

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

**Modulation der T-Zell-Infiltration und  
der Aktivierung von  
Makrophagen/Mikroglia bei der EAE  
durch zellspezifische Deletion des  
Arylkohlenwasserstoffrezeptors (AhR)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
[für Zahnmedizin]  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mogadassa Aber

aus

Kabul, Afghanistan

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer\*in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

### **Prüfungskommission**

Referent\*in: Prof. Dr. C. Stadelmann-Nessler

Ko-Referent\*in: Prof. Dr. F. Odoardi

Drittreferent\*in: Prof. Dr. P. Kauffmann

Datum der mündlichen Prüfung: 28. August 2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Modulation der T-Zell-Infiltration und der Aktivierung von Makrophagen/ Mikroglia bei der EAE durch zellspezifische Deletion des Arylkohlenwasserstoffrezeptors (AhR)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 18. 08. 2024

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose .....	1
1.2 Epidemiologie.....	1
1.3 Ätiologie.....	2
1.3.1 Genetische Prädisposition .....	3
1.3.2 Geographische Verteilung.....	3
1.3.3 Geschlecht .....	4
1.3.4 Ernährung.....	4
1.3.5 Viruserkrankungen.....	4
1.3.6 Weitere Faktoren.....	5
1.4 Klinik.....	6
1.4.1 Stadien.....	6
1.4.2 Symptome.....	7
1.4.3 Diagnostik.....	8
1.4.4 MS Therapieansätze .....	9
1.4.4.1 Schubtherapie .....	10
1.4.4.2 Immunmodulatorische Therapie .....	11
1.4.4.3 Immunsuppressive Therapie .....	12
1.5 Pathophysiologie .....	12
1.5.1 T-Zellen .....	13
1.5.1.1 T-Helferzellen.....	15
1.5.1.2 Zytotoxischen T-Zellen.....	16
1.5.1.3 Regulatorischen T-Zellen.....	16
1.5.1.4 T-Gedächtniszellen.....	17
1.5.1.5 NK-Zellen .....	17
1.5.2 Weitere Immunzellen.....	19
1.5.2.1 Makrophagen/Mikroglia, Monozyten.....	19
1.5.2.2 B-Zellen .....	20
1.5.2.3 Dendritischen Zellen .....	22
1.5.2.4 Astrozyten .....	23
1.6 Histopathologie der multiplen Sklerose.....	23
1.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	24
1.7.1 Histopathologie und Immunpathologie der EAE .....	26
1.7.2 Vergleich der MS und EAE.....	28
1.8 Der Arylkohlenwasserstoffrezeptor .....	29
1.8.1 Funktion.....	29
1.8.2 Liganden .....	30

---

1.8.3	Die Darm-Gehirn-Achse .....	31
1.8.4	AhR und EAE .....	32
1.8.5	AHR und Multiple Sklerose.....	33
1.9	Fragestellung .....	34
2	Material und Methoden .....	35
2.1	Materialien .....	35
2.1.1	Chemikalien und Substanzen .....	35
2.1.2	Antikörper .....	36
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Transgene Mäuse.....	36
2.2.2	Immunisierung und EAE Induktion.....	37
2.2.3	Scoring der klinischen EAE Symptome .....	37
2.2.4	Gewebeasservation.....	37
2.2.5	Histologische Färbung.....	38
2.2.6	Immunhistochemische Färbung .....	38
2.2.6.1	Indirekte Methode.....	39
2.2.6.2	Direkte Methode .....	39
2.2.6.3	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB).....	39
2.2.7	Auswertung und Statistik .....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Klinischer Schweregrad der EAE.....	42
3.2	Histologische Untersuchung .....	42
3.3	Zellspezifische Deletion des AhR in CD4+ T-Zellen.....	43
3.3.1	Läsionsgröße .....	43
3.3.2	T-Zellinfiltrat.....	44
3.3.3	Makrophageninfiltration/MikrogliaaktivierungAuswertung und Statistik .....	45
3.4	Zellspezifische Deletion des AhR in FoxP3+ regulatorischen T-Zellen .....	46
3.4.1	Läsionsgröße .....	46
3.4.2	T-Zellinfiltrat.....	47
3.4.3	Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung.....	47
3.5	Zellspezifische Deletion des AhR in CD11c+ dendritischen Zellen.....	48
3.5.1	Läsionsgröße .....	48
3.5.2	T-Zellinfiltrat.....	49
3.5.3	Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung .....	50
3.6	Zellspezifische Deletion des AhR in GFAP+ Astrozyten .....	50
3.6.1	Läsionsgröße .....	50
3.6.2	T-Zellinfiltrat.....	51
3.6.3	Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung.....	52
4	Diskussion .....	54
5	Literaturverzeichnis .....	58

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Graphische Darstellung der sekundär und primär chronisch-progredienten Verlaufsform der MS.....	7
<b>Abbildung 2:</b> Bildliche Darstellung der T-Zell Aktivierung. ....	15
<b>Abbildung 3:</b> Wirkungsmechanismus unterschiedlicher Lymphozyten, die sich durch Antigenerkennung zu Effektorzellen differenzieren .....	18
<b>Abbildung 4:</b> Interaktion zwischen T-Helferzelle und B-Zelle.....	21
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der EAE-Pathogenese .....	28
<b>Abbildung 6:</b> Der AhR-Signalweg in schematischer Darstellung.....	30
<b>Abbildung 7:</b> Die Darm-Gehirn-Achse und dessen Wechselwirkungen.....	32
<b>Abbildung 8:</b> Finale EAE Scores .....	42
<b>Abbildung 9:</b> Ausmaß der Entmarkung der weißen Substanz (LFB-PAS) in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD4</sup> -Mäusen. ....	44
<b>Abbildung 10:</b> Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD4</sup> -Mäusen. ....	44
<b>Abbildung 11:</b> MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD4</sup> -Mäusen .....	45
<b>Abbildung 12:</b> Ausmaß der demyelinisierten Läsionen mittels LFB-PAS in Kontroll-vs. AhR <sup>ΔFoxP3</sup> -Mäusen .....	46
<b>Abbildung 13:</b> Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD4</sup> -Mäusen .....	47
<b>Abbildung 14:</b> MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔFoxP3</sup> -Mäusen .....	48
<b>Abbildung 15:</b> Ausmaß der demyelinisierten Läsionen mittels LFB-PAS in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD11c</sup> -Mäusen.....	49
<b>Abbildung 16:</b> Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD11c</sup> -Mäusen.....	49
<b>Abbildung 17:</b> MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔCD11c</sup> -Mäusen .....	50
<b>Abbildung 18:</b> Ausmaß der demyelinisierten Läsionen mittels LFB-PAS in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔGFAP+</sup> -Mäusen .....	51
<b>Abbildung 19:</b> Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔGFAP</sup> -Mäusen .....	52
<b>Abbildung 20:</b> MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR <sup>ΔGFAP</sup> -Mäusen .....	52

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Überarbeitete McDonald-Kriterien von 2017.....	8
<b>Tabelle 2:</b> Aktuelle Empfehlung zur Stufentherapie der MS.....	10
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Chemikalien für histologische und immunhistochemische Färbungen .....	35
<b>Tabelle 4:</b> Liste der verwendeten Primär-und Sekundärantikörper .....	36
<b>Tabelle 5:</b> Bezeichnung der verwendeten Knock-out-Linien .....	37
<b>Tabelle 6:</b> Scoring der klinischen EAE Symptome .....	37

## Abkürzungsverzeichnis

aEAE	Aktiv-induzierte EAE
AhR	Arylkohlenwasserstoffrezeptor ( <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> )
AhR <sup>fl/fl</sup>	Mäuse mit gefloxtem AhR-Gen ohne Cre Rekombinase (Kontrollgruppe)
AhR <sup>ΔCD11c</sup>	Mäuse mit zellspezifischer Deletion des AhR in dendritischen Zellen
AhR <sup>ΔCD4</sup>	Mäuse mit zellspezifischer Deletion des AhR in T-Zellen
AhR <sup>ΔFoxP3</sup>	Mäuse mit zellspezifischer Deletion des AhR in regulatorischen T-Zellen
AhR <sup>ΔGFAP</sup>	Mäuse mit zellspezifischer Deletion des AhR in Astrozyten
AIP	AhR-wechselwirkendes Protein ( <i>AhR interacting protein</i> )
APC/APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ARNT	<i>AhR nuclear translocator</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CIS	<i>Clinically Isolated Syndrome</i>
DAB	3-3'-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid
DIM	Diindolylmethan
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FICZ	<i>6-Formylindolo-[3,2b]-Carbazole</i>
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
I3C	Indol-3-Carbinol
IDO1	Indolamin 2, 3-Dioxygenase 1
IFN-β	Interferon-β
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL-12	Interleukin-12
ITE	Indolylcarboxythiazolcarbonsäuremethylester
LFB	<i>Luxol-Fast-Blue</i>
LFB/PAS	<i>Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSAB	<i>Labelled</i> (Strept-) Avidin-Biotin-Methode
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
mDC	Myeloide dendritische Zellen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
MPS	Mononukleär-phagozytäres System

---

MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSSS	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PEAE	Passiv übertragene EAE
PLP	Proteolipid Protein
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PP-MS	<i>Primary Progressive MS</i>
PTX	<i>Pertussis-Toxin</i>
RR-MS	<i>Relapsing-Remitting MS</i>
SEAE	Spontane EAE
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SP-MS	<i>Secondary Progressive MS</i>
TCDD	Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>c</sub> -Zellen	Zytotoxische T-Zellen
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub> -Zellen	Regulatorische T-Zellen
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VES	Visuell evozierte Signale
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine unheilbare demyelinisierende Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Ätiologie und Pathogenese sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die Krankheit durch Autoimmunprozesse verursacht wird, die eine Immunantwort gegen Komponenten des ZNS richten (Noseworthy 1999; Keegan und Noseworthy 2002). Um ein besseres Verständnis der komplexen Vorgänge im Körper von MS Patienten zu erlangen und so die Entwicklung von Therapien voranzutreiben, werden in der Forschung häufig Studien an Tiermodellen durchgeführt, so auch in der hier vorliegenden Arbeit.

## 1.1 Multiple Sklerose

Bei der MS handelt es sich um eine unheilbare chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS. Auch als *Encephalomyelitis disseminata* bezeichnet, gilt sie als die häufigste neurologische Erkrankung bei jungen Erwachsenen in Industrieländern und verursacht nach Angaben der Gesundheitssysteme europaweit jährliche Kosten von bis zu 15 Milliarden Euro. Ihr zu Grunde liegen autoimmune Krankheitsprozesse, die häufig im frühen Erwachsenenalter entstehen. Die Ursachen sind bisher noch nicht vollständig geklärt, jedoch lassen Studien eine Abhängigkeit von diversen Umweltfaktoren sowie der Ethnie vermuten (Gustavsson et al. 2011). Die MS zeigt bei Betroffenen schwere neurologische Behinderungen und Ausfälle (Lassmann et al. 2001), die sich teilweise vollständig zurückbilden oder persistieren können. Aktuelle Therapieansätze und -strategien beruhen auf Symptomkontrolle und Schubprävention. Eine kausale Therapie ist derzeit noch nicht bekannt.

## 1.2 Epidemiologie

Die MS ist die häufigste entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS und betrifft etwa 2,8 Millionen Menschen weltweit (*Multiple Sclerosis International Federation* 2020). Mit einer Geschlechterverteilung der Krankheit in einem Verhältnis von 2,3:1 zwischen Frauen und Männern sind annähernd zwei Drittel Frauen betroffen (Alonso und Hernán 2008). Epidemiologischen Studien zufolge zeigt die MS nicht nur in Bezug auf Inzidenz und Prävalenz eine ausgeprägte Variabilität, sondern auch deutliche Diskrepanzen hinsichtlich geographischer und ethnischer Verteilung. So ist bei der Krankheitsprävalenz vom Äquator ausgehend ein Gefälle zuerkennen. Es zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle auf der Nordhalbkugel und ein

Süd-Nord-Gefälle auf der Südhalbkugel (Hogancamp et al. 1997). Während die niedrigste Prävalenz in Asien, Afrika und dem Mittleren Osten beobachtet wird, ist sie in West-Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland am höchsten (Poser 1994; Koch-Henriksen und Sørensen 2010). Aktuell sind in Europa schätzungsweise mehr als eine Millionen Menschen von einer MS betroffen, das heißt die Zahl der MS Erkrankten ist seit 2017 um mehr als 35% gestiegen. Davon betroffen sind alleine in Deutschland schätzungsweise 252.000 Menschen, die ihre Diagnose im Schnitt zwischen dem 20. und 40. Lebensalter erhalten (Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband e.V. 2022). Dabei ist die Zahl der neuen MS-Diagnosen pro Jahr im Westen mit 19 zu 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner etwa ein Viertel höher als im Osten (Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband e.V. 2020). Die Wahrscheinlichkeit an einer MS zu erkranken, scheint auch von der Ethnie abhängig zu sein. So konnten Studien zeigen, dass Kaukasier circa zehn Mal häufiger erkranken als Nicht-Kaukasier, ebenso zeigen Skandinavier eine besonders hohe Anfälligkeit, an MS zu erkranken (Page et al. 1993). In den Vereinigten Staaten wurde lange angenommen, dass Afroamerikaner ein geringeres Risiko hätten, an einer MS zu erkranken als Europäer. Eine Studie in Kalifornien ergab jedoch, dass Afroamerikaner die höchste MS-Inzidenz aller amerikanischen Rassen zeigen, im Gegensatz zu Asiaten und Hispanics mit den niedrigsten Raten (Langer-Gould et al. 2013). Interessanterweise gibt es auch Studien, die zeigen, dass erwachsene Migranten, die aus Ländern mit niedriger Prävalenz in Länder mit hoher Prävalenz ziehen, weiterhin einem geringen Risiko ausgesetzt sind. Dagegen nehmen Menschen, die zum Zeitpunkt der Einwanderung jünger sind als 15 Jahre alt, die Erkrankungswahrscheinlichkeit ihres neuen Aufenthaltsortes an (Marrie 2004).

### 1.3 Ätiologie

Das erste Mal beschrieben wurde die MS 1868 von Jean-Martin Charcot. Seither werden Ätiologie und Pathophysiologie eingehend untersucht, um mögliche Therapien zu entwickeln (Da Mota Gomes et al. 2013). Trotzdem sind die genauen Ursachen der Erkrankung bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig geklärt. Beschrieben wird sie als eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, bei der einige der folgenden Faktoren eine Rolle spielen und zu einer Fehlreaktion des Immunsystems führen.

### 1.3.1 Genetische Prädisposition

Die erhöhte Inzidenz der MS in Familien weist auf eine genetische Veranlagung hin. Verwandte ersten Grades von MS Erkrankten haben ein Risiko von 3-5% die Krankheit zu entwickeln, und somit ein 30- 50-fach höheres Erkrankungsrisiko, vergleichsweise zu einem Risiko von 0,1% in der Normalbevölkerung (Sadovnick und Baird 1988). Verschiedene Zwillingsstudien zeigten, dass eineiige Zwillinge von MS Patienten mit einer Wahrscheinlichkeit von 21-40% ebenfalls an MS erkranken, während dieser Wert bei zweieiigen Zwillingen bei nur 0-4,7% liegt. Genen des humanen Leukozytenantigen-Systems (Link et al. 2012) und Proteinen der MHC-Familie wird ein großer Einfluss auf die MS-Anfälligkeit zugeschrieben. Darüber hinaus wurden über 100 weitere Gene identifiziert, die das MS-Risiko beeinflussen können (Beecham et al. 2013).

### 1.3.2 Geographische Verteilung

Wie eingangs erwähnt, zeigen epidemiologische Studien, dass die Wahrscheinlichkeit an einer MS zu erkranken mit zunehmender Entfernung vom Äquator steigt. Hier wird ein Zusammenhang mit der Sonneneinstrahlung und der davon abhängigen Menge an UVB-Strahlung vermutet. Länder mit hoher Sonneneinstrahlung, wie Afrika und Asien, zeigen im Vergleich zu weiter nördlich und südlich gelegenen Gebieten ein geringeres MS-Risiko (Makhani et al. 2014; Sun et al. 2017; Rojas et al. 2018). Die UVB-Strahlung ist für die körpereigene Synthese von Vitamin D in der Haut essentiell, wodurch Menschen, die näher am Äquator leben, höhere Vitamin D-Spiegel aufweisen (Solomon und Whitham 2010). In den meisten Zellen des menschlichen Körpers wird der Vitamin D-Rezeptor (VDR) exprimiert. Dessen Aktivierung hat einen protektiven Effekt in Bezug auf Autoimmunerkrankungen (Pandit et al. 2013; Pierrot-Deseilligny et al. 2013; Alharbi et al. 2015; Christakos et al. 2016). Einige weitere Studien haben gezeigt, dass die Ergänzung einer normalen Ernährung mit mehr als  $\geq 400$  IU/d Vitamin D die Wahrscheinlichkeit, an einer MS zu erkranken, um 40% senkt (Munger et al. 2004). Der aktuelle Forschungsstand ist noch nicht hinreichend geklärt, um eine definitive Behandlung im Sinne einer Primärprävention zu empfehlen. Dennoch wird MS Patienten empfohlen, einen nachgewiesenen Vitamin D-Mangel auszugleichen (Solomon und Whitham 2010).

### 1.3.3 Geschlecht

Ähnlich wie bei andere Autoimmunerkrankungen zeigt die MS bei Frauen ein deutlich höheres Vorkommen als bei Männern (Whitacre 2001). Als Ursache dafür das Frauen ein 2–3-mal höheres Risiko haben als Männer (Alonso und Hernán 2008) an einer MS zu erkranken, wird der unterschiedliche Hormonhaushalt, geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression und die Ernährung diskutiert (Dörr et al. 2013; Compston und Coles 2008). So beeinflusst beispielsweise das weibliche Östrogen das Immunsystem, indem es eine Th1-dominante Immunantwort auf immunogene Stimuli hervorruft (Whitacre 2001). Bei einer Schwangerschaft, insbesondere im dritten Trimenon, treten Schübe in signifikant reduzierter Häufigkeit auf, während das Risiko für Krankheitsschübe in den ersten sechs Monaten nach der Geburt erhöht ist (Damek und Shuster 1997). Dies kann daran liegen, dass das Immunsystem während der Schwangerschaft gegen eine Th2-Antwort reagiert. (Whitacre 2001).

### 1.3.4 Ernährung

In Laborversuchen stellten Wissenschaftler einen zunehmenden Zusammenhang zwischen der Ernährung, der Darmflora und MS Erkrankungen fest. Scheinbar können Ernährungsgewohnheiten die MS beeinflussen, insbesondere ein hoher Konsum an Fett (Swank et al. 1990; Harbo et al. 2013), Salz (Farez et al. 2015; McDonald et al. 2016) und vielen Ballaststoffen (Lauer et al. 1997; Riccio et al. 2015; Wilck et al. 2017). Eine große Längsschnittstudie aus dem Jahr 2012 ergab, dass die Mittelmeerdiet Läsionen in der weißen Substanz verhindern kann, indem kleine Gefäße im Gehirn geschützt werden (Mische et al. 2018). Diese Art der Ernährung ist mit einem verringerten MS-Risiko verbunden, da sie eine hohe Zufuhr an Obst, Gemüse, Fisch, Vollkornprodukten, Hülsenfrüchten und Nüssen beinhaltet (Gardener et al. 2012; Berer et al. 2012; Hubbard et al. 2017). Neben dem Ernährungsstatus sind Fettleibigkeit (Hedström et al. 2014; Sedaghat et al. 2016; Guerrero-García et al. 2016) und Mangelernährung (Langer-Gould et al. 2013) ebenfalls mit der MS in Verbindung gebracht worden.

### 1.3.5 Viruserkrankungen

In Verbindung mit der MS sind eine Reihe von Infektionen, die ätiologisch wichtige Umweltfaktoren sind, zu nennen (Gilden 2005; Giovannoni et al. 2006). Bei mehr als 90% der MS-Patienten weisen Immunglobuline im *Liquor cerebrospinalis* auf eine Infektion hin (Gilden 2005). Zahlreiche Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen Viren (wie zum Beispiel das Epstein-Barr-Virus, humane Herpesvirus, TorqueTeno-Virus, sowie Retroviren) und MS

(Koprowski et al. 1985; Greenberg et al. 1989; Perron et al. 1989; 1991; Rozenberg et al. 1991; Hackett et al. 1996; Rasmussen et al. 1997; Ascherio und Munch 2000; Cermelli et al. 2003; Mancuso et al. 2013). Dennoch konnte bis heute nicht bewiesen werden, dass ein Virus als MS-Auslöser in Frage kommt. Derzeit werden auch über Erreger von Atemwegserkrankungen, wie das intrazelluläre Bakterium *Chlamydia pneumoniae*, als mögliche MS-Pathogene debattiert (Sriram et al. 1998; 1999; Yao et al. 2001; Sotgiu et al. 2001; Derfuss et al. 2001; Roulis et al. 2013). Es gab sogar kurze, aber hitzige Diskussionen über die sexuelle Übertragbarkeit der Erkrankung, ohne schlüssige Beweise hierfür zu finden (Hawkes 2002; Stewart 2002; O'Donovan 2003; Lidegaard und Svendsen 2008). Die Zunahme der Zahl chronisch entzündlicher Autoimmunerkrankungen sei einer Hygienehypothese zufolge das Ergebnis von Immunregulationsstörungen, die auf erhöhte Hygienestandards und die damit verbundene Eliminierung von Organismen zurückzuführen, die sich mit dem menschliche Immunsystem koevolutionär entwickeln (Rook 2012). Dies wird als Erklärung für die höhere MS-Prävalenz in Regionen mit besserem Hygienestandard herangezogen. Außerdem konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine frühe Konfrontation von Kindern mit Krankheitserregern durch beispielsweise Geschwister im Säuglings- und Kleinkindalter, der frühzeitige Kindergartenbesuch oder das städtische Leben das Krankheitsrisiko in Ländern mit hohen Hygienestandard verringert (Leibowitz et al. 1966; Stefano et al. 2003; Ponsonby 2005; Conradi et al. 2011; Hughes et al. 2013).

### 1.3.6 Weitere Faktoren

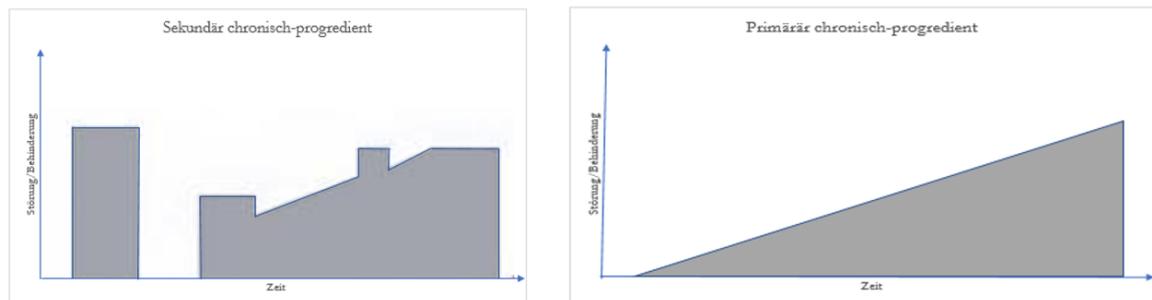
Weiterhin diskutiert werden Erkrankungen, wie die Dyslipidämie oder Hypertonie (Payne 2001; Weinstock-Guttman et al. 2011), sowie Umweltfaktoren wie das Zigarettenrauchen, das durch immunmodulatorische und/oder neurotoxische Wirkungen mit einem höheren MS-Risiko verbunden ist (Hernán et al. 2001; Riise et al. 2003; Handel et al. 2011; O'Gorman et al. 2012; Hedström et al. 2013; Salzer et al. 2013). Studien zufolge erkranken Raucher 1,5-mal häufiger an MS als Nichtraucher (Hubbard et al. 2018). Auch der Alkoholkonsum wird als Risikofaktor debattiert (Hawkes 2005; Massa et al. 2013; Hedström et al. 2014). All diese Erkenntnisse deuten bei der MS Erkrankung insgesamt auf eine polygenetische Erkrankung hin, bei der bestimmte Umweltfaktoren für den Krankheitsausbruch oder -progress eine Rolle spielen (Giovannoni et al. 2006; Kurtzke 2013).

