

Vergleich histopathologischer und MRT-basierter morphometrischer struktureller Veränderungen in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anna Franziska Lowinski

aus Düsseldorf

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten
2. Gutachterin: PD Dr. med. Louisa Nitsch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2025

Aus dem Neuroanatomischen Institut

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	8
1.1	Einleitung	8
1.2	Material und Methoden	12
1.3	Ergebnisse	17
1.4	Diskussion	26
1.5	Zusammenfassung	29
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	31
2.	Veröffentlichung	37
3.	Erklärung zum Eigenanteil	38
4.	Danksagung	39

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Vorderseitenstrang (<i>anterolateral tract</i>)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans (<i>complete Freund's adjuvant</i>)
DTI	<i>Diffusion tensor imaging</i>
DZNE	Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ECTRIMS	<i>European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis</i>
EPI	<i>Echo-planar imaging</i>
FA	Fraktionelle Anisotropie (<i>fractional anisotropy</i>)
FLAIR	<i>Fluid-attenuated inversion recovery</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
HE	Hämatoxylin/Eosin
hMOG ₁₋₁₂₅	humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein 1-125
IBA1	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1 (<i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>)
IHC	Immunhistochemie
LANUV	Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen

MBP	Basisches Myelinprotein (<i>myelin basic protein</i>)
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIRA	<i>Progression independent of relapse activity</i>
PPMS	Primär-progrediente Multiple Sklerose (<i>primary progressive multiple sclerosis</i>)
PRL	Paramagnetische Randläsion (<i>paramagnetic rim lesion</i>)
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>)
SL	<i>Smoldering lesion</i>
SMI-32	Nicht-phosphoryliertes Neurofilamentprotein H
SPMS	Sekundär-progrediente Multiple Sklerose (<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>)
SWI	<i>Susceptibility-weighted imaging</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris-buffered saline</i>)
TE	Echozeit (<i>time of echo</i>)
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TR	Repetitionszeit (<i>time of repetition</i>)
VGM	Voxel-Guided-Morphometry
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) (Baecher-Allan et al., 2018), von der weltweit etwa 2,3 Millionen Menschen betroffen sind (Haki et al., 2024). Sie ist die häufigste demyelinisierende Erkrankung und führt zu irreversibler Behinderung und früher Arbeitsunfähigkeit bei jungen Erwachsenen (Dobson und Giovannoni, 2019). Die entzündlichen Läsionen können in ihrer Lokalisation in Gehirn und Rückenmark stark variieren (Disanto et al., 2011). Dies macht die MS zu einer heterogenen Erkrankung mit verschiedenen Symptomen, deren Ausprägung sich bei verschiedenen Patienten stark unterscheiden kann (Disanto et al., 2011).

Bei der MS werden verschiedene Verlaufsformen unterschieden (Klineova und Lublin, 2018). Der häufigste Subtyp ist mit etwa 85 % die schubförmig remittierende MS (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS), die durch Schub- und Remissionsphasen gekennzeichnet ist. Dabei wird ein Schub als eine innerhalb kurzer Zeit neu auftretende oder sich verschlechternde neurologische Symptomatik definiert (McDonald et al., 2001). Bei einem Großteil der RRMS-Patienten entwickelt sich nach etwa 15 Jahren eine sekundär-progrediente MS (*secondary progressive multiple sclerosis*, SPMS), die sich durch permanente neurologische Defizite und ein kontinuierliches Fortschreiten der Krankheitsaktivität auszeichnet (Cree et al., 2021). Von der RRMS und SPMS abzugrenzen ist die primär-progrediente MS (*primary progressive multiple sclerosis*, PPMS), bei der sich die Symptome von Erkrankungsbeginn an ohne Schubaktivität verschlechtern (Pozzilli et al., 2023).

Bis heute ist eine kurative Therapie der MS nicht bekannt (Haki et al., 2024). Man unterscheidet zwischen einer Schubtherapie mit der Gabe von hochdosiertem Cortison und der verlaufsmodifizierenden Therapie, zu der ein breites Spektrum immunmodulatorischer Substanzen verschiedener Wirksamkeitsstufen gehört (Haki et al., 2024). In den letzten Jahren hat sich das Therapieprinzip „*Hit hard and early*“ etabliert, das bereits früh

im Erkrankungsverlauf die entzündliche Aktivität unterdrücken und somit langfristig einen günstigeren Erkrankungsverlauf bewirken soll (Selmaj et al., 2024).

Eine frühe Diagnosestellung und die Zuordnung zu einem der Verlaufstypen sind für einen frühen Therapiebeginn von entscheidender Bedeutung (Brownlee und Solomon, 2021). Die aktuellen Diagnosekriterien nach McDonald von 2017 beruhen auf klinischen Symptomen, laborchemischen Parametern und bildgebenden Verfahren (Thompson et al., 2018). Die Magnetresonanztomografie (MRT) hat sich in den letzten Jahren als Goldstandard der bildgebenden Diagnostik etabliert (Wattjes et al., 2021). Dabei müssen die Kriterien der zeitlichen Dissemination (neue Läsionen im Verlaufs-MRT oder gleichzeitiger Nachweis von Kontrastmittel-anreichernden und nicht-anreichernden Läsionen) und der räumlichen Dissemination (mindestens eine Läsion in mindestens zwei von vier der typischen Hirnregionen) erfüllt sein (Thompson et al., 2018). Im Rahmen der ECTRIMS-Konferenz 2024 (*European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis*) wurden aktuelle Erkenntnisse zum diagnostischen Algorithmus untersucht und Zusatzkriterien diskutiert, die zukünftig die Diagnosestellung der MS erleichtern sollen. Dazu zählen beispielsweise die Hinzunahme des Nervus opticus als fünfte typische Hirnregion und das Ersetzen der zeitlichen Dissemination durch neue MRT-Kriterien wie das Vorkommen von zentralen Venenzeichen in kortikalen Läsionen.

Die standardmäßig angefertigten MRT-Sequenzen in der Beurteilung der MS sind die T2- und FLAIR-Sequenzen (*fluid-attenuated inversion recovery*) sowie die T1-Wichtung zunächst ohne und dann mit intravenöser Gabe von Gadolinium (Filippi et al., 2016). Darüber hinaus lassen sich auch mit anderen MRT-Wichtungen pathologische Veränderungen im ZNS MS-erkrankter Personen nachweisen. Dazu gehören beispielsweise Suszeptibilitäts-gewichtete Sequenzen (*susceptibility-weighted imaging*, SWI) oder T2*-Sequenzen, die Eisenablagerungen darstellen können (Chavhan et al., 2009). Bereiche mit Eisenanreicherungen lassen sich visuell anhand von hypointensen Punkten oder ringförmigen Strukturen erkennen (Chavhan et al., 2009). Solche Bereiche finden sich bei MS-Patienten in Form von paramagnetischen Randläsionen (*paramagnetic rim lesions*, PRL), einer speziellen Unterform von chronisch-aktiven Läsionen (Martire et al., 2022). PRLs gewinnen aktuell an klinischer Bedeutung, da ihr Nachweis im MRT mit gesteigerten Schubraten und einer höheren Wahrscheinlichkeit für einen Krankheitsfort-

schritt unabhängig von der Schubaktivität (*progression independent of relapse activity*, PIRA) assoziiert ist (Reeves et al., 2024).

Weiterhin kann man diffusionsgewichtete Sequenzen (*diffusion tensor imaging*, DTI) zum Nachweis von Diffusionsstörungen im Gewebe nutzen (Grover et al., 2015). Die fraktionelle Anisotropie (*fractional anisotropy*, FA) ist dabei ein Maß für gerichtete Diffusion im Gewebe (Alexander et al., 2007). Parallel ausgerichtete, homogene Nervenfaserbündel generieren hohe FA-Werte (Alexander et al., 2007). DTI kann für die Diagnostik und Prognostik von Verletzungen des Rückenmarks herangezogen werden (Zaninovich et al., 2019). Es konnte auch gezeigt werden, dass FA-Werte in demyelinisierenden Läsionen und Bereichen mit axonaler Schädigung bei MS-Patienten vermindert sind (Sbardella et al., 2013).

Die Voxel-Guided-Morphometry (VGM) ist eine Technik zur Beurteilung von Volumenveränderungen in MRT-Scans (Raj et al., 2024). Dabei können sowohl intraindividuelle Vergleiche mit longitudinalen Scans über einen längeren Zeitraum als auch Gruppenvergleiche durchgeführt werden (Fox et al., 2016). Gegenüber anderen MR-morphometrischen Methoden zeichnet sich VGM durch eine sehr hohe Genauigkeit aus und ist lediglich begrenzt durch die Feldstärke des verwendeten MRT-Scanners und die Auflösung der generierten MRT-Bilder (Raj et al., 2024). Untersuchungen an MS-Patienten haben gezeigt, dass VGM in der Lage ist, sehr diskrete Strukturveränderungen beispielsweise in schwelenden MS Läsionen (*smoldering lesions*, SL) automatisch zu erkennen und Gewebealterationen in der Umgebung solcher und anderer MS-bedingter Entzündungsherde zu detektieren (Fox et al., 2016).

