

Aus dem Institut für translationale Immunologie (TIM)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), einem murinen Modell
der humanen Multiplen Sklerose, unter der therapeutischen Zufuhr von SEFA-6207

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Laura Maria Helena Kazakis-Steinbach
aus Heidelberg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

Meinen Eltern und meinem Mann.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGEN UND TABELLEN	IV
EINLEITUNG	1
DAS IMMUNSYSTEM	1
MULTIPLE SKLEROSE	6
Epidemiologie	6
Klinische Verlaufsformen und Symptomatik	7
Ätiologie und Risikofaktoren	8
Pathologie	9
Diagnostik	10
Therapie der Multiplen Sklerose.....	11
TIERMODELLE DER MULTIPLER SKLEROSE.....	14
Pathogenese der EAE und Übertragbarkeit auf die MS.....	16
FRAGESTELLUNG	19
EINLEITENDE LITERATURDISKUSSION	20
ERNÄHRUNG UND MULTIPLE SKLEROSE	20
Das Mikrobiom und der Einfluss diätetischer Fettsäuren auf die Darm-Hirn-Achse	20
<i>Structurally engineered fatty acids (SEFA)</i>	22
MATERIAL UND METHODEN	24
MATERIAL	24
METHODEN	31
Immunsisierung von Mäusen: Induktion der EAE	31
Verlauf der EAE	31
Gewichtskontrolle	32
VERSUCHSAUFBAU	33
PROBENENTNAHME UND GEWEBEAUFARBEITUNG.....	35
Fixierung der Gewebe und Anfertigung von Schnitten.....	35
Sonstige Vorbereitungen: Vorbehandlung der Objektträger.....	36
STANDARDFÄRBUNGEN	36
HE Protokoll	36
Versilberung.....	36
LFB-PAS.....	37
Immunhistochemie	38
MORPHOMETRIE	40
Auswertung der Rückenmarkschnitte.....	40
Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	40
RNA ISOLIERUNG, SYNTHESE DER CDNA UND QPCR	41
Die $\delta\delta$ CT-Methode zur Quantifizierung der Genexpression	43
STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG	43
ERGEBNISSE	45

Symptombeginn in allen Gruppen um den 12. Tag p.i.	49
Gewichtsverlust unter Zufuhr von SEFA.....	50
Reduktion demyelinisierter Areale in Therapiegruppen.....	52
Axonaler Schaden im Bereich demyelinisierter Abschnitte	54
Quantifizierung der Genexpression mittels qPCR	56
Zufuhr von SEFA beeinflusst dosisabhängig die Genexpression von Zytokinen im Ileum.....	56
Änderung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Ileum	56
Änderung der Genexpression antiinflammatorischer Zytokine im Ileum.....	58
Einfluss auf die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Kolon.....	59
Histologische Analyse des Ileums	61
Immunhistochemischer Nachweis von CD45 + Zellen im Ileum.....	62
Immunhistochemischer Nachweis von CD3 + Zellen im Ileum.....	63
DISKUSSION.....	64
Tiermodelle der MS und ihre Grenzen	64
SEFA: vielversprechende modifizierte Fettsäuren für die Therapie entzündlicher (Leber-) Erkrankungen.....	66
Klinischer Verlauf der EAE unter Zufuhr von SEFA-6207	69
Bedeutung der <i>gut-brain-axis</i>	70
ZUSAMMENFASSUNG	73
LITERATURVERZEICHNIS.....	77
DANKSAGUNG.....	84
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	85
LEBENS LAUF	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung	NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
ABC	Avidin-Biotin-Komplex	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ANOVA	<i>analysis of variances</i>	p.i.	nach Immunisierung
BHS	Blut-Hirn-Schranke	PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>	PLP	Proteolipid-Protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	PNALD	parenterale ernährungsbedingte Lebererkrankung
Ct	<i>threshold cycle</i>	PPMS	<i>primary progressive multiple sclerosis</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
DMD	<i>disease modifying drugs</i>	PTX	Pertussistoxin
DSS	Dextransulfat	PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis	qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
EBV	Epstein-Barr-Virus	RRMS	<i>relapsing remitting multiple sclerosis</i>
EDSS	<i>expanded disability status scale</i>	SCFA	<i>short-chain fatty acid</i>
EU	Europäische Union	SEFA	<i>structurally engineered fatty acid</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	SFA	<i>saturated fatty acid</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>	SPMS	<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
IFN	Interferon	TGF	<i>transforming growth factor</i>
Ig	Immunglobulin	TH1	T-Helferzellen Subtyp I
IL	Interleukin	TH2-Zellen	T-Helferzellen Subtyp II
LCFA	<i>long-chain fatty acid</i>	TLR	<i>toll-like receptors</i>
LFB-PAS	<i>Luxol Fast Blue - Periodic Acid Schiff</i>	TMEV	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus</i>
MAG	Myelin-assoziiertes-Glykoprotein	TNF	Tumornekrosefaktor
MBP	Myelin-basisches-Protein	Tregs	regulatorische T-Zellen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	ZNS	Zentrales Nervensystem
MHV	Maus-Hepatitis-Virus	ω-3	Omega-3
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	ω-6	Omega-6
MRT	Magnetresonanztomographie		
MS	Multiple Sklerose		
MUFA	<i>monounsaturated fatty acid</i>		

Abbildungen und Tabellen

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: VERLAUFSFORMEN DER MS.....	7
ABBILDUNG 2: VORAUSSETZUNG FÜR DIE ENTWICKLUNG EINER AUTOIMMUNERKRANKUNG.....	9
ABBILDUNG 3: THERAPIESÄULEN DER MULTIPLER SKLEROSE.	12
ABBILDUNG 4: T-ZELL-VERMITTELTHER PATHOMECHANISMUS DER EAE.	16
ABBILDUNG 5: CHEMISCHE STRUKTUR VON SEFA-6207.	23
ABBILDUNG 6: VERSUCHSAUFBAU.....	34
ABBILDUNG 7: KLINISCHER VERLAUF DER EAE.....	46
ABBILDUNG 8: EAE SCORE AN TAG 15.	47
ABBILDUNG 9: EAE AN TAG 12 UND 13 NACH IMMUNISIERUNG.....	48
ABBILDUNG 10: KRANKHEITSBEGINN.	49
ABBILDUNG 11: GEWICHTSVERLUST UNTER DER THERAPIE MIT SEFA.....	50
ABBILDUNG 12: AUFBAU DES RÜCKENMARKS.	51
ABBILDUNG 13: DEMYELINISIERUNG VERSCHIEDENER RÜCKENMARKSEBENEN.....	52
ABBILDUNG 14: DEMYELINISIERUNG DER WEIßEN SUBSTANZ.....	53
ABBILDUNG 15: AUSGEWÄHLTE LÄSIONEN IN LFB-PAS-FÄRBUNG UND BIELSCHOWSKY VERSILBERUNG.	55
ABBILDUNG 16: VERÄNDERUNG DER GENEXPRESSION VON IL-6, IFN- γ , INOS UND TNF-A.....	56
ABBILDUNG 17: VERÄNDERUNG DER GENEXPRESSION VON IL-10, TGF- β 1 UND CD11 B IM ILEUM. ...	58
ABBILDUNG 18: GENEXPRESSION VERSCHIEDENER ZYTOKINE IM KOLON.	59
ABBILDUNG 19: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CD45+ ZELLEN IM ILEUM.	62
ABBILDUNG 20: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CD3+ ZELLEN IM ILEUM.	63
ABBILDUNG 21: ICOSABUTAT, EIN LANGKETTIGES OMEGA-3-FS ANALOGON.....	66
ABBILDUNG 22: CHEMISCHE MODIFIKATIONEN VON SEFA-6207.....	68

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: BEISPIELE FÜR OBERFLÄCHENMERKMALE VERSCHIEDENER IMMUNZELLEN	4
TABELLE 2: BEISPIELE FÜR AUTOIMMUNERKRANKUNGEN.....	5
TABELLE 3: PUFFER, BLOCKSEREN UND FÄRBE LÖSUNGEN	24
TABELLE 4: CHEMIKALIEN	26
TABELLE 5: ANTIKÖRPER.....	27
TABELLE 6: PRIMERSEQUENZEN.....	27
TABELLE 7: KITS UND ANDERE REAGENZIEN	28
TABELLE 8: VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	28
TABELLE 9: GERÄTE UND INSTRUMENTE	29
TABELLE 10: KLINISCHER SCORE DER EAE.....	32

Einleitung

Das Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist es, den menschlichen Organismus, der in ständigem Kontakt mit seiner Umwelt steht, vor pathogenen Erregern zu schützen. Das Immunsystem besteht dabei aus einer angeborenen (unspezifischen) und einer erworbenen (spezifischen) Komponente.

Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort besteht aus von Geburt an vorhandenen Abwehrmechanismen, die nur eine beschränkte Spezifität gegenüber Erregern aufweisen, daher auch die Bezeichnung „unspezifische Immunreaktion“ (1). Primäre Funktion des angeborenen Immunsystems ist die rasche Beseitigung von Erregern und die Aktivierung sowie Koordination spezifischer Effektorzellen des erworbenen Immunsystems (1).

Man unterscheidet zwischen physikalischen, zellulären und humoralen Komponenten der Immunantwort.

Physikalische Barrieren sind die erste Abwehr gegen Pathogene. Sie sorgen dafür, dass diese nicht eindringen bzw. schnell unschädlich gemacht werden.

Eine physikalische Barriere stellen Haut und Schleimhaut dar (2). Auf der Schleimhaut der Atemwege unterstützen Zilien den Abtransport schädlicher Pathogene. Im Magen wehrt die von Zellen der Schleimhaut gebildete Magensäure Erreger ab. Im Darm erfolgt eine Abwehr zusätzlich durch mikrobielle Besiedlung. Die Gesamtheit aller besiedelnden Mikroorganismen wird dabei als Mikrobiom bezeichnet (3). Daneben enthält Schleim, zum Beispiel in den Atemwegen, unspezifische und spezifische Infekt-abwehrende Substanzen wie Lysozym (von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet), Laktoferrin und Immunglobuline (2).

Die wichtigsten zellulären Träger der angeborenen Immunantwort sind neutrophile Granulozyten, Monozyten und (Gewebs-)Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen. Ihre Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) erkennen sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Dabei handelt es sich um charakteristische Strukturmoleküle, aber auch um bestimmte DNS- und RNS-Sequenzen, die von vielen Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten gebildet werden (4). Zu den erkannten Molekülen gehören zum Beispiel Lipopolysaccharide als Bestandteil

der Zellmembran gramnegativer Bakterien oder Peptidoglykane primär grampositiver Bakterien, die u.a. von sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt werden. Die so aktivierten TLRs führen schließlich über die Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Produktion verschiedener Zytokine und anderer Entzündungsmediatoren (5).

Humorale Mechanismen des Immunsystems basieren auf Entzündungsmediatoren, die im Blut zirkulieren und überwiegend von Immunzellen produziert werden. Wichtige Akteure der humoralen Immunreaktion sind zum Beispiel Zytokine als Botenstoffe des Immunsystems (1). Zytokine werden dabei sowohl von Effektorzellen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems als Antwort auf mikrobielle Pathogene und andere Antigene produziert. Zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen gehören Interferon (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6 und IL-17 (6). IL-10 dagegen gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen, ebenso TGF- β 1 (7).

Erworbene Immunantwort

Die erworbene Immunreaktion ist der angeborenen nachgeschaltet und langsamer, allerdings spezifischer. Sie basiert auf einer hochspezifischen Reaktion des Organismus bei Reinfektion nach vorangegangenem Erstkontakt mit einem Erreger (immunologisches Gedächtnis). Die Effektorzellen des erworbenen Immunsystems sind B- und T-Zellen (Lymphozyten) und ihre Aktivierung resultiert aus der Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems (8). B- und T-Lymphozyten entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (1). Aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs tragen alle Subpopulationen der B- und T-Lymphozyten das Oberflächenmerkmal CD (*cluster of differentiation*) 45, ebenso alle anderen Leukozyten (Makrophagen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Granulozyten) (9). Die Differenzierung aus hämatopoetischen Stammzellen zu funktionellen T-Zellen erfolgt im Thymus, die B-Zell-Reifung im Knochenmark (*bone marrow*).

B-Lymphozyten sezernieren Antikörper (Immunglobuline, Ig) als Teil der humoralen Immunantwort. Diese befinden sich entweder membrangebunden an der Oberfläche von B-Zellen oder als lösliche Effektormoleküle in verschiedenen Körperflüssigkeiten. Sie

können Antigene direkt und mit hoher Affinität binden und eine spezifische Immunantwort auslösen oder Toxine neutralisieren.

Gemeinsam mit dem CD3-Oberflächenmarker exprimieren alle reifen T-Lymphozyten an ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren, die Fremdatigene spezifisch erkennen können. Je nach Differenzierung koexprimieren sie CD4- oder CD8-Rezeptoren.

Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) leiten eine direkte Zellyse oder Apoptose durch porenbildende Proteine (Perforine) und Proteasen (Granzyme) ein. Sie werden durch die Antigenpräsentation von MHC-I-Moleküle aktiviert. MHC-I-Moleküle sind auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert und präsentieren intrazelluläre Antigene (10). Manche Viren verhindern die Expression des MHC-I-Rezeptors. Diese entarteten Zellen werden durch Natürliche Killerzellen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind, erkannt und die Apoptose eingeleitet (11).

MHC-II-Rezeptoren werden dagegen auf antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) exprimiert und sind spezialisiert auf die Präsentation phagozytierter und fragmentierter extrazellulärer Proteine. Sie aktivieren CD4⁺ Zellen, die T-Helferzellen.

CD4⁺ T-Zellen differenzieren in funktionell unterschiedliche Subpopulationen, je nach lokal vorhandenen Zytokinen. Folgende CD4⁺ T-Zellsubpopulationen werden unterschieden (1):

- T-Helferzellen vom Subtyp 1 (CD4-TH1-Zellen) werden durch Interaktion mit Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ , IL-2 und TNF- α) angeregt, die wiederum weitere Makrophagen (positive Selbstverstärkung) sowie zytotoxische T-Zellen stimulieren (12).
- T-Helferzellen vom Subtyp 2 (CD4-TH2-Zellen) entstehen in Gegenwart von IL-4. Durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 fördern sie eine humorale Immunantwort über Stimulation von B-Zellen, die in Folge Immunglobuline sezernieren (12).
- CD4-TH17-Zellen sind eine weitere Subpopulation der T-Zellen. Sie setzen das proinflammatorischen Zytokin IL-17, oder auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-22 frei, haben aber mehrheitlich entzündungsfördernde Wirkungen.
- Eine weitere wichtige T-Zell-Subpopulation sind die regulatorischen CD4-T-Zellen (Tregs). Sie exprimieren neben CD4 auch CD25, CD39 und FoxP3 (s. Tabelle). Sie sezernieren IL-10 und TGF (*transforming growth factor*)- β 1 und

regulieren die TH1 und TH2-gerichtete T-Zell-Antworten. Eine Beeinträchtigung ihrer Funktion oder Depletion ist eine wesentliche Ursache von autoimmunen oder entzündlichen Erkrankungen beim Menschen (13, 14).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht verschiedener Oberflächenmerkmale und die Effektorzelle, die das Merkmal trägt.

Tabelle 1: Beispiele für Oberflächenmerkmale verschiedener Immunzellen

Zelltyp	Oberflächenmerkmal
T-Zellen	CD3
T-Helferzellen	CD4
Zytotoxische T-Zellen	CD8
B-Zellen	CD20
regulatorische T-Zellen (Tregs)	CD4 CD25 CD39 FoxP3
alle kernhaltige Zellen hämatopoetischen Ursprungs	CD45

Autoimmunität

Autoimmunität beschreibt eine Reaktion des Immunsystems gegen körpereigene Zellen durch Verlust der immunologischen Toleranz. Autoreaktive B-Lymphozyten werden im Knochenmark, in der Milz oder in den Lymphknoten eliminiert. Autoreaktive T-Lymphozyten werden normalerweise im Thymus aussortiert oder gehen peripher zugrunde (15). Diese Selektionsmechanismen verhindern in der Regel ein Angriff von Immunzellen gegen körpereigene Zellen. Bei Versagen dieser Mechanismen kommt es zur Autoimmunerkrankung. In diesem Fall wird eine Immunreaktion gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) hervorgerufen, die Antikörper (Autoantikörper) sowie autoreaktive Effektorzellen hervorbringt.

Die genauen Mechanismen, die zum Verlust der Immuntoleranz führen sind unbekannt – wie die Ursache der Multiplen Sklerose (MS). Sie gehört zu den (häufigeren) T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen. Weitere Beispiele für Autoimmunerkrankungen zeigt Tabelle 2. Genetische Faktoren, Umweltfaktoren und eine fehlerhafte Regulation

der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen scheinen eine Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu spielen.

Tabelle 2: Beispiele für Autoimmunerkrankungen
mod. nach K. Murphy, P. Travers, M. Walport, Janeway Immunologie, 7. Auflage (7)

Erkrankung	Mechanismus	Folge
Diabetes Mellitus Typ 1	Autoreaktive T-Zellen gegen Inselzellen im Pankreas	Zerstörung der insulinbildenden Inselzellen des Pankreas, absoluter Insulinmangel
Hashimoto-Thyreoiditis	Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen gegen Schilddrüsenantigene	Hypothyreose durch Zerstörung des Schilddrüsenorgans
Morbus Basedow	Autoantikörper gegen TSH-Rezeptor (TRAK)	Hyperthyreose durch übermäßige Stimulation
Rheumatoide Arthritis	Autoreaktive T-Zellen gegen Antigene der Gelenke (Synovia)	Arthritis mit Entzündung und Zerstörung der Gelenke

Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose, auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems. Sie ist neben der Epilepsie eine der häufigsten organischen Hirnerkrankungen im Erwachsenenalter und die häufigste Autoimmunerkrankung des ZNS. Außerdem ist sie die häufigste Ursache für Gehbehinderung bei jungen Erwachsenen. Die Multiple Sklerose zeichnet sich durch eine Zerstörung der Myelinscheiden um Axone aus. Durch Entzündungsreaktionen entstehen damit axonale Schäden. Es kommt außerdem zu einer reaktiven Astrozytose mit gliösen Vernarbung (daher die Bezeichnung „Sklerose“). Die Ursache der Erkrankung ist bislang unbekannt. Je nach verursachtem Schaden sind verschiedene Ausfallserscheinungen möglich, ein häufiges Erstsymptom ist die Optikusneuritis mit Sehstörungen. Es gibt verschiedene Verlaufsformen der Erkrankung mit interindividuell heterogenen Symptomen. Diese können sich teilweise vollständig oder unvollständig zurückbilden. Eine kurative Therapie der MS gibt es bisher nicht, der Verlauf kann durch immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie teilweise modifiziert werden. In vielen Fällen führt die MS zu einer dauerhaften Gehbehinderung und Rollstuhlpflichtigkeit.

