingefärbt (adjustiertes  $p < 0.05$ ). AS, Astrozyten; KTL, Kontrolle; MS, Multiple Sklerose; GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

### 3.2.6 Transkriptomische Veränderungen in MS-Oligodendrozyten

Um eine Untersuchung der homöostatischen und reaktiven Subtypen (siehe auch 3.2.5) von Oligodendrozyten zu ermöglichen, erfolgte eine gemeinsame Analyse aller Zellkerne, die als Oligodendrozyt identifiziert wurden (gemeinsame Analyse aller ZNS-Regionen sowie Gewebe von gesunden und MS Spendern). Hierbei konnten vier verschiedene Subtypen identifiziert werden, von welchen zwei als homöostatisch (OL-*LINC01608* und OL-*SLC5A11*, Ursprung gleichermaßen von MS- und Kontrollgewebe) und zwei als reaktiv (OL-*SGCZ* und OL-*HSPA1A*, Ursprung nahezu ausschließlich von MS-Gewebe) klassifiziert werden konnten (Abb. 13a, b). Da sich in den beiden reaktiven Subtypen hohe Genexpression vor allem an Genen zeigte, die mit metabolischer Erschöpfung und Zellstress assoziiert sind und diese somit vermutlich Zellkerne darstellen, welche bereits deutlich verändert sind, wurde die weitere Analyse für die homöostatischen Subtypen durchgeführt. Das Cluster OL-*SLC5A11* zeigte hohe Expression an *ACSBG1* und *LINGO1* und enthielt eine nahezu ausgeglichene Anzahl an spinalen und zerebralen Oligodendrozyten, sowie einige wenige Oligodendrozyten zerebellären Ursprungs (Abb. 13 c, d).

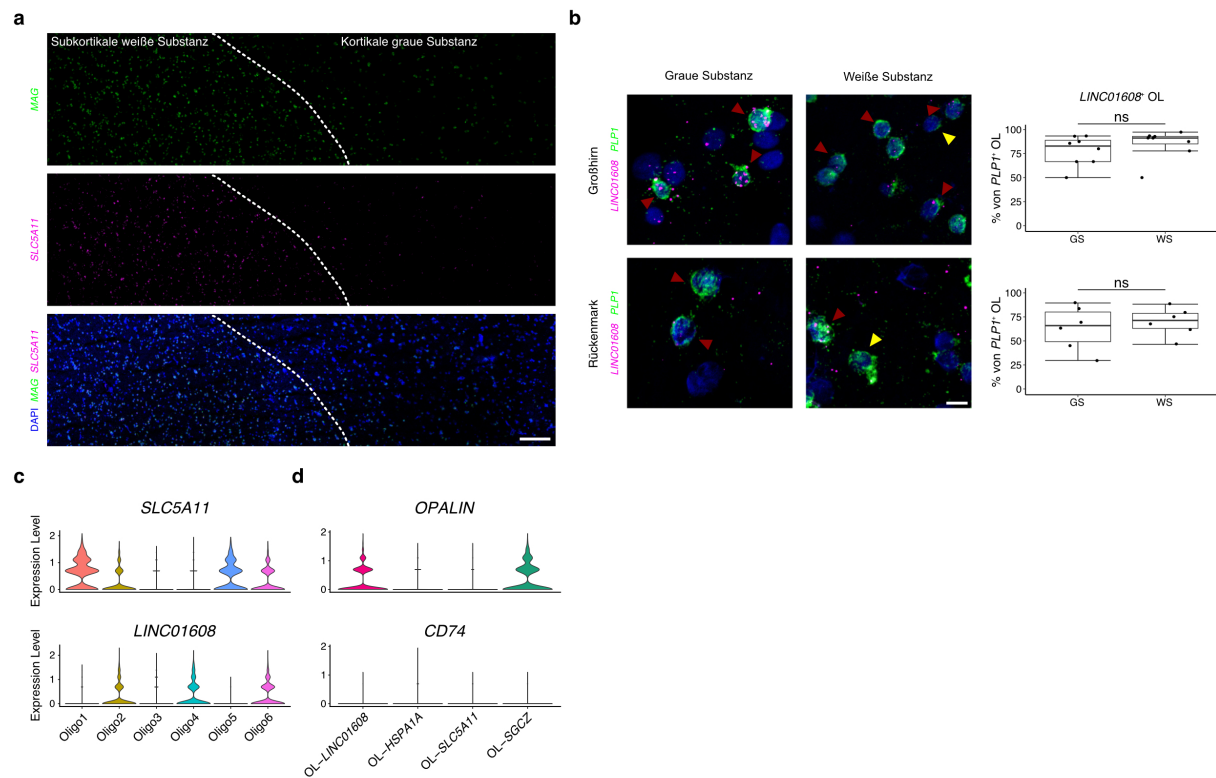
Die Untersuchung der räumlichen Verteilung der Oligodendrozyten-Subtypen mittels smFISH (single-molecule Fluorescence in situ Hybridization) zeigte eine starke Assoziation der *SLC5A11*-Expression mit Oligodendrozyten in den Fasertrakten der weißen Substanz aller drei ZNS-Regionen (Abb. 13f, Abb. 14a).



**Abbildung 13: Oligodendrozyten-Subtypen in Kontroll- und MS-Gewebe.** **a** Oligodendrozyten (OL)-Subtypen im Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark von Kontroll- und MS-Gewebe. **b** OL-Subtypen, gefärbt nach ihrer Herkunft aus Kontroll- oder MS-Proben. Bemerkenswert ist, dass das Clustering eine Trennung in homöostatische und reaktive Subtypen zeigt. **c** OL-Subtyp-Fractionen nach ZNS-Regionen. **d** UMAP-Plot, welcher die spezifische Expression des OL-Subtyp-Markergens *SLC5A11* zeigt. **e** Heatmap, welche die

Expression der subtypspezifischen Gencluster zeigt. Für jeden Subtyp sind drei repräsentative Gene in der Heatmap annotiert. Der Farbbalken für die Cluster entspricht den Farben für die Subtypen in (a). **f** RNA in situ Validierung des subregionalen OL-Markergens *SLC5A11* der weißen Substanz. Die gelben Pfeilspitzen markieren *MAG*-exprimierende (*MAG*<sup>+</sup>) OL, während rote Pfeilspitzen *SLC5A11*/*MAG*-exprimierende (*SLC5A11*<sup>+</sup>/*MAG*<sup>+</sup>) OL markieren. Die Färbung wurde für alle drei ZNS-Regionen durchgeführt; das Bild der zerebellären grauen Substanz wurde in der Molekularschicht aufgenommen; die Quantifizierung der grauen Substanz wurde sowohl in der Körnerzell- als auch in der Molekularschicht durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Die Box-Plots zeigen *SLC5A11*<sup>+</sup> OL (*SLC5A11*<sup>+</sup>/*MAG*<sup>+</sup>) als Prozentsatz aller OL (*MAG*-exprimierende Zellen, *MAG*<sup>+</sup>). Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde der Welch's t-Test für die statistische Analyse verwendet, \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001. OL, Oligodendrozyten; GH, Großhirn; KH, Kleinhirn; RM, Rückenmark; GS, graue Substanz; WS, weiße Substanz. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

*LINC01608* zeigte dagegen sowohl in Regionen der grauen als auch der weißen Substanz eine hohe Expression in Oligodendrozyten (Abb. 14b). Zur Validierung der Spezifität unseres Ansatzes wurde die Expression subregionaler Oligodendrozyten-Marker-Gene mit Daten aus einem zuvor veröffentlichten Datensatz, der aus menschlichen subkortikalen zerebralen Gewebeproben (Kontrollen und MS) stammte, verglichen<sup>42</sup>. Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch in diesem Datensatz eine Unterteilung der Oligodendrozytenpopulationen basierend auf den Markergenen *SLC5A11* und *LINC01608* möglich ist. Umgekehrt ließ sich nachweisen, dass die Expression von *OPALIN*, einem bekannten Oligodendrozyten-Markergen, mit dem *LINC01608*- und *SGCZ*-Subtyp, aber nicht mit Oligodendrozyten der weißen Substanz, assoziiert war (Abb. 14d). *CD74*, ein Markergen, das mit der Antigenpräsentation in reaktiven Oligodendrozyten in Verbindung steht, zeigte in diesem Datensatz nur eine geringe Expression in der MS-spezifischen *HSPA1A*-Population (Abb. 14d)<sup>42</sup>.



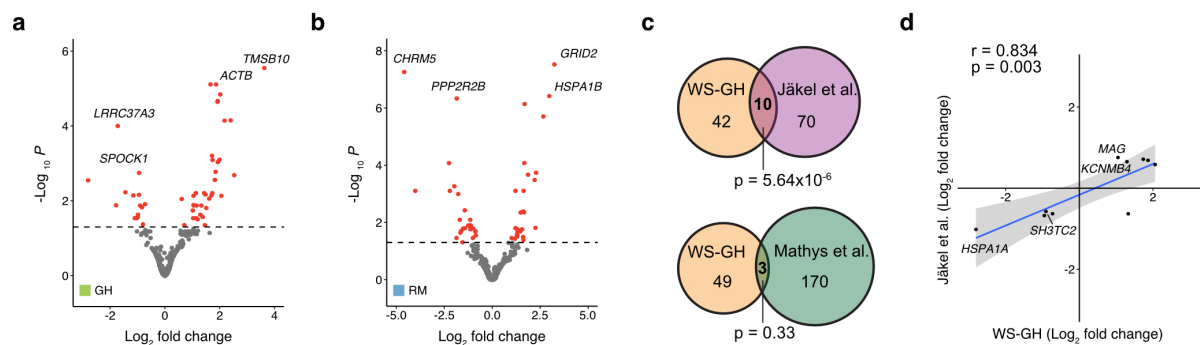
**Abbildung 14: Subregionale Diversität von homöostatischen und reaktiven Oligodendrozyten.** **a** RNA in situ Validierung des subregionalen OL-Markergens *SLC5A11* als spezifisch für die weiße Substanz. Maßstabbalken: 150  $\mu$ m. **b** RNA in situ Validierung des OL-Subtyp-Markergens *LINC01608*. Gelbe Pfeilspitzen markieren einfach positive (*PLP1* exprimierende, *PLP1*<sup>+</sup>) OL, während rote Pfeilspitzen doppelt positive (*LINC01608/PLP1* exprimierende, *LINC01608*<sup>+</sup>/*PLP1*<sup>+</sup>) OL markieren. Die Färbungen sind für das Großhirn und Rückenmark dargestellt. Der Maßstabbalken entspricht 10  $\mu$ m. Die Box-Plots zeigen *LINC01608*<sup>+</sup> OL (*LINC01608*<sup>+</sup>/*PLP1*<sup>+</sup>) als Prozentsatz aller OL (*PLP1*-exprimierende Zellen, *PLP1*<sup>+</sup>). Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für die statistische Analyse verwendet (\**p* < 0,05). **c** Violinplots, die die Expression der OL-Subtyp-Marker *SLC5A11* und *LINC01608* in den OL-Subtypen von Jäkel et al. zeigen<sup>42</sup>. **d** Violinplots, die die Expression der OL-Subtyp-Marker von Jäkel et al. in allen vier OL-Subtypen zeigen. GS, graue Substanz; WS, weiße Substanz; OL, Oligodendrozyten; ns, nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

### 3.2.7 MS-assoziierte Oligodendrozyten der weißen Substanz zeigen eine promyelinisierende Signatur

Im Folgenden wurde eine detaillierte DGE-Analyse für die *SLC5A11*-exprimierenden Oligodendrozyten mit spinaler und zerebraler Herkunft durchgeführt, wobei 52 dysregulierte Gene pro Population identifiziert werden konnten. Eine Analyse für den zerebellären Subtyp war aufgrund einer sehr geringen Zellzahl statistisch nicht möglich.

