

Aus dem Institut für Neuropathologie  
(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Die Rolle des mikroglialen Aryl- Hydrocarbon-Rezeptors in der Cuprizon-induzierten toxischen Entmarkung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Insa Borgmann**

aus

Osnabrück

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. F. Odoardi

### **Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Referent/in: Prof. Dr. F. Odoardi

Drittreferent/in: Prof. Dr. R. Dressler

Datum der mündlichen Prüfung: 12.04.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des mikroglialen Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors bei der Cuprizon-induzierten toxischen Demyelinisierung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 17.05.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik.....	1
1.1.2 Pathogenese.....	2
1.1.3 Therapie der MS.....	3
1.2 Mikroglia.....	4
1.2.1 Herkunft und Funktion .....	4
1.2.2 Die Rolle der Mikroglia in der MS.....	6
1.3 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR).....	7
1.3.1 Vorkommen und Funktion des AhR.....	7
1.3.2 Der AhR im ZNS .....	8
1.4 Das Cuprizonmodell .....	9
1.5 Zielsetzung.....	9
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Reagenzien .....	11
2.1.2 Lösungen, Puffer und Zellmedien .....	13
2.1.3 Antikörper, Enzyme und Proteine.....	15
2.1.4 Oligonukleotidprimer.....	16
2.1.5 Technische Geräte .....	17
2.1.6 Software.....	17
2.2 Experimentaltiere.....	17
2.3 Methoden .....	18
2.3.1 Genotypisierung von CX3CR1-CreERT2/+ AhR <sup>fl/fl</sup> -Mäusen .....	18
2.4 Das Cuprizonmodell .....	21
2.4.1 Vorbereitung mit Tamoxifen .....	21
2.4.2 Zeitplan und Versuchsaufbau.....	21
2.4.3 Präparation der Tiere.....	22
2.5 Färbungen .....	22
2.5.1 LFB-PAS-Färbung.....	22
2.5.2 Immunhistochemische Färbungen.....	23
2.6 Auswertung.....	24
2.6.1 Quantifizierung der aktivierten Mikroglia, reifen Oligodendrozyten, der axonalen Schädigung und der Oligodendrozytenvorläuferzellen.....	24
2.6.2 Myelinbeurteilung .....	24

---

2.6.3	Statistische Analyse.....	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1	Gewichtsentwicklung der Mäuse.....	26
3.2	Der mikrogliale AhR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Demyelinisierung im Corpus callosum.....	27
3.3	Mikrogliainfiltration.....	29
3.4	Reife Oligodendrozyten.....	30
3.5	Geschädigte Axone.....	32
3.6	Oligodendrozytenvorläuferzellen.....	33
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	35
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
4.1	Das Cuprizonmodell der toxischen Entmarkung.....	37
4.2	Reproduzierbarkeit der Zählmethode .....	38
4.3	LFB-PAS-Färbung zur Darstellung der Demyelinisierung .....	38
4.4	Oligodendrozyten .....	39
4.5	Mikrogliaaktivierung unter Cuprizon.....	39
4.6	Der mikrogliale AhR spielt keine wesentliche Rolle bei Demyelinisierung durch Cuprizon.....	41
4.7	Die Rolle des AhR in verschiedenen Organsystemen.....	43
4.8	Ausblick.....	46
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf des Experiments .....	21
Abbildung 2: Gewichtsverlauf während der Cuprizongabe. ....	26
Abbildung 3: Der mikrogliale AhR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Demyelinisierung im CC nach dreiwöchiger Cuprizongabe.....	28
Abbildung 4: Starke Demyelinisierung des CC nach sechswöchiger Cuprizongabe. ....	29
Abbildung 5: Signifikant weniger Mikrogliainfiltration bei CX3CR1-CreERT2/+ AhR <sup>fl/fl</sup> - Mäusen. ....	30
Abbildung 6: Starke Mikrogliainfiltration nach sechswöchiger Cuprizongabe. ....	30
Abbildung 7: Geringfügig mehr Oligodendrozyten in CX3CR1-CreERT2/+ AhR <sup>fl/fl</sup> -Mäusen. ....	31
Abbildung 8: Konstante Zellzahl der reifen Oligodendrozyten nach sechswöchiger Cuprizonbehandlung. ....	32
Abbildung 9: Vergleichbare akute axonale Schädigung in beiden Experimentalgruppen. ....	33
Abbildung 10: Starke axonale Schädigung in beiden Gruppen. ....	33
Abbildung 11: Geringe Anzahl an Oligodendrozytenvorläuferzellen nach dreiwöchiger Cuprizonbehandlung. ....	34
Abbildung 12: Zunahme der Oligodendrozytenvorläuferzellen nach sechswöchiger Cuprizonbehandlung. ....	35
Abbildung 13: Direkter Vergleich der Daten nach drei- bzw. sechswöchiger Cuprizonbehandlung. ....	36

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medikamente modifiziert nach Weissert (2013) und ergänzt .....	4
Tabelle 2: Reagenzien .....	11
Tabelle 3: Lösungen, Puffer, Zellmedien .....	13
Tabelle 4: Lösungen und Puffer für die Histochemie und Immunhistochemie .....	14
Tabelle 5: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie .....	15
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.....	15
Tabelle 7: Enzyme und Proteine .....	16
Tabelle 8: Oligonukleotidprimer für die Genotypisierung transgener Mäuse.....	16
Tabelle 9: Technische Geräte.....	17
Tabelle 10: Software .....	17
Tabelle 11: PCR-Ablauf für CX3CR1-CreERT2/+ .....	19
Tabelle 12: PCR Zyklusbedingungen für CX3CR1-CreERT2/+ .....	19
Tabelle 13: PCR-Reaktionsmix für AhR <sup>fl/fl</sup> .....	20
Tabelle 14: PCR Zyklusbedingungen für AhR <sup>fl/fl</sup> .....	20

## Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APP	Amyloid precursor protein, Amyloid-Vorläuferprotein
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
CC	Corpus callosum
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
IGF	Insulin-like-growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
LFB-PAS	Luxol Fast Blue / periodic acid Schiff
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	myelinassoziiertes Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
OPCs	Oligodendrocyte precursor cells, Oligodendrozytenvorläuferzellen
PBS	Phosphatebuffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR alpha	Platelet derived growth factor receptor alpha
PFA	Paraformaldehyd
p.o.	per os
RRMS	Relapsing-remitting MS, schubförmige MS
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SPMS	sekundär progrediente MS
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCDD	2,3,7,8-Tetrachloro-Dibenzo-p-Dioxin
TH-Zelle	T-Helferzelle
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik

Multiple Sklerose (MS) ist eine erworbene, entzündliche und neurodegenerative immunvermittelte Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Weltweit sind circa 2,5 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen. Dabei erkranken Frauen im Durchschnitt dreimal häufiger als Männer (Lee und Chitnis 2016). Die meisten Diagnosen werden zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr gestellt (Montgomery et al. 2017). Damit stellt MS die Hauptursache von nichttraumatischen Behinderungen bei jungen Menschen dar (Sadovnick und Ebers 1993). In Europa und Nordamerika ist die Prävalenz deutlich höher als auf der Südhalbkugel der Erde. In Europa und Nordamerika liegt die Inzidenz bei 6/100.000 pro Jahr und die Prävalenz bei 1/1.000 (Dua et al. 2008). In Deutschland sind etwa 220.000 Menschen an MS erkrankt (Flachenecker et al. 2020). Bislang ist die zugrunde liegende Ursache der MS noch nicht vollständig geklärt. Seit längerem wird angenommen, dass die Erkrankung aus einer Kombination von Umweltfaktoren und genetischen Komponenten besteht (Dendrou et al. 2015). In Zwillingsstudien wurde bei monozygoten Zwillingen eine Konkordanzrate von 20-40 % gezeigt, bei dizygoten Zwillingen und Geschwistern liegt diese bei 3 bis 5 % (Hawkes und Macgregor 2009). Es wurde in der Vergangenheit festgestellt, dass die genetischen Faktoren für MS polygen sind (Patsopoulos et al. 2019). Auch Tabakkonsum, Fettleibigkeit und Mononukleose erhöhen das Risiko für MS (Reich et al. 2018). Der genetische Einfluss wird vor allem durch die sogenannten HLA-II-Gene dominiert (Sawcer et al. 2011). Forscher haben auch Assoziationen mit Viren wie dem Herpes simplex Virus (HSV), dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Humanen Herpes Virus (HHV 6 und 8) vermutet. Allerdings konnten diese Assoziationen nicht hinreichend bewiesen werden (Lutton et al. 2004).

MS stellt sich klinisch heterogen dar. Die häufigste Form ist die sogenannte schubförmige MS (RRMS), die etwa 85 % der Erkrankten aufweisen (Ruiz et al. 2019). Hier imponieren Krankheitsschübe, die meistens keine bleibenden Behinderungen zur Folge haben. Die RRMS geht in 25 % bis 50 % nach zehn bis 20 Jahren in die sekundär progrediente MS (SPMS) über (Tremlett et al. 2008), bei der es zu bleibenden neurologischen Defiziten

kommen kann. Bei etwa 10 % der Patienten mit MS wird eine primär progrediente Erkrankung diagnostiziert, die sich von Anfang an durch ein progressives Fortschreiten und das Ausbleiben von Schüben auszeichnet (Dendrou et al. 2015). Da die Läsionen ubiquitär im ZNS auftreten können, werden verschiedenste Symptome beschrieben (Compston und Coles 2002). Dominierend sind Sehstörungen, spastische Paresen, Ataxie, Blasenentleerungsstörungen und Fatigue (Ghasemi et al. 2017). Die durchschnittliche Überlebensdauer bis zum Tod beträgt etwa 35 bis 45 Jahre ab Krankheitsbeginn, was einer Verringerung der Lebenserwartung um fünf bis zehn Jahre entspricht (Lunde et al. 2017).

### 1.1.2 Pathogenese

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Entstehung und Entwicklung der MS geforscht, sodass die pathogenetischen Prozesse teilweise schon gut verstanden sind. Charakteristische pathologische Merkmale stellen Entzündung, Demyelinisierung, primäre sowie sekundäre axonale Schädigung und Gliose dar (Stadelmann et al. 2011). Die Läsionen befinden sich vornehmlich am Sehnerv, Hirnstamm, Kleinhirn, in der periventrikulären weißen Substanz und dem Rückenmark (Filippi et al. 2019). Sie werden gemeinhin auch als „Plaques“ bezeichnet. Die MS-Läsionen lassen sich in aktive, gemischt aktive/inaktive oder inaktive Läsionen einteilen, basierend auf dem Vorhandensein und der Verteilung von Makrophagen/Mikroglia (Kuhlmann et al. 2017). Dieser Klassifikation der MS-Läsionen lässt sich weiterunterteilen. So kann eine aktive MS-Läsion weiter in aktive und demyelinisierende, sowie aktive und post-demyelinisierende Läsionen unterteilt werden. Kennzeichen der gemischt aktiven/inaktiven Läsionen ist ein zellarmes Zentrum, welches von einem Makrophagen-/Mikrogliaaum umgeben ist. Inaktive Läsionen hingegen sind scharf abgegrenzt, hypozellulär und fast vollständig von reifen Oligodendrozyten entleert (Kuhlmann et al. 2017). Allen Formen gemein ist, dass eine Entzündung, die durch ein erhöhtes Auftreten von Makrophagen/Mikroglia und/oder T-Zellen charakterisiert ist, sich in allen Formen der MS und in den Läsionsherden selbst nachweisen lässt. Diese ist jedoch am stärksten in aktiv demyelinisierenden Läsionen (Machado-Santos et al. 2018). In den aktiven Läsionen können zusätzlich auch viele aktiv Myelin phagozytierende Zellen gesehen werden (Lassmann 2018). In inaktiven Läsionen dominieren Demyelinisierung, partieller Axonerhalt und reaktive Gliose (Lassmann 2018). Diese Form der Läsionen sind der Anzahl nach am häufigsten im ZNS von MS-Patienten zu finden (Lucchinetti et al. 2000). Basierend auf Daten aus Tierversuchen wird MS als eine vorwiegend T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit angesehen, bei der autoreaktive Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke

(BHS) überschreiten. Sind die autoreaktiven T-Zellen einmal im ZNS angekommen, so gefährden diese autoreaktiven T-Zellen die Integrität der BHS weiter und zielen vermutlich auf ein oder mehrere Myelin-Antigene im ZNS ab (Westland et al. 1999). Dabei aktivieren Lymphozyten Mikrogliazellen und Astrozyten durch die Ausschüttung von Zytokinen. Zudem werden vermehrt Entzündungszellen rekrutiert und die Antikörperproduktion über Plasmazellen stimuliert. Vermutlich ist das Versagen der lokalen Regulationsmechanismen im Gehirn für die besonderen Entzündungsherde verantwortlich, die von perivaskulären CD8<sup>+</sup>-Zellinfiltraten dominiert werden.

Ein Teil der MS Läsionen erfährt eine Wiederbemarkung (= Remyelinisierung) der Axone. Das Ausmaß der Remyelinisierung ist sehr individuell und heterogen. Allerdings ist sie Teil jeder klinischen Form von MS, und man kann sie sowohl in aktiven als auch chronischen Läsionen verzeichnen (Heß et al. 2020). Warum die Läsionen nicht wieder vollständig remyelinisieren und es somit zu einer vollständigen Abheilung der Läsionen kommen würde, ist noch unklar. Mittlerweile nimmt man an, dass es von großer Bedeutung ist, dass das geschädigte Myelin komplett abgebaut wird, damit letztendlich eine vollständige Remyelinisierung stattfinden kann (Skripuletz et al. 2013). Es wird vermutet, dass die Remyelinisierung sowohl von noch vorhandenen Oligodendrozyten als auch Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) ausgeht, die proliferieren, in die Läsion einwandern und dann letztendlich zu reifen Oligodendrozyten differenzieren (Franklin 2002; Kuhlmann et al. 2017). Bei diesem Prozess spielt der insulin-like-growth-factor (IGF), welcher von Astrozyten sezerniert wird, eine entscheidende Rolle. Die Mechanismen in dem komplexen Milieu der Läsion und der glialen Narbe werden bis heute noch nicht komplett verstanden. Sicher ist aber, dass dieses Milieu und auch die Entstehung der glialen Narbe dazu führen, dass OPCs nach der Einwanderung und Proliferation in der Läsion nicht überleben können und es somit nicht schaffen, eine adäquate Remyelinisierung durchzuführen (Haindl et al. 2019).

### 1.1.3 Therapie der MS

Da bei der MS die Klinik heterogen ist und auch die verschiedenen Verlaufsformen auf unterschiedliche jeweils dominierende Pathomechanismen hinweisen, gibt es verschiedene Ansätze der Therapie. Die unterschiedlichen Medikamente werden entweder als Schubtherapie, Schubprophylaxe oder Eskalationstherapie eingesetzt. Die unterschiedlichen Mechanismen beruhen dabei auf einer Immunmodulation, einer Migrations- oder Proliferationshemmung. Einteilen lassen sich die Medikamente in zwei Hauptgruppen: Es

gibt die neuen biologischen Wirkstoffe (new biological entity, NBE) und die neuen chemischen Wirkstoffe (new chemical entity, NCE). NBEs beinhalten hauptsächlich Proteine und monoklonale Antikörper (Weissert 2013). Sie werden biopharmazeutisch hergestellt, wohingegen die NCEs chemisch hergestellt werden.

**Tabelle 1: Medikamente modifiziert nach Weissert (2013) und ergänzt**

Neue biologische Entitäten			Neue chemische Entitäten		
Interferon beta-1a	Avonex	i.m.	Fingolimod	Gilenya	p.o.
	Rebif	s.c.			
	Plegridy	s.c.			
Interferon beta-1b	Betaferon	s.c.	Teriflunomid	Aubagio	p.o.
	Extavia	s.c.			
Glatirameracetat	Copaxone	s.c.	Dimethylfumarat	Tecfidera	p.o.
Natalizumab	Tysabri	i.v.	Mitoxantron	Ralenoa	i.v.
Ocrelizumab	Ocrevus	i.v.	Cladribine	Mavenclad	p.o.
Alemtuzumab	Lemtrada	i.v.	Fambridin	Fampyra	p.o.

Je nach Krankheitsverlauf gibt es in den Leitlinien Empfehlungen, mit welchem Präparat bei welcher Form der MS therapiert werden sollte. Bei der RRMS wird in erster Linie mit Alemtuzumab, Cladribine, Fingolimod, Natalizumab oder Ocrelizumab behandelt (Bsteh und Berger 2020). Bei milderer Formen der RRMS kann auch Interferon beta-1a, Interferon beta-1b oder Glatirameraceta verwendet werden (Gold et al. 2014). Bei der SPMS hingegen werden Siponimod, eine Weiterentwicklung von Fingolimod, sowie Interferon beta-1a oder Interferon beta-1b als erste Wahl empfohlen (Bsteh und Berger 2020).