## 1.4 Klinik

### 1.4.1 Stadien

Die heterogenen Erscheinungsformen der MS erfordern aufgrund der verschiedenen klinischen Verläufe eine Kategorisierung, da sie sich in Prognose, Erkrankungsalter, Geschlechterverteilung (Lublin und Reingold 1996) und Ansprechen auf verschiedene Behandlungsstrategien unterscheiden (Bitsch und Brück 2002). Ein Schub wird definiert, wenn neue Symptome mindestens 24 Stunden andauern und nicht beispielsweise durch Fieber erklärbar sind. Meistens sind dann seit dem Beginn des letzten Schubes mehr als 30 Tage vergangen. Seelische und körperliche Belastungen, wie beispielsweise Infektionen, psychischer Stress oder seelische Belastungssituationen können einen Schub begünstigen. Ein Schub kann dabei einige Tage bis mehrere Wochen anhalten, wobei die Abstände zwischen zwei Schüben Wochen oder auch Monate bis Jahre betragen können. Im Gegensatz zu Schüben mit kompletter Remission, wo sich anschließend die Symptome komplett zurückbilden, verbleiben bei Schüben mit unvollständiger bzw. inkompletter Remission meistens Funktionsstörungen, welche sich vor allem in späteren Krankheitsstadien zeigen. Die am häufigsten vorkommende Verlaufsform ist die schubförmige MS (*relapsing-remitting MS*, RR-MS), sie wird in etwa 80% aller Fälle diagnostiziert (Bitsch und Brück 2002). Gekennzeichnet ist diese Verlaufsform durch einen Schubverlauf mit teilweise vollständiger oder unvollständiger Rückentwicklung der Symptome in den Phasen zwischen den Schüben. Bleibt die schubförmige MS unbehandelt, geht diese in 25–40% der Fälle in eine sekundär chronisch progrediente MS (*secondary progressive MS*, SP-MS) über. Diese wird diagnostiziert, wenn eine klinische Verschlechterung für mindestens sechs Monate und unabhängig von einem Schub anhält (Katz Sand und Lublin 2013). Trotzdem kann es dabei phasenweise dazu kommen, dass das Voranschreiten der Erkrankung vorläufig stoppt. Typisch für SP-MS ist jedoch ein fortschreitender Krankheitsverlauf ohne vollständige Rückbildung der Symptome mit anhaltender Beeinträchtigung des Patienten. Selten gibt es einen von Anfang an schon chronisch voranschreitenden Verlauf (*primary progressive*, PP-MS) ohne Auftreten von erkennbaren Erkrankungsschüben. Dieser tritt bei ungefähr 10-15% aller MS-Patienten auf, wobei sich der Krankheitszustand und die Symptomatik von Beginn an langsam verschlechtern. Auch hier kann es phasenweise zum klinischen Stillstand der Erkrankung kommen. Das Durchschnittsalter von Patienten bei Erstdiagnose einer PP-MS liegt mit ungefähr 40 Jahren, circa zehn Jahre höher als bei der RR-MS (Miller und Leary 2007). Diese Verlaufsform hat normalerweise eine schlechtere Prognose hinsichtlich der Behinderung (Bitsch und Brück

2002). In Abbildung 1 wird der unterschiedliche Verlauf eines sekundär-progredienten und eines primär-progredienten Krankheitsverlaufs schematisch dargestellt. Tritt erstmals eine uni- oder multifokale Manifestation einer ZNS-Entzündung ohne Zeit für eine Ausbreitung zu haben, dann wird von einem klinisch isolierten Syndrom gesprochen (*Clinically Isolated Syndrome, CIS*), d.h. der Patient hat nur einen Schub (Marcus und Waubant 2013). Zeigen sich im MRT (Magnetresonanztomografie) MS-typische Befunde ohne klinischen Vergleich, dann wird von einem radiologisch isolierten Syndrom gesprochen (Miller et al. 2012).



**Abbildung 1: Graphische Darstellung der sekundär und primär chronisch-progredienten Verlaufsform der MS** (modifiziert nach Vhancer 2011 [Creative Commons CC0 1.0 License]).

### 1.4.2 Symptome

Die Symptome der MS sind verschieden, gleichzeitig aber abhängig von der Lokalität der entzündlichen Läsionen im ZNS. Häufigste Anfangssymptome sind neben einseitigen Sehstörungen durch eine Optikusneuritis und Empfindungsstörung, der Ausfall des Vibrationssinns bzw. ein Taubheitsgefühl unterer Extremitäten sowie Muskelschwäche (Mumenthaler und Mattle 2008). Nach 10-15 Jahren treten 65% der RR-MS Patienten in eine sekundär progrediente Verlaufsform (SP-MS) über. Häufiges Symptom der MS ist das Fatigue-Syndrom (abnorme Müdigkeit), welches in circa 70% aller MS Patienten zu beobachten ist (Minden et al. 2006). Typische weitere Symptome sind Kleinhirn-Schädigungssymptome (Zittern der Gliedmaßen, Störung der Bewegungskoordination, Sprechstörungen), spastische inkomplette Lähmung zweier symmetrischer Extremitäten oder Störungen in der Miktions und/oder Defäkation (Mumenthaler und Mattle 2008). Ebenfalls treten neuropsychische Symptome wie Psychosen (Patten et al. 2005), Depressionen (Sadovnick et al. 1996) und/oder unangemessene Euphorie (Mumenthaler und Mattle 2008) auf. Die Vielfalt der Symptome führte zur Entwicklung von Klassifikationen wie die *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) oder *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS) (Roxburgh und Seaman 2005). Durch diese Scores soll der Grad der Beeinträchtigung durch die MS Erkrankung in unterschiedliche Stadien unterteilbar sein und trotz Symptomvielfalt einen Vergleich ermöglichen.

### 1.4.3 Diagnostik

Um das heterogene Erscheinungsbild der MS Erkrankung kategorisieren zu können, bedient man sich als Goldstandard in der Diagnostik der überarbeiteten McDonald-Kriterien aus dem Jahre 2017 (McDonald et al. 2016; Thompson et al. 2018). Wichtigste Grundlage der Diagnostik ist neben der gründlichen neurologischen Untersuchung, die MRT zur Bestimmung der räumlichen und zeitlichen Ausbreitung der Läsionen im ZNS. Auch die Untersuchung von oligoklonale Immunglobulin G (IgG)-Antikörper im *Liquor cerebrospinalis* oder die Messung visuell evozierter Signale (VES) kann wegweisend sein (Polman et al. 2005). Auftretende Symptome können, müssen aber nicht charakteristisch für die Krankheit sein (Keegan und Noseworthy 2002; Compston und Coles 2008). So stellt beispielsweise die Charcot-Trias aus Intentionstremor, Nystagmus und skandierender Sprache allgemein gültige zerebelläre Symptome dar (Kumar et al. 2011; Gafson et al. 2012). Als typische Charakteristika werden dennoch das Lhermitte-Zeichen (Schockgefühl im Körper und den Gliedmaßen beim Beugen des Kopfes) oder das Uhthoff-Phänomen (eine temporäre Verschlimmerung der Symptome bei steigender Körpertemperatur) beschrieben (Compston und Coles 2008). Für die Diagnostik gewinnt die Kernspintomographie immer mehr an Bedeutung, sodass andere Kriterien ergänzt oder sogar ersetzt werden können. Dies reflektieren die McDonald-Kriterien, die 2001 vom *International Panel on Diagnosis of Multiple Sclerosis* empfohlen und in der zweiten Ausgabe verwendet wurden (vgl. Tab. 1) (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2011; Katz Sand und Lublin 2013).

**Tabelle 1: Überarbeitete McDonald-Kriterien von 2017** (eigene Darstellung, modifiziert nach Thompson et al. 2018).

	Klinische Präsentation	Läsionen	Zusätzliche Parameter, die für eine MS- Diagnose gegeben sein müssen
<b>Schubförmige MS (<i>relapsing-remitting</i>, RR-MS)</b>			
1	≥ 2 klinisch nachgewiesene Schübe	≥ 2	Keine
2	≥ 2 klinisch nachgewiesene Schübe	1 <sup>1</sup>	Keine
3	≥ 2 klinisch nachgewiesene Schübe	1	<u>Räumliche Dissemination:</u> <b>entweder</b> ein klinisch nachgewiesener Schub einer zweiten, räumlich getrennten klinisch nachgewiesenen Läsion <b>oder</b> Nachweis der räumlichen Dissemination im MRT
4	1 klinisch nachgewiesener Schub	≥ 2	<u>Zeitliche Dissemination:</u> <b>entweder</b> ein weiterer klinisch nachgewiesener Schub <b>oder</b> Nachweis der zeitlichen Dissemination im MRT <b>oder</b> oligoklonale Banden im Liquor, die im Serum nicht vorhanden sind

	<b>Klinische Präsentation</b>	<b>Läsionen</b>	<b>Zusätzliche Parameter, die für eine MS-Diagnose gegeben sein müssen</b>
5	1 klinisch nachgewiesener Schub	1	<u>Räumliche und zeitliche Dissemination</u>
<b>Primär progrediente MS (PPMS)</b>			
6	≥ 1 Jahr klinische Behinderungsprogression ohne Schübe		Zutreffen von mindestens zwei der folgenden drei Punkte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• mindestens eine T2-Läsion periventrikulär, kortikal/juxtakortikal oder infratentoriell</li> <li>• mindestens 2 T2 Läsionen im spinalen MRT</li> <li>• Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden im Liquor</li> </ul>

#### 1.4.4 MS Therapieansätze

Da die Ursachen der MS bis heute noch vollständig geklärt sind, zielen medikamentöser Therapien der MS darauf ab, das Immunsystem so zu modifizieren, dass sich entzündliche Veränderungen im Gehirn erst gar nicht entwickeln. Hierzu gibt es mittlerweile einige Medikamente, die sich in ihren Wirkungsmechanismen, ihrer Wirkungsstärke und Anwendung sowie in ihren Nebenwirkungen unterscheiden. Therapeutisch unterschieden wird zwischen der kurzfristigen Schubtherapie und einer verlaufsmodifizierenden Therapie. Ziel ist eine Langzeittherapie, um den Schweregrad und die Häufigkeitsanzahl von Schüben so zu verringern, dass der Grad der fortschreitenden Erkrankung positiv beeinflusst wird. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung wird bei der verlaufsmodifizierenden Therapie zwischen einer immunmodulatorischen Schubprophylaxe und immunsuppressiven Schubtherapie unterschieden. Bei der Immunmodulation wird durch therapeutisch eingesetzte Botenstoffe die Kommunikation zwischen den Immunzellen und somit die Immunantwort im Körper beeinflusst, d.h. das Gleichgewicht zwischen immunstimulierenden und immunsuppressiven Mechanismen kann durch Immunmodulatoren wiederhergestellt werden. Nachteilig können sie das Immunsystem schwächen. Doch vorteilhafterweise können sie eventuell auch zum Wiederherstellen beschädigter Myelinscheiden beitragen und damit Narbenbildungen im ZNS verhindern. Die Immunsuppression beschreibt eine milde Art der Chemotherapie. Hierbei werden Funktionen von Immunzellen unterdrückt und/oder einzelne Komponente des körpereigenen Abwehrsystems gehemmt. Zusätzlich sollen funktionelle Fähigkeiten des Patienten durch psychologische Therapie, Logopädie sowie Physio- und Ergo-verbessert werden. Die therapeutischen Maßnahmen der MS sind somit von der Verlaufsform der Erkrankung abhängig und wird in Deutschland nach dem Kompetenznetz Multiple Sklerose und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012) angelegt (vgl. Tab. 2). Da sich die chronisch progredienten Formen PP-MS und SP-MS tendenziell behandlungsresistent darstellen, stehen die meisten therapeutischen Möglichkeiten der RR-MS zur Verfügung.

### 1.4.4.1 Schubtherapie

Therapie erster Wahl bei der Behandlung eines akuten Schubes ist in der Regel Kortison. In einer Vielzahl von MS-Zentren wird eine intravenöse Behandlung mit 1g Methylprednisolon über drei bis fünf Tage als optimal angesehen. Eine Kurzzeittherapie mit hochdosiertem Methylprednisolon zeigt moderate Nebenwirkungen. Hierzu zählen neben einer schlechten Magenverträglichkeit, gelegentliche Insomnie und Stimmungsschwankungen auch ein metallisches Geschmacksgefühl im Mund. Die von den meisten Patienten befürchteten Nebenwirkungen von Kortison wie eine Zunahme des Gewichts, Verlust der Knochendichte und Veränderungen der Haut sind eher Folgen einer Langzeittherapie. Zwar zeigt die Steroidtherapie eine gute Wirkung, kann ferner weitere Schübe noch das Fortschreiten der Erkrankung langfristig aufhalten (Filippini et al. 2000). Bessern sich die Symptome unter Kortikoidbehandlung nicht, dann stellt die Plasmapherese eine alternative Therapieoption dar, die eine gute Wirksamkeit zeigt, aber teilweise mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden ist (Weinshenker et al. 1999; Keegan und Noseworthy 2002; Schilling et al. 2006; Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012).

**Tabelle 2: Aktuelle Empfehlung zur Stufentherapie der MS** (eigene Darstellung, modifiziert nach Vorlage der Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012).

Indikation		CIS	RRMS	SPMS	
Therapie	hochaktiver Verlauf		<b>1. Wahl</b> Alemtuzumab Fingolimod Natalizumab <b>2. Wahl</b> Mitoxantron (Cyclophosphamid)* <b>3. Wahl</b> Experimentelle Verfahren	Mit aufgesetzten Schüben	Ohne aufgesetzte Schübe
	Milder oder moderater Verlauf	Glatirameracetat IFN- $\beta_{12}$ i.m. IFN- $\beta_{12}$ s.c. IFN- $\beta_{1b}$ s.c.	Dimethylfumarat Glatirameracetat IFN- $\beta_{12}$ i.m. IFN- $\beta_{12}$ s.c. IFN- $\beta_{1b}$ s.c. PEG-IFN- $\beta_{12}$ s.c. Teriflunomid (Azathioprin)* (IVIg)**	IFN- $\beta_{12}$ s.c. IFN- $\beta_{1b}$ s.c. Mitoxantron (Cyclophosphamid)*	Mitoxantron (Cyclophosphamid)*
Schubtherapie	2. Wahl	Plasmaseparation			
	1. Wahl	Methylprednisolonpuls			

Substanzen nach alphabetischer Reihenfolge

\*nur besondere Indikation

\*\*nur postpartal im Einzelfall

#### 1.4.4.2 Immunmodulatorische Therapie

Als Therapie erster Wahl kommt es bei der immunmodulatorischen Therapie zum Einsatz von Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) und Glatirasmeracetat. Beide Arzneimittel werden als sogenannte Basistherapien eingesetzt. Das heißt, es handelt sich hierbei um Wirkstoffe, die durch ihr optimaleres Nebenwirkungsprofil im frühen Krankheitsverlauf angewendet werden können und Schübe um bis zu circa 30% deutlich reduzieren.  $\beta$ -Interferone haben regulatorische und entzündungshemmende Wirkungen, möglicherweise durch Regulierung der entzündungsfördernden Zytokinexpression und der Th17-Zell-Differenzierung und reduzieren dadurch nicht nur die Schubrate, sondern auch die Narbenbildung im Gehirn (Ramgolam et al. 2009; Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Zudem soll im Gegensatz zu Glatiramacetat das Interferon- $\beta$  den Krankheitsverlauf um 12 Monate verzögern können (Rejdak et al. 2010). Gleichzeitig führt die Therapie mit Interferon- $\beta$  zu einer Ausbildung neutralisierender Antikörper, wodurch die Wirksamkeit der Therapie reduziert werden kann (Deisenhammer 2009). Als Nebenwirkung rufen Interferone grippeähnliche Symptome hervor, wodurch es zu Gliederschmerzen, Schüttelfrost und Fieber kommen kann. Typische IFN-beta Medikamente und ihr Applikationsschema sind wie folgt:

<b>Interferon-beta 1a</b> (Avonex®)	6 MIU 1x/Woche, intramuskuläre Injektion
<b>Interferon-beta 1a</b> (Rebif®)	6 MIU 3x/Woche oder 12 MIU 3x/Woche, subkutan
<b>Pegyliertes Interferon-beta 1a</b> (Plegridy®)	2x/Monat, subkutan
<b>Interferon beta 1b</b> (Betaferon®)	8 MIU jeden 2. Tag, subkutan

Glatiramacetat ist eine Aminosäurekombination, in der die Aminosäuren Alanin, Lysin, Glutamat und Tyrosin zufällig polymerisieren. Diese haben ähnlich wie Interferone eine immunmodulatorische, antiinflammatorische, neuroprotektive und schubreduzierende Wirkung mit Unterdrückung der Narbenbildung (Blanchette und Neuhaus 2008; McGraw und Lublin 2013).

<b>Glatiramacetat</b> (Copaxone®)	20 $\mu$ g 1x täglich subkutan
-----------------------------------	--------------------------------

Zeigt die Therapie mit beiden Substanzen keinen Effekt, können weitere Zweite-Wahl-Medikamente versucht werden. Hierzu zählen beispielsweise Teriflunomid, welches vermehrungshemmend auf sich schnell teilende T- und B-Lymphozyten wirkt (Brunetti et al. 2013), während Dimethylfumarat im Gegensatz dazu zusätzlich zellschützende Auswirkungen im ZNS zeigt und die zelluläre Resistenz gegen oxidativen Stress verbessert (Scannevin et al. 2012).

### 1.4.4.3 Immunsuppressive Therapie

Gegen VLA-4-Integrine gerichtete monoklonale Antikörper, wie beispielsweise Natalizumab, haben in Studien gezeigt, dass eine Reduktion der Schubhäufigkeit im ersten Jahr um 68% und in 42% der Fälle eine Unterbrechung der Krankheitsprogression möglich ist (Polman et al. 2006), indem sie den Austritt von Abwehrzellen durch die Blutgefäße in das Gehirn blockieren und dadurch die Entzündungsaktivität unterdrücken (Pucci et al. 2011; Pawate und Bagnato 2015; Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012). Dabei wurden schwere Nebenwirkungen wie die Entwicklung von Therapie-assoziiertes progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) registriert und sollten im Auge behalten werden. Wichtig ist hierbei die genaue Medikamentendosierung. Es wird als 300 mg (15 ml) Konzentrat in 100 ml Kochsalzlösung verdünnt und über eine Dauer von 60 Minuten als Infusion verabreicht. Da das Risiko einer PML nach circa 1,5 Jahren steigt, sollte eine längere Therapie sehr sorgfältig abgewogen werden. Die Nutzungsbewertung ist jedoch meistens frühestens erst nach einem Jahr möglich. Ein ähnlich wirkender monoklonaler Antikörper ist das Alemtuzumab, welches CD52-positive Immunzellen depletiert. Außerdem zu erwähnen sind die B-Zell-depletierenden Antikörper, wie beispielsweise das Rituximab, Ocrelizumab oder Ofatumumab, von denen einige sogar für die progrediente MS genutzt werden. Andere immunsuppressiv wirkende Medikamente wie beispielsweise Azathioprin, Methotrexat, Mitoxantron oder Cyclophosphamid werden kaum noch genutzt (Rejda et al. 2010).

**Natalizumab** (Tysabri®)                      Infusion alle 4 Wochen

## 1.5 Pathophysiologie

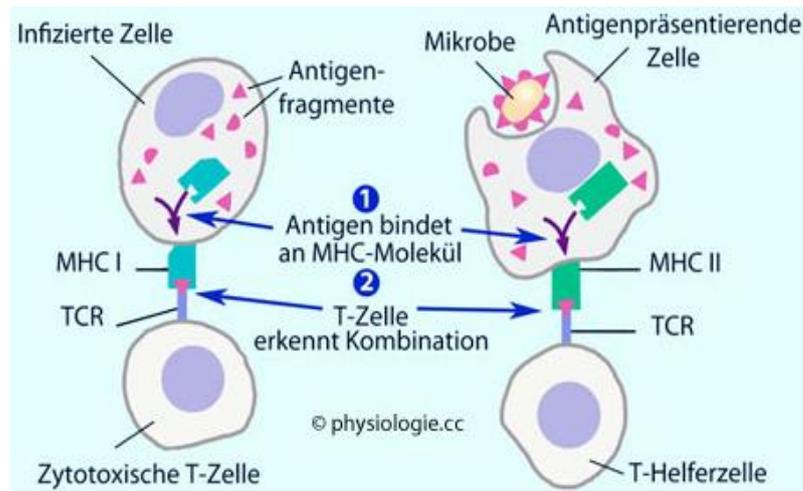
Zentrale Merkmale der MS sind Neuroinflammation und -degeneration. Akute Krankheitsschübe werden durch Entzündungsherde im ZNS hervorgerufen, welche primär in der weißen Substanz zu finden sind. Diese sind mit 50% bevorzugt im Rückenmark, mit 25% in den *Nervi optici*, mit 20% im Hirnstamm/Kleinhirn und der periventriculären weißen Substanz lokalisiert (Rejda et al. 2010). Wie es zur Bildung von Entzündungsherden kommt, ist nicht komplett verstanden, es ist jedoch weithin akzeptiert, dass eine initiale Einschränkung der Barriere-Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) dazu führt, dass T-Zellen die BHS überwinden und eine Entzündung des ZNS hervorrufen. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Produktion von Adhäsionsmolekülen an den Endothelien, sodass weitere Leukozyten in das normalerweise „immun-privilegierte“ ZNS eindringen können. Im Blut befinden sich T-Zellen, welche gegen verschiedene Antigene gerichtet sind. Einige von ihnen, sogenannte autoreaktive T-Zellen, können auch gegen körpereigene Strukturen, wie zum Beispiel Myelin gerichtet sein.

Sollten sich in dem Infiltrat, welches die BHS überwindet und ins Parenchym eindringt, nun gegen Myelinbestandteile gerichtete autoreaktive T-Zellen befinden, kann dies die Bildung einer entzündlich demyelinisierenden Läsion auslösen (Frohman et al. 2006). Denkbare Autoantigene sind unterschiedliche Myelinbestandteile, wie das *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG), *Myelin Basic Protein* (MBP) oder *Proteo Lipid Protein* (PLP). Nach dem Passieren der BHS registrieren autoreaktive T-Zellen über ihren TCR-Antigen, welche von antigenpräsentierenden Zellen auf Haupthistokompatibilitätskomplex-II-Molekülen (MHC-II) dargestellt werden (Lodygin et al. 2013). Dadurch wird die Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine wie beispielsweise von Interleukin-12 (IL-12), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ausgelöst, die wiederum zur Anschaffung und Aktivierung weiterer Immunzellen wie zum Beispiel Monozyten/Makrophagen führen (Murphy et al. 2008; Fletcher et al. 2010). Die entzündliche Entmarkung bei der MS beruht auf einem komplexen und nicht komplett verstandenen Zusammenspiel verschiedener Immunzellen. Im Folgenden werden die wichtigsten beteiligten Zelltypen und ihre Bedeutung für die Pathophysiologie der MS kurz vorgestellt.

### 1.5.1 T-Zellen

Wichtigste Mediatoren der Immunantwort bei der MS Erkrankung sind T-Zellen (Frohman et al. 2006). T-Zellen gehören zur Zellgruppe der Lymphozyten und damit zur Familie der weißen Blutzellen. Gemeinsam mit den B-Lymphozyten zählen sie zum adaptiven Immunsystem. Das T im Namen steht für den Thymus, wo die Ausdifferenzierung der Zellen stattfindet, nachdem diese im Knochenmark erzeugt und über die Blutbahn zum Thymus transportiert wurde. Durch eine positive und eine anschließende negative Selektion werden T-Zellen aussortiert, die entweder körpereigene MHC-Rezeptoren nicht identifizieren oder auf körpereigene Proteine anspringen können. Die restlichen T-Zellen erkennen dadurch nur noch körperfremde Antigene und sind nicht autoreaktiv bzw. bekämpfen nicht den eigenen Körper. Aufgabe der T-Zellen im Organismus ist die ständige Überwachung der Membranzusammensetzung von Körperzellen auf krankhafte Veränderungen. Auf diese Weise können auf der Zelloberfläche veränderte oder fremdartige Substanzen, hervorgerufen durch eine Mutation der Erbsubstanz oder Virusinfektion, erkannt werden. Genauer gesagt dienen hierzu TCR in der Zellmembran, die vergleichbar zu den von B-Lymphozyten produzierten Antikörper Fremdstoffe erkennen. Anders als die Antikörper nur dann, wenn das Antigen an MHC auf der Oberfläche anderer Zellen gebunden ist und von antigenpräsentierenden Zellen aktiv vorgeführt wird (sog. MHC-Restriktion). Eingeteilt werden die T-Lymphozyten nach ihrer Oberflächenantigene CD4 und CD8. Bei den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten handelt es sich um Helferzellen, deren Rezeptor MHC-

Klasse-II-Moleküle erkennt. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten werden wiederum als zytotoxische T<sub>c</sub>-Zellen angesehen. Ihre Rezeptoren erkennen Antigene, über MHC-Klasse-I-Moleküle, die von den meisten Körperzellen präsentiert werden. Tatsächlich gibt es aber auch CD4<sup>+</sup> T<sub>c</sub>-Zellen und CD8<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen befinden sich hauptsächlich im peripheren Blut sowie in stark durchbluteten lymphatischen Geweben, wie zum Beispiel den parafollikulären Regionen von Tonsillen, Milz und Lymphknoten. Im Gegensatz dazu sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen eher in den lymphatischen Geweben der Atmungsorgane, der Magen-Darm-Schleimhaut und der Harnwege vertreten. Zusammen mit dem mit MHC-II wird das Antigen von der antigenpräsentierenden Zelle dem T-Zell-Antigenrezeptor präsentiert. Jeder TCR T-Zell-Antigenrezeptor peripherer T-Zellen ist an ein CD3-Rezeptormolekül gekoppelt und leitet Aktivierungssignale ins Zellinnere weiter. Binden kann dieses an TCR $\alpha\beta$  und TCR $\gamma\delta$  Rezeptoren. Ähnlich wie der Antigenrezeptor der B-Lymphozyten gehört der TCR zur Immunglobulin-Gen-Superfamilie. Hierbei sind zwei von vier Proteinketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) über Disulfidbrücken gekoppelt. Dabei handelt es sich meistens beim TCR um ein  $\alpha\beta$ -Heterodimer, weniger um ein  $\gamma\delta$ -Heterodimer. Somit werden bei den T-Zellen zwischen zwei Subpopulationen unterschieden, den TCR $\alpha\beta$  und TCR $\gamma\delta$  (Simpson et al. 2011). Während mit 95–98% aller T-Zellen die  $\alpha\beta$ - Subpopulation in den lymphatischen Organen und im Blutkreislauf, wozu auch die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zählen, vertreten sind, überwiegen mit bis zu 50% die  $\gamma\delta$ -T-Zellen in epithelialen Geweben der Haut, den Geschlechtsorganen und der Darmschleimhaut. Passt nun ein über MHC-I- oder MHC-II präsentiertes Antigen zu einem spezifischen Rezeptor einer T-Zelle ähnlich wie beim Schlüssel-Schlossprinzip, kommt es zu einer Co-Stimulation (Oberflächenprotein B7-1 wird präsentiert). Das heißt, es kommt zu einer Aktivierung bestimmter Gene des Zellkerns und die T-Zelle geht in den aktivierten Zustand über, sodass die Zelle sich zu einer Effektor-bzw. Gedächtniszelle entwickelt. Abhängig von der Zellart unterscheiden sich die Effektorzellen in ihrer Funktionsweise, die folgend näher erklärt werden. Während T-Killerzellen (gekennzeichnet durch den CD8-Rezeptor) kranke Zellen direkt zerstören, kommt es bei den T<sub>H</sub>-Zellen (mit CD4-Rezeptor) zu einer Ausschüttung löslicher Botenstoffe (Zytokinen), wodurch weitere Immunzellen angelockt werden. T<sub>reg</sub>-Zellen dienen der Selbsttoleranz und verhindern überschießende Angriffe auf intakte Körperzellen.