Neben der Bildgebung sind histopathologische Untersuchungen des ZNS-Gewebes erkrankter Personen zum genaueren Verständnis der MS unerlässlich (Kolb et al., 2022). Die Erkrankung umfasst eine Vielzahl pathophysiologischer Veränderungen, insbesondere Inflammation, Demyelinisierung, axonale Schädigung und reaktive Astrogliose (Lassmann, 2018). Die Inflammation wird von diversen zellulären und humoralen Mediatoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems wie z. B. von T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen unterhalten (Attfield et al., 2022). Bei MS-Erkrankten konnten

demyelinisierende Läsionen in der weißen Substanz sowie eine Atrophie der grauen Substanz nachgewiesen werden (Lassmann, 2018).

Schwierigkeiten bei der histopathologischen Charakterisierung von Läsionen sind die begrenzte Verfügbarkeit von Gewebe aus Biopsien von MS-Patienten, sowie die fehlende Möglichkeit Veränderungen im zeitlichen Verlauf zu beobachten (Kolb et al., 2022). Die MRT bietet hier aufgrund der nicht-invasiven Technik Vorteile durch eine bessere Verfügbarkeit und die Möglichkeit zu longitudinalen Analysen (Kolb et al., 2022). Die Untersuchung der Assoziation zwischen MRT-Bildgebung und Histopathologie spielt aus diesem Grund in der MS-Forschung eine besondere Rolle (Filippi et al., 2019). Bisherige Studien haben gezeigt, dass die MRT Rückschlüsse auf die Histopathologie des Gewebes erlaubt. Die Interpretation dieser Zusammenhänge sollte aber kontinuierlich überprüft und verbessert werden (Filippi et al., 2019). Ein Beispiel für den Zusammenhang zwischen Histopathologie und Neuroimaging ist die Detektion demyelinisierender Läsionen durch hyperintense Signale in T2-gewichteten oder FLAIR-Sequenzen, die aus dem klinischen Alltag längst nicht mehr wegzudenken ist (Absinta et al., 2016).

Für die Untersuchung histopathologischer Veränderungen und deren direkter Korrelation mit der MRT-Bildgebung kann man sich Tiermodelle zunutze machen (Blezer et al., 2007). Ein häufig verwendetes Tiermodell der MS ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die durch Immunisierung mit diversen Antigenen in Mäusen induziert werden kann (Constantinescu et al., 2011). Die Tiere entwickeln aufsteigende Paresen mit Beginn in der Schwanzspitze bis hin zur kompletten Tetraplegie in schweren Fällen (Constantinescu et al., 2011). Bei der Krankheitsinduktion mit humanem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein 1-125 (hMOG₁₋₁₂₅) verläuft die Erkrankung chronisch mit dem Erkrankungsgipfel um den 15. Tag nach Immunisierung und späterem Plateau der Symptome (Lyons et al., 1999).

Das Ziel dieser Studie war die Beobachtung MR-morphometrischer Veränderungen in longitudinalen *In-vivo*-MRT-Scans von Mäusen mit EAE im Vergleich zu einer gesunden Kohorte. Der Fokus lag dabei auf dem lumbalen Rückenmark als Prädilektionsstelle inflammatorischer und demyelinisierender Vorgänge in der hMOG₁₋₁₂₅-induzierten EAE (Lyons et al., 1999). Im Anschluss an die *In-vivo*-Scans erfolgte die Perfusion des Ge-

webes und die *Ex-vivo*-Bildgebung mittels MRT. Danach wurden histologische und immunhistochemische Analysen durchgeführt und die Ergebnisse der *Ex-vivo*-MRT-Scans mit den histopathologischen Parametern korreliert. Wir stellten die Hypothese auf, dass es bei immunisierten Mäusen zur Entwicklung fokaler Läsionen kommt, die sich in der akuten Erkrankungsphase durch eine Volumenzunahme im Sinne eines inflammatorischen Ödems auszeichnen. Nach längerer Erkrankungsdauer postulierten wir ein höheres Ausmaß an Gewebsatrophie verglichen mit der gesunden Kohorte und die Korrelation der Volumenabnahme mit histopathologischen Markern.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Tierversuchsgenehmigung und EAE-Induktion

Die Genehmigung zum vorliegenden Tierversuch mit dem Aktenzeichen 81-02.04.2022.A122 wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) vom Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) erteilt. Alle Experimente standen im Einklang mit § 31 der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) und den ARRIVE-Richtlinien für die Meldung von Tierversuchen (Kilkenny et al., 2010). $N = 20$ weibliche Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6J (B6) (Charles River, Sulzfeld, Germany) wurden ab einem Alter von acht Wochen im Tierstall des Deutschen Zentrums für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in Bonn unter spezifischen Pathogen-freien Bedingungen gehalten. $N = 11$ Tiere wurden mit hMOG₁₋₁₂₅ mithilfe eines Standard-Kits (Hooke Laboratories, Lawrence, MA, USA) immunisiert. Es erfolgte die Gabe von 0,5 mg/ml hMOG₁₋₁₂₅ als Emulsion mit komplettem Freund-Adjuvans (*complete Freund's adjuvant*, CFA mit 2-5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*, Stamm H37Ra) als subkutane Injektion von je 100 µl in beide Flanken. Zusätzlich erhielten die Tiere intraperitoneale Injektionen mit 110 ng Pertussis-Toxin in 100 µl steriler phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) am Tag der Immunisierung und 24 Stunden später. Die Überwachung der Tiere erfolgte durch tägliche Gewichtskontrollen und mithilfe des EAE-Scores, einer klinischen Skala zur Einteilung der Symptomatik: 0 – symptomfrei; 1 – Schwanzparese; 2 – komplette Schwanzparese und Schwäche der Hinterläufe; 3 –

komplette Parese von Schwanz und Hinterläufen; 4 – Tetraplegie; 5 – Moribund. Eine Kontrollgruppe von $N = 9$ Tieren wurde nicht immunisiert.

1.2.2 *In-vivo*-MRT

Alle MRT-Untersuchungen erfolgten am 11,7 Tesla Bruker Biospec® Kleintier-MRT (Ettlingen, Deutschland) am DZNE in Bonn. Die Etablierung der verwendeten MRT-Sequenzen und *In-vivo*-Scans erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Serviceleiter des MRTs Hardik Doshi. Alle Tiere erhielten ein Ausgangs-MRT vor Versuchsbeginn. Die immunisierten Tiere wurden nach EAE-Induktion zu folgenden Zeitpunkten gescannt, um verschiedene Phasen der Erkrankung abzubilden: 9 Tage (präklinische EAE), 14 Tage (Erkrankungsmaximum), 23 Tage (subakute EAE), 30 Tage (Erkrankungsplateau) und 87 Tage (chronische EAE). Tiere der Kontrollgruppe erhielten nach 72 Tagen ein Verlaufs-MRT (Abb. 1).



Abb. 1: Versuchsaufbau

Überblick über den Versuchsaufbau. $N = 9$ Kontrollen wurden nicht immunisiert, bei $N = 11$ Tieren erfolgte die EAE-Induktion mit hMOG₁₋₁₂₅. Ein Ausgangs-MRT wurde im Mittel 6 Tage vor Immunisierung angefertigt. Nach der *In-vivo*-MRT-Bildgebung erfolgten *Ex-vivo*-MRT und histologische Untersuchungen. Modifiziert nach Figure 1 (Lowinski et al., 2025). EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; hMOG, humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; Kon, Kontrolle; MRT, Magnetresonanztomografie.

Die Bildakquisition wurde mit einer planaren Oberflächenspule mit 15 mm Durchmesser durchgeführt. *In vivo* wurde eine dreidimensionale isotrope T1-gewichtete Sequenz mit einer Repetitionszeit (*time of repetition*, TR) von 50 ms, einer Echozeit (*time of echo*, TE) von 2,5 ms und einer Auflösung von 0,13 mm x 0,13 mm x 0,13 mm verwendet. Während des einstündigen Scans erfolgte die inhalative Sedierung der Tiere mittels Isofluran (Iso-vet®, 1000 mg/g, Bad Oldesloe, Deutschland). Mit einem Lokalisierungs-

Programm der Bruker Paravision Software (ParaVision® 7) wurde der vierte Lumbalwirbel identifiziert, wobei das Os ilium als Orientierungshilfe diente (Harrison et al., 2013).

1.2.3 Perfusion und Präparation des Gewebes

Am Tag des letzten MRT-Scans erfolgten die transkardiale Perfusion der Tiere mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und die Präparation des lumbalen Rückenmarks. Das dem vierten Wirbelkörper benachbarte Segment konnte dabei nicht exakt identifiziert werden, sodass ein größerer Abschnitt des lumbalen Rückenmarks entnommen wurde. Dieses Segment wird im Folgenden als Vertebra L4 (vL4) bezeichnet. Das entnommene Gewebe wurde über Nacht in 4 % PFA immersionsfixiert und am nächsten Tag in 10 ml Spritzen mit 1 % Agarose eingebettet.

1.2.4 *Ex vivo* MRT

Die Durchführung der *Ex-vivo*-MRT-Scans erfolgte mit einer Kryoprobe (Bruker BioSpec® CryoProbe™). Die folgenden *Ex-vivo*-MRT Sequenzen wurden verwendet: 3D T1-FLASH mit TR = 30 ms, TE = 3,6 ms und einer Auflösung von 0.075 mm x 0.075 mm x 0.1 mm; 3D isotrope T2-star (T2*) with TR = 30 ms, TE = 10 ms und einer Auflösung von 0.1 mm x 0.1 mm x 0.1 mm; DTI mit echo-planarer Bildgebung (*echo-planar imaging*, EPI) in 96 Diffusionsrichtungen und einer Auflösung von 0.1095 mm x 0.1099 mm x 0.5 mm.