## 1.2 Mikroglia

### 1.2.1 Herkunft und Funktion

Mikrogliazellen gelten als die Gewebemakrophagen des ZNS. Sie wurden 1932 erstmalig von del Río-Hortega beschrieben (del Rio-Hortega 1932) und machen etwa 5 - 20 % aller glialen Zellen aus (Perdiguerro et al. 2013). Heutzutage wird angenommen, dass mikrogliale Zellen erythro-myeloischen Ursprungs sind (Prinz et al. 2019). Sie stellen plastische Zellen dar, die

im ganzem ZNS zu finden sind. Seit kurzer Zeit weiß man, dass Mikroglia verschiedene phänotypische Signaturen aufweisen, die von der Hirnregion, in der sie sich befinden, abhängig zu sein scheinen, während der Kern-Immunchänotyp, der sie von zirkulierenden und/oder infiltrierenden myeloischen Zellen unterscheidet, postmortal in allen fünf untersuchten Regionen des menschlichen Gehirns erhalten bleibt (Böttcher et al. 2019). Aus Mausmodellen weiß man heutzutage auch, dass embryonale und postnatale Mikrogliazellen hochdivers sind und dass sich die Genexpression der Mikroglia im Laufe des Lebens einer Maus verändert (Hammond et al. 2019). Eine wichtige Fähigkeit der Mikrogliazelle ist es ihre Umgebung permanent zu scannen, um Anomalitäten zu erkennen. Dabei überprüft sie ständig das Wohlbefinden und den Zustand der anderen glialen Zellen sowie die Aktivität der Neurone, um diese zu schützen (Nimmerjahn et al. 2005). Mikroglia können somit je nach Lagebedingungen von einem ruhenden zu aktivierten und schließlich komplett reaktiven Zustand transformieren (Masuda und Prinz 2016) und können unter pathologischen Bedingungen schnell aktiviert werden, ihre Expressionsprofile ändern und wechseln schließlich aufgrund ihrer extremen Plastizität in verschiedene kontextabhängige reaktive Zustände (Shemer et al. 2015). Zytokine können dabei als Mediatoren die mikroglialen Zellen beeinflussen, indem sie die Expression von Oberflächenrezeptoren, Adhäsionsmolekülen, Ionenkanälen und löslichen Verbindungen induzieren, verstärken oder abschwächen. Zytokine mit solchen Eigenschaften sind Interleukine (IL) der IL-1 Familie, Interferon- $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ) sowie der Granulozyten/Makrophagen-stimulierende Faktor (CSF) (van Rossum und Hanisch 2004). Nicht nur Zytokine sind dabei in der Lage, Mikroglia zu orchestrieren. Auch Lipopolysaccharide (LPS) auf Bakterien, Komplementfaktoren, Immunglobuline, Chemokine, wie z. B. CX3CR1 oder Ionen ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ), haben einen großen Einfluss und Effekt auf ruhende Mikroglia und können diese zu vermehrter Aktivität stimulieren. Offenbar ist der Angriff von Oligodendrozytenstrukturen einer der mikroglialen Beiträge zur MS, obwohl die Phagozytose wahrscheinlich auch die Ausbreitung von freigesetzten Produkten aus geschädigtem Myelin verhindern oder anderen schadensbegrenzenden Zwecken dienen könnte (van Rossum und Hanisch 2004). Im gesunden ZNS hingegen sind die Mikrogliazellen für die Aufrechterhaltung des OPCs-Pools verantwortlich und schützen somit die Myelinscheide (Hagemeyer et al. 2017). Die Forschung an Mikrogliazellen wird dadurch erschwert, dass Mikrogliazellen in pathologischen Stoffwechsellagen nur schwer von Makrophagen, die aus der Peripherie in das ZNS einwandern, zu unterscheiden sind (Schwartz und Jung 2012). Zur Differenzierung dient dabei unter anderem der Chemokinrezeptor CX3CR1, der ausschließlich von Mikroglia exprimiert wird (Ho et al. 2020) und der Interaktion zwischen Neuronen und Mikroglia dient.

Als ziemlich spezifisch für Mikroglia gelten auch die Oberflächenmarker TMEM110 und P2YR12 (Zrzavy et al. 2017). So wie professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) präsentieren auch Mikroglia über MHC-II-Moleküle Antigene, die von T-Lymphozyten erkannt werden können und zu einer spezifischen Immunantwort führen können (Watts 1997). Bemerkenswert ist auch, dass Mikroglia bei Pathologien im ZNS Subpopulationen zu bilden scheinen, welche im gesunden ZNS nicht zu finden sind (Masuda et al. 2019).

### 1.2.2 Die Rolle der Mikroglia in der MS

Wie oben beschrieben ist weithin bekannt, dass Mikrogliazellen eine protektive Funktion im ZNS einnehmen. Allerdings können aktivierte Mikrogliazellen auch genau entgegengesetzt agieren. So können Cluster aktivierter Mikroglia, so genannte "Mikroglia-Knötchen", im Hirngewebe von MS-Patienten in der Nähe von Plaques beobachtet werden, die mit degenerierenden Achsen, gestressten Oligodendrozyten oder Ablagerungen aktivierter Produkte des Komplementwegs assoziiert sind (Voet et al. 2019). Außerdem wird heute vermutet, dass Mikrogliazellen während der Demyelinisierung auch dazu beitragen, dass Oligodendrozyten und Neurone geschädigt werden. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass Mikrogliazellen im Gehirn eines MS-Patienten verschiedene Phänotypen einnehmen können. Sogenannte M1-Zellen sind an der pathogenen T-Zellantwort via TH1- und TH17-Zellen (T-Helfer-Zellen) beteiligt, während M2-Zellen die Läsionsreparatur gewährleisten (Ponomarev et al. 2007; Krausgruber et al. 2011). Dies geschieht unter anderem dadurch, dass es zu Beginn der Remyelinisierung ein Wechsel von M1- zu M2-Zellen gibt. Diese M2-Zellen fördern die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen zu reifen Oligodendrozyten und tragen somit zur einer adäquaten Remyelinisierung bei (Miron et al. 2013). Die unterschiedliche Zellantwort wird dabei stark durch das herrschende Zytokin- und Chemokin-Milieu reguliert (Chastain et al. 2011). So kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wenn Mikrogliazellen Zelltrümmer und geschädigtes Myelin während der Demyelinisierung phagozytieren. Weiterhin kommt es unter der Phagozytose zu einem oxidativen Energiestoffwechsel und zur Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Domingues et al. 2016). Diese schädigen wiederum Oligodendrozyten und Axone (Sierra et al. 2013). Neben der Phagozytose und der Ausschüttung von Zytokinen kommt es auch zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie IGF-1 durch die Mikrogliazellen. Dieser kann die Remyelinisierung fördern, indem er die Migration, Proliferation, Differenzierung, und das Überleben von glialen Zellen begünstigt (Voss et al. 2012). Im Umkehrschluss kann ein vermindertes Auftreten dieses Faktors dazu beitragen, dass Oligodendrozytenvorläuferzellen nicht ausreifen und eine vollständige

Remyelinisierung ausbleibt. Ein weiteres Problem bei der MS ist, dass die Demyelinisierung nur schwer aufgehalten werden kann, sobald die Mikrogliazellen proliferieren und in Läsionen einwandern. Dabei scheint auch eine verringerte Astrozytenzahl keinen Einfluss auf die Demyelinisierung zu haben (Skripuletz et al. 2013). Außerdem haben verschiedene Studien gezeigt, dass Mikrogliazellen als APCs agieren (Luo et al. 2017). Hier wurde insbesondere im Modell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gezeigt, dass Mikroglia durch ihre Antigen-präsentierende Funktion infiltrierende Immunzellen, vor allem T-Zellen, stimulieren (Jack et al. 2005). Eine Entzündungsreaktion wird dadurch verstärkt und ein krankheitsbedingter Schub ausgelöst oder verschlimmert. Mit Hilfe der EAE konnte auch festgestellt werden, dass Mikrogliazellen die ersten APCs sind, die Myelinantigen enthalten (Sosa et al. 2013). Zudem wurde herausgefunden, dass es eine MS -assoziierte Gruppe von Mikrogliazellen gibt, welche Mikroglia-Kerngene verringerter exprimiert als Mikroglia in einem gesundem ZNS (Masuda et al. 2019). Die Transkriptionsprofile dieser Mikrogliazellen ähneln denen von Mikroglia-Phänotypen, welche in einem Mausmodell der Demyelinisierung, einem Hauptkriterium der MS-Pathologie, identifiziert wurden (Masuda et al. 2019). Ein weiterer Punkt der MS-assozierten Mikroglia-Veränderungen ist eine erhöhte Expression von Genen, die Interaktionen zwischen Mikroglia und Immunzellen verstärken und somit zu einer chronischen Neuroinflammation führen können (Priller und Prinz 2019).

### **1.3 Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR)**

#### **1.3.1 Vorkommen und Funktion des AhR**

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der im Immun- und Nervensystem weit verbreitet ist. Als Teil der grundlegenden Per-ARNT-Sim (PAS) - Familie der basischen Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren-Familie ist der AhR ein Rezeptor, der durch strukturell unterschiedliche Agonisten aktiviert werden kann, die aus der Umwelt stammen oder endogen produziert werden (McIntosh et al. 2010). Er stellt einen evolutionär konservierten Sensor dar, der Umwelt-, Ernährungs-, Mikroben- und Stoffwechselfsignale integriert, um komplexe Transkriptionsprogramme auf liganden-, zelltypen- und kontextspezifische Weise zu steuern (Rothhammer und Quintana 2019). Der AhR ist ubiquitär in Zellen zu finden. Vor allem wird er jedoch in Zellen der Leber, des Darms, der Lunge und der Haut exprimiert, wohingegen er in der Niere, den sekretorischen Drüsen sowie Stroma- und Muskelzellen kaum gefunden werden kann (Esser und Rannug

2015). Man nimmt eine starke Assoziation mit immunologischen Prozessen an, da der AhR in B- und T-Zellen (Esser et al. 2009), Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritischen Zellen (DC) und Langerhans-Zellen (Jux et al. 2009; Stockinger et al. 2011) vorhanden ist. Es ist bekannt, dass der AhR auch im ZNS in den Neuronen und Gliazellen zu finden ist (Williamson et al. 2005). Als Liganden können sowohl exogene Xenobiotika, wie das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) (Stockinger et al. 2014), als auch endogene Stoffe wie Indolcarbazol und Tryptophanmetabolite binden (Quintana 2013). Wenn kein Ligand an den AhR gebunden ist, befindet sich dieser inaktiv im Zytoplasma und wird durch einen Chaperonkomplex stabilisiert. Sobald ein Ligand bindet, verändert der AhR seine Konformation, sodass er Importin- $\beta$  bindet und schließlich in den Zellkern transloziert werden kann (Esser und Rannug 2015). Im Zellkern bildet der AhR mit dem nukleären AhR-Translokator (ARNT) ein Dimer. Dieses kann nun an bestimmte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Zielstrukturen binden und die Transkription bestimmter Zielgene, z. B. AhR-Repressor (AhRR), Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) und Enzyme induzieren. Zu den Enzymen gehören CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, die Teil der Cytochrom P450 (CYP)-Familie sind (Rothhammer und Quintana 2019). Dabei können verschiedene Liganden sehr unterschiedliche Reaktionen in den Zellen hervorrufen. Auf der einen Seite können durch die Förderung der Entwicklung von TH17-Zellen proinflammatorische Reaktionen hervorgerufen werden (Stockinger et al. 2014). Auf der anderen Seite können auch antiinflammatorische Reaktionen, wie die Sekretion von IL-10 von DCs, induziert werden.

### 1.3.2 Der AhR im ZNS

Die physiologische Funktion des AhR im ZNS ist bislang noch nicht sehr gut verstanden. Man nimmt jedoch an, dass die ligandenabhängige AhR-Aktivierung die Mikrogliaaktivierung im ZNS, ähnlich wie die Makrophagenaktivierung in der Peripherie, vermindert (Lee et al. 2015; Rothhammer et al. 2018). Weiter wurde herausgefunden, dass eine Entzündung des ZNS durch ein Interferon (IFN)- $\beta$ -induziertes AhR-Signal in Astrozyten in einem Modell der EAE reduziert werden kann (Rothhammer et al. 2016). Diese Erkenntnisse lassen schlussfolgern, dass die AhR-Aktivität entzündliche Prozesse im ZNS mildert. Allerdings hat der AhR nicht nur protektive Eigenschaften im ZNS. Während der Verlauf einer zerebralen Ischämie durch eine AhR-Aktivierung verschlechtert wird, wirkt sich die durch Antagonisten induzierte AhR-Deaktivierung positiv auf das ZNS aus (Cuartero et al. 2014). Der AhR hat demnach nach heutigem Wissensstand eine sowohl protektive als auch schädigende Funktion im erkrankten ZNS. Hierbei scheinen die Art der AhR-Aktivierung bzw. -Inaktivierung durch verschiedene Liganden sowie das

Krankheitsbild des ZNS eine große Rolle zu spielen. Schaut man auf die neuronale Entwicklung, so fällt auf, dass neuronale Vorläuferzellen während der Embryogenese hohe Konzentrationen von AhR exprimieren. Dabei beeinträchtigt die TCDD-induzierte AhR-Aktivierung die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in konzentrationsabhängiger Weise (Latchney et al. 2011). Bei erwachsenen Mäusen konnte zudem durch die AhR-Aktivierung ein Einfluss auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im Gyrus dentatus festgestellt werden (Latchney et al. 2011). Einen negativen Einfluss auf die Neurogenese hat hingegen die Deletion des AhR in Vorläuferzellen der Körnerzellen des Kleinhirns (Dever et al. 2016).

## 1.4 Das Cuprizonmodell

Cuprizon (Bis-Cyclohexanon-Oxaldihydraton, CPZ) ist ein Kupferchelator, der im Tiermodell zur toxischen, reproduzierbaren Demyelinisierung eingesetzt wird (Stockinger et al. 2011). Die Entmarkung zeigt sich dabei vor allem im Corpus callosum (CC). Wie genau Cuprizon wirkt, ist bislang nicht klar. Es wurde allerdings gezeigt, dass es unter Cuprizon zu stark vergrößerten Mitochondrien in den Oligodendrozyten kommt (Blakemore 1972). In den Mitochondrien wird über die Atmungskette Energie produziert. Durch die Cuprizongabe wird in der Atmungskette der Komplex I und III gestört (Cammer 1999; Bénardais et al. 2013), sodass Oligodendrozyten einen Energiemangel erfahren. Die Schädigung der Oligodendrozyten lässt sich auf zellulärer Ebene als Folge der Cuprizongabe durch einen starken Verlust dieser Zellen wiederfinden (Goldberg et al. 2013). Neben der Oligodendrozytenapoptose, die während der Dauer des Experiments zunimmt (Komoly et al. 1987), lässt sich eine Mikrogliaaktivierung feststellen, die ab der zweiten Woche der Gabe sichtbar wird. Ab der dritten Woche kommt es zusätzlich zu einer Astrogliose (Vega-Riquer et al. 2019). Generell lässt sich sagen, dass die Demyelinisierung während des Experimentes ab der dritten Woche stark ansteigt und das Maximum in der fünften bis sechsten Woche erreicht wird (Hiremath et al. 1998a). Die Demyelinisierung wird während der Zeit nicht durch periphere Immunzellen beeinflusst, da die BHS unter Cuprizongabe intakt bleibt (Kondo et al. 1987). Das Cuprizonmodell ist heutzutage ein weitverbreitetes Modell, um die Gliafunktionen und die Zellinteraktionen während der Demyelinisierung zu erforschen.

## 1.5 Zielsetzung

Ausgehend von den oben beschriebenen Erkenntnissen war es das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob der mikrogliale AhR während der Cuprizon-induzierten toxischen

Entmarkung einen Einfluss auf die Oligodendrozytenapoptose, Mikrogliaaktivierung, Demyelinisierung und auf die axonale Schädigung hat. Hierzu wurden CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup> sowie Cre-negative Wurfgeschwister als Kontrollen mit Cuprizon-supplementiertem Mausfutter gefüttert und nach drei oder sechs Wochen getötet, um an immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten die entsprechenden Zelltypen zu quantifizieren und schließlich statistisch auszuwerten. Hauptziel dabei war es zu untersuchen, ob der mikrogliale AhR einen Einfluss auf die Pathogenese von demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS hat. Hierfür ist ein Verstehen seiner Funktion bei pathologischen Prozessen während der Inflammation und Demyelinisierung beim Krankheitsbild der MS wichtig, um ihn eventuell als Target für eine Therapie nutzen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

Zur Durchführung der Experimente wurden die folgenden Reagenzien verwendet.