**Abbildung 2: Bildliche Darstellung der T-Zell Aktivierung. Links:** MHC-I-Interaktion auf Körperzelle mit dem Antigenrezeptor der T<sub>c</sub>-Zellen, wobei CD8 ein für MHC-I-Moleküle spezifischer Korezeptor ist. **Rechts:** MHC-II-Interaktion auf antigenpräsentierenden Zellen mit dem Antigenrezeptor auf T<sub>H</sub>-Zellen, wobei CD4 ein für MHC-II-Moleküle spezifischer Korezeptor ist. (Mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Hinghofer Szalkay 2022).

### 1.5.1.1 T-Helferzellen

T-Helferzellen, auch T<sub>H</sub>-Zellen abgekürzt, gehören zur Familie der T-Lymphozyten. Diese werden aufgrund der von ihnen abgegebenen Zytokine in zwei Untergruppen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt. Bei der einen Subpopulation handelt es sich um Typ1-T<sub>H</sub>-Zellen, die CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Lymphozyten mit einem T-Zell-Antigenrezeptor sein können und typischerweise mit der Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  an der *zellulären* Immunantwort beteiligt sind, indem eine Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen erfolgt. Typ2-T<sub>H</sub>-Zellen können ebenfalls sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sein, die Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 ausschütten und somit an der *humorale* Immunantwort beteiligt sind. Hier kommt es zu einer Interaktion mit B-Lymphozyten und damit einer Produktion und Ausschüttung von Antikörpern. Ein weiterer T-Helferzelltyp, der 2005 entdeckt wurde, induziert unter anderem IL-17 und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen (Girardi et al. 2006). IL-6 hat hierbei eine wichtige Schlüsselfunktion, indem es die Transformation einer jungen CD4<sup>+</sup> T-Zelle zu einer T<sub>H</sub>17-Zelle bewirkt. Genaue Funktionen der T<sub>H</sub>17-Lymphozyten ist noch nicht vollständig erläutert und Gegenstand laufender Forschung. Außerdem gibt es Typ0-T-Zellen; T<sub>H</sub>-Zellen mit einem gemischten Zytokinmuster. Tim Mosmann beschrieb erstmals 1986 die unterschiedlichen Charakteristika der Typ1-T-Zellen und Typ2-T-Zellen (Harrington et al. 2005). CD4<sup>+</sup> Th17-Zellen sollen vor allem in der Entstehungsphase der MS eine wichtige Rolle übernehmen (Fletcher et al. 2010).

### 1.5.1.2 Zytotoxischen T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen ( $T_c$ -Zellen) gehören zum adaptiven Immunsystem und in der Regel zu den  $CD8^+$  Zellen. Sie erkennen Antigene, die auf MHC-I-Molekülen dargestellt werden, vor allem aber Tumorzellen und andere viral infizierte Zellen. Durch Freisetzung zytotoxischer Proteine, wie Perforin, Granzyme und Granulysin kommt es in den fehlerhaften Zellen zu einem programmierten Zelltod bzw. einer Apoptose.  $T_c$ -Zellen arbeiten mit einer sehr hohen Geschwindigkeit, da sie die vorgefertigten Granula in sich tragen und somit sofort einsatzbereit sind. Während eine Zielzelle getötet wird, füllen sich die internen Granulaspeicher bereits wieder auf, sodass die nächste Zielzelle sofort angegriffen werden kann. Außerdem kommt es zu einer Ausschüttung bestimmter Zytokine, wie  $TNF-\alpha$ , welche zu einer Verlangsamung der Ausbreitung der Viren und eine verstärkte Wirkung von MHC-Klasse-I-Molekülen führen. Da  $T_c$ -Zellen sehr selektiv arbeiten, indem sie nur die Zellen, die mit den Pathogenen befallen sind, zerstören, kann der Organismus weitestgehend geschont werden. In MS Läsionen dominieren unter den T-Zellen klonal vermehrte  $CD8^+$  Zellen (Babbe et al. 2000). Tierexperimente zeigen, dass antigenbeladene dendritische Zellen (DC) aus dem ZNS in zervikale Lymphknoten eindringen und durch Präsentation von Autoantigenen antigenspezifische T-Lymphozyten erregen. Dadurch erfolgt der Übergang enzephalitogener Zellen in das zentrale Nervensystem (Karman et al. 2004, Furtado et al. 2008). Durch Aktivierung dieser Zellen kommt es zum weiteren Einstrom von Immunzellen über des sonst nicht- oder nur wenig- für Leukozyten durchgängigen BHS-Endothels (Steinman 1996, Reboldi et al. 2009).

### 1.5.1.3 Regulatorischen T-Zellen

Um gleichzeitig Krankheitserreger und/oder Krebszellen vernichten, aber auch die Autoimmunität gegen normales Gewebe blockieren zu können, muss die Wirkungsstärke der Immunantwort kontinuierlich überwacht werden. Durch Kontrollmechanismen, die zum Teil von regulatorischen T-Zellen ( **$T_{reg}$ -Zellen**) gesteuert werden, können Reifung und Nachproduktion von Leukozyten konstant gehalten werden. Gelenkt werden diese Kontrollmechanismen von  $T_{reg}$ -Zellen über Zytokine wie  $TGF-\beta$  und IL-10 oder durch CTLA4-vermittelte Einschränkung der klonalen Ausdehnung von B-Zellen, durch das Abtöten von überzähligen T-Zellen über Fas/FasL-vermittelte Signale sowie durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren oder durch das Abfangen von Antigenen. Anhand ihrer Zytokinprofile werden die  $T_{reg}$ -Zellen weiter unterteilt, in  $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ -Zellen,  $CD8^+$  regulatorische Zellen,  $T_{R1}$ -Zellen,  $T_{H3}$ -Lymphozyten und NK-Zellen. Wichtig für den Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen und damit auch für die MS sind die  $CD4^+ T_{reg}$ -Zellen. Allgemein werden natürliche  $T_{reg}$ -Zellen von adaptiven  $T_{reg}$ -Zellen unterschieden.

Während sich natürliche  $T_{\text{reg}}$ -Zellen schon im Thymus differenzieren, entwickeln sich adaptive  $T_{\text{reg}}$ -in der Peripherie durch Einflüsse von außen aus naiven T-Zellen. Die Aktivierung von  $nT_{\text{reg}}$ - sowie  $T_{\text{reg}}$ -Zellen erfolgt durch die Freisetzung von TGF- $\beta$  oder IL-10, die unterdrückend auf andere Immunzellen wirken und eine übermäßige Entzündungsreaktion verhindern. Scheinbar hemmen besonders  $nT_{\text{reg}}$ -Zellen auch gleichzeitig autoreaktive Immunzellen (Murphy et al. 2008). Studien zeigen, dass sich in absoluten Zahlen die  $nT_{\text{reg}}$ -Zellen von an MS erkrankten Patienten nicht von gesunden Menschen unterscheiden. Dennoch wurde bei MS erkrankten Patienten durch den reduzierten Spiegel von IL-10 eine verminderte Aktivität der  $nT_{\text{reg}}$ -Zellen nachgewiesen (Viglietta et al. 2004; Haas et al. 2005).

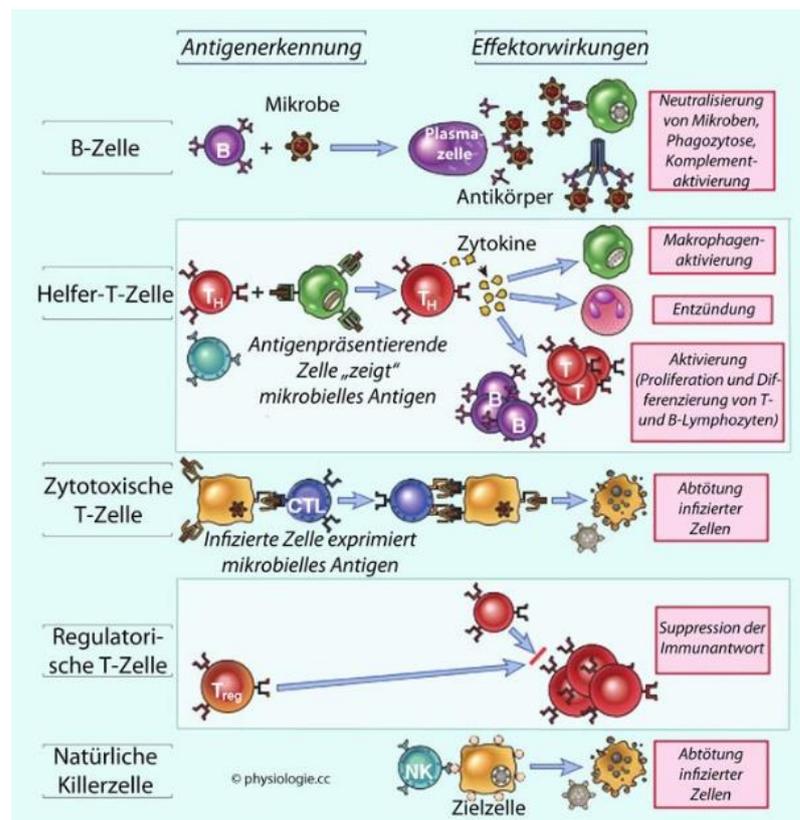
#### 1.5.1.4 T-Gedächtniszellen

T-Gedächtniszellen, die sowohl CD4+ als auch CD8+ sein können, entwickeln ein „immunologisches Gedächtnis“, da sie nach ihrer Aktivierung im Blutkreislauf bleiben und bei erneuter Ansteckung mit demselben Erreger aktiv werden. Durch die Gegenwart von Gedächtniszellen kommt es zu einer Zunahme antigenspezifischer T-Zellen um mehr als das 10- bis 100-fache.

#### 1.5.1.5 NK-Zellen

Ebenfalls zu den Lymphozyten zählen die natürliche Killerzellen (**NK-Zellen**). Wesentlich größer als die T- und B-Lymphozyten können sie funktionell abnorme Zellen, wie Krebszellen oder virusinfizierte Zellen via Rezeptoren identifizieren und zerstören (Mosmann et al. 1986). Als Teil des **angeborenen Immunsystems** besitzen sie keine Antigen-spezifischen Rezeptoren und bilden bei gesunden Menschen einen Anteil von 5–15% (Baggio et al. 2017). Ihr wichtigstes Merkmal ist der CD56 Rezeptor. Während NK-Zellen mit einer hohen Expression von CD56 (CD56bright) eher Zytokine herstellen, sind NK-Zellen mit einer geringeren Expression von CD56 an zytotoxische Aufgaben beteiligt (Claus et al. 2008). Tumor- und virusinfizierte Zellen werden in der Regel von den zytotoxischen T-Lymphozyten über MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche entdeckt und eliminiert. Diejenigen, die der Eliminierung durch T-Lymphozyten entgehen, können an dieser Stelle von den NK-Zellen identifiziert werden und zu einem programmierten Zelltod der Zielzelle führen. Der Immunologen Klas Kärre bezeichnete diese Gesetzmäßigkeit als *Missing-self-Hypothese*. NK-Zellen haben somit eine wichtige Aufgabe an der Kreuzung zwischen angeborener und adaptiver Immunität und fördern die Modellierung der erworbenen Immunantwort (Cooper et al. 2003; Moretta et al. 2008). Es bedarf dabei keiner Aktivierung NK-Zellen. Ihre Aktivität kann jedoch durch Interferone wie IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  oder IL-2 und IL-12, die durch Makrophagen freigesetzt werden, gesteigert werden, sodass eine erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  möglich ist und ebenfalls eine Infektion eindämmen kann.

Neuroimmunologen und Neuropathologen der Universitäten München und Münster entdeckten, dass Killerzellen des angeborenen Immunsystems von MS erkrankten Patienten ihre Schutzfunktion nicht mehr erfüllen können. Die Wissenschaftler belegten außerdem, dass mit der Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen den IL-2-Rezeptor (Daclizumab) ein Wirkstoff entdeckt wurde, der die immunregulatorische Funktion der NK-Zellen stärken kann (Reschner et al. 2008). 2018 wurde allerdings das Daclizumab wieder vom Markt genommen, da in einigen Fällen eine immunvermittelte Enzephalitis bei MS erkrankten Patienten bekannt und damit die Krankheit aggraviert wurde.



**Abbildung 3: Wirkungsmechanismus unterschiedlicher Lymphozyten, die sich durch Antigenerkennung zu Effektorzellen differenzieren.** (Mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Hinghofer Szalkay, modifiziert nach Abbas et al. 2014). **B-Zellen** entdecken Oberflächenantigenen und differenzieren sich dadurch zu antikörpersezierenden Zellen. **Helfer-T-Zellen** können Oberflächenantigene antigenpräsentierender Zellen identifizieren, wodurch eine Zytokinausschüttung und damit Entzündungsvorgänge und Immunmechanismen angeregt werden. **Zytotoxische T-Zellen** können MHC-gebundene Antigene identifizieren und durch Apoptose infizierte Zellen eliminieren. **Regulatorische T-Zellen** regulieren die Aktivität anderer T-Zellen, wodurch eine Autoimmunität verhindert wird. **Natürliche Killerzellen** gehören zum *angeborenen*, alle anderen zum *adaptiven* Immunsystem und können umgeformte Oberflächenmerkmale infizierter Zellen identifizieren und diese eliminieren.

## 1.5.2 Weitere Immunzellen

**Antigenpräsentierende Zellen**, auch **APC** oder **APZ** genannt, sind vor allem **Monozyten**, **Makrophagen**, **B-Zellen** und **DCs**. Es können zwar auch andere Zellen Antigene präsentieren, aber nur bei der Präsentation durch diese Zellen kommt es zu einer T-Zell-Aktivierung. Nach Aufnahme mittels Phagozytose oder Pinozytose werden diese Antigene schließlich über MHC II-Moleküle präsentiert.

### 1.5.2.1 Makrophagen/Mikroglia, Monozyten

**Monozyten** sind die größten zellulären Bestandteile des menschlichen Bluts und gehören zu den Leukozyten und somit zum zellulären Immunsystem. Sie differenzieren sich im Knochenmark und haben eine Halbwertszeit von circa 72 Stunden. Im Falle einer Infektion werden Monozyten am Infektionsort durch Chemotaxis angelockt. Mit Hilfe von Zytokinen und Gewebeanantigenen wie IL-1 oder Interferon-gamma entwickeln sich diese weiter zu Makrophagen. Sie gehören dann zum mononukleär-phagozytären System (MPS). Als Gewebemakrophagen verweilen sie dort für einige Wochen bis Monate. Man unterscheidet u. a. folgende Formen:

- Langerhans-Zelle in der Haut
- Histozyt im Bindegewebe
- Osteoklast im Knochen
- Mikrogliazelle im Gehirn
- Kupffer'sche Sternzelle in der Leber
- Alveolarmakrophage in der Lunge
- Hofbauer-Zelle in der Plazenta

Die Bildung des **M1-Phänotyps** wird durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  und Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) hervorgerufen. Hierbei handelt es sich um einen stark proinflammatorischen Makrophagenphänotyp, der durch die Bildung des Enzyms iNOS (NO-Synthase) und die Produktion von NO-Radikalen besonders zytotoxisch auf umliegende Zellen wirkt. Dieser Phänotyp setzt außerdem durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine eine Immunreaktion in Gang. Gewebsdebris, wie beispielsweise Myelin nach einer peripheren Nervenverletzung oder entzündungshemmende Zytokine wie IL-4 regen zur Bildung des antiinflammatorischen **M2-Phänotyps** mit hoher Phagozytosekapazität an. Dieser Phänotyp sorgt für die Differenzierung von Stammzellen, Produktion weiterer Wachstumsfaktoren und durch die Ausschüttung entzündungshemmender Zytokine zu einer Proliferation regenerationsfördernder Zellen im Gewebe. Typisch für alle Gewebstumore ist ein

Hoher Anteil an M2-Markerproteinen, wie beispielsweise Arginase 1 (Arg-1). Bei Interaktion mit Pathogenen wie zum Beispiel LPS kommt es über einen Recognition-Rezeptor zu einer Aktivierung von Makrophagen, wodurch weitere zahlreiche Zytokine und proinflammatorische Faktoren wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-2}$  und  $\text{IL-6}$  abgegeben werden.

### 1.5.2.2 B-Zellen

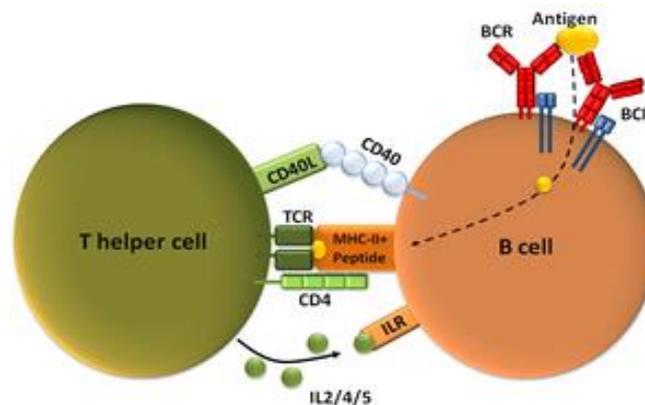
**B-Zellen** beziehungsweise **B-Lymphozyten** zählen zu den Leukozyten und bilden zusammen mit den T-Lymphozyten das adaptive Immunsystem. Als alleinige Zellen sind sie im Stande Plasmazellen zu produzieren, die Antikörper sezernieren können. Im Gegensatz zu den T-Zellen, die an der zellvermittelten Immunantwort teilnehmen, gehören B-Zellen zur humoralen Immunantwort (Antikörperproduktion) und können durch körperfremde Antigene aktiviert werden, wodurch sie sich dann zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen entwickeln. Von wesentlicher Bedeutung bei der B-Zell-Entwicklung ist die Ausbildung des B-Zell-Rezeptors mit dessen Hilfe reife B-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt fremde Antigene entdeckt und durch die Produktion entsprechender Antikörper feindliche Fremdkörper bekämpfen kann. Der Reifungsprozess der B-Zellen erfolgt im Knochenmark. Reife B-Zellen zeigen schließlich auf ihrer Oberfläche **IgM und IgD-Rezeptoren**. B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche membranständige Immunglobuline (Antikörper) und Proteine, wie **CD19, CD20** und **CD21**.

Entwicklungsstadien der B-Lymphozyten:

- die frühe Pro-B-Zelle
- die späte Pro-B-Zelle
- die große Prä-B-Zelle
- die kleine Prä-B-Zelle
- die unreife B-Zelle
- die reife B-Zelle

Naive B-Lymphozyten zirkulieren im Blut und den lymphatischen Organen (Milz, Thymus, Lymphknoten, Knochenmark) des Körpers bis der B-Zell-Rezeptor an ein körperfremdes Antigen knüpft und es zu einem costimulatorischen Signal von  $\text{T}_\text{H}$ -Zellen (die ebenfalls dasselbe Antigen erkannt haben müssen) kommt. Die B-Zellen bewegen sich dann zu den Keimzentren der Lymphknoten oder Milz, wo es zur Proliferation der B-Zellen zur Plasmazellen, die Antikörper sezernieren können, kommt. Die Antikörper haben dann die genau selbe Spezifität wie der B-Zell-Rezeptor der Zelle, heißt sie knüpfen an dasselbe Antigen. Der Mensch besitzt um die  $10^9$ - $10^{10}$  spezifische B-Lymphozyten mit unterschiedlichen Antigen- Rezeptoren. Abhängig vom Antigen können B-Zellen T-Zell-abhängig oder T-Zell-unabhängig aktiviert werden.

Die Mehrzahl aller Antigene werden *T-Zell-abhängig* aktiviert, sprich für ein Maximum an Antikörperproduktion ist die Mitwirkung von T-Zellen notwendig. Die T-Helferzelle aktiviert die B-Zelle durch Präsentation des Antigens mit dem MHC-II-Komplex. Die weitere Kommunikation zwischen T-Helferzelle und B-Zelle erfolgt über CD40 und seinen Liganden (CD40L) sowie durch Ausschüttung von IL 2/4/5 über die T-Zelle. Bei Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor kommt es zu einer Antigenaufnahme in das Zellinnere der B-Zelle, der dann gemeinsam mit einem MHC-Molekül an der Oberfläche dargestellt wird. Nun kann eine passende T-Helferzelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den Antigen-MHC-Komplex binden. Dadurch kommt es nun zu einer Aktivierung der B-Zelle, sodass bestimmte Zytokine ausgeschüttet werden. Durch klonale Expansion nimmt die Anzahl an B-Zellen zu und es kommt zu einer Ausdifferenzierung von Antikörper-produzierenden B-Zelle, sprich Plasmazelle, die Antikörper wie IgA, IgE und IgG produzieren kann.



**Abbildung 4: Interaktion zwischen T-Helferzelle und B-Zelle** (modifiziert nach Janeway 2002 [Creative Commons CC0 License]).

Einige wenige Antigene werden *T-Zell-unabhängig* aktiviert. Dabei benötigen sie allein ein Signal, welches durch eine Art Kreuzvernetzung der B-Zell-Rezeptoren ausgelöst wird. Hierzu zählen zum Beispiel Polysaccharide, die sich an der Oberfläche von Bakterien wiederholen und dadurch identifiziert werden können. Nach dadurch erfolgter Aktivierung der B-Zelle folgt dann eine Vermehrung und anschließend die Bildung von IgM Antikörper. Die Ausbildung von Gedächtniszellen bleibt jedoch aus, weshalb eine Impfung mit Polysaccharid-Impfstoffen für einen unzureichenden Schutz von nur 3 bis 6 Jahren sorgt.

Unabhängig von den verschiedenen Reifestadien der B-Zellen wird zwischen zwei Typen von B-Zellen unterschieden. Während **B2-Zellen** zu den gängigen B-Zellen gehören, kommen **B1-Zellen** eher in der Bauchhöhle vor, sprich mit nur 5% in der Milz vertreten und in den peripheren Lymphknoten vollständig fehlend. Sie sind größer als die B2-Zellen und tragen eher IgM und CD43 auf der Oberfläche und reagieren eher auf Kohlenhydrantigene.

B2-Zellen tragen eher IgD und CD23 und reagieren eher auf Proteinantigene. In Bezug auf die MS Erkrankung lassen sich B-Lymphozyten in Läsionen der weißen und grauen Substanz sowie in follikelartige Strukturen der Meningen nachweisen. Auch die Ablagerung von Immunglobulinen in MS-Plaques wurde gezeigt (Lucchinetti et al. 2000; Serafini et al. 2004; Frischer et al. 2009) Lucchinetti et al. 2011). Einen weiteren Beweis hierfür liefert der therapeutische Erfolg von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper, wodurch es zu einer Abnahme der CD20-positiven B-Lymphozyten kommt (Hauser et al. 2008). Zusätzlich zeigen nahezu alle MS-Patienten klonal expandierte B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie von ihnen produzierte oligoklonale Immunglobuline im *Liquor cerebrospinalis* (Walsh et al. 1985; Obermeier et al. 2008; Büdingen et al. 2010). Bezüglich der Reaktivität solcher Antikörper gegenüber Myelinbestandteile bestehen dennoch widersprüchliche Ansichten (Markovic et al. 2003; Büdingen et al. 2008; Owens et al. 2009).

### 1.5.2.3 Dendritischen Zellen

**Dendritische Zellen** gehören ebenfalls zu den zellulären Bestandteilen des Immunsystems. Je nach Typ entwickeln sie sich entweder aus Vorläufern der B- und T-Zellen oder aus Monozyten. Ihr Name bezieht sich auf ihre bäumchenartigen Zellfortsätze, wodurch sie charakterisiert werden; haben aber nichts mit den Dendriten der Nervenzellen zu tun. Ihre Funktion besteht in der Antigenerkennung und -präsentation im MHC-Kontext vorher als fremdartig erkannter und durch Endozytose oder Phagozytose intrazellulär aufgenommener Strukturen. Sie sind in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers vertreten und die einzigen Zellen, die eine primäre Immunantwort durch Aktivierung naiver T-Lymphozyten erregen können. Alle anderen APCs können nur Antigene aufnehmen, verarbeiten und präsentieren. DCs sind APC mit einer hohen Konzentration an MHC-Klasse-II-Molekülen und co-stimulatorischen Molekülen, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und dadurch besonders in der Lage sind eine T-Zell-Aktivierung durchzuführen. Durch die Darstellung bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die Freisetzung entsprechender Zytokine instruieren sie die T-Zellen und steuern auf diese Weise die spezifische zelluläre Immunantwort. Dabei kann eine DC für die Aktivierung von 100 bis 3000 Antigen-spezifische T-Zellen sorgen, das heißt sie sind wesentlich effizienter als die anderen APC's. Grund hierfür ist die 10 bis 100-fach höhere Darstellung an MHC-Peptid-Komplexe auf ihrer Oberfläche als wie zum Beispiel bei B-Zellen oder Monozyten. Dendritische Zellen werden anhand ihres Aussehens und ihrer Oberflächenmerkmale (*Cluster of Differentiation*) in zwei Gruppen geteilt, den **myeloiden dendritischen Zellen** (mDC) und **plasmazytoiden dendritischen Zellen** (pDC).

mDC sehen aus wie Monozyten und zeigen das Oberflächenmerkmal **CD11c** auf, pDC ähneln den Plasmazellen und besitzen kein CD11c-Merkmal.