1.2.5 MRT-Auswertung

Für die Auswertung der T1 *In-vivo*-Scans erfolgte zunächst die manuelle Segmentierung von vL4. Die segmentierten Abschnitte wurden mithilfe der VGM-Software (VGMorph GmbH, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) durch die Entwickler Dr. Andreas Dabringhaus und Dr. Matthias Kraemer auf Volumenänderungen untersucht und als Wärmekarte dargestellt. Die Auswertung von Volumenänderungen in den T1-gewichteten *Ex-*

vivo-Scans erfolgte mit VGM als Gruppenvergleichsanalyse. Mittels der Benjamini-Hochberg-Prozedur (Genovese et al., 2002) ergab sich eine Signifikanzgrenze von $P = 0.0079$ ($-\log_{10}(P = 2.10)$) für statistisch signifikante Volumenänderungen. Für jeden *Ex-vivo*-MRT-Scan wurden fünf transversale Schnittbilder entlang der Längsquartile des Präparates ausgewählt. In T1-gewichteten *Ex-vivo*-Scans wurde die Fläche des Vorderseitenstrangs (*anterolateral tract*, ALT) und des gesamten Rückenmarks ausgemessen. Für T2*-gewichtete *Ex-vivo*-Scans erfolgte die Analyse des Vorderseitenstrangs durch Segmentierung und Bestimmung der mittleren Intensität. Die ermittelten Werte wurden in Relation zur mittleren Intensität der grauen Substanz desselben Präparates gesetzt, um eine interne Kontrolle der Grauwertinformation zu ermöglichen. Die mit DTI erhobenen Daten wurden mit *rigid body transformation* (Zhou et al., 2011) in ihrer Ausrichtung angeglichen. Die Generierung von FA-Karten erfolgte mit der Software DSI-Studio Version 2023.12.06. Für jedes Tier wurde der mittlere FA-Wert im Bereich des Vorderseitenstrangs bestimmt. Zur Darstellung, Segmentierung und Analyse von Grauwertinformationen, Flächen und Volumina der MRT-Scans wurden die VGM-Software, MRICron Version 1.0.20190902 und ITKsnap Version 3.8.0 verwendet.

1.2.6 Paraffin-Einbettung

Nach dem letzten *Ex-vivo*-Scan erfolgte die Überführung in Paraffin mit dem Tissue-Tek VIP 5 Jr. (Umkirch, Deutschland, Vakuum Infiltration Prozessor Sakura). Die Einbettung erfolgte mit der Histocore Arcadia H (Leica, Nussloch, Deutschland) Einbettstation. Die Präparate wurden mit einem halbautomatischen HistoCore Multicut Mikrotom (Leica) seriell in transversale Schichten von 10 μm Dicke geschnitten und auf Superfrost® (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) Objektträger aufgezogen.

1.2.7 Hämatoxylin/Eosin-Färbung und Immunhistochemie

Jeder fünfte Objektträger wurde einer Färbung zugeordnet: (a) Die Objektträger 1, 6, 11, 16, etc. wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) nach einem Standardprotokoll gefärbt (Fischer et al., 2008). (b) Die Objektträger 2, 7, 12, 17, etc. wurden immunhistochemisch

auf basisches Myelinprotein (*myelin basic protein*, MBP) und den Oberflächenmarker *cluster of differentiation* (CD) 3 untersucht. (c) Die Objektträger 3, 8, 13, 18, etc. wurden immunhistochemisch auf saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) und ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*, IBA1) untersucht. (d) Die Objektträger 4, 9, 14, 19, etc. wurden immunhistochemisch auf nicht-phosphoryliertes Neurofilamentprotein H (SMI-32) und Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach einem von der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll durchgeführt (Weier et al., 2022). Die gefärbten Schnitte wurden mit dem DMI8 Thunder Imager Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) mikroskopiert und die Bilder mit der LAS X Software (Leica Application Suite X 3.8.2.27713) als *Tile Scans* aufgenommen.

1.2.8 Auswertung der Histologie und Immunhistochemie

Die Auswertung der mikroskopierten Schnitte erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.54f. Für die Analyse der HE-Schnitte wurden fünf Schnitte in analoger Lokalisation zu den Schnitten der *Ex-vivo*-MRT-Analyse ausgewählt. In den Schnitten wurden der Vorderseitenstrang und die Gesamtfläche des Rückenmarks segmentiert und die relative Fläche des Vorderseitenstrangs berechnet. In den *Tile Scans* der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurde das Rückenmark manuell segmentiert. Anschließend wurden für jeden Farbkanal die folgenden Schwellenwerte gesetzt und die Fläche der innerhalb dieser Schwellenwerte liegenden Pixel gemessen: GFAP: 1.500-10.000; IBA1: 300-10.000; MBP: 5.500-20.000; CD3: 200-400; APP: 800-1.500; SMI-32: 6.000-20.000. Die Fläche der gefärbten Areale wurde in Relation zur Gesamtfläche des entsprechenden Rückenmarksquerschnitts gesetzt.

1.2.9 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 9.5.1, Dotmatics., Boston, MA, USA) durchgeführt. Für jeden durch manuelle Segmentierung erhobenen Parameter wurde ein Mittelwert pro Tier gebildet. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % festge-

legt. Alle Gruppenvergleiche wurden aufgrund der kleinen Gruppengröße unabhängig von der Verteilung der Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Korrelationsanalysen erfolgten durch Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (R_s).

1.3 Ergebnisse

1.3.1 B6-Mäuse entwickeln eine schwere EAE nach Immunisierung mit hMOG₁₋₁₂₅

Die erhobenen klinischen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst, EAE-Score und Gewicht sind in Abbildung 2 dargestellt. Alle immunisierten Tiere ($N = 11$) entwickelten eine chronische EAE. Nach dem Erkrankungsgipfel erfolgte bei allen Tieren eine partielle Remission mit anschließendem Wiederanstieg und Plateau des EAE-Scores. Mit Beginn der Erkrankung trat ein Gewichtsverlust auf, von dem sich die Tiere während der Remissionsphase wieder erholten.

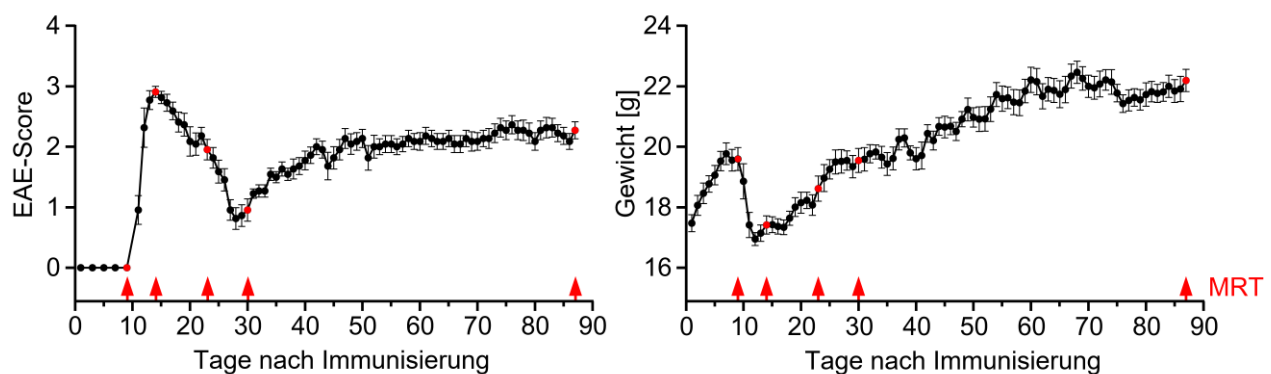


Abb. 2: EAE-Score und Gewicht während des *In-vivo*-Versuchsteils.

Die Zeitpunkte der *In-vivo*-MRT-Scans sind rot markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler des Mittelwerts. Modifiziert nach Figure 1 (Lowinski et al., 2025). EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; hMOG, humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; MRT, Magnetresonanztomografie.

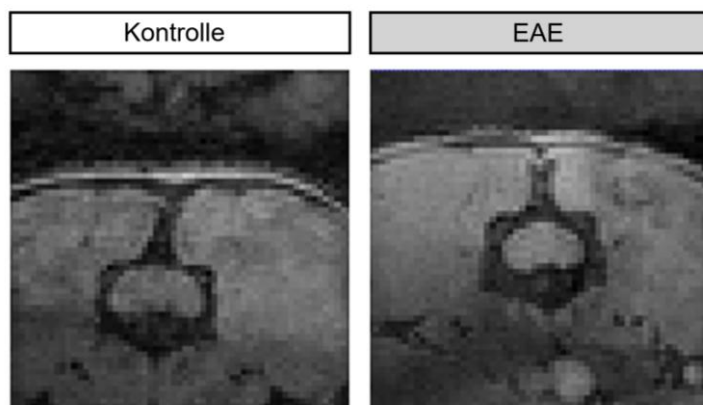
Tab. 1: Klinische Parameter der EAE

EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis. Modifiziert nach Table 2, (Lowinski et al., 2025).