Epidemiologie

Derzeit gibt es weltweit geschätzt etwa 2,5 Millionen Betroffenen, die Verteilung ist regional unterschiedlich. Vor allem in den gemäßigten Breiten der nördlichen und südlichen Hemisphäre tritt die Erkrankung gehäuft auf (16). Die Inzidenz in Deutschland im Jahr 2015 lag bei 18 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr (17).

Die Erkrankung manifestiert sich häufig um das 30. Lebensjahr. Je später sich die MS klinisch manifestiert, desto schlechter ist ihre Prognose (18). Selten tritt sie im Kindes- oder späten Erwachsenenalter auf. Insbesondere bei dem Verlaufstyp der schubförmig remittierenden MS treten starke geschlechterspezifische Unterschiede hervor. Frauen sind hier zwei- bis dreimal so häufig betroffen wie Männer (19). Bei eineiigen Zwillingen beträgt die Konkordanz laut verschiedener Studien zwischen 25 und 30% (20, 21). Bisher sind mehr als 50 Risikogenregionen identifiziert, die eine Assoziation mit der MS zeigen. Als wichtigstes gilt das HLA-DRB1-Gen (22).

Klinische Verlaufsformen und Symptomatik

Man unterscheidet bei der MS zwischen verschiedene Verlaufsformen (Abb. 1). Bei der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose (*relapsing remitting MS*, RRMS) treten neurologische Störungen in Form von Schüben auf, die sich teilweise oder vollständig zurückbilden können (23). Ein Schub ist dabei definiert als neu aufgetretenes, oder sich verschlechterndes Symptom, das mindestens 24 Stunden besteht und nicht im Rahmen einer erhöhten Körpertemperatur oder eines Infektes auftritt. Ein vorhergehender Schub liegt dabei mehr als 30 Tage zurück. Im Intervall zwischen den Schüben verschlechtern sich die Symptome bei einer RRMS nicht. Bei Erstdiagnose stellt diese Verlaufsform die häufigste dar, bei mehr als der Hälfte aller Betroffenen geht die RRMS unbehandelt in die sekundär progrediente Form über. Die sekundär progrediente MS (SPMS) zeichnet sich durch eine stetige Verschlechterung der Symptome aus, nach einem initial remittierenden Verlauf (23). Schübe können zudem zusätzlich auftreten.

Nur 15% der Betroffenen weisen bei Erstdiagnose eine primäre progrediente Verlaufsform (PPMS) ohne vorhergehende Schübe auf (23).

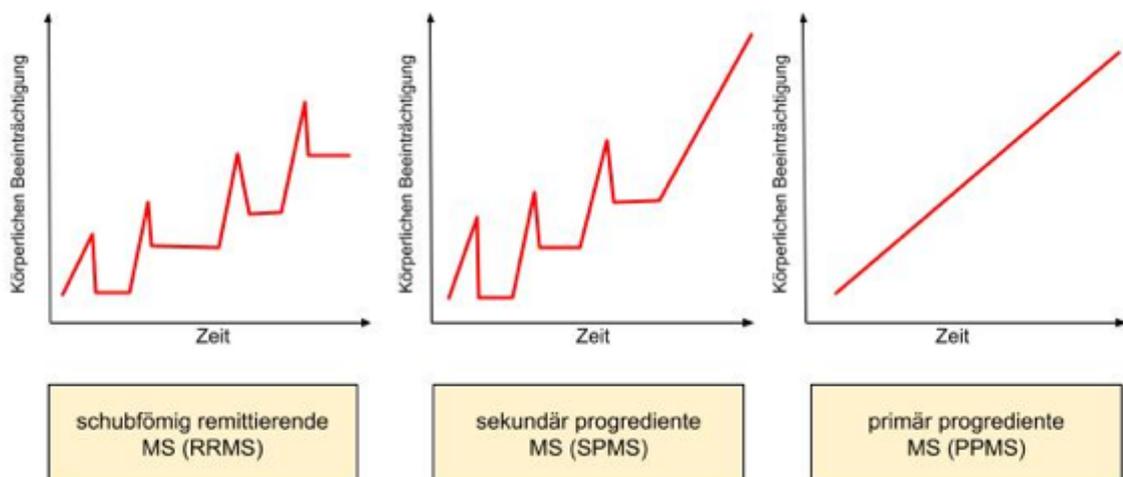


Abbildung 1: Verlaufsformen der MS.

Bei der schubförmig remittierenden MS können sich die Schübe teilweise bis vollständig zurückbilden. Die sekundär progrediente MS zeigt initial einen schubförmig remittierenden, später jedoch progredienten Verlauf auf. Eine unbehandelte RRMS geht in über 50% in eine SPMS über. Ein geringer Anteil der Betroffenen erleidet einen primären progredienten Verlauf ohne Rückbildung von Symptomen. Abb. mod. nach Klineova, S. und Lublin, F.D., 2018 (24).

Häufige Erstsymptome der MS stellen Sehstörungen in Folge einer Optikusneuritis und Sensibilitätsstörungen dar (25). Zu den Symptomen einer Optikusneuritis gehören beispielsweise eine meist einseitige afferente Pupillenstörung, eine Visusminderung bis hin zur Erblindung, ein Zentralskotom und Farbsinnesstörungen. Der Augenhintergrund zeigt sich in der Ophthalmoskopie meist unauffällig. Auch Doppelbilder durch Augenmuskelparesen sind möglich. Die Sensibilitätsstörungen umfassen Parästhesien, Hypästhesien und Dysästhesien. Im Rahmen einer RRMS können sich diese Ausfallerscheinungen vollständig oder teilweise innerhalb von Tagen bis Wochen zurückbilden. Weitere Symptome der MS sind motorische Störungen mit Paresen und Spastik, Gangstörungen (zerebelläre Ataxien), Schmerzen, insbesondere Kopfschmerzen, daneben neuropathische und muskuloskeletale Schmerzen, Muskelkrämpfe und vegetative Symptome wie Blasenstörungen oder Störung der Sexualfunktion. Patienten können auch kognitive und psychische Defizite aufweisen, etwa Konzentrations- und Gedächtnisschwäche oder Symptome einer Depression (26). Mit einem hohen Leidensdruck vergesellschaftet ist auch die chronische Erschöpfung mit Tagesmüdigkeit und pathologischer Erschöpfbarkeit (26). Epileptische Anfälle und Demenz sind selten, können aber auftreten (26).

Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ursache der Multiplen Sklerose ist bis heute nicht bekannt. Derzeit wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen (vgl. Abbildung 2), bei denen genetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (7).

Die MS ist innerhalb der kaukasischen Population, insbesondere bei Nordeuropäern und deren Nachfahren, häufiger anzutreffen als in anderen ethnischen Gruppen (16). Eine familiäre Häufung der Erkrankung ist zu beobachten, dennoch tritt sie häufiger sporadisch auf. Die geringe Konkordanz bei monozygoten Zwillingen spricht gegen rein genetische Faktoren, exogene Faktoren scheinen eine bedeutende Rolle in der Krankheitsentstehung zu spielen. Migrationsstudien unterstützen diese Annahme: Erfolgt eine Migration vor dem 15. Lebensjahr, so wird das Erkrankungsrisiko des Gastlandes erworben. Bei einer Migration im Erwachsenenalter hält sich das Risiko des Herkunftslandes (27).

Infektionen werden immer wieder als Trigger diskutiert, von besonderem Interesse sind hierbei Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Hier konnten molekulare

Ähnlichkeiten zwischen EBV und dem basischen Myelin-Protein beschrieben werden, die möglicherweise zu einer Kreuzreaktion führen (28).

Weitere Umweltfaktoren, die ebenfalls in Frage kommen, sind geringe Sonneneinstrahlung, damit assoziiert Vitamin-D-Mangel, sowie toxische Umwelteinflüsse (29-31).

Epidemiologische Studien konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen Ernährung und MS-Inzidenz zeigen: Regionen mit einem verringerten Milch- und Fleischkonsum weisen eine geringere Inzidenz auf, wohingegen eine „Verwestlichung“ der Ernährungsgewohnheiten, etwa in Japan, mit einem Anstieg der MS Inzidenz einhergeht (32).

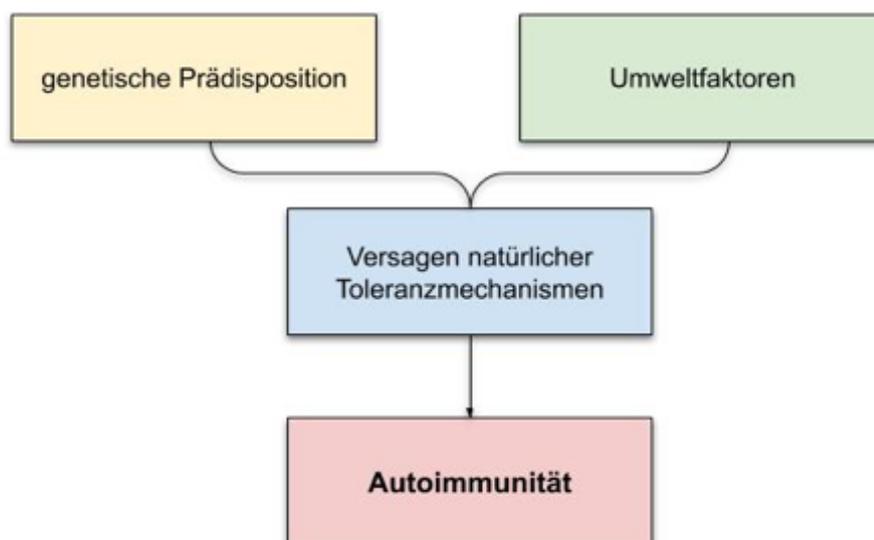


Abbildung 2: Voraussetzung für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung.

Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen, in denen genetische Prädisposition sowie Umweltfaktoren von Bedeutung sind. Aus unbekanntem Gründen kommt es zum Versagen von Toleranzmechanismen und zur Schädigung körpereigener Antigene. Abb. mod. nach K. Murphy, P. Travers, M. Walport, Janeway Immunologie, 7. Auflage (7).

Pathologie

Histologisch ist die MS durch entzündlich-demyelinisierende Läsionen sowie durch neurodegenerative Veränderungen mit axonaler Schädigung und Atrophie der grauen Substanz gekennzeichnet (33). Daraus resultiert außerdem eine reaktive Astrozytose mit gliöser Vernarbung („Sklerose“). Remyelinisierungen sind möglich, diese sogenannten

„*shadow plaques*“ zeigen dabei in der Regel eine verringerte Myelindichte und verhältnismäßig dünne Myelinscheiden (34, 35). Besonders progrediente Verlaufsformen zeichnen sich durch Reduzierung der axonalen Strukturen aus, ihr Ausmaß korreliert mit dem zunehmenden Behinderungsgrad. Im Verlauf dominiert eine fortschreitende diffuse Entzündungsaktivität die Erkrankung.

Dominante Zelltypen in der Pathophysiologie der MS sind autoreaktive, periphere T-Lymphozyten, die das ZNS invadieren. Die Ursache der Autoreaktivität ist unbekannt. Es gibt hierzu zwei wichtige Hypothesen:

Die Hypothese der peripheren Aktivierung beschreibt eine Aktivierung der T-Lymphozyten in der Peripherie durch ein unbekanntes Antigen. Es kommt zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und infolge molekularen Mimikrys zum Angriff gegen ZNS-Antigene („*outside-in-theory*“) (36). Unter molekularem Mimikry versteht man die Ähnlichkeit von Peptidsequenzen von Pathogenen und körpereigenem Gewebe, die zur Aktivierung des Immunsystems und zum Angriff gegen körpereigenes Gewebe führen.

Die Hypothese der zentralen Aktivierung hingegen beschreibt eine sekundäre Einwanderung von T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke infolge eines primären neurodegenerativen Prozesses („*inside-out-theory*“) (36).

Welche Rolle B-Lymphozyten spielen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Zum einen zeigen sich Antikörper- und Komplementkomponenten in histopathologischen Befunden von MS-Läsionen, zum anderen weisen Anti-B-Zell-Therapeutika (etwa Ocrelizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD20+ B-Zellen) gute Ergebnisse vor, welches die Bedeutung von B-Lymphozyten, u.a. als Antigen-präsentierende Zellen, unterstreicht (37).

Diagnostik

Um die Diagnose einer Multiplen Sklerose zu stellen, müssen eine ausführliche Anamnese, objektive Messung neurologischer Ausfälle und der klinische Nachweis einer zeitlichen und örtlichen Dissemination bzw. Vergrößerung der Demyelinisierungsherde, insbesondere über Bildgebung durch MRT, sowie der Ausschluss von Differentialdiagnosen für die Auffälligkeiten durchgeführt werden (23). Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen werden in der Regel anhand der Expanded Disability

Status Scale (EDSS) bepunktet. Diese Ordinalskala dient zur Bestimmung des Schweregrads der körperlichen Behinderung.

In der Bildgebung stellen laut McDonald-MRT-Kriterien (revidierte Fassung von 2017) mindestens eine T2-hyperintense Läsion in mindestens zwei von vier MS typischen Regionen (periventrikulär, kortikal, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) und Verlaufs-MRT-Aufnahmen mit neuen T2 oder Gadolinium-anreichernden Läsionen (örtliche und zeitliche Dissemination) entscheidende Diagnosekriterien der MS dar (38). Durch Untersuchung von visuell evozierten Potentialen und charakteristischen Läsionen mit Demyelinisierung und axonalen Schäden in der MRT lassen sich klinische Auffälligkeiten bildhaft darstellen. Der Augenhintergrund bei Patienten mit MS ist meist unauffällig.

Neben der neurologischen und neuropsychiatrischen Befundung sowie der Bildgebung spielt auch die Liquoruntersuchung bei der Diagnostik eine wichtige Rolle. Besonders relevant für die Diagnose der MS ist der Nachweis von intrathekalen oligoklonalen Immunglobulin-Banden im Liquor als Hinweis auf einen gezielten chronisch inflammatorischen Prozess (23). Differenzialdiagnostisch kommen chronisch-infektiöse Erkrankungen wie Neuro-Lues, Borreliose, HIV-Infektionen, sowie Kollagenosen, Vaskulitiden und Leukodystrophien in Frage, ebenso Sonderformen entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen wie die Neuromyelitis optica (Devic-Krankheit) (23). Im Hinblick auf erregerbedingte Erkrankungen sollte eine einschlägige und umfassende Serologie durchgeführt werden.

Eine frühe Diagnosestellung und das rechtzeitige Einleiten einer immunmodulatorischen Therapie ist prognostisch sehr wichtig (39).

Therapie der Multiplen Sklerose

Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Säulen in der Therapie, je nach Erkrankungsphase (Abbildung 3): Die Therapie des akuten Schubs, die verlaufsmodifizierende Stufentherapie und die symptomatische Therapie (40).

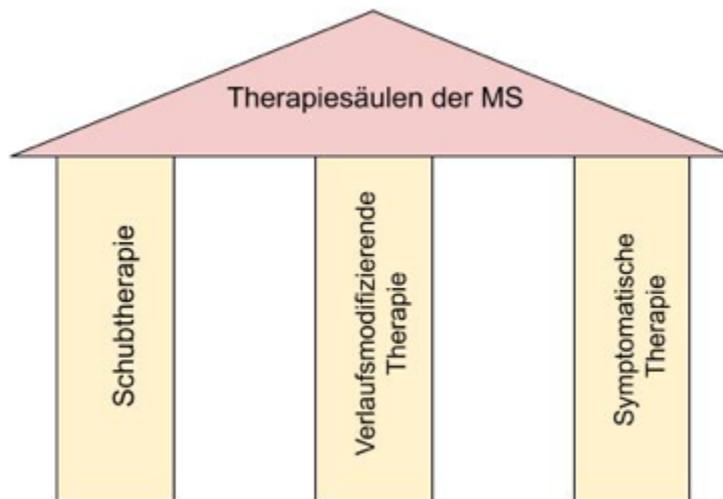


Abbildung 3: Therapiesäulen der Multiplen Sklerose.

Die Therapie der MS ruht auf drei Säulen: Die Therapie des akuten Schubs, die Therapie mit sogenannten „*disease modifying drugs*“ (DMD) und die symptomatische Therapie. Eigene Abbildung nach Hart, F.M. und Bainbridge, J., 2016 (40).

Die Therapie des akuten Schubs

Im akuten Schub ist das primäre Ziel eine Symptomrückbildung. Erste Wahl ist hier eine Hochdosis-Glukokortikoid-Pulstherapie über drei bis fünf Tage (41). In der Regel wird die i.v.-Kurzinfusion morgens verabreicht, diese Applikation entspricht am ehesten dem zirkadianen Rhythmus der Cortisol-Ausschüttung und geht mit weniger Nebenwirkungen einher. Die Therapie wird meist stationär durchgeführt, vor allem in Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen, unter anderem Hypokaliämie, Hyperglykämie sowie psychotische Dekompensationen (41). Die Therapie sollte baldmöglichst nach Symptommanifestation eingeleitet werden. Die zweite Wahl im Schub nach erfolgloser Glukokortikoid-Therapie ist die Plasmaseparation mittels Plasmapherese oder Immunadsorption.