#### 1.5.2.4 Astrozyten

**Astrozyten** gehören zu den Gliazellen und bilden somit das Stützgewebe des zentralen Nervensystems (Neuroglia). Sie besitzen vom Zellkörper abgehende Zellfortsätze. Durch die dichte Zusammenlagerung ihrer Zellkörper und Fortsätze im ZNS bilden sie Schichten wie die *Membrana limitans gliae perivascularis* und *Membrana limitans gliae superficialis* aus. Zusammengehalten werden die Zellen durch Gap junctions mittels elektrischer Kopplung und Zonulae adhaerentes mittels mechanischer Kopplung. Astrozyten haben somit eine Stützfunktion im ZNS. Außerdem sind sie an der Bildung der BHS beteiligt und dienen dem Austausch von Stoffwechselprodukten und Nährstoffen zwischen Neuronen und dem Blut. Sie umhüllen und isolieren Synapsen und bilden das Apolipoprotein E. Astrozyten versorgen die Nervenzellen mit Cholesterin, modulieren den zerebralen Blutfluss bei starker Glutamatfreisetzung und regulieren die extrazelluläre Kaliumkonzentration.

## 1.6 Histopathologie der multiplen Sklerose

Erste neuropathologische Beschreibungen der MS-Entzündungsherde gehen auf Robert Carswell von 1838 zurück. Zusammenhänge zwischen der „Hirnsklerose“ und neurologischen Ausfällen wurden erst 1849 von Friedrich von Frerich erkannt. 1868 veröffentlichte Jean-Martin Charcot detaillierte mikroskopische und makroskopische Illustrationen und beschrieb damit ausführlich die *Sclérose en Plaque* (Murray 2009). Histologisch zeigt die MS Erkrankung ein uneinheitliches Bild (Lucchinetti et al. 2000). Zu den MS-typischen Plaques kommen umfangreiche Schäden an Gehirn und Rückenmark mit Atrophie und Veränderungen im Bereich der nicht sklerosierten weißen und grauen Substanz hinzu (Miller et al. 2002; Lassmann et al. 2007; Stadelmann et al. 2011). Gekennzeichnet sind frühe Läsionen der weißen Substanz durch Einwanderung von Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Plasmazellen, einer Demyelinisierung und reaktiver glialer Narbenbildung (Babbe et al. 2000; Lassmann et al. 2001; Frischer et al. 2009). Schon während der Frühphase der Entzündung ist ein axonaler Schaden zu erkennen. Im weiteren Verlauf kommt es schließlich in den chronischen Erkrankungsstadien zu einem axonalem Verlust (Ferguson et al. 1997). Autopsien zeigen eine astrozytäre Gliose mit demyelinisierten chronischen Läsionen, die hypozellulär, z.T. randständig remyelinisiert sind.

Ursache für die ausbleibende Remyelinisierung sind möglicherweise nur noch spärlich vorhandene entzündliche Infiltrate und somit ein Mangel proinflammatorischer und wachstumsfördernder Zytokine. Diese können für eine Remyelinisierung günstiges Umfeld sorgen. Je älter die Läsion, desto weniger Oligodendrozytenvorläufer sind in den Plaques nachweisbar. Ursächlich hierfür sind womöglich bestimmte Antikörper, die gegen diese Zellen arbeiten (Niehaus et al. 2000; Wolswijk 2002). Das (histo)pathologische Erscheinungsbild ändert sich in der chronisch progredienten Phase der Erkrankung. Hierbei rückt die akute Entzündung in den Hintergrund. Neben den demyelinisierten Läsionen mit nur noch geringen T-Zellinfiltraten und wenigen aktivierten Mikrogliazellen findet sich vermehrt eine Schädigung der normal erscheinenden weißen Substanz mit axonaler Schädigung und Verlust, aktivierten Mikrogliazellen und diffusen Entzündungsreaktionen (Lassmann et al. 2007). Studien haben vermehrt einen Zusammenhang zwischen Behinderung und geistiger Einschränkung sowie eine sich teilweise auf das vollständige Gehirn ausbreitende Atrophie zeigen können (Grassiot et al. 2009). Typisches Merkmal sind Entmarkungsläsionen der grauen Substanz, die bis heute charakteristisch für die primär als auch sekundär chronisch progredienten MS gelten (Brownell und Hughes 1962; Kutzelnigg et al. 2005; Albert et al. 2007).

## 1.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Bei der EAE handelt es sich um ein etabliertes Tiermodell der MS. Es handelt sich dabei um eine künstlich induzierte neuroinflammatorische Erkrankung bei Labortieren (Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen und Primaten), welche bestimmte inflammatorische Aspekte bei der Pathogenese der MS abbildet aber nicht gleichzusetzen ist mit der menschlichen MS (Constantinescu et al. 2011). Die EAE ist bis heute eines der wichtigsten Werkzeuge, wenn es um die Untersuchung von pathologischen Vorgängen der MS geht und wurde erstmals 1933 erläutert (Rivers et al. 1933). Sie kann in einer Vielzahl von Labortieren (Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen und Primaten) erfolgreich induziert werden, wobei sich die klinischen Bilder je nach Spezies unterscheiden, sodass die Untersuchung verschiedener Aspekte der MS möglich ist (Gold et al. 2006). Aufgrund ihrer einfachen Haltungsbedingungen und der Option genetischer Variation ist die Maus heutzutage jedoch die mit Abstand am häufigsten verwendete Spezies. Die Demyelinisierung bei der klassischen EAE ist im Gegensatz zur MS geringer ausgeprägt und findet sich hauptsächlich im Kleinhirn und dem Rückenmark (Schreiner et al. 2009). Im Unterschied zur MS, die meistens durch einen chronischen und schubförmigen Verlauf mit rezidivierendem Rückgang der Symptome charakterisiert ist, tritt die EAE akut und monophasisch mit persistierenden neurologischen Defiziten auf.

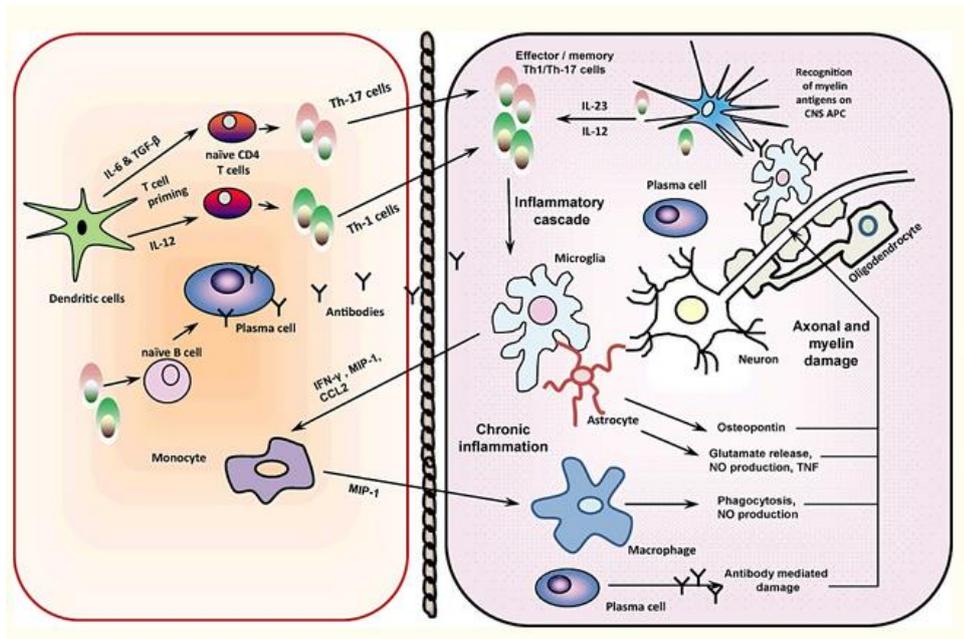
Induziert wird die EAE durch die Immunisierung mit verschiedenen Myelinbestandteilen. Hierzu verwendet man beispielsweise MBP, PLP oder MOG in Kombination mit Freund'schem Adjuvans (Libbey und Fujinami 2011). Bezeichnet wird diese Art der Induktion der EAE als „**aktive Immunisierung**“. Der für die EAE gängige Mausstamm C57BL/6 wird am häufigsten mit dem Peptid MOG<sub>35-55</sub> aktiv immunisiert, wobei dieses Peptid lediglich die Aminosäuren 35-55 des kompletten MOG-Proteins beinhaltet. Es kommt zur Entwicklung eines akuten monophasischen Krankheitsbildes. Klinisch gekennzeichnet durch eine zunehmende Paralyse des Schwanzes und der Hinterbeine, später sind auch die Vorderläufe betroffen. In der EAE wird die Entzündung durch autoimmune CD4+ Th1-Zellen, die nach aktiver Immunisierung durch APC in der Peripherie das MOG<sub>35-55</sub> präsentieren, ausgelöst (Ben-Nun et al. 1981; Halachmi et al. 1992). Durch diese Aktivierung können Immunzellen, die BHS überwinden und eine Zytokinausschüttung (zB. IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) bewirken. Folglich werden weitere Makrophagen und T-Zellen rekrutiert, sodass Axone und Myelinscheiden zerstört werden (Tsunoda und Fujinami 1996; Engelhardt 2008). Kommt es zu einer EAE durch die Übertragung von bereits aktivierten, gegen Myelin gerichteten CD4+ Th1-Zellen (Stone 1961), spricht man von einem „**adoptiven Transfer**“. Im Folgenden werden die drei verschiedenen grundsätzlichen Ansätze der EAE kurz gegenübergestellt:

1. Die **aktiv-induzierte EAE** (aEAE) mit Hilfe von CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) Immunisierung, beschreibt das einfachste Modell und bildet den "Goldstandard". Hierbei wird eine Emulsion injiziert, bestehend aus einem Antigen und CFA. Begleitet wird dies von einer intraperitonealen Injektion von *Pertussis-Toxin* (PTX) am Tag der Immunisierung und zwei Tage später, um die Inzidenz der Krankheit zu erhöhen.
2. Die **passive, adoptive transfer EAE** (pEAE) wird induziert durch den adoptiven Transfer von MOG-spezifischen T- Zellen, die in vitro manipuliert werden können, bevor sie dem Empfänger injiziert werden.
3. Bei der **spontanen EAE** (sEAE) handelt es sich um ein Mausmodell ohne exogene Manipulation. Häufig werden hierfür transgene Mäuse vom Stamm C57BL/6 genutzt, bei denen es durch das Vorhandensein von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen T-Zellen und MOG-spezifischen B-Zellen zur spontanen Ausbildung einer EAE kommen kann. Diese Mäuse werden auch als *opticospinal encephalomyelitis* (OSE)-Mäuse bezeichnet. Bei etwa 50% der OSE-Mäuse entwickelt sich eine spontane EAE, in Abhängigkeit vom Alter und Umwelteinflüssen.

### 1.7.1 Histopathologie und Immunpathologie der EAE

Wie eingangs erwähnt, ist die EAE ein einzigartiges Tiermodell mit einer antikörpervermittelte Demyelinisierung, welches die Immunpathologie der MS reproduzieren kann. Induziert wird sie durch aktive Immunisierung mit sog. „Volllängen“-MOG<sub>1-125</sub>, einem ZNS-spezifischen Myelinprotein. Hierbei handelt es sich um ein Autoantigen, das bisher einmalig ist und in Ratten zu einer der MS-ähnlichen Pathologie führt (Adelmann et al. 1995; Johnson et al. 1995; Genain et al. 1995; Genain und Hauser 1997; Storch und Lassmann 1997; Genain et al. 1999). Goldstandard bei der Erforschung der MS Erkrankung bildet die in C57BL/6J-Mäusen durch das MOG<sub>35-55</sub> Peptid hervorgerufene EAE (Mendel et al. 1995; Recks et al. 2011; Ben-Nun et al. 2014). Über eine CD4+ T-Zell-Antwort führt die MOG-induzierte EAE zu einer entzündlichen Reaktion im ZNS, indem eine Zytokinkaskade ausgelöst wird, die zum einen lokale Mikrogliazellen und infiltrierende Makrophagen aktiviert und zum anderen die BHS öffnet. Die In EAE-Modellen mit entmarkenden anti-MOG-Antikörpern, wie beispielsweise der spontanen (s)EAE, ermöglicht eine Störung der Integrität der BHS durch die autoimmune Entzündung, dass zirkulierende MOG-spezifische Autoantikörper in das ZNS gelangen, an das MOG binden und somit die Komplementkaskade aktivieren, wodurch es zu einer Myelinolyse und Nekrose von Oligodendrozyten kommt. Anschließend folgen eine Vesikulierung des Myelins und einer Abfolge von komplementabgeleiteten entzündungsfördernden Effekten, wodurch die lokale Inflammation und die Destruktion der BHS verstärken (Piddlesden et al. 1993). Im Einzelnen wird angenommen, dass aktivierte Th1-Zellen und Th17-Zellen eine Hauptrolle bei der Entwicklung einer EAE/MS spielen. Bei den Th1-Zellen handelt es sich um IFN- $\gamma$  und bei den Th17-Zellen um IL-17, IL-22 und IL21-produzierende T-Lymphozyten. Aktivierte T-Zellen regulieren Integrine, wie VLA-4, hoch und können dann die BHS überschreiten; dort wird ihnen Antigen von ZNS-residenten oder eingewanderten APC präsentiert. Diese können Makrophagen oder aktivierte Mikroglia und in bestimmten Fällen auch DCs oder Astrozyten sein. Beim Auftreffen auf das Antigen werden die autoreaktiven T-Zellen reaktiviert und differenziert, wobei diese dann ihre charakteristischen Zytokine produzieren und damit benachbarte Immun- oder Nervenzellen aktivieren, sodass weitere Entzündungszellen in das ZNS einwandern und die Entzündungskaskade aufrechterhalten. Von diesen sind es insbesondere aktivierte Makrophagen, von denen angenommen wird, dass sie das ZNS indirekt und direkt schädigen, indem sie das Myelin phagozytieren und Axone schädigen (Barnett et al. 2004; 2009). Sowohl B-Lymphozyten als auch Plasmazellen tragen durch Bildung von Antikörper gegen Komponente des ZNS zur Pathogenese der MS, aber auch der EAE bei (Lassmann 2008).

Als sogenannte APC können B-Zellen zusätzlich proinflammatorisch mit regulierenden Funktionen wirken (Weber et al. 2010). Je nach ausgewähltem Modell und Zeitpunkt kann eine B-Zell-Depletion positive, aber auch negative Auswirkungen auf den Verlauf der EAE haben (Matsushita et al. 2008; Weber et al. 2010). Th2-Zellen, die IL-4 produzieren, können die Antikörperproduktion steigern. CD8 (zytotoxische) T-Zellen können den Schaden durch weitere Zytokinproduktion sowie Granzym- und Perforinproduktion verstärken und Axone direkt durchtrennen (Fletcher et al. 2010). Die Entzündung kann aufgehoben werden, wenn entzündungshemmende Zytokine, wie z. B. IL-10 oder andere immunregulatorische Mechanismen wie T<sub>reg</sub>-Zellen oder NK-Zellen ins Spiel kommen. Dadurch wird eine fortschreitende, nicht-remittierende Form der EAE ausgelöst, charakterisiert durch multifokale, teilweise konfluierende mononukleäre, entzündliche Infiltrate und Demyelinisierung in der peripheren weißen Substanz des Rückenmarks (Day 2005). Wichtigster Effektor bei der Gewebedestruktion sind neben den T- und B-Lymphozyten die Makrophagen (Day 2005; Lassmann 2008). Lange Zeit wurde vermutet, dass CD4+ Th1-Zellen, die sich mit Hilfe von IL-12 entwickeln und IFN- $\gamma$  ausschütten, als alleinige Effektor-T-Zellen wirken und Th<sub>17</sub>-Zellen zeitgleich eine eher protektive Funktion haben (Liblau et al. 1995; Domingues et al. 2010). Zahlreiche Untersuchungen zeigten jedoch, dass weder ein Mangel an IFN- $\gamma$  noch IL-12 auf eine reduzierte EAE-Suszeptibilität hinweisen (Ferber et al. 1996; Becher et al. 2002; Gran et al. 2002). Stattdessen scheinen IL-23-defiziente Mäuse (erblich oder durch Behandlung mit Antikörper hervorgerufen) zu einer reduzierten EAE-Empfänglichkeit zu steuern (Cua et al. 2003; Chen 2006). Mit Hilfe von IL-23 scheinen sich naive T<sub>H</sub>-Zellen zu Th17-Zellen zu differenzieren. Durch adoptivem Transfer konnte das hohe enzephalitogene Potenzial dieser Zellen belegt werden (Langrish et al. 2005). Dies deutet auf eine bedeutende Funktion von Th17-Zellen in der Ausbildung der EAE hin. Studien zeigten also, dass neben den Th1- auch Th17-Lymphozyten eine EAE bewirken können, auch wenn sie ein unterschiedliches histopathologisches Muster und andere Chemokinexpressionen im ZNS zeigen (Kroenke et al. 2008; Domingues et al. 2010). Weitere Untersuchungen bewiesen, dass das von Th17-, Th1- und womöglich weiteren Helferzellen produzierte Zytokin GM-CSF eine wichtige Rolle bei der Enzephalitogenität der T<sub>H</sub>-Zellen spielt (Kroenke et al. 2008; El-Behi et al. 2011; Grifka-Walk et al. 2015). Typischerweise zeigen Th17-Zellen eine hohe Anpassungsfähigkeit und sind somit nicht nur in der Lage einen zytotoxischen Th1-Phänotyp anzunehmen, sondern auch ein Th2 ähnliches Zytokinprofil zu entwickeln (Cosmi et al. 2010; Domingues et al. 2010). Gleichermaßen verhalten sich CD8+Zellen, die zum einen zur Immunantwort bei der EAE verhelfen können oder regulatorisch und protektiv wirken (Montero et al. 2004; Linker et al. 2005; York et al. 2010).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der EAE-Pathogenese** (modifiziert nach Esser et al. 2009 [Creative Commons CC-BY-NC-ND License]).

### 1.7.2 Vergleich der MS und EAE

Die MS Erkrankung ist eine spontan auftretende Erkrankung, deren Auslöser nicht bekannt ist, während es sich bei der EAE um eine aktiv induzierte, meist mit starken Adjuvantien hervorgerufene Erkrankung handelt. Die Erforschung der EAE erfolgt an genetisch homogenen Tieren, während jeder Patient ein genetisches Unikat ist. Obwohl grundlegende histopathologische Gemeinsamkeiten zu beobachten sind, gibt es doch auch einige bedeutsame Unterschiede. Im klassischen Modell der EAE überwiegen CD4<sup>+</sup> Zellen in den Läsionen, während in den MS-Läsionen CD8<sup>+</sup> Zellen dominieren. Nicht nur das Verteilungsmuster der EAE-Läsionen, sondern auch der meist monophasische Krankheitsverlauf unterscheidet sich von der MS. Außerdem lassen sich bei der EAE Erkrankung Läsionen eher im Rückenmark finden. Dies wird als Ursache dafür angesehen, dass viele Therapieansätze, die im Tiermodell getestet wurden, nicht effektiv oder gar schädlich für Patienten sind (Sriram und Steiner 2005). Trotzdem bildet die EAE bis zum heutigen Tag ein altbewährtes Modell zur Untersuchung der MS Erkrankung, auch wenn kein Tiermodell die komplette Entität der MS abbildet, sondern nur einzelne Teilbereiche zeigen kann (Gold 2006; Steinman und Zamvil 2006).

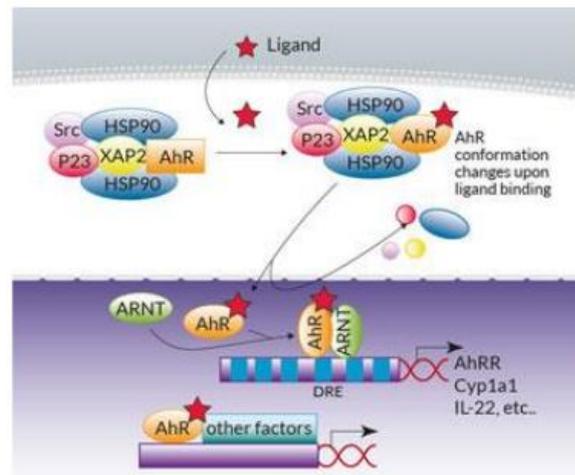
## 1.8 Der Arylkohlenwasserstoffrezeptor

Der Arylkohlenwasserstoffrezeptor (AhR) ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der durch strukturell vielfältige endogene Liganden und exogene Chemikalien aktiviert werden kann. Seine Hauptfunktion ist die Interaktion des Organismus mit der Umwelt, weswegen die Expressionsrate in Zellen von Grenzflächenorganen wie Lunge, Darm und Haut besonders hoch ist (Banchereau et al. 1998; Esser et al. 2009; Li et al. 2011; Zhou et al. 2016). Dort ist der AhR primär für die Homöostase des Immunsystems zuständig, weswegen er in den meisten Immunzellen ebenfalls exprimiert wird (z.B. B- und T-Zellen, Plasmazellen, Th17,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und DCs (Marcus et al. 1998; Veldhoen et al. 2008; Jux et al. 2009; Martin et al. 2009; Esser et al. 2009; Stockinger et al. 2011; Quintana et al. 2013; Esser und Rannug 2015; Villa et al. 2017)). Außerdem kann im ZNS ein Vorkommen des AhR beobachtet werden, wobei Astrozyten die höchsten Expressionsraten aufweisen, wohingegen Neurone und andere Glia-Zellen nur eine geringe Expression zeigen (Rothhammer et al. 2016).

### 1.8.1 Funktion

Der AhR hat verschiedene Funktionen, welche unter anderem die Metabolisierung von organischen Molekülen (Williamson et al. 2005), die Kontrolle des Zellwachstums, die zelluläre Differenzierung und die Modulation der Immunantwort umfassen (Li et al. 2011). Die jeweilige Reaktion des Organismus auf eine AhR-Aktivierung hängt primär vom Liganden und vom Zelltyp ab, was in Kapitel 1.8.2 näher ausgeführt wird. Generell kann festgestellt werden, dass der AhR als inaktives Protein im Zytoplasma liegt, wo er durch Aktinfilamente verankert ist und mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP 90), dem AhR-wechselwirkenden Protein (AIP), der c-SRC-Proteinkinase und dem Co-Chaperon p23 einen Multiproteinkomplex bildet. Bei Ligandenbindung erfährt der AhR eine Konformationsänderung, wodurch er sich vom Multiproteinkomplex löst, seinen Interaktionspartner *AhR nuclear translocator* (ARNT) bindet und in den Kern transloziert (Esser und Rannug 2015). Dort wirkt AhR als Transkriptionsfaktor und induziert die Transkription bestimmter Zielgene, wie zum Beispiel Indolamin 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) oder Peptiden aus der Cytochrom P450 (CYP)-Familie, denen eine wichtige Rolle in der metabolischen Verstoffwechslung verschiedener Moleküle zukommt (Veldhoen et al. 2009; Quintana et al. 2013; Stockinger et al. 2014). AhR-Liganden werden im Darm von einer Vielzahl unterschiedlicher Darmbakterien produziert und sind für das Funktionieren des Darmimmunsystems besonders wichtig. Hier kann der AhR unter anderem durch die Induktion der Produktion von proinflammatorischen Th17- oder antiinflammatorischen T<sub>reg</sub>-Zellen zur Aufrechterhaltung des Darmepithels beitragen

(Sabatino et al. 2017). Außerdem wurde bewiesen, dass die Aktivierung des AhR in Immunzellen zu einer Veränderung der Expression verschiedener proinflammatorischer Cytokine (z.B. IL-22) führt, was ihn auch zu einem möglichen Ziel für immunmodulatorische Therapien, wie z.B. für die MS macht (Pallotta et al. 2014; Wheeler et al. 2017).



**Abbildung 6: Der AHR-Signalweg in schematischer Darstellung.** AhR-Liganden gelangen in das Zellinnere und binden an den AhR, sodass dieser in den Kern wandert, an ARNT bindet und zum Transkriptionsfaktor wird. Dadurch werden dann Gene abgelesen. (Mit freundlicher Genehmigung durch Joncker 2022).

### 1.8.2 Liganden

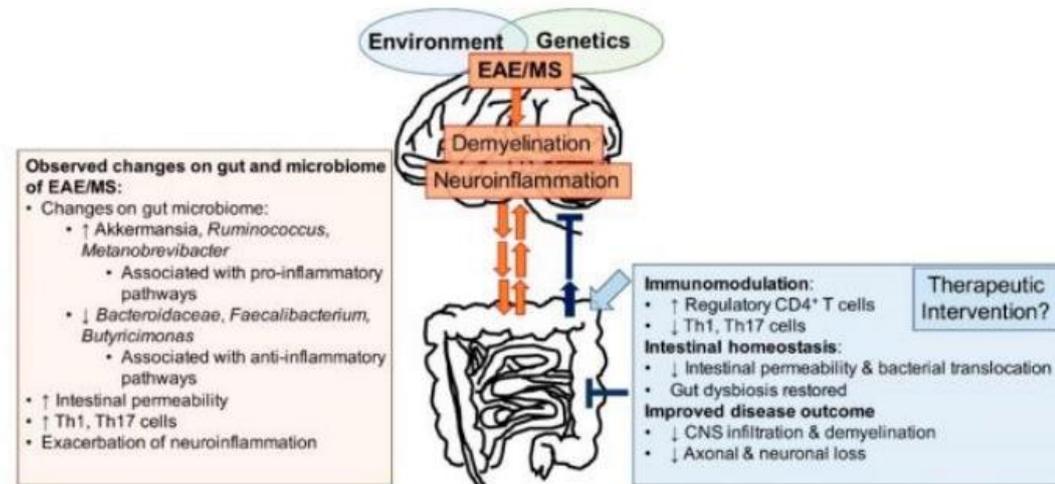
Obwohl der AhR nur eine Andockstelle hat, kann es an eine hohe Anzahl von strukturell unterschiedlichen Molekülen binden, solange sie eine bestimmte Größe und planare Form zeigen. Die Liganden lassen sich grob in drei Gruppen einteilen, nämlich exogene synthetische Liganden, exogene natürliche Liganden und endogene Liganden. Zu den exogenen synthetischen Liganden zählt die Chemikalie Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). TCDD erlangte seine Bekanntheit im Vietnamkrieg, wo es als Teil eines Gases und damit als chemische Waffe eingesetzt wurde. Es wird im Menschen kaum verstoffwechselt und hat eine sehr lange Halbwertszeit von circa 7 Jahren und führte in den Nachkommen derer, die mit dem Gas in Berührung kamen, zu Geburtsdefiziten: Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise auch Benzo[a]pyren oder Naphthoflavone. Zu den natürlichen exogenen Liganden zählen zum Beispiel Indolderivate, die von verschiedenen Pflanzen gebildet werden und z.B. durch die Nahrungsaufnahme oder Atmung über die Grenzflächenorgane mit dem Organismus in Berührung kommen. Natürliche AhR Liganden hängen oft mit dem Tryptophan-Stoffwechsel zusammen. Mit Hilfe von Sonnenlicht kann beispielsweise aus der Aminosäure Tryptophan in der Haut das Molekül 6-Formylindole-[3,2b]-carbazol (FICZ) produziert werden, das ebenfalls

zu den endogenen AhR-Liganden gehört. Darüber hinaus können auch Darmbakterien Tryptophan-Metabolite bilden und sekretieren, welche über ihre Wechselwirkung mit dem AhR für ein funktionierendes Darmimmunsystem wichtig sind (Schmidt et al. 1996; Hahn et al. 2009; Quintana et al. 2013; Stockinger et al. 2014; Esser und Rannung 2015).