Parameter	Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes
Tag des Erkrankungsbeginns	11,36 $\pm$ 0,20
Durchschnittlicher EAE-Score	1,99 $\pm$ 0,12
Maximum EAE-Score	2,91 $\pm$ 0,09
Finaler EAE-Score	2,27 $\pm$ 0,14

1.3.2 Die Analyse von *In-vivo*-MRT mit VGM zeigt keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied für Volumenänderungen

Abbildung 3 zeigt beispielhaft T1 *Ex-vivo*-Scans des lumbalen Rückenmarks eines gesunden Tieres und eines Tieres nach EAE-Induktion. In Abbildung 4 ist die longitudinale VGM-Analyse des lumbalen Rückenmarkssegments vL4 für ein Tier beispielhaft dargestellt. Abbildung 5 zeigt die relative Volumenänderung zwischen Ausgangs-Scan und den Verlaufskontrollen. Es ließ sich bei beiden Versuchsgruppen eine relative Volumenzunahme im zeitlichen Verlauf nachweisen. Ein signifikanter Gruppenunterschied war allerdings nicht vorhanden ($P = 0,25$).

**Abb. 3:** Axiale Schnittbilder des *In-vivo*-MRT

Axiale Schnittbilder des lumbalen Rückenmarks im T1-gewichteten *In-vivo*-MRT in der chronischen Phase der EAE (MRT 5). Modifiziert nach Figure 2 (Lowinski et al., 2025). EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; MRT, Magnetresonanztomografie.

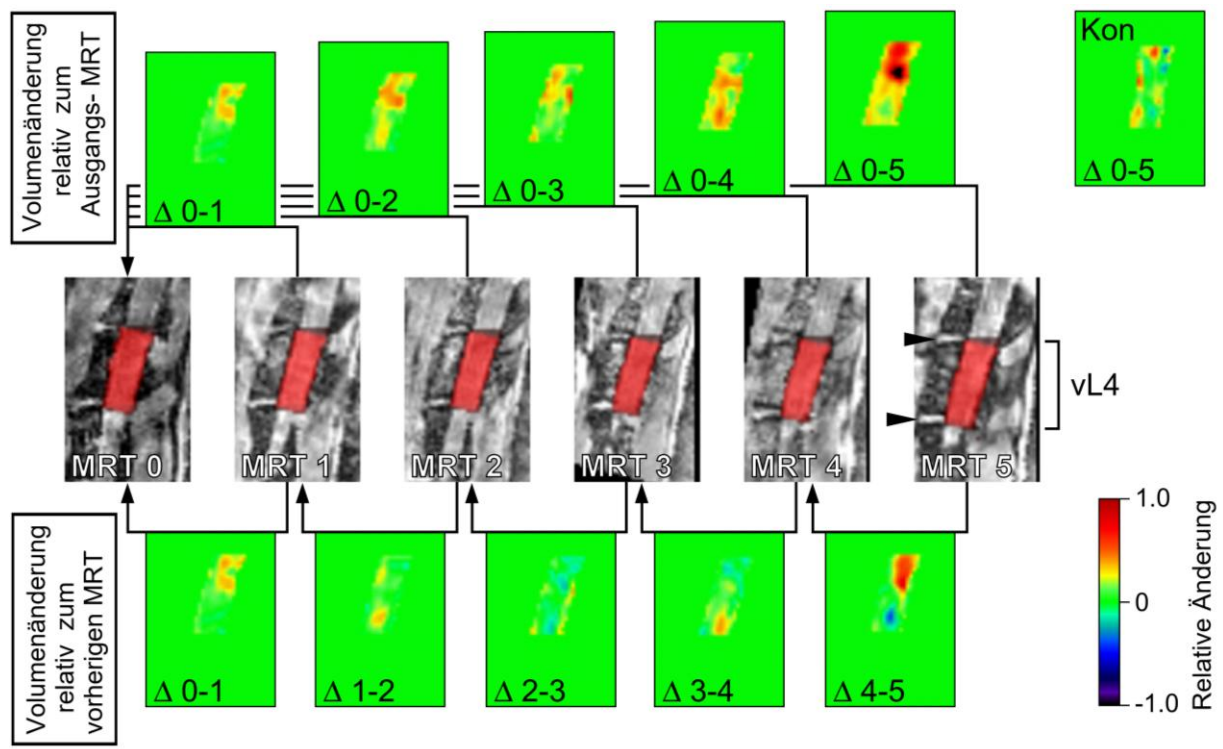


Abb. 4: VGM-Analysen der *In-vivo*-MRT-Scans

In der mittleren Reihe sind longitudinale *In-vivo*-MRT-Scans des lumbalen Rückenmarks eines EAE-Tieres in sagittaler Schnittführung dargestellt. Die roten Markierungen entsprechen manuellen Segmentierungen von vL4. In MRT 5 sind die angrenzenden Bandscheiben mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die obere Reihe zeigt die VGM-Analysen als Wärmekarten der relativen Volumenänderungen im Vergleich zum Ausgangs-MRT, die untere Reihe im Vergleich zum vorherigen MRT-Scan. Rechts oben sind zum Vergleich die Volumenänderungen bei einem Kontrolltier gezeigt. Modifiziert nach Figure 2 (Lowinski et al., 2025). EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; Kon, Kontrolle; MRT, Magnetresonanztomografie; VGM, Voxel-Guided-Morphometry.

Gruppenvergleich

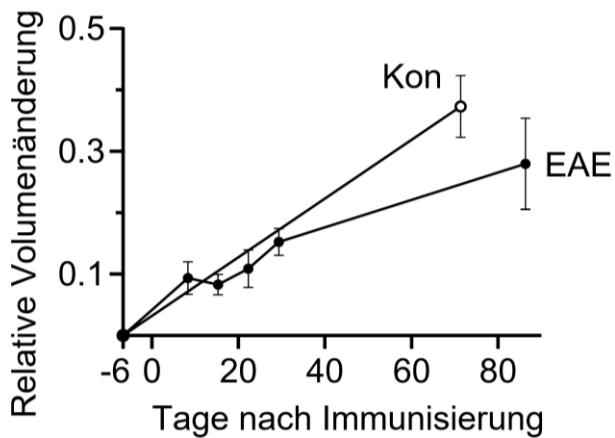


Abb. 5: Graphische Darstellung der relativen Volumenänderung in *In-vivo*-MRT-Scans

Durchschnittliche relative Volumenänderungen im Vergleich zum Ausgangs-MRT von EAE-Tieren ($N = 6$) und Kontrollen ($N = 9$). Modifiziert nach Figure 2 (Lowinski et al., 2025). EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; hMOG, humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; Kon, Kontrolle; MRT, Magnetresonanztomografie; VGM, Voxel-Guided-Morphometry.

1.3.3 Auswertung der *Ex-vivo*-MRT-Scans

In Abbildung 6 sind Schnittbilder des Rückenmarks aus *Ex-vivo*-MRT-Scans und die entsprechenden Gruppenanalysen dargestellt. Bei der Analyse der T1-gewichteten *Ex-vivo*-Scans zeigte sich bei EAE-Tieren im Vergleich zur gesunden Kohorte eine statistisch signifikante Reduktion der Fläche des Vorderseitenstrangs ($P < 0,001$) und des gesamten Rückenmarksquerschnitts ($P = 0,013$). In *Ex-vivo*-T2*-gewichteten Scans war die relative Intensität des Vorderseitenstrangs bei EAE-Tieren statistisch signifikant erhöht ($P = 0,02$). Bei Auswertung der Diffusions-Bildgebung zeigte sich kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied für die gemessenen FA-Werte ($P = 0,24$). Abbildung 7 zeigt die Gruppenanalyse der Volumenunterschiede in T1 *Ex-vivo*-Scans mit VGM. Es ist eine statistisch signifikante Volumenreduktion im Bereich des ALT erkennbar.