Die verlaufsmodifizierende Stufentherapie

Zum Einsatz kommen hier Immunsuppressiva und Immunmodulatoren als sogenannte „*disease modifying drugs*“ (DMD) (42). Die Vielzahl der mittlerweile zugelassenen Therapien machen es möglich, individualisierte Strategien zu finden, bei denen Wirksamkeit, Nebenwirkungen und mögliche Schäden durch die Therapie in einem gemeinsamen Entscheidungsprozess von Patienten und behandelnden Ärzten abgewogen

werden können. Die Heterogenität der Verläufe erschwert die Erstellung einer strikten Leitlinie zur Behandlung der MS.

Durch eine verlaufsmodifizierende Stufentherapie soll die Zahl der Schübe zurückgehen, so wie die im MRT nachzuweisende Krankheitsaktivität. Ziel der verlaufsmodifizierenden Stufentherapie ist es, den Verlauf der Erkrankung günstig zu beeinflussen und die Progression zu verzögern oder sogar zu verhindern (43).

Für die PPMS ist in der EU nur ein Wirkstoff zur Behandlung zugelassen. Es handelt sich um Ocrelizumab (vergleichbar mit dem auch in der Therapie von B-Zell-Lymphomen und der rheumatoiden Arthritis eingesetzten, aber wesentlich preiswerteren Rituximab), ein monoklonaler Antikörper gegen CD20, welches auf allen B-Lymphozyten exprimiert wird und u.a. die Präsentation von Autoantigenen auf B-Zellen verhindert (42). Zur ersten Wahl bei dem milden Verlauf der RRMS gehören Dimethylfumarat, Glatirameracetat und verschiedene Interferon- β -Therapeutika, die subkutan oder oral verabreicht werden können (42). Auch Teriflunomid kommt zum Einsatz. Als zweite Wahl, vor allem in der Schwangerschaft und postnatal, werden bei moderaten Verläufen außerhalb der Zulassung im Rahmen von Studien auch intravenös Immunglobuline appliziert (44). Hochaktive Verläufe mit mindestens zwei Schüben und eine Verschlechterung der EDSS um einen Punkt in den letzten Monaten werden in erster Linie mit Cladribin, Fingolimod, Natalizumab oder Ocrelizumab behandelt. Auch der Einsatz von Mitoxantron, einem Zytostatikum und unselektivem Immunmodulator, ist bei hoher Krankheitsaktivität möglich (42).

Die symptomatische Therapie

Die Multiple Sklerose geht im Verlauf der Erkrankung mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Symptomen einher. Neben motorischen Einschränkungen der Gehfähigkeit, Spastiken oder Blasenstörungen, sexuellen Funktionen, Ataxie und Tremor, Dysphagie und Dysarthrie, gehören auch psychische Symptome wie Depressivität und ein Erschöpfungs-Syndrom (Chronic Fatigue Syndrom, CFS) dazu (26). Durch eine multimodale Therapie, die medikamentöse sowie nicht-medikamentöse Maßnahmen umfasst, soll eine Verbesserung der Lebensqualität für MS Patienten erzielt werden sowie der Progress der limitierenden Einschränkungen verlangsamt werden (45).

Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Genetisches MS-Tiermodell

Ein Beispiel für ein genetisches Modell für die humane MS sind transgene OSE (optikospinale Enzephalomyelitis)-Mäuse. Zum Einsatz kommen dabei 2D2-Mäuse (Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein, MOG35-55-spezifische, TCR transgene Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund), die mit IgH^{MOG}-Mäusen (mit MOG-spezifischen B-Zellen auf dem Hintergrund eines sonst generellen B-Zell-Knockout) gekreuzt werden. Mit einer 50%-Inzidenz entwickeln die Nachkommen eine spontane Neuroinflammationen des Rückenmarks und des Nervus opticus, die vergleichbar mit der Neuromyelitis optica (Devic-Krankheit) beim Menschen ist. In diesem Tiermodell kooperieren MOG-spezifische T- und B-Zellen in der Genese der Erkrankung (46, 47).

Induktion von Demyelinisierungsprozessen durch Viren

Schon lange hält sich die Theorie, dass es sich bei der MS um eine virusinduzierte Erkrankung handeln könnte. Bis heute wurde allerdings kein Virus identifiziert, das als Ursache in Frage kommt. Es gibt allerdings Viren, die eine Demyelinisierung bei Mäusen induzieren: Dazu gehören Picornaviren, das Theiler's murine Enzephalomyelitis-Virus (TMEV) und bestimmte Virusstämme der Coronaviren wie das Maus-Hepatitis-Virus (MHV). Eine Untergruppe des TMEV, GDVII, ist in höchstem Maße neurovirulent und führt nach einer bis zwei Wochen zum Tod (48). In diesem Modell kommt es zunächst zu einem Axon-Schaden, erst darauf folgt die entzündliche Demyelinisierung und Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen in das ZNS („*inside-out-model*“) (49). Der Erkrankungsverlauf entspricht etwa der humanen PPMS (49).

Induktion durch Toxine

Auch durch Toxine kann eine MS-ähnliche Erkrankung bei Mäusen hervorgerufen werden. Diese Modelle werden vornehmlich zur Studie von de- und remyelinisierenden Prozessen genutzt. Die häufigsten Agenzien zur Induktion sind Cuprizin und Lysolecithin. Cuprizin (Bis(cyclohexanon)oxaldihydrazon) ist ein Kupferchelator und Monoamin-Oxidase-Hemmer, und führt in 0,2% Zumischung zum Normalfutter über mehrere Wochen bei C57BL/6-Mäusen zu einer Demyelinisierung des ZNS. Nach Absetzen von Cuprizin kommt es zu Remyelinisierungsvorgängen (50).

Bei Lysolecithin, auch Lysophosphatidylcholin (LPC), handelt es sich um einen Aktivator der Phospholipase A2, der in das Rückenmark injiziert wird und dort zur fokalen Demyelinisierung führt (51). Aufgrund seines chemischen Aufbaus lagert sich Lysolecithin in die Phospholipiddoppelschicht von biologischen Membranen ein, bildet Mizellen und führt zur Destabilisierung und Zerstörung (52). Besonders Oligodendrozyten, die die Myelinschicht der Axone bilden, reagieren sensibel auf die erhöhte Lysolecithin-Exposition, so kommt es zur akuten Demyelinisierung mit begleitender Immunreaktion mit Mikrogliaaktivierung, Immigration von Makrophagen und erhöhter Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (52).

Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) ist das am besten untersuchte und in der Wissenschaft am weitesten verbreitete Tiermodell für die humane Multiple Sklerose. Bei der EAE kommt es zu einer antigenspezifischen CD4+ T-Zell-Reaktion gegen Antigene der Myelinscheide von Axonen, die schließlich zur Demyelinisierung und Neurodegeneration führt (53).

Das Modell der EAE geht zurück auf den Virologen Thomas M. Rivers aus dem Jahre 1933. Durch wiederholte intramuskuläre Injektionen einer Kaninchenhirnemulsion wurde bei Affen eine Immunreaktion herbeigeführt, die mit einer pathologischen Myelindestruktion im Gehirn der Versuchstiere einherging (54). Das Modell wurde weiterentwickelt, sodass heute durch die zusätzliche Injektion von komplettem Freund-Adjuvans (CFA), das hitzeinaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* enthält, nach nur einmaliger Immunisierung eine EAE induziert werden kann (55). Durch die zusätzliche Gabe von Pertussistoxin wird die Immunreaktion verstärkt.

Zu den heute verwendeten Antigenen zur Induktion der EAE gehören das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), das Myelin-basische-Protein (MBP) (56), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), und das Proteolipid-Protein (PLP) (57).

Die durch das MOG-Peptidfragment 35-55 (MOG35-55) induzierte EAE, wie in dieser Arbeit verwendet, zeichnet sich durch einen chronischen Verlauf und eine T-Zell-vermittelte Autoimmun- und Entzündungsreaktion aus. Die Entzündung zeigt sich dabei vor allem im Rückenmark. Nach der Initiationsphase, in der die Immunreaktion vornehmlich peripher abläuft, migrieren aktivierte Immunzellen in das zentrale

Nervensystem und induzieren in der Effektorphase eine Neuroinflammation, die schließlich zu einer Zerstörung der Myelinscheiden und Neurodegeneration führt.

Pathogenese der EAE und Übertragbarkeit auf die MS

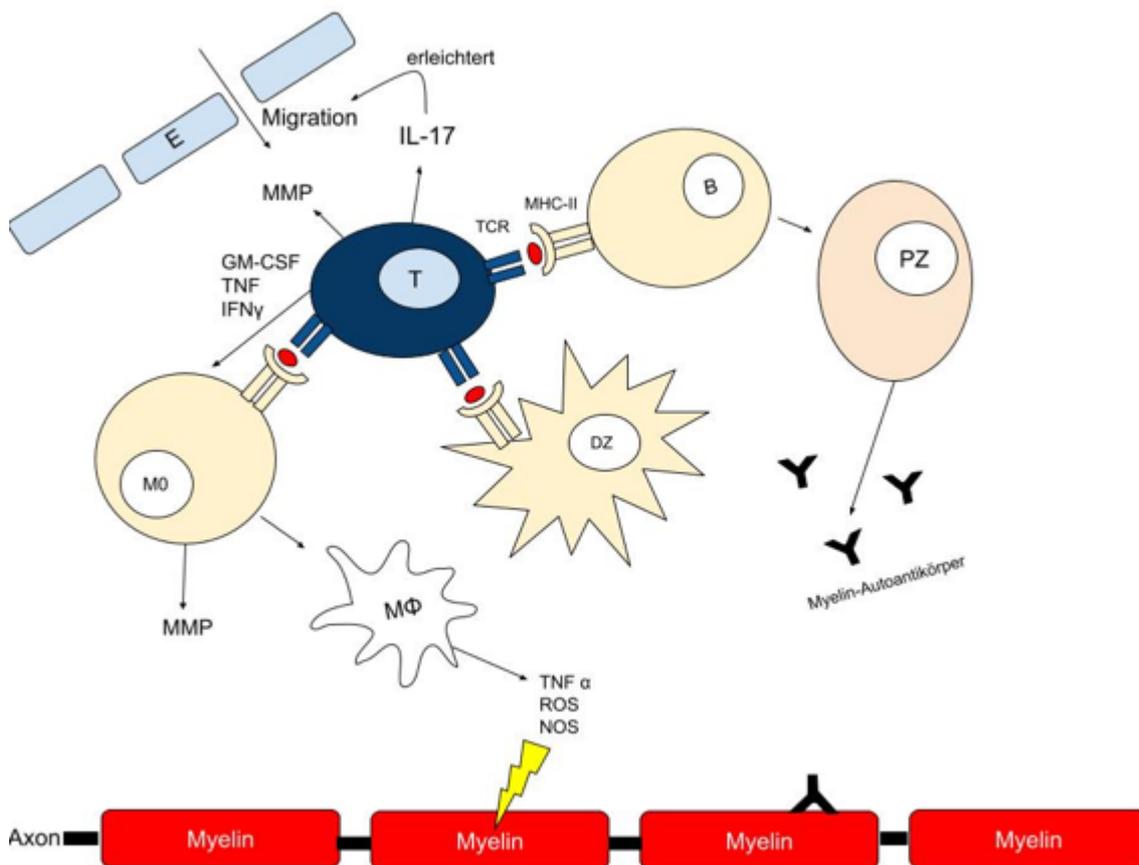


Abbildung 4: T-Zell-vermittelter Pathomechanismus der EAE.

Aktivierte T-Zellen übertreten die Blut-Hirn-Schranke und führen über verschiedene Effektorzellen zur Schädigung von Myelinscheiden um die Axone von Neuronen. Über die Aktivierung von B-Zellen zu Plasmazellen kommt es zur Sezernierung von Myelin-Autoantikörpern.

Abkürzungen: B: B-Zelle; DZ: dendritische Zelle; E: Endothelzelle (Plexus choroideus); GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor; IL-17: Interleukin 17; MHC: *major histocompatibility complex*; M0: Monozyt; M ϕ : Makrophage; MMP: Matrixmetalloprotease; PZ: Plasmazelle; T: T-Zelle; TCR: T-Zell-Rezeptor; TNF: Tumornekrosefaktor; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; NOS: reaktive Stickstoffspezies.

Abbildung mod. nach Kurschus, F.C., 2015 (58).

Die genaue Pathogenese der EAE ist nicht abschließend geklärt. Eine vereinfachte Darstellung zeigt Abbildung 4:

Aktivierte T-Zellen überschreiten die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und werden im ZNS über MHC-Klasse-II-Rezeptoren auf Mikrogliazellen (Gewebsmakrophagen), B-Zellen

und dendritischen Zellen durch die Präsentation von Myelinantigenen reaktiviert (Folge des molekularen Mimikry). Es kommt zur Reaktivierung der T-Zellen und Differenzierung zu T-Helferzellen, die in der Folge autoreaktiv gegen Myelinscheiden agieren (59). Sie sezernieren unter anderem die Zytokine IL-17, IFN- γ und GM-SCF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor). Durch IL-17 kommt es zur Induktion sekundärer Zytokine, Chemokine und Matrixmetalloproteasen (MMP), was wiederum zur erhöhten Permeabilität der BHS und Migration der enzephalolitogenen TH17-Zellen führt. TH17 Zellen gelten als Initiatoren der klassischen EAE-Modelle (58). In der nun ablaufenden Effektorphase kommt es zur Neuroinflammation und Rekrutierungen weiterer Zellen durch sezernierte Zytokine, die außerdem die Permeabilität der BHS weiter erhöhen und das Eindringen von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen ermöglichen. Die reaktivierten T-Zellen üben mit aktivierten Mikroglia- und dendritischen Zellen, antikörperproduzierenden B-Zellen und zytotoxischen CD8+ T-Zellen (zyto-)toxische Effekte aus. Aktivierte Mikroglia sezerniert lösliche Mediatoren, die zur Zerstörung der Myelinscheide führen, darunter zum Beispiel TNF- α , und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und NOS). CD8+ Zellen schütten zytotoxische Granula mit Effektoren wie Perforin, Granzym und INF γ aus (60). Möglicherweise führen sie auch über den Fas/FasL-Weg zur neuronalen Apoptose (61). Zudem werden neurotoxische Substanzen und exzitatorische Aminosäuren ausgeschüttet. Letztere wirken über den NDMA(n-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor neurotoxisch. Zu Plasmazellen differenzierte B-Zellen sezernieren Antikörper, die zur Komplementaktivierung und Zellyse führen. Die Immunantwort wird durch eine erneute Freisetzung von Autoantigenen in einem Circulus vitiosus zusätzlich verstärkt. Die von B-Zellen produzierten Antikörper scheinen vor allem in der chronischen Phase der MS von Bedeutung zu sein (62).

Um die heterogene Pathogenese der MS darzustellen, werden verschiedene EAE-Modelle verwendet. So zeigt sich bei Induktion von C57BL/6 Mäusen mit MOG 35-55 (wie in dieser Arbeit verwendet) ein monozyklischer, chronischer Krankheitsverlauf, der nach einigen Wochen abnimmt, wohingegen eine Immunisierung mit PLP 139-151 in SJL Mäusen einen schubförmig-remittierenden Verlauf induziert (63). Außerdem bildet das Immunisierungsmodell lediglich die „*outside-in-theory*“ ab, nämlich die periphere Initiierung einer Immunreaktion und anschließende Migration aktivierter autoreaktiver T-Zellen in das ZNS. Die „*inside-out-theory*“, also der vorausgehende

neurodegenerative Prozess mit sekundärer Einwanderung von Immunzellen wird nicht durch das EAE-Modell abgebildet. Hierzu können ggf. das Cuprizon-Modell oder Tiermodelle für die virusinduzierte Demyelinisierung eingesetzt werden (64).

Fragestellung

Immer weiter in den Fokus der MS-Forschung rückt die Vorstellung einer bidirektionalen Kommunikation zwischen Darm(-mikrobiom) und Gehirn, die „*gut-brain-axis*“. Epidemiologische Studien unterstützen die hohe Relevanz von Ernährungsfaktoren für die Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Autoimmunerkrankungen wie der MS (32). Gezielte diätetische Modifikationen könnten demnach begünstigend auf die Krankheitsaktivität bei MS Patienten wirken, was eine attraktive Ergänzung zu den aktuellen Therapiesäulen bei der Behandlung darstellen könnte (65).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung der oral aufgenommenen modifizierten Fettsäure (*structurally engineered fatty acid*) SEFA-6207 der Firma NorthSea Therapeutics, einem nicht für den Energie- oder Zellmembranstoffwechsel aufgebrauchten Analogon der Omega-3 ungesättigten Fettsäure mit allein signalgebenden Eigenschaften, auf die Schwere und den Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) untersucht, sowie zentrale entzündlichen Korrelate in Darm und ZNS charakterisiert werden.

Ziel der Arbeit war es somit, den klinischen Effekt der SEFA-6207 auf den Krankheitsverlauf der EAE gemäß einer validierten Score-Tabelle sowie des Gewichtsverlustes zu charakterisieren. Dazu wurde SEFA-6207 in zwei unterschiedlichen Dosen (Niedrig- und Hochdosis-Gruppe) oral zugeführt. Als Kontrollgruppe diente eine Gruppe, die anstelle von SEFA reizfreies Maisöl verabreicht bekam. Weiterhin wurden mögliche Unterschiede in der Histopathologie untersucht. Bei den dafür analysierten Geweben handelte es sich um verschiedene Abschnitte des Rückenmarks und des Darms. Im Rückenmark wurde der Grad der Demyelinisierung bestimmt, während im Darm durch immunhistochemische Färbung verschiedene Zelltypen quantifiziert werden sollten. Mittels qPCR sollten Unterschiede in der Genexpression zentraler Entzündungsmediatoren untersucht und beschrieben werden. So sollte ein möglicher immunmodulatorischer Effekt auf zellulärer Ebene, sowie eine klinische Relevanz durch die therapeutische Zufuhr von SEFA nachgewiesen werden. Erkenntnisse aus diesem Versuch könnten zu einem neuen Therapiezusatz für die MS führen.