### 1.8.3 Die Darm-Gehirn-Achse

Aktuelle Studien zeigten in EAE-Tiermodelle sowie bei MS-Patienten, dass eine Immunantwort im ZNS zu Veränderungen im Darmmikrobiom führt, weshalb an dieser Stelle näher auf die sogenannte Darm-Gehirn-Achse eingegangen wird. Die Kommunikation zwischen dem Gehirn und dem Darm beruht auf einer gegenseitigen Wechselwirkung, wie beispielsweise über Hormone, Botenstoffe oder sensorische Neuronen. Über die Darm-Gehirn-Achse steuert der Verdauungstrakt Hunger und Appetit, beeinflusst die Stimmung, Emotionen und kognitive Prozesse. In entgegengesetzter Richtung hat das ZNS einen Einfluss auf das Darmmikrobiom und die Immunzell-Untergruppen, die im intestinalen lymphoiden Gewebe gebildet werden. Studien zeigen, dass das MS-Darmmikrobiom allgemeine Veränderungen aufweist, von denen einige mit der Förderung entzündlicher Zytokine und einer allgemeinen Entzündung verbunden sind. Abbildung 7 zeigt auf der linken Seite Veränderungen des Darms und Mikrobioms bei EAE/MS im Vergleich zu Kontrolltieren bzw. gesunden Kontrollpatienten. Dazu gehören zum Beispiel:

- Veränderungen am Darmmikrobiom wie:
  - die Zunahme proinflammatorischer Bakterientypen
  - die Reduktion entzündungshemmender Bakterien, die typischerweise mit entzündungshemmenden Prozessen verbunden sind
- Die Erhöhung der intestinalen Permeabilität
- Eine erhöhte Anzahl von Th1- und Th17-Zellen
- Verschlimmerung der Neuroinflammation



**Abbildung 7: Die Darm-Gehirn- Achse und deren Wechselwirkungen** (modifiziert nach Kirby und Ochoa-Repáraz 2018 [Creative Commons Attribution CCBY License])

Auf der rechten Seite sind einige Auswirkungen des Darms auf das ZNS dargestellt, von denen angenommen wird, dass sie durch therapeutische Interventionen beeinflusst werden können. Hierzu zählen:

- Die Modulation von Immunantworten über eine Erhöhung der regulatorischen CD4<sup>+</sup> Zellen sowie eine Reduktion von Th1- und Th17-Zellen
- Die Verringerung der intestinalen Permeabilität, bakterielle Translokation
- Die Wiederherstellung der Darmsymbiose
- Die Verringerung der Infiltration und Demyelinisierung des ZNS, welche schließlich zu einem verringerten Verlust von Axonen und Neuronen führt

**Letztendlich sind weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet erforderlich, um die komplexen Interaktionen zwischen dem Darmmikrobiom und –immunsystem und ZNS-spezifischer Immunität besser zu verstehen und, die gezielte Beeinflussung der Darmmikrobiota zu erforschen, um damit neuartige Therapiestrategien zu entwickeln.**

#### 1.8.4 AhR und EAE

Studien zeigten, dass die Aktivierung des AhR durch den TCDD Liganden zu einer Erhöhung der Anzahl an T<sub>reg</sub>-Zellen und einer Reduzierung der Anzahl an Th17-Zellen führt, wodurch es insgesamt zu einer weniger ausgeprägten EAE kommt (Quintana *et. al.* 2008). Die Aktivierung des AhR durch das ITE (Indolylcarboxythiazolcarbonsäuremethylester), einen endogenen AhR-Liganden, führt ebenfalls zu einer weniger ausgeprägten EAE durch vermehrte Bildung von DC und T<sub>reg</sub>-Zellen (Quintana *et al.* 2010). Verstärkt wird die EAE durch Bindung des FICZ-Liganden, welcher zu einer verringerten Bildung von T<sub>reg</sub>-Zellen und TH<sub>17</sub>-Zellen führt

(Quintana et al. 2008; Veldhoen et al. 2008). Studien zeigen, dass Mäuse mit einem AhR-*knockout* insgesamt eine weniger schwere EAE entwickelten (Veldhoen et al. 2008). AhR-defiziente Makrophagen produzieren in EAE als Reaktion auf LPS weniger entzündungsfördernde Zytokine (Kimura et al. 2009). Weitere Studien zeigten, dass der AhR auf dendritischen Zellen (DCs) stark exprimiert wird und deren Differenzierung und Funktion stark beeinflusst (Gutierrez-Vasquez und Quintana 2018). Die AhR-gesteuerte Produktion bestimmter Substanzen durch DCs fördert unter anderem die Differenzierung der FoxP3-Expression regulatorischer T-Zellen, die die Entwicklung einer EAE unterdrücken (Quintana et al. 2010). Damit hat also der AhR in dendritischen Zellen eine entzündungshemmende Funktion.

### 1.8.5 AHR und Multiple Sklerose

MS erkrankte Patienten zeigten in Studien niedrigere Werte an zirkulierendem AHR als Gesunde, woraus sich schließen lässt, dass der AHR eine wichtige Bedeutung bei der MS-Pathogenese haben könnte (Rothhammer et al. 2016). In einem MS-Modell, der EAE, erhöhte der AHR Knock-down die Krankheitswerte, während die Aktivierung von AHR mit AHR-Agonisten wie TCDD, Indol-3-Carbinol (I3C) und Diindolylmethan (DIM) sie verringerte (Busbee et al. 2013). Das Fortschreiten der EAE-Erkrankung wurde durch eine erhöhte Expression von *Forkhead Box P3* (FOXP3), eine erhöhte Anzahl an entzündungshemmenden T<sub>reg</sub>-Zellen und eine verringerte proinflammatorische Th17-Expansion erreicht (Quintana et al. 2013). Der AHR-Agonist FICZ linderte bei systemischer Verabreichung ebenfalls das Fortschreiten der EAE-Erkrankung und verringerte den EAE-Score in Mausmodellen (Duarte et al. 2013). Die lokale Verabreichung von FICZ erhöhte jedoch die Th17-Expansion, was wiederum zu erhöhten EAE-Krankheitswerten führte (Hanieh et al. 2014). Der Mechanismus, der durch den FICZ zu unterschiedlichen AHR-Aktivierungsreaktionen führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Trotzdem wurden gegensätzliche Wirkungen auf Th17-Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Verabreichungsmethode und/oder der Dosis gezeigt. Außerdem scheint der AHR, wie zuvor erläutert, eine wichtige Funktion im Kontext der Darm-Hirn-Achse, welche zur Schwere der EAE-Erkrankung beiträgt, indem sie die Entzündungsreaktion der Astrozyten und damit den EAE-Score reguliert zu haben. Die Entfernung von diätetischem TRP erhöht den EAE-Score. Im Umkehrschluss kann der EAE-Score nach der Wiedereinführung von TRP bei AHR-WT-Mäusen verringert werden, jedoch nicht bei AHR<sup>-/-</sup>-Mäusen (Rothhammer et al. 2016). Laquinimod ist ein derzeit in der Entwicklung befindliches Medikament, das die BHS passiert und EAE in einer AHR-abhängigen Weise verbessern kann (Wheeler et al. 2017). Daher könnte der AHR ein wichtiger Modulator bei der MS und ein therapeutisches Ziel für die zukünftige Entwicklung von MS-Medikamenten sein.

## 1.9 Fragestellung

Der AhR-Signalweg moduliert die Differenzierung und Funktion verschiedener Zellpopulationen, von denen viele eine bedeutende Rolle bei der Neuroinflammation haben. Darüber hinaus wurde bereits bewiesen, dass ein *Knock-Out* des AhR die EAE-Induktion behindert. Um herauszufinden, auf welchen Zelltyp dieser Effekt zurückzuführen ist, wurde der AhR in der vorliegenden Arbeit zell-spezifisch ausgeknockt. Anschließend wurde eine aktive EAE induziert und eine histologische Auswertung durchgeführt, um die Läsionslast, die T-Zellinfiltration sowie die Makrophagen und Mikrogliaaktivierung zu beurteilen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Substanzen

**Tabelle 3:** Angewendete Chemikalien für histologische und immunhistochemische Färbungen

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol reinst (Isopropanol)	Chemsolute <sup>1</sup>
3-3'-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid (DAB) <b>DAB-Lösung:</b> 25 mg DAB 20 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% 50 ml PBS	Sigma-Aldrich <sup>2</sup>  Sigma-Aldrich Merck <sup>3</sup> AppliChem <sup>4</sup>
<b>Aqua dest. und bidest.</b>	
Citratpuffer 10 Mm	Merck
Ethanol 99%, vergällt mit Methylethylketon 1%	Chemie-Vertrieb Hannover <sup>5</sup>
Fetales Kälberserum (FCS) Fetales Kälberserum 10%: Verdünnung in PBS	Biochrom <sup>6</sup>
Lithiumcarbonat <b>Lithiumcarbonatlösung 0,05%:</b> 0,5 g Lithiumcarbonat auf 1000 ml Aqua bidest.	Merck  Merck
<i>Luxol-Fast-Blue</i> (LFB) <b>LFB-Lösung:</b> 1g LFB 1000 ml Ethanol 96% 5 ml Essigsäure 10%	Clin-Tech Limited <sup>7</sup>  Clin-Tech Limited  Merck
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Paraffin, Paraplast Plus	McCornick Scientific <sup>8</sup>
Peroxidase-konjugiertes Avidin, ExtrAvidin, verdünnt 1:1000 in FCS 10%	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	AppliChem
Salzsäure 25% <b>1%ige Salzsäure-Alkohol-Lösung:</b> 175 ml Isopropanol 100% 750 ml Aqua dest. 25 ml 25%ige Salzsäure	Merck  Chemsolute  Merck
Schiff-Reagenz	Sigma
Wasserstoffperoxid 30% Wasserstoff 3%: Verdünnung mit PBS	Merck
Xylol	Chemsolute

- 1) Chemsolute, Marke der Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
- 2) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 3) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- 4) AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- 5) Chemie-Vertrieb Hannover GmbH & Co. Hannover KG, 30163 Hannover
- 6) Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- 7) Clin-Tech Limited, Unit G, Perram Works, Guildford, UK

8) McCornick Scientific Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

### 2.1.2 Antikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verdünnung
<b>Primärantikörper:</b> Kaninchen-anti-CD3	SP7 (IgG, monoklonal)	DCS <sup>1</sup>	1:150 in FCS 10%
Ratte-anti-MAC3	M3/84 (IgG, monoklonal)	BD	1:200 in FCS 10%
<b>Sekundärantikörper:</b> Ziege-anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert	Polyklonal	Dianova <sup>2</sup>	1:500 in FCS 10%
Ziege-anti-Ratte-IgG, biotinyliert	Polyklonal	Dianova <sup>2</sup>	1:500 in FCS 10%

1) DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG Hamburg, Deutschland

2) Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transgene Mäuse

Alle Tierversuche wurden an der Universitätsmedizin Göttingen von Dr. Stefan Nessler und Dr. Erika Avendaño Guzman durchgeführt. Die Tiere wurden einem konstanten 12h/12h Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt und *ad libitum* mit Nahrung und Wasser versorgt. Die Versuche wurden unter Berücksichtigung aller relevanter nationaler und internationaler Richtlinien bezüglich der Verwendung von Tieren zu Forschungszwecken durchgeführt. Genehmigungen des niedersächsischen Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) lagen vor. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 6-8 Wochen genutzt. Alle transgenen Linien wurden auf einem C57BL/6-Hintergrund gezüchtet. Um die Auswirkungen der AhR-Signalübertragung auf bestimmte Immunzellen zu untersuchen, wurden zellspezifische AhR-KO-Mausstämme generiert. Kurz zusammengefasst wurde mittels des Cre/loxP-Systems ein zellspezifischer *Knock-out* des AhR erzeugt, d.h. es wurden zellspezifische Cre-Rekombinase-Linien (CD11c-Cre, FoxP3-Cre, GFAP-Cre und CD4-Cre) mit AhR fl/fl-Mäusen gekreuzt, um den AhR in dendritischen Zellen, regulatorischen T-Zellen, Astrozyten und CD4+ T-Zellen spezifisch zu eliminieren. Als Kontrollen wurden AhR<sup>fl/fl</sup> Mäuse ohne Cre Rekombinase verwendet. Die verwendeten *Knock-out*-Linien werden wie in der nachfolgenden Tabelle 5 bezeichnet.

**Tabelle 5: Bezeichnung der verwendeten Knock-out-Linien**

Verwendete Knock-out-Linien	Bezeichnung
AhR <sup>fl/fl</sup>	Kontrollgruppe
CD4 <sup>Cre</sup> AhR <sup>fl/fl</sup>	CD4+ T-Zellen = AhR <sup>ΔCD4</sup>
CD11c <sup>Cre</sup> AhR <sup>fl/fl</sup>	Dendritische Zellen = AhR <sup>ΔCD11c</sup>
GFAP <sup>Cre</sup> AhR <sup>fl/fl</sup>	Astrozyten = AhR <sup>ΔGFAP</sup>
FoxP3 <sup>Cre</sup> AhR <sup>fl/fl</sup>	Regulatorische T-Zellen = AhR <sup>ΔFoxP3</sup>

### 2.2.2 Immunisierung und EAE Induktion

AhR<sup>ΔCD4</sup>, AhR<sup>ΔCD11c</sup>, AhR<sup>ΔGFAP</sup>, AhR<sup>ΔFoxP3</sup> und Kontrolltiere wurden s.c. mit insgesamt 200 µg MOG<sub>35-55</sub>-Peptid in Freundschem Adjuvans immunisiert, das in einem Volumen von je 50 µl in die inguinalen und axillären Hautfalten injiziert wurde. Begleitet wurde die Immunisierung von einer intraperitonealen Injektion von 400 ng PTX am Tag der Immunisierung und zwei Tage später.

### 2.2.3 Scoring der klinischen EAE Symptome

**Tabelle 6: Scoring der klinischen EAE Symptome**

Score	Einschränkung
0	Keine Einschränkung
0,5	Leichte Ataxie
1	Schwanzlähmung, Ataxie
2	Ataxie, leichte Hinterbein Lähmung
3	Komplette Hinterbein Lähmung
4	Tetraparese
5	Tod

Die Tiere wurden nach der EAE Induktion täglich hinsichtlich des Auftretens von klinischen Symptomen untersucht. Hierbei wurde die Symptomatik mithilfe eines etablierten Scoring-Systems beurteilt und protokolliert.

### 2.2.4 Gewebeasservation

Zwecks histologischer Untersuchung wurden die Mäuse transkardial perfundiert, zuerst mit PBS und dann mit 4% PFA. Das Gewebe wurde anschließend 48 Stunden in 4% PFA bei 4°C nachfixiert. Das Rückenmark wurde aus dem Spinalkanal heraus präpariert, in circa 0,5 cm lange Segmente geschnitten und Gemäß der üblichen Verfahren entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden 2-3 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf Objektträger gezogen.

### 2.2.5 Histologische Färbung

Zur Beurteilung der Läsionslast und zum Nachweis der Demyelinisierung wurde eine Luxol-Fast-Blue/Perjodsäure-Schiff (LFB/PAS) Färbung der Rückenmarksquerschnitte vollzogen. Das alkohol-lösliche Kupferphthalocyanin *Luxol-Fast-Blue* erlaubt eine gute Darstellung der Myelinscheiden, da das LFB mit den Phospholipiden des Myelins reagiert und es türkisblau darstellt. Durch die Ergänzung der PAS-Färbung werden Zellkerne blau oder violett, Kapillaren rot und graue Substanz sowie demyelinisierte Läsionen blassrosa dargestellt, da das PAS unsubstituierte 1,2-Glykole oxidiert und dadurch Basalmembranen, Bindegewebsfasern, Zellwände, glykogenhaltige Zellen und Glykolipide rot anfärbt. Für die anschließende Färbung des Gewebes erfolgt eine Entparaffinierung durch das Bad in Xylol und anschließend einem Xylol-Isopropanol-Gemisch. Anschließend werden die Rückenmarksquerschnitte in **Isopropanol 90%** überführt, in LFB-Lösung bei 60 °C im Wärmeschrank über Nacht inkubiert. Nach visueller Kontrolle erfolgt für circa eine Minute die Differenzierung in Lithiumcarbonatlösung, 70%igem Isopropanol sowie Aqua dest. Anschließend wird zweimal mit Aqua dest. gespült, sodass danach die Färbung mit 1%iger Perjodsäure bei Raumtemperatur für fünf Minuten erfolgen kann. Dann erfolgt erneuert das Spülen mit Leitungswasser für weitere fünf Minuten und abschließend das zweimalige gründliche Spülen mit destilliertem Wasser. Danach werden die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten in das Schiffsche-Reagenz eingetaucht. Unter fließendem Leitungswasser werden dann die Schnitte für fünf Minuten gehalten und schließlich für zwei Minuten die Gegenfärbung mit Hämalaulösung und eine abschließende Differenzierung in 1%iger Salzsäure-Alkohol-Lösung durchgeführt. Danach werden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für fünf bis zehn Minuten gebläut, um schließlich in aufsteigender Alkoholreihe bis Isopropanol 100% dehydriert, kurz in Isopropanol-Xylol (Verhältnis 1:1) und dreimal für drei Minuten in Xylol eingebracht und schließlich mit Entellan eingedeckelt zu werden.

### 2.2.6 Immunhistochemische Färbung

Mithilfe immunhistochemischer Färbungen können Immunzell-Infiltrationen im Rückenmarksgewebe gezielt angefärbt und quantifiziert werden, wodurch das Ausmaß der Entzündung beurteilt werden kann. Das Färbeprinzip beruht auf der Affinität von Antikörpern zu spezifischen Epitopen. Diese Antikörper-Antigen-Reaktion ermöglicht die gezielte Markierung bestimmter Proteine.

### 2.2.6.1 Indirekte Methode

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle kurz das Prinzip der hier angewandten indirekten Methode, auch als indirekte Immunfluoreszenz (IIF) bezeichnet, geschildert werden. Hierbei wird unterschieden zwischen der Zwei-Schritt-Methode und der Drei-Schritt-Methode. Auf das zu untersuchende Präparat (Gewebeprobe, Zellen) wird im ersten Schritt der **Zwei-Schritt-Methode** ein spezifischer **Primärantikörper** gebracht und im nächsten Schritt ein **Sekundärantikörper** aufgetragen. Dieser richtet sich gegen den Primärantikörper und ist mit einem Enzym verknüpft, das für die Farbentstehung durch eine **Enzym-Substrat-Reaktion** verantwortlich ist. Der nun sichtbare Farbstoff gilt als Indikator für das Epitop. Diese Methode wird angewandt, wenn große Mengen an Antigenen vorhanden sind und dargestellt werden sollen. Die **Drei-Schritt-Methode** wird immer dann angewandt, wenn es darum geht geringe Mengen an Antigenen darzustellen, da sie der Signalverstärkung dient. Hierbei kommt es zum Einsatz eines mit einem Enzym gekoppelten **Tertiärantikörpers**, der dann an den Sekundärantikörper bindet.

### 2.2.6.2 Direkte Methode

Die direkte Methode kombiniert das zu testende Antigen (Protein) mit einem spezifischen Primärantikörper, welcher direkt mit einem Enzym oder Fluorophor (Texas Red, Rhodamin oder Fluorescein) gekoppelt ist. Dieser Antikörper-Enzym-Komplex knüpft an das Antigen, sodass nicht gebundene Antikörper abgespült werden. Nun wird im nächsten Schritt dem Enzym ein spezifisches Substrat zugegeben, sodass eine kolorierende Enzym-Substrat-Reaktion stattfindet. Der Farbstoff wird überall dort gebildet, wo auch eine immunochemische Reaktion erfolgt ist und macht diese damit erkennbar. Geeignet ist diese Methode vor allem zur Veranschaulichung mehrerer unterschiedlicher Proteine innerhalb eines Präparats.

### 2.2.6.3 *Labelled* (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB)

Es ist die am häufigsten angewendete Methode, beruhend auf die hohe Zuneigung von Avidin (Hühnereiweiß) und Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) gegenüber Biotin. Beide Proteine verfügen über jeweils vier Andockstellen für Biotin. Bei Mischung von Avidin mit einem biotinylierten Marker (Biotingold, Biotinenzym) wird ein Komplex mit vielen Biotinmarkern und einigen Avidinmolekülen gebildet. Optional kann Avidin an ein Enzym, wie Peroxidase konjugiert werden und damit die Sensitivität des Verfahrens erhöhen (Ramos-Vara 2005). Bei Zugabe von Avidin auf das Präparat werden biotinylierten Antikörper gebunden, wodurch auch kleine Antigenmengen nachgewiesen werden können. Wir verwendeten für unsere Versuchsreihe ausschließlich die Streptavidin-Biotin-Methode mit einem Primärantikörper und

einem biotinylierten Sekundärantikörper. Die an Streptavidin gekoppelte Peroxidase setzt dann das Substrat (DAB) enzymatisch zu einem braunen Farbstoff um. Es erfolgt zunächst eine Entparaffinierung mit Xylol (4x10min) und einem Xylol-Isopropanol-Gemisch und schließlich die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe bis Isopropanol 50% (je 5min) und anschließend eine Wässerung in Aqua dest. (5min). Damit Epitope der Antigene, die teilweise durch Fixierung und Einbettung verändert und damit unzugänglich für Antikörper gemacht wurden wieder zugänglich sind, erfolgte eine Demaskierung der Antigene mittels Citratpuffer (10mM) bei  $\text{pH} = 6,0$  in der Mikrowelle bei 800 Watt für fünfmal drei Minuten. Nachdem Abkühlen der Präparate im Puffer erfolgt das Abspülen mit Aqua dest. und PBS. Danach wird die endogene Peroxidase bei Raumtemperatur mit 3%igem Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für 10 Minuten geblockt und anschließend dreifach mit PBS gespült. Unspezifische Bindungsstellen für die Primärantikörper werden durch 10% FCS Serum 10 Minuten lang blockiert. Ohne vorheriges Abspülen wird der Primärantikörper in einer Blockierungslösung (10% NGS in PBS) entsprechend verdünnt, aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgt dann das dreimalige Spülen mit PBS und das Auftragen des passenden biotinylierten Sekundärantikörpers für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach nochmaliger PBS-Spülung erfolgt eine Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Avidin, 1:1000 verdünnt in Blockierungslösung für 60min bei Raumtemperatur und abschließend erneuert eine Spülung mit PBS. Nach Zugabe der DAB-Lösung und 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert die gekoppelte Peroxidase DAB und es zeigt sich ein bräunlicher Farbniederschlag. Nachdem gründlichen Abspülen mit Aqua dest. erfolgt die Gegenfärbung in Hämalaun für 30 Sekunden. Danach erfolgen wieder das Ausspülen in Aqua dest. und kurzes Dippen in HCl-Alkohol zur Differenzierung. Abschließend wird das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten und eine finale Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, einem Alkohol/Xylol-Gemisch und Xylol durchgeführt. Abschließend werden die Färbungen mit Entellan eingedeckelt.

### **2.2.7 Auswertung und Statistik**

Zur mikroskopischen Erfassung und Auswertung der Läsionslast wurden die LFB/PAS gefärbten Rückenmarksquerschnitte digital mittels eines Photomikroskops (BX63, Olympus), ausgestattet mit einer CCD-Kamera von Olympus und des Programms CellSens Dimension, abfotografiert. Bei Rückenmarkquerschnitten, die sich aus mehreren Bildern zusammensetzten, wurde eine Nachbearbeitung und Zusammensetzung einzelner Querschnitte mit Photoshop CS4 durchgeführt. Die weitere Auswertung erfolgte mittels des Bildbearbeitungs- und Verarbeitungsprogramms ImageJ, wodurch die Gesamtfläche des Rückenmarksquerschnittes,

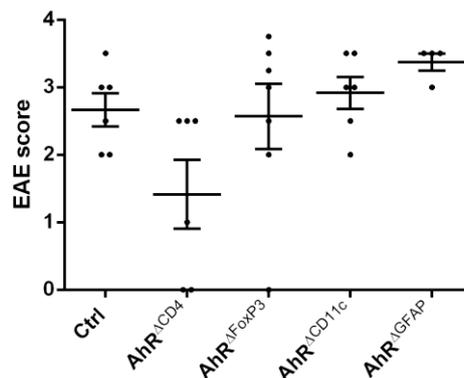
der grauen und weißen Substanz sowie der Läsionen bestimmt werden konnte. Anschließend wurde der Prozentsatz aus der Summe aller Läsionen und der Gesamtfläche der weißen Substanz gebildet, um dann einen Mittelwert aller Tiere innerhalb einer Gruppe bestimmen zu können. Mit Hilfe eines standardisierten Zählgitters wurde die Dichte der CD3-positiven Zellen sowie der MAC-3-positiven Zellen innerhalb der Läsionen pro Objektträger in 400-facher Vergrößerung gezählt. Die ermittelten Messwerte bzw. Zählwerte wurden dann mithilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel bestimmt und weiterverarbeitet. Für jedes Versuchstier wurde damit die Läsionslast (Gesamtfläche der Läsionen dividiert durch die Fläche der weißen Substanz in Prozent) und die Zelldichte (Zellzahl dividiert durch die Gesamtfläche in Quadratmillimeter) berechnet. Die grafische Veranschaulichung und statistische Beurteilung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 6.0. Zur statistischen Analyse wurden die Daten zuerst auf Normalverteilung getestet. Da die Daten größtenteils nicht normal verteilt waren, wurde im Rahmen der Signifikanzanalyse der „Student's t-Test“ für die Berechnung der Signifikanzen angewendet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von unter 0,05 definiert. Die Signifikanzniveaus werden als Sternchen über den Graphen gekennzeichnet.