**Tabelle 2: Reagenzien**

Reagenzien	Bezugsquelle
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
dNTP (Desoxynucleosidtriphosphat) Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid disodiumsalt dehydrate)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Essigsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
ExtrAvidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GelRed® Nukleinsäure-Gel-Färbung, 10.000x in Wasser	Biotium, Fremont, CA, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid), 30 %	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
HCl (Salzsäure)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ketamin 10 %	Medistar, Ascheberg, Deutschland

<b>Reagenzien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Mayer's Hämalan	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid), 25mM	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NaOH (Natriumhydroxidlösung), 1 M	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Paraffin (Paraplast Plus®)	Tyco Healthcare, Neustadt, Deutschland
Passiver Lysepuffer, 5x	Promega, Walldorf, Deutschland
PCR Puffer, 5x Grüner GoTaq-Reaktionspuffer	Promega, Walldorf, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd), Pulver	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Schiff's Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
StarPure Low EEO Standard Agarose, > 1 kb	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin-Lösung, 20mg/ml	Ecuphar, Oostkamp, Belgien
Xylol	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Zitronensäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.2 Lösungen, Puffer und Zellmedien

Tabelle 3: Lösungen, Puffer, Zellmedien

Lösungen	Zusammensetzung
DNase I, 5 mg/ml Lösung	100 mg DNase I 20 ml HBSS, steril
LFB Arbeitslösung	0,1 % LFB (w/v) 0,5 % Essigsäure in Ethanol
Paraformaldehyd (PFA), 4 % Lösung	PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) 4 % PFA pH 7,4
tail lysis Puffer	0,1 M Tris-HCl 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2 % SDS bidestilliertes Wasser pH 9,5

**Tabelle 4: Lösungen und Puffer für die Histochemie und Immunhistochemie**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1 % HCl	1 % HCl absolut 70 % Ethanol
Blockierpuffer für Immunohistochemie	PBS 10 % Ziegenserum
Zitronensäure Puffer, 10 mM	2,1 g Zitronensäure 1 l destilliertes Wasser NaOH pH 6
DAB Arbeitslösung	49 ml PBS 1 ml DAB 20 µl Wasserstoffperoxid
HCl-Isopropanol	70 % Isopropyl 0,25 % HCl
LFB Arbeitslösung	1 g LFB gelöst in 1,000 ml 96 % Ethanol plus 5 ml 10 % Essigsäure und Filtrationslösung
TBE- Puffer, 10x Lösung	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA Bis 1,000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
Tris-EDTA Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 9,0

### 2.1.3 Antikörper, Enzyme und Proteine

Tabelle 5: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie

Anti- gen	Marker für	Spezies/ Klon/ Antigen	Antigen Wiederherstel- lung/Fixierung	Verdün- nung	Bezugs- quelle
APP	Amyloid precursor protein, akut geschädigte Axone	Maus/ monoklonal/ 22C11	Mikrowelle/ Zitronensäure Puffer	1:1000	Merck Millipore
MAC3	Aktivierte Mikroglia	Ratte/ polyklonal/ M37/84	Mikrowelle/ Zitronensäure Puffer	1:200	BD Pharmin- gen
P25	Reife Oligodendrozyten	Kaninchen/ monoklonal/ 92305	Mikrowelle/ Tris-EDTA	1:500	Abcam
PDGFR alpha	Vorläuferzellen (Oligodendrozyt)	Kaninchen/ monoklonal	Mikrowelle/ Tris-EDTA	1:50	Abcam

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti-mouse IgG, biotinyliert	1:100	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany
goat anti-rat IgG, biotinyliert	1:200	Dianova GmbH, Hamburg, Germany
goat-anti-rabbit IgG, Biotin- SP-konjugiert AffiniPure	1:250	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

Tabelle 7: Enzyme und Proteine

Proteine/Enzyme	Bezugsquelle
DNase I	Worthington, Lakewood, USA
ExtrAvidin-Peroxidase (0,01 % Lösung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GoTaq DNA Polymerase, 500 U	Promega, Walldorf, Germany
Proteinase K, rekombinant, PCR Grad	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 % in PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

#### 2.1.4 Oligonukleotidprimer

Tabelle 8: Oligonukleotidprimer für die Genotypisierung transgener Mäuse

Mäuse	Primer	Sequenz (5' -> 3')	Funktion
CX3CR1-CreERT2 +/- Mäuse	Common (Com)	5'-AAG ACT CAC GTG GAC CTG CT-3'	Gemeinsamer Primer zur Detektion von CX3CR1-CreERT2
	Mut	5'-CGG TTA TTC AAC TTG CAC CA-3'	Primer zur Detektion von CX3CR1-CreERT2 mutantern Allel
	WT	5'-AGG ATG TTG ACT TCC GAG TGG-3'	Primer zur Detektion von CX3CR1-CreERT2 Wildtyp Allel
AhR <sup>fl/fl</sup> -Mäuse	Ahrtm3.1B ra-vorwärts	5'-GGT ACA AGT GCA CAT GCC TGC-3'	Vorwärts-Primer zum Nachweis von AhR-Exon 3
	Ahrtm3.1B ra-revers	5'-CAG TGG GAA TAA GGC AAG GA-3'	Reverser Primer zur Detektion non AhR Exon 3

Bezugsquelle: Alle Oligonukleotidprimer wurden von Eurofins Scientific, Deutschland bezogen.

### 2.1.5 Technische Geräte

Tabelle 9: Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Biometra Themocycler TRIO	Analytik Jena, Deutschland
BX51 Olympus Lichtmikroskop ausgestattet mit DP71 und XM10 Digitalkameras	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Gerling-Schillerhöhe, Deutschland

### 2.1.6 Software

Tabelle 10: Software

Software	Anwendung	Hersteller
GraphPad Prism 6	Statistische Analyse und Graphen	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

## 2.2 Experimentaltiere

Alle mutierten Mäuse wurden für das Experiment aus eigenen Zuchtkolonien in der tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen erzeugt. Die AhR<sup>flx</sup>-Linie, auch als AhR<sup>fl/fl</sup>-Linie bezeichnet, sowie die Tamoxifen-induzierbare CX3CR1-CreERT2-Mauslinie wurde von Charles River in Sulzfeld, Deutschland, gekauft. Zur Erzeugung von CX3CR1-zellspezifischen AhR-konditionalen Knockout-Mäusen wurden CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle der CX3CR1-Regulationssequenz (Promotor) exprimieren, mit AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen gekreuzt. Erwachsene CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup> (= CX3CR1-AhR) Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit Tamoxifen in einer Konzentration von 75 mg/kg Körpergewicht behandelt, um eine Cre-vermittelte Rekombination zu erreichen. Die Mäuse waren sowohl männlich als auch weiblich. In dem dreiwöchigen Experiment waren 19 Tiere (n = 19) eingeschlossen, wobei zehn Mäuse (n = 10) zu den CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen zählten und neun Mäuse (n = 9) die Kontrollgruppe bildeten. Das sechswöchige Experiment bestand aus 24 Mäusen (n = 24).

Hier zählten beide Versuchsgruppen zwölf Mäuse ( $n = 12$ ). Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit der Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 24. November 1986 (86/EWG) durchgeführt und von der Regierung von Niedersachsen, Deutschland (Tierversuchsnummer: 17/2528), zugelassen.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Genotypisierung von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Analyse des Genotyps von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen verwendet. Während der PCR wurden kleine Fragmente einer DNA-Vorlage amplifiziert. Als Ausgangspunkt für die Amplifikation dienen spezifische Nukleinsäuresequenzen (Primer) (vgl. Tabelle 8). Beide Primer flankieren die zu untersuchende Region und gewährleisten die korrekte Amplifikation des Targets. Die DNA-Polymerase bildet einen neuen komplementären DNA-Strang zur Template-DNA (DNA-Target). Die neuen DNA-Stränge dienen als Vorlage für die weitere Amplifikation. Basierend auf diesem Prinzip wird das DNA-Target vervielfältigt. Der PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten (vgl. Tabelle 12, Tabelle 14). In der ersten Phase (Denaturierung) werden die DNA, die Polymerase und die Nukleotide auf 95 °C erhitzt, um die DNA-Stränge zu trennen. In der Annealing-Phase binden sich die Primer an die DNA-Einzelstränge und die Polymerase beginnt mit der DNA-Synthese in 5'→3'-Richtung (Elongation). Für die Genotypisierung wurde DNA aus Schwanzbiopsien von CX3CR1-creERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen extrahiert. Um eine Gewebeverdauung zu erreichen, wurde das Gewebe in 350 µl Schwanzlysepuffer und 20 µl Proteinase K für zwei bis drei Stunden bei 56 °C in einem Thermoblock geschüttelt. Das verdaute Gewebe wurde bei 13.200 Einheiten pro Minute bei Raumtemperatur für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde zehn Minuten lang in einem Vakuumkonzentrator mit hoher Geschwindigkeit getrocknet und in 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die extrahierte DNA diente als Vorlage für die DNA-Amplifikation.

### 2.3.1.1 Genotypisierung von CX3CR1-CreERT2/+

Die Tabelle 11 zeigt die Komponenten und Volumina, die jede PCR-Reaktion beinhaltet.

Tabelle 11: PCR-Ablauf für CX3CR1-CreERT2/+

Volumen	Komponente
2 µl	Genomische DNA
4 µl	5x PCR Puffer
0,3 µl	2,5 mM dNTP Mix
0,5 µl	10 pmol Oligonukleotidprimer (WT/Mutant)
0,5 µl	10 pmol Oligonukleotidprimer (Com)
0,1 µl	GoTaq Polymerase
0,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
9,1 µl	Bidestilliertes Wasser

Die Tabelle 12 zeigt die Zyklusbedingungen, unter denen die PCR-Reaktionen durchgeführt wurden.

Tabelle 12: PCR Zyklusbedingungen für CX3CR1-CreERT2/+

Temperatur	Zeit	Schritt	
94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	
94 °C	30 s	} 35 Zyklen Denaturierung	
58 °C	45 s		Annealing
72 °C	45 s		Extension
72 °C	5 min	Endextension	
4 °C	∞	Aufbewahrung	

Zur Analyse des amplifizierten PCR-Produkts wurden die Proben (16 µl) auf ein Agarosegel in 1x Tris-Borat-EDTA- Puffer (TBE-Puffer) mit GelRed geladen. Das Cre-Rekombinase-Allel wurde durch eine Bande bei 300 Basenpaare (bp) nachgewiesen und die Wildtyp-Bande bei 695 bp beobachtet. Beide Banden wurden bei heterozygoten Tieren nachgewiesen.

### 2.3.1.2 Genotypisierung von AhR<sup>n/n</sup>

Die Tabelle 13 zeigt die Komponenten und Volumina, die jede PCR-Reaktion beinhaltet.

Tabelle 13: PCR-Reaktionsmix für AhR<sup>n/n</sup>

Volumen	Komponenten
2 µl	genomische DNA
4 µl	5x PCR Puffer
0,5 µl	2,5 mM dNTP Mix
0,5 µl	10 mM Oligonukleotidprimer (For)
0,5 µl	10 mM Oligodendrozytenprimer (Rev)
0,1 µl	GoTaq Polymerase
9,4 µl	bidestilliertes Wasser

Die Tabelle 14 zeigt die Zyklusbedingungen, unter denen die PCR-Reaktionen durchgeführt wurden.

Tabelle 14: PCR Zyklusbedingungen für AhR<sup>n/n</sup>

Temperatur	Zeit	Schritte	
94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	
94 °C	30 s	} 35 Zyklen	
60 °C	20 s		Denaturierung
72 °C	20 s		Annealing
72 °C	20 s	Extension	
72 °C	2 min	Endextension	
4 °C	∞	Aufbewahrung	

Zur Analyse des amplifizierten PCR-Produkts wurden die Proben (16 µl) auf ein Agarosegel in 1x TBE- Puffer mit GelRed geladen. Das endogene Allel wurde durch eine Bande bei 106 bp charakterisiert, während das gefloخته Allel durch eine Bande bei 140 bp nachgewiesen wurde. Beide Banden wurden bei heterozygoten Tieren nachgewiesen.

## 2.4 Das Cuprizinmodell

### 2.4.1 Vorbereitung mit Tamoxifen

Tamoxifen wurde für diese Arbeit von Sigma-Aldrich aus Steinheim, Deutschland, gekauft und in Maisöl in einer Konzentration von 7,5 mg/ml durch mindestens zweistündiges Rotieren bei 37 °C gelöst. Dabei wurde die lichtempfindliche Lösung durch eine Aluminiumfolienverpackung abgedunkelt und für die Dauer der Injektionen bei 4 °C gelagert. Die Tamoxifengabe erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion, wobei eine Konzentration von 75 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht gespritzt wurde. Das Gewicht der Tiere wurde kontrolliert und die Dosierung entsprechend angepasst.

### 2.4.2 Zeitplan und Versuchsaufbau

Zur Analyse der oligodendroglialen Apoptosen, Demyelinisierung im CC, Mikrogliaaktivierung sowie der axonalen Schädigung wurden Mäuse, die zwischen acht und zehn Wochen alt waren, drei bzw. sechs Wochen lang mit normalem Futter gefüttert, das 0,25 % des Kupferchelators Cuprizin enthielt (vgl. Abbildung 1). Die Tiere hatten ad libitum Zugang zu Futter und Wasser. Um die Cre-Rekombinase-Aktivität und die effiziente Deletion des AhR in CX3CR1-positiven Mikroglia zu induzieren, wurden den Mäusen eine Woche vor der Cuprizingabe an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 75 mg/kg Tamoxifen injiziert. Nach einer drei- bzw. sechswöchigen Behandlung mit Cuprizin wurden die Mäuse getötet und Gehirn, Milz und Leber für histologische bzw. immunhistochemische Analysen entnommen.

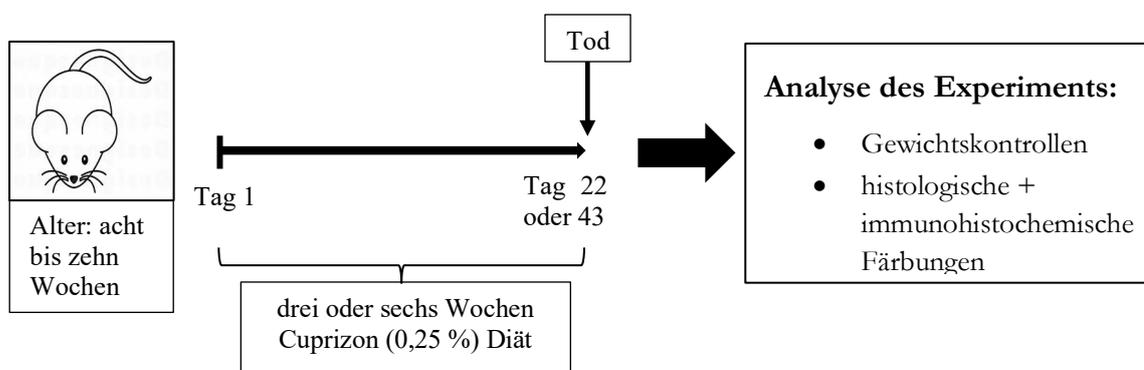


Abbildung 1: Schematischer Ablauf des Experiments

### 2.4.3 Präparation der Tiere

Um die Gewebemorphologie für die histologischen Analysen optimal zu erhalten, wurden die Mäuse transkardial perfundiert. Zunächst wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Überdosis an Ketamin (240 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (40 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Nachdem das Tier ausreichend für eine chirurgische Behandlung betäubt wurde und die kornealen und pedalen Schmerzreflexe erloschen waren, wurde der Brustkorb eröffnet. Die Perfusion erfolgte über die linke Herzkammer bei gleichzeitiger Öffnung des rechten Vorhofs. Die Tiere wurden zunächst kurz mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) perfundiert, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen, daraufhin folgte die Injektion von 4 % Paraformaldehyd (PFA). Für histologische Auswertungen wurden Gehirn, Milz und Leber entnommen und in einem Gefäß mit 4 % PFA für mindestens 48 Stunden bei 4 °C nachfixiert. Nach zwei Tagen wurden die Gehirne mit PBS gewaschen und in zwei bis drei Millimeter dicke koronale Schnitte zerlegt. Milz und Leber wurden auf die gleiche Weise verarbeitet und dienten als Kontrollgewebe im gleichen Paraffinblock. Für die Paraffineinbettung wurden die Gewebe zunächst mit Wasser gewaschen, gefolgt von einer schrittweisen Dehydrierung der Alkohol-, Xylol- und Paraffinreihen mit dem Gewebeautomaten TP 1020 über Nacht. Am nächsten Tag wurden Hirn, Milz und Leber in Paraffin eingebettet.

Die Tierexperimente wurden von Susanne Schmid im Rahmen ihrer naturwissenschaftlichen Dissertation durchgeführt.

## 2.5 Färbungen

### 2.5.1 LFB-PAS-Färbung

Um den Grad der Demyelinisierung nach der Cuprizonbehandlung zu analysieren, wurde eine Luxol-Fast-Blue-Perjodsäure-Schiff-Färbung (LFB-PAS) durchgeführt. LFB-PAS färbt das Myelin im ZNS blau (LFB) und demyelinisierte Bereiche rosa (PAS). Nach der Rehydrierung in 90%igem Isopropanol wurden die Gewebeschnitte in eine LFB-Arbeitslösung überführt und bei 60 °C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit 90%igem Isopropanol gewaschen und differenziert, zuerst mit 0,05 % Lithiumcarbonat (in Wasser verdünnt), gefolgt von einer kurzen Inkubation in 70%igem Isopropanol. Die Differenzierung wurde gestoppt, bis nur noch das Myelin tiefblau gefärbt war. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die gefärbten Schnitte ausgiebig mit destilliertem Wasser gespült. Für die PAS-Reaktion wurden die gefärbten Schnitte fünf Minuten lang in 1%iger

Perjodsäure (in Wasser verdünnt) inkubiert, gefolgt von fünf Minuten Waschen unter fließendem Leitungswasser und fünf Minuten gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten lang in Schiff'schem Reagenz gefärbt und zehn Minuten lang mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun wurde durchgeführt, um die Zellkerne zu färben. Die Schnitte wurden zwei Minuten mit Mayers Hämalaun inkubiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und kurz in 1 % HCl differenziert. Die blaue Färbung wurde nach dem Waschen mit destilliertem Wasser durch Spülen der gefärbten Schnitte für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser erreicht. Der Grad der Demyelinisierung im CC nach der Cuprizonbehandlung wurde mit einem semiquantitativen Scoring-System nach Hiremath et al. (Hiremath et al. 1998b) analysiert: keine (0), minimale (0,5), < 33 % (1), 33-66 % (2) und > 66 % (3) Demyelinisierung.

### 2.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunfärbung (IHC) nutzt Antikörper, um Antigene in Zellen oder Geweben nachzuweisen. Der große Vorteil der IHC ist die Gelegenheit, das gewünschte Zielantigen in Gewebeproben unter Beibehaltung der räumlichen Zusammenhänge und der Gewebearchitektur sichtbar zu machen. Die IHC wurde mit primären Antikörpern gegen akut geschädigte Axone (Amyloid-Vorläuferprotein, APP), welche sich durch Anschwellen und Akkumulation von APP darstellen, aktivierte Mikroglia (MAC3), reife Oligodendrozyten (p25) und Oligodendrozytenvorläuferzellen (PDGFR alpha) durchgeführt (vgl. Tabelle 5). Vor der IHC wurde eine Epitopfreilegung durch fünfmaliges Erhitzen der Objektträger in 10mM Zitronensäurepuffer, pH 6.0, (APP, MAC3) oder 1mM Tris-EDTA-Lösung (p25) in der Mikrowelle für drei Minuten durchgeführt. Um dies zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte in Glasküvetten übertragen, die mit dem entsprechenden Puffer gefüllt waren. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Küvetten abwechselnd mit destilliertem Wasser oder entsprechendem Puffer nachgefüllt. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte zunächst in PBS gewaschen und anschließend 20 Minuten in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Inhibierung unspezifischer Bindungen mit 10 % Ziegen Serum für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Primärantikörper (vgl. Tabelle 5) wurden in 10%igem fetalen Kälberserum (fetal calf serum = FCS) in PBS verdünnt und über Nacht in feuchten Kammern inkubiert. Kontrollschnitte wurden in Abwesenheit von Primärantikörpern oder mit Isotyp-Kontrollantikörpern inkubiert. Dann wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Eine Biotin-konjugierte Sekundärantikörperbindung

wurde mit Peroxidase und 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) sichtbar gemacht. Die biotinylierten Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 6) wurden mit 10 % FCS in PBS verdünnt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Daraufhin wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und mit Hämalaun 30 Sekunden gegengefärbt. Die APP-positiven Axone, MAC3-positiv Mikrogliä, p25-positiv Oligodendrozyten und die PDGFR alpha-positiv OPCs wurden im CC bei vierhundertfacher Originalvergrößerung unter Verwendung eines okularen Zählgitters lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Zellzahlen wurden pro Quadratmillimeter angegeben.

Die Färbungen wurden von medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

## **2.6 Auswertung**

### **2.6.1 Quantifizierung der aktivierten Mikrogliä, reifen Oligodendrozyten, der axonalen Schädigung und der Oligodendrozytenvorläuferzellen**

Die Auszählung der aktivierten Mikrogliä (MAC3), der reifen Oligodendrozyten (p25), der akuten axonalen Schädigung (APP) sowie der OPCs (PDGFR alpha) wurde am Mikroskop mit okulare Zählgitter in vierhundertfacher Vergrößerung durchgeführt. Dabei wurden die jeweiligen immunhistochemisch markierten Zellen im gesamten CC mit Hilfe von Gesichtsfeldern ausgezählt. Dabei besteht ein Gesichtsfeld aus 16 kleinen Quadraten Es wurde darauf geachtet, dass in allen histologischen Schnitten, sprich in jeder untersuchten Maus, jeweils die gleiche Schnittebene morphometriert wurde. Die Dichte wurde in Zellen/mm<sup>2</sup> angegeben.

### **2.6.2 Myelinbeurteilung**

Die Demyelinisierung wurde mit Hilfe der LFB-PAS-Färbung detektiert (vgl. Abbildung 3, Abbildung 5). Hierzu wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop gescort (nach Hiremath et al., 1988). Die Demyelinisierung wurde dabei im gesamten CC beurteilt. Der semiquantitative Score umfasst die Punkte 0 bis 3. 0 bedeutet dabei keine Demyelinisierung (DM), 1 eine DM von bis zu 33 %, 2 eine DM zwischen 33 % und 66 % und der Wert 3 eine DM von mehr als 66 %.

### 2.6.3 Statistische Analyse

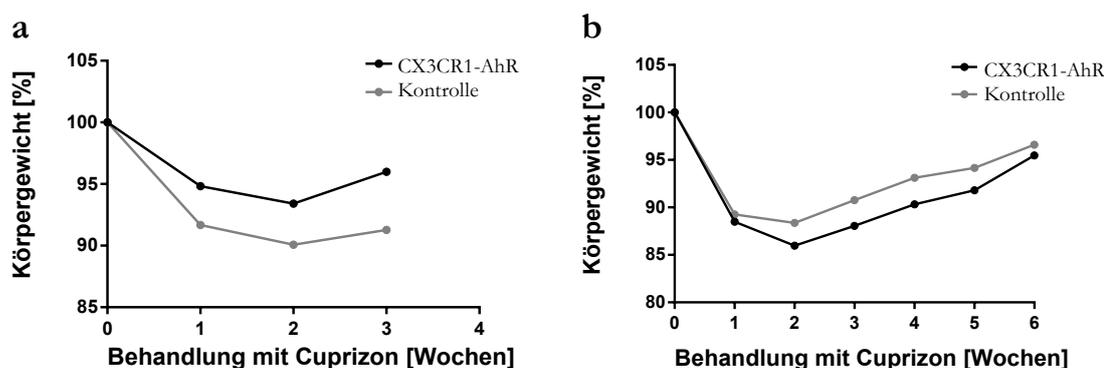
Die statistische Analyse wurde mit der GraphPad Prism Software (Version 6 GraphPad Software, USA) durchgeführt (vgl. Tabelle 10). Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler ( $\pm$  SEM) angegeben. Die Daten wurden zunächst mit dem D'Agostino & Pearson Omnibus-Normalitätstest auf Normalverteilung getestet. Daraufhin wurde ein t-Test durchgeführt. Bei normalverteilten Daten wurde ein Welch t-Test angewandt, bei nicht-normalverteilten Daten ein nicht-parametrischer Mann-Whitney Test (Rangsummentest). Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde für parametrische Daten eine one-way-ANOVA (Analysis of variance) mit Bonferroni-Post-Test verwendet, während für nicht-parametrische Daten der Kruskal-Wallis-Test mit dem Dunn-Post-Test durchgeführt wurde. Die statistische Signifikanz wurde als  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) bestimmt.

### 3 Ergebnisse

Mit meiner Arbeit habe ich die Rolle des mikroglialen AhR in der Cuprizon-induzierten Demyelinisierung untersucht. Dafür wurden CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse, die keinen AhR in Mikroglia exprimieren, und CX3CR1-CreERT2-negative AhR<sup>fl/fl</sup> Wurfgeschwister (= Kontrollgruppe) als Kontrollmäuse, die über den AhR in Mikroglia verfügen, drei bzw. sechs Wochen mit 0,25 % Cuprizon gefüttert und hinsichtlich verschiedener Parameter wie der Demyelinisierung im CC, der Anzahl der Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und akut geschädigten Axone verglichen.

#### 3.1 Gewichtsentwicklung der Mäuse

Um die Laborbedingungen des Cuprizonmodells zu erfüllen, dürfen die Versuchsmäuse während des Experiments nicht stark an Gewicht abnehmen. Deshalb muss der Gewichtsverlauf der Mäuse während des Experiments wöchentlich kontrolliert und dokumentiert werden.



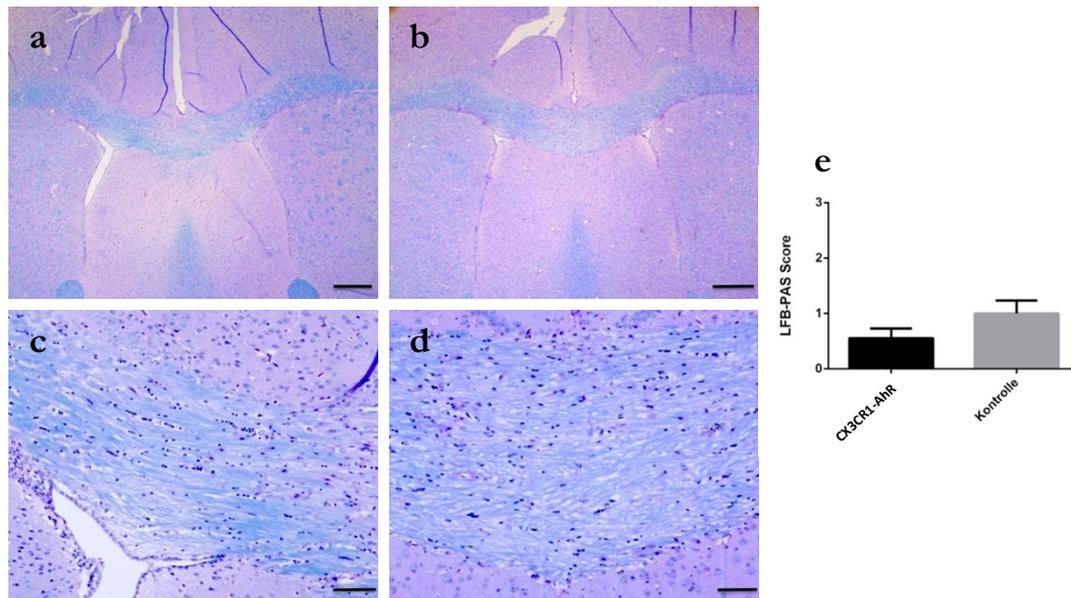
**Abbildung 2: Gewichtsverlauf während der Cuprizongabe.** Gewichtsverlust von bis zu 10 % in den ersten zwei Wochen des dreiwöchigen Experiments, ab Woche zwei des Experiments steigt das Gewicht wieder an, erreicht das Ausgangsgewicht jedoch nicht ganz (a). Auch im sechswöchigen Experiment fällt das Gewicht der Mäuse in den ersten zwei Wochen um mehr als 10 % ab. Danach erfolgt wieder eine Gewichtszunahme auf circa 95 % des Ausgangsgewichts (b). Es konnte in beiden Experimenten kein signifikanter Unterschied zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe festgestellt werden (a, b) (ungepaarter T-Test).

Es fällt zunächst auf, dass sowohl bei der drei- als auch bei der sechswöchigen Fütterung mit Cuprizon die Mäuse innerhalb der ersten zwei Wochen bis zu 13 % des Körpergewichtes verlieren (vgl. Abbildung 2). Ab der zweiten Woche der Fütterung mit Cuprizon-supplementiertem Futter nehmen die Mäuse wieder an Gewicht zu (vgl. Abbildung 2). Es ist

jedoch ersichtlich, dass die Mäuse in beiden Experimenten nicht ihr Ausgangsgewicht wieder erreichen. Es lässt sich jedoch ein eindeutiger Trend in Richtung des Ausgangsgewichts erkennen. Nach sechs Wochen lag das Gewicht bei etwa 95 % des Ausgangsgewichtes (vgl. Abbildung 2b). Es wurde kein signifikant unterschiedlicher Gewichtsverlauf zwischen den CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe festgestellt (ungepaarter T-Test).

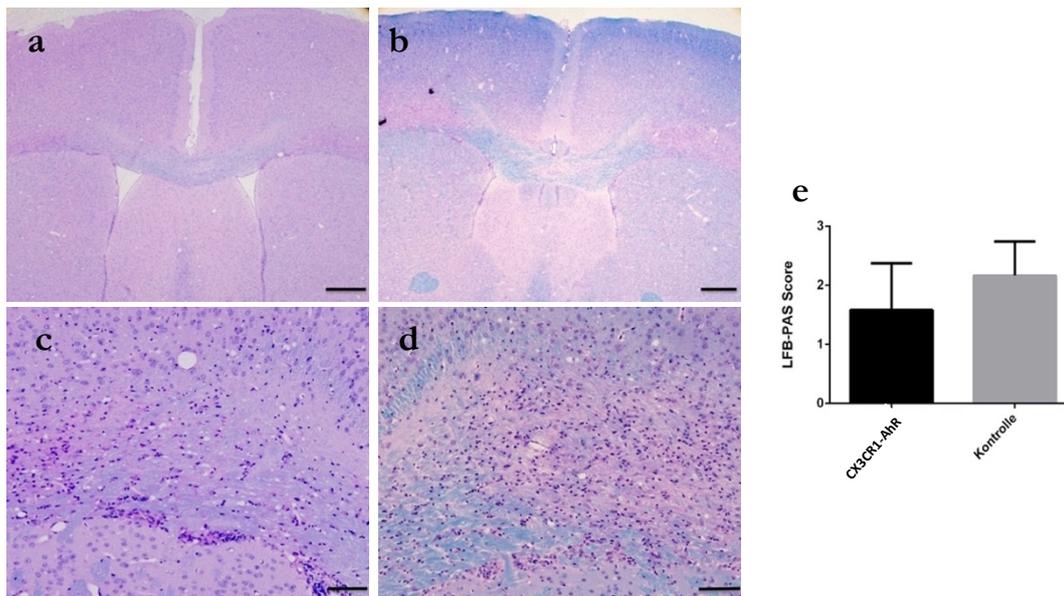
### **3.2 Der mikrogliale AhR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Demyelinisierung im Corpus callosum**

Um die Wirkung des mikroglialen AhR auf die Cuprizin-induzierte Demyelinisierung zu untersuchen, wurde der Myelinverlust auf LFB-PAS-gefärbten Schnitten in CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (vgl. Abbildung 3a, c; Abbildung 4a, c) und der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 3b, d; Abbildung 4b, d) nach drei und sechs Wochen Cuprizin überprüft. Die Demyelinisierung wurde mit Hilfe des semiquantitativen Scoringsystems bewertet. Dabei werden keine (0), minimale (0,5), < 33 % (1), 33-66 % (2) und > 66 % (3) Entmarkung unterschieden (Hiremath et al. 1998b).



**Abbildung 3: Der mikrogliale AhR hat keinen signifikanten Einfluss auf die Demyelinisierung im CC nach dreiwöchiger Cuprizongabe.** Dargestellt ist eine LFB-PAS-Färbung zur Detektion der Demyelinisierung im CC. Man sieht eine allenfalls geringgradige Demyelinisierung bzw. Auflockerung des Gewebes nach drei Wochen Fütterung mit Cuprizon-supplementiertem Futter bei CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 10) (a, c) und der Kontrollgruppe (n = 9) (b, d). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (e) (Mann Whitney Test). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die repräsentativen Bilder des CC von Cuprizon-gefütterten Mäusen wurden bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (a, b; Maßstabsbalken: 200 µm) und hundertfacher Originalvergrößerung (c, d; Maßstabsbalken: 50 µm) aufgenommen.

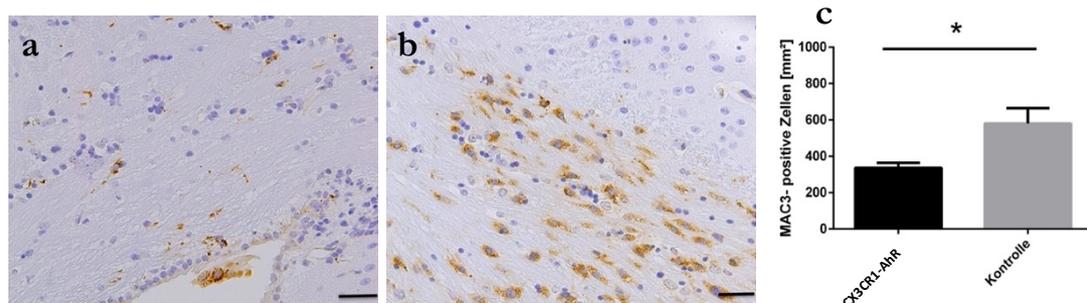
Nach drei Wochen wurde kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Demyelinisierung bei CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse: Score  $0,56 \pm 0,53$  vs. Kontrollgruppe: Score  $1,0 \pm 0,7$ ,  $p = 0,2756$ , Mann Whitney Test, Abbildung 3e). Das Ausmaß der Demyelinisierung des CC war zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen gering. Auch nach sechs Wochen wurde kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Entmarkung im CC zwischen Mäusen mit und ohne AhR auf Mikrogliazellen beobachtet (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen: Score  $1,58 \pm 0,79$  vs. Kontrollgruppe: Score  $2,1 \pm 0,58$ ,  $p = 0,0514$ , ungepaarter T-test, Abbildung 4e). Allerdings stieg die Demyelinisierung bei längerer Cuprizonfütterung in beiden Versuchsgruppen von bis zu 33 % auf 33 %-66 % an.



**Abbildung 4: Starke Demyelinisierung des CC nach sechswöchiger Cuprizongabe.** Dargestellt ist eine LFB-PAS-Färbung zur Detektion der Demyelinisierung im CC. Man sieht sowohl bei den CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 12) (a, c) als auch bei der Kontrollgruppe (n = 12) (b, d) eine starke Demyelinisierung. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (e) (ungepaarter T-Test). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die repräsentativen Bilder des CC von Cuprizongefütterten Mäusen wurden bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (a, b; Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m) und hundertfacher Originalvergrößerung (c, d; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m) aufgenommen.

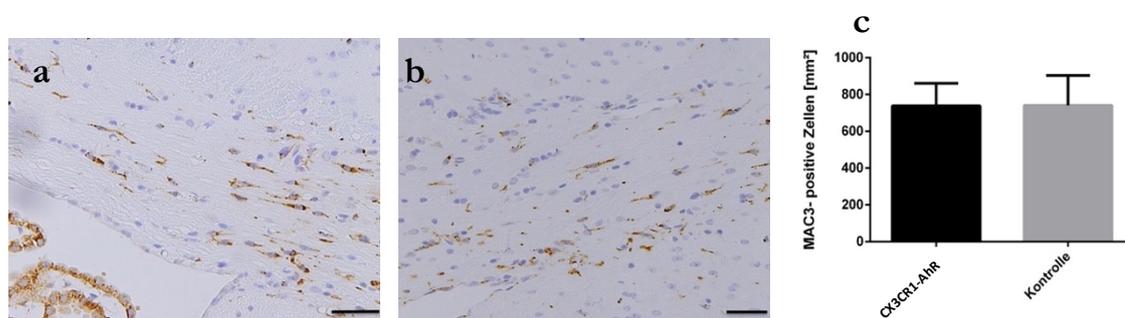
### 3.3 Mikrogliainfiltation

Um die Mikrogliainfiltation in das CC während der Cuprizongabe zu detektieren, wurden Hirnschnitte mit Antikörpern gegen MAC3, einem Antigen auf der Oberfläche von Gewebemakrophagen, immungefärbt (vgl. Abbildung 5, Abbildung 6). Nach drei Wochen Cuprizon-Fütterung zeigte die Kontrollgruppe signifikant mehr aktivierte Mikroglia im CC als die CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse: 337,2  $\pm$  85,61 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. Kontrollgruppe: 580,4  $\pm$  255,4 Zellen/mm<sup>2</sup>, p = 0,0112, ungepaarter T-Test, Abbildung 5c). Nach sechs Wochen Cuprizon-Fütterung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien festgestellt werden (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse: 738,9  $\pm$  02,4 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. Kontrollgruppe: 741,5  $\pm$  537,7 Zellen/mm<sup>2</sup>, p = 0,7341, Mann Whitney Test, Abbildung 6c). Insgesamt nahm die Anzahl an aktivierten Mikroglia im CC bei allen Tieren von Woche drei bis Woche sechs stark zu. Bei den Mäusen mit AhR-defizienten Mikroglia verdoppelte sich die Dichte an MAC3-positiven Zellen, während sie in der Kontrollgruppe nur um ein Drittel zunahm.



**Abbildung 5: Signifikant weniger Mikrogliafiltration bei CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen.**

CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse weisen etwa halb so viele MAC3-positive Zellen auf wie die Tiere der Kontrollgruppe (c) (ungepaarter T-Test). Die repräsentativen Bilder des CC nach drei Wochen Cuprizongabe von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 10) (a) und der Kontrollgruppe (n = 9) (b) wurden bei zweihundertfacher Originalvergrößerung (Maßstabalken: 20 µm) (\*p < 0,05) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.



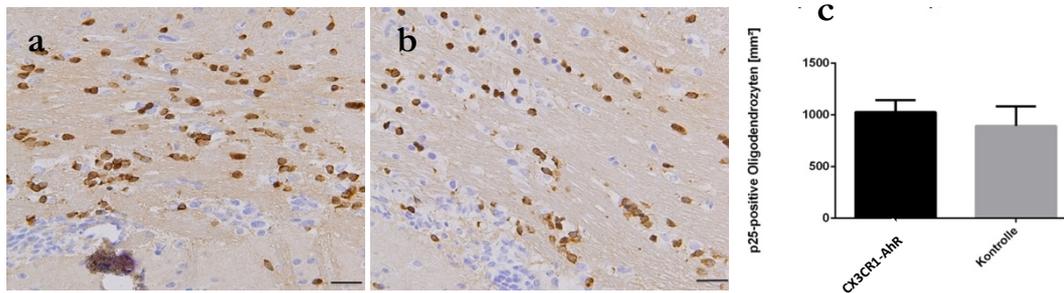
**Abbildung 6: Starke Mikrogliafiltration nach sechswöchiger Cuprizongabe.**

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe (c) (Mann Whitney Test). Allerdings sieht man eine starke Zunahme der Mikroglia im CC zwischen Woche drei und Woche sechs des Experiments (vgl. Abbildung 5c, Abbildung 6c). Die repräsentativen Bilder des CC nach sechs Wochen Cuprizongabe von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 12) (a) und der Kontrollgruppe (n = 12) (b) wurden bei 200-facher Originalvergrößerung (Maßstabalken: 20 µm) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

### 3.4 Reife Oligodendrozyten

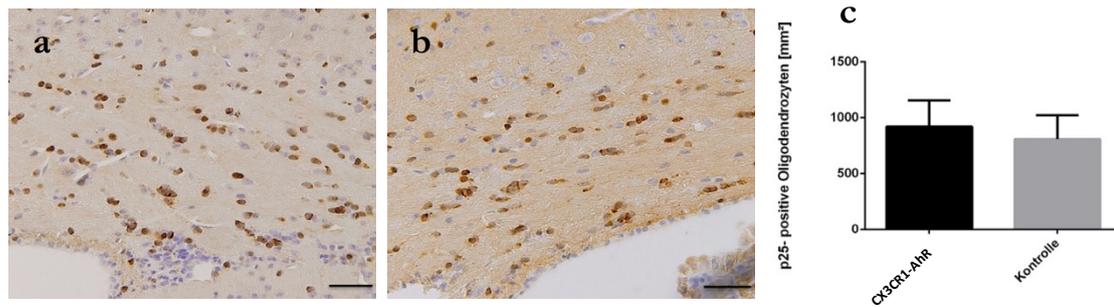
Um die Wirkung des mikroglialen AhR auf reife Oligodendrozyten zu untersuchen, wurden Hirnschnitte mit p25, einem Protein, das in reifen Oligodendrozyten exprimiert wird, angefärbt (Höftberger et al. 2010) (vgl. Abbildung 7, Abbildung 8). Die Dichte an reifen Oligodendrozyten unterschied sich nach drei Wochen nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse: 1027 ± 117,1 p25-positive Zellen/mm<sup>2</sup> vs.

Kontrollgruppe:  $892,9 \pm 188,8$  p25-positive Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,0775$ , ungepaarter T-Test, Abbildung 7c).



**Abbildung 7: Geringfügig mehr Oligodendrozyten in CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen.** Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied von reifen Oligodendrozyten zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen ( $n = 10$ ) und der Kontrollgruppe ( $n = 9$ ) (c) (ungepaarter T-Test). Die repräsentativen Bilder des CC nach drei Wochen Cuprizonebehandlung wurden von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (a) und der Kontrollgruppe (b) bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (Maßstabballen: 20 µm) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

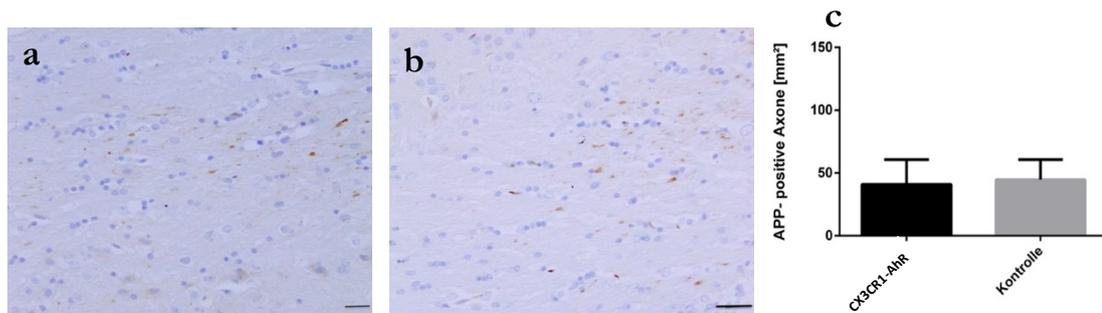
Auch nach sechs Wochen Cuprizongabe konnte kein signifikantes Ergebnis zwischen den zwei Experimentgruppen festgestellt werden (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse:  $921,2 \pm 234,7$  p25-positive Zellen/mm<sup>2</sup> vs. Kontrollgruppe:  $808,1 \pm 214,4$  p25-positive Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,1418$ , Mann Whitney Test, Abbildung 8c). Es konnten in beiden Experimenten, sowohl nach drei als auch nach sechs Wochen nahezu konstante Zellzahlen in beiden Gruppen verzeichnet werden.



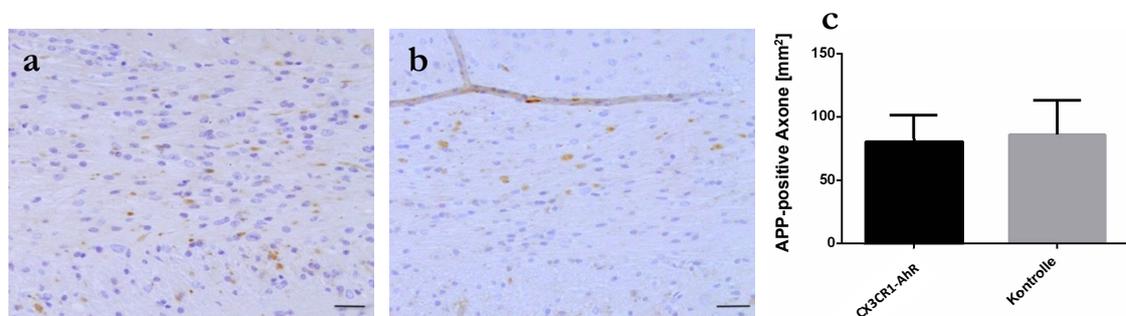
**Abbildung 8: Konstante Zellzahl der reifen Oligodendrozyten nach sechswöchiger Cuprizonbehandlung.** Kein signifikanter Unterschied (c) zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (a) und der Kontrollgruppe (b) (Mann Whitney Test). Die repräsentativen Bilder des CC wurden nach sechs Wochen Cuprizonbehandlung von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 12) (a) und der Kontrollgruppe (n = 12) (b) bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (Maßstabballen: 20 µm) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

### 3.5 Geschädigte Axone

Akut geschädigte Axone wurden mittels der APP-Immunhistochemie detektiert (vgl. Abbildung 9, Abbildung 10). Sowohl drei (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse:  $41,0 \pm 62,06$  APP-positive axonale Sphäroide/mm<sup>2</sup> vs. Kontrollgruppe:  $44,73 \pm 47,9$  APP-positive axonale Sphäroide/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,8251$ , Mann Whitney Test, Abbildung 9c) als auch sechs Wochen (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse:  $79,58 \pm 75,9$  APP-positive axonale Sphäroide/mm<sup>2</sup> vs. Kontrollgruppe:  $86,01 \pm 94,78$  APP-positive axonale Sphäroide/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,7010$ , Mann Whitney Test, Abbildung 10c) nach Beginn der Fütterung mit Cuprizon wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Mäusen mit und ohne funktionellem AhR auf Mikroglia in Bezug auf eine akute axonale Schädigung beobachtet. Allerdings wurde deutlich, dass durch die längere Behandlung mit Cuprizon wesentlich mehr Axone geschädigt wurden, obwohl die Anzahl an Oligodendrozyten während des Experiments nicht abnahm, sondern relativ konstant blieb (vgl. Abschnitt 3.4).



**Abbildung 9: Vergleichbare akute axonale Schädigung in beiden Experimentalgruppen.** Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der akuten axonalen Schädigung zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe (c) (Mann Whitney Test). Die repräsentativen Bilder des CC wurden nach drei Wochen Cuprizonbehandlung von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 10) (a) und der Kontrollgruppe (n = 9) (b) bei zweihundertfacher Originalvergrößerung (Maßstab balken: 20 µm) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

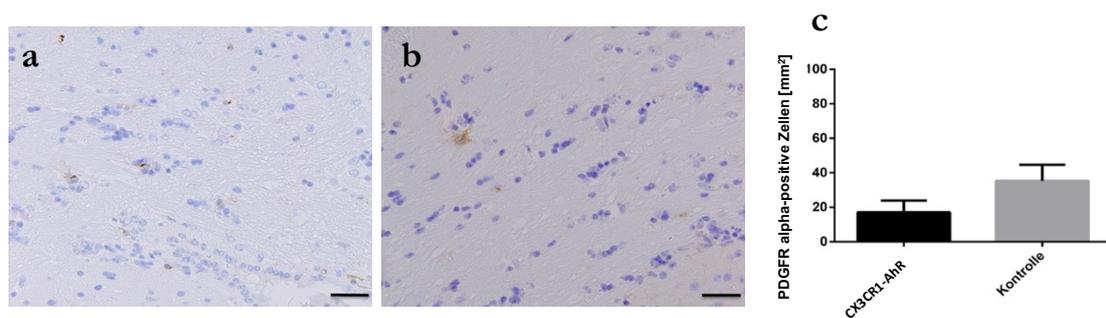


**Abbildung 10: Starke axonale Schädigung in beiden Gruppen.** Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe (c) (Mann Whitney Test). Die repräsentativen Bilder des CC nach sechs Wochen Cuprizonbehandlung wurden von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 12) (a) und der Kontrollgruppe (n = 12) (b) bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (Maßstab balken: 20 µm) aufgenommen. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt.

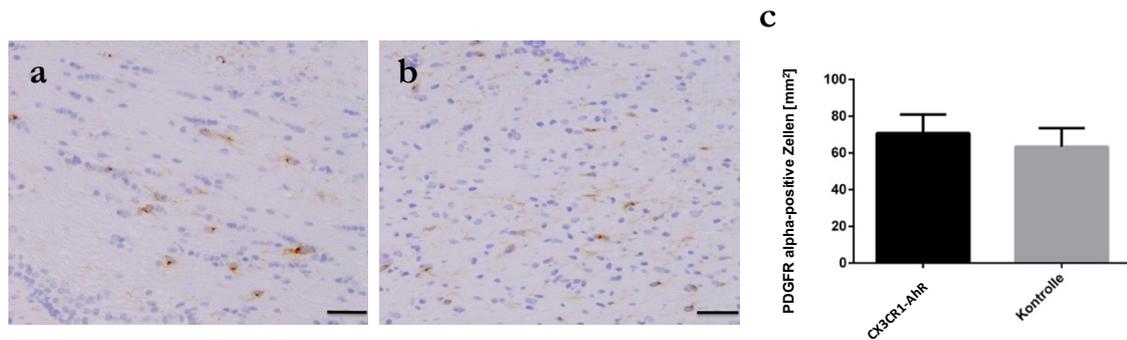
### 3.6 Oligodendrozytenvorläuferzellen

Zur Darstellung der Oligodendrozytenvorläuferzellen wurden Hirnschnitte von Mäusen, die drei und sechs Wochen mit Cuprizon gefüttert worden waren, mit PDGFR alpha (platelet-derived growth factor receptor alpha) gefärbt (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12). PDGFR alpha ist ein Rezeptor, der sich auf der Oberfläche verschiedener Zellen befindet und bei Aktivierung Zellwachstum und Zelldifferenzierung fördert. Hier gab es sowohl nach drei (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse: 17,05 ± 20,56 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. Kontrollgruppe: 35,39

$\pm 26,1$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ,  $p = 0,1262$ , ungepaarter T-Test, Abbildung 11c) als auch nach sechs Wochen Cuprizongabe (CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse:  $70,83 \pm 35,05$  Zellen/ $\text{mm}^2$  vs. Kontrollgruppe:  $63,39 \pm 35,05$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ,  $p = 0,6080$ , ungepaarter T-Test, Abbildung 12c) keinen signifikanten Unterschied zwischen Mäusen mit depletiertem AhR auf Mikroglia und der Kontrollgruppe, die den mikroglialen AhR exprimieren. Es zeigte sich allerdings, dass sich die Zellzahl PDGFR alpha-positiver Zellen in CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen von Woche drei auf Woche sechs vervierfachte, während die Zellzahl in der Kontrollgruppe nur um den Faktor 1,5 zunahm (vgl. Abbildung 11c und 12c).



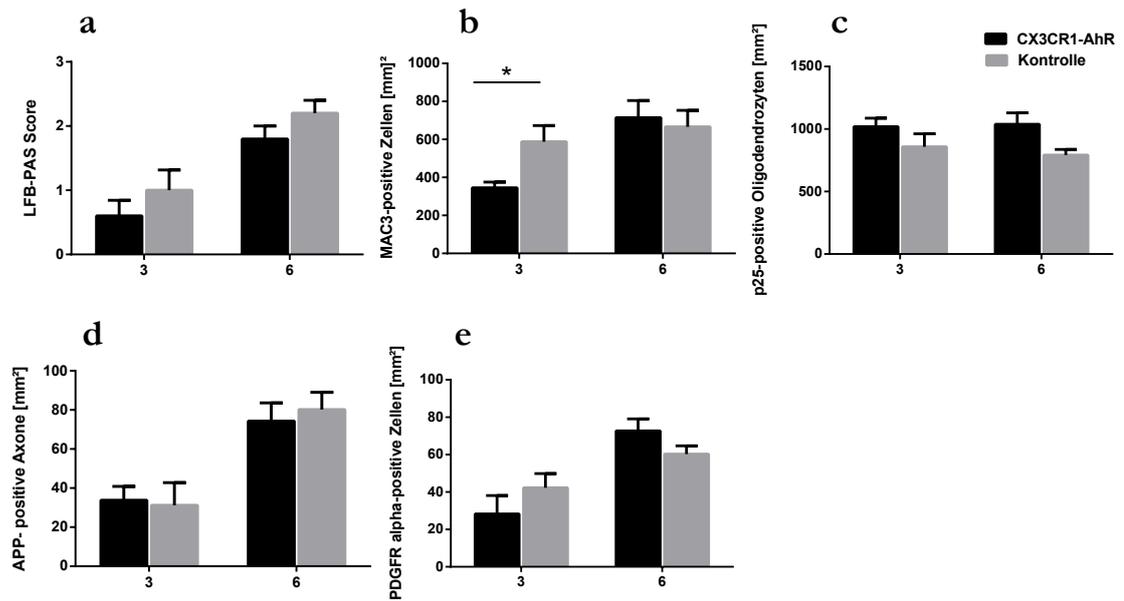
**Abbildung 11: Geringe Anzahl an Oligodendrozytenvorläuferzellen nach dreiwöchiger Cuprizonbehandlung.** Kein signifikanter Unterschied (c) (ungepaarter T-Test) zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (a) und der Kontrollgruppe (b). Die repräsentativen Bilder des CC nach drei Wochen Cuprizonbehandlung wurden von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen ( $n = 10$ ) (a) und der Kontrollgruppe ( $n = 9$ ) (b) bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (Maßstabballen:  $20 \mu\text{m}$ ) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.



**Abbildung 12: Zunahme der Oligodendrozytenvorläuferzellen nach sechswöchiger Cuprizonbehandlung.** Man sieht keinen signifikanten Unterschied (c) (ungepaarter T-Test) zwischen CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (a) und der Kontrollgruppe (b). Allerdings zeigt sich eine starke Zunahme der Zellen im Vergleich zur Zellzahl nach dreiwöchiger Cuprizonbehandlung (vgl. Abbildung 10). Die repräsentativen Bilder des CC wurden von CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (n = 12) (a) und der Kontrollgruppe (n = 12) (b) nach sechs Wochen Cuprizonbehandlung bei zwanzigfacher Originalvergrößerung (Maßstabalken: 20 µm) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

### 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Experimente zeigen keinen Unterschied nach drei- bzw. sechswöchiger Cuprizonbehandlung in den beiden Versuchsgruppen in der toxischen Entmarkung des CC (Abbildung 13a), der Zahl der reifen Oligodendrozyten (Abbildung 13c), der Anzahl der akut geschädigten Axone (Abbildung 13d) und der Zahl der OPCs (Abbildung 13e). Die einzige Ausnahme in diesem Experiment zeigen die mittels MAC3-Immunhistochemie detektierten aktivierten Mikrogliazellen nach einer dreiwöchigen Gabe von Cuprizon. Hier wurde eine signifikant höhere Anzahl an aktivierten Mikroglia in der Kontrollgruppe, welche den AhR exprimiert, festgestellt (Abbildung 13b). Allerdings relativiert sich das Ergebnis, wenn man die Mikrogliazahlen des sechswöchigen Experiments heranzieht. Hier zeigten die CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen wieder ähnliche Mikrogliazahlen wie die Kontrollgruppe (Abbildung 13b).



**Abbildung 13: Direkter Vergleich der Daten nach drei- bzw. sechswöchiger Cuprizinbehandlung.** Dargestellt sind die Demyelinisierung im CC mittels LFB-PAS (a), die Detektion der Mikroglia mittels MAC3-IHC (b) (\* $p < 0,05$ ), die Detektion der reifen Oligodendrozyten mittels p25-IHC (c) sowie die Darstellung der akut geschädigten Axone mittels APP-IHC (d) und die Detektion der Oligodendrozytenvorläuferzellen mittels PDGFR alpha-IHC. Die Abbildung dient der Zusammenfassung der Auswertung der CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>f/f</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe nach drei und sechs Wochen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (Two-way ANOVA).

## 4 Diskussion

### 4.1 Das Cuprizonmodell der toxischen Entmarkung

Die Charakteristika des Cuprizonmodells sind in der Literatur gut dokumentiert. Das experimentelle Design vermeidet systemische Nebenwirkungen bei den Mäusen, produziert aber dennoch eine effiziente und reproduzierbare Demyelinisierung und ermöglicht wieder eine erfolgreiche Remyelinisierung nach Cuprizon-Entzug. In der Literatur wird beschrieben, dass eine ausgeprägte Entmarkung etwa in der dritten Woche beginnt und ihr Maximum in der fünften oder sechsten Woche erreicht (Gudi et al. 2009). Dies spiegelt sich auch in dieser Arbeit wider, in der eine leichte Demyelinisierung nach drei Wochen festgestellt werden konnte, die bis zu Woche sechs des Experiments in beiden Mauslinien stark zunahm. Im Rahmen der Cuprizon-induzierten Entmarkung werden äußerst frühe „präphagozytische“ oder „initiale“ MS-Läsionen modelliert, die sich durch eine hohe Dichte an apoptotischen Oligodendrozyten auszeichnen (Barnett und Prineas 2004). Im Gegensatz zum Cuprizon-Modell zeigt sich aber bei MS auch eine adaptive Immunantwort (Machado-Santos et al. 2018). In meiner Arbeit konnte ich den in der Literatur beschriebenen steigenden Oligodendrozytenverlust unter Cuprizon nicht nachweisen (Vega-Riquer et al. 2019). Meine Ergebnisse zeigen sowohl nach drei als auch nach sechs Wochen eine nahezu konstante Oligodendrozytendichte. Dies könnte möglicherweise an der Auswahl der untersuchten Regionen – ggf. mit unterschiedlich starker Entmarkung – liegen. Die durch Cuprizon typischerweise verursachte Mikrogliose trat hingegen auch bei meinem Experiment auf. Die Mikrogliaendichte stieg bei den CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen zwischen der dritten und sechsten Woche auf etwa das Doppelte und auch in der Kontrollgruppe nahm die Mikrogliaendichte um ein Drittel zu. Generell muss die Cuprizon-induzierte Demyelinisierung als Modell für den Myelinverlust bei MS-Patienten hinterfragt werden, da die experimentelle toxische Entmarkung die Komplexität der humanen Erkrankung nicht abbilden kann. Allerdings besteht bislang noch kein allumfassendes Tiermodell der MS, das alle Facetten der MS abdeckt. Stattdessen können die verschiedenen entzündlichen Tiermodelle und die Oligodendrozyten-Intoxikation angewandt werden, um selektiv verschiedene pathologische Prozesse und Reparaturmechanismen der MS zu untersuchen und aufzudecken (Kipp et al. 2009). Trotzdem stellt die Cuprizon-Intoxikation ein relativ leicht zu handhabendes, unkompliziertes Modell zur Untersuchung von Demyelinisierung und Mikrogliose dar und eignet sich für meine Arbeit, da der mikrogliale AhR untersucht werden soll, was hier gezielt in Abwesenheit einer adaptiven Immunantwort und offenen BHS stattfinden soll.

## 4.2 Reproduzierbarkeit der Zählmethode

Manuelle Zählungen direkt am Mikroskop sind eine gängige Methode, um Zelldichten in Tierexperimenten wie dem Cuprizinmodell zu ermitteln (Hiremath et al. 1998a; Morell et al. 1998). Dabei sollen die Zählungen die absoluten Werte der jeweilig untersuchten Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt widerspiegeln. Trotzdem bietet diese Methode auch Raum für Variabilität. Daher ist es wichtig, dass innerhalb eines Experiments eine Person alle dazugehörigen Schnitte auswertet, damit gewährleistet ist, dass jedes Signal immer gleich als positiv oder als negativ gewertet wird. Die auszählende Person muss gegenüber der experimentellen Gruppe verblindet sein. Dazu kommt, dass auch innerhalb einer Gruppe die Tiere Variabilität zeigen können. Um letztendlich einen Durchschnittswert für die allein in einer Gruppe eingeschlossenen Versuchstiere zu bekommen, wurde ein Durchschnittswert pro immunhistochemischer Färbung mittels einer Formel ( $\text{Zelldichte (mm}^2\text{)} = (\text{Zellzahl}/\text{Gesichtsfeld}) * 16$ ) ermittelt. In diesem Experiment wurden dabei alle positiv gefärbten Zellen des gesamten CC ausgezählt. In der Literatur gibt es dazu keine einheitliche Auszählungsweise. So werden in manchen Experimenten lediglich die Zellen des medialen CC ausgezählt (Morell et al. 1998; Arnett et al. 2002). Andere Arbeiten werten das mediale und laterale CC getrennt aus. Alternativ kann man die Zelldichte auch nach Einscannen der Schnitte mit automatischen Methoden auswerten, die sich in der Vergangenheit allerdings nicht als wesentlich genauer herausgestellt haben (Armstrong et al. 2002), sodass sich die in diesem Experiment durchgeführte manuelle Zählung als durchaus repräsentative Methode zur Erfassung absoluter Werte der zellulären Reaktion einschätzen lässt.

## 4.3 LFB-PAS-Färbung zur Darstellung der Demyelinisierung

Die LFB-PAS-Färbung wird in der neuropathologischen Diagnostik zur Untersuchung von Veränderungen der Myelinscheide und im Speziellen der Myelinlipide verwendet (Matsushima und Morell 2001a). Die in dieser Arbeit angewendete Scoring-Methode eignet sich sehr gut, um größere Flächen, wie das gesamte CC, zu beurteilen. Außerdem lässt sie sich gut reproduzieren sowie schnell und einfach anwenden. Die Untersuchung der Entmarkung mittels LFB-PAS-Färbung zeigte einen Anstieg des Scores mit zunehmender Cuprizinintoxikation, der direkt proportional zum Grad des Myelinverlusts ist. In der Literatur tritt der Höhepunkt der Demyelinisierung nach fünf oder sechs Wochen Cuprizingabe auf (Hiremath et al. 1998a; Arnett et al. 2001). Wie in dieser Arbeit dargestellt wurde, hat auch in meinem Experiment die Entmarkung nach sechs Wochen Cuprizin im Vgl. zu drei Wochen deutlich zugenommen. Zum genauen Verständnis und zur

Interpretation des LFB-PAS-Scores gehört die Berücksichtigung der folgenden Punkte: Die LFB-PAS-Färbung gibt weiterhin ein positives Signal, bis das degradierte Myelin vollständig aus dem Läsionsbereich entfernt ist. Zudem ist die Bewertung des Schnittes subjektiv, sodass ein Experiment stets von einer Person gescoret werden sollte. Die Färbung ist nicht in der Lage, frühe und kleine Veränderungen des Myelins darzustellen, daher weist der Score eine Zeitverzögerung bei der Erkennung von Myelinveränderungen im Vergleich zur Elektronenmikroskopie auf. Nach der Oligodendrozyten-Apoptose tritt der sichtbare Myelinscheidenverlust erst mit einer Zeitverzögerung von mehreren Tagen auf. Dies hat einen erheblichen Einfluss auf den Score. Sie ist wichtig für die richtige Interpretation des Scores, für dessen Vergleich mit anderen Färbetechniken, anderen mikroskopischen Methoden und für dessen Korrelation mit molekularen und zellulären Parametern. Eine weitere wichtige Einschränkung ist die biologische Variabilität, denn selbst bei den unbehandelten Kontrollen gibt es eine gewisse Variation im Ausmaß der Myelinisierung (Stidworthy et al. 2003).

#### 4.4 Oligodendrozyten

Die Verfügbarkeit von Oligodendrozyten und ihren Vorläufern ist eine wichtige Voraussetzung für eine normale Myelinisierung und eine erfolgreiche Remyelinisierung in experimentellen Modellen und bei MS. Darüber hinaus ist die Anreicherung von Oligodendrozyten und ihren Vorläufern ein wichtiger limitierender Faktor für eine erfolgreiche Remyelinisierung (Ludwin 1980; Matsushima und Morell 2001b). In den Experimenten dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse sowohl nach drei als auch nach sechs Wochen geringfügig mehr reife Oligodendrozyten aufweisen als die Kontrollgruppe. Auffällig war allerdings vor allem, dass mittels der PDGFR alpha-Färbung eine Verdreifachung der OPCs bei AhR-defizienten Mäusen zwischen Woche drei und Woche sechs festzustellen war, während die Kontrollgruppe deutlich weniger Vorläuferzellen rekrutiert hat (Steigerung um Faktor 1,5, Abbildung 13e). Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis darauf geben, dass der mikrogliale AhR einen negativen Einfluss auf die Rekrutierung von OPCs hat und somit eine zeitnahe Remyelinisierung verzögert bzw. hemmt.

#### 4.5 Mikrogliaaktivierung unter Cuprizon

Zu den wichtigsten Zellen, die während einer Cuprizon-Intoxikation rekrutiert werden, gehören die Mikroglia (Hiremath et al. 1998a; Morell et al. 1998; McMahon et al. 2001). Auch

in diesem Experiment konnte eine starke Zunahme an MAC3-positiven Zellen verzeichnet werden (Abbildung 13b), sodass sich dieses Ergebnis mit der bereits von vielen Autoren beschriebenen zellulären Antwort auf die Cuprizin-induzierte Entmarkung deckt. Darüber hinaus weist die Mikroglia-Rekrutierung während einer Cuprizin-Intoxikation eine zeitliche und räumliche Korrelation mit anderen Hauptveränderungen auf, zu denen Demyelinisierung und eine reduzierte Anzahl an Oligodendrozyten gehören. Viele Studien belegen, dass die Zelldichte der aktivierten Mikroglia nach einer Woche Cuprizingabe ansteigt. Außerdem sind nach der Literatur die Zellzahlen der Mikroglia in Woche sechs höher als in Woche drei (Hiremath et al. 1998b; Morell et al. 1998; Mason et al. 2004). Es zeigt sich also eine Zunahme an aktivierten Mikroglia mit der Dauer der Cuprizingabe, die in Woche sechs ihr Maximum erreicht. Diese Ergebnisse habe auch ich in diesen Experimenten für beide Gruppen feststellen können. Von Masuda et al. wurde gezeigt, dass die steigende Anzahl an Mikroglia nicht auf der Zunahme von Makrophagen, sondern auf der Proliferation und Rekrutierung von ZNS-ständigen Mikroglia beruht (Masuda et al. 2019). Diese Erkenntnis unterstreicht, dass die BHS unter Cuprizin intakt bleibt. Außerdem ist so gewährleistet, dass die Ergebnisse in diesem Experiment tatsächlich auf den Unterschied in den beiden Mausgruppen und das Vorhandensein bzw. Fehlen des AhR auf Mikroglia bezogen werden können und ein relevanter Einfluss von peripheren Makrophagen auf Myelinschäden oder andere Zellen des ZNS, wie zum Beispiel Oligodendrozyten, ausgeschlossen ist.

Anders verhalten sich Mäuse, bei denen ein CX3CR1-knockout induziert wurde. Bei diesen Mäusen konnte unter einer Cuprizinbehandlung keine starke Mikroglia-Rekrutierung und Demyelinisierung verzeichnet werden, obwohl der Verlust von Oligodendrozyten sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den CX3CR1-knockout-Mäusen ein ähnliches Ausmaß annahm (Lampron et al. 2015). Weiterhin konnte mit der Studie von Lampron et al. gezeigt werden, dass CX3CR1-knockout-Mäuse eine geringere Phagozytoseaktivität haben, wodurch Myelinreste nicht adäquat entfernt wurden und somit eine komplette Remyelinisierung nicht möglich war. Die Remyelinisierung wird zusätzlich dadurch erschwert, dass mikroglia-defiziente Mäuse signifikant weniger OPCs rekrutieren als Mäuse mit intakten Mikroglia (Hagemeyer et al. 2017). Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so zeigt sich demnach, dass eine reduzierte Myelinphagozytose durch Mikroglia bei CX3CR1-Defizienz und bei TREM2 mutierten Mikroglia zu Defiziten in der Rekrutierung von OPCs führt, was im Cuprizinmodell zu einer verminderten bzw. verzögerten Remyelinisierung von Axonen führt (Lampron et al. 2015; Cignarella et al. 2020). Diese Eigenschaften von CX3CR1-knockout-Mäusen im Cuprizinmodell finden sich in meiner Arbeit nicht wieder. Vielmehr

konnte ich hier zeigen, dass die Defizienz des mikroglialen AhR keinen wesentlichen Einfluss auf die Mikrogliaaktivität und Mikrogliaeigenschaften im Cuprizonmodell hat. Ein Fehlen des AhR schränkt die Mikrogliaeigenschaften demnach nicht maßgeblich ein und verändert die typischen mikroglialen Reaktionen im Cuprizonmodell nicht.

#### **4.6 Der mikrogliale AhR spielt keine wesentliche Rolle bei Demyelinisierung durch Cuprizon**

Zur Rolle der Funktion des mikroglialen AhR bei Entmarkungserkrankungen gibt es bislang keine einheitlichen Erkenntnisse. Um die Funktion des AhR in Mikroglia, aber auch in anderen ZNS-ständigen Zellen wie Astrozyten zu erforschen, diente häufig das Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Ein bedeutender Unterschied zwischen diesem Modell und dem Cuprizonmodell, welches in meinen Versuchen angewandt wurde, ist, dass beim Cuprizonmodell periphere, ZNS-Antigen-spezifische T-Zellen keine Rolle spielen und nicht zur Inflammation und Demyelinisierung beitragen. Trotzdem beschreiben beide Modelle ähnliche Pathologien, wie sie auch bei der MS zu finden sind. Ergebnisse aus Studien, welche die EAE als Versuchsmodell verwendet haben, können ebenso zum Verständnis der Funktion des AhR im ZNS beitragen. So haben Rothhammer et al. (2018) im Modell der EAE bereits herausgefunden, dass eine Deletion des mikroglialen AhR mit einer Zunahme der Expression proinflammatorischer Genen in Astrozyten assoziiert ist. Dieses Ergebnis spricht dem mikroglialen AhR eine protektive Rolle zu. Die gleiche Studie belegt, dass das Fehlen des AhR auf Mikroglia zu einer verringerten Transforming growth factor  $\alpha$ -( $Tgf\alpha$ -) und erhöhten Vascular endothelial growth factor  $\beta$ -( $Vegf\beta$ -)Expression bei EAE führt. Zudem zeigen die Autoren, dass Tryptophanmetabolite, die bekanntlich als AhR-Agonisten fungieren, sich positiv auf die Neuroinflammation auswirken. Insgesamt deuten diese Befunde von Rothhammer et al. darauf hin, dass proinflammatorische Prozesse in Mikroglia durch eine AhR-Aktivierung begrenzt werden und die Fähigkeit der Mikroglia, proinflammatorische Aktivitäten in Astrozyten zu fördern, unterdrückt werden. Zudem wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass die AhR-Aktivierung die IL10-Expression steigert, und ein Mangel an AhR-Agonisten, die durch Stoffwechsel, Ernährung, die kommensale Flora oder die Umwelt bereitgestellt werden, zur Pathogenese der MS beitragen kann (Rothhammer et al. 2016). Außerdem ist der mikrogliale AhR in der Lage, das Transkriptionsfaktor-Kappa-B( $NF-\kappa B$ )-Signal zu hemmen, und damit dessen proinflammatorische Eigenschaften einzudämmen (Kadowaki et al. 2016). Umgekehrt bedeutet dies, dass ein Mangel an AhR im Modell der EAE  $NF-\kappa B$ -

Signale verstärken kann, was die mit der Mikrogliaaktivierung korrelierten Transkripte hochreguliert und zu Entzündung und Neurodegeneration führt (Rothhammer et al. 2018). Die Unterdrückung von NF- $\kappa$ B-Signalen durch den AhR kann außerdem die pathogene Aktivität von Astrozyten in der EAE hemmen (Rothhammer et al. 2016). Die Ergebnisse zeigen, dass der AhR sowohl in Mikrogliazellen als auch in Astrozyten an der Hemmung der Entwicklung von EAE durch multiple entzündungshemmende Effekte beteiligt ist und die Aktivierung des AhR schützende Auswirkungen auf MS haben könnte. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der mikrogliale AhR zur Neuroprotektion beiträgt und die Deletion sich somit negativ auf die entzündliche und degenerative Pathogenese im Modell der EAE auswirkt.

Weitere bislang bekannte Fakten sind, dass der AhR im ZNS die Differenzierung und Stabilisierung von Tr1-Zellen fördert, welche die Selbsttoleranz regulieren und so die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindern (Wheeler et al. 2017). Zudem wurde festgestellt, dass die AhR-Aktivität in MS-Läsionen reduziert ist, welches darauf zurückzuführen sei, dass bei MS-Patienten weniger AhR-Agonisten im Serum vorhanden sind (Wheeler et al. 2017). Es wird vermutet, dass der AhR protektive Wirkungen bei autoimmunen Erkrankungen im ZNS hat. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die EAE, als Beispiel einer autoimmun-entzündlichen Erkrankung im ZNS, mit Laquinimod therapiert werden kann. Dieses Medikament wirkt in AhR-abhängiger Weise (Berg et al. 2016). Dabei ist wichtig zu beachten, dass der AhR zellspezifisch funktioniert. Die eben beschriebenen Effekte wurden vor allem in Bezug auf den Astrozyten-spezifischen AhR untersucht. Andere Forschungsgruppen, die speziell den mikroglialen AhR genauer studiert haben, konnten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen des mikroglialen AhR identifizieren. Hierbei scheint es von Bedeutung zu sein, wie der AhR aktiviert wird. Die allein durch LPS induzierte AhR-Aktivierung kann dabei die Expression von proinflammatorischen Mediatoren und neurotoxischen Faktoren erleichtern, die von LPS-aktivierten Mikrogliazellen stammen. Im Gegensatz dazu wirkte die durch LPS induzierte AhR-Aktivierung zusammen mit FICZ (6-formyl-indolo[3,2-b]carbazole), einem AhR-Liganden, entzündungshemmend und führte zur Unterdrückung der durch Mikroglia vermittelten Immunreaktionen (Lee et al. 2015). In meiner Arbeit lag der Fokus auf dem mikroglialen AhR. Wie meine Ergebnisse zeigen, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen ohne mikroglialen AhR und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Der AhR scheint hier also keine Wirkung hinsichtlich einer unterschiedlich starken Rekrutierung der Mikroglia zu haben und zeigt keine protektive Rolle in der Cuprizin-induzierten toxischen Entmarkung. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der mikrogliale

AhR keinen Einfluss auf die Pathogenese der Cuprizin-induzierten Demyelinisierung ausübt. So zeigen meine Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an akut geschädigten Axonen (APP-IHC), der Demyelinisierung im CC (LFB-PAS-Färbung) und ebenfalls keinen entscheidenden Unterschied in den Oligodendrozytenzahlen (p25-IHC). Meine Untersuchungen können daher keine protektive Wirkung des AhR in diesem Modell nachweisen. Der Unterschied zwischen meinen Ergebnissen und den dargestellten Studien lässt sich in erster Linie durch die verschiedenen Versuchsmodelle erklären. Zudem bleibt auch hier noch einmal zu betonen, dass die MS eine komplexe Erkrankung darstellt, die sich durch ein Tiermodell allein nicht komplett darstellen lässt. Zudem ist bekannt, dass das Einwandern von peripheren T-Zellen zur Pathogenese der MS beiträgt. Dieser Aspekt fehlt durch die fehlende Aktivierung peripherer ZNS-Antigen-spezifischer T-Zellen und das Intaktbleiben der BHS im Cuprizinmodell. Folglich werden hier auch keine T-Zellen durch Mikroglia aktiviert. Aus der Literatur ist ersichtlich, dass die bisherigen Erkenntnisse über den Einfluss des AhR bei einer Inflammation im ZNS noch eher vage sind. Ob er gezielt protektiv wirkt, kann noch nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Allerdings hat eine Studie gezeigt, dass AhR-Agonisten im Serum von Patienten mit einer akuten ZNS-Entzündung erhöht sind (Rothhammer et al. 2017). Man mutmaßt aus den Ergebnissen, dass die Agonisten den AhR aktivieren, um die Immunpathologie einzudämmen.

#### **4.7 Die Rolle des AhR in verschiedenen Organsystemen**

Eine Reihe von Studien konnte in den letzten Jahren einen starken Einfluss des AhR auf Immunzellen und eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen verdeutlichen. Zudem führt ein Verlust des AhR bei Mäusen zu multiplen Anomalien in verschiedensten Organen und Geweben. Schon lange ist bekannt, dass eine AhR-Defizienz in der Leber zu einer Fibrose und einem offenen Ductus venosus führt (Lahvis et al. 2005). Aber auch andere Organsysteme wie die Haut werden durch eine geringere Barrierefunktion negativ beeinträchtigt (Haas et al. 2016). Ebenso wirkt sich der AhR-Verlust negativ auf den Gastrointestinaltrakt aus und senkt auch hier die Barrierefunktion des Darms (Di Meglio et al. 2014), führt zu vermehrter Entzündung (Yu et al. 2018) und ist bei AhR-knockout-Mäusen mit der Tumorgenese von kolorektalen Karzinomen assoziiert (Díaz-Díaz et al. 2016). Außerdem führt ein AhR-Verlust zu ausgedehnten Immunstörungen, die vor allem auf einer geringeren Produktion von IL-10, welches antiinflammatorisch wirkt, und der TH-17-Zelldifferenzierung, welche vor allem proinflammatorische Zytokine produzieren, beruhen (Gutiérrez-Vázquez und Quintana 2018). All diese Beispiele verdeutlichen, dass ein

AhR-Verlust mit vermehrten Organpathologien einhergeht. Der AhR agiert jedoch nicht nur in protektiver Weise im Organismus. Ein Beispiel für eine Erkrankung, bei der der AhR die Organfunktion nicht unterstützt und zu einer Erkrankung führen kann, ist die Arteriosklerose, eine chronische Erkrankung der Gefäße, bei der verschiedene AhR-Liganden mit einem erhöhten Risiko für diese Erkrankung in Verbindung gebracht wurden (Kerley-Hamilton et al. 2012; Zeilinger et al. 2013). Bei der Arteriosklerose könnte demnach die Antagonisierung des AhR eine Möglichkeit zur Therapie darstellen (Pernomian und da Silva 2015). Die unterschiedlichen Organsysteme verdeutlichen, wie ubiquitär der AhR im Organismus verbreitet ist und wie zahlreich seine Funktionen sind. Überdies demonstrieren diese Beispiele, dass der AhR Pathologien unterdrücken, aber auch erzeugen kann. Nicht nur in der Peripherie, sondern auch im ZNS kann sich ein AhR-knockout auswirken. So zeigen AhR-knockout-Mäuse einen angeborenen spontanen Nystagmus, der auf Veränderungen des Fettgehaltes der Myelinscheide zurückzuführen ist (Juricek et al. 2017). Dies legt nahe, dass der AhR die physiologischen Myelinisierungsprozesse stören kann. An dieser Stelle lässt sich eine Parallele zur MS aufzeigen, da eine nicht intakte Myelinscheide ein Hauptproblem der MS darstellt. Zudem kann es auch bei der MS aufgrund von Myelinverlust und axonaler Schädigung zu einem erworbenen Nystagmus kommen (Kang und Shaikh 2017). Es lässt sich also die Frage stellen, ob ein Verlust bzw. eine verminderte Aktivierung des AhR auch maßgeblich zum Myelinschaden bei der MS beitragen könnte. Des Weiteren haben AhR-knockout-Mäuse eine dünnere Myelinscheide und sind motorisch verlangsamt (Shackleford et al. 2018). Diese Symptome einer veränderten Myelinscheide und einer motorischen Einschränkung sind für die MS typisch, sodass die Ergebnisse der AhR-knockout-Mäuse vermuten lassen, dass der AhR protektive Effekte auf die Myelinisierung hat. Diese Effekte konnten in meiner Arbeit, in der ausschließlich der AhR zellspezifisch ausgeknockt wurde, während alle anderen Zellen den AhR noch exprimierten, nicht bestätigt werden. In meinen Experimenten ließ sich kein Unterschied zwischen den CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und der Kontrollgruppe feststellen, sodass sich schlussfolgern lässt, dass ein Verlust des mikroglialen AhR keinen Einfluss auf die Cuprizin-induzierte Demyelinisierung hat. Betrachtet man jedoch den mikroglialen AhR unter EAE-Bedingungen, so verschlechtert ein Verlust des mikroglialen AhR die durch EAE ausgelöste autoimmune Entzündung (Rothhammer et al. 2018). Auch bei einem kompletten AhR-knockout verstärkt sich die durch EAE ausgelöste Entzündung im Vergleich zu Wildtypmäusen, welche den AhR exprimieren (Quintana et al. 2008). Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal, dass der AhR in unterschiedlichen Situationen, wie hier in zwei unterschiedlichen experimentellen Modellen dargestellt, verschiedene Reaktionen auslösen kann. Wie bereits erwähnt agiert der

AhR zelltypspezifisch und hat, je nachdem welcher Ligand ihn aktiviert oder inaktiviert, unterschiedliche Auswirkungen. Ein anderer Punkt, der den AhR in Bezug auf die MS interessant macht, ist die Tatsache, dass der AhR bei verschiedensten Autoimmunerkrankungen einen Einfluss hat. Diese Autoimmunerkrankungen haben gemein, dass sie multifaktoriell entstehen können und meist ein Zusammenspiel von exogenen und endogenen Auslösern zu der Erkrankung führt oder den Krankheitsverlauf verschlechtert. Bei der rheumatoiden Arthritis weiß man, dass eine Aktivierung des AhR mit TCDD oder FICZ zum Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis, zur Schwere der Erkrankung, zur Knochenzerstörung, zur Differenzierung der Osteoklasten und zu einer erhöhten Anzahl IL17-exprimierender Zellen in den entzündeten Gelenken beiträgt (Fu et al. 2018) und somit die Schwere der Erkrankung beeinflussen kann. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass bei AhR-knockout-Mäusen eine verringerte Krankheitsschwere der rheumatoiden Arthritis beobachtet werden konnte, welche maßgeblich auf eine reduzierte Serumkonzentration der proinflammatorischen Zytokine Matrix-Metalloproteinase 3, IL-1 $\beta$  und IL-6 zurückzuführen war (Nakahama et al. 2011). Eine entgegengesetzte, krankheitshemmende Wirkung hat der AhR bei der Psoriasis, bei der viele Gene, die bei dieser Erkrankung dysreguliert sind, durch AhR-Antagonisten hochreguliert werden. In AhR-knockout-Mäusen konnte man diese Gene erhöht nachweisen (Di Meglio et al. 2014). Die These der entzündungshemmenden Wirkung des AhR wird bei der Psoriasis dadurch unterstützt, dass man die Psoriasis mit Tapinarof, einen AhR-Agonist, therapieren kann und dass dieses Medikament die Entzündung lindern kann (Bissonnette et al. 2020). Diese beiden Autoimmunerkrankungen zeigen beispielhaft auf, dass der AhR sowohl protektiv als auch krankheitsfördernd wirken kann. Die Erkenntnisse über die AhR-Funktion in diesen beiden Autoimmunerkrankungen werfen die Frage auf, wie der AhR andere Autoimmunerkrankungen, und im speziellen die MS, beeinflusst und an deren Pathogenese beteiligt ist. In meiner Arbeit konnte weder ein protektiver noch ein schädlicher Effekt des mikroglialen AhR auf die Entmarkung im Cuprizon-Modell aufgezeigt werden. Es sollte jedoch bedacht werden, dass das hier angewandte Cuprizonmodell nur einige pathologische Aspekte der MS nachbildet, es allerdings diese komplexe Erkrankung nicht komplett modellieren kann. Bislang ist noch kein Tiermodell bekannt, mit dem man die MS vollumfänglich reproduzieren kann.

## 4.8 Ausblick

Die hier durchgeführten Experimente haben keinen protektiven Nutzen des AhR bei der Cuprizin-induzierten toxischen Entmarkung gezeigt. Die CX3CR1-CreERT2/+ AhR<sup>fl/fl</sup>-Mäuse, bei denen die Mikroglia den AhR nicht exprimieren, haben eine ähnliche Entmarkung wie die Kontrollgruppe im CC gezeigt und auch die Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Oligodendrozytenvorläuferzellen haben sich im zeitlichen Verlauf des Experiments ähnlich verhalten. Die Forschung zur Funktion des AhR im ZNS hat bislang noch keinen klaren protektiven Einfluss auf die MS-Erkrankung gezeigt. Leider ist bisher im Vergleich zu den Funktionen des AhR in der Peripherie wenig über dessen Aufgaben im ZNS bekannt. Es sollten in Zukunft demnach weitere umfassende Studien anlaufen, um die Regulation des AhR und seine Rolle bei Entzündungen und demyelinisierenden Prozessen im ZNS besser zu verstehen und seine potentielle Funktion als Target für Medikamente auszuloten. Hierfür könnte man beispielsweise einen kompletten AhR-knockout in allen Zellen des ZNS hervorrufen und, wie in dieser Arbeit, mit Hilfe des Cuprizinmodells untersuchen, ob ein kompletter AhR-knockout im Gehirn einen Einfluss auf die Cuprizin-induzierte Entmarkung hat. Da während der Cuprizingabe die BHS intakt bleibt, wäre gewährleistet, die Funktion des AhR im ZNS zu beurteilen, ohne dass der Rezeptor in Interaktionen zu anderen peripheren Immunzellen und deren Zytokinen tritt. Zudem fokussieren durchgeführte Studien überwiegend auf Astrozyten und Mikroglia. Um neue Erkenntnisse über den AhR im ZNS zu erlangen, wäre es wichtig, den AhR auch auf andere Zelllinien, wie z. B. den Oligodendrozyten, zu untersuchen. Sobald die Funktionen des AhR auf unterschiedlichen Zelltypen definiert worden sind, lässt sich in der Zusammenschau hoffentlich erkennen, unter welchen Bedingungen bestimmte – günstige oder ungünstige - Reaktionen ausgelöst werden. Zudem wäre es hilfreich, ein Tiermodell zu entwickeln, das nicht nur einzelne Aspekte der MS reproduziert, sondern die Erkrankung insgesamt abbildet. In den hier präsentierten Experimenten wie auch in den aus der Literatur bekannten Ergebnissen anderer Forschungsgruppen wurden bislang keinerlei Hinweise auf einen zusätzlichen Schaden durch vermehrte AhR-Aktivierung bei ZNS-Entzündungen gezeigt. Dies lässt darauf hoffen, dass die protektive Funktion, die dem AhR in der Peripherie bereits zugesprochen wurde, in Zukunft auch für das ZNS erforscht wird und die Möglichkeit besteht, Patienten mit MS über Ansteuerung des AhR zu therapieren.

## 5 Zusammenfassung

Die multiple (MS) Sklerose ist eine erworbene, entzündliche und neurodegenerative, immunvermittelte Erkrankung des Zentralnervensystems, bei der es in erster Linie zu einem fokal betonten Myelinverlust kommt. Die detaillierte Ätiopathogenese der MS ist noch unbekannt, allerdings ist für ihre Entstehung ein Zusammenspiel von genetischen und Umweltfaktoren von zentraler Bedeutung.

Ein zentrales Bindeglied zwischen Umwelt und Immunsystem und Sensor für zahlreiche endogene und exogene Metabolite ist der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der nahezu ubiquitär im Organismus exprimiert wird. In meiner Arbeit habe ich untersucht, ob der mikrogliale AhR einen Einfluss auf die Demyelinisierung im Modell der Cuprizin-induzierten Entmarkung hat. Das Cuprizinmodell zeichnet sich, im Gegensatz zur häufig als Modell für die MS genutzten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) durch eine intakte Blut-Hirn-Schranke aus, sodass hier ein Einfluss von peripheren aktivierten Immunzellen ausgeschlossen ist. Die Experimente beinhalteten Mikroglia-spezifische AhR-knockout Mäuse und entsprechende Kontrollen. Nach Verfütterung von Cuprizin über drei bzw. sechs Wochen wurden Entmarkung, Mikrogliaaktivierung sowie verschiedene Oligodendrozytenpopulationen untersucht. Die erhobenen Daten ergaben keinen Hinweis auf eine wesentliche Rolle des mikroglialen AhR für die toxische Demyelinisierung im Cuprizinmodell.

Allerdings zeigte sich eine transiente, nur in Woche drei beobachtete, reduzierte Mikrogliaaktivierung in Mikroglia-spezifisch AhR-deletierten Mäusen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen daher nahe, dass dem von Mikrogliazellen exprimierten AhR bei der Pathogenese der Cuprizin-induzierten toxischen Entmarkung keine wesentliche protektive oder schädigende Rolle zukommt. Weitere Experimente sind erforderlich, um die Rolle des ZNS-intrinsisch exprimierten AhR bei entzündlichen und entmarkenden Erkrankungen zu klären.

## 6 Literaturverzeichnis

- Armstrong RC, Le TQ, Frost EE, Borke RC, Vana AC (2002): Absence of fibroblast growth factor 2 promotes oligodendroglial repopulation of demyelinated white matter. *J Neurosci* 22, 8574–8585
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP Y (2001): TNF $\alpha$  promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4, 1116–1122
- Arnett HA, Hellendall RP, Matsushima GK, Suzuki K, Laubach VE, Sherman P, Ting JP Y (2002): The protective role of nitric oxide in a neurotoxicant-induced demyelinating model. *J Immunol* 168, 427–433
- Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55, 458–468
- Bénardais K, Kotsiari A, Škuljec J, Koutsoudaki PN, Gudi V, Singh V, Vulinović F, Skripuletz T, Stangel M (2013): Cuprizone [bis (cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox Res* 24, 244–250
- Berg J, Mahmoudjanlou Y, Duscha A, Massa MG, Thöne J, Esser C, Gold R, Haghikia A (2016): The immunomodulatory effect of laquinimod in CNS autoimmunity is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *J Neuroimmunol* 298, 9–15
- Bissonnette R, Gold LS, Rubenstein DS, Tallman AM, Armstrong A (2020): Tapinarof in the treatment of psoriasis: A review of the unique mechanism of action of a novel therapeutic AhR modulating agent (TAMA). *J Am Acad Dermatol* 84, 1059-1067
- Blakemore WF (1972): Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol* 1, 413–426
- Böttcher C, Schlickeiser S, Sneebouer MA, Kunkel D, Knop A, Paza E, Fidzinski P, Kraus L, Snijders GJ, Kahn RS (2019): Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci* 22, 78–90
- Bsteh G, Berger T (2020): Therapie-update multiple sklerose//Update–Therapy of multiple sclerosis. *J Für Neurol Neurochir Psychiatr* 21, 61–71
- Cammer W (1999): The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurol Sci* 168, 116–120
- Chastain EM, d’Anne SD, Rodgers JM, Miller SD (2011): The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Basis Dis* 1812, 265–274

- Cignarella F, Filipello F, Bollman B, Cantoni C, Locca A, Mikesell R, Manis M, Ibrahim A, Deng L, Benitez BA et al. (2020): TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 140, 513–534
- Compston A, Coles A (2002): Multiple sclerosis. *The Lancet* 359, 1221–1231
- Cuartero MI, Ballesteros I, de la Parra J, Harkin AL, Abautret-Daly A, Sherwin E, Fernández-Salguero P, Corbí ÁL, Lizasoain I, Moro MA (2014): L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation* 130, 2040–2051
- del Rio-Hortega P: *Cytology & [and] Cellular Pathology of the Nervous System*. Hoeber 1932
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015): Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15, 545–558
- Dever DP, Adham ZO, Thompson B, Genestine M, Cherry J, Olschowka JA, DiCicco-Bloom E, Opanashuk LA (2016): Aryl hydrocarbon receptor deletion in cerebellar granule neuron precursors impairs neurogenesis. *Dev Neurobiol* 76, 533–550
- Díaz-Díaz CJ, Ronnekleiv-Kelly SM, Nukaya M, Geiger PG, Balbo S, Dator R, Megna BW, Carney PR, Bradfield CA, Kennedy GD (2016): The aryl hydrocarbon receptor is a repressor of inflammation-associated colorectal tumorigenesis in mouse. *Ann Surg* 264, 429–436
- Di Meglio P, Duarte JH, Ahlfors H, Owens NDL, Li Y, Villanova F, Tosi I, Hirota K, Nestle FO, Mrowietz U et al. (2014): Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity* 40, 989–1001
- Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB (2016): Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. *Front Cell Dev Biol* 4, 71
- Dua T, Rompani P, World Health Organization, Multiple Sclerosis International Federation (Hrsg.): *Atlas: multiple sclerosis resources in the world, 2008*. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2008
- Esser C, Rannug A (2015): The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev* 67, 259–279
- Esser C, Rannug A, Stockinger B (2009): The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* 30, 447–454

- Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, Barkhof F, Ciccarelli O, De Stefano N, Geurts JJG, Paul F, Reich DS, Toosy AT et al. (2019): Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain* 142, 1858–1875
- Flachenecker P, Eichstädt K, Berger K, Ellenberger D, Friede T, Haas J, Kleinschnitz C, Pöhlau D, Rienhoff O, Stahmann A, Zettl UK (2020): Multiple Sklerose in Deutschland: aktualisierte Auswertungen des MS-Registers der DMSG 2014–2018. *Fortschritte Neurol · Psychiatr* 88, 436–450
- Franklin RJM (2002): Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705–714
- Fu J, Nogueira SV, van Drongelen V, Coit P, Ling S, Rosloniec EF, Sawalha AH, Holoshitz J (2018): Shared epitope–aryl hydrocarbon receptor crosstalk underlies the mechanism of gene–environment interaction in autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 4755–4760
- Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E (2017): Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J Yakhteh* 19, 1–10
- Gold R, Wiendl H, Hemmer B, für die Leitliniengruppe MS und das Krankheitsbezogene Kompetenznetz Multiple Sklerose (2014): DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. *Aktuelle Neurol* 41, 326–327
- Goldberg J, Daniel M, van Heuvel Y, Victor M, Beyer C, Clarner T, Kipp M (2013): Short-term cuprizone feeding induces selective amino acid deprivation with concomitant activation of an integrated stress response in oligodendrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 33, 1087–1098
- Gudi V, Moharreggh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki PN, Kotsiari A, Skuljec J, Trebst C, Stangel M (2009): Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res* 1283, 127–138
- Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ (2018): Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48, 19–33
- Haas K, Weighardt H, Deenen R, Köhrer K, Clausen B, Zahner S, Boukamp P, Bloch W, Krutmann J, Esser C (2016): Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity. *J Invest Dermatol* 136, 2260–2269
- Hagemeyer N, Hanft K-M, Akriditou M-A, Unger N, Park ES, Stanley ER, Staszewski O, Dimou L, Prinz M (2017): Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol (Berl)* 134, 441–458

- Haindl MT, Köck U, Zeitelhofer-Adzemovic M, Fazekas F, Hochmeister S (2019): The formation of a glial scar does not prohibit remyelination in an animal model of multiple sclerosis. *Glia* 67, 467–481
- Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, Walker AJ, Gergits F, Segel M, Nemesh J (2019): Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes. *Immunity* 50, 253-271. e6
- Hawkes C, Macgregor A (2009): Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult Scler J* 15, 661–667
- Heß K, Starost L, Kieran NW, Thomas C, Vincenten MCJ, Antel J, Martino G, Huitinga I, Healy L, Kuhlmann T (2020): Lesion stage-dependent causes for impaired remyelination in MS. *Acta Neuropathol (Berl)* 140, 359–375
- Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting J-Y, Suzuki K, Matsushima GK (1998a): Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 92, 38–49
- Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting J-Y, Suzuki K, Matsushima GK (1998b): Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 92, 38–49
- Ho C-Y, Lin Y-T, Chen H-H, Ho W-Y, Sun G-C, Hsiao M, Lu P-J, Cheng P-W, Tseng C-J (2020): CX3CR1-microglia mediates neuroinflammation and blood pressure regulation in the nucleus tractus solitarii of fructose-induced hypertensive rats. *J Neuroinflammation* 17, 185
- Höftberger R, Fink S, Aboul-Enein F, Botond G, Olah J, Berki T, Ovadi J, Lassmann H, Budka H, Kovacs GG (2010): Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis. *Glia* 58, 1847–1857
- Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP (2005): Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81, 363–373
- Juricek L, Carcaud J, Pelhaitre A, Riday TT, Chevallier A, Lanzini J, Auzeil N, Laprèvote O, Dumont F, Jacques S, et al. (2017): AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. *Sci Rep* 7, Article number: 9794
- Jux B, Kadow S, Esser C (2009): Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Immunol* 182, 6709–6717

- Kadowaki A, Miyake S, Saga R, Chiba A, Mochizuki H, Yamamura T (2016): Gut environment-induced intraepithelial autoreactive CD4 + T cells suppress central nervous system autoimmunity via LAG-3. *Nat Commun* 7, 11639
- Kang S, Shaikh AG (2017): Acquired pendular nystagmus. *J Neurol Sci* 375, 8–17
- Kerley-Hamilton JS, Trask HW, Ridley CJA, DuFour E, Lesseur C, Ringelberg CS, Moodie KL, Shipman SL, Korc M, Gui J, et al. (2012): Inherent and benzo[a]pyrene-induced differential aryl hydrocarbon receptor signaling greatly affects life span, atherosclerosis, cardiac gene expression, and body and heart growth in mice. *Toxicol Sci* 126, 391–404
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009): The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol (Berl)* 118, 723–736
- Komoly S, Jeyasingham MD, Pratt OE, Lantos PL (1987): Decrease in oligodendrocyte carbonic anhydrase activity preceding myelin degeneration in cuprizone induced demyelination. *J Neurol Sci* 79, 141–148
- Kondo A, Nakano T, Suzuki K (1987): Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice. *Brain Res* 425, 186–190
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA (2011): IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12, 231–238
- Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H (2017): An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol (Berl)* 133, 13–24
- Lahvis GP, Pyzalski RW, Glover E, Pitot HC, McElwee MK, Bradfield CA (2005): The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. *Mol Pharmacol* 67, 714–720
- Lampron A, Laroche A, Laflamme N, Préfontaine P, Plante M-M, Sánchez MG, Yong VW, Stys PK, Tremblay M-È, Rivest S (2015): Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med* 212, 481–495
- Lassmann H (2018): Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8
- Latchney SE, Liroy DT, Henry EC, Gasiewicz TA, Strathmann FG, Mayer-Pröschel M, Opanashuk LA (2011): Neural precursor cell proliferation is disrupted through activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Stem Cells Dev* 20, 313–326
- Lee JY, Chitnis T: Pediatric multiple sclerosis. In: *Seminars in neurology*. Band 36; Thieme Medical Publishers 2016, 148–153

- Lee Y-H, Lin C-H, Hsu P-C, Sun Y-Y, Huang Y-J, Zhuo J-H, Wang C-Y, Gan Y-L, Hung C-C, Kuan C-Y, Shie F-S (2015): Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia. *Glia* 63, 1138–1154
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717
- Ludwin SK (1980): Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. An analysis of contributing factors. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 43, 382–387
- Lunde HMB, Assmus J, Myhr K-M, Bø L, Grytten N (2017): Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 621–625
- Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Yuejuan, Liu X, Zou D, Wu Yuan (2017): The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 1661–1667
- Lutton JD, Winston R, Rodman TC (2004): Multiple Sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med* 229, 12–20
- Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, Bien CG, Bauer J, Lassmann H (2018): The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and B cells. *Brain* 141, 2066–2082
- Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman JE, Matsushima GK (2004): Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol* 164, 1673–1682
- Masuda T, Prinz M (2016): Microglia: A unique versatile cell in the central nervous system. *ACS Chem Neurosci* 7, 428–434
- Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Scheiwe C, Nessler S, Kunz P, van Loo G, Coenen VA (2019): Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392
- Matsushima GK, Morell P (2001a): The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11, 107–116
- Matsushima GK, Morell P (2001b): The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11, 107–116

- McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA (2010): Mammalian per-arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* 72, 625–645
- McMahon EJ, Cook DN, Suzuki K, Matsushima GK (2001): Absence of macrophage-inflammatory protein-1 $\alpha$  delays central nervous system demyelination in the presence of an intact blood-brain barrier. *J Immunol* 167, 2964–2971
- Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJM, French-Constant C (2013): M2 microglia/macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16, 1211–1218
- Montgomery S, Hiyoshi A, Burkill S, Alfredsson L, Bahmanyar S, Olsson T (2017): Concussion in adolescence and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 82, 554–561
- Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK (1998): Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci* 12, 220–227
- Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Chinen I, Hanieh H, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T (2011): Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14222–14227
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318
- Patsopoulos NA, Baranzini SE, Santaniello A, Shoostari P, Cotsapas C (2019): Multiple Sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells & microglia in susceptibility. *Science* 365
- Perdiguer EG, Schulz C, Geissmann F (2013): Development and homeostasis of “resident” myeloid cells: The case of the microglia. *Glia* 61, 112–120
- Pernomian L, da Silva CH (2015): Current basis for discovery and development of aryl hydrocarbon receptor antagonists for experimental and therapeutic use in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 764, 118–123
- Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN (2007): CNS-Derived Interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci* 27, 10714–10721
- Priller J, Prinz M (2019): Targeting microglia in brain disorders. *Science* 365, 32–33
- Prinz M, Jung S, Priller J (2019): Microglia Biology: one century of evolving concepts. *Cell* 179, 292–311

- Quintana FJ (2013): The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response. *Immunology* 138, 183–189
- Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL (2008): Control of T reg and TH 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71
- Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018): Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378(2), 169–180
- Rothhammer V, Quintana FJ (2019): The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* 19, 184–197
- Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, Chao C-C, Patel B, Yan R, Blain M, et al. (2016): Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* 22, 586–597
- Rothhammer V, Borucki DM, Garcia Sanchez MI, Mazzola MA, Hemond CC, Regev K, Paul A, Kivisäkk P, Bakshi R, Izquierdo G, et al. (2017): Dynamic regulation of serum aryl hydrocarbon receptor agonists in MS. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation* 4, 359
- Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao C-C, Ardura-Fabregat A, de Lima KA, Gutiérrez-Vázquez C, Hewson P, Staszewski O, et al. (2018): Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557, 724–728
- Ruiz F, Vigne S, Pot C (2019): Resolution of inflammation during multiple sclerosis. *Semin Immunopathol* 41, 711–726
- Sadovnick AD, Ebers GC (1993): Epidemiology of multiple sclerosis: A Critical Overview. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* 20, 17–29
- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214
- Schwartz M, Jung S (2012): Non-identical twins—microglia and monocyte-derived macrophages in acute injury and autoimmune inflammation. *Front Immunol* 3, 89
- Shackelford G, Sampathkumar NK, Hichor M, Weill L, Meffre D, Juricek L, Laurendeau I, Chevallier A, Ortonne N, Larousserie F, et al. (2018): Involvement of aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1319–E1328

- Shemer A, Erny D, Jung S, Prinz M (2015): Microglia plasticity during health and disease: an immunological perspective. *Trends Immunol* 36, 614–624
- Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H (2013): Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 7, 6
- Skipuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, Pul R, Voss E, Berger K, Kipp M, Baumgärtner W, Stangel M (2013): Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain* 136, 147–167
- Sosa RA, Murphey C, Ji N, Cardona AE, Forsthuber TG (2013): The kinetics of myelin antigen uptake by myeloid cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 191, 5848–5857
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration — Recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1812, 275–282
- Stidworthy MF, Genoud S, Suter U, Mantei N, Franklin RJ (2003): Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone-induced demyelination. *Brain Pathol* 13, 329–339
- Stockinger B, Hirota K, Duarte J, Veldhoen M: External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. In: *Seminars in immunology*. Band 23; Elsevier 2011, 99–105
- Stockinger B, Meglio PD, Gialitakis M, Duarte JH (2014): The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol* 32, 403–432
- Tremlett H, Yinshan Zhao, Devonshire V (2008): Natural history of secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler J* 14, 314–324
- van Rossum D, Hanisch U-K (2004): Microglia. *Metab Brain Dis* 19, 393–411
- Vega-Riquer JM, Mendez-Victoriano G, Morales-Luckie RA, Gonzalez-Perez O (2019): Five decades of cuprizone, an updated model to replicate demyelinating diseases. *Curr Neuropharmacol* 17, 129–141
- Voet S, Prinz M, van Loo G (2019): Microglia in central nervous system inflammation and multiple sclerosis pathology. *Trends Mol Med* 25, 112–123
- Voss E, Skuljec J, Gudi V, Skipuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M (2012): Characterisation of microglia during de- and remyelination: Can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis* 45, 519–528
- Watts C (1997): Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15, 821–850

- Weissert R (2013): The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 857–866
- Westland KW, Pollard JD, Sander S, Bonner JG, Linington C, McLeod JG (1999): Activated non-neural specific T cells open the blood–brain barrier to circulating antibodies. *Brain* 122, 1283–1291
- Wheeler MA, Rothhammer V, Quintana FJ (2017): Control of immune-mediated pathology via the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 292, 12383–12389
- Williamson MA, Gasiewicz TA, Opanashuk LA (2005): Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci* 83, 340–348
- Yu M, Wang Q, Ma Y, Li L, Yu K, Zhang Z, Chen G, Li X, Xiao W, Xu P (2018): Aryl hydrocarbon receptor activation modulates intestinal epithelial barrier function by maintaining tight junction integrity. *Int J Biol Sci* 14, 69
- Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, et al. (2013): Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS ONE* 8
- Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H (2017): Loss of ‘homeostatic’ microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain* 140, 1900–1913

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit der Promotion in ihrer Abteilung.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Susanne Schmid bedanken, die die Mausexperimente durchgeführt hat und mir viele Anregungen gegeben hat. Ohne ihre Unterstützung und Bereitschaft Fragen zu beantworten, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts für Neuropathologie für ihr Mithilfe bei den Färbungen bedanken.