Um zu überprüfen, ob diese Gene spezifisch für die Pathologie der MS angereichert sind, wurden die DEGs der zerebralen Population (WS-GH) mit den DEGs aus einer

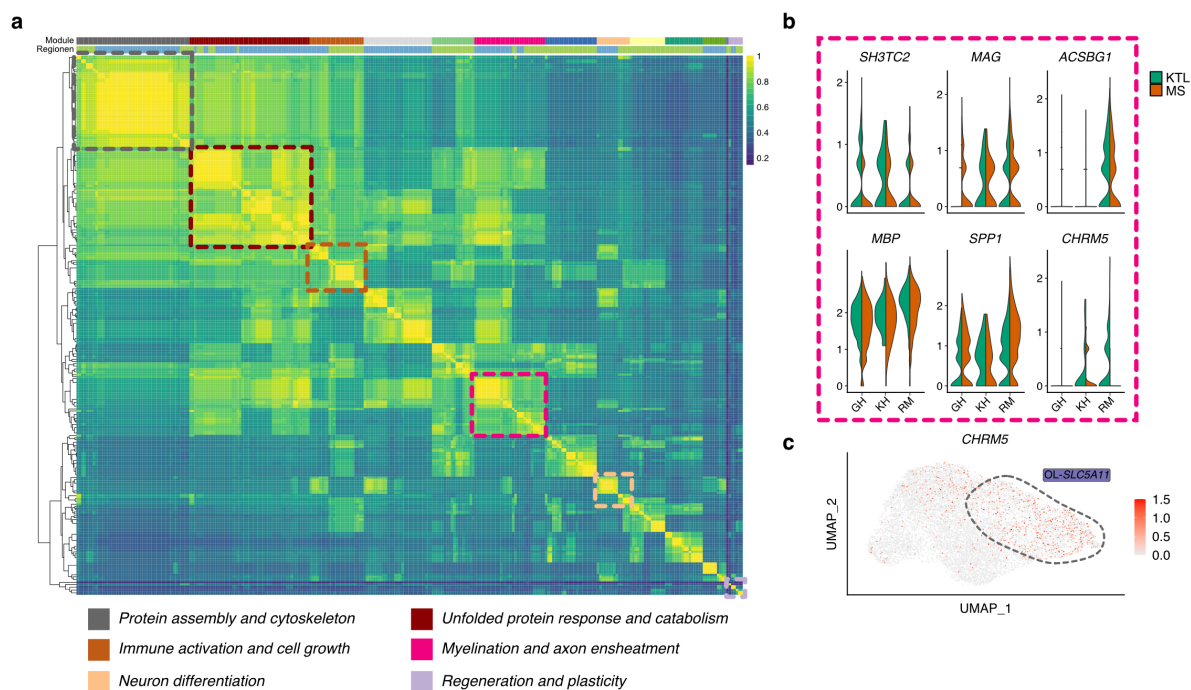
ähnlichen humanen MS-snRNA-seq-Studie verglichen<sup>42</sup>. Hierbei wurden entsprechend die subkortikalen Oligodendrozytenpopulationen, in denen die *SLC5A11*-Expression angereichert war, zum Vergleich herangezogen (vgl. Abb. 14c). Dabei konnte eine starke Überlappung der OL-*SLC5A11*-DEGs zwischen den beiden Studien beobachtet werden, während die Überlappung nicht signifikant war, wenn ein Vergleich mit einem anderen humanen zerebralen snRNA-seq-Datensatz erfolgte, der aus Kontroll- und Alzheimer-Gewebe gewonnen wurde (Abb. 15c)<sup>100</sup>. Weiterhin zeigte sich, dass gemeinsame DEGs beider MS-snRNA-seq-Studien (Jäkel et al. und Trobisch et al.) in ähnlicher Weise dysreguliert waren, wobei *MAG/KCNMB4* hochreguliert und *SH3TC2/HSPA1A* in MS OL-*SLC5A11*-Zellen herunterreguliert waren (Abb. 15d).



**Abbildung 15: Interregionale Oligodendrozyten der weißen Substanz zeigen promyelinisierende Signaturen.** **a, b** Vulkandiagramme zeigen unterschiedlich exprimierte Gene zwischen Kontroll- und MS-Proben. **a** Die DEGs sind für *SLC5A11*<sup>+</sup> OL aus dem Großhirn dargestellt. **b** Die DEGs sind für *SLC5A11*<sup>+</sup> OL aus dem Rückenmark dargestellt. Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene sind rot eingefärbt (adjustiertes  $p < 0,05$ ). **c** Die Venn-Diagramme zeigen die Überlappung von DEGs des zerebralen (GH) *SLC5A11*<sup>+</sup> OL-Subtyps mit DEGs der OL-Subtypen von Jäkel et al.<sup>42</sup> (oberes Feld) und Mathys et al.<sup>100</sup> (unteres Feld). Für den Vergleich mit Jäkel et al. wurden OL-Subtypen mit hoher *SLC5A11*-Expression verwendet (vgl. Abb. 14c). Für den Vergleich mit Mathys et al. stand nur ein OL-Subtyp zur Verfügung, der zum Vergleich herangezogen wurde. **d** Pearson-Korrelationsanalyse des log<sub>2</sub>-fold change der überlappenden DEGs zwischen zerebralen *SLC5A11*<sup>+</sup> OL und Jäkel et al. GH, Großhirn; RM, Rückenmark; WS, weiße Substanz; OL, Oligodendrozyten. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Anschließend an die DGE-Analyse wurde eine GO-Term-Anreicherung basierend auf den dysregulierten Genen durchgeführt. Die hierbei identifizierten GO-Terme wurden dann für eine semantische Ähnlichkeitsanalyse genutzt, welche zur Identifizierung von sechs konvergenten Funktionsmodulen führte. Während die ersten drei Module mit zellstressassoziierten Pfaden angereichert waren ("protein assembly and

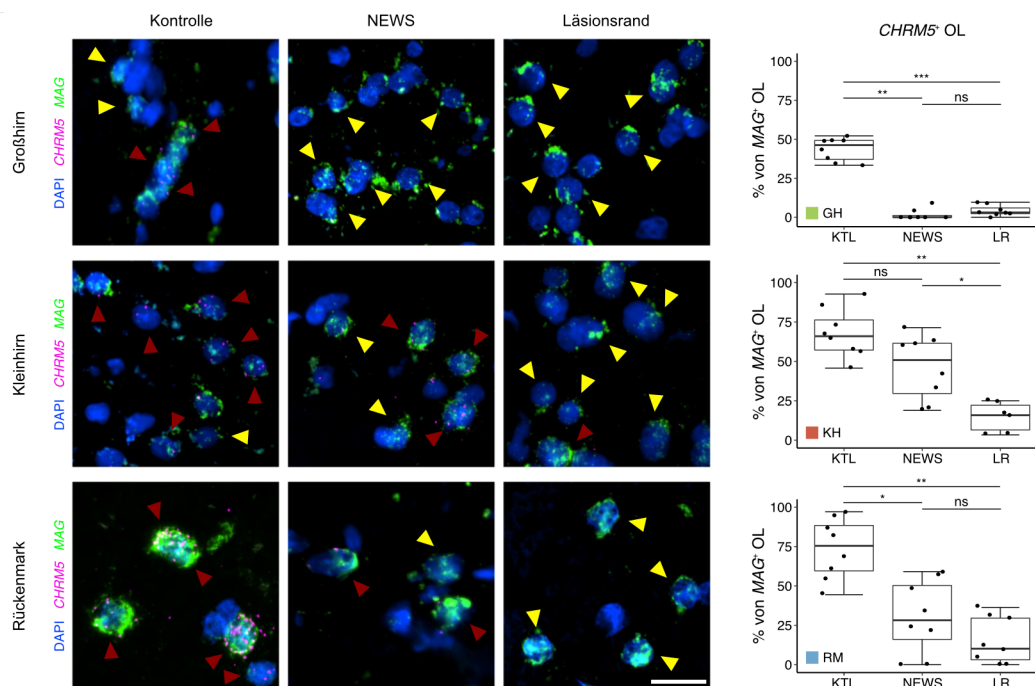
cytoskeleton", "unfolded protein response and catabolism", "immune activation and cell growth"), waren andere mit Myelinisierung, neuronaler Differenzierung und Plastizität assoziiert (Abb. 16a). Da Myelinisierung und Remyelinisierung Schlüsselwege in der Pathophysiologie der MS sind, folgte eine genauere Analyse von Genen, die zum Modul "Myelination and axon ensheathment" beitragen. Hervorzuheben ist hierbei *CHRM5*, ein Gen, das den muskarinischen Acetylcholinrezeptor M5 kodiert, und in Oligodendrozyten der weißen Substanz des Rückenmarks bei MS signifikant herunterreguliert war (Abb. 16b, c). Myelin assoziierte Transkripte wie *MAG* und *MBP* zeigten sich dagegen hochreguliert (Abb. 16b).



**Abbildung 16: Semantische Ähnlichkeitsanalyse dysregulierter Signalwege.** **a** Die Heatmap zeigt die berechneten Korrelationen zwischen den identifizierten GO-Termen, welche sich basierend auf den in Abb. 15 a und b gezeigten dysregulierten Genen angereichert zeigten. Die hierarchische Gruppierung der GO-Begriffe ergab funktionelle Module, die durch den oberen Farbbalken dargestellt sind. Die Zugehörigkeit der Gencluster zu ihrem regionalen Ursprung ist im unteren Farbbalken kodiert (Großhirn = grün, Rückenmark = blau). Sechs Cluster zeigten hierbei Überlappungen zwischen den beiden ZNS-Regionen. GO-Terme, die mit einem adjustierten  $p < 0,1$  identifiziert wurden, sind enthalten. **b** Violinplots zeigen die Expression dysregulierter Gene in Kontroll- und MS-Proben. **c** UMAP-Plot, der die Expression von *CHRM5* im OL-*SLC5A11*-Subtyp der weißen Substanz zeigt. OL, Oligodendrozyten. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>.

Um die spezifische Rolle von *CHRM5* weiter zu erforschen, wurden Kontroll- und MS-Gewebe mittels smFISH untersucht. Hierbei zeigte sich in allen drei ZNS-Regionen sowohl in normal erscheinenden Arealen als auch in Läsionsrandbereichen eine

ausgeprägte Herabregulierung von *CHRM5* in *MAG*-positiven Oligodendrozyten der weißen Substanz (Abb. 17).



**Abbildung 17: RNA in situ Validierung der mit MS-Läsionen assoziierten Herunterregulierung von *CHRM5*.** Gelbe Pfeilspitzen markieren *MAG*-exprimierende (*MAG*<sup>+</sup>) OL, während rote Pfeilspitzen *CHRM5*/*MAG*-exprimierende (*CHRM5*<sup>+</sup>/*MAG*<sup>+</sup>) OL markieren. Die Färbung wurde für alle drei ZNS-Regionen durchgeführt. Der Maßstabsbalken zeigt 10  $\mu$ m an. Die Box-Plots zeigen *CHRM5*<sup>+</sup> OL (*CHRM5*<sup>+</sup>/*MAG*<sup>+</sup>) in Prozent aller OL (*MAG*-exprimierende Zellen, *MAG*<sup>+</sup>). Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde der Kruskal-Wallis-Test für die statistische Analyse verwendet. Für den Vergleich jeder Gruppe wurde der paarweise Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . OL, Oligodendrozyt; NEWS, normal erscheinende weiße Substanz; LR, Läsionsrand; KTL, Kontrolle; MS, Multiple Sklerose; ns, nicht signifikant.