Dabei entspricht:  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinischer Schweregrad der EAE

Um beurteilen zu können, welchen Einfluss die Deletion des AhR auf einzelnen an der Immunreaktion beteiligten Zellen auf die EAE hat, wurde die klinische Symptomatik der Tiere wie oben beschrieben ermittelt. Dargestellt ist der finale EAE Score vor dem Versuchsabbruch in den verschiedenen Gruppen. Es ist zu erkennen, dass nur die Deletion des AhR auf CD4+ T-Zellen einen klaren Effekt auf die Schwere der EAE hat, wobei der durchschnittliche finale EAE Score der  $AhR^{\Delta CD4}$  Mäuse mit  $1,4 (\pm 1,2)$ , gegenüber  $2,7 (\pm 2,1)$  in der Kontrollgruppe, deutlich niedriger liegt. Für alle anderen Gruppen ist kein deutlicher Effekt auf den Schweregrad der EAE erkennbar.



**Abbildung 8: Finale EAE Scores.** Dargestellt sind die finalen EAE Scores der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich zu Kontroll-Tieren. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier, und der Mittelwert sowie die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) sind graphisch dargestellt.

### 3.2 Histologische Untersuchung

Im Weiteren wurde zusätzlich zum finalen Schweregrad der EAE auch untersucht, inwieweit sich eine Zell-spezifische Deletion des AhR auf die Bildung demyelinisierter Läsionen, die Infiltration von T-Zellen, sowie die Makrophageninfiltration und Mikrogliaaktivierung auswirkt. Zu diesem Zweck wurden histologische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Ausgewertet wurden Rückenmarksquerschnitte von Tieren aller vier transgenen Linien sowie von Kontroll-Tieren in der LFB/PAS, CD3 und MAC3 Färbung. Mit Hilfe der LFB/PAS Färbung wurde die Läsionslast bestimmt. Rückenmarksquerschnitte in der MAC3-Färbung dienen zum Anfärben von Makrophagen und aktivierter Mikroglia. Genauer gesagt handelt es sich hier um eine Färbung gegenüber Mac3, welches ein Glykoprotein ist, dass von

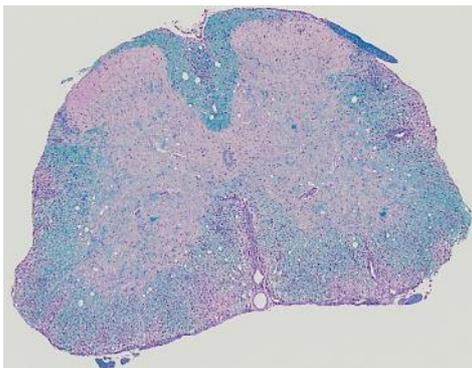
Makrophagen produziert wird. Antikörper gegen Mac3 kolorieren Makrophagen und aktivierte Mikroglia, sowie Strukturen in Lunge, Leber, Milz und Knochenmark, aber nicht in Gehirn, Herz oder Thymus. Um die T-Zell-Infiltration in das Rückenmark zu untersuchen, erfolgte eine Auswertung der immunhistochemischen CD3-Färbungen. Hier handelt es sich um eine Färbung von T-Lymphozyten durch Antikörper, die gegen CD3 gerichtet sind, einem Proteinkomplex aus vier Ketten, der als Ko-Rezeptor für den TCR dient und auf allen T-Zellen exprimiert wird. CD3 ist spezifisch für T-Lymphozyten und nicht-kovalent an den TCR gebunden (Abbas et al. 2014, Chetty und Gatter 1994).

### 3.3 Zellspezifische Deletion des AhR in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

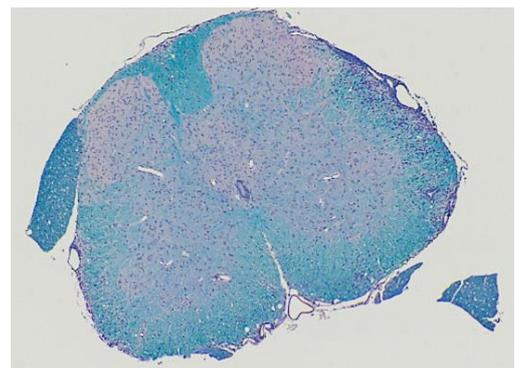
#### 3.3.1 Läsionsgröße

Um das Ausmaß der Entmarkung in AhR<sup>ΔCD4</sup>- und Kontrollmäusen zu bestimmen, wurde in der LFB/PAS-Färbung in jeweils mindestens fünf Rückenmarksquerschnitten pro Tier der Prozentsatz der entmarkten weißen Substanz bestimmt. (Die Auswertung der LFB-PAS Färbung in diesen Tieren ergab, dass) In Tieren der Kontrollgruppe waren durchschnittlich 16,1% ( $\pm 3,7\%$ ) der weißen Substanz demyelinisiert, wohingegen in den AhR<sup>ΔCD4</sup>-Mäusen lediglich 3,2% ( $\pm 1,5\%$ ) der weißen Substanz demyelinisiert waren. Somit weisen die AhR<sup>ΔCD4</sup>-Mäuse hier eine signifikante Verringerung der Läsionsgröße auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).

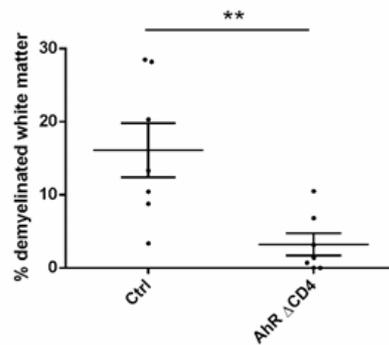
Ctrl



AhR<sup>ΔCD4</sup>



200  $\mu\text{m}$

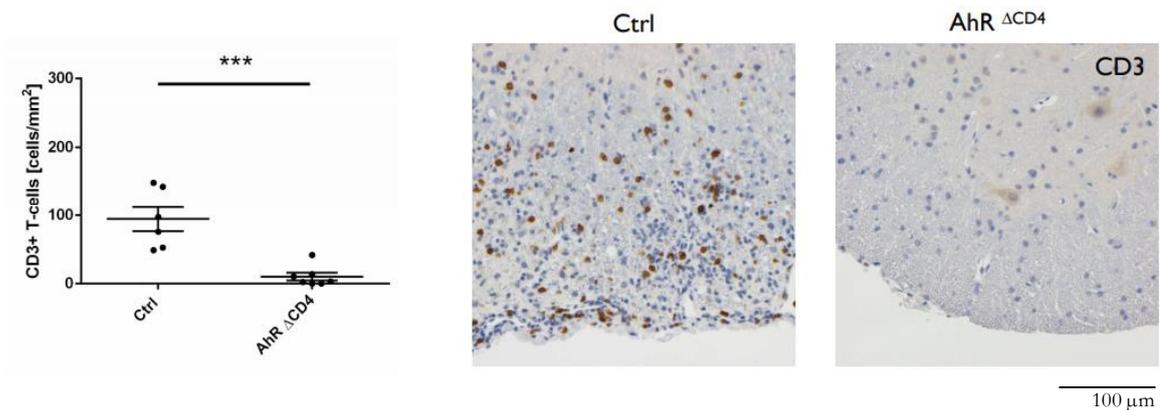


**Abbildung 9: Ausmaß der Entmarkung der weißen Substanz (LFB-PAS) in Kontroll- vs. AhR<sup>ΔCD4</sup>-Mäusen.**

Der Prozentsatz der entmarkten weißen Substanz im Rückenmark wurde in der LFB/PAS-Färbung bestimmt. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors. Dargestellt sind repräsentativ Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 40-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$  (Abb. 9).

### 3.3.2 T-Zellinfiltrat

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen CD3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 94,4 ( $\pm 17,8$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren, wohingegen in den AhR<sup>ΔCD4</sup>-Mäusen lediglich 10,2 ( $\pm 5,7$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren. Somit weisen die AhR<sup>ΔCD4</sup>-Mäuse hier ein signifikant geringeres T-Zell-infiltrat auf (t-Test,  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 10: Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR<sup>ΔCD4</sup>-Mäusen.**

Die Anzahl der CD3-positiven T-Zellen wurde manuell anhand eines Okulargitters für jeden gescannten Schnitt ermittelt und die Zelldichte pro  $\text{mm}^2$  für jedes Tier errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der

Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors. Der Mittelwert errechnet sich aus der Summe aller T- Zellen pro Läsion. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$  (Abb.10).

### 3.3.3 Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung

Um das Ausmaß der Makrophageninfiltration zwischen den Ctrl- und AhR <sup>$\Delta$ CD4</sup> Mäusen vergleichen zu können, wurde anhand eines Okulargitters für jeden gescannten Schnitt die Anzahl der Zellen ermittelt und die Zelldichte pro mm<sup>2</sup> für jedes Tier errechnet. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen MAC3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 169,4 ( $\pm$ 41,2) Zellen pro mm<sup>2</sup> zu finden waren, wohingegen in den AhR <sup>$\Delta$ CD4</sup>-Mäusen lediglich 7,4 ( $\pm$ 3,1) Zellen pro mm<sup>2</sup> zu finden waren. Somit weisen die AhR <sup>$\Delta$ CD4</sup>-Mäuse hier ein signifikant geringeres Vorkommen von Makrophagen/aktivierter Mikroglia auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).

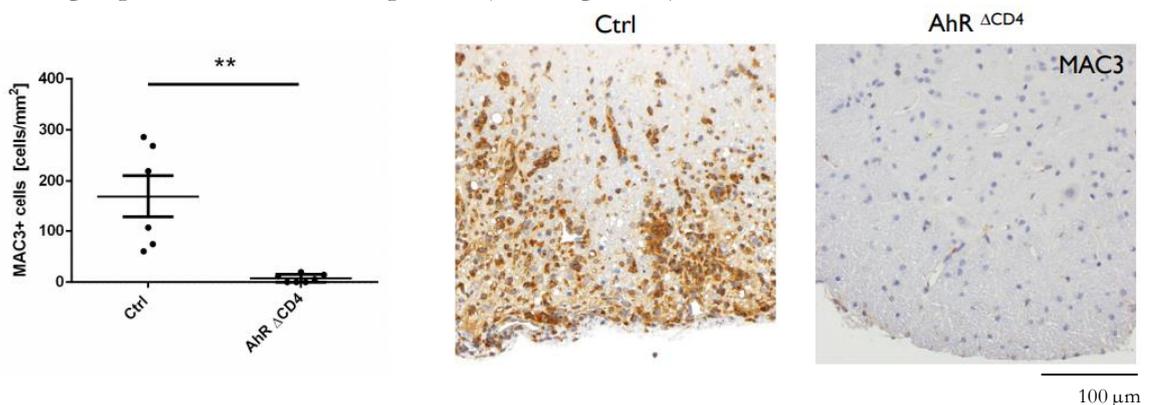


Abbildung 11: MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR <sup>$\Delta$ CD4</sup>-Mäusen.

Die Anzahl der MAC3-positiven Makrophagen/aktivierter Mikroglia wurde **manuell** ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors (t-Test,  $p < 0,01$ ). Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$  (Abb.11).

### 3.4 Zellspezifische Deletion des AhR in FoxP3+ regulatorischen T-Zellen

#### 3.4.1 Läsionsgröße

Um den Grad der Entmarkung in  $AhR^{\Delta FoxP3}$  und Kontrollmäusen zu bestimmen, wurde in der LFB/PAS-Färbung in Rückenmarksquerschnitten pro Tier der Prozentsatz der entmarkten weißen Substanz bestimmt. Die Auswertung der LFB-PAS Färbung in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 16,1% ( $\pm 3,7\%$ ) der weißen Substanz demyelinisiert waren, wohingegen in den  $AhR^{\Delta FoxP3}$ -Mäusen lediglich 9,9% ( $\pm 3,0\%$ ) der weißen Substanz demyelinisiert waren. Somit weisen die  $AhR^{\Delta FoxP3}$ -Mäuse hier keine signifikante Verringerung der Läsionsgröße auf, (t-Test,  $p = ns$ ).

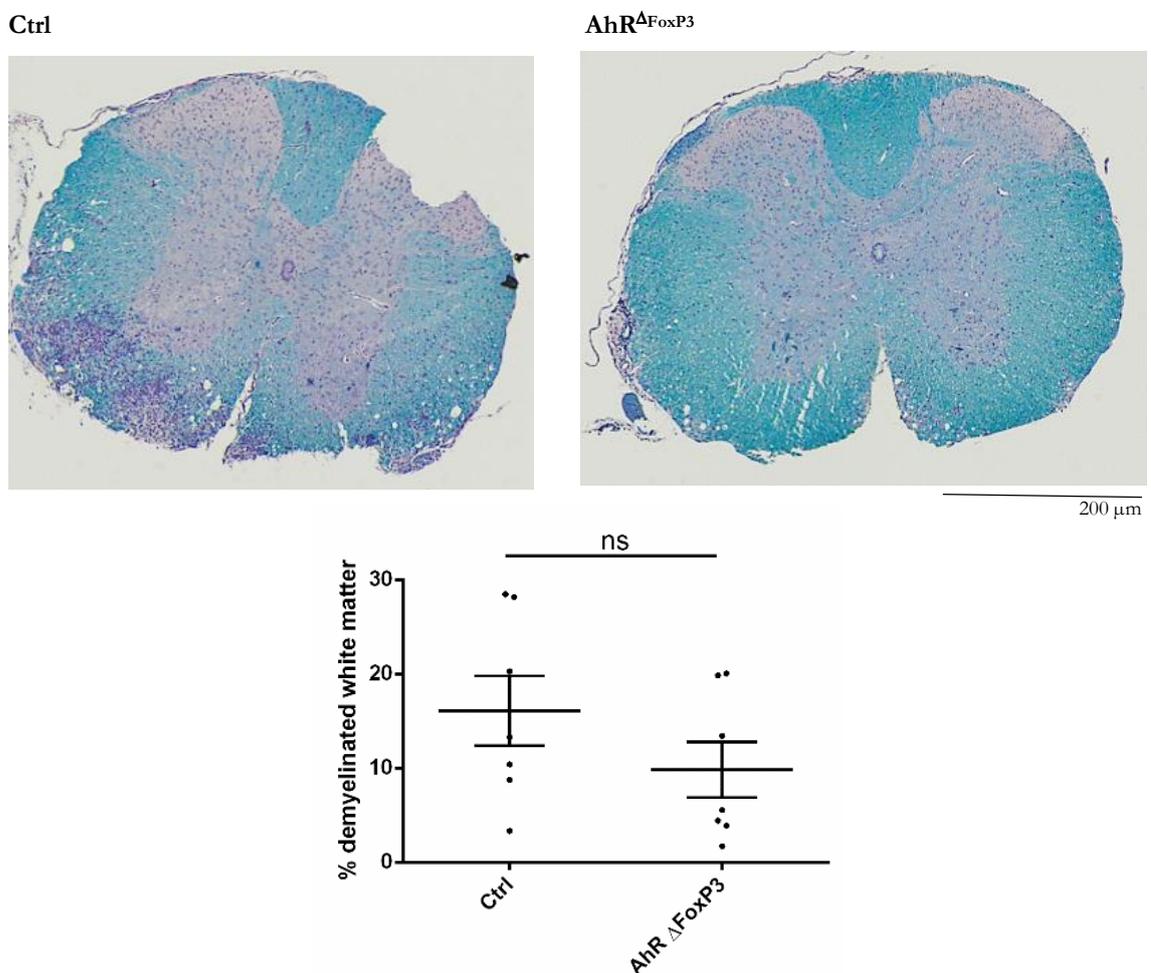


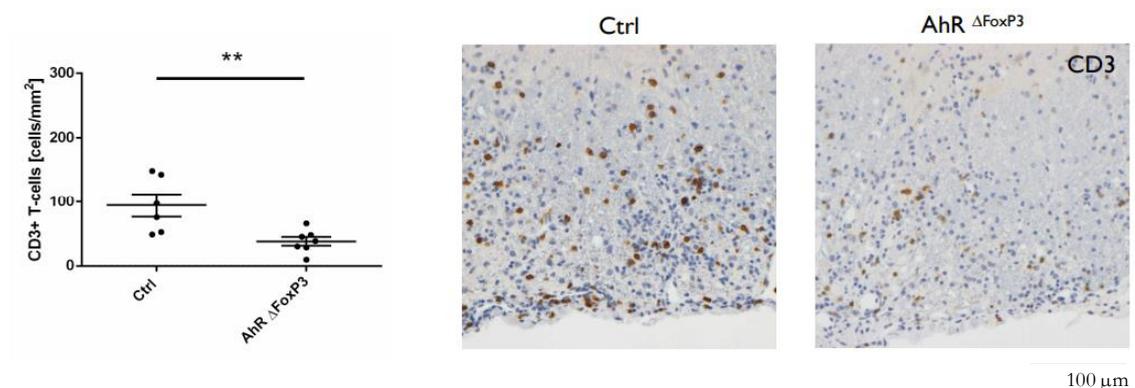
Abbildung 12: Ausmaß der demyelinisierten Läsionen mittels LFB-PAS in Kontroll- vs.  $AhR^{\Delta FoxP3}$ -Mäusen.

Die Größe der Läsion wurde als Fläche der LFB-negativen Areale der weißen Substanz im Verhältnis zum Gesamtareal der weißen Substanz bestimmt. Die Resultate sind in Prozent angegeben. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the*

Mean = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors (t-Test,  $p =$  nicht signifikant). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 40-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$  (Abb.12).

### 3.4.2 T-Zellinfiltrat

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen CD3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 94,4 ( $\pm 17,8$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren, wohingegen in den AhR $^{\Delta\text{FoxP3}}$ -Mäusen lediglich 38,2 ( $\pm 6,7$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren. Somit weisen die AhR $^{\Delta\text{FoxP3}}$ -Mäuse hier ein signifikant geringeres T-Zell-infiltrat auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 13: Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR $^{\Delta\text{CD4}}$ -Mäusen.**

Die Anzahl der CD3-positiven T-Zellen wurde manuell ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$  (Abb.13).

### 3.4.3 Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen MAC3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 169,4 ( $\pm 41,2$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren, wohingegen in den AhR $^{\Delta\text{FoxP3}}$ -Mäusen 110,0 ( $\pm 28,9$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren. Somit weisen die AhR $^{\Delta\text{FoxP3}}$ -Mäuse hier kein signifikant unterschiedliches Vorkommen von Makrophagen/aktivierter Mikroglia auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).

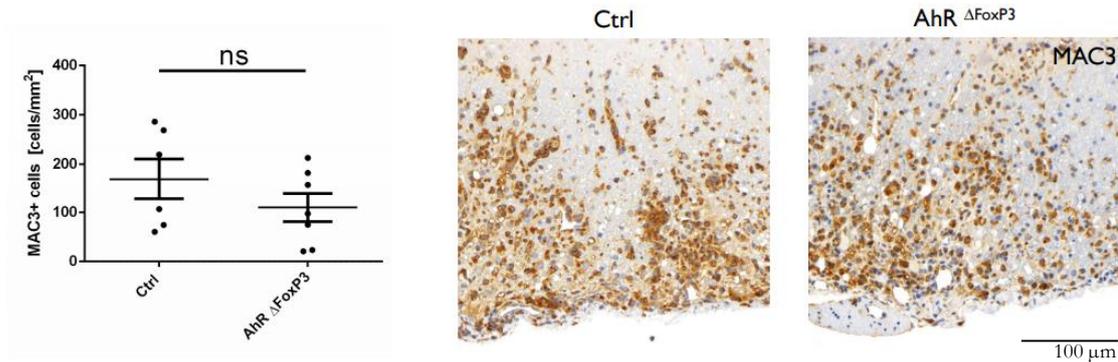


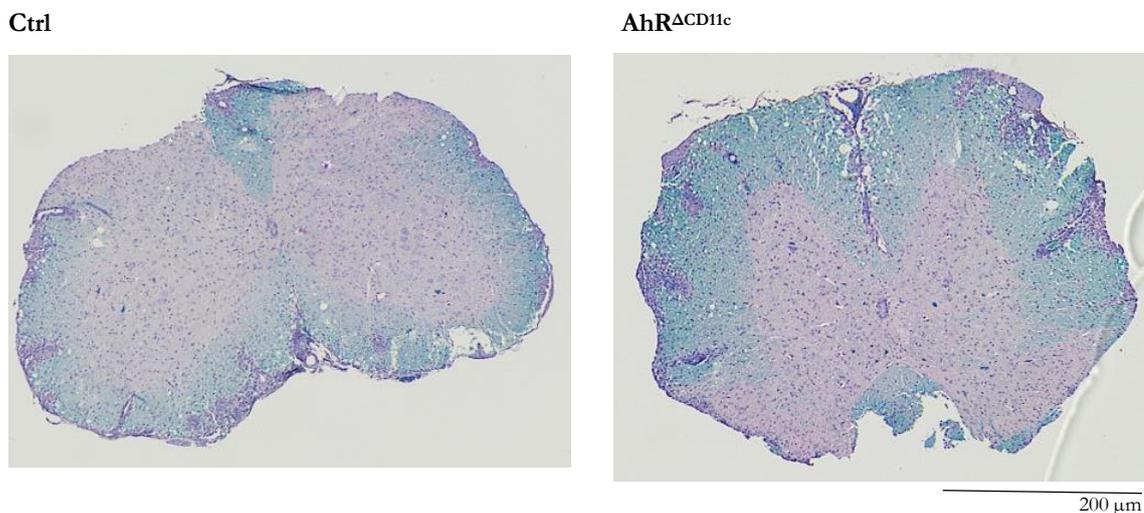
Abbildung 14: MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR $\Delta$ FoxP3-Mäusen.

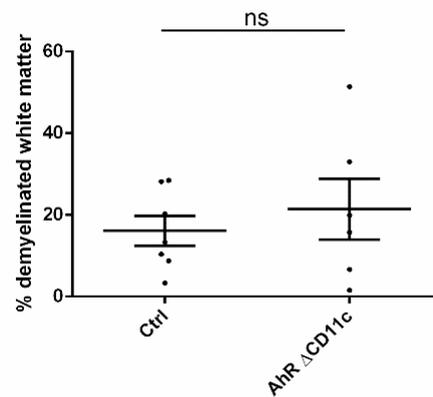
Die Anzahl der MAC3-positiven Makrophagen/aktivierter Mikroglia wurde manuell ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m (Abb.14).

### 3.5 Zellspezifische Deletion des AhR in CD11c+ dendritischen Zellen

#### 3.5.1 Läsionsgröße

Die Auswertung der LFB-PAS Färbung in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 16,1% ( $\pm$ 3,7%) der weißen Substanz demyelinisiert waren, wohingegen in den AhR $\Delta$ CD11c-Mäusen 21,4% ( $\pm$ 7,5%) der weißen Substanz demyelinisiert waren. Somit weisen die AhR $\Delta$ CD11c-Mäuse hier keine signifikante Verringerung der Läsionsgröße auf.



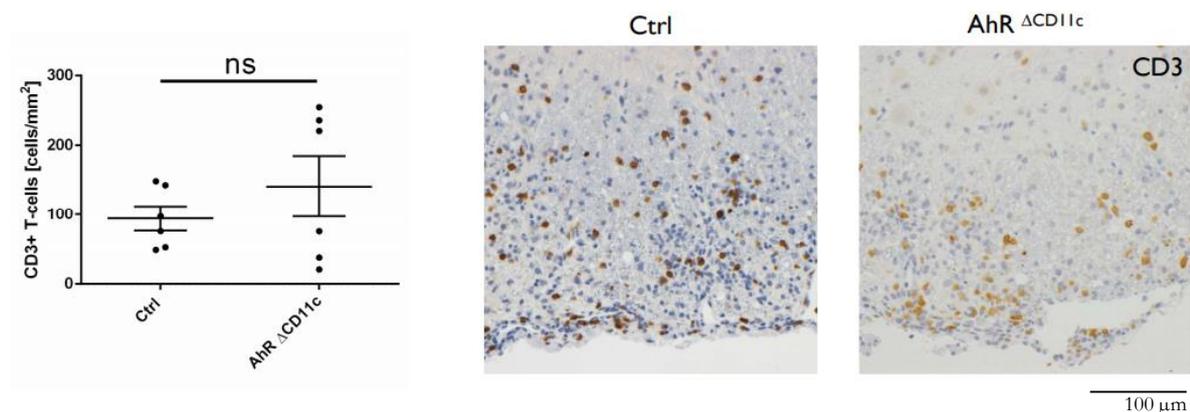


**Abbildung 15:** Ausmaß der demyelinisierten weißen Substanz mittels LFB-PAS in Kontroll- vs. AhR $\Delta$ CD11c-Mäusen.

Die Größe der Läsion wurde als Fläche der LFB-negativen Areale der weißen Substanz im Verhältnis zum Gesamtareal der weißen Substanz bestimmt. Die Resultate sind in Prozent angegeben. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 40-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 200  $\mu$ m (Abb.15).

### 3.5.2 T-Zellinfiltrat

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen CD3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 94,4 ( $\pm$ 17,8) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren, wohingegen in den AhR $\Delta$ CD11c-Mäusen 140,9 ( $\pm$ 43,8) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren. Somit weisen die AhR $\Delta$ CD11c-Mäuse hier keine signifikante Reduzierung des T-Zell-Infiltrats auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 16:** Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR $\Delta$ CD11c-Mäusen.