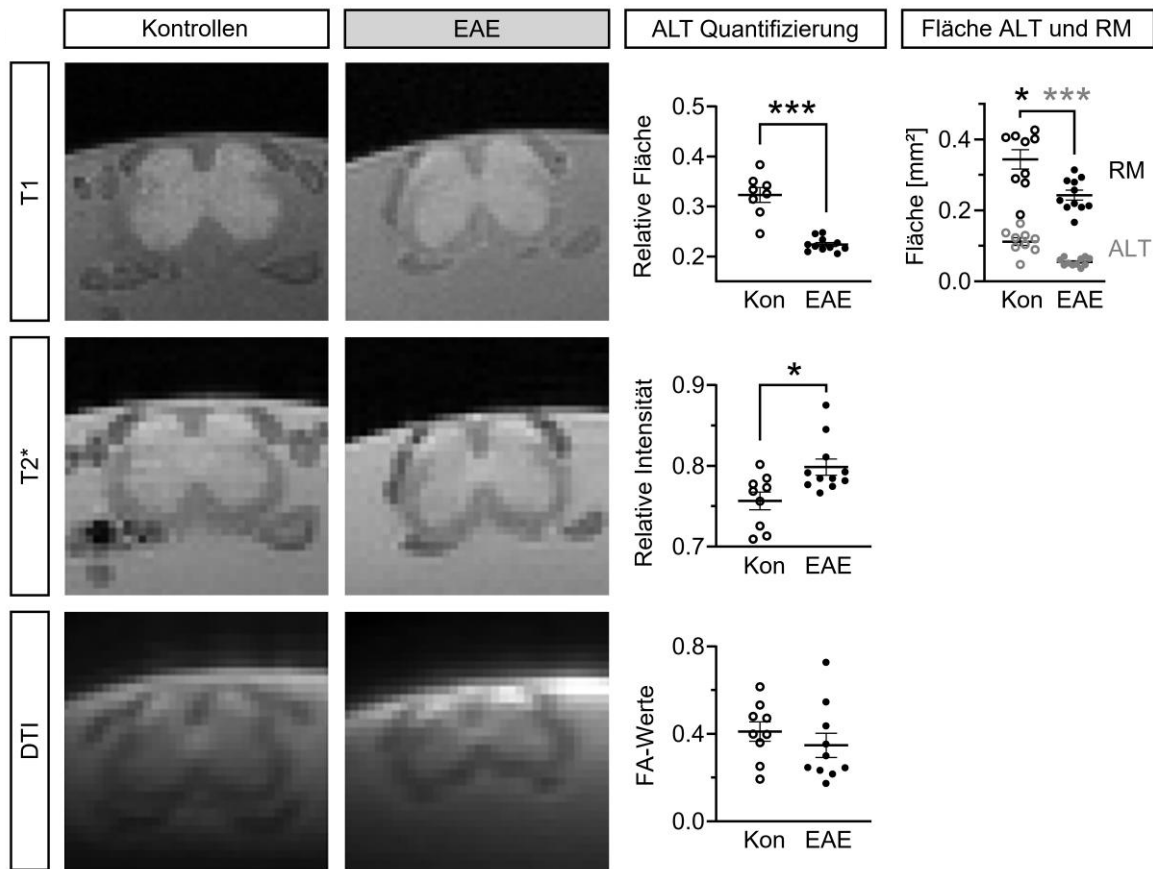


Abb. 6: ALT-Quantifizierung in *Ex-vivo*-MRT-Scans

Axiale Schnittbilder des lumbalen Rückenmarks in *ex vivo* T1-, T2*- und DTI-Wichtung. Unter ALT Quantifizierung sind die Gruppenvergleichsanalysen der relativen Fläche, relativen Intensität und FA-Werte des ALT für Kontrollen ($N = 9$) und immunisierte Tiere ($N = 11$) dargestellt. Rechts oben sind die absoluten Werte für ALT (graue Schrift) und RM (schwarze Schrift) als Gruppenvergleichsanalyse aufgeführt. * $P < 0.05$; *** $P \leq 0.005$. Modifiziert nach Figure 3, (Lowinski et al., 2025). ALT, *anterolateral tract*; DTI, *diffusion tensor imaging*; EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; FA, fraktionale Anisotropie; Kon, Kontrolle; MRT, Magnetresonanztomografie; RM, Rückenmark.

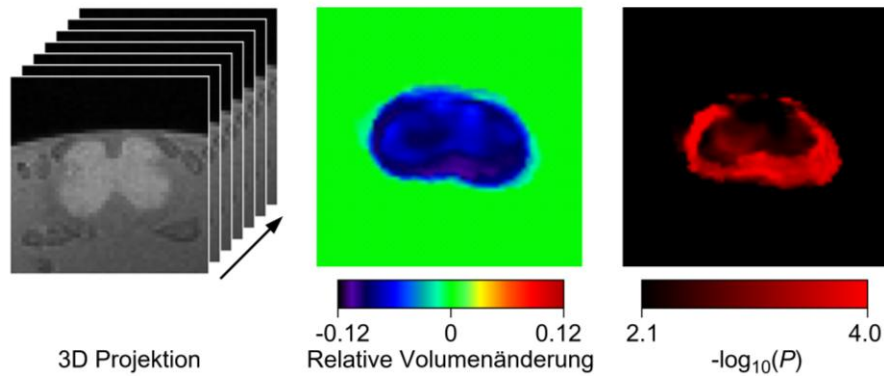


Abb. 7: VGM-Analyse der *Ex-vivo* MRT-Scans

Gruppenanalyse des lumbalen Rückenmarks durch VGM. Links Darstellung des *ex-vivo*-MRTs als 3D Projektion. In der Mitte Wärmekarte der lokalen Volumenänderungen der immunisierten Tiere im Vergleich zu Kontrollen. Rechts Darstellung statistisch signifikanter Bereiche durch rote Färbung mit einem Cut-off-Wert von $P < 0.0079$ (or $-\log_{10}(P) > 2.10$). Modifiziert nach Figure 3, (Lowinski et al., 2025). MRT, Magnetresonanztomografie; VGM, Voxel-Guided-Morphometry.

1.3.4 Gruppenunterschiede bei der Untersuchung histopathologischer Parameter

In Abbildung 8 sind exemplarisch histologisch und immunhistochemisch gefärbte Schnitte sowie die zugehörigen Gruppenanalysen dargestellt. Die HE-gefärbten Schnitte zeigen eine statistisch signifikante Reduktion der relativen Fläche der weißen Substanz bei der immunisierten Kohorte im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($P < 0,001$). In der IHC waren die GFAP-positive ($P < 0,001$), IBA1-positive ($P < 0,001$) und CD3-positive ($P = 0,006$) Fläche bei EAE-Tieren statistisch signifikant erhöht. Die Fläche MBP-positiver Areale war hingegen bei den Kontrolltieren größer ($P = 0,002$). Für die Marker SMI-32 ($P = 0,82$) und APP ($P = 0,66$) fand sich kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied.

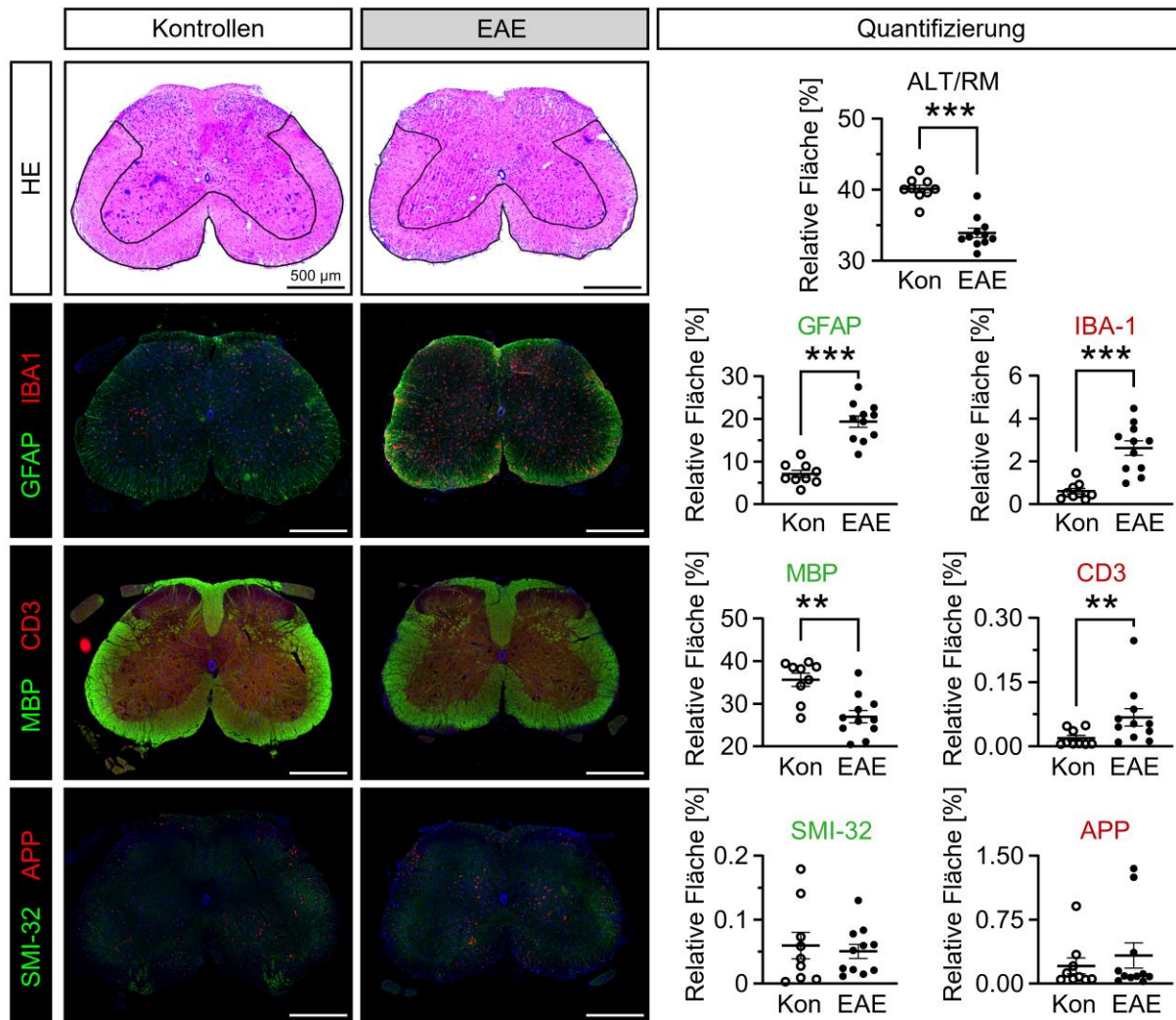


Abb. 8: Histologie und Immunhistochemie

Axiale Schnittbilder des lumbalen Rückenmarks in HE-, GFAP-, IBA1-, MBP-, CD3-, SMI-32- und APP-Färbung exemplarisch dargestellt. Rechts Gruppenvergleichsanalysen für Kontrollen ($N = 9$) und EAE-Tiere ($N = 11$). ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Modifiziert nach Figure 4, (Lowinski et al., 2025). ALT, *anterolateral tract*; APP, *amyloid precursor protein*; CD3, *cluster of differentiation 3*; EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; HE, Hämatoxylin/Eosin; IBA1, ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1; Kon, Kontrolle; MBP, basisches Myelinprotein; RM, Rückenmark; SMI-32, nicht-phosphoryliertes Neurofilamentprotein H.