Einleitende Literaturdiskussion

Ernährung und Multiple Sklerose

Die Ernährung wird als möglicher Faktor in der Pathogenese der MS gesehen (66). Dieser Aspekt ist deshalb besonders interessant, da sich Ernährung im Vergleich zu genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen für alle Patienten modifizieren und anpassen lässt. Es handelt sich damit um einen vielversprechenden Ansatz komplementär zu den vorhandenen Therapiestrategien (67).

Durch Nahrungsfaktoren können Stoffwechselwege, zelluläre Entzündungsreaktionen sowie das symbiontische Mikrobiom des Darms beeinflusst werden und über die Darm-Hirn-Achse einen Einfluss auf die MS haben. Entzündungsfördernd scheint eine hochkalorische „westliche“ Ernährungsformen („*Western diet*“) zu sein, die sich durch hohen Salzkonsum, den Genuss von reichlich rotem Fleisch, gezuckerten Getränken, frittierten Speisen, zu wenig Ballaststoffe, meist verbunden mit zu geringer körperlicher Betätigung auszeichnet (68). Diese Ernährungsweise fördert Entzündungsreaktionen durch Aktivierung von z.B. T-Zellen und Makrophagen, und führt zu einer Dysbiose des Darms, d.h. einer veränderten Zusammensetzung verschiedener Bakterienspezies, was wiederum deren Balance und Metabolite verändert. Beide Faktoren führen damit zu einer unterschwelligen intestinalen und auch systemischen Entzündung (69, 70).

Dies scheint eine wichtige Ursache für die erhöhte Prävalenz der MS in westlichen, industrialisierten Ländern zu sein, deren Lebensweise sich durch Sesshaftigkeit, hochkalorische Ernährung und erhöhte Aufnahme gesättigter tierischer Fette auszeichnet (68).

Das Mikrobiom und der Einfluss diätetischer Fettsäuren auf die Darm-Hirn-Achse

Der Gastrointestinaltrakt stellt die größte Interaktionsfläche des Organismus mit seiner Umwelt dar und beherbergt das größte Immunsystem des Körpers (71). Auch wenn viele grundlegende Fragen zum Verständnis noch offen sind, ist etabliert, dass das intestinale Mikrobiom essenziell für eine adäquate Immunantwort des Darms ist (71). In keimfrei gehaltenen Mäusen, die unter sterilen Bedingungen geboren und gehalten werden und damit kein intestinales Mikrobiom besitzen, ist die Ausbildung eines intakten Immunsystems beeinträchtigt (72). Sie haben durch niedrigere Spiegel von Antikörpern und Leukozyten ein schwächeres angeborenes sowie erworbenes Immunsystem. So finden sich weniger CD4+ T-Zellen in der Lamina propria des Darms, eine Malformation

von Lymphknoten und Milz und hypoplastische intestinale Peyer-Plaques. Die Anzahl von IL-17 produzierenden T-Zellen ist ebenfalls deutlich vermindert, was zu einer unzureichenden Induktion der EAE in diesen Versuchstieren führte (72). Das Mikrobiom moduliert damit maßgeblich die Balance zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen, die ausschlaggebend für ein intaktes Immunsystem ist (73, 74). Bei der EAE sind deshalb auch die Effektor-T-Zellen verringert und in ihrer Funktion beeinträchtigt (14).

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass die Neuroinflammation durch die Darm-Hirn-Achse moduliert wird (67, 72). Die Autoren Joscelyn und Kasper halten das Darmmikrobiom sogar möglicherweise für den wichtigsten umweltbedingten Risikofaktor für die MS (75).

Fettsäuren als Nahrungskomponenten oder Metabolite des Mikrobioms im Speziellen haben einen maßgeblichen Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung im Darm. Ob Immunreaktionen durch Fettsäuren begünstigt oder gehemmt werden, ist abhängig von verschiedenen Eigenschaften:

Kettenlänge

Langkettige Fettsäuren (*long-chain fatty acids*, LCFA) mit einer Kettenlänge von 13-21 Kohlenstoffatomen begünstigen die Differenzierung und Proliferation von TH1 und TH17 Zellen und führen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und IL-17. Sie führen damit zu einer Exazerbation der EAE (71). LCFA, wie Laurinsäure mit einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoff-Atomen, unterdrücken außerdem die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und führen zu einer verminderten Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (71).

Kurzkettige Fettsäuren (*short-chain fatty acids*, SCFA) wie Propionsäure mit drei Kohlenstoff-Atomen hingegen führen zu einer erhöhten Treg-Zell-Differenzierung, Produktion von IL-10 und führen zu einem mildereren Verlauf der EAE sowie einer verringerten axonalen Schädigung (71). Kurzkettige Fettsäuren sind Metabolite, die als Nebenprodukt der Verstoffwechslung von pflanzlichen Polysacchariden von bestimmten Darmbakterien anfallen (76). Ihre antiinflammatorische Wirkung üben sie einerseits über spezifische G-gekoppelte Rezeptoren, z.B. GPR 41 und GPR43, auf den Immunzellen (77), oder über die Hemmung von Histondeacetylasen in ihrem Zellkern aus (74). Eine orale Zufuhr von SCFA wird dadurch limitiert, dass diese bereits im oberen

Gastrointestinaltrakt metabolisiert werden und nur zu einem geringen Anteil in Ileum und Kolon, einer Hauptlokalisation mukosaler Immunzellen, ankommen. Eine chemische Modifizierung, wie eine Veresterung kurzkettiger Fettsäuren, könnte die orale Zufuhr kurzkettiger Fettsäuren zukünftig erleichtern (76).

Gesättigte vs ungesättigte Fettsäuren

Neben der Kettenlänge unterscheiden sich Fettsäuren außerdem in ihrer Anzahl und Position von Doppelbindungen. Es gibt gesättigte Fettsäuren ohne Doppelbindungen (*saturated fatty acids*, SFA), einfach gesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated acids*, PUFA).

Wie oben beschrieben, haben gesättigte Fettsäuren abhängig von ihrer Kettenlänge unterschiedliche Auswirkungen auf die EAE.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben pro- wie auch antiinflammatorische Eigenschaften. Dabei unterscheidet man zwischen Omega-3- und Omega-6- PUFA (78). Omega-3-Fettsäuren (ω -3-) besitzen eine Doppelbindung zwischen dem dritten und vierten C-Atom ausgehend vom (endständigen) Omega-C-Atom, Omega-6- (ω -6) entsprechend zwischen dem sechsten und siebten C-Atom.

Fleisch und Fleischprodukte enthalten Arachidonsäure, eine Omega-6-Fettsäure, als Vorstufe für proinflammatorische Eikosanoide (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene) (65). Omega-3-Fettsäuren wiederum, hauptsächlich in Fisch- aber auch Rapsöl enthalten, haben antiinflammatorische Eigenschaften. In einer ausgewogenen Ernährung sollte das Verhältnis von ω -6- und ω -3-Fettsäuren deshalb ausgeglichen sein. Eine „*Western diet*“ zeichnet sich allerdings durch ein Ungleichgewicht in diesem Verhältnis aus, was offensichtlich zu der höheren Inzidenz chronisch entzündlicher Erkrankungen beiträgt (65).

Modifikationen des Darmmikrobioms und dessen Metabolismus durch Ernährungskomponenten wie Fettsäuren stellen zukünftig vielversprechende Ansätze für erfolgreiche Therapiezusätze der MS dar (79).

Structurally engineered fatty acids (SEFA)

NorthSea Therapeutics ist ein paneuropäisches Biotechnologieunternehmen, das sich auf die Entwicklung von neuen und innovativen Strategien z.B. für die Behandlung des metabolischen Syndroms, des Typ 2 Diabetes und der Nicht-Alkoholische Steatohepatitis (NASH) und ihren Folgen, inklusive der Leberfibrose und Gefäßsklerose konzentriert hat.

Icosabutat ist die erste SEFA, die sich bereits in einer Phase 2-Studie für NASH-Patienten befindet. Icosabutat ist eine metabolisch stabile Variante der ω 3-Fettsäure EPA (*eicosa-pentaenoic acid*). Es wird einmal pro Tag per os zugeführt und hat in präklinischen Modellen und in zwei Phase 2 Studien vielversprechende Effekte gezeigt. So wirkte Icosabutat über die Reduktion des Plasma Cholesterol- und Triacylglycerol-Spiegels ausgeprägt antiatherogen (80). Vergleichbar günstige Ergebnisse mit Icosabutat wurden in der experimentellen NASH (Daten des TIM) und in der Interimsanalyse der Phase 2b Studie (ICONA) erreicht (81, 82). Icosabutat zeigte hier stark entzündungshemmende, antifibrotische und antioxidative Eigenschaften und verbesserte das kardiometabolische Risikoprofil (81).

Ich untersuchte deshalb den Effekt einer neuartigen, mittelkettigen SEFA (SEFA-6207, Abb.5) auf den klinischen Verlauf und die Entzündungsparameter im Darm und im ZNS anhand eines etablierten Mausmodells der Multiplen Sklerose, der EAE.

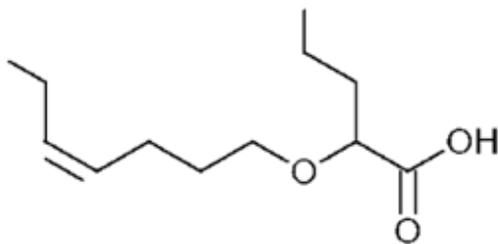


Abbildung 5: Chemische Struktur von SEFA-6207.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde SEFA-6207, eine mittelkettige, chemisch modifizierte Fettsäure, erstmals in einem etablierten Mausmodell der Multiplen Sklerose, der EAE, eingesetzt. Dabei wurden der Niedrigdosis-Gruppe 0,3 mmol/kg KG SEFA per Schlundsonde zugeführt, der Hochdosis-Gruppe 0,6 mmol/kg KG. Die Kontrollgruppe erhielt eine Kontrollsubstanz (Placebo).

Material und Methoden

Material

Tabelle 3: Puffer, Blockseren und Färbelösungen

Name	Herstellung
ABC-Komplex	2 Tropfen ABC Reagenz A (Avidin) 2 Tropfen ABC Reagenz B (biotinylierte Meerrettichperoxidase) 5 ml TBS 1X
Ammoniumhydroxidlösung 0,1%	1 ml konzentriertes Ammoniumhydroxid 1000 ml destilliertes Wasser
Blockserum	2,5 ml Ziegenserum 47,5 ml TBS
Chromalaun-Lösung	0,2 g Chromalaun 10 ml destilliertes Wasser
DAB-Entwickler-Lösung	5 ml destilliertes Wasser 2 Tropfen DAB Reagenz 1 (Puffer) 4 Tropfen DAB Reagenz 2 (DAB-Substrat) 2 Tropfen DAB Reagenz 3 (Meerrettichperoxidase-Substrat) DAB Substrat Kit
Entwickler-Lösung (Versilberung nach Bielschowsky)	0,2 ml 37% Formaldehyd 12 ml destilliertes Wasser 12,5 µl 20% Salpetersäure 0,05 g Zitronensäure Monohydrat
Eosin-Lösung	1 g Eosin 300 ml destilliertes Wasser 3 Tropfen Essigsäure
Gelatine-Lösung	3 g Gelatine 144 ml destilliertes Wasser 60 ml einer 95% Ethanollösung

Hämatoxylin-Lösung (Hämalaun nach Mayer)	1 g Hämatoxylin 1000 ml destilliertes Wasser 0,2 g Natriumiodat 50 g Kalialaun 50 g Chloaralhydrat 1g Zitronensäure Monohydrat
Lithiumcarbonat-Lösung 0,05%	0,1 g Lithiumcarbonat 200 ml destilliertes Wasser
Luxol-Fast-Blue-Lösung	1 g Luxol 1L 96% Ethanol 5 ml 10% Essigsäure
Natrium-Citratpuffer	29,4 g Tri-Natrium-Citrat Dihydrat 900 ml destilliertes Wasser pH auf 6,0 auf 1000 ml destilliertes Wasser auffüllen
Natrium-Thiosulfatlösung 5 %	5 g Natriumthiosulfat 100 ml destilliertes Wasser
Silbernitrat-Lösung 10%	5 g Silbernitrat 50 ml destilliertes Wasser
TBS (trisgepufferte Salzlösung) 1x	100 ml 10X TBS-Stammlösung 900 ml destilliertes Wasser 1 ml Tween 20
TBS Stammlösung 10x	24.2g Trizma Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 80g NaCl 1 l destilliertes Wasser (entmineral.) pH auf 7,6
Wasserstoffperoxid 3%	1 ml 30% Wasserstoffperoxid 99 ml TBS

Chemikalien**Tabelle 4:** Chemikalien

Name	Hersteller
Ammoniaklösung 32%	Carl Roth, Karlsruhe
Chloaralhydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC-behandeltes-Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Eindeckmedium Roti-Histokitt II	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure ROTIPURAN 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Gelatine	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin A nach Weigert	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Honeywell Riedel-de Haen, Seelze
Kalialaun	Carl Roth, Karlsruhe
Ketamin Hameln 50 mg/ml	Hameln Pharmaceuticals, Hameln
Lithiumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natrimhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumiodat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Perjodsäurelösung 1%	Carl Roth, Karlsruhe
Ribozol	VWR International, Radnor, USA
Rompun 2%	Bayer vital GmbH, Leverkusen
Salpetersäure 68%	Carl Roth, Karlsruhe
Schiff'sche Reagenz	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Solvent blue 38 (Luxol)	Carl Roth, Karlsruhe
Tri-Natrium-Citrat Dihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trizma base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe

Xylol	Merck KGaA, Darmstadt
Ziegen Serum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe

Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
Ziege Anti-CD45- Antikörper (Primärantikörper)	1:250	R&D Systems, Minneapolis, USA
Kaninchen Anti-CD3- Antikörper (Primärantikörper)	1:100	Abcam, Cambridge
Ziege Anti-Kaninchen- Antikörper (sekundärer Antikörper)	1:500	Abcam, Cambridge
Esel Anti-Ziege-Antikörper (sekundärer Antikörper)	1:500	R&D Systems, Minneapolis, USA

Primersequenzen

Tabelle 6: Primersequenzen

mRNA-Target	Sequenz 5' – 3'	Hersteller
18 S	for: GAA ACG GCT ACC ACA TCC rev: TTA CAG GGC CTC GAA AGA	Metabion GmbH, Planegg
CD11b	for: ATG GAC GCT GAT GGC CAA TAC C rev: TCC CCA TTC ACG TCT CCC A	Metabion GmbH, Planegg
IFN γ	for: TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA rev: TGG CTC TGC AGG ATT TTC AT	Metabion GmbH, Planegg
IL-10	for: CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA rev: TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG	Metabion GmbH, Planegg
IL-6	for: CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG rev: GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA	Metabion GmbH, Planegg
iNOS	for: ACA TCG ACC CGT CCA CAG TAT rev: CAG AGG GGT AGG CTT GTC TC	Metabion GmbH, Planegg
TGF β 1	for: AGA GGT CAC CCG CGT GCT AA rev: TCC CGA ATG TCT GAC GTA TTG A	Metabion GmbH, Planegg

TNF- α	for: TCT AC GAA CTT CGG GGT GAT CGG TCC rev: AGA TAG CAA ATC GGC TGA CGG TGT GGG	Metabion, Planegg
---------------	---	-------------------

for = forward primer, rev = reverse primer

Kits und andere Reagenzien

Tabelle 7: Kits und andere Reagenzien

Name	Hersteller
DAB Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Hooke Kit MOG35-55/ CFA Emulsion, PTX, EK-2110	Hooke Laboratories, MA, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio Rad Laboratories, München
Power SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
96-Loch-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Basisfutter	ssniff Spezialdiäten (Soest, Deutschland)
Deckgläser 24*50 mm	VWR International, Radnor, USA
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Gewebe-Einbettkassetten ActivFlo	Leica Biosystems, Wetzlar
Injektions-Kanülen Sterican	B. Braun, Melsungen
Mikrotomklingen MX 35 Premier 34/80 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger Superfrost Ultra Plus Slides	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraffin Paraplast	Leica Biosystems, Wetzlar
Pipettenspitzen 1000 μ l	VWR International, Radnor, USA
Pipettenspitzen 200 μ l	VWR International, Radnor, USA

Schlundsonde (Cadence Science, unflexible Edelstahladel)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SEFA-6207	NorthSea Therapeutics, Amsterdam, Niederlande
Vehikelsubstanz (Maisöl)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Geräte und Instrumente

Tabelle 9: Geräte und Instrumente

Name	Hersteller
DAKO Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
ErgoOne Pipette 10 µl	Starlab GmbH, Hamburg
ErgoOne Pipette 1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg
ErgoOne Pipette 2,5 µl	Starlab GmbH, Hamburg
ErgoOne Pipette 20 µl	Starlab GmbH, Hamburg
ErgoOne Pipette 200 µl	Starlab GmbH, Hamburg
Gewebeeinbettautomat TP1020	Leica Biosystems, Wetzlar
Kugelmühle TissueLyser II	Quiagen, Hilden
Leica HI1210 Paraffinstreckbad	Leica Biosystems, Wetzlar
Leica RM2255 Mikrotom	Leica Biosystems, Wetzlar
Metallkugeln	Quiagen, Hilden
Ofen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Präparierbesteck	Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg
Sartorius AX2202 Präzisionswaage	PK Electronic Ettlingen
StepOnePlus Real-Time-PCR Maschine	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tecan Platten-Reader infinite M 200 Pro	Tecan, Männedorf
Thermocycler	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Vortexmischer VortexGenie 2	Scientific Industries Inc., NY, USA
Zeiss Mikroskop AX10	Carl Zeiss, München

Versuchstiere

Für die Untersuchung wurden 9 Wochen alte, weibliche, 17-22 g schwere C57BL/6J Mäuse (Janvier/Frankreich) eingesetzt. Die Haltung erfolgte gemäß standardisierten Laborbedingungen in gut belüfteten Käfigen, die regelmäßig gewechselt wurden. Die Versuchstiere wurden bei einem festen Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden und einer standardisierten Raumtemperatur ($23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) sowie ausreichender Luftzirkulation und Luftfeuchtigkeit gehalten. Vor Beginn des Versuches hatten sich die Tiere wenigstens eine Woche an die Umgebung akklimatisiert.