Die Anzahl der CD3-positiven T-Zellen wurde manuell ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-

Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$  (Abb.16).

### 3.5.3 Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen MAC3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 169,4 ( $\pm 41,2$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren, wohingegen in den  $\text{AhR}^{\Delta\text{CD11c}}$ -Mäusen 229,6 ( $\pm 65,7$ ) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren. Somit weisen die  $\text{AhR}^{\Delta\text{CD11c}}$ -Mäuse hier keine signifikant unterschiedliche Dichte von Makrophagen/aktivierten Mikrogliazellen auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).

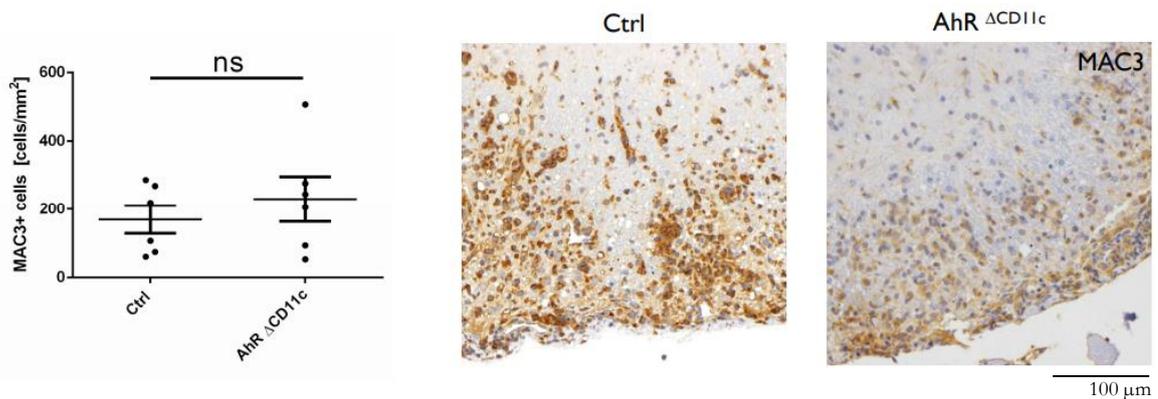


Abbildung 17: MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs.  $\text{AhR}^{\Delta\text{CD11c}}$ -Mäusen.

Die Anzahl der MAC3-positiven Makrophagen/aktivierter Mikroglia wurde manuell ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen knockout des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$  (Abb.17).

## 3.6 Zellspezifische Deletion des AhR in GFAP+ Astrozyten

### 3.6.1 Läsionsgröße

Die Auswertung der LFB-PAS Färbung in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 16,1% ( $\pm 3,7\%$ ) der weißen Substanz demyelinisiert waren, wohingegen in den  $\text{AhR}^{\Delta\text{GFAP}}$ -Mäusen 12,6% ( $\pm 3,4\%$ ) der weißen Substanz demyelinisiert waren. Somit weisen die  $\text{AhR}^{\Delta\text{GFAP}}$ -Mäuse keine signifikant unterschiedliche Läsionsgröße auf.

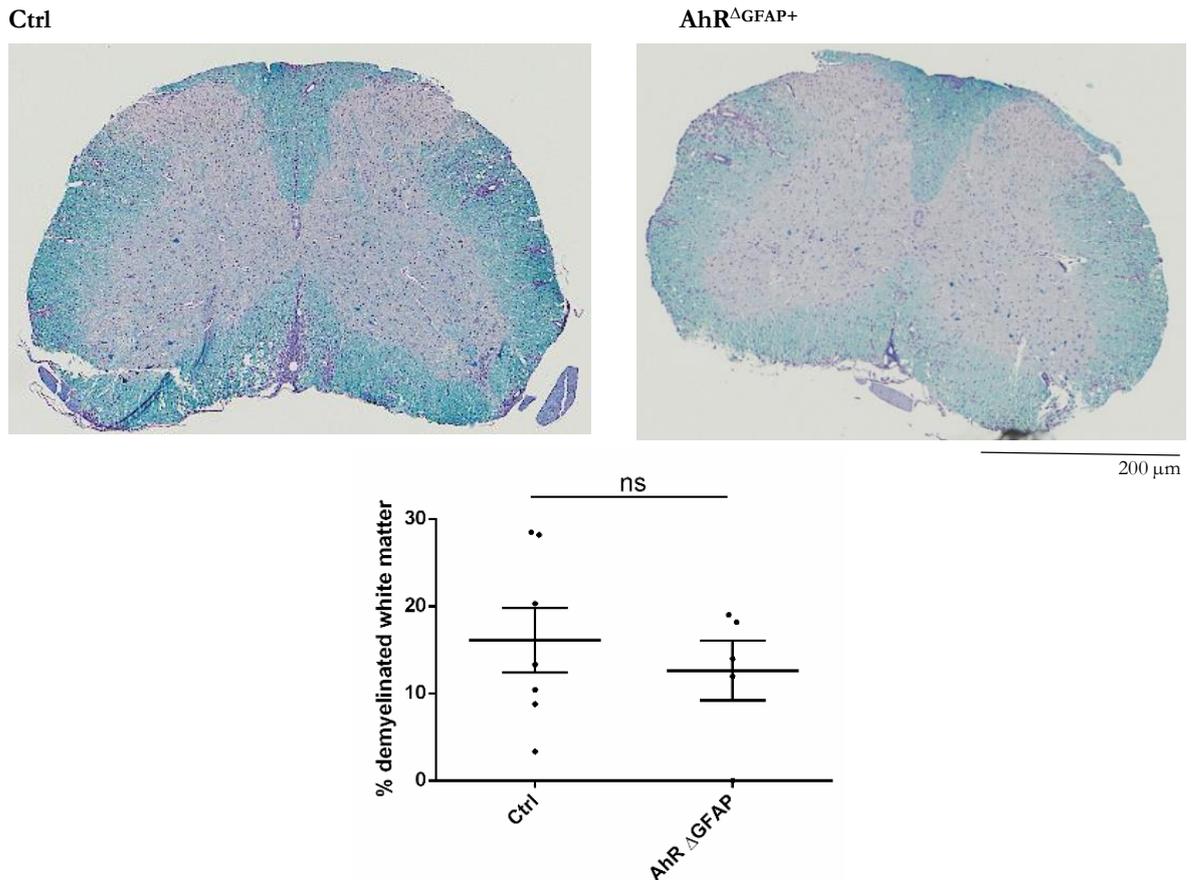


Abbildung 18: Ausmaß der demyelinisierten Läsionen mittels LFB-PAS in Kontroll- vs. AhR $\Delta$ GFAP $^{+/-}$ .

Die Größe der Läsion wurde als Fläche der LFB-negativen Areale der weißen Substanz im Verhältnis zum Gesamtareal der weißen Substanz bestimmt. Die Resultate sind in Prozent angegeben. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knockout* des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 40-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 200  $\mu$ m (Abb.18).

### 3.6.2 T-Zellinfiltrat

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen CD3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 94,4 ( $\pm$ 17,8) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren, wohingegen in den AhR $\Delta$ GFAP-Mäusen 58,4 ( $\pm$ 23,3) Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu finden waren. Somit weisen die AhR $\Delta$ GFAP-Mäuse hier keine signifikante Reduzierung des T-Zell-infiltrat auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).

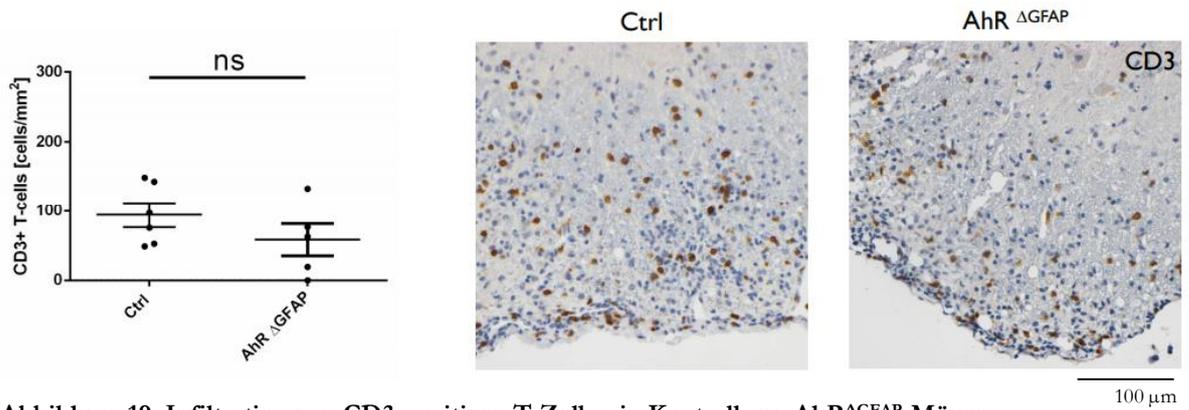


Abbildung 19: Infiltration von CD3-positiven T-Zellen in Kontroll- vs. AhR<sup>ΔGFAP</sup>-Mäusen.

Die Anzahl der CD3-positiven T-Zellen wurde manuell ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen knockout des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μm (Abb.19).

### 3.6.3 Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen MAC3 in diesen Tieren ergab, dass in Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 169,4 ( $\pm 41,2$ ) Zellen pro mm<sup>2</sup> zu finden waren, wohingegen in den AhR<sup>ΔGFAP</sup>-Mäusen 265,2 ( $\pm 65,7$ ) Zellen pro mm<sup>2</sup> zu finden waren. Somit weisen die AhR<sup>ΔGFAP</sup>-Mäuse hier kein signifikantes Vorkommen von Makrophagen/aktivierter Mikroglia auf (t-Test,  $p < 0,01$ ).

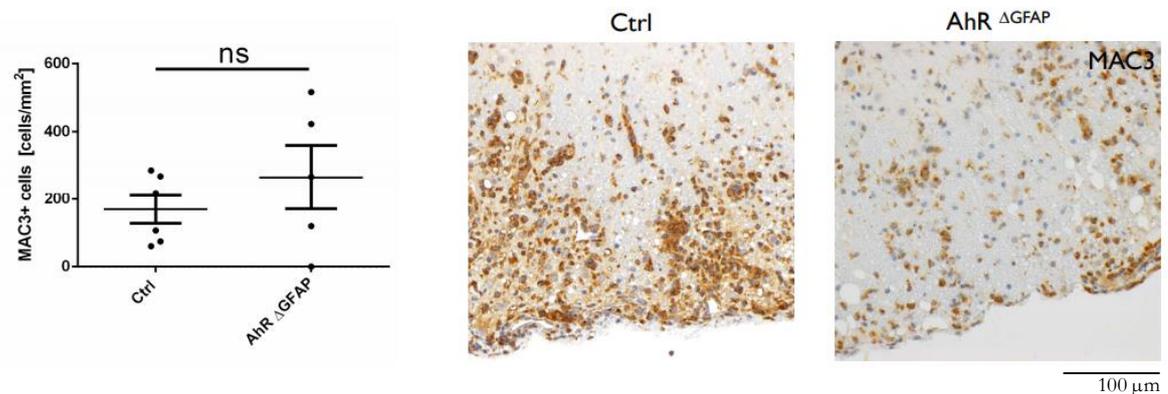


Abbildung 20: MAC3-positive Makrophagen/aktivierte Mikroglia in Kontroll- vs. AhR<sup>ΔGFAP</sup>-Mäusen.

Die Anzahl der MAC3-positiven Makrophagen/aktivierter Mikroglia wurde manuell ermittelt und die Zelldichte wurde errechnet. Aufgetragen wurde der Mittelwert pro Tier (ein Punkt repräsentiert ein Tier), sowie der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean* = SEM) von Tieren der Kontrollgruppe versus Tieren mit einem CD4-spezifischen *knock-Out* des AhR-Rezeptors. Rechts finden sich repräsentative Aufnahmen von Rückenmarksquerschnitten in 200-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$  (Abb.20).

## 4 Diskussion

Um die Rolle des AhR bei der Pathogenese der EAE bewerten zu können, untersuchten wir den Krankheitsverlauf, das Ausmaß der Entmarkung, die T-Zell-Infiltration und die Makrophageninfiltration/Mikrogliaaktivierung bei Mäusen mit zellspezifischem AhR-*knockout* in verschiedenen an der peripheren Immunantwort beteiligten Zelltypen sowie in Astrozyten. In der vorliegenden Arbeit wurden ein zellspezifischer AhR-*knockout* in T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen, dendritischen Zellen sowie Astrozyten untersucht.

Der ausgeprägteste Effekt konnte in Mäusen mit einem AhR-*knockout* in CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Ich konnte in diesen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren eine schwächere Krankheitsausprägung, ein reduziertes Ausmaß an entmarkten Läsionen, eine verringerte T-Zellinfiltration sowie auch eine verringerte Makrophageninfiltration und Mikrogliaaktivierung feststellen. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass dem AhR auf CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen eine entscheidende Rolle während der Ausprägung einer Immunantwort zukommt, hauptsächlich da seine Aktivierung zur Expression und Sekretion von Effektor-Zytokinen wie IL-17 und IL-22 führt (Veldhoen et al. 2008; Esser et al. 2009). Darüber hinaus ist der AhR wichtig für die korrekte Ausdifferenzierung von T-Helfer-Zellen, die eine bedeutende Rolle bei der Invasion von Immunzellen in das ZNS spielen (Rouse et al. 2013; Gutiérrez-Vázquez et al. 2018). In vitro Studien zeigten, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus AhR-defizienten Mäusen zwar eine TH17-mediierte Immunantwort ausbilden können, aber unter Zugabe eines AhR-Liganden keine vermehrte Ausdifferenzierung von TH17-Zellen stattfindet (Duarte et al. 2013). AhR-defiziente TH17-Zellen sind darüber hinaus in der Lage IL-22 zu produzieren, jedoch in verringerter Menge (Veldhoen et al. 2008; Yeste et al. 2014). Es wurde jedoch gezeigt, dass IL-22 für die Pathogenese der EAE keine wichtige Rolle zukommt, da IL-22 *knockout* Mäuse keine veränderte Suszeptibilität aufweisen (Kreymborg et al. 2007). Daher ist der in dieser Studie gezeigte Effekt höchstwahrscheinlich nicht auf eine veränderte IL-22 Sekretion zurückzuführen. Die Bedeutung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 für verschiedene Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel MS oder EAE, wurde in verschiedenen Studien belegt. Im Falle der EAE konnte gezeigt werden, dass IL17-*knockout* Mäuse eine verringerte Suszeptibilität aufweisen (Regen et al. 2021). Rezente Studien belegen außerdem den Einfluss der Darm-Gehirn-Achse auf die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise MS. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Modulation der Ausbildung von Autoimmunprozessen im ZNS von EAE Mäusen durch IL-17 primär durch eine Modulation des Darm-Mikrobioms hervorgerufen wird und nicht wie bisher vermutet durch Prozesse im

Gehirn (Regen et al. 2021). Da der AhR bekanntermaßen einer der Hauptregulatoren des Darm-Mikrobioms ist, liegt die Vermutung nahe, dass die deutlich weniger ausgeprägte EAE in AhR<sup>ΔCD4</sup> Mäusen ebenfalls zum Teil auf ein verändertes Darm-Mikrobiom zurückzuführen sein könnte.

Wie oben bereits beschrieben, ist der AhR von entscheidender Bedeutung bei der Ausdifferenzierung von TH17-Zellen zu FoxP3+ regulatorischen T-Zellen, da durch die Aktivierung des AhR diverse entscheidende intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden. Generell können T<sub>reg</sub>-Zellen, welche eine immunmodulatorische Funktion im Körper besitzen, die Proliferation von Effektor-T-Zellen und die Produktion von Zytokinen limitieren und somit Autoimmunität verhindern. Es konnte in unterschiedlichen EAE-Modellen gezeigt werden, dass der *knockout* von T<sub>reg</sub>-Zellen zu einer Verschlimmerung des klinischen Verlaufs der EAE führt (Zhang et al. 2004; McGeachy et al. 2005; Gärtner et al. 2006). Auf Grundlage dieser Kenntnisse würde man nun erwarten, dass der *knockout* von AhR in FoxP3+ Zellen dazu führt, dass die Ausreifung von T<sub>reg</sub>-Zellen gestört ist. Obwohl diese Studie keine explizite Quantifizierung von FoxP3+ T<sub>reg</sub>-Zellen beinhaltet, deutet die signifikant geringere T-Zell-Infiltration in den AhR<sup>ΔFoxP3</sup> Mäusen durchaus darauf hin. Dies sollte zum besseren Verständnis der Pathogenese in diesen Tieren jedoch in zukünftigen Studien geklärt werden. Das verringerte Auftreten von T<sub>reg</sub>-Zellen sollte nach aktuellem Wissensstand zu einer Verschlimmerung der EAE führen. Dies konnte in dieser Studie jedoch nicht beobachtet werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und AhR<sup>ΔFoxP3</sup> Mäusen in Bezug auf den klinischen Verlauf, die Läsionslast oder die Makrophageninfiltration und Mikrogliaaktivierung beobachtet werden. Der Grund für das Ausbleiben des erwarteten Effekts ist im Rahmen der vorliegenden Studie nicht zu erkennen, man kann nur anhand von publizierten Studien spekulieren. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass die immunmodulatorische Funktion der FoxP3+ T<sub>reg</sub>-Zellen von *T regulatory type 1* Zellen aufgefangen wird. Da diese kein FoxP3 exprimieren, wird ihre Ausdifferenzierung und Funktion durch den *knockout* von AhR unter FoxP3 nicht beeinträchtigt. Somit sind weitere Experimente erforderlich, um die Gründe für diese Effekte erklären zu können.

Eine Studie von Quintana und Kollegen konnte zeigen, dass der AhR auf dendritischen Zellen (DCs) und Astrozyten eine entzündungshemmende Funktion hat. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein *knockout* des AhR in einer dieser beiden an der angeborenen Immunantwort beteiligten Zellpopulationen die Pathogenese der EAE verändert. Es wurde gezeigt, dass der AhR sowohl die Ausdifferenzierung als auch die Funktion von DCs

beeinflusst (Quintana et al. 2015). Die Hauptaufgabe der DCs besteht in der Präsentation von Antigenen gegenüber T- und B-Zellen. Im Kontext der EAE ist dies hauptsächlich wichtig für die Differenzierung verschiedener T-Zell Subpopulationen, vor allem von regulatorischen FoxP3+ T-Zellen. Dies lässt annehmen, dass ein *Knockout* des AhR in CD11c+ DCs eine verringerte Ausdifferenzierung von T<sub>reg</sub>-Zellen und somit eine schwerere EAE zur Folge hat. Obwohl die ausgewerteten Parameter alle eine Verschlimmerung der EAE andeuten, konnten wir hier keine signifikanten Veränderungen nachweisen. Auch hier würde sich eine Quantifizierung der FoxP3+ T<sub>reg</sub>-Zellen anbieten, um die Ausgangshypothese zu testen. Darüber hinaus wären vermutlich weitere Experimente nötig, um die Effekte in den AhR<sup>ACD11c</sup>-Mäusen besser zu verstehen. Weiterhin ist durchaus denkbar, dass Effekte des *Knockouts* erst durch Zugabe von AhR-Liganden zu Tage treten, auch dies könnte in weiteren Experimenten überprüft werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Aktivierung des AhR in ZNS-residenten Gliazellen, wie zum Beispiel Astrozyten oder Mikroglia, durch entsprechende Liganden zu einer klinisch milderen EAE mit einem geringeren Gewebsschaden führt (Rothhammer et al. 2016; 2018; Wheeler und Quintana 2018; Rothhammer et al. 2021). Es wurde gezeigt, dass die immunmodulatorische Wirkung des AhR auf Astrozyten in der EAE hauptsächlich dadurch zustande kommt, dass unter Zugabe eines AhR-Liganden die Astrozyten-medierte Aktivierung pro-inflammatorischer Mechanismen in Makrophagen und aktivierter Mikroglia verringert ist (Rothhammer et al. 2021). Die vorliegende Studie untersucht nun, ob der *knockout* des AhR in Astrozyten zu einer direkten Immunmodulation führt. Der klinische Verlauf der EAE, hier reflektiert durch den finalen EAE-Score, zeigt eine leichte Tendenz zu einer stärkeren EAE-Ausprägung in den AhR<sup>AGFAP</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Diese erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. In Bezug auf die Dichte von Makrophagen und aktivierter Mikroglia kann ebenfalls eine minimale Tendenz in Richtung einer erhöhten Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen in den AhR<sup>AGFAP</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen festgestellt werden. Da die Aktivierung des AhR auf Astrozyten wie oben erwähnt, zu einer verringerten Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen führt, erscheint dieser Effekt als Resultat des AhR-knockouts auf Astrozyten durchaus plausibel. Jedoch kann in der Auswertung der Läsionslast sowie des T-Zellinfiltrats kein Unterschied beobachtet werden. Publierte Studien legen nahe, dass die Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen durch Astrozyten vor allem einen Effekt auf das progrediente Stadium der EAE hat (Rothhammer et al. 2021). Daher sollten zur besseren Charakterisierung der Effekte des AhR-Knockouts auf Astrozyten zusätzlich spätere Zeitpunkte als der hier gewählte betrachtet werden. Wiederum würde auch hier die Zugabe eines

AhR-Liganden vermutlich die Effekte vergrößern. Auch hier werden weitere Studien nötig sein, um den Einfluss des AhR auf die unterschiedlichen Zelltypen und die komplexen Abläufe während der EAE vollständig zu ergründen.

Zusammenfassend wurde somit der ausgeprägteste Effekt auf die Ausbildung einer Myelinprotein-spezifischen adaptiven Immunreaktion in Mäusen mit einem AhR-Knockout in CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Die vorliegende Studie legt insgesamt nahe, dass der *Knockout* des AhR in FoxP3<sup>+</sup> Zellen und in CD11c<sup>+</sup> DCs eine gestörte Ausreifung und Ausdifferenzierung von T<sub>reg</sub>-Zellen zur Folge haben könnte. Dies erfordert weitere immunologisch ausgerichtete Studien. Abschließend kann auf der Basis dieser Arbeit festgestellt werden, dass dem AhR eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese einer ZNS-spezifischen Autoimmunantwort zukommt. Weitere Studien sind erforderlich, um zu untersuchen, inwiefern dies für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen beim Menschen, wie beispielsweise MS, genutzt werden kann.