1.3.5 Korrelation klinischer, bildgebender und histopathologischer Parameter

Abbildung 9 zeigt Korrelationsanalysen zwischen finalem EAE-Score, *Ex-vivo*-MRT-Sequenzen und histopathologischen Parametern. Der finale EAE-Score korrelierte statistisch signifikant invers mit der Fläche der weißen Substanz in *Ex-vivo*-T1 Scans ($R_s = -0,84$; $P < 0.001$) und der Expression verschiedener histopathologischer Parameter. Die Fläche des Vorderseitenstrangs in *Ex-vivo*-T1-Scans korrelierte statistisch signifikant mit der Fläche des Vorderseitenstrangs in HE-gefärbten Schnitten ($R_s = 0,77$; $P = 0.001$). Hyperintense Werte in T2* MRT-Scans korrelierten statistisch signifikant mit einer größeren SMI-32-positiven Fläche ($R_s = 0,75$; $P < 0.001$). Die immunhistochemisch erhobenen Parameter korrelierten statistisch signifikant untereinander, insbesondere GFAP und IBA1 ($R_s = 0,88$; $P < 0.001$).

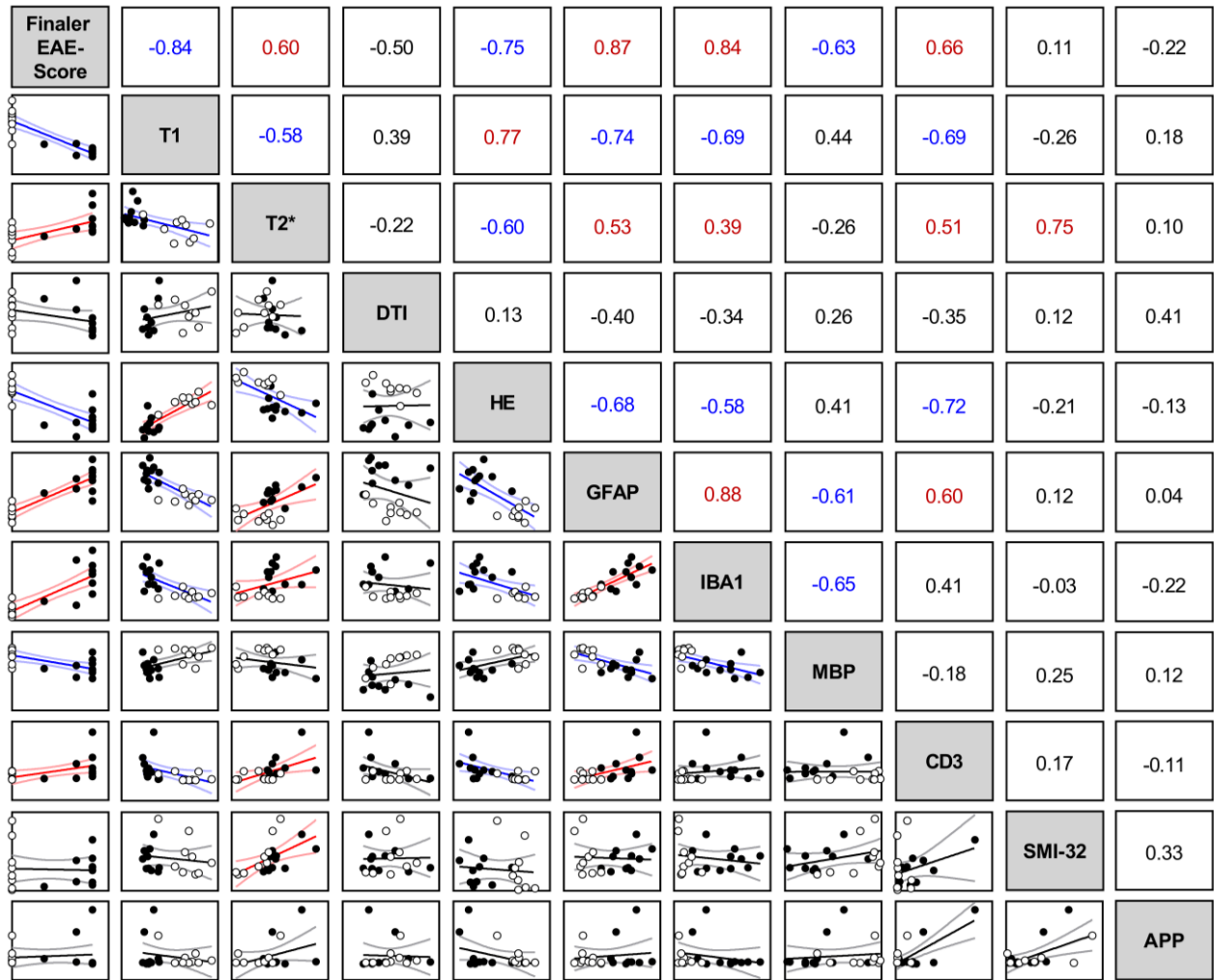


Abb. 9: Korrelationsmatrix klinischer, bildgebender und histopathologischer Parameter

Auf der Diagonalen sind verschiedene Parameter der paarweisen Korrelation aufgelistet (grau hinterlegt). Oberhalb der Diagonalen sind die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (R_s) angegeben. Unterhalb der Diagonalen sind Streudiagramme mit Regressionslinien und 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Die x-Achse repräsentiert den Parameter aus der entsprechenden Spalte des Diagramms, die y-Achse den Parameter aus der entsprechenden Zeile. Signifikante Korrelationen ($P < 0,05$) sind rot (positive Korrelation) bzw. blau (negative Korrelation) markiert. Kontrollwerte werden als weiße Kreise und EAE-Werte als schwarze Kreise angezeigt. Modifiziert nach Figure 5, (Lowinski et al., 2025). APP, *amyloid precursor protein*; CD3, *cluster of differentiation 3*; DTI, *diffusion tensor imaging*; EAE, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; GFAP, *glial fibrillary acidic protein*; HE, Hämatoxylin/Eosin; IBA1, ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1; MBP, basisches Myelinprotein; SMI-32, nicht-phosphoryliertes Neurofilamentprotein H.

1.4 Diskussion

Ziel dieser Studie war die VGM-morphometrische Analyse longitudinaler *In-vivo*-MRT-Scans bei Mäusen nach EAE-Induktion und der Vergleich mit einer Kontrollgruppe. Anschließend erfolgten *Ex-vivo*-MRT-Scans und die Korrelation mit histopathologischen Parametern.

Die mit hMOG₁₋₁₂₅ immunisierten Tiere entwickelten wie erwartet eine chronische EAE. Die Erkrankung verlief synchron bei allen Tieren. In den longitudinalen *In-vivo*-MRT-Scans des lumbalen Rückenmarks zeigte sich keine identifizierbare Läsion. Auch in der VGM-Analyse fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen immunisierten Tieren und Kontrollen. In der Fachliteratur wurde auf die Bedeutung der Feldstärke des verwendeten MRT-Scanners zur Verbesserung der Bildauflösung und Verringerung des Signal-Rausch-Verhältnisses hingewiesen (Bilgen et al., 2005). Die Generierung von MRT-Bildern mit höherer Auflösung könnte potenziell die visuelle Darstellung von Läsionen und deren Analysen mit VGM verbessern (Raj et al., 2024). Eine wichtige Limitation ist dabei die Dauer der *In-vivo*-Scans durch die Narkosezeit der Versuchstiere.

Die Analyse des lumbalen Rückenmarks mit VGM zeigte eine Volumenzunahme über die Zeit der Versuchsdauer bei immunisierten Tieren und Kontrollen. Dies kann durch eine Größenzunahme der Tiere begründet sein, ebenfalls suggeriert durch die in Abbildung 2 dargestellte Gewichtszunahme. Eine andere mögliche Erklärung ist ein Bias bei der Segmentierung der analysierten Rückenmarkssegmente anhand des benachbarten Wirbelkörpers.

Die Analyse der *Ex-vivo*-T1-Scans und der HE-gefärbten histologischen Schnitte ergab eine statistisch signifikante Reduktion der Fläche des Vorderseitenstrangs, die auf einer Atrophie der weißen Substanz beruhte. Für Mäuse mit EAE konnten fokale Atrophien der weißen Substanz im Gehirn bereits nachgewiesen werden (Hamilton et al., 2019). Die immunhistochemische Analyse zeigte demyelinisierende Läsionen in diesem Bereich, die zur Volumenabnahme beigetragen haben (Trapp et al., 2018). Bei MS-Patienten konnte gezeigt werden, dass eine Gewebsatrophie in der grauen und weißen Substanz des Gehirns mit einer schlechteren Prognose einhergeht und prädiktiv zu phy-

sischen und kognitiven Defiziten führt (Andravizou et al., 2019). Die Ursache dieser Atrophie ist nicht vollständig geklärt, es wird ein Zusammenspiel aus Demyelinisierung und axonalem Schaden vermutet (Hamilton et al., 2019).