Der Tierversuch ist nach dem §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz durch das Landesuntersuchungsamt genehmigt unter der Tierversuchsnummer G17-1-019. Alle Tätigkeiten an lebenden Versuchstieren wurde von qualifizierten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts unter Einhaltung der geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

Methoden

Immunisierung von Mäusen: Induktion der EAE

Zur Induktion wurde das HOOKE Kit (EK-2110) verwendet.

An Tag 0 wurde den Versuchstieren je 0,1 ml Antigen-Emulsion, die neben dem MOG35-55-Protein komplettes Freund-Adjuvans (CFA) mit hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* enthält, subkutan in den oberen und unteren Rücken injiziert. Dies erfolgte unter Isofluran-Narkose. Im Anschluss erfolgte unter sterilen Bedingungen die Vorbereitung der Pertussistoxin-Lösung (PTX-Lösung). Die hergestellte Lösung wurde bis zur Injektion auf Eis gelagert und innerhalb von zwei Stunden nach Injektion der Antigenemulsion verabreicht. Pro Maus wurden 100ng (1ml) PTX-Lösung intraperitoneal appliziert.

An Tag 1 wurde erneut PTX-Lösung hergestellt und 100 ng intraperitoneal appliziert, um die Immunreaktion zusätzlich zu verstärken. Zwischen den zwei Injektionen der PTX-Lösung lagen mindestens 22 Stunden.

Verlauf der EAE

Die Versuchstiere wurden ab Tag 7 täglich visitiert. In der Regel treten erste klinische Symptome der EAE zwischen Tag 9 und Tag 14 auf. Die Tiere wurden beobachtet bis die Kontrollgruppe ein scheinbares Erkrankungsmaximum erreicht hatte. Beim Scoring hat sich eine 5-Punkte-Skala etabliert (Tabelle 9), die zur Bestimmung der Krankheitsaktivität herangezogen wurde (83).

Da die Tiere im weiteren Erkrankungsverlauf nicht in der Lage sind, das Futter in der sich über ihren Köpfen befindlichen Troge zu erreichen, musste Futter auf dem Käfigboden zur Verfügung gestellt werden. Um eine ausreichende Flüssigkeitsversorgung zu garantieren, wurde Futter zusätzlich eingeweicht und auf dem Käfigboden bereitgestellt.

Tabelle 10: Klinischer Score der EAE

Score	klinische Beobachtungen
0,0	Das Tier zeigt keine neurologischen Ausfallerscheinungen.
0,5	Die Schwanzspitze ist lahm.
1,0	Der Schwanz ist lahm. Wird er angehoben, ist keine Spannung mehr vorhanden, er fällt kraftlos zu Boden.
1,5	Der Schwanz ist lahm, die Hinterbeinlähmung setzt ein. Wird die Maus auf ein Käfiggitter gesetzt, fällt mindestens ein Bein konstant durch die Streben. Die Maus beginnt langsam, wacklig zu laufen.
2,0	Schwäche in den beiden Hinterbeinen. Wird die Maus am Schwanz hochgehoben, spreizt sie nicht die Beine, sondern zieht sie an den Körper heran.
2,5	Noch ist Bewegung in den Hinterbeinen, doch die Füße werden nachgezogen. Auch: Ein Bein ist komplett gelähmt, während das andere noch funktionsfähig ist.
3,0	Schlaffer Schwanz und komplette Hinterbeinlähmung.
3,5	Komplette Hinterbeinlähmung. Wird die Maus auf die Seite gelegt, ist sie nicht in der Lage, sich selbst aufzurichten. Die Hüfte ist komplett schlaff und hängt breitbeinig zu Boden.
4,0	Schlaffer Schwanz, komplette Hinterbeinlähmung und teilweise Vorderbeinlähmung. Die Maus bewegt sich minimal fort, erscheint aber munter und hat Appetit.
4,5	Komplette Hinterbein-, partielle Vorderbeinlähmung. Die Maus ist nicht mehr wach, reagiert kaum auf Kontakt. Die Maus sollte wegen schwerer Lähmung eingeschläfert werden.
5,0	Die Maus wurde tot aufgefunden oder wegen schwerer Lähmung eingeschläfert.

Gewichtskontrolle

Neben der Erhebung des EAE-Scores wurden die Tiere täglich vor Verabreichung der Kontroll- und Versuchssubstanzen mithilfe einer Waage gewogen.

Versuchsaufbau

Insgesamt wurden 3 Gruppen á 10 Tiere untersucht. Den Versuchsaufbau zeigt Abbildung 6: Alle Tiere erhielten eine definierte, reizfreie (da weizenfreie) Standarddiät (Fa. Ssniff Spezialdiät). Diese setzt sich aus definierten Kohlenhydraten, Fetten und einem Proteinanteil aus Zein zusammen. Fehlende Aminosäuren, Spurenelemente und Vitamine sind substituiert. Um eine Beeinflussung durch die Applikationsform zu vermeiden, wurde der Kontrollgruppe ein reizfreies Placebo, Maisöl, per oraler Schlundsonde zugeführt.

Die Niedrigdosis-Gruppe erhielt zusätzlich zur Basisdiät SEFA-6207 in niedriger Dosis, 0,3 mmol/kg Körpergewicht (KG) pro Tag. Die Hochdosis-Gruppe erhielt zusätzlich zur Basisdiät SEFA in hoher Dosis, 0,6 mmol/kg KG pro Tag. Die SEFA wurden oral über eine Schlundsonde verabreicht.

Die Verabreichung der SEFA wurde parallel zum Start des Scorings an Tag 7 nach Immunisierung begonnen. Die Applikation erfolgte einmal täglich nach Gewichtskontrolle und Scoring.

Am durchschnittlichen Erkrankungsmaximum der Kontrolltiere wurden alle Versuchstiere abgetötet, bei denen keine vorherige Tötung durch Tierschutzbestimmungen nötig war. Danach wurden die entsprechenden Organe histologisch aufgearbeitet oder zur cDNA-Synthese für die Analyse der Genexpression vorbereitet.

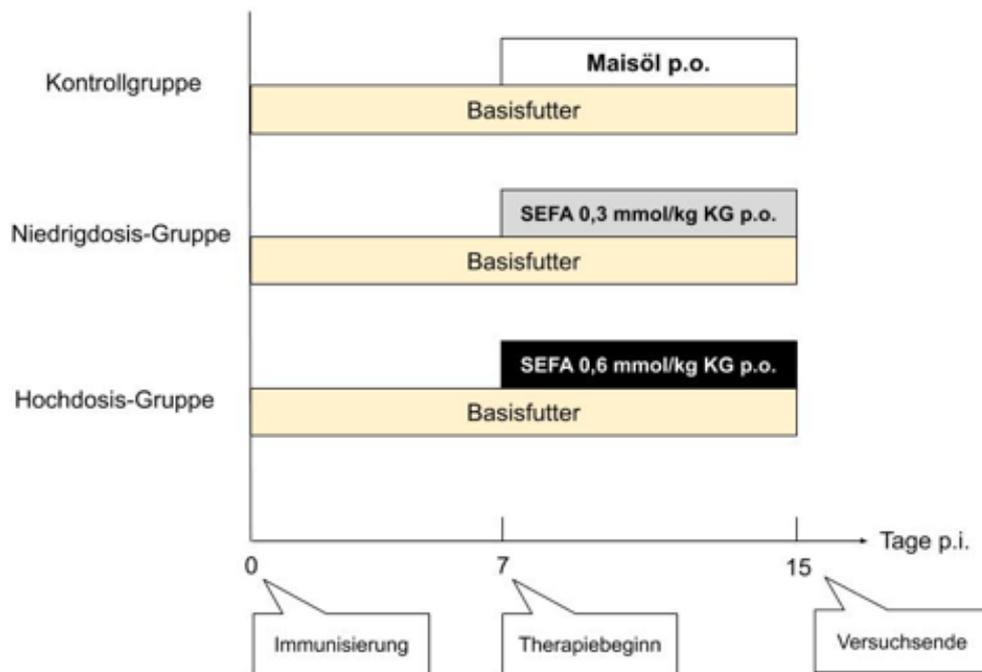


Abbildung 6: Versuchsaufbau.

Verglichen wurden drei Versuchstiergruppen. Alle Tiere wurden an Tag 0 immunisiert. Ab Tag 7 wurde den Tieren zusätzlich zur reizfreien Basisdiät ein Placebo (Kontrollgruppe), SEFA in niedriger Dosierung (0,3 mmol/kg KG, Niedrigdosis-Gruppe) oder SEFA in hoher Dosierung (0,6 mmol/kg KG, Hochdosis-Gruppe) per Schlundsonde zugeführt. An Tag 15 nach Immunisierung wurde der Versuch beendet.

Probenentnahme und Gewebeaufarbeitung

Fixierung der Gewebe und Anfertigung von Schnitten

Zunächst wurden die Versuchstiere in Ketamin/Rompun-Narkose durch transkardiale Perfusion mit Fixierlösung (Formaldehyd) devitalisiert und fixiert. Um Gehirn und Rückenmark freizulegen wurde dann die Haut entlang der Schädelnaht eingeschnitten und vom Schädel gezogen, ebenso erfolgte eine Hautinzision entlang der Wirbelsäule, um diese freizulegen. Nun wurde der Schädel eröffnet. Die Wirbelsäule wurde zunächst im Ganzen mit dem Gehirn entnommen. Bei Entnahme des Gehirns aus der Schädelgrube wurden vorher die Hirnnerven durchtrennt, ebenso der Nervus opticus, möglichst distal vom Chiasma opticum. Die Wirbelsäule dann über zwei Tage in Formaldehyd eingelegt, damit die Fixierlösung das Gewebe hinreichend durchtränkte; dazu wurde Formaldehyd mehrfach ausgetauscht. Das Rückenmark wurde dann aus dem knöchernen Skelett herausgetrennt, dazu mussten jeweils beidseitig die Wirbelbögen jeden Wirbelkörpers durchtrennt werden.

Das herausgelöste Rückenmark wurde nun der Anatomie folgend in mehrere Abschnitte unterteilt, um repräsentative Abschnitte für die Histologie zu gewinnen. Die Wirbelsäule der Maus besteht aus sieben Halswirbeln, dreizehn Brustwirbeln und sechs Lendenwirbeln, dem Kreuzbein und den Schwanzwirbel. Entsprechend wurden Abschnitte aus der Halswirbelsäule (zervikal), Brustwirbelsäule (thorakal) und Lendenwirbelsäule (lumbal) entnommen. Orientierungshilfen waren dabei die Intumescencia cervicalis und die Intumescencia lumbosacralis, makroskopisch sichtbare Umfangzunahmen des Rückenmarks im Hals- und Lendenbereich. In einem Gewebereinbettungsautomat erfolgte die Dehydrierung des Gewebes, bei dem die Gewebekassetten in eine aufsteigende Alkoholreihe und anschließend in Xylol getaucht. Schließlich wurde das fixierte Gewebe in Paraffin eingebettet.

Die Gewebeschnitte zur Färbung wurden mit dem Microtom angefertigt und im Anschluss in ein Wasserbad mit heißem, destilliertem Wasser zum Glätten gegeben. Für die Rückenmarksschnitte wurde eine Dicke von 6 μm gewählt, für die Schnitte des proximalen Dünndarmabschnittes (Ileum) 4 μm . Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aus dem Wasserbad entnommen und anschließend bei Raumluft getrocknet.

Sonstige Vorbereitungen: Vorbehandlung der Objektträger

Die angefertigten Rückenmarksabschnitte zeigten insgesamt eine schlechtere Haftung auf der Oberfläche der verwendeten Objektträger. Damit die Schnitte also verlässlich haften, wurden die Objektträger mit Gelatine beschichtet. Dabei wurden 3g Gelatine in 144 ml destilliertem Wasser gegeben und unter ständigem Rühren erhitzt, bis sich die Gelatine gelöst hatte. Dann wurden 60 ml einer 95% Ethanollösung hinzugegeben. Nachdem das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 10 ml einer 0,02 % Chromalaun-Lösung und 14 ml Essigsäure hinzugegeben. Die Objektträger wurden anschließend kurz in das Gemisch eingetaucht und anschließend über Nacht getrocknet.

Standardfärbungen

Um die Gewebe zu charakterisieren und pathologische Veränderungen darzustellen, wurden verschiedene Färbungen herangezogen.

HE Protokoll

Die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) gehört zu den Standardfärbungen in histologischen und immunologischen Labors. Dabei werden Zellkerne violett-blau angefärbt, wohingegen das Zytoplasma blassrosa erscheint.

Zur Vorbereitung für die Färbung wurden die paraffinierten Schnitte zunächst für eine halbe Stunde bei 65°C in den Ofen gestellt, wobei das Paraffin schmilzt. Es folgten drei Waschvorgänge in 100% Xylol zur vollständigen Entparaffinierung, danach folgte das Waschen zur Rehydrierung des Gewebes in eine absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 100%, 95% und 70% für jeweils 5 min) und zuletzt in destilliertes Wasser getaucht. Es folgte die Färbung in Hämalaun-Mayer-Lösung für 10 Sekunden. Die Schnitte wurden danach zum Bläuen für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser in einer Küvette gelagert. Nach einem erneuten Waschvorgang in destilliertem Wasser folgte die Gegenfärbung der Schnitte in der Eosin-Lösung für etwa eine halbe Minute. Nach einem erneuten Waschvorgang in destilliertem Wasser folgte eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung des Gewebes, sowie Waschen in Xylol. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eindeckserum und Deckgläsern eingedeckt.

Versilberung

Eine spezifische neuropathologische Färbung, ist die Versilberung nach Bielschowsky (Bielschowsky 1903). Hierbei können axonale Strukturen angefärbt werden, um

pathologische Veränderungen wie die Reduktion der axonalen Dichte nachzuweisen. In der Versilberung werden Axone dunkelbraun bis schwarz gefärbt, das restliche Gewebe erscheint hellbraun.

Formalin-fixierte, paraffinierte, 6 µm dicke Gewebeschnitte wurden hierbei zunächst durch Anwärmung im Ofen und Waschung in Xylol vom Paraffin befreit und in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Präparate in einer 10% Silbernitratlösung bei 37°C im Ofen erwärmt. Nach mehreren Waschvorgängen mit destilliertem Wasser wurde dieser Lösung tropfenweise eine 32% Ammoniaklösung hinzugegeben, bis sich unter ständigem Rühren das gebildete Präzipitat aufgelöst hatte. In dieser Silbernitrat-Ammoniak-Lösung wurden die Schnitte wiederum für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach mehreren Waschvorgängen mit 0,1% Ammoniumhydroxid wurden 350 µl der Entwicklerlösung zugesetzt. In dieser Lösung wurden die Schnitte 10 Minuten inkubiert. Anschließend sind Nervenfasern schwarz und der Hintergrund grau gefärbt. Nach Waschvorgängen in 0,1% Ammoniumhydroxid wurden die Schnitte in einer 5% Natrium-Thiosulfatlösung fixiert. Es folgte das Waschen, eine aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren der Schnitte und schließlich das Decken der angefärbten Schnitte mit Eindeckmedium und Deckglas.

LFB-PAS

Eine weitere, neuropathologisch spezifische Färbung ist die LFB-PAS (Luxol Fast Blue-Periodic Acid Schiff) Färbung nach Klüver und Barrera. LFB besitzt eine Affinität zu in Myelin enthaltenem Neurokeratin und färbt myelinisierte Fasern blau an. Das Parenchym und demyelinisierte Bereiche werden durch die Inkubation mit Schiff'schem Reagenz rosa gefärbt.

Für die Färbung wurde zunächst eine Luxol-Fast-Blue-Lösung hergestellt. Diese ist nach Herstellung acht Wochen haltbar. In einem späteren Schritt wurde eine frisch zubereitete 0,05% Lithiumcarbonat Lösung benötigt.

Anfangs erfolgte die Entparaffinierung durch Erwärmung im Ofen und eintauchen in Xylol sowie die Rehydrierung der Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe. Dann inkubierten die Schnitte bei 60°C ein bis zwei Tage in der Luxol-Fast-Blue-Lösung. Ein Verdampfen der Lösung wurde durch festen Verschluss der Küvette verhindert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zunächst in eine 90% Ethanol Lösung gegeben. In folgender Reihenfolge wurden sie anschließend in mehreren Zyklen in drei Petrischalen getaucht, bis kein blauer Farbstoff mehr abgegeben wurde: (a) destilliertes Wasser, (b)

0,05% Lithiumcarbonatlösung, (c) 70% Ethanol. Myelinreiche Abschnitte wie die weiße Substanz des Rückenmarks waren dann deutlich blau angefärbt worden.

Die Schnitte wurden nach einem Waschvorgang für fünf Minuten in einer 1% Perjodsäurelösung inkubiert und anschließend sorgfältig unter fließendem Leitungswasser abgespült. Es folgte ein Waschvorgang mit destilliertem Wasser und anschließend eine 20-minütige Inkubation in Schiff'schem Reagenz. In der mikroskopischen Kontrolle hatten sich schwach bläulich angefärbte Areale jetzt rosafarben dargestellt. Zuletzt folgte eine Färbung der Zellkerne durch die Hämalaun-Lösung nach Meyer. Gemäß Protokoll wurden Waschvorgänge und eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Eindeckmedium und Deckglas versiegelt.

Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen erlauben die Färbung von bestimmten Zielproteinen. Über eine mehrschrittige Antigen-Antikörper-Reaktion werden so beispielsweise Oberflächenmoleküle als Epitope angefärbt, um die entsprechenden Zellen auf Gewebeschnitten identifizieren zu können.

Zu Beginn wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten im Ofen bei ca. 65°C erwärmt und in Xylol eingetaucht, um das Paraffin zu entfernen. In einer absteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe anschließend rehydriert.