## 5 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and molecular immunology. 8. Auflage (Kindle Edition); Elsevier Saunders, Philadelphia 2014

Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C (1995): The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63, 17-27

Albert M, Antel J, Brück W, Stadelmann C (2007): Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17, 129–138

Alharbi FM (2015): Update in vitamin D and multiple sclerosis. *Neurosciences* 20, 329–335

Alonso A, Hernán MA (2008): Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology* 71, 129–135

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

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S et al. (2000): Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192, 393–404

Baggio L, Laureano AM, da Rocha Silla LM, Lee DA (2017): Natural killer cell adoptive immunotherapy: Coming of age. *Clin Immunol.* 177, 3-11

Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252

Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55, 458–468

Barnett MH, Parratt JDE, Pollard JD, Prineas JW (2009): MS: Is it one disease? *Int MS J* 16, 57–65

Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002): Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110, 493–497

Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A (2013): Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45, 1353–1360

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR (1981): Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* 292, 60–61

- Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, Hohlfeld R, Wekerle H (2014): From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun* 54, 33–50
- Berer K, Krishnamoorthy G (2012): Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol* 123, 639–651
- Bitsch A, Brück W (2002): Differentiation of multiple sclerosis subtypes: Implications for treatment. *CNS Drugs* 16, 405–418
- Blanchette F, Neuhaus O (2008): Glatiramer acetate. *J Neurol* 255, 26–36
- Brownell B, Hughes JT (1962): The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25, 315–320
- Brunetti L, Wagner ML, Maroney M, Ryan M (2013): Teriflunomide for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a review of clinical data. *Ann Pharmacother* 47, 1153–60
- Büdingen HC, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M, Goebels N (2008): Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol* 38, 2014–2023
- Büdingen HC, Gulati M, Kuenzle S, Fischer K, Rupprecht TA, Goebels N (2010): Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce “oligoclonal bands”. *J Neuroimmunol* 218, 134–139
- Busbee PB, Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2013): Use of natural *A<sub>B</sub>R* ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev* 71, 353–69
- Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'ambrosia JM, Ludwin SK, Jacobson S (2003): High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 187, 1377–1387
- Chen Y (2006): Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116, 1317–1326
- Chetty R, Gatter K (1994): CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol* 173, 303–307
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016): Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev* 96, 365–408
- Claus M, Greil J, Watzl C (2008): Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *Journal of Immunological Methods* 341, 154–164
- Compston A, Coles A (2008): Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517
- Conradi S, Malzahn U, Schröter F, Paul F, Quill S, Spruth E, Harms L, Bergh F, Ditzenbach A, Georgi T (2011): Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol* 11, 123

- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2003): The biology of human natural killer-cell subset. *Trends in Immunology* 22, 633–640
- Cosmi L, Maggi E, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambri M (2010): Identification of a novel subset of human circulating memory CD4<sup>+</sup> T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 125, 222–230.e1–e4
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T et al. (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744–748
- Damek DM, Shuster EA (1997): Pregnancy and multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 72, 977–989
- Da Mota Gomes M, Engelhardt E, Charcot JM (2013): Father of modern neurology: an homage 120 years after his death. *Arq Neuropsiquiatr* 71, 815–817
- Day MJ: Histopathology of EAE. In: Lavi E, Constantinescu CS (Hrsg.): *Experimental models of multiple sclerosis*. Springer US, Boston 2005, 25–43
- Deisenhammer F (2009): Neutralizing antibodies to Interferon- $\hat{1}2$  and other Immunological Treatments for multiple sclerosis. *CNS Drugs* 23, 379–396
- Derfuss T, Gürkov R, Then Bergh F, Goebels N, Hartmann M, Barz C, Wilske B, Autenrieth I, Wick M, Hohlfeld R (2001): Intrathecal antibody production against chlamydia pneumoniae in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 124, 1325–1335
- Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband e.V. (2022): Was ist multiple Sklerose (MS)? <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/was-ist-ms/>; Zugriff am 11.09.2022
- Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G, Unutmaz D (2010): Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5, e15531
- Dörr J, Döring A, Paul F (2013): Can we prevent or treat multiple sclerosis by individualized vitamin D supply? *EPMA J* 4, 4
- Duarte JH, Di Meglio P, Hirota K, Ahlfors H, Stockinger B (2013): Differential Influences of the aryl hydrocarbon receptor on Th17 mediated responses in vitro and in vivo. *PLoS One* 8, e79819
- El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A (2011): The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12, 568–575
- Engelhardt B (2008): Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines: Treatment targets in multiple sclerosis: 'The ends and the means', European Charcot Foundation Symposium 2007. *J Neurol Sci* 274, 23–26
- Esser C, Rannug A, Stockinger B (2009): The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* 30, 447–54

- Esser C, Rannug A (2015): The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev* 67, 259–279
- Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J (2015): Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86, 26–31
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996): Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156, 5–7
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120, 393–399
- Filippini G, Brusaferrri F, Sibley WA, Citterio A, Ciucci G, Midgard R, Candelise L (2000): Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis *Cochrane Database Syst Rev* (4), CD001331
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG (2010): T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162, 1–11
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175–1189
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006): Multiple Sclerosis - The plaque and Its pathogenesis. *N Engl J Med* 354, 942–955
- Furtado GC, Marcondes MCG, Latkowski JA, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ (2008): Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181, 4648–4655
- Gafson A, Giovannoni G, Hawkes CH (2012): The diagnostic criteria for multiple sclerosis: from Charcot to McDonald. *Mult Scler Relat Disord* 1, 9–14
- Gardener H, Scarmeas N, Gu Y, Boden-Albala B, Elkind MSV, Sacco RL, DeCarli C, Wright CB (2012): Mediterranean diet and white matter hyperintensity volume in the Northern Manhattan Study. *Arch Neurol* 69, 251
- Gärtner D, Hoff H, Gimsa U, Burmester GR, Brunner-Weinzierl MC (2006): CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol* 172, 73–84
- Genain CP, Hauser SL (1997): Creation of a model for multiple sclerosis in callithrix jacchus marmosets. *J Mol Med* 75, 187–197
- Genain CP, Nguyen MH, Letvin NL, Pearl R, Davis RL, Adelman M, Lees MB, Linington C, Hauser SL (1995): Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96, 2966–2974
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999): Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Medicine* volume 5, 170–175

- Gilden DH (2005): Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4, 195–202
- Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Münz C, Sriram S, Steiner I, Hammerschlag MR, Gaydos CA (2006): Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 5, 887–894
- Girardi M (2006): Immunosurveillance and immunoregulation by  $\gamma\delta$  T cells. *J. of Investigative Dermatology* 126, 25–31
- Gold R (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971
- Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A (2002): IL-12p35- deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169, 7104–7110
- Grassiot B, Desgranges B, Eustache F, Defer G (2009): Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review. *J Neurol* 256, 1397-1412
- Greenberg SJ, Ehrlich GD, Abbott MA, Hurwitz BJ, Waldmann TA, Poiesz BJ (1989): Detection of sequences homologous to human retroviral DNA in multiple sclerosis by gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2878–2882
- Grifka-Walk HM, Giles DA, Segal BM (2015): IL-12-polarized Th1 cells produce GM-CSF and induce EAE independent of IL-23. *Eur J Immunol* 0, 1-7
- Guerrero-García J, Carrera-Quintanar L, López-Roa RI, Márquez-Aguirre AL, Rojas-Mayorquín AE, Ortuño-Sahagún D (2016): Multiple sclerosis and obesity: Possible roles of adipokines. *Mediators Inflamm* 2016, 4036232
- Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L (2011): Cost of disorders of the brain in europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 718–779
- Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ (2018): Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity* 48, 19-33
- Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk C, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporal M, Fritz B et al. (2005): Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35, 3343–3352
- Hackett J, Swanson P, Leahy D, Anderson EL, Sato S, Roos RP, Decker R, Devare SG (1996): Search for retrovirus in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40, 805–809
- Hahn ME, Allan LA, Sherr DH (2009): Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem. Pharmacol.* 7, 485–497
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2011): Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One* 6, e161

- Hanie H (2014): Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: Current progress and future trends. *Biomed Res Int* 2014, 520763
- Halachmi E, Ben-Nun A, Lehmann D, Karussis D, Wekerle H, Berke G (1992): Delineation of tissue damage mechanisms in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). I. Cell detachment and lysis induced by encephalitogenic CD4+ T lymphocytes. *J Autoimmun* 5, 411–425
- Harbo HF, Gold R, Tintoré M (2013): Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 6, 237–248
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676–688
- Harrington LD, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005): Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6, 1123–1132
- Hawkes CH (2002): Is multiple sclerosis a sexually transmitted infection? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 439–443
- Hawkes CH (2005): Are multiple sclerosis patients risk-takers? *QJM* 98, 895–911
- Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L (2013): Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol* 28, 867–874
- Hedström AK, Bomfim IL, Barcellos L, Gianfrancesco M, Schaefer C, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L (2014): Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology* 82, 865–872
- Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A (2001): Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 154, 69–74
- Hinghofer-Szalkay H (2022): Erkennung proteolytischer Fragmente über MHC-TCR-Interaktion. <http://physiologie.cc/XVII.7.htm>; Zugriff am 12.09.2020
- Hinghofer-Szalkay H (2022): Lymphozytenklassen und deren Funktionen. <http://physiologie.cc/XVII.3.htm>; Zugriff am 09.12.2020
- Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 72, 871–878
- Hubbard TD, Murray IA, Nichols RG, Cassel K, Podolsky M, Kuzu G, Tian Y, Smith P, Kennett MJ, Patterson AD et al. (2017): Dietary broccoli impacts microbial community structure and attenuates chemically induced colitis in mice in an Ah receptor dependent manner. *J Funct Foods* 37, 685–698
- Hubbard EA, Motl RW, Fernhall B (2018): Sedentary behavior and blood pressure in patients with multiple sclerosis. *Int. J. MS Care* 20, 1–8

Hughes AM, Lucas RM, McMichael AJ, Dwyer T, Pender MP, van der Mei I, Taylor BV, Valery P, Chapman C, Coulthard A (2013): Early-life hygiene-related factors affect risk of central nervous system demyelination and asthma differentially. *Clin Exp Immunol* 172, 466–474

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie*, 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin 2002

Joncker NT (2020): AhR Reporter Cell Lines. <https://www.invivogen.com/ahr-cell-lines>; Zugriff am 12.06.2020

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB (1995): Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 45, 1268–1276

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

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z (2004): Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 173, 2353–2361

Katz Sand IB, Lublin FD (2013): Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Continuum (Minneapolis Minn)* 19, 922–943

Keegan BM, Noseworthy JH (2002): Multiple sclerosis. *Annu Rev Med.* 53, 285-302

Kirby TO, Ochoa-Repáraz J (2018): The gut microbiome in multiple sclerosis: A potential therapeutic avenue. *Med Sci (Basel)* 6, 69

Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T (2009): Der Arylkohlenwasserstoffrezeptor in Kombination mit Stat1 reguliert LPS-induzierte Entzündungsreaktionen. *Mol Immunol* 53, 335-44

Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9, 520–532

Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, Sandberg-Wollheim M, Sheremata WA, Robert-Guroff M, Saxinger CW, Feinberg MB, Wong-Staal F, Gallo RC (1985): Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* 318, 154–160

Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renaud JC, Becher B (2007): IL-22 Is Expressed by Th17 cells in an IL-23-Dependent Fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179, 8098-8104

Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM (2008): IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 205, 1535–1541

Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ (2011): Jean-Martin Charcot: the father of neurology. *Clin Med Res* 9, 46–49

- Kurtzke JF (2013): Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain* 136, 2904–2917
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128, 2705–2712
- Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Koebnick C (2013): Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology* 80, 548–552
- Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Zhang JL (2013): Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups. *Neurology* 80, 1734–1739
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233–240
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115–121
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007): The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17, 210–218
- Lassmann H (2008): Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Curr Opin Neurol* 21, 242–247
- Lauer K (1997): Diet and multiple sclerosis. *Neurology* 49, S55-61
- Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M (1966): Epidemiological study of multiple sclerosis in israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29, 60–68
- Leitliniengruppe Multiple Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2012): S2e-Leitlinie: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Gültig bis 17.02.2022, [https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030-050l\\_S2e\\_Multiple\\_Sklerose\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Archiv-min.pdf](https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030-050l_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_Archiv-min.pdf); Zugriff am 04.12.2019
- Libbey JE, Fujinami RS (2011): Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine* 29, 3356–3362
- Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO (1995): Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol* 16, 34–38
- Lidegaard O, Svendsen AL (2008): Sexual habits before multiple sclerosis: a national case control study. *Mult Scler* 14, 67–72
- Link J, Kockum I, Lorentzen ÅR, Lie BA, Celius EG, Westerlind H, Schaffer M, Alfredsson L, Olsson T, Brynedal B (2012): Importance of human leukocyte antigen (HLA) class I and II alleles on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* 7, e36779

- Linker RA, Sendtner M, Gold R (2005): Mechanisms of axonal degeneration in EAE – lessons from CNTF and MHC I knockout mice. *J Neurol Sci* 233, 167–172
- Li Y, Innocentin S, Withers DR, Roberts NA, Gallagher AR, Grigorieva EF, Wilhelm C, Veldhoen M (2011): Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 147, 629–640
- Lodygin D, Odoardi F, Schlager C, Korner H, Kitz A, Nosov M, van den Brandt, Jens, Reichardt HM, Haberl M, Flugel A (2013): A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity. *Nat Med* 19, 784–790
- Lucchinetti CF, 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
- Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C et al. (2011): Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 2188–2197
- Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of new agents in multiple sclerosis. *Neurology* 46, 907–911
- Makhani N, Morrow SW, Fisk J, Evans C, Beland SG, Kulaga S, Kingwell E, Marriott JJ, Dykeman J, Jetté N, Pringsheim T, Wolfson C, Marrie RA, Koch MW (2014): MS incidence and prevalence in africa, asia, australia and new zealand: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord* 3, 48–60
- Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Agostini S, Piancone F, Caputo D, Maggi F, Clerici M (2013): Torque teno virus (TTV) in multiple sclerosis patients with different patterns of disease. *J Med Virol* 85, 2176–2183
- Marcus RS, Holsapple MP, Kaminski NE (1998): Lipopolysaccharide activation of murine splenocytes and splenic B cells increased the expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 1113–8
- Marcus JF, Waubant EL (2013): Updates on Clinically Isolated Syndrome and diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurohospitalist* 3, 65–80
- Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojavljevic N, Dujmovic I, Stojkovic MM (2003): Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 211, 67–73
- Marrie RA (2004): Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3, 709–718
- Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M (2009): Interleukin-17-Producing  $\gamma\delta$  T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31, 321–330

- Massa J, O'Reilly E, Munger K, Ascherio A (2013): Caffeine and alcohol intakes have no association with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler* 19, 53–58
- Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF (2008): Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* 118, 3420–3430
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121–127
- McDonald J, Graves J, Waldman A, Lotze T, Schreiner T, Belman A, Greenberg B, Weinstock-Guttman B, Aen G, Tillema JM et al. (2016): A case-control study of dietary salt intake in pediatric-onset multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 6, 87–92
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005): Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175, 3025–32
- McGraw CA, Lublin FD (2013): Interferon beta and glatiramer acetate therapy. *Neurotherapeutics* 10, 2–18
- Mendel I, Rosbo NK de, Ben-Nun A (1995): A Myelin Oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor V $\beta$  expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25, 1951–1959
- Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ (2002): Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125, 1676–1695
- Miller DH, Leary SM (2007): Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 6, 903–912
- Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O (2012): Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol* 11, 157–169
- Minden SL, Frankel D, Hadden L, Perloff J, Srinath KP, Hoaglin DC (2006): The sonya slifka longitudinal multiple sclerosis study: methods and sample characteristics. *Mult Scler* 12, 24–38
- Mische LJ, Mowry EM (2018): The evidence for dietary interventions and nutritional supplements as treatment options in multiple sclerosis. A Review. *Curr. Treat. Options Neurol* 20, 8
- Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, Cohen IR (2004): Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun* 23, 1–7
- Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L (2008): NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell death and differentiation* 15, 226–233

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman LR (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136, 2348–2357
- Multiple Sclerosis International Federation (2022): Atlas of MS 2020. Hrsg. v. Sharawy M, <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>; Zugriff am 11.09.2022
- Mumenthaler M, Mattle H: *Neurologie*. 226 Tabellen, 12., vollst. neu bearb. Aufl.; Thieme, Stuttgart 2008
- Munger KLM, Zhang SMMS, O'Reilly EM, Hernán MAMD, Olek MJD, Willett WCMD, Ascherio AMD (2004): Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62, 60–65
- Murphy K, Travers P, Walport M, Ehrenstein M, Janeway C: *Janeway's immunobiology*, 7. Auflage; Garland Science, New York 2008
- Murray TJ (2009): The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci* 277, S3-8
- Niehaus A, Shi J, Grzenkowski M, Diers-Fenger M, Archelos J, Hartung HP, Toyka K, Brück W, Trotter J (2000): Patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis synthesize antibodies recognizing oligodendrocyte progenitor cell surface protein: implications for remyelination. *Ann Neurol* 48, 362–371
- Noseworthy JH (1999): Progress in determining the cause and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40-7
- Obermeier B, Mentele R, Malotka J, Kellermann J, Kümpfel T, Wekerle H, Lottspeich F, Hohlfeld R, Dornmair K (2008): Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med* 14, 688–693
- O'Donovan M (2003): Infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 693
- O'Gorman C, Lucas R, Taylor B (2012): Environmental risk factors for multiple sclerosis: A review with a focus on molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* 13, 11718–11752
- Owens GP, Bennett JL, Lassmann H, O'Connor KC, Ritchie AM, Shearer A, Lam C, Yu X, Birlea M, DuPree C et al. (2009): Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 65, 639–649
- Page WF, Durtzke JF, Murphy FM, Norman JE (1993): Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: V. Ancestry and the risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 33, 632–639
- Pallotta MT, Fallarino F, Matino D, Macchiarulo A, Orabona C (2014): AhR-mediated, non-genomic modulation of IDO1 function. *Front. Immunol.* 5, 1–6
- Pandit L, Ramagopalan SV, Malli C, D'Cunha A, Kunder R, Shetty R (2013): Association of vitamin D and multiple sclerosis in India *Mult Scler J* 19, 1592–1596

Patten SBMP, Svenson LWB, Metz LMM (2005): Psychotic disorders in MS: Population-based evidence of an association. *Neurology* 65, 1123–1125

Pawate S, Bagnato F (2015): Newer agents in the treatment of multiple sclerosis. *Neurologist* 19, 104–117

Payne A (2001): Nutrition and diet in the clinical management of multiple sclerosis. *J Hum Nutr Diet* 14, 349–357

Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, Seigneurin JM (1989): Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol* 140, 551–561

Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, Mallaret M, Schuller E, Stoebner P, Seigneurin JM (1991): Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 337, 862–863

Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Lington C (1993): The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 143, 555–564

Pierrot-Deseilligny CP, Souberbielle JC (2013): Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 6, 81–116

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW et al. (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 58, 840–846

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A et al. (2006): A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899–910

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292–302

Ponsonby AL (2005): Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 293, 463

Poser CM (1994): The epidemiology of multiple sclerosis: A general overview. *Ann Neurol* 36, 180–193

Pucci E, Giuliani G, Solari A, Simi S, Minozzi S, Di Pietrantonj C, Galea I (2011): Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 10, CD007621

Quintana FJ (2013): The aryl hydrocarbon receptor: A molecular pathway for the environmental control of the immune response. *Immunology* 138, 183–189

Quintana FJ (2013): Regulation of central nervous system autoimmunity by the aryl hydrocarbon receptor. *Semin Immunopathol* 35, 627–635

Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Estelle Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL (2008): Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the arylhydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71

Quintana FJ, Murugaiyan G, Farez MF, Mitsdoerffer M, Tukupah AM, Burns EJ, Weiner HL (2010): An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biological Sciences* 107, 20768-20773

Quintana FJ, Yeste A, Mascalfroni ID (2015): Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity. *Cell Death Differ* 22, 215-24

Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S (2009): IFN- $\beta$  inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 183, 5418–5427

Ramos-Vara JA (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405–426

Rasmussen HB, Geny C, Deforges L, Perron H, Tourtelotte W, Heltberg A, Clausen J (1997): Expression of endogenous retroviruses in blood mononuclear cells and brain tissue from multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand Suppl* 169, 38–44

Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F (2009): C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10, 514–523

Recks MS, Addicks K, Kuerten S (2011): Spinal cord histopathology of MOG peptide 35–55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time- and score-dependent. *Neurosci Lett* 494, 227–231

Regen T, Isaac S, Amorim A, Núñez NG, Hauptmann J, Shanmugavadivu A, Klein M, Sankowski R, Mufazalov IA, Yogev N et al. (2021): IL-17 controls central nervous system autoimmunity through the intestinal microbiome. *Sci Immunol* 6, eaaz6563

Rejdak K, Jackson S, Giovannoni G (2010): Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *Br Med Bull* 95, 79–104

Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J, Jacobs N (2008): Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clinical and Experimental Immunology* 152, 219–226

Riccio P, Rossano R (2015): Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro* 7, 1–20

Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A (2003): Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 61, 1122–1124

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58, 39–53

Rojas JI, Romano M, Patrucco L, Cristiano E (2018): A systematic review about the epidemiology of primary progressive multiple sclerosis in latin america and the caribbean. *Mult Scler Relat Disord* 22, 1–7

- Rook GAW (2012): Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 42, 5–15
- Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, Chao CC, 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, Kenison JE, Li Z, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, De Lima KA, Borucki DM, Kaye J, Quintana FJ (2021): Aryl hydrocarbon receptor activation in astrocytes by laquinimod ameliorates autoimmune inflammation in the CNS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 8, e946
- Roulis E, Polkinghorne A, Timms P (2013): Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen. *Trends Microbiol* 21, 120–128
- Rouse M, Singh NP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2013): Indoles mitigate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of reciprocal differentiation of regulatory T cells and Th17 cells. *Br J Pharmacol* 169, 1305–21
- Roxburgh RHSR, Seaman SR (2005): Multiple sclerosis severity score: Using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64, 1144–1151
- Rozenberg F, Lefebvre S, Lubetzki C, Lebon P, Lyon-Caen O, Brahic M, Bureau JF (1991): Analysis of retroviral sequences in the spinal form of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 29, 333–336
- Sabatino JJ, Zamvil SS (2017): Aryl hydrocarbon receptor activity may serve as a surrogate marker for MS disease activity. *Neurol. - Neuroimmunol Neuroinflammation* 4, e366
- Sadovnick ADP, Baird PA (1988): The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology* 38, 990–991
- Sadovnick ADP, Remick RAM, Allen JMD, Swartz E, Yee IMLM, Eisen KRN, Farquhar RRN, Hashimoto SAM, Hooge JMD, Kastrukoff LFM et al. (1996): Depression and multiple sclerosis. *Neurology* 46, 628–632
- Salzer J, Hallmans G, Nystrom M, Stenlund H, Wadell G, Sundstrom P (2013): Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler* 19, 1022–1027
- Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M (2012): Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 341, 274–284
- Schilling S, Linker RA, König FB, Koziolok M, Bähr M, Müller GA, Paulus W, Gärtner J, Brück W, Chan A (2006): Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben. *Nervenarzt* 77, 430–438

- Schmidt JV, Bradfield CA (1996): Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 55–89
- Schreiner B, Heppner F, Becher B (2009): Modeling multiple sclerosis in laboratory animals. *Semin Immunopathol* 31, 479–495
- Sedaghat F, Jessri M, Behrooz M, Mirghotbi M, Rashidkhani B (2016): Mediterranean diet adherence and risk of multiple sclerosis: A case-control study. *Asia Pac J Clin Nutr* 25, 377-384
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F (2004): Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14, 164–174
- Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van Der Mei I, Taylor B (2011): Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: A meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82, 1132–1141
- Solomon A, Whitham R (2010): Multiple sclerosis and vitamin D: A review and recommendations. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10, 389-396
- Sotgiu S, Piana A, Pugliatti M, Sotgiu A, Deiana GA, Sgaramella E, Muresu E, Rosati G (2001): Chlamydia pneumoniae in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and neurological controls. *Mult Scler* 7, 371–374
- Sriram S, Mitchell W, Stratton C (1998): Multiple sclerosis associated with chlamydia pneumonia infection of the CNS. *Neurology* 50, 571–572
- Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM (1999): Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46, 6–14
- Sriram S, Steiner I (2005): Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58, 939–945
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W (2011): Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta* 1812, 275–282
- Stefano S, Maura P, Alessandra S, Alessandra S, Giulio R (2003): Does the “hygiene hypothesis” provide an explanation for the high prevalence of multiple sclerosis in Sardinia? *Autoimmunity* 36, 257–260
- Steinman L (1996): A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2253–2256
- Steinman L, Zamvil SS (2006): How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60, 12–21
- Stewart GJ (2002): Infection and multiple sclerosis-a new hypothesis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 358-a-359

- Stockinger B, Hirota K, Duarte J, Veldhoen M (2011): External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Semin Immunol* 23, 99–105
- Stockinger B, Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH (2014): The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol* 32, 403–432
- Stone SH (1961): Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred guinea pigs. *Science* 134, 619–620
- Storch M, Lassmann H (1997): Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr Opin Neurol* 10, 186–192
- Sun H (2017): Temperature dependence of multiple sclerosis mortality rates in the united states. *Mult Scler J* 23, 1839–1846
- Swank RL, Dugan BB (1990): Effect of low saturated fat diet in early and late cases of multiple sclerosis. *Lancet* 336, 37–39
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17, 162-173
- Tsunoda I, Fujinami RS (1996): Two Models for Multiple Sclerosis: Experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's Murine encephalomyelitis virus. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 673–686
- Vhancer (2011): Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.  
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verlaufsformen-MS.png>; Zugriff am 11.09.2020
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Dumoutier JBL, Renaud JC, Stockinger B (2008): The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106–9
- Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B (2009): Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med* 206, 43–9
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004): Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971–979
- Villa M, Gialitakis M, Tolaini M, Ahlfors H, Henderson CJ, Wolf CR<sup>0</sup>, Brink R, Stockinger B (2017): Aryl hydrocarbon receptor is required for optimal B-cell proliferation. *EMBO J* 36, 116–128
- Walsh MJ, Tourtellotte WW, Roman J, Dreyer W (1985): Immunoglobulin G, A, and M-clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum-analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin Immunol Immunopathol* 35, 313–327

- Weber MS, Prod'homme T, Patarroyo JC, Molnarfi N, Karnezis T, Lehmann-Horn K, Danilenko DM, Eastham-Anderson J, Slavin AJ, Lington C (2010): B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 68, 369–383
- Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, Pineda AA, Stevens LN, Rodriguez M (1999): A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 46, 878–886
- Wheeler MA, Rothhammer V, Quintana FJ (2017): Control of immune-mediated pathology via the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 292, 12383–12389
- Wheeler MA, Quintana FJ (2018): Regulation of astrocyte functions in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9, a029009
- Whitacre CC (2001): Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2, 777–780
- Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomaeus H, Haase S, Mähler A, Balogh A, Markó L et al. (2017): Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* 551, 585–589
- Williamson MA, Gasiewicz TH, Opanashuk LA (2005): Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: Implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci* 83, 340–348
- Wolswijk G (2002): Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125, 338–349
- Yao SY, Stratton CW, Mitchell WM, Sriram S (2001): CSF oligoclonal bands in MS include antibodies against chlamydomphila antigens. *Neurology* 56, 1168–1176
- Yeste A, Mascanfroni ID, Nadeau M, Burns EJ, Tukupah AM, Santiago A, Wu C, Patel B, Kumar D, Quintana FJ (2014): IL-21 induces IL-22 production in CD4+T cells. *Nat Commun* 5, 3753
- York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, Karandikar NJ (2010): Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 35, 33–44
- Zhou L (2016): AHR function in lymphocytes: Emerging concepts. *Trends Immunol* 37, 17–31
- Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL (2004): IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 249–5

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Hilfe und Mitbeteiligung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Daher möchte ich an dieser Stelle die Möglichkeit ergreifen und mich bei allen, die zur Dissertation beigetragen haben, bedanken:

An Prof. Dr. Christine Stadelmann für die Aufnahme der Dissertation in die Neuropathologie und alle wertvollen Kommentare während meiner Fortschrittsberichte und Ausschusssitzungen.

An Dr. Stefan Nessler für die Betreuung der Doktorarbeit.

An das hervorragende Team technischer Assistenten: Angela, Brigitte, Elke, Jasmin, Heidi, Olga und Uta. Hier besonders für die Hilfe bei der Immunhistochemie und die Durchführung der Genotypisierungen der verschiedenen transgenen Mauslinien.

Besonderer Dank gilt Dr. Melanie Lohrberg für ihr hilfreiches Feedback und die wissenschaftliche Beratung, die es mir ermöglicht haben, auch über die Distanz aus Hamburg zusammenzuarbeiten.

## Lebenslauf

Meinen schulischen Werdegang beendete ich als Abiturientin 2008 an der gymnasialen Oberstufe des Jacob-Grimm Gymnasiums in Kassel.

Vorbereitend auf das Studium der Zahnmedizin absolvierte ich anschließend 2009 ein freiwilliges soziales Jahr in der Mund-Kiefer und Gesichtschirurgie im Roten-Kreuz Krankenhaus in Kassel. Durch das sich daraus entwickelnde große Interesse an der Zahnmedizin begann ich 2009 die Lehre zu Zahntechnikerin im Dentallabor Schobeß in Kassel und wurde sogar 2012 als Innungsbeste und Landessiegerin des Deutschen Handwerks in Hessen ausgezeichnet.



2019 beendete ich dann erfolgreich das Studium der Zahnmedizin an der medizinischen Universität in Göttingen. Zeitgleich zum Studium begann ich als Doktorandin der Neuropathologie die Forschung für meine Doktorarbeit. Seit 2020 bin ich praktizierende Zahnärztin in Hamburg.