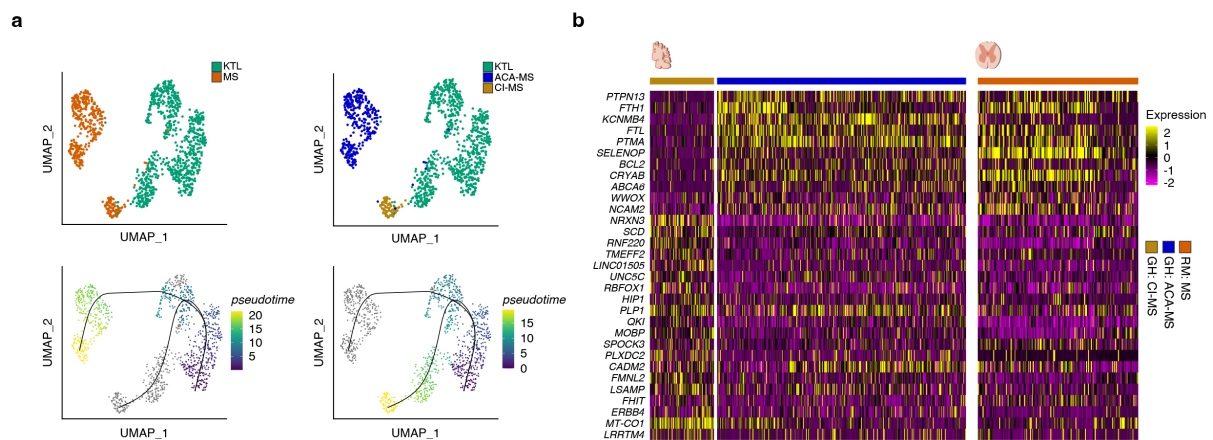
Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>

Weitere Gene des *SLC5A11*-Subtyps der weißen Substanz, die in dem Modul "Myelination and axon ensheatment" enthalten sind, sind *SH3TC2* und *ACSBG1*, zwei Gene, deren Beteiligung an der Myelinisierung bekannt ist (Abb. 16b)<sup>101,102</sup>.

### 3.2.8 Überlappende transkriptomische Antwort von Oligodendrozyten während der Progression von MS-Läsionen

Die alleinige Analyse der zerebralen *SLC5A11*<sup>+</sup> Oligodendrozyten zeigte ein deutliches Clustering entsprechend ihrem jeweiligen Entzündungsstadium, was eine Einteilung der Cluster anhand des Ursprungs aus Kontrollgewebe, Gewebe aus

akut/chronisch-aktiven Läsionen und Gewebe aus chronisch-inaktiven Läsionen ermöglichte (Abb. 18a, obere Reihe). Um mögliche Entwicklungsstadien dieser Zellen im Verlauf der Entzündungsprogression zu modellieren, wurde eine Pseudotime-Trajektorienanalyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.12). Diese Analyse ergab zwei unterschiedliche Entwicklungszweige: Ein Zweig endete im Cluster mit akut/chronisch-aktivem Ursprung, das ein frühes Läsionsstadium repräsentiert, während der andere Zweig in dem Cluster mit chronisch-inaktivem Ursprung mündete und somit ein spätes Läsionsstadium darstellt (Abb. 18a, untere Reihe). Auf Grundlage dieser Trajektorienanalyse wurde anschließend eine differentielle Genexpressionsanalyse zwischen den Endpunkten der beiden Entwicklungszweige durchgeführt, wodurch charakteristische Genmuster für jedes Läsionsstadium identifiziert werden konnten (Abb. 18b). Ein besonders bemerkenswertes Ergebnis war hierbei die überlappende Genexpression zwischen spinalen Oligodendrozyten und akut/chronisch-aktiven zerebralen Oligodendrozyten der weißen Substanz (Abb. 18b). Dies deutet darauf hin, dass Oligodendrozyten im Frühstadium von MS-Läsionen in verschiedenen ZNS-Regionen eine ähnliche transkriptomische Reaktion zeigen.



**Abbildung 18: Läsionsprädiktion mittels *pseudotime* Analyse.** **a** Obere Reihe: UMAP-Darstellung von *SLC5A11*-exprimierenden (*SLC5A11*<sup>+</sup>) zerebralen Oligodendrozyten (OL). Untere Reihe: Mittels Trajektorieninferenz von zerebralen *SLC5A11*<sup>+</sup> Oligodendrozyten werden zwei verschiedene Zweige entsprechend dem Entzündungsstadium identifiziert. Zu beachten ist, dass die Farbgebung den *Pseudotime*-Score angibt; graue Zellen haben keinen Wert für den jeweiligen Abstammungszweig. **b** Heatmap-Darstellung von differenziell-exprimierten Genen basierend auf der *Pseudotime*-Analyse. Es werden Gene, die als differenziell-exprimiert zwischen den Endpunkten der beiden Zweige in (a) klassifiziert wurden (angepasstes  $p < 0,05$ ), für alle *SLC5A11*<sup>+</sup> OL sowohl aus zerebralen als auch aus spinalen MS-Proben dargestellt. OL, Oligodendrozyt; KTL, Kontrolle; MS, Multiple Sklerose; ACA, akut/chronisch-aktiv; CI, chronisch-inaktiv; RM, Rückenmark; GH, Großhirn. Abbildung modifiziert nach Trobisch et al., 2022<sup>1</sup>

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Einleitung

Trotz wirksamer Kontrolle der peripheren Immunantwort bei schubförmig remittierender MS wird bei Patienten eine fortschreitende Atrophie und eine Verschlechterung der Symptome über verschiedene funktionelle Systeme und anatomische Regionen hinweg beobachtet<sup>47,103</sup>. Ein vertieftes Verständnis der regionalen Diversität neuronaler und glialer Subtypen sowie ihrer unterschiedlichen transkriptomischen Antworten auf entzündliche Demyelinisierung könnte entscheidend zur Aufklärung der kompartimentalisierten Pathologie bei MS beitragen<sup>13</sup>. Zudem könnte die Identifikation dieser räumlichen Subtypen die Entwicklung von regions- und zelltypspezifischen Biomarkern vorantreiben und die Entwicklung gezielter Therapien für spezifische Zelltypen, die an der Progression der MS beteiligt sind, unterstützen. In dieser Dissertation wurde eine umfassende Analyse der regionalen Heterogenität und der zelltypspezifischen Reaktivität im ZNS im Kontext der MS durchgeführt. Ziel war es, ein detailliertes Verständnis der vielfältigen Rollen zu erlangen, die Gliazellen in unterschiedlichen ZNS-Regionen einnehmen. Mittels fortschrittlicher Methoden wie der Einzelzellsequenzierung konnten die Genexpressionssignaturen von Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten in verschiedenen ZNS-Regionen untersucht und regionsspezifische Signaturen charakterisiert werden. Darüber hinaus wurden die spezifischen Reaktionsmuster dieser Zelltypen im Rahmen der MS-Pathologie analysiert und zwischen den Regionen verglichen.

Die Studie bestätigt und erweitert das Verständnis der MS als eine Erkrankung, die durch eine außergewöhnliche zelluläre und regionale Diversität gekennzeichnet ist. Die identifizierten transkriptomischen Signaturen einzelner Gliazelltypen bieten neue Einblicke in die zellulären Mechanismen, die der regionalen Varianz in der Krankheitsmanifestation und -progression zugrunde liegen. Diese Erkenntnisse tragen wesentlich dazu bei, zu verstehen, wie die spezifische Umgebung innerhalb des ZNS die Funktion und das Verhalten der Gliazellen in MS beeinflusst, und heben die Bedeutung einer differenzierten Betrachtung der ZNS-Regionen in der MS-Forschung hervor.

Die in der Einleitung formulierten Forschungsfragen konnten gezielt adressiert werden. Es wird nicht nur die Existenz von Unterschieden in den transkriptomischen Eigenschaften der Gliazellen zwischen verschiedenen ZNS-Regionen illustriert,

sondern auch aufgezeigt, wie die Reaktivität dieser Zellen im Kontext der MS-Pathologie variiert. Insbesondere wurde die Entdeckung gemacht, dass bestimmte Gliazelltypen in spezifischen ZNS-Regionen einzigartige Muster der Genexpression aufweisen, die sie möglicherweise prädisponieren oder vor den schädigenden Auswirkungen der MS schützen.

Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, regionale Unterschiede und die spezifische Reaktivität von Gliazellen in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für MS zu berücksichtigen. Zudem eröffnen sie neue Wege für die Forschung, indem sie spezifische Zielmoleküle identifizieren, die für die Entwicklung von Therapien genutzt werden könnten, die auf die Modulation der Gliazellfunktion und -reaktivität abzielen.

### **4.2 Regionale Heterogenität des ZNS**

Mit einem Fokus auf Gewebe von gesunden Spendern konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass es eine hohe neurogliale Heterogenität zwischen den verschiedenen ZNS-Regionen basierend auf unterschiedlichen Genexpressionsmustern gibt. Die neuronalen Subtypen zeigten eine sehr starke regionale Identität und dabei kaum Überlappung mit Signaturen von neuronalen Zellen einer anderen Region. Bei Betrachtung der regionalen Heterogenität im Bereich der glialen Zelltypen (mit einem Fokus auf Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen) zeigte sich zwar prinzipiell eine homogenere Verteilung, allerdings auch hier eine teils deutliche regionale Signatur. Im Allgemeinen ergaben sich basierend auf einer Korrelationsanalyse die deutlichsten interregionalen Unterschiede für die verschiedenen Astrozytenpopulationen.

#### **4.2.1 Heterogenität der Astrozyten**

Astrozyten bilden die Mehrheit der zentralnervösen Gliazellen und nehmen verschiedenste Aufgaben wahr. Hierzu zählen beispielsweise die Aufrechterhaltung des zellulären Mikromilieus mittels Ionen- und Wassertransportern, die Aufnahme und Regulation von Neurotransmittern, eine stützende Funktion nach Gewebeschädigung (Sklerose) und eine Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke<sup>9-11</sup>. Angesichts dieser vielfältigen und hochspezifischen Funktionen stellt sich die Frage, ob sie tatsächlich von einer einzigen homogenen Zellpopulation erfüllt werden können.

Bereits seit vielen Jahren ist eine morphologische Unterteilung von Astrozyten in einen sogenannten protoplasmatischen Typ (vorwiegend in der grauen Substanz lokalisiert) und einen fibrillären Typ (vorwiegend in der weißen Substanz lokalisiert) bekannt<sup>9</sup>. Erst mit der Entwicklung moderner Methoden ergab sich in den letzten Jahren eine zunehmende Charakterisierung verschiedener Astrozytensubtypen auch auf molekularer und funktionaler Ebene.

So ergab sich eine Unterteilung der Astrozyten in die sogenannten A1- und A2-Subtypen. A1-Astrozyten entstehen in der Regel durch Aktivierung von Mikroglia und zeichnen sich durch neurotoxische Eigenschaften aus. Diese Astrozyten können Neuronen und reife Oligodendrozyten schnell abtöten und tragen so zur Neurodegeneration bei. Im Gegensatz dazu produzieren A2-Astrozyten neurotrophe Faktoren und fördern das Überleben und die Reparatur von Neuronen, was auf eine protektive Rolle hindeutet<sup>18,20,104</sup>.

Weiterhin wurden zuletzt vermehrt Studien basierend auf Transkriptomanalysen durchgeführt, die die molekulare Diversität von Astrozyten zwischen verschiedenen Hirnregionen untersuchten. Hierbei wurden beispielsweise zwischen Astrozyten des Hippocampus und des Kleinhirns unterschiedliche regionale Signaturen gefunden, die auf einen möglichen Adaptationsmechanismus auf lokale Anforderungen hindeuten können<sup>26</sup>. In Einklang hierzu konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass Astrozyten der jeweiligen Region (Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark) deutliche regionale Signaturen aufweisen, die in der Identifikation neuer Markergene (*ADGRV1*, *GRIA1*, *CPAMD8*) resultierte, wobei eine solche markerspezifische Unterteilung der Astrozyten zuvor nicht gelungen war. Wichtig zu beachten ist hierbei, dass es sich bei *GRIA1* um ein Markergenen spezifisch für Bergman-Glia handelt.

Aufbauend auf den als regionsspezifisch identifizierten Genen ergaben sich zudem unterschiedliche Signalwege, die für diese Gene identifiziert werden konnten: Transsynaptische Signalübertragung und Neurotransmission waren die am häufigsten vertretenen Signalwege in Astrozyten des Großhirns, während Ionentransportsignalwege stark im Kleinhirn vertreten waren. Rückenmarksastrozyten hingegen zeigten eine besondere Anreicherung für metabolische Signalwege, wie z.B. der anaeroben Glykolyse. Es ergeben sich damit klare Hinweise, dass Astrozyten der jeweiligen ZNS-Region für ihre Region spezifische Aufgaben wahrnehmen, um unter anderen die residenten Neuronenpopulationen bestmöglich zu unterstützen.