Um eine Maskierung durch Quervernetzung zu vermeiden, zu deren Bildung es durch Fixierung mit Formaldehyd kommen kann, wurden die Schnitte anschließend in Natriumcitratpuffer (pH 6,0) für mehrere Minuten in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht (Demaskierung durch „*heat induced epitope retrieval*“, sog. „*HIER-Methode*“). Nach einem Waschvorgang mit destilliertem Wasser wurde das Gewebe in einer 3% Wasserstoffperoxid-Lösung für etwa 15 Minuten inkubiert, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit destilliertem Wasser und Waschpuffer (1x Tris-gepufferte Salzlösung, TBS) für jeweils fünf Minuten.

Danach wurde das Gewebe mit einem Dako Pen umzeichnet. Es wurde dann für 60 Minuten mit dem Blockierserum (5% Ziegen Serum in TBS) bedeckt. Anschließend wurde das Blockierserum entfernt und der im Blockierserum verdünnte primäre Anti-Maus-Antikörper aufgetragen. Dieser inkubierte über Nacht im Kühlschrank bei etwa 4°C.

Am folgenden Tag wurde mehrfach mit TBS gewaschen, bevor das Gewebe für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten sekundäre Antikörper inkubiert

wurde. 30 Minuten bevor er aufgetragen werden konnte, wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) hergestellt und dunkel gelagert.

Nach einem Waschvorgang der Schnitte in TBS wurde die ABC-Lösung aufgetragen und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt band nun Avidin aus der ABC-Lösung an den zuvor aufgetragenen biotinylierten Sekundärantikörper. Die ABC-Lösung enthielt außerdem die Meerrettichperoxidase, die im nächsten Schritt das Substrat (DAB) zu einem unlöslichen Farbstoff umsetzte, der sich als bräunlicher Niederschlag detektieren ließ.

Nach einem Waschvorgang wurde die DAB-Entwickler-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle bis zum Erreichen der bräunlichen Färbung der Zielstrukturen aufgetragen. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Schnitte destilliertes Wasser getaucht und gespült. Es folgte die Gegenfärbung mit etwa 20-sekündiger Inkubation in Hämatoxylinlösung. Das Bläuen erfolgte unter fließendem Leitungswasser für etwa 10 Minuten. Nach einem Waschvorgang in destilliertem Wasser und der aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung des Gewebes wurden die Schnitte mit Eindeckmedium und Deckglas gedeckt.

Morphometrie

Auswertung der Rückenmarkschnitte

Um den Grad der Demyelinisierung im Verhältnis zur weißen Substanz zu ermitteln, wurden histologische Bilder der LFB-PAS-Färbung angefertigt. Ausgewertet wurden Schnitte des zervikalen, thorakalen und lumbalen Rückenmarks. Die Bilder wurden durch eine densitometrische Messung mithilfe von ImageJ (Version 1.53a für macOS, National Institute of Health, USA) analysiert.

Zunächst wurden die in 50-facher Vergrößerung angefertigten Bilder importiert und Helligkeit sowie Kontrast angepasst. Anschließend wurde die gesamte Rückenmarksfläche sowie die graue Substanz manuell umrandet, die Differenz beider Flächen ergab die gesamte weiße Substanz. Im nächsten Schritt wurde über den Farbschwellenwert (*color threshold*) die gesunde, nicht demyelinisierte weiße Substanz ermittelt. So ließ sich der Grad der Demyelinisierung im Verhältnis zur weißen Substanz errechnen.

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Bei der Färbung von CD45+ Zellen wurden die positiven Zellen ausgezählt und im Verhältnis zu allen Zellen der Lamina propria mucosae mehrerer vollständig abgebildeter Villi ausgewertet.

Bei der Färbung von CD3 + Zellen wurden die positiven Zellen ausgezählt und im Verhältnis zu (100) Epithelzellen gesetzt. Die Auszählung von für die jeweilige Färbung positiven Immunzellen erfolgte mithilfe des Multi-Point-Tools von ImageJ. Zur Auswertung herangezogen wurden Bilder in 400-facher Vergrößerung.

Alle histopathologischen Auswertungen erfolgten verblindet.

RNA Isolierung, Synthese der cDNA und qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR oder RT-PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren und basiert auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Durch die Bestimmung und Quantifizierung von RNA Abschnitten kann auf eine erhöhte oder erniedrigte Genexpression in Geweben rückgeschlossen werden.

Im ersten Schritt wurde RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe (Ileum, Kolon) isoliert. Das Gewebe wurde in eine phenolische Lösung (Ribozol) eingelegt und anschließend mithilfe von Metallperlen und einer Kugelmühle aufgeschlossen. Pro 1 ml Ribozol wurden anschließend 200 µl Chloroform hinzugegeben und vorsichtig homogenisiert. Das Gemisch inkubierte anschließend für etwa zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nun wurde es bei 4°C und 12 000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Um eine Verunreinigung mit DNA zu vermeiden, wurden die etwa 80% der wässrigen, oberen Phase, welche zu großen Teilen nur RNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde das Gemisch mit dem Vortexmischer homogenisiert und anschließend bei -20°C mindestens eine Stunde oder über Nacht zum Ausfällen gelagert. Im nächsten Schritt wurde bei -4°C und 12 000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, ohne das RNA-Pellet zu beschädigen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanollösung gewaschen, anschließend mit dem Vortexmischer homogenisiert und zentrifugiert (s. zuvor). Wieder wurde der Überstand entfernt und das Pellet zum Trocknen aufgestellt. Danach wurden 50 µl mit DEPC behandeltes (RNase freies) Wasser (Volumen je nach Größe des Pellets) hinzugegeben und kurz zentrifugiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA bei einem standardisierten Volumen wurde mit dem Mikroplattenreader bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Die isolierte RNA wurde dann bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Im nächsten Schritt wurde aus der RNA durch eine reverse Transkription die cDNA (komplementäre DNA) synthetisiert. Dazu wurden 1000 ng RNA benötigt. Das Volumen, das die gewünschte Menge enthält, errechnet sich aus der bereits bestimmten Konzentration. Zur cDNA-Synthese wurde das iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. verwendet.

Dieses enthält ein Reaktionsgemisch mit Reaktionspuffer, RNase H⁺ (zur Degradierung der RNA nach Synthese der cDNA), OligodT-Primer (hybridisieren mit dem Poly-A-

Ende der RNA), zufällige Hexamer-Primer (erhöht die Sensitivität der cDNA-Synthese) sowie dNTPs (zum Aufbau der cDNA).

Pro Probe wurden 4 µl des 5x iScript Reaktionsgemisch, 1 µl des Enzyms iScript Reverse Transkriptase und die RNA (1µg) angesetzt, dazu eine variable Menge Nuklease-freien Wassers bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 20 µl. Dann wurden die Reaktionsgefäße in einen vorprogrammierten Thermocycler gestellt. Im ersten Schritt, der Primerhybridisierung, für 5 min bei 25°C, lagern sich die Primer aus dem iScript Reaktionsgemisch an die einsträngigen RNA-Vorlage an. Die Reverse Transkription (Elongation), also die Synthese der doppelsträngigen cDNA, erfolgte im nächsten Schritt bei 46°C für 20 min. Mit der Enzyminaktivierung bei 95°C für eine Minute war der Prozess abgeschlossen.

Die Quantifizierung der cDNA-Menge wurde erneut mit dem Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Dann wurde die cDNA in DEPC-Wasser verdünnt, so dass die Konzentration 15,4 ng/µl betrug, aliquotiert und eingefroren.

Im Anschluss folgte nun die qPCR. Dabei kann man in Echtzeit die Akkumulation der amplifizierten Genprodukte während des Reaktionsprozesses verfolgen. Die Detektion des gewünschten Genproduktes gelingt durch die Zugabe des fluoreszierenden Moleküls SYBR Green. Da das Fluorophor nur zwischen Doppelstrang-DNA interkalieren kann, hängt das Fluoreszenzsignal maßgeblich von der Menge an doppelsträngiger DNA und der Anzahl der Reaktionszyklen ab. In den anfänglichen Zyklen wird kaum Änderungen im Fluoreszenz-Signal registriert. Der Schwellenwert (*threshold*) markiert einen signifikanten Anstieg des Signals und ist entscheidend für die Differenzierung von Hintergrundsignal und relevanter Amplifikation des cDNA Abschnittes. Der Schwellenwert-Zyklus, oder *threshold cycle* (Ct), ist der Zyklus, in dem das Fluoreszenz-Signal den definierten Schwellenwert überschreitet.

Die PCR-Maschine (Step One Plus, Applied Biosystems by Thermo Fisher) wurde folgendermaßen eingestellt: (1) 10 min bei 95°C (Enzymaktivierung), (2) 15 s bei 95°C (Denaturierungsschritt), (3) 20 s bei 60°C (Primerhybridisierung), (4) 10 s bei 72°C (Elongation). Die Schritte 2-4 werden jeweils für bis zu 40 Zyklen wiederholt.

Pro Probe wurde ein Volumen von insgesamt 15 µl pipettiert: 0,5 µl 5' Primer, 0,5 µl 3' Primer, 6,5 µl cDNA (=100 ng) und 7,5 µl des Power SYBR Green PCR Master Mix (dieser enthält Puffer, die DNA Polymerase, dNTPs und den SYBR-Green Farbstoff). Für alle Proben wurden Duplikate analysiert.

Nach der qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Das Übereinanderliegen aller Peaks bestätigte, dass in der qPCR nur ein Genprodukt amplifiziert wurde.

Die $\delta\delta$ Ct-Methode zur Quantifizierung der Genexpression

Der Ct-Wert wird genutzt, um die Menge der DNA-Kopien zu errechnen, denn er ist abhängig von der anfänglichen RNA-Menge. Die Quantifizierung sollte in der frühen exponentiellen Phase erfolgen, bevor die Reaktion ihr Plateau erreicht. Die Quantifizierung kann entweder absolut erfolgen oder relativ, also im Vergleich zu einem anderen Produkt. Hierzu wird üblicherweise ein nicht reguliertes sogenanntes Referenz- oder Haushaltsgen herangezogen, etwa GAPDH oder 18S-rRNA. Ich verwendete als Referenzgen 18S-rRNA. Die Berechnung führte ich mithilfe der $\delta\delta$ Ct Methode durch. Zunächst wurde $\delta\delta$ Ct als Differenz des Ct-Wert des Zielgens und Ct-Wert des Referenzgens (Haushaltsgen) bestimmt. Dann wurde vom δ Ct-Wert der behandelten Proben der δ Ct-Wert einer Kontrolle abgezogen. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen Behandlung und Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen (Haushaltsgen), ergibt sich aus der Formel $2^{-\delta\delta$ Ct}. In der Berechnung geht man von einer optimalen PCR Effizienz in allen Proben mit einer Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus aus. In diesen Ergebnissen gibt der errechnete Wert die x-fache Expression einer behandelten Gruppe (Niedrigdosis- oder Hochdosis-Gruppe) zur unbehandelten Kontrollgruppe an.

Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA). Für alle Ergebnisse wurde angenommen, dass die Daten normalverteilt sind. Dies wurde durch verschiedene Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk, D'Agostino and Pearson Test) überprüft. Da insgesamt drei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) eingesetzt und der Tukey Post-Hoc-Test zum Vergleich aller Gruppenkombinationen verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$ und *** = $p < 0,0001$ festgelegt. Die Grafen bilden jeweils Mittelwerte sowie den Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) ab. Grafen wurden ebenfalls mit GraphPad erstellt. Abbildungen wurden mit der kostenfreien Google Drawings Software oder Microsoft Power Point für Mac (Version 16.16.27) erstellt.

Insgesamt wurden die Rohdaten von 30 Mäusen (10 pro Versuchsgruppe) ausgewertet, dafür wurden jeweils 5 Tiere zur histologischen Analyse, und 5 zur RNA-Isolierung herangezogen.

Ergebnisse

Die Ernährung als modifizierbarer Umweltfaktor rückt immer weiter in den Fokus der MS-Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurde als Modell für die MS die EAE gewählt. Die Tiere wurden mit einer bestens definierten, weizenfreien Diät ernährt (s. Versuchsaufbau, S. 32). Den Versuchstieren wurde eine modifizierte, gegen Abbau stabile mittelkettige, einfach ungesättigte Fettsäure (SEFA-6207) zusätzlich zur Basisdiät täglich ab Tag sieben nach Induktion der EAE per Schlundsonde in zwei verschiedenen Dosen verglichen mit Placebo appliziert, um deren Einfluss auf den Erkrankungsverlauf, Gewichtsverlust und Auswirkungen auf histologischer und zellulärer Ebene zu charakterisieren. Tiere der Niedrigdosis-Gruppe erhielten täglich ab dem siebten Tag nach Immunisierung 0,3 mmol SEFA pro kg Körpergewicht per Schlundsonde, Tiere der Hochdosis-Gruppe die doppelte Dosis, 0,6 mmol SEFA pro kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppe erhielt reizfreies Maisöl (Placebo) per Schlundsonde. Die Versuchstiere wurden bis Tag 14 nach Immunisierung beobachtet und therapiert. An Tag 15 nach Immunisierung wurde der Versuch beendet. Zunächst wurde der klinische Verlauf der EAE anhand des etablierten Punktesystems (s. Tabelle 9) beschrieben.

Einfluss der oral zugeführten SEFA auf den Erkrankungsverlauf der EAE

Eine graphische Abbildung des Erkrankungsverlaufs der drei Gruppen zeigt Abbildung 7.

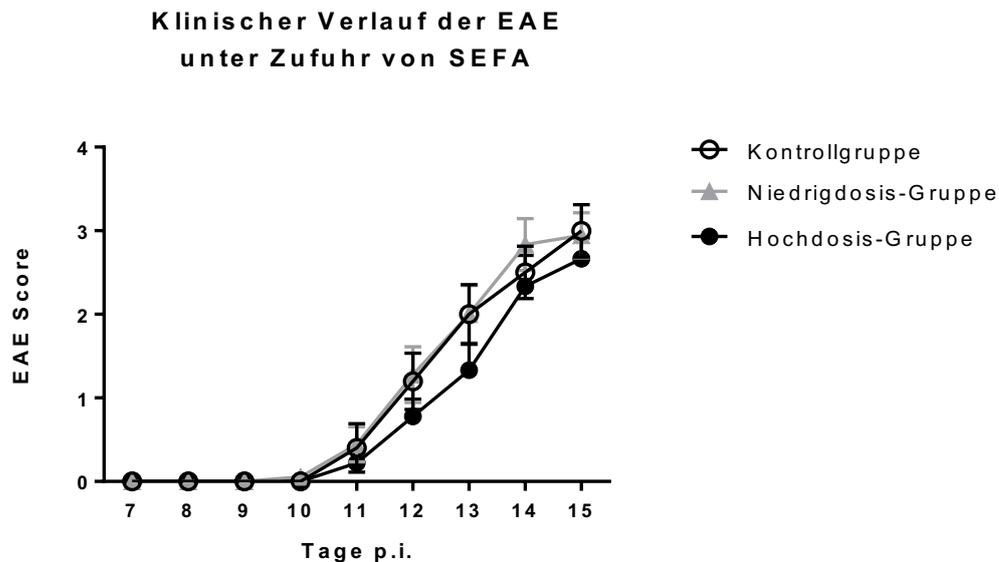


Abbildung 7: Klinischer Verlauf der EAE.

Jeweils unter der Zufuhr von Kontrollsubstanz (Placebo) und SEFA in mittlerer (0,3 mmol/kg KG) und hoher Dosis (0,6 mmol/kg KG). Insgesamt zeigen alle Versuchsgruppen einen nahezu linearen Erkrankungsverlauf. Die x-Achse markiert den Zeitraum nach Immunisierung. Dargestellt ist jeweils der mittlere Erkrankungsscore \pm SEM der Versuchsgruppen.

Im Detail stellte sich der Erkrankungsverlauf in der Kontrollgruppe, die lediglich Maisöl per Schlundsonde erhielt, folgendermaßen dar:

Bis zum Tag 10 nach Immunisierung (p.i.) war keines der Tiere klinisch erkennbar erkrankt. An Tag 11 zeigten zwei Tiere der Kontrollgruppe erste Krankheitssymptome. An Tag 12 waren bereits alle Tiere erkrankt. Zu diesem Zeitpunkt lag der Score gerundet bei 1,2. An Tag 13 hatte ein Tier bereits Score 3 erreicht, an Tag 14 p.i. waren es 3 Tiere mit Score 3 und am darauffolgenden Tag 3 Tiere mit 3,5, weshalb der Versuch beendet wurde. Im Schnitt erreichten die erkrankten Tiere zum Ende des Versuches einen Score von 3,08 (\pm 0,27, SEM).

Bei der Versuchsgruppe, welche die niedrigere Dosis (0,3 mmol/kg KG) SEFA erhielt (Niedrigdosis-Gruppe), stellte sich der Verlauf folgendermaßen dar:

Die erste Maus erkrankt an Tag 10 nach Injektion und zeigte einen klinischen Score von 0,5. Am folgenden Tag waren drei Tiere erkrankt, mit einem mittleren Score von 1. An

Tag 12 waren alle Tiere bis auf eines erkrankt. An Tag 13 hatte eine Maus bereits einen Score von 3,5 erreicht, eine weitere von 3. An Tag 14 waren es bereits drei Tiere mit einem Score von 3,5 und 4 weitere mit einem Score von 3. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes hatten vier Tiere einen Score von 3,5 erreicht, drei Mäuse einen Score von 3, eine Maus einen Score von 2,5 und ein Tier eine 1. Im Schnitt erreichten die Tiere der Niedrigdosis-Gruppe einen Score von 3,0 ($\pm 0,25$, SEM) an Tag 15 p.i..

Der Verlauf der EAE bei der Versuchsgruppe, welche die hohe Dosis SEFA (0,6 mmol/kg KG) erhielt, stellte sich folgendermaßen dar: Erst an Tag 11 zeigten sich bei einem einzelnen Tier Symptome, die dem Score 0,5 zugeordnet werden konnten. An Tag 12 waren dann bis auf zwei Tiere alle Mäuse erkrankt. An Tag 14 hatten bereits 6 Tiere den Score 3 erreicht, allerdings war eine Maus noch nicht erkrankt. Am Versuchsende, Tag 15 hatte ein Tier den Score 3,5 erreicht, die übrigen Scores bewegten sich zwischen 1 und 3. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Tiere erkrankt. Im Schnitt betrug der Score an Tag 15 p.i. in der Hochdosis-Gruppe 2,7 ($\pm 0,23$, SEM).

Eine bildhafte Darstellung des mittleren EAE-Scores aller Gruppen an Tag 15 zeigt Abbildung 8. Insgesamt weist die Hochdosis-Gruppe zwar das geringste Erkrankungsmaß zum Endzeitpunkt vor, jedoch ohne statistische Signifikanz.

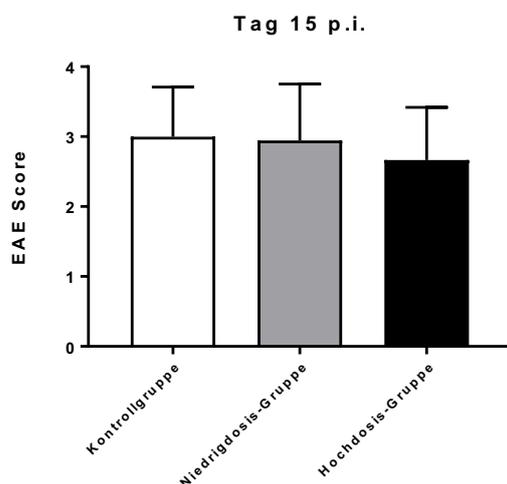


Abbildung 8: EAE Score an Tag 15.

Vergleich der drei Versuchsgruppe. Die Kontrollgruppe erhielt zusätzlich zur Basisdiät ein Placebo oral per Schlundsonde, die Niedrigdosis-Gruppe 0,3 mmol/kg KG SEFA, die Hochdosis-Gruppe 0,6 mmol/kg KG. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz hinsichtlich des Krankheitsaktivitätsscores an Tag 15 nach Immunisierung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

Die statistische Auswertung der Verläufe vor der Versuchsbeendigung ergab ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu keinem weiteren Zeitpunkt. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Tage 12 und 13 p.i..

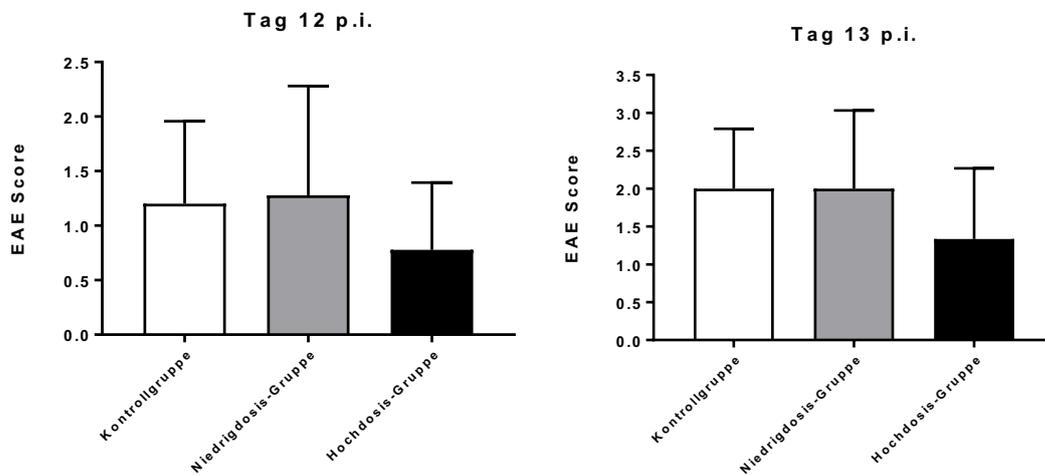


Abbildung 9: EAE an Tag 12 und 13 nach Immunisierung. Behandlung mit Placebo, SEFA in niedriger Dosis (0,3 mmol/kg KG) und hoher Dosis (0,6 mmol/kg KG). Auch bei Betrachtung einzelner Tage, hier beispielhaft Tag 12 und 13 zeigt sich keine statistisch signifikante Differenz innerhalb der Versuchsgruppen.

Symptombeginn in allen Gruppen um den 12. Tag p.i.

Neben dem klinischen Verlauf wurde auch das Auftreten erster Krankheitssymptome in den einzelnen Gruppen untersucht. So sollte festgestellt werden, ob die Zufuhr von SEFA den Symptombeginn beeinflusst.

Üblicherweise liegt der Symptombeginn der EAE bei 11,3 ($\pm 1,4$) Tage nach Immunisierung laut des Herstellers des verwendeten Immunisierungscocktails. Dieser Verlauf konnte bestätigt werden. Eine graphische Darstellung des Krankheitsbeginns zeigt Abbildung 10.

In der Kontrollgruppe zeigten sich die ersten Krankheitssymptome im Mittel an Tag 11,6 ($\pm 0,24$ SEM) nach Immunisierung. In der Niedrigdosis-Gruppe lag der Symptombeginn bei Tag 11,67 ($\pm 0,37$ SEM). In der Hochdosis-Gruppe lag der Symptombeginn im Mittel bei Tag 12,22 ($\pm 0,46$), also etwas später.

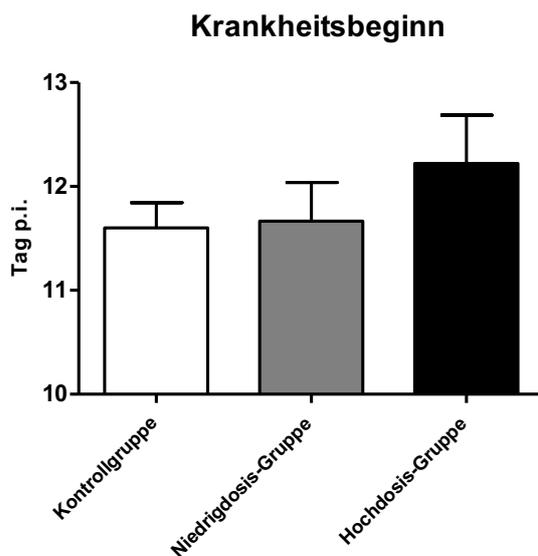


Abbildung 10: Krankheitsbeginn.

In der Hochdosis-Gruppe zeigte sich ein späterer Symptombeginn an Tag 12,22 ($\pm 0,46$ SEM) ohne statistische Signifikanz, die frühesten Krankheitssymptome zeigten sich in der Kontrollgruppe um Tag 11,6 ($\pm 0,24$ SEM). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Gewichtsverlust unter Zufuhr von SEFA

Neben dem klinischen Verlauf wurde der Einfluss der SEFA-Therapie auf das Körpergewicht dokumentiert. Dazu wurden die Tiere ab Tag 7 p.i. (Startgewicht) täglich gewogen. Eine graphische Darstellung des Gewichtsverlaufs zeigt Abbildung 11:

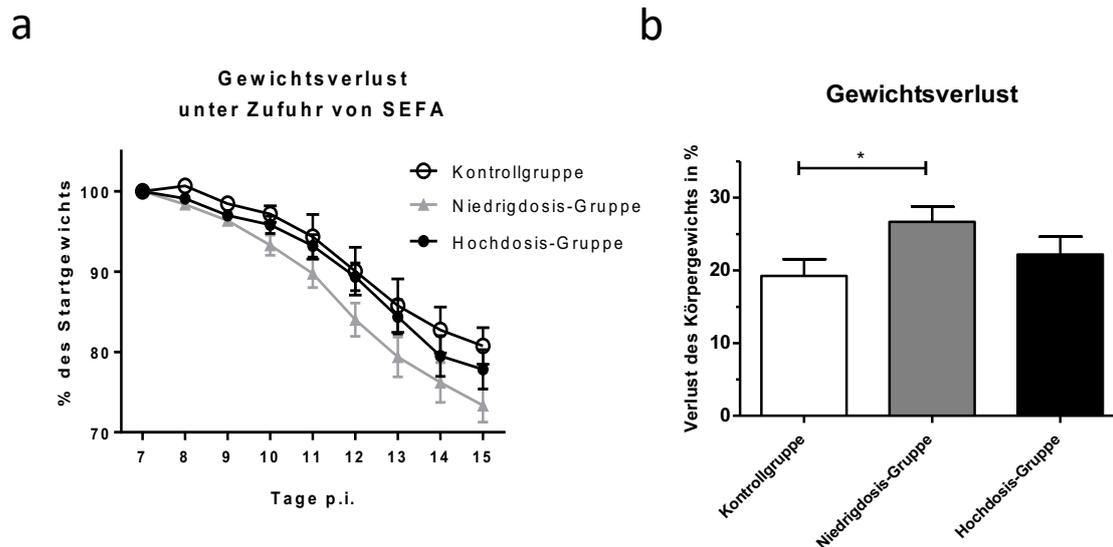


Abbildung 11: Gewichtsverlust unter der Therapie mit SEFA.

(a) zeigt den Gewichtsverlust im zeitlichen Verlauf nach Immunisierung. Es zeigte sich eine kontinuierliche Körpergewichtsabnahme aller Versuchsgruppen bei voranschreitender Erkrankung. Den Gewichtsverlust in % des Körpergewichts zeigt (b). Insgesamt hatte die Niedrigdosis-Gruppe, der 0,3 mmol SEFA/kg KG zugeführt wurde, zum Versuchsende am meisten Gewicht verloren, mit statistischer Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe, die lediglich ein Placebo per Schlundsonde erhielt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

Im Verlauf (Abb.11 a) zeigt sich eine kontinuierliche Gewichtsabnahme in allen drei Gruppen. Einem zunächst langsamen Gewichtsverlust schloss sich in der späteren Phase des Versuchs ein schneller Gewichtsverlust bei stetiger Verschlechterung des Allgemeinzustandes an. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes (Tag 15) zeigte sich hinsichtlich des gesamten Gewichtsverlustes (Abb.11 b) bezogen auf das Gesamtkörpergewicht an Tag 7 (Startgewicht) eine statistisch signifikante Differenz zwischen Kontrollgruppe und der Niedrigdosisgruppe: Die Niedrigdosis-Gruppe hatte mit 26,67 (\pm 2,08) % am meisten Gewicht verloren. Die Hochdosis-Gruppe verlor im Schnitt 22,17 (\pm 2,45) % des Körpergewichts. Am wenigsten Gewicht verloren hatte die Kontrollgruppe mit 19,24 (\pm 2,3) %. Allerdings korreliert der Gewichtsverlust nicht mit dem klinischen Score an Tag 15 (Abb. 8), in dem Kontroll- und Niedrigdosisgruppe gleichauf liegen, während die Hochdosisgruppe eine geringere Krankheitsaktivität zeigt.

Charakterisierung von Läsionen des Rückenmarks

Neben dem Krankheitsbeginn und dem Verlauf der EAE in den Versuchsgruppen wurden histologische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung entzündlicher, demyelinisierter Areale und axonaler Schäden in Schnitten des Rückenmarks der Versuchstiere eingesetzt. Beurteilt und ausgewertet wurde die Demyelinisierung verschiedener Ebenen des Rückenmarks.

Zur Identifizierung demyelinisierter Areale diente die LFB-PAS-Färbung. LFB zeigt eine Affinität zu Myelin und färbt myelinisierte Axone blau, wohingegen demyelinisierte Areale rosa erscheinen.

Die Bielschowsky-Versilberung zeigte korrespondierend axonale Schäden im Bereich der demyelinisierten Areale. Die Färbungen wurden beispielhaft gegenübergestellt.

Den histologischen Aufbau des Rückenmarks zeigt Abbildung 12 (LFB-PAS-Färbung eines zervikalen Rückenmarksausschnittes, Kontrolltier).

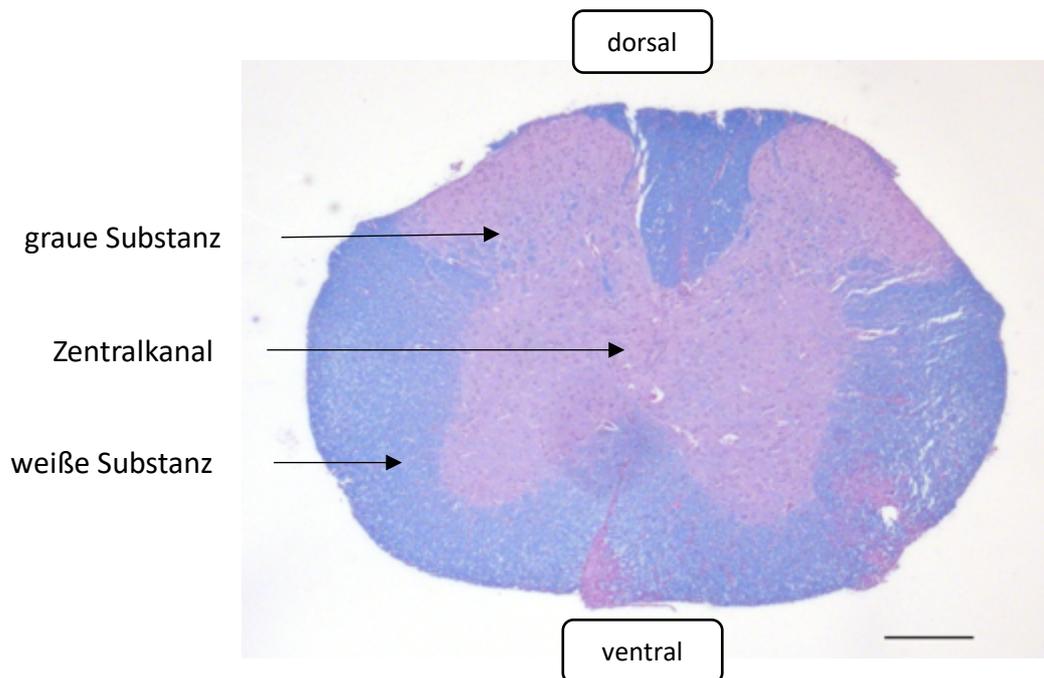


Abbildung 12: Aufbau des Rückenmarks.

Die graue Substanz enthält vorrangig die Zellkörper (Perikarya) der Nervenzellen. Die weiße Substanz hingegen besteht überwiegend aus den myelinisierten Nervenzellfortsätzen (Axonen). In der Mitte der grauen Substanz liegt der Zentralkanal, der eine Fortsetzung des Hirn-Ventrikelsystems darstellt und mit Ependymzellen ausgekleidet ist. Maßstab = 50 µm

Reduktion demyelinisierter Areale in Therapiegruppen

Abbildung 13 zeigt jeweils einen zervikalen, thorakalen, und lumbalen Rückenmarksabschnitt eines Kontrolltiers (Abb.13 a), eines Vertreters der Niedrigdosis-Gruppe (Abb.13 b) und eines Vertreters der Hochdosis-Gruppe (Abb.13 c). Demyelinisierte Abschnitte sind gekennzeichnet durch ungenügende Anfärbung mit Luxol. Durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin erscheinen sie rosa. Durch Schädigung von Axonen kommt es zur unzureichenden Anfärbung mit Luxol, welches die regelrechte weiße Substanz blau anfärbt. Maßstab = 50 µm

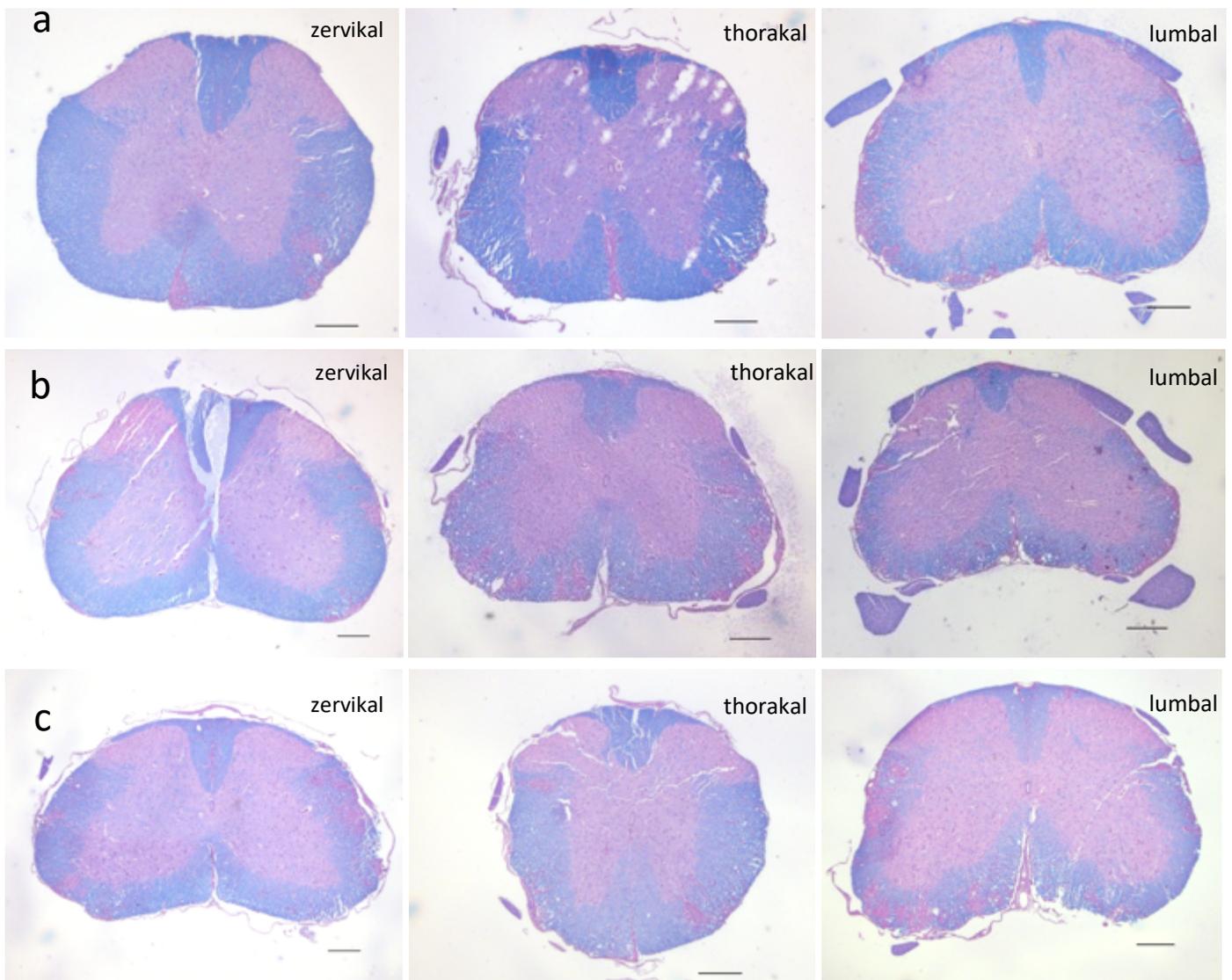


Abbildung 13: Demyelinisierung verschiedener Rückenmarksebenen.

Dargestellt sind jeweils zervikale, thorakale und lumbale Rückenmarkschnitte eines Kontrolltiers (a), eines Vertreters der Niedrigdosis-Gruppe (b) und der Hochdosis-Gruppe (c). Demyelinisierte Areale sind in der LFB-PAS-Färbung jeweils als rosa gegengefärbte Areale innerhalb der weißen Substanz zu erkennen. Durch Schädigung von Axonen kommt es zur unzureichenden Anfärbung mit Luxol, welches die regelrechte weiße Substanz blau anfärbt. Maßstab = 50 µm

Die morphometrische Auswertung der Schnitte zeigt Abbildung 14:

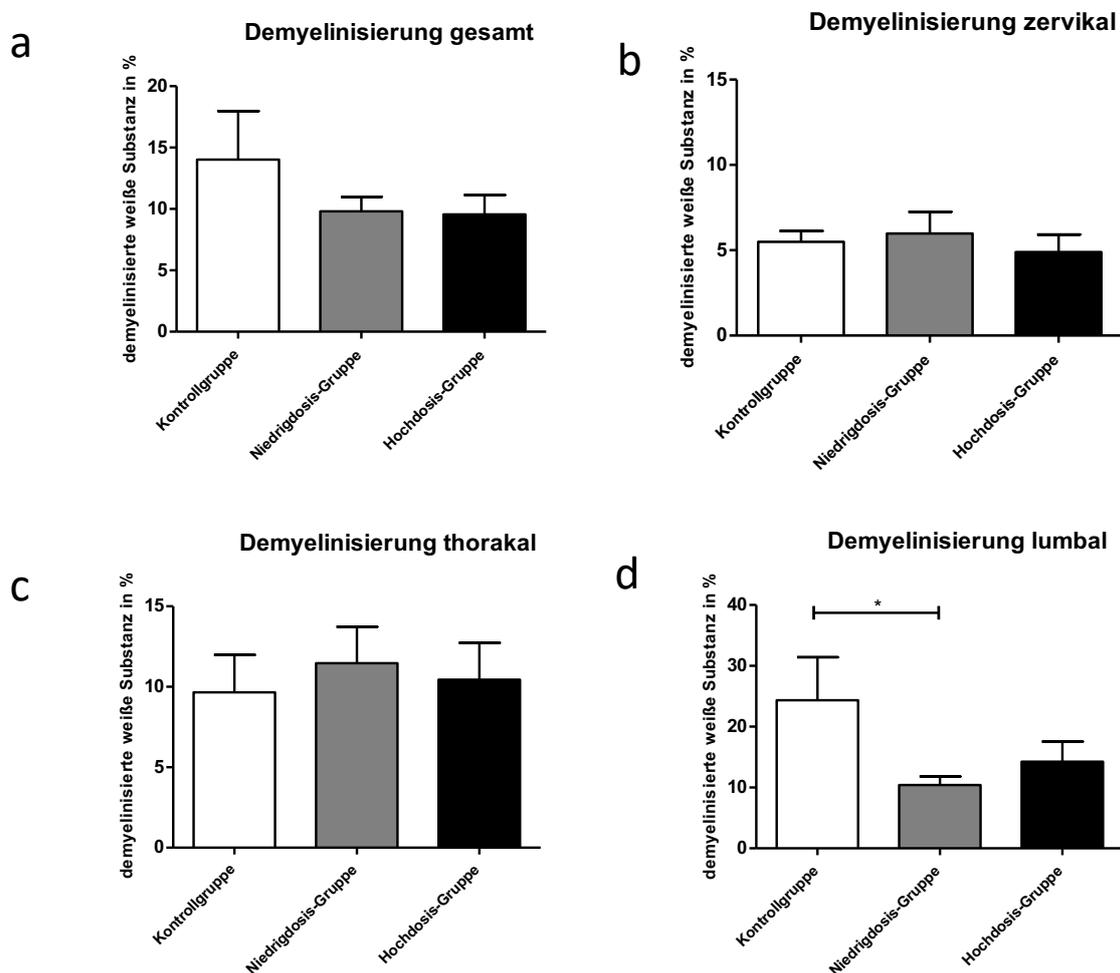


Abbildung 14: Demyelinisierung der weißen Substanz.

Morphometrische Auswertung der Demyelinisierung (LFB-PAS-Färbung) für Kontroll-, Niedrig- (0,3 mmol/kg KG) und Hochdosis-Gruppe (0,6 mmol/kg KG): gesamt (a), im zervikalen Rückenmark (b), thorakal (c) und lumbal (d). Lumbal zeigte sich hinsichtlich der Demyelinisierung eine statistische Signifikanz im Vergleich von Kontroll- und Niedrigdosis-Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert der Demyelinisierung in % \pm SEM.

Insgesamt wies die Kontrollgruppe mit 14,03% (\pm 3,94 SEM) den höchsten Demyelinisierungsgrad auf (Abb.14 a). In den Versuchsgruppen wurde ein geringeres Ausmaß der Demyelinisierung festgestellt: In der Niedrigdosis-Gruppe lag sie insgesamt bei 9,80% (\pm 1,19 SEM), in der Hochdosis-Gruppe bei 9,55% (\pm 1,59 SEM). Auf zervikaler Ebene (Abb.14 b) konnte nur ein geringer Unterschied hinsichtlich der Demyelinisierung festgestellt werden: In der Kontrollgruppe lag sie bei 5,49% (\pm 0,64 SEM), in der Niedrigdosis-Gruppe bei 5,99% (\pm 1,27 SEM), in der Hochdosis-Gruppe bei 4,89% (\pm 1,03 SEM). Ebenso zeigte sich auf thorakaler Ebene in allen Gruppen ein

ähnliches Ausmaß der Demyelinisierung (Abb.14 c). In der Kontrollgruppe zeigte sich hier eine Demyelinisierung von 9,65% (\pm 2,32 SEM), in der Niedrigdosis-Gruppe von 11,46% (\pm 2,27 SEM) und in der Hochdosis-Gruppe von 10,44% (\pm 2,29 SEM). Lumbal jedoch (Abb.14 d) konnte eine statistisch signifikante Differenz der Demyelinisierung festgestellt werden. Tiere der Kontrollgruppe wiesen mit 24,34% (\pm 7,09 SEM) einen höheren Demyelinisierungsgrad gegenüber Tieren der Niedrigdosis-Gruppe mit 10,41% (\pm 1,4 SEM) sowie Hochdosis-Gruppe mit 14,26% (\pm 3,31 SEM) auf.

Axonaler Schaden im Bereich demyelinisierter Abschnitte

Abbildung 15 zeigt repräsentative demyelinisierte Läsionen (schwarze Pfeile), kenntlich gemacht durch die LFB-PAS-Färbung im Vergleich zu korrespondierenden Ausschnitten der Bielschowsky-Versilberung. In der Versilberung werden intakte Axone schwarz dargestellt, das restliche Gewebe färbt sich hellbraun. Areale mit reduzierter axonaler Dichte zeigten sich deckungsgleich mit demyelinisierten Arealen in der LFB-PAS Färbung. (Abb.15a und b) illustrieren jeweils korrespondierende Läsionen in der weißen Substanz des Rückenmarks eines Kontrolltieres. (Abb.15 c und d) sind Ausschnitte aus dem Rückenmark eines Niedrigdosis-Tieres. (Abb.15 e und f) zeigen ein Tier der Hochdosis-Gruppe.

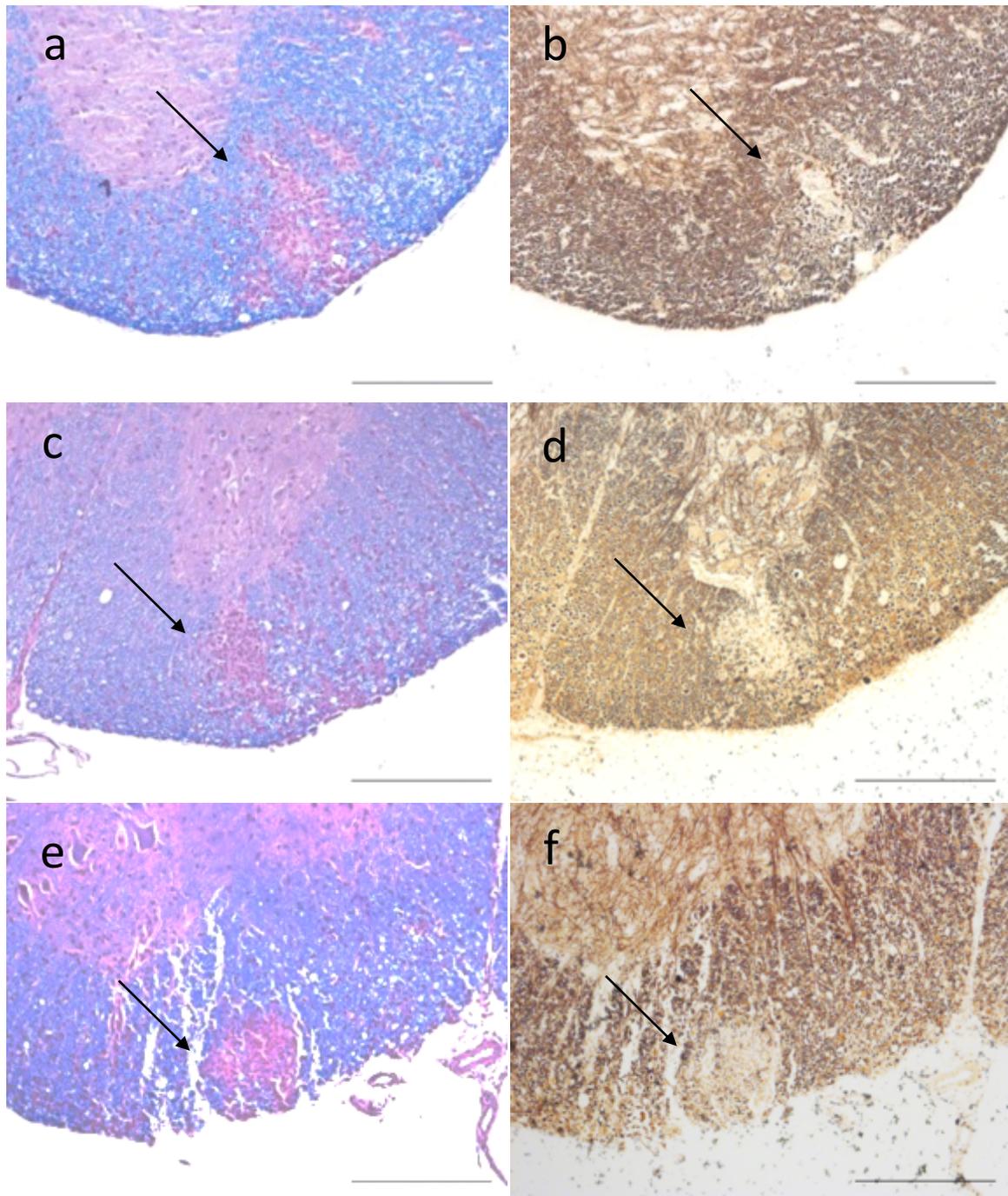


Abbildung 15: Ausgewählte Läsionen in LFB-PAS-Färbung und Bielschowsky Versilberung.

Die Bielschowsky Versilberung färbt intakte Axone schwarz an. Korrespondierend zur fehlenden Färbung mit Luxol zeigen sich Schäden in der Bielschowsky-Färbung durch schwächer gefärbte Areale im Bereich der sonst axonreichen, weißen Substanz (schwarze Pfeile). (a und b) zeigen Ausschnitte aus dem Rückenmark eines Kontrolltiers, (c und d) aus der Niedrigdosis-Gruppe, (e und f) aus der Hochdosis-Gruppe. Maßstab = 200 µm

Quantifizierung der Genexpression mittels qPCR

Zufuhr von SEFA beeinflusst dosisabhängig die Genexpression von Zytokinen im Ileum

Untersucht wurde die Genexpression verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Dazu wurde zunächst RNA aus dem Ileum der Versuchstiere isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend die Genexpression der Zielgene und eines Haushaltgens zur Normierung durch eine qPCR-Analyse quantifiziert. Durch die $\delta\delta$ CT-Methode wurde so eine relative Änderung der Genexpression errechnet.

Änderung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Ileum

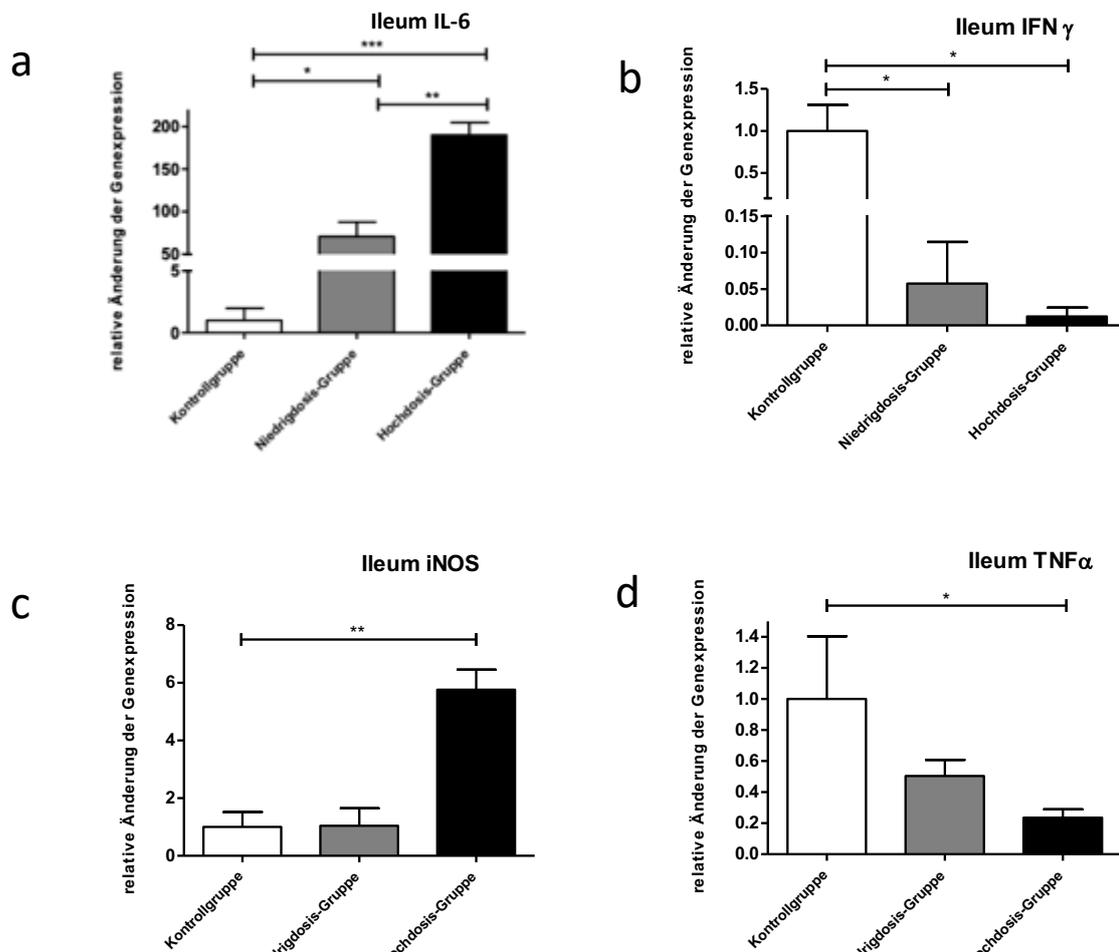


Abbildung 16: Veränderung der Genexpression von IL-6, IFN- γ , iNOS und TNF- α .

Die Veränderung der Genexpression des Zielgens ist jeweils auf das Haushaltsgen 18S normiert und über die $\delta\delta$ Ct Methode relativ auf die Kontrollprobe angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert der x-fachen Änderung der Genexpression \pm SEM.

Die Genexpression von IL-6 (Abb.16 a) zeigte sich dosisabhängig in der Hochdosis- und Niedrigdosis-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. IFN- γ (Abb.16 b) war im Ileum der Hochdosis- und Niedrigdosis-Gruppe signifikant verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe. In unserem Versuch zeigte sich eine signifikant erhöhte Genexpression der proinflammatorischen iNOS (Abb.16 c) in der Hochdosis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, nicht jedoch in der Niedrigdosis-Gruppe. Für TNF- α zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion in der Genexpression bei Vergleich von Kontroll- und Hochdosisgruppe.

Somit zeigt sich ein gemischtes Bild hinsichtlich der proinflammatorischen Zytokine im Ileum: sowohl eine Erhöhung der Genexpression (IL-6, iNOS), wie auch eine Verringerung (IFN- γ , TNF- α).

Änderung der Genexpression antiinflammatorischer Zytokine im Ileum