In der T2*-Wichtung der *Ex-vivo*-MRT-Scans präsentierten sich bei den EAE-Tieren keine typischen Veränderungen im Sinne hypointenser Punkte oder Ringe. Stattdessen zeigten die immunisierten Tiere statistisch signifikant hyperintensere Grauwerte im Bereich des Vorderseitenstrangs im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Diese Veränderung könnte möglicherweise durch demyelinisierende Prozesse und axonale Schädigung bedingt sein (Debette und Markus, 2010). Eine Steigerung der Grauwerte in T2*-gewichteten MRT-Scans korrelierte statistisch signifikant mit einem Anstieg der SMI-32-gefärbten Areale ($R_s = 0,75$; $P < 0.001$), was ebenfalls auf eine mögliche Assoziation T2*-hyperintensere Signale und axonaler Schädigung hinweist (Parent et al., 2023).

Die Analyse der *Ex-vivo*-DTI-Scans ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied für die FA-Werte der Versuchsgruppen. Dies könnte auf eine ungenügende Bildauflösung oder Bewegungsartefakte zurückzuführen sein (Wu und Miller, 2017). Verringerte FA-Werte werden in der Literatur für demyelinisierende Läsionen in der weißen Substanz beschrieben und beruhen vermutlich auf einem axonalen Schädigungsmuster (Sbardella et al., 2013). In unserer Studie ließ sich allerdings keine statistisch signifikante Korrelation der FA-Werte mit dem Vorkommen APP- oder SMI-32-positiver Areale in der Histopathologie nachweisen. Veränderungen der fraktionellen Anisotropie sind mit einer schlechteren Krankheitsprognose der EAE assoziiert und damit ein interessanter Ansatz für zukünftige Studien (Gilli et al., 2016).

Die immunhistochemischen Analysen zeigten pathologische Charakteristika, die für EAE Läsionen typisch sind: Demyelinisierung, Inflammation und Astrogliose (Constantinescu et al., 2011). Interessant ist der fehlende Nachweis eines Gruppenunterschieds für die axonalen Degenerationsmarker APP und SMI-32. Für APP wurde nachgewiesen, dass es in aktiv demyelinisierenden Läsionen akkumuliert (Gehrmann et al., 1995). SMI-32 ist ein Marker für nicht-phosphoryliertes Tau-Protein, das in terminalen axonalen Ovoiden nach Axotomie vorkommt (Dziedzic et al., 2010). In Studien an MS-Patienten wurde gezeigt, dass APP und SMI-32 insbesondere in akuten Läsionen vorkommen und ihr Auf-

treten im Laufe der Erkrankung abnimmt (Schirmer et al., 2011). Dies könnte eine mögliche Begründung für die fehlende statistische Differenz zwischen den Gruppen der EAE-Tiere und der Kontrollen sein.

Unsere Analysen zeigten, dass klinische, *Ex-vivo*-MRT und histopathologische Parameter miteinander korrelieren. Insbesondere bestätigt die statistisch signifikante Korrelation zwischen T1-gewichteten Scans und HE-Schnitten, dass T1-Sequenzen gut zur Darstellung anatomischer Strukturen geeignet sind (Bitar et al., 2006). Das Verständnis pathophysiologischer Veränderungen und deren Korrelate in der MRT-Bildgebung ist essenziell, um mittels nicht-invasiver MRT-Diagnostik Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Gewebeeigenschaften ziehen zu können (Khodanovich et al., 2022). Eine Herausforderung bestand in der exakten Lokalisation und Präparation des durch *In-vivo*-Bildgebung dargestellten Rückenmarkssegments, sodass eine Korrelation mit *Ex-vivo* erhobenen Parametern nicht möglich war. Ein Lösungsansatz einer anderen Studie war beispielsweise die Untersuchung einer größeren iatrogenen Läsion des Rückenmarks über mehrere Segmente, die sich in der *In-vivo*- und *Ex-vivo*-Bildgebung gut lokalisieren ließ und somit das exakte anatomische Wiederauffinden ermöglichte (Noristani et al., 2015). Für die Untersuchung kleinerer, disseminierter Läsionen bei EAE-Tieren bedarf diese Methode jedoch weiterer Optimierung.

Die hier vorliegende Studie zeigt, dass sich klinische, bildmorphologische und histopathologische Parameter korrelieren lassen. Die Anwendung von VGM ermöglicht dabei den Voxel-genauen Vergleich verschiedener MRT-Scans und deren Analyse auf Volumenänderungen. Die Verfeinerung der MRT-Auflösung und die exakte anatomische Zuordnung der lumbalen Rückenmarksregion vor und nach Präparation bieten dabei eine Grundlage für weitere Experimente. Die Optimierung der MRT-Bildqualität und die Generierung Artefakt-freier Scans könnte zukünftig die Verlaufsbeobachtung der Läsionsentwicklung *in vivo* erleichtern und prädiktive Aussagen über den Erkrankungsverlauf anhand früher MR-morphometrischer Parameter ermöglichen.

1.5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die longitudinale Verlaufsanalyse des lumbalen Rückenmarks mittels *In-vivo*-MRT-Bildgebung, sowie die Korrelation von klinischen Parametern, *Ex-vivo*-MRT und histopathologischen Merkmalen in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose. Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine autoimmune, chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, die eine häufige Ursache für Behinderungen im jungen Erwachsenenalter darstellt. Die Untersuchung gewebe-spezifischer Veränderungen und ihrer bildmorphologischen Korrelate ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

In dieser Studie wurde bei $N = 11$ Mäusen mit humanem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein₁₋₁₂₅ eine Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis induziert und T1-gewichtete MRT-Scans des lumbalen Rückenmarks in verschiedenen Erkrankungsphasen durchgeführt. Eine Kontrollgruppe von $N = 9$ Tieren wurde zu Beginn und am Ende der *In-vivo*-Versuche gescannt. Im Anschluss wurden die Tiere perfundiert und das lumbale Rückenmark präpariert. Es wurden T1-, T2*- und diffusionsgewichtete *Ex-vivo*-MRTs sowie histologische bzw. immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Gruppenvergleichen und Korrelationsanalysen.

Die Ergebnisse zeigten eine Volumenzunahme des lumbalen Rückenmarks im Laufe der Zeit bei beiden Kohorten. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in den *In-vivo*-MRT-Scans festgestellt. Die Auswertung der *Ex-vivo*-T1-Scans ergab eine Reduktion der weißen Substanz bei den immunisierten Tieren, während T2*-gewichtete Bilder bei der immunisierten Kohorte Hyperintensitäten in der weißen Substanz offenbarten. Die T1-gewichteten *Ex-vivo*-Scans korrelierten statistisch signifikant mit einer Atrophie des Vorderseitenstrangs in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und histopathologischen Markern für Mikroglia-Aktivierung und Astrogliose.

Diese Studie zeigt, dass die MRT zum Nachweis einer Atrophie der weißen Substanz im Rückenmark geeignet ist, die wiederum mit einem höheren Krankheits-Score und ausgeprägterer Histopathologie assoziiert ist. Es bleibt Aufgabe zukünftiger Studien die

Bildauflösung der *In-vivo*-MRT-Scans zu verbessern und eine mögliche Korrelation mit *ex vivo* erhobenen Parametern nachzuweisen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Absinta M, Sati P, Reich DS. Advanced MRI and staging of multiple sclerosis lesions. *Nat. Rev. Neurol.* 2016; 12: 358–368

Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics.* 2007; 4: 316–329

Andravizou A, Dardiotis E, Artemiadis A, Sokratous M, Siokas V, Tsouris Z, Aloizou A-M, Nikolaidis I, Bakirtzis C, Tsivgoulis G, Deretzi G, Grigoriadis N, Bogdanos DP, Hadji-georgiou GM. Brain atrophy in multiple sclerosis: mechanisms, clinical relevance and treatment options. *Autoimmun. Highlights.* 2019; 10: 7

Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2022; 22: 734–750

Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron.* 2018; 97: 742–768

Bilgen M, Al-Hafez B, Berman NEJ, Festoff BW. Magnetic resonance imaging of mouse spinal cord. *Magn. Reson. Med.* 2005; 54: 1226–1231

Bitar R, Leung G, Perng R, Tadros S, Moody AR, Sarrazin J, McGregor C, Christakis M, Symons S, Nelson A, Roberts TP. MR Pulse Sequences: What Every Radiologist Wants to Know but Is Afraid to Ask. *RadioGraphics.* 2006; 26: 513–537

Blezer ELA, Bauer J, Brok HPM, Nicolay K, 't Hart BA. Quantitative MRI-pathology correlations of brain white matter lesions developing in a non-human primate model of multiple sclerosis. *NMR Biomed.* 2007; : 90–103

Brownlee WJ, Solomon AJ. Misdiagnosis of multiple sclerosis: Time for action. *Mult. Scler. J.* 2021; 27: 805–806

Chavhan GB, Babyn PS, Thomas B, Shroff MM, Haacke EM. Principles, Techniques, and Applications of T2*-based MR Imaging and Its Special Applications. *RadioGraphics.* 2009; 29: 1433–1449

Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* 2011; 164: 1079–1106

Cree BAC, Arnold DL, Chataway J, Chitnis T, Fox RJ, Pozo Ramajo A, Murphy N, Lassmann H. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: New Insights. *Neurology.* 2021; 97: 378–388

Debette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010; 341: c3666–c3666

Disanto G, Berlanga AJ, Handel AE, Para AE, Burrell AM, Fries A, Handunnetthi L, De Luca GC, Morahan JM. Heterogeneity in Multiple Sclerosis: Scratching the Surface of a Complex Disease. *Autoimmune Dis.* 2011; 2011: 1–12

Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur. J. Neurol.* 2019; 26: 27–40