Im Einklang hierzu konnte bereits eine andere Gruppe zeigen, dass Astrozyten ihre Aufgaben in einer regionsspezifischen Art anpassen können, da sie in manchen Gehirnregionen stärker mit Neuronen interagieren und deren synaptische Aktivität beeinflussen, wohingegen sie in anderen Regionen mehr mit der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beschäftigt sind<sup>105</sup>.

Eine weitere Arbeit, die sich Astrozytenpopulationen auf molekularer Ebene anschaute, analysierte Astrozyten in 13 verschiedenen ZNS-Regionen und fand signifikante Unterschiede in der Genexpression, Morphologie und Funktion. Diese Arbeit unterstrich die Idee, dass Astrozyten nicht nur regional unterschiedlich sind, sondern auch innerhalb einer Region eine große Vielfalt aufweisen können<sup>106</sup>.

Interessanterweise ergab sich aber eine Änderung dieser regionalen Heterogenität, sobald diese im Kontext der MS untersucht wurde. Die Anzahl der als regionsspezifisch identifizierten Gene nahm hierbei drastisch ab. Auch bei der Analyse der Signalwege, denen diese Gene zugeordnet werden konnten, zeigte sich eine gewisse Überlappung. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass trotz einer hohen regionalen Heterogenität im Gesunden, Astrozyten ihre regionsspezifische Signatur teilweise zugunsten inflammatorischer Signalwege verlieren und sich ihre Reaktivität unter dem Einfluss chronischer Neuroinflammation wie bei MS regionsübergreifend angleicht.

### **4.2.2 Heterogenität der Oligodendrozyten**

Die Heterogenität von Oligodendrozyten im gesunden Gehirn ist Gegenstand intensiver Forschung, da ein tieferes Verständnis dieser Zellpopulationen in unterschiedlichen Regionen des ZNS essenziell ist, um ihre Anpassungsmechanismen und funktionellen Rollen besser zu verstehen. Diese Zellen sind entscheidend für die Myelinisierung von Axonen, was die Geschwindigkeit und Effizienz der neuronalen Signalübertragung beeinflusst<sup>38</sup>. Es wurde gezeigt, dass die Heterogenität von Oligodendrozyten durch zahlreiche Faktoren geprägt wird, darunter der Entwicklungsstand der Zellen, der anatomische Standort, die Mikroumgebung und die funktionellen Anforderungen.

Oligodendrozyten weisen je nach ihrer Position im ZNS signifikante Unterschiede in Morphologie und Struktur auf und produzieren in verschiedenen Hirnregionen unterschiedliche Mengen an Myelin. Dies deutet darauf hin, dass die Anzahl, Länge und Dicke der Myelinscheiden stark von der jeweiligen Umgebung und den neuronalen

Bedürfnissen abhängen können<sup>107</sup>. Auch Einzelzellanalysen haben verschiedene Subtypen von Oligodendrozyten identifiziert, die sich in ihrer Genexpression und Funktion unterscheiden. Diese Unterschiede zwischen Oligodendrozyten in verschiedenen ZNS-Regionen legen nahe, dass ihre Heterogenität eng mit ihrer Funktion und ihrem Standort verknüpft ist. Besonders bemerkenswert ist die Identifizierung von Genen, die spezifisch in bestimmten Oligodendrozyten-Subtypen exprimiert werden, was auf eine mögliche Spezialisierung dieser Zellen hindeutet<sup>108</sup>. Die Morphologie der Oligodendrozyten wird zudem durch neuronale Aktivität beeinflusst und die Struktur der Myelinscheiden kann sich je nach Erfahrung und Umwelteinflüssen verändern, was darauf schließen lässt, dass Oligodendrozyten dynamische Eigenschaften besitzen, die es ihnen ermöglichen, auf Veränderungen in ihrer Umgebung zu reagieren. Oligodendrozyten scheinen daher keine statische Zellpopulation zu sein, sondern eine besondere Anpassungsfähigkeit an die Anforderungen neuronaler Netzwerke zu besitzen<sup>109</sup>.

Die Differenzierung und Funktion von Oligodendrozyten werden ebenfalls durch ihre Interaktionen mit anderen Gliazellen, insbesondere Mikroglia und Astrozyten, beeinflusst. Hierbei wird vermehrt die Mikroumgebung betont, die die Anwesenheit bestimmter Moleküle und Zellen in der Nähe von Oligodendrozyten, deren Verhalten und Entwicklung prägen kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Heterogenität von Oligodendrozyten nicht nur durch genetische Eigenschaften, sondern auch durch äußere Einflüsse bestimmt wird<sup>110</sup>. Zudem ist bekannt, dass Mikroglia in verschiedenen ZNS-Regionen unterschiedliche Signale aussenden können, die die Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozyten beeinflussen. Dies weist darauf hin, dass regionale Mikroglia-Interaktionen spezifische Signale zur Förderung der Oligodendrozyten-Dynamik bereitstellen können, was zur Heterogenität dieser Zellen beiträgt<sup>111</sup>.

In dieser Arbeit konnten mithilfe der Single-Nucleus-RNA-Sequenzierung unterschiedliche Genexpressionsprofile von Oligodendrozyten in verschiedenen ZNS-Regionen beobachtet werden, wobei sich die Heterogenität sowohl auf makroskopische Unterschiede zwischen größeren ZNS-Regionen als auch auf mikroskopische Unterschiede innerhalb bestimmter Bereiche, wie der grauen und weißen Substanz, erstreckt. So wurde beispielsweise *GNA14* als spezifischer Marker für spinale Oligodendrozyten identifiziert, während *SLC5A11* und *LINC01608* als spezifische Markergene zwei homöostatischen Oligodendrozytenpopulationen

zugeordnet werden konnten. Interessanterweise konnte der *SLC5A11*<sup>+</sup> Subtyp hierbei vor allem in der weißen Substanz gefunden werden, was auf eine Identifizierung spezifischer Oligodendrozytenmarker, die mit bestimmten Regionen assoziiert sind, hindeutet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Heterogenität von Oligodendrozyten ein komplexes Zusammenspiel von Faktoren widerspiegelt, die von der Entwicklung über die anatomische Lage bis hin zur Interaktion mit anderen Zellen reichen. Bisherige Studien haben eine solide Grundlage für das Verständnis dieser Diversität geschaffen. Die neuesten Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Dissertation gewonnen werden konnten, erweitern dieses Wissen, indem sie aufzeigen, wie sich diese Heterogenität in gesunden Kontrollgehirnen manifestiert und welche spezifischen Marker für die verschiedenen Oligodendrozyten-Subtypen verantwortlich sind. Diese Erkenntnisse könnten wertvolle Einblicke in die Rolle dieser Zellen bei der normalen Gehirnfunktion liefern und mögliche therapeutische Ansatzpunkte für demyelinisierende Erkrankungen eröffnen.

### **4.3 Gliazell-Reaktivität und deren Bedeutung für die Remyelinisierung bei Multipler Sklerose**

#### **4.3.1 Neurogliale Reaktivität in Multipler Sklerose**

Mithilfe der Einzelkern-RNA-Sequenzierung wurden im Rahmen dieser Dissertation verschiedene ZNS-Bereiche analysiert, was tiefgehende Einblicke in Regionenspezifische, aber auch globale Auswirkungen von MS ermöglichte. Diese umfassende Analyse erlaubte es, Veränderungen in der Genexpression zwischen gesunden Kontrollproben und MS-Proben zu identifizieren und zentrale Gene herauszustellen. Ein hervorzuhebendes Ergebnis war hierbei die signifikante Herunterregulierung der Gene *KANSL1* und *ARL17B* in MS-Gewebe. Beide Gene befinden sich auf dem Chromosomenlocus 17q21.31 und sind mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und der Progressiven Supranukleären Blickparese assoziiert<sup>94,95</sup>. Auch für *KANSL1* selbst ist bereits eine krankheitsassoziierte Funktion bekannt: Mutationen im *KANSL1*-Gen können das 17q21.31-Mikrodeletionssyndrom (auch Koolen-de-Vries-Syndrom genannt) auslösen oder zu erhöhtem oxidativen Zellstress führen und damit eine neuronale Dysfunktion bedingen<sup>112-114</sup>. Ihre gemeinsame Lokalisierung und die reduzierte Expression in MS legen nahe, dass sie eine Schlüsselrolle in der Krankheitsentwicklung spielen könnten.

Diese Entdeckung unterstützt die Hypothese, dass MS nicht isoliert betrachtet werden sollte, sondern potenziell mit anderen neurologischen Störungen verknüpft ist.

Ein weiterer zentraler Aspekt ist die beobachtete Verringerung der regionalen Heterogenität in MS-Gewebe. Während gesunde Kontrollproben eine deutliche regionale Vielfalt in der Genexpression aufwiesen, zeigte sich bei MS-Proben eine Konvergenz der Reaktivität, die darauf hindeutet, dass verschiedene ZNS-Regionen ähnlich auf die inflammatorischen Einflüsse der MS reagieren und dabei universelle Signalwege aktiviert werden.

Die Vereinheitlichung der Genexpression legt nahe, dass bestimmte pathologische Mechanismen unabhängig von der spezifischen ZNS-Region auftreten. Dadurch ergeben sich wichtige Implikationen für die Entwicklung zukünftiger Therapien, da zu vermuten ist, dass Behandlungsansätze, die auf diese gemeinsamen Mechanismen abzielen, eine breitere Wirksamkeit entfalten könnten.

Zusammenfassend zeigt die globale Analyse, dass MS nicht nur eine komplexe entzündliche Erkrankung ist, sondern basierend auf einer einheitlichen Reaktivität auch zu einer allgemeinen Verringerung der regionalen Heterogenität im ZNS führt. Die Entdeckung der herunterregulierten Gene *KANSL1* und *ARL17B* sowie die beobachtete Konvergenz der Genexpression bieten wertvolle Erkenntnisse darüber, wie MS das ZNS verändert und welche therapeutischen Ansätze zukünftig vielversprechend sein könnten.

### 4.3.2 Reaktivität der Astrozyten

Astrozyten sind zentrale Zellen des ZNS und erfüllen eine Vielzahl wichtiger Funktionen, darunter die strukturelle und metabolische Unterstützung, die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke sowie die Regulation synaptischer Prozesse<sup>9</sup>. Ihre Bedeutung wird besonders in der Pathologie der Multiplen Sklerose deutlich, bei der die Reaktivität von Astrozyten eine Schlüsselrolle spielt. Diese Reaktivität zeigt sich in komplexen, oft widersprüchlichen Effekten, die sowohl die Krankheitsprogression fördern als auch Heilungsprozesse unterstützen können<sup>16</sup>.

Reaktive Astrozyten entstehen durch die Antwort der Zellen auf verschiedene externe und interne Reize. Dies kann sowohl zu schützenden als auch zu schädlichen Effekten führen, abhängig vom spezifischen Kontext der Umgebung. In MS-Läsionen können Astrozyten durch die Aktivierung von Mikroglia in einen neurotoxischen Zustand übergehen. Dieser Zustand ist durch die Hochregulation von Komplementfaktoren wie

C3 gekennzeichnet, was zur Ausbildung sogenannter A1-Astrozyten führt. Diese A1-Astrozyten sind in der Lage, Neuronen und ausgereifte Oligodendrozyten schnell zu schädigen, was die neuronale Degeneration und den Verlust von Myelinscheiden fördert, zwei zentrale Merkmale der chronisch progredienten MS-Pathologie<sup>20</sup>.

In aktiven MS-Plaques sind Astrozyten häufig hypertroph, was zu einer verstärkten Bildung von Glianarben führen kann. Diese Narbenbildung ist oft nicht permissiv, was bedeutet, dass sie den Heilungsprozess hemmen kann, indem sie die Remyelinisierung und Regeneration von Nervenzellen behindert. Im Gegensatz dazu zeigen Astrozyten in inaktiven Plaques filamentreiche Strukturen, die eine stabilisierende Wirkung haben könnten und möglicherweise zum Erhalt der Gewebestruktur beitragen<sup>16</sup>. Die Unterschiede in der Reaktivität unterstreichen die Notwendigkeit, Astrozyten in verschiedenen Stadien und Formen der MS differenziert zu betrachten, da sie durch ihre duale Rolle zu einem komplexen Ziel für therapeutische Interventionen werden<sup>13</sup>.

Zusätzlich zu diesen strukturellen und funktionellen Veränderungen wurde im Rahmen dieser Dissertation auch eine detaillierte Analyse der transkriptomischen Reaktivität von Astrozyten in MS durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionen von Astrozyten in verschiedenen Regionen des ZNS, insbesondere im zerebralen und spinalen Bereich, miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass in beiden Regionen bestimmte Gene, die mit metabolischem Stress in Verbindung stehen, hochreguliert waren (z.B. *HSP90AA1*, *HSPB1*, *ACTB*). Diese Genexpressionen deuten darauf hin, dass Astrozyten in MS durch metabolische Herausforderungen besonders belastet werden. Bemerkenswert ist auch die Herunterregulierung des Gens *ARL17B* in spinalen Astrozyten, das zuvor mit einem erhöhten Risiko für neurologische Erkrankungen assoziiert wurde (siehe auch Abschnitt 4.3.1). Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen ZNS-Regionen könnten eine wichtige Rolle bei der regionalen Heterogenität von Astrozyten in der MS-Pathologie spielen.

Trotz der signifikanten regionalen Heterogenität zwischen Astrozyten in gesundem Gewebe weisen die reaktiven Muster in MS bemerkenswerte Ähnlichkeiten auf. Die Ähnlichkeiten könnten auf gemeinsame pathologische Mechanismen hinweisen, die unabhängig von der spezifischen ZNS-Region auftreten. Allerdings gibt es auch spezifische transkriptomische Veränderungen, die regionale Unterschiede in der MS-Pathologie vermuten lassen. Diese regionsspezifischen Unterschiede in der Astrozytenreaktivität könnten potenziell therapeutische Zielstrukturen darstellen und

bieten neue Perspektiven für die Entwicklung von Behandlungsstrategien, die auf die spezifischen Bedürfnisse verschiedener ZNS-Regionen abgestimmt sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Astrozyten in der Pathologie der MS eine vielschichtige und komplexe Rolle spielen. Sie können sowohl schädliche als auch schützende Funktionen übernehmen, je nachdem, wie sie auf entzündliche Reize und genetische Faktoren reagieren. Die verschiedenen Studien betonen die Notwendigkeit, diese Zellen als dynamische Akteure im Krankheitsgeschehen zu betrachten, deren Reaktivität sowohl die Progression der MS vorantreiben als auch Reparaturprozesse ermöglichen kann. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung weiterer Forschung, um die genauen Mechanismen der Astrozytenreaktionen zu verstehen und gezielte therapeutische Ansätze zu entwickeln. Solche Ansätze könnten darauf abzielen, die schützenden Effekte der Astrozyten zu fördern und ihre schädlichen Auswirkungen zu minimieren, um so das Fortschreiten der MS zu verlangsamen und die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern.

### 4.3.3 Reaktivität der Oligodendrozyten

Innerhalb der Oligodendrozytenlinie konnten zwei homöostatische und zwei reaktive Subtypen identifiziert werden. In der smFISH-Analyse wurde ein homöostatischer Subtyp identifiziert, der spezifisch für die Bahnen der weißen Substanz in allen drei ZNS-Regionen ist und sich durch die Markergene *SLC5A11* und *LINGO1* auszeichnet. Für diesen Subtyp wurde eine Herunterregulierung des M5-Muskarinrezeptors (*CHRM5*) beobachtet, während Myelin-assoziierte Transkripte hochreguliert wurden. Diese Ergebnisse könnten auf einen endogenen Reparaturmechanismus in den Oligodendrozyten hinweisen, der in den Bahnen der weißen Substanz bei MS aktiviert ist und die Remyelinisierung fördert.

*LINGO1* ist bekannt für seine Rolle bei der Hemmung der Differenzierung von OVZs, was zu einer Beeinträchtigung der Remyelinisierung führen könnte<sup>115,116</sup>. Besonders interessant ist daher, dass Anti-*LINGO1*-Antikörper und Muskarinrezeptorantagonisten in präklinischen und klinischen Studien bei MS-Patienten eingesetzt wurden und sich teilweise als wirksam erwiesen haben<sup>115,117</sup>. Neben anderen antimuskarinischen Therapien wie Benzotropin wurde auch dem H1-Antagonisten der ersten Generation, Clemastin, eine positive, möglicherweise myelinisierungsfördernde Wirkung bei MS-Patienten zugeschrieben<sup>118,119</sup>. Eine

klinische Folgestudie zeigte tatsächlich eine Verbesserung der Sehfunktion bei Patienten mit Optikusneuritis, die mit Clemastin behandelt wurden<sup>120</sup>. Diese Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf den Muskarinrezeptor M1, mögliche Effekte des Rezeptors M5 wurden bisher nicht diskutiert<sup>118</sup>. Beim Vergleich der Expressionsniveaus von Muskarinrezeptor-Subtypen im gesamten menschlichen ZNS ergab sich jedoch, dass *CHRM5* der am häufigsten vorkommende Rezeptor-Subtyp im ZNS ist. Obwohl dies auf eine wichtige Rolle von *CHRM5* in der MS-Pathologie des menschlichen ZNS hindeutet, sind letztlich weitere funktionelle Studien zum Funktionsverlust erforderlich, um die Herunterregulierung von *CHRM5* mit der Hochregulierung von Myelin-Transkripten in Verbindung zu bringen und so eine mechanistische Verbindung herzustellen.

Weitere in dem *SLC5A11*<sup>+</sup> Subtyp identifizierte Gene, die mit Myelinisierung assoziiert sind, waren *SH3TC2* und *ACSBG1*. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass *SH3TC2* in Schwann-Zellen exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Ranvier-Knotens spielt<sup>101</sup>. Mutationen in diesem Gen verursachen die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 4C, eine erbliche motorisch-sensorische Neuropathie<sup>121</sup>. *ACSBG1* kodiert für ein Protein mit Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität, das am Stoffwechsel langkettiger Fettsäuren beteiligt ist und somit mit der Myelinbildung in Verbindung steht<sup>102</sup>.

Die Heterogenität der Oligodendrozyten und ihre Unterteilung in verschiedene Subtypen, die möglicherweise unterschiedliche Rollen in der Remyelinisierung und Regeneration einnehmen, wurde bereits untersucht<sup>40</sup>. Es gibt Hinweise darauf, dass die Fähigkeit der Oligodendrozyten zur Remyelinisierung von verschiedenen Faktoren abhängt, darunter ihre Umgebung, das Mikromilieu und die begleitende Immunantwort<sup>42,122</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Oligodendrozyten, insbesondere mit Astrozyten und Neuronen, entscheidend ihre Verhaltensweise und somit auch ihre Fähigkeit zur Remyelinisierung beeinflusst<sup>123</sup>. Die Ergebnisse dieser Dissertation ergänzen nun die bisherigen Erkenntnisse und deuten darauf hin, dass der M5-Muskarinrezeptor eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Oligodendrozyten und ihrer Fähigkeit, aktiv an Remyelinisierung und Reparaturprozessen teilzunehmen, spielen könnte. Die Integration dieser Ergebnisse liefert eine umfassende Perspektive auf mögliche therapeutische Ansätze, um Remyelinisierungsprozesse zu fördern und somit Regeneration zu ermöglichen.

### 4.3.4 Entzündungsprädiktion mittels Trajektorienanalyse

Anhand einer gezielten Analyse subkortikaler Oligodendrozyten konnte eine Trajektorie gefunden werden, die der Läsionsentwicklung basierend auf dem jeweiligen Entzündungsstadium entspricht (akut/chronisch-aktiv vs. chronisch-inaktiv). Der nachfolgende Vergleich mit dem Expressionsmuster spinaler Oligodendrozyten ermöglichte somit eine Einschätzung des Entzündungsgrades des spinalen Gewebes, da sich hier eine deutliche Überlappung der Expression mit den subkortikalen Oligodendrozyten aus akut/chronisch-aktiven Läsionen ergab. Entscheidend ist hierbei, dass eine solche bioinformatische Trajektorienanalyse für die spinalen Oligodendrozyten nicht vorlag, sich deren Entzündungsgrad also rein über die zerebralen Oligodendrozyten ableiten ließ. Durch die gleichzeitige histologische Auswertung der spinalen Gewebeschnitte konnte hierbei die Einschätzung, dass es sich vorwiegend um Läsionen mit einem hohen Entzündungslevel handelt, bestätigt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass anhand bioinformatischer Analysen eine Prädiktion über den Entzündungsgrad und das Läsionsstadium des untersuchten Gewebes möglich ist, sollten diese Informationen nicht verfügbar sein.

In dem hier vorgestellten Beispiel handelt es sich lediglich um einen kleinen Datensatz, der die Läsionsprädiktion nur für einzelne Gewebeproben untersucht hat. Um weiter zu validieren, wie verlässlich eine solche Vorhersage möglich ist, bedarf es einer Analyse größerer Gewebekohorten, für die detaillierte histologische Informationen vorliegen.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Multiple Sklerose, eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, führt zur Zerstörung von Myelin, der schützenden Hülle um die Nervenfasern, was in der Folge schwerwiegende neurologische Defizite verursacht. Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe von modernen Methoden wie der Einzelzellkern-RNA-Sequenzierung die regionale Heterogenität der glialen Zellreihen im zentralen Nervensystem auf Einzelzellebene zu entschlüsseln sowie die unterschiedlichen Reaktionen dieser Gliazellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose zu untersuchen. Astrozyten und Oligodendrozyten erfüllen im zentralen Nervensystem wesentliche Funktionen. Astrozyten tragen zur Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke bei und regulieren die neuronale Homöostase, während Oligodendrozyten für die Myelinisierung der Axone verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte hierbei eine enorme regionale Heterogenität und Subtypenspezifizierung entlang der Neuroachse für die glialen Zellreihen gezeigt, und spezifische Subtypmarker für die jeweiligen Regionen identifiziert werden. Ein weiterer zentraler Befund war die Identifizierung eines homöostatischen Subtyps innerhalb der Oligodendrozytenlinie, welcher durch die Expression von *SLC5A11* und *LINGO1* charakterisiert ist. Dieser Subtyp zeigte eine Herunterregulierung des M5-Muskarinrezeptors (*CHRM5*), welche in Zusammenschau mit einer gleichzeitig verstärkten Expression von Myelintranskripten auf einen endogenen Reparaturmechanismus hinweisen könnte, der in den Bahnen der weißen Substanz aktiviert wird, um die Remyelinisierung zu fördern. Neben der zelltypspezifischen Reaktivität konnte eine globale Gendysregulation über verschiedene Zellpopulationen hinweg identifiziert werden. Hierbei standen insbesondere *ARL17B* und *KANSL1* im Fokus, zwei Gene, die in verschiedenen MS-Proben und zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen konsistent fehlreguliert waren. Beide Gene sind mit dem gleichen Genlocus assoziiert und könnten eine zentrale Rolle in der gestörten Homöostase neuroglialer Zellen bei Multipler Sklerose spielen. Zusammenfassend ergab die umfassende Analyse der zellulären Heterogenität und der spezifischen Reaktionen von Gliazellen in unterschiedlichen ZNS-Regionen neue Einblicke in die Pathogenese von MS und bietet eine Grundlage für die Entwicklung innovativer Behandlungsmöglichkeiten, basierend auf molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Trobisch, T., Zulji, A., Stevens, N.A., Schwarz, S., Wischniewski, S., Öztürk, M., Perales-Patón, J., Haeussler, M., Saez-Rodriguez, J., Velmeshev, D., and Schirmer, L. (2022). Cross-regional homeostatic and reactive glial signatures in multiple sclerosis. *Acta neuropathologica* 144, 987-1003. 10.1007/s00401-022-02497-2.
2. Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517. 10.1016/s0140-6736(08)61620-7.
3. Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., and Calabresi, P.A. (2018). Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378, 169-180. 10.1056/NEJMra1401483.
4. Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B.C., Kuhle, J., Mina, M.J., Leng, Y., Elledge, S.J., Niebuhr, D.W., Scher, A.I., Munger, K.L., and Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* 375, 296-301. 10.1126/science.abj8222.
5. Ascherio, A., and Munger, K.L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61, 288-299. 10.1002/ana.21117.
6. Bar-Or, A., Pender, M.P., Khanna, R., Steinman, L., Hartung, H.P., Maniar, T., Croze, E., Aftab, B.T., Giovannoni, G., and Joshi, M.A. (2021). Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies: (Trends in Molecular Medicine, 26:3 p:296-310, 2020). *Trends Mol Med*. 10.1016/j.molmed.2021.01.004.
7. Koch-Henriksen, N., and Magyari, M. (2021). Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 17, 676-688. 10.1038/s41582-021-00556-y.
8. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. (2019). *Science* 365. 10.1126/science.aav7188.
9. Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 7-35. 10.1007/s00401-009-0619-8.
10. Molofsky, A.V., Krencik, R., Ullian, E.M., Tsai, H.H., Deneen, B., Richardson, W.D., Barres, B.A., and Rowitch, D.H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26, 891-907. 10.1101/gad.188326.112.
11. Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430-440. 10.1016/j.neuron.2008.10.013.
12. Nagelhus, E.A., and Ottersen, O.P. (2013). Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev* 93, 1543-1562. 10.1152/physrev.00011.2013.

13. Schirmer, L., Schafer, D.P., Bartels, T., Rowitch, D.H., and Calabresi, P.A. (2021). Diversity and Function of Glial Cell Types in Multiple Sclerosis. *Trends Immunol.* 10.1016/j.it.2021.01.005.
14. Uzawa, A., Oertel, F.C., Mori, M., Paul, F., and Kuwabara, S. (2024). NMOSD and MOGAD: an evolving disease spectrum. *Nature reviews. Neurology* 20, 602-619. 10.1038/s41582-024-01014-1.
15. Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717. 10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q.
16. Ludwin, S.K., Rao, V., Moore, C.S., and Antel, J.P. (2016). Astrocytes in multiple sclerosis. *Mult Scler* 22, 1114-1124. 10.1177/1352458516643396.
17. Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8. 10.1101/cshperspect.a028936.
18. Sofroniew, M.V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci* 16, 249-263. 10.1038/nrn3898.
19. Prineas, J.W., and Lee, S. (2019). Multiple Sclerosis: Destruction and Regeneration of Astrocytes in Acute Lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 78, 140-156. 10.1093/jnen/nly121.
20. Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Munch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487. 10.1038/nature21029.
21. Ramaglia, V., Hughes, T.R., Donev, R.M., Ruseva, M.M., Wu, X., Huitinga, I., Baas, F., Neal, J.W., and Morgan, B.P. (2012). C3-dependent mechanism of microglial priming relevant to multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 965-970. 10.1073/pnas.1111924109.
22. Rothhammer, V., Borucki, D.M., Tjon, E.C., Takenaka, M.C., Chao, C.C., Arduro-Fabregat, A., de Lima, K.A., Gutierrez-Vazquez, C., Hewson, P., Staszewski, O., et al. (2018). Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557, 724-728. 10.1038/s41586-018-0119-x.
23. Lerma-Martin, C., Badia, I.M.P., Ramirez Flores, R.O., Sekol, P., Schäfer, P.S.L., Riedl, C.J., Hofmann, A., Thäwel, T., Wünnemann, F., Ibarra-Arellano, M.A., et al. (2024). Cell type mapping reveals tissue niches and interactions in subcortical multiple sclerosis lesions. *Nat Neurosci* 27, 2354-2365. 10.1038/s41593-024-01796-z.
24. Chen, C., Shu, Y., Yan, C., Li, H., Huang, Z., Shen, S., Liu, C., Jiang, Y., Huang, S., Wang, Z., et al. (2024). Astrocyte-derived clusterin disrupts glial physiology to obstruct remyelination in mouse models of demyelinating diseases. *Nat Commun* 15, 7791. 10.1038/s41467-024-52142-7.

25. Smith, Z., Cheli, V.T., Angeliu, C.G., Wang, C., Denaroso, G.E., Tumuluri, S.G., Corral, J., Garbarini, K., and Paez, P.M. (2024). Ferritin loss in astrocytes reduces spinal cord oxidative stress and demyelination in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. *Glia* 72, 2327-2343. 10.1002/glia.24616.
26. Batiuk, M.Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., Kusserow, C., Koeppen, J., Viana, J.F., Oliveira, J.F., Voet, T., et al. (2020). Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun* 11, 1220. 10.1038/s41467-019-14198-8.
27. Schirmer, L., Velmeshev, D., Holmqvist, S., Kaufmann, M., Werneburg, S., Jung, D., Vistnes, S., Stockley, J.H., Young, A., Steindel, M., et al. (2019). Neuronal vulnerability and multilineage diversity in multiple sclerosis. *Nature* 573, 75-82. 10.1038/s41586-019-1404-z.
28. Mishra, M.K., and Yong, V.W. (2016). Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 12, 539-551. 10.1038/nrneurol.2016.110.
29. Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35, 441-468. 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
30. Nayak, D., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32, 367-402. 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.
31. Lloyd, A.F., and Miron, V.E. (2019). The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nature reviews. Neurology* 15, 447-458. 10.1038/s41582-019-0184-2.
32. Lloyd, A.F., Davies, C.L., Holloway, R.K., Labrak, Y., Ireland, G., Carradori, D., Dillenburg, A., Borger, E., Soong, D., Richardson, J.C., et al. (2019). Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation. *Nat Neurosci* 22, 1046-1052. 10.1038/s41593-019-0418-z.
33. Wilton, D.K., Dissing-Olesen, L., and Stevens, B. (2019). Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annu Rev Neurosci* 42, 107-127. 10.1146/annurev-neuro-070918-050306.
34. van der Valk, P., and Amor, S. (2009). Preactive lesions in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 22, 207-213. 10.1097/WCO.0b013e32832b4c76.
35. Maggi, P., Macri, S.M., Gaitán, M.I., Leibovitch, E., Wholer, J.E., Knight, H.L., Ellis, M., Wu, T., Silva, A.C., Massacesi, L., et al. (2014). The formation of inflammatory demyelinated lesions in cerebral white matter. *Ann Neurol* 76, 594-608. 10.1002/ana.24242.
36. Sankowski, R., Böttcher, C., Masuda, T., Geirsdottir, L., Sagar, Sindram, E., Seredenina, T., Muhs, A., Scheiwe, C., Shah, M.J., et al. (2019). Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nat Neurosci* 22, 2098-2110. 10.1038/s41593-019-0532-y.

37. Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., and Ransohoff, R.M. (2011). Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14, 1227-1235. 10.1038/nn.2923.
38. Bergles, D.E., and Richardson, W.D. (2015). Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a020453. 10.1101/cshperspect.a020453.
39. Franklin, R.J., and Goldman, S.A. (2015). Glia Disease and Repair-Remyelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020594. 10.1101/cshperspect.a020594.
40. Falcao, A.M., van Bruggen, D., Marques, S., Meijer, M., Jakel, S., Agirre, E., Samudiyata, Floriddia, E.M., Vanichkina, D.P., Ffrench-Constant, C., et al. (2018). Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nat Med* 24, 1837-1844. 10.1038/s41591-018-0236-y.
41. Shiow, L.R., Favrais, G., Schirmer, L., Schang, A.L., Cipriani, S., Andres, C., Wright, J.N., Nobuta, H., Fleiss, B., Gressens, P., and Rowitch, D.H. (2017). Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury. *Glia* 65, 2024-2037. 10.1002/glia.23212.
42. Jakel, S., Agirre, E., Mendanha Falcao, A., van Bruggen, D., Lee, K.W., Knuesel, I., Malhotra, D., Ffrench-Constant, C., Williams, A., and Castelo-Branco, G. (2019). Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature* 566, 543-547. 10.1038/s41586-019-0903-2.
43. Androutsou, M.E., Tapeinou, A., Vlamis-Gardikas, A., and Tselios, T. (2018). Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and Multiple Sclerosis. *Med Chem* 14, 120-128. 10.2174/1573406413666170906123204.
44. Reindl, M., and Waters, P. (2019). Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nature reviews. Neurology* 15, 89-102. 10.1038/s41582-018-0112-x.
45. Al-Ani, A., Chen, J.J., and Costello, F. (2023). Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease (MOGAD): current understanding and challenges. *J Neurol* 270, 4132-4150. 10.1007/s00415-023-11737-8.
46. Brownlee, W.J., Hardy, T.A., Fazekas, F., and Miller, D.H. (2017). Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet* 389, 1336-1346. 10.1016/S0140-6736(16)30959-X.
47. Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., et al. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17, 162-173. 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
48. Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sorensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., et al. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83, 278-286. 10.1212/WNL.0000000000000560.

49. Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., and Filippi, M. (2005). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 4, 281-288. 10.1016/S1474-4422(05)70071-5.
50. 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. *Ann Neurol* 69, 292-302. 10.1002/ana.22366.
51. Grauer, O., Offenhäusser, M., Schmidt, J., Toyka, K.V., and Gold, R. (2001). [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt* 72, 577-589. 10.1007/s001150170057.
52. Burton, J.M., O'Connor, P.W., Hohol, M., and Beyene, J. (2012). Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 12, Cd006921. 10.1002/14651858.CD006921.pub3.
53. Trebst, C., Reising, A., Kielstein, J.T., Hafer, C., and Stangel, M. (2009). Plasma exchange therapy in steroid-unresponsive relapses in patients with multiple sclerosis. *Blood Purif* 28, 108-115. 10.1159/000224630.
54. Weinshenker, B.G., O'Brien, P.C., Petterson, T.M., Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C.F., Dodick, D.W., Pineda, A.A., Stevens, L.N., and Rodriguez, M. (1999). A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 46, 878-886. 10.1002/1531-8249(199912)46:6<878::aid-ana10>3.0.co;2-q.
55. Callegari, I., Derfuss, T., and Galli, E. (2021). Update on treatment in multiple sclerosis. *Presse Med* 50, 104068. 10.1016/j.lpm.2021.104068.
56. Tintore, M., Rovira, À., Río, J., Otero-Romero, S., Arrambide, G., Tur, C., Comabella, M., Nos, C., Arévalo, M.J., Negrotto, L., et al. (2015). Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 138, 1863-1874. 10.1093/brain/awv105.
57. Bsteh, G., Ehling, R., Lutterotti, A., Hegen, H., Di Pauli, F., Auer, M., Deisenhammer, F., Reindl, M., and Berger, T. (2016). Long Term Clinical Prognostic Factors in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Insights from a 10-Year Observational Study. *PLoS One* 11, e0158978. 10.1371/journal.pone.0158978.
58. Bergamaschi, R. (2006). Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision. *Expert Rev Neurother* 6, 357-364. 10.1586/14737175.6.3.357.
59. Malpas, C.B., Manouchehrinia, A., Sharmin, S., Roos, I., Horakova, D., Havrdova, E.K., Trojano, M., Izquierdo, G., Eichau, S., Bergamaschi, R., et al. (2020). Early clinical markers of aggressive multiple sclerosis. *Brain* 143, 1400-1413. 10.1093/brain/awaa081.

60. Sorensen, P.S., Sellebjerg, F., Hartung, H.P., Montalban, X., Comi, G., and Tintoré, M. (2020). The apparently milder course of multiple sclerosis: changes in the diagnostic criteria, therapy and natural history. *Brain* 143, 2637-2652. 10.1093/brain/awaa145.
61. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. (2019). *Lancet Neurol* 18, 269-285. 10.1016/s1474-4422(18)30443-5.
62. Cree, B.A., Gourraud, P.A., Oksenberg, J.R., Bevan, C., Crabtree-Hartman, E., Gelfand, J.M., Goodin, D.S., Graves, J., Green, A.J., Mowry, E., et al. (2016). Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol* 80, 499-510. 10.1002/ana.24747.
63. Tan, Y.L., Yuan, Y., and Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* 25, 351-367. 10.1038/s41380-019-0609-8.
64. Hansson, E. (1990). Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system. *Neurochem Int* 16, 237-245. 10.1016/0197-0186(90)90097-d.
65. Cebrian-Silla, A., Nascimento, M.A., Redmond, S.A., Mansky, B., Wu, D., Obernier, K., Romero Rodriguez, R., Gonzalez-Granero, S., García-Verdugo, J.M., Lim, D.A., and Álvarez-Buylla, A. (2021). Single-cell analysis of the ventricular-subventricular zone reveals signatures of dorsal and ventral adult neurogenesis. *Elife* 10. 10.7554/eLife.67436.
66. Park, C., Ponath, G., Levine-Ritterman, M., Bull, E., Swanson, E.C., De Jager, P.L., Segal, B.M., and Pitt, D. (2019). The landscape of myeloid and astrocyte phenotypes in acute multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol Commun* 7, 130. 10.1186/s40478-019-0779-2.
67. Chen, Y., Wei, Y., Liu, J., Zhu, T., Zhou, C., and Zhang, D. (2025). Spatial transcriptomics combined with single-nucleus RNA sequencing reveals glial cell heterogeneity in the human spinal cord. *Neural Regen Res* 20, 3302-3316. 10.4103/nrr.Nrr-d-23-01876.
68. Weng, C., Groh, A.M.R., Yaqubi, M., Cui, Q.L., Stratton, J.A., Moore, G.R.W., and Antel, J.P. (2025). Heterogeneity of mature oligodendrocytes in the central nervous system. *Neural Regen Res* 20, 1336-1349. 10.4103/nrr.Nrr-d-24-00055.
69. Itoh, N., Itoh, Y., Tassoni, A., Ren, E., Kaito, M., Ohno, A., Ao, Y., Farkhondeh, V., Johnsonbaugh, H., Burda, J., et al. (2018). Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E302-E309. 10.1073/pnas.1716032115.
70. Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., et al. (2015). Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 161, 1202-1214. 10.1016/j.cell.2015.05.002.
71. Qu, H.Q., Kao, C., and Hakonarson, H. (2024). Single-Cell RNA Sequencing Technology Landscape in 2023. *Stem Cells* 42, 1-12. 10.1093/stmcls/sxad077.

72. Huang, X., Liu, S., Wu, L., Jiang, M., and Hou, Y. (2018). High Throughput Single Cell RNA Sequencing, Bioinformatics Analysis and Applications. *Adv Exp Med Biol* 1068, 33-43. 10.1007/978-981-13-0502-3\_4.
73. Wu, X., Yang, X., Dai, Y., Zhao, Z., Zhu, J., Guo, H., and Yang, R. (2024). Single-cell sequencing to multi-omics: technologies and applications. *Biomark Res* 12, 110. 10.1186/s40364-024-00643-4.
74. Velmeshev, D., Schirmer, L., Jung, D., Haeussler, M., Perez, Y., Mayer, S., Bhaduri, A., Goyal, N., Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2019). Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science* 364, 685-689. 10.1126/science.aav8130.
75. Gong, H., Do, D., and Ramakrishnan, R. (2018). Single-Cell mRNA-Seq Using the Fluidigm C1 System and Integrated Fluidics Circuits. *Methods Mol Biol* 1783, 193-207. 10.1007/978-1-4939-7834-2\_10.
76. Sen, R., Dolgalev, I., Bayin, N.S., Heguy, A., Tsirigos, A., and Placantonakis, D.G. (2018). Single-Cell RNA Sequencing of Glioblastoma Cells. *Methods Mol Biol* 1741, 151-170. 10.1007/978-1-4939-7659-1\_12.
77. Picelli, S., Björklund Å, K., Faridani, O.R., Sagasser, S., Winberg, G., and Sandberg, R. (2013). Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 10, 1096-1098. 10.1038/nmeth.2639.
78. Ramsköld, D., Luo, S., Wang, Y.C., Li, R., Deng, Q., Faridani, O.R., Daniels, G.A., Khrebtukova, I., Loring, J.F., Laurent, L.C., et al. (2012). Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30, 777-782. 10.1038/nbt.2282.
79. Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N., and Yanai, I. (2012). CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2, 666-673. 10.1016/j.celrep.2012.08.003.
80. Hashimshony, T., Senderovich, N., Avital, G., Klochendler, A., de Leeuw, Y., Anavy, L., Gennert, D., Li, S., Livak, K.J., Rozenblatt-Rosen, O., et al. (2016). CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biol* 17, 77. 10.1186/s13059-016-0938-8.
81. Ashton, J.M., Rehrauer, H., Myers, J., Myers, J., Zanche, M., Balys, M., Foon, J., Mason, C.E., Steen, R., Kuentzel, M., et al. (2021). Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Platforms and Methods. *J Biomol Tech* 32. 10.7171/3fc1f5fe.3eccea01.
82. Germain, P.L., Lun, A., Garcia Meixide, C., Macnair, W., and Robinson, M.D. (2021). Doublet identification in single-cell sequencing data using scDbtFinder. *F1000Res* 10, 979. 10.12688/f1000research.73600.2.
83. Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., 3rd, Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888-1902.e1821. 10.1016/j.cell.2019.05.031.

84. Korsunsky, I., Millard, N., Fan, J., Slowikowski, K., Zhang, F., Wei, K., Baglaenko, Y., Brenner, M., Loh, P.R., and Raychaudhuri, S. (2019). Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods* 16, 1289-1296. 10.1038/s41592-019-0619-0.
85. Lun, A.T., McCarthy, D.J., and Marioni, J.C. (2016). A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Res* 5, 2122. 10.12688/f1000research.9501.2.
86. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. 10.1186/s13059-014-0550-8.
87. Zhu, A., Ibrahim, J.G., and Love, M.I. (2019). Heavy-tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences. *Bioinformatics* 35, 2084-2092. 10.1093/bioinformatics/bty895.
88. Yu, G., Wang, L.G., Han, Y., and He, Q.Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics* 16, 284-287. 10.1089/omi.2011.0118.
89. Carlson, M. (2019). org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human.
90. Yu, G., Li, F., Qin, Y., Bo, X., Wu, Y., and Wang, S. (2010). GOSemSim: an R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products. *Bioinformatics* 26, 976-978. 10.1093/bioinformatics/btq064.
91. Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps.
92. Street, K., Risso, D., Fletcher, R.B., Das, D., Ngai, J., Yosef, N., Purdom, E., and Dudoit, S. (2018). Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* 19, 477. 10.1186/s12864-018-4772-0.
93. Van den Berge, K., Roux de Bézieux, H., Street, K., Saelens, W., Cannoodt, R., Saeys, Y., Dudoit, S., and Clement, L. (2020). Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. *Nat Commun* 11, 1201. 10.1038/s41467-020-14766-3.
94. Bowles, K., Pugh, D., Farrell, K., Han, N., TCW, J., Liu, Y., Liang, S., Qian, L., Bendl, J., Fullard, J., et al. (2019). 17q21.31 sub-haplotypes underlying H1-associated risk for Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy converge on altered glial regulation. *bioRxiv*, 860668. 10.1101/860668.
95. Nalls, M.A., Blauwendraat, C., Vallerga, C.L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D.A., Noyce, A.J., Xue, A., et al. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 18, 1091-1102. 10.1016/s1474-4422(19)30320-5.
96. de Goede, O.M., Nachun, D.C., Ferraro, N.M., Gloudemans, M.J., Rao, A.S., Smail, C., Eulalio, T.Y., Aguet, F., Ng, B., Xu, J., et al. (2021). Population-scale

- tissue transcriptomics maps long non-coding RNAs to complex disease. *Cell*. 10.1016/j.cell.2021.03.050.
97. Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468, 214-222. 10.1038/nature09611.
  98. Fullwood, Y., dos Santos, M., and Hsuan, J.J. (1999). Cloning and characterization of a novel human phosphatidylinositol transfer protein, rdgBbeta. *J Biol Chem* 274, 31553-31558. 10.1074/jbc.274.44.31553.
  99. Bender, C.L., Sun, X., Farooq, M., Yang, Q., Davison, C., Maroteaux, M., Huang, Y.S., Ishikawa, Y., and Liu, S.J. (2020). Emotional Stress Induces Structural Plasticity in Bergmann Glial Cells via an AC5-CPEB3-GluA1 Pathway. *J Neurosci* 40, 3374-3384. 10.1523/jneurosci.0013-19.2020.
  100. Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J.Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., et al. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature* 570, 332-337. 10.1038/s41586-019-1195-2.
  101. Arnaud, E., Zenker, J., de Preux Charles, A.S., Stendel, C., Roos, A., Médard, J.J., Tricaud, N., Kleine, H., Luscher, B., Weis, J., et al. (2009). SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17528-17533. 10.1073/pnas.0905523106.
  102. Steinberg, S.J., Morgenthaler, J., Heinzer, A.K., Smith, K.D., and Watkins, P.A. (2000). Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 275, 35162-35169. 10.1074/jbc.M006403200.
  103. Cree, B.A.C., Oksenberg, J.R., and Hauser, S.L. (2022). Multiple sclerosis: two decades of progress. *Lancet Neurol* 21, 211-214. 10.1016/s1474-4422(22)00040-0.
  104. Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Munch, A.E., Heiman, M., and Barres, B.A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1896-E1905. 10.1073/pnas.1800165115.
  105. Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 18, 942-952. 10.1038/nn.4043.
  106. Endo, F., Kasai, A., Soto, J.S., Yu, X., Qu, Z., Hashimoto, H., Gradinaru, V., Kawaguchi, R., and Khakh, B.S. (2022). Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. *Science* 378, eadc9020. 10.1126/science.adc9020.
  107. Hayashi, C., and Suzuki, N. (2019). Heterogeneity of Oligodendrocytes and Their Precursor Cells. *Adv Exp Med Biol* 1190, 53-62. 10.1007/978-981-32-9636-7\_5.
  108. Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcão, A., Xiao, L., Li, H., Häring, M., Hochgerner, H., Romanov, R.A., et al. (2016).

- Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* 352, 1326-1329. 10.1126/science.aaf6463.
109. Osanai, Y., Yamazaki, R., Shinohara, Y., and Ohno, N. (2022). Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology. *Front Cell Dev Biol* 10, 1030486. 10.3389/fcell.2022.1030486.
110. Sadick, J.S., O'Dea, M.R., Hasel, P., Dykstra, T., Faustin, A., and Liddelow, S.A. (2022). Astrocytes and oligodendrocytes undergo subtype-specific transcriptional changes in Alzheimer's disease. *Neuron* 110, 1788-1805.e1710. 10.1016/j.neuron.2022.03.008.
111. Sherafat, A., Pfeiffer, F., and Nishiyama, A. (2021). Shaping of Regional Differences in Oligodendrocyte Dynamics by Regional Heterogeneity of the Pericellular Microenvironment. *Front Cell Neurosci* 15, 721376. 10.3389/fncel.2021.721376.
112. Koolen, D.A., Kramer, J.M., Neveling, K., Nillesen, W.M., Moore-Barton, H.L., Elmslie, F.V., Toutain, A., Amiel, J., Malan, V., Tsai, A.C., et al. (2012). Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet* 44, 639-641. 10.1038/ng.2262.
113. Koolen, D.A., Vissers, L.E., Pfundt, R., de Leeuw, N., Knight, S.J., Regan, R., Kooy, R.F., Reyniers, E., Romano, C., Fichera, M., et al. (2006). A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 38, 999-1001. 10.1038/ng1853.
114. Linda, K., Lewerissa, E.I., Verboven, A.H.A., Gabriele, M., Frega, M., Gunnewiek, T.M.K., Devilee, L., Ulferts, E., Oudakker, A., Schoenmaker, C., et al. (2020). KANSL1 Deficiency Causes Neuronal Dysfunction by Oxidative Stress-Induced Autophagy. *bioRxiv*, 2020.2008.2007.241257. 10.1101/2020.08.07.241257.
115. Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., et al. (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8, 745-751. 10.1038/nn1460.
116. Shao, Z., Lee, X., Huang, G., Sheng, G., Henderson, C.E., Louvard, D., Sohn, J., Pepinsky, B., and Mi, S. (2017). LINGO-1 Regulates Oligodendrocyte Differentiation through the Cytoplasmic Gelsolin Signaling Pathway. *J Neurosci* 37, 3127-3137. 10.1523/jneurosci.3722-16.2017.
117. Najm, F.J., Madhavan, M., Zaremba, A., Shick, E., Karl, R.T., Factor, D.C., Miller, T.E., Nevin, Z.S., Kantor, C., Sargent, A., et al. (2015). Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. *Nature* 522, 216-220. 10.1038/nature14335.
118. Mei, F., Lehmann-Horn, K., Shen, Y.A., Rankin, K.A., Stebbins, K.J., Lorrain, D.S., Pekarek, K., S, A.S., Xiao, L., Teuscher, C., et al. (2016). Accelerated remyelination during inflammatory demyelination prevents axonal loss and improves functional recovery. *Elife* 5. 10.7554/eLife.18246.

119. Deshmukh, V.A., Tardif, V., Lyssiotis, C.A., Green, C.C., Kerman, B., Kim, H.J., Padmanabhan, K., Swoboda, J.G., Ahmad, I., Kondo, T., et al. (2013). A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature* 502, 327-332. [10.1038/nature12647](https://doi.org/10.1038/nature12647).
120. Green, A.J., Gelfand, J.M., Cree, B.A., Bevan, C., Boscardin, W.J., Mei, F., Inman, J., Arnow, S., Devereux, M., Abounasr, A., et al. (2017). Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet* 390, 2481-2489. [10.1016/s0140-6736\(17\)32346-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32346-2).
121. Lupski, J.R., Reid, J.G., Gonzaga-Jauregui, C., Rio Deiros, D., Chen, D.C., Nazareth, L., Bainbridge, M., Dinh, H., Jing, C., Wheeler, D.A., et al. (2010). Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 362, 1181-1191. [10.1056/NEJMoa0908094](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908094).
122. Yeung, M.S.Y., Djelloul, M., Steiner, E., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Brundin, L., and Frisén, J. (2019). Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature* 566, 538-542. [10.1038/s41586-018-0842-3](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0842-3).
123. Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., and Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8. [10.3390/cells8111424](https://doi.org/10.3390/cells8111424).

## 7 TABELLARISCHER ANHANG

ZNS-Region	Gewebeummer	Diagnose	Entzündungsstadium	Alter	Geschlecht	Region	RIN	PMI	KD [y]	VF	SRA Nummer	Angewendete Methoden
Kleinhirn	KH_KTL3	Kontrolle	NA	61	Weiblich	NA	7	15	NA	NA	SRR14408234	snRNA-seq, IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_KTL1	Kontrolle	NA	64	Männlich	NA	6,9	18	NA	NA	SRR14408233	snRNA-seq, IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_KTL2	Kontrolle	NA	35	Männlich	NA	7,2	22	NA	NA	SRR14408230	snRNA-seq, IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_MS2	MS	Akut/Chronisch-aktiv	64	Weiblich	NA	6,9	7	36	SPMS	SRR14408229	snRNA-seq, IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_MS3	MS	Akut/Chronisch-aktiv	55	Weiblich	NA	7,9	24	20	SPMS	SRR14408228	snRNA-seq, IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_MS1	MS	Chronisch-inaktiv	55	Männlich	NA	7,9	16	43	SPMS	SRR14408227	snRNA-seq, IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_KTL4	Kontrolle	NA	68	Männlich	NA	6,7	30	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_KTL5	Kontrolle	NA	60	Weiblich	NA	7,3	13	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_MS4	MS	Akut/Chronisch-aktiv	39	Weiblich	NA	5,2	18	21	NA	NA	IHC, smFISH
Kleinhirn	KH_MS5	MS	Akut/Chronisch-aktiv	38	Männlich	NA	4	19	16	SPMS	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_KTL1	Kontrolle	NA	82	Männlich	Motor- /Prämotorcortex	8,5	21	NA	NA	SRR9123038	snRNA-seq, IHC
Großhirn	GH_KTL2	Kontrolle	NA	64	Männlich	Motor- /Prämotorcortex	7,5	18	NA	NA	SRR9123039	snRNA-seq, IHC, smFISH
Großhirn	GH_KTL3	Kontrolle	NA	68	Männlich	Präfrontal	8,5	30	NA	NA	SRR9123041	snRNA-seq, IHC, smFISH
Großhirn	GH_KTL4	Kontrolle	NA	35	Männlich	Parietal	6,8	22	NA	NA	SRR9123034	snRNA-seq, IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS1	MS	Chronisch-inaktiv	55	Männlich	Temporal	7,1	16	43	SPMS	SRR9123052	snRNA-seq, IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS2	MS	Chronisch-inaktiv	53	Männlich	Parietal	7	13	16	SPMS	SRR9123042	snRNA-seq, IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS3	MS	Akut/Chronisch-aktiv	40	Männlich	Präfrontal	7,6	27	16	SPMS	SRR9123050	snRNA-seq, IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS4	MS	Akut/Chronisch-aktiv	40	Männlich	Präfrontal	7,9	27	16	SPMS	SRR9123049	snRNA-seq, IHC
Großhirn	GH_KTL5	Kontrolle	NA	61	Weiblich	Präfrontal	7,3	15	NA	NA	SRR9123040	IHC, smFISH
Großhirn	GH_KTL6	Kontrolle	NA	84	Männlich	Motor- /Prämotorcortex	7,3	5	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_KTL7	Kontrolle	NA	69	Weiblich	Motor- /Prämotorcortex	5,2	33	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_KTL8	Kontrolle	NA	84	Weiblich	Motor- /Prämotorcortex	6,1	22	NA	NA	NA	IHC, smFISH

## Tabellarischer Anhang

Großhirn	GH_KTL9	Kontrolle	NA	61	Weiblich	Motor- /Prämotorcortex	5,8	15	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS5	MS	Akut/Chronisch-aktiv	81	Weiblich	Motor- /Prämotorcortex	7,1	23	41	SPMS	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS6	MS	Akut/Chronisch-aktiv	64	Weiblich	Motor- /Prämotorcortex	5,8	7	36	SPMS	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS7	MS	Akut/Chronisch-aktiv	50	Weiblich	Präfrontal	8,9	22	23	SPMS	SRR9123051	IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS8	MS	Akut/Chronisch-aktiv	35	Weiblich	Motor- /Prämotorcortex	7	9	5	SPMS	SRR9123033	IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS9	MS	Akut/Chronisch-aktiv	42	Weiblich	Temporal	6,9	11	6	PPMS	NA	IHC, smFISH
Großhirn	GH_MS10	MS	Akut/Chronisch-aktiv	60	Weiblich	Präfrontal	6,1	26	29	SPMS	NA	IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL2	Kontrolle	NA	86	Weiblich	Thorakal	7,1	29	NA	NA	SRR14408226	snRNA-seq, IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL3	Kontrolle	NA	61	Weiblich	Thorakal	6,9	15	NA	NA	SRR14408225	snRNA-seq, IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL1	Kontrolle	NA	90	Männlich	Thorakal	6,7	20	NA	NA	SRR14408224	snRNA-seq, IHC, smFISH
Rückenmark	RM_MS1	MS	Akut/Chronisch-aktiv	78	Weiblich	Thorakal	6,6	5	NA	NA	SRR14408223	snRNA-seq, IHC, smFISH
Rückenmark	RM_MS2	MS	Akut/Chronisch-aktiv	71	Weiblich	Thorakal	6,5	24	35	SPMS	SRR14408232	snRNA-seq, IHC, smFISH
Rückenmark	RM_MS3	MS	Akut/Chronisch-aktiv	81	Weiblich	Thorakal	7,3	23	41	SPMS	SRR14408231	snRNA-seq, IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL4	Kontrolle	NA	85	Männlich	Thorakal	6,1	23	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL5	Kontrolle	NA	75	Männlich	Thorakal	5,7	17	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL6	Kontrolle	NA	61	Weiblich	Thorakal		15	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Rückenmark	RM_KTL7	Kontrolle	NA	54	Männlich	Thorakal	4,9	20	NA	NA	NA	IHC, smFISH
Rückenmark	RM_MS4	MS	Akut/Chronisch-aktiv	45	Männlich	Thorakal	3,4	24	25	SPMS	NA	IHC, smFISH
Rückenmark	RM_MS5	MS	Akut/Chronisch-aktiv	53	Männlich	Thorakal	3,2	14	33	SPMS	NA	IHC, smFISH

### Zusatztable 1: Klinische und pathologische Daten des Kontroll- und MS-Gewebes

## 8 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Trobisch, Tim  
Geburtsdatum: 07.01.1996  
Geburtsort: Weinheim  
Familienstand: Ledig  
Vater: Trobisch, Rüdiger  
Mutter: Trobisch, Heidi Maria

### SCHULISCHER WERDEGANG

2006 – 2014 Albertus-Magnus-Schule, Viernheim  
04.06.2014 Abitur

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2014/15 Beginn des Studiums der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät Mannheim, Ruprecht-Karls-  
Universität Heidelberg  
05.09.2016 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)  
08.10.2020 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)  
15.11.2021 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

**Eigene Publikationen:**

Friedrich, M., R. Sankowski, L. Bunse, M. Kilian, E. Green, C. Ramallo Guevara, S. Pusch, G. Poschet, K. Sanghvi, M. Hahn, T. Bunse, P. Münch, H. M. Gegner, J. K. Sonner, A. von Landenberg, F. Cichon, K. Aslan, **T. Trobisch**, L. Schirmer, D. Abu-Sammour, T. Kessler, M. Ratliff, D. Schrimpf, F. Sahm, C. Hopf, D. H. Heiland, O. Schnell, J. Beck, C. Böttcher, C. Fernandez-Zapata, J. Priller, S. Heiland, I. Gutcher, F. J. Quintana, A. von Deimling, W. Wick, M. Prinz and M. Platten (2021). "Tryptophan metabolism drives dynamic immunosuppressive myeloid states in IDH-mutant gliomas." Nat Cancer **2**(7): 723-740.

Lerma-Martin, C., I. M. P. Badia, R. O. Ramirez Flores, P. Sekol, P. S. L. Schäfer, C. J. Riedl, A. Hofmann, T. Thäwel, F. Wünnemann, M. A. Ibarra-Arellano, **T. Trobisch**, P. Eisele, D. Schapiro, M. Haeussler, S. Hametner, J. Saez-Rodriguez and L. Schirmer (2024). "Cell type mapping reveals tissue niches and interactions in subcortical multiple sclerosis lesions." Nat Neurosci **27**(12): 2354-2365.

**Trobisch, T.**, A. Zulji, N. A. Stevens, S. Schwarz, S. Wischnewski, M. Öztürk, J. Perales-Patón, M. Haeussler, J. Saez-Rodriguez, D. Velmeshev and L. Schirmer (2022). "Cross-regional homeostatic and reactive glial signatures in multiple sclerosis." Acta Neuropathol **144**(5): 987-1003.

Wischnewski, S., T. Thäwel, C. Ikenaga, A. Kocharyan, C. Lerma-Martin, A. Zulji, H. W. Rausch, D. Brenner, L. Thomas, M. Kutza, B. Wick, **T. Trobisch**, C. Preusse, M. Haeussler, J. Leipe, A. Ludolph, A. Rosenbohm, A. Hoke, M. Platten, J. H. Weishaupt, C. J. Sommer, W. Stenzel, T. E. Lloyd and L. Schirmer (2024). "Cell type mapping of inflammatory muscle diseases highlights selective myofiber vulnerability in inclusion body myositis." Nat Aging **4**(7): 969-983.

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen herzlich danken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Lucas Schirmer, für seine exzellente wissenschaftliche Betreuung, seine wertvollen Anregungen und seine stets offene Tür für Fragen und Diskussionen. Seine Expertise, sein Engagement und seine wiederholte Ermutigung, eigene Ideen zu verfolgen, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Herrn Professor Michael Platten, dem Lehrstuhlinhaber der Neurologischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim, für die Möglichkeit, in einem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld zu forschen, sowie für seine Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitgliedern des Labors für ihre Fachkenntnis, ihre Hilfsbereitschaft und den inspirierenden kollegialen Austausch. Besonders danke ich Amel Zulji für seine hilfsbereite Art, Ideen zu diskutieren und Ergebnisse zu reflektieren. Mein tiefster Dank gilt zudem Sophia Schwarz, die mich in jeder Phase dieser Arbeit unterstützend begleitet hat.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit ermutigt und motiviert haben. Ihre Unterstützung war für mich von unschätzbarem Wert.