Dziedzic T, Metz I, Dallenga T, König FB, Müller S, Stadelmann C, Brück W. Wallerian Degeneration: A Major Component of Early Axonal Pathology in Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* 2010; 20: 976–985

Filippi M, Brück W, Chard D, Fazekas F, Geurts JJG, Enzinger C, Hametner S, Kuhlmann T, Preziosa P, Rovira À, Schmierer K, Stadelmann C, Rocca MA. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2019; 18: 198–210

Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, Rovira A, Sastre-Garriga J, Tintorè M, Frederiksen JL, Gasperini C, Palace J, Reich DS, Banwell B, Montalban X, Barkhof F. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol.* 2016; 15: 292–303

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2008; 2008: pdb.prot4986

- Fox J, Kraemer M, Schormann T, Dabringhaus A, Hirsch J, Eisele P, Szabo K, Weiss C, Amann M, Weier K, Naegelin Y, Kappos L, Gass A. Individual Assessment of Brain Tissue Changes in MS and the Effect of Focal Lesions on Short-Term Focal Atrophy Development in MS: A Voxel-Guided Morphometry Study. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 489
- Gehrmann J, Banati RB, Cuzner ML, Kreutzberg GW, Newcombe J. Amyloid precursor protein (APP) expression in multiple sclerosis lesions. *Glia.* 1995; 15: 141–151
- Genovese CR, Lazar NA, Nichols T. Thresholding of Statistical Maps in Functional Neuroimaging Using the False Discovery Rate. *NeuroImage.* 2002; 15: 870–878
- Gilli F, Chen X, Pachner AR, Gimi B. High-Resolution Diffusion Tensor Spinal Cord MRI Measures as Biomarkers of Disability Progression in a Rodent Model of Progressive Multiple Sclerosis. Furlan R, ed. *PLOS ONE.* 2016; 11: e0160071
- Grover VPB, Tognarelli JM, Crossey MME, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJW. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2015; 5: 246–255
- Haki M, AL-Biati HA, Al-Tameemi ZS, Ali IS, Al-hussaniy HA. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. *Medicine (Baltimore).* 2024; 103: e37297
- Hamilton AM, Forkert ND, Yang R, Wu Y, Rogers JA, Yong VW, Dunn JF. Central nervous system targeted autoimmunity causes regional atrophy: a 9.4T MRI study of the EAE mouse model of Multiple Sclerosis. *Sci. Rep.* 2019; 9: 8488
- Harrison M, O'Brien A, Adams L, Cowin G, Ruitenberg MJ, Sengul G, Watson C. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *NeuroImage.* 2013; 68: 22–29
- Khodanovich MY, Anan'ina TV, Krutenkova EP, Akulov AE, Kudabaeva MS, Svetlik MV, Tumentceva YA, Shadrina MM, Naumova AV. Challenges and Practical Solutions to MRI and Histology Matching and Measurements Using Available ImageJ Software Tools. *Biomedicines.* 2022; 10: 1556

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research [Internet]. PLoS Biology, 2010:Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20613859/>

Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2018; 8: a028928

Kolb H, Al-Louzi O, Beck ES, Sati P, Absinta M, Reich DS. From pathology to MRI and back: Clinically relevant biomarkers of multiple sclerosis lesions. Neurolmage Clin. 2022; 36: 103194

Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2018; 8: a028936

Lowinski A, Dabringhaus A, Kraemer M, Doshi H, Weier A, Hintze M, Chunder R, Kuersten S. MRI-based morphometric structural changes correlate with histopathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurol. Sci. 2025; 468: 123358

Lyons J-A, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. Eur. J. Immunol. 1999; 29: 3432–3439

Martire MS, Moiola L, Rocca MA, Filippi M, Absinta M. What is the potential of paramagnetic rim lesions as diagnostic indicators in multiple sclerosis? Expert Rev. Neurother. 2022; 22: 829–837

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, Van Den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann. Neurol. 2001; 50: 121–127

Noristani HN, Lonjon N, Cardoso M, Le Corre M, Chan-Seng E, Captier G, Privat A, Coillot C, Goze-Bac C, Perrin FE. Correlation of in vivo and ex vivo ¹H-MRI with histology in two severities of mouse spinal cord injury. Front. Neuroanat. [Internet]. 2015 [cited

2024 Dec 18]; 9Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnana.2015.00024/abstract>

Parent O, Bussy A, Devenyi GA, Dai A, Costantino M, Tullo S, et al. Assessment of white matter hyperintensity severity using multimodal magnetic resonance imaging. *Brain Commun.* 2023; 5: fcad279

Pozzilli C, Pugliatti M, Vermersch P, Grigoriadis N, Alkhawajah M, Airas L, Oreja-Guevara C. Diagnosis and treatment of progressive multiple sclerosis: A position paper. *Eur. J. Neurol.* 2023; 30: 9–21

Raj A, Gass A, Eisele P, Dabringhaus A, Kraemer M, Zöllner FG. A generalizable deep voxel-guided morphometry algorithm for the detection of subtle lesion dynamics in multiple sclerosis. *Front. Neurosci.* 2024; 18: 1326108

Reeves JA, Mohebbi M, Wicks T, Salman F, Bartnik A, Jakimovski D, Bergsland N, Schweser F, Weinstock-Guttman B, Dwyer MG, Zivadinov R. Paramagnetic rim lesions predict greater long-term relapse rates and clinical progression over 10 years. *Mult. Scler. J.* 2024; 30: 535–545

Sbardella E, Tona F, Petsas N, Pantano P. DTI Measurements in Multiple Sclerosis: Evaluation of Brain Damage and Clinical Implications. *Mult. Scler. Int.* 2013; 2013: 1–11

Schirmer L, Antel JP, Brück W, Stadelmann C. Axonal Loss and Neurofilament Phosphorylation Changes Accompany Lesion Development and Clinical Progression in Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* 2011; 21: 428–440

Selmaj K, Cree BAC, Barnett M, Thompson A, Hartung H-P. Multiple sclerosis: time for early treatment with high-efficacy drugs. *J. Neurol.* 2024; 271: 105–115

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17: 162–173

Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, Battapady H, Mork S, Ontaneda D, Jones SE, Fox RJ, Chen J, Nakamura K, Rudick RA. Cortical neuronal

densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2018; 17: 870–884

Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS, Banwell B, De Stefano N, Enzinger C, et al. 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2021; 20: 653–670

Weier A, Enders M, Kirchner P, Ekici A, Bigaud M, Kapitza C, Wörl J, Kuerten S. Impact of Siponimod on Enteric and Central Nervous System Pathology in Late-Stage Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 14209

Wu W, Miller KL. Image formation in diffusion MRI: A review of recent technical developments. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2017; 46: 646–662

Zaninovich OA, Avila MJ, Kay M, Becker JL, Hurlbert RJ, Martirosyan NL. The role of diffusion tensor imaging in the diagnosis, prognosis, and assessment of recovery and treatment of spinal cord injury: a systematic review. *Neurosurg. Focus.* 2019; 46: E7

Zhou Z, Liu W, Cui J, Wang X, Arias D, Wen Y, Bansal R, Hao X, Wang Z, Peterson BS, Xu D. Automated artifact detection and removal for improved tensor estimation in motion-corrupted DTI data sets using the combination of local binary patterns and 2D partial least squares. *Magn. Reson. Imaging.* 2011; 29: 230–242

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Lowinski A, Dabringhaus A, Kraemer M, Doshi H, Weier A, Hintze M, Chunder R, Kuersten S. MRI-based morphometric structural changes correlate with histopathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurol. Sci. 2025; 468: 123358.

<https://doi.org/10.1016/j.jns.2024.123358>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Neuroanatomischen Institut der Universität Bonn unter Betreuung von Prof. Dr. med. Stefanie Kürten durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Stefanie Kürten in Zusammenarbeit mit den Entwicklern der VGMorph Software, Dr. Matthias Kraemer und Dr. Andreas Dabringhaus. Zu Modifikationen des Studiendesigns während der Versuchsdurchführung habe ich beigetragen. Alle Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Für die Etablierung der MRT-Sequenzen und Durchführung der *In-vivo*-Experimente erhielt ich Unterstützung von Hardik Doshi. Die statistische Auswertung durch die VGM-Software erfolgte in Zusammenarbeit mit Matthias Kraemer und Andreas Dabringhaus. Die übrige statistische Auswertung erfolgte eigenständig mithilfe der Software Graphpad Prism. Die Datenanalyse und Interpretation erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Maik Hintze, Dr. Rittika Chunder und Alicia Weier.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Zunächst danke ich allen Koautorinnen und Koautoren der Publikation für ihre wertvolle Zusammenarbeit und Unterstützung. Euer Engagement und eure Expertise haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Prof. Dr. med. Stefanie Kürten, meiner Doktormutter, und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für ihre wissenschaftliche Expertise und den angenehmen Umgang miteinander. Ihr habt mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und den Spaß dabei nie zu kurz kommen lassen. Meine gewonnene Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten habe ich euch zu verdanken.

Meinen Freunden und Familie danke ich für ihr offenes Ohr und ihr Verständnis während dieser intensiven Zeit. Ihr habt mir immer wieder Mut gemacht und mich motiviert, auch in schwierigen Phasen durchzuhalten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Eure bedingungslose Unterstützung hat mir den Weg zu dieser Arbeit geebnet. Diese Dissertation widme ich euch, als Zeichen meiner Dankbarkeit für alles, was ihr für mich getan habt.

Vielen Dank an alle, die mich auf diesem Weg begleitet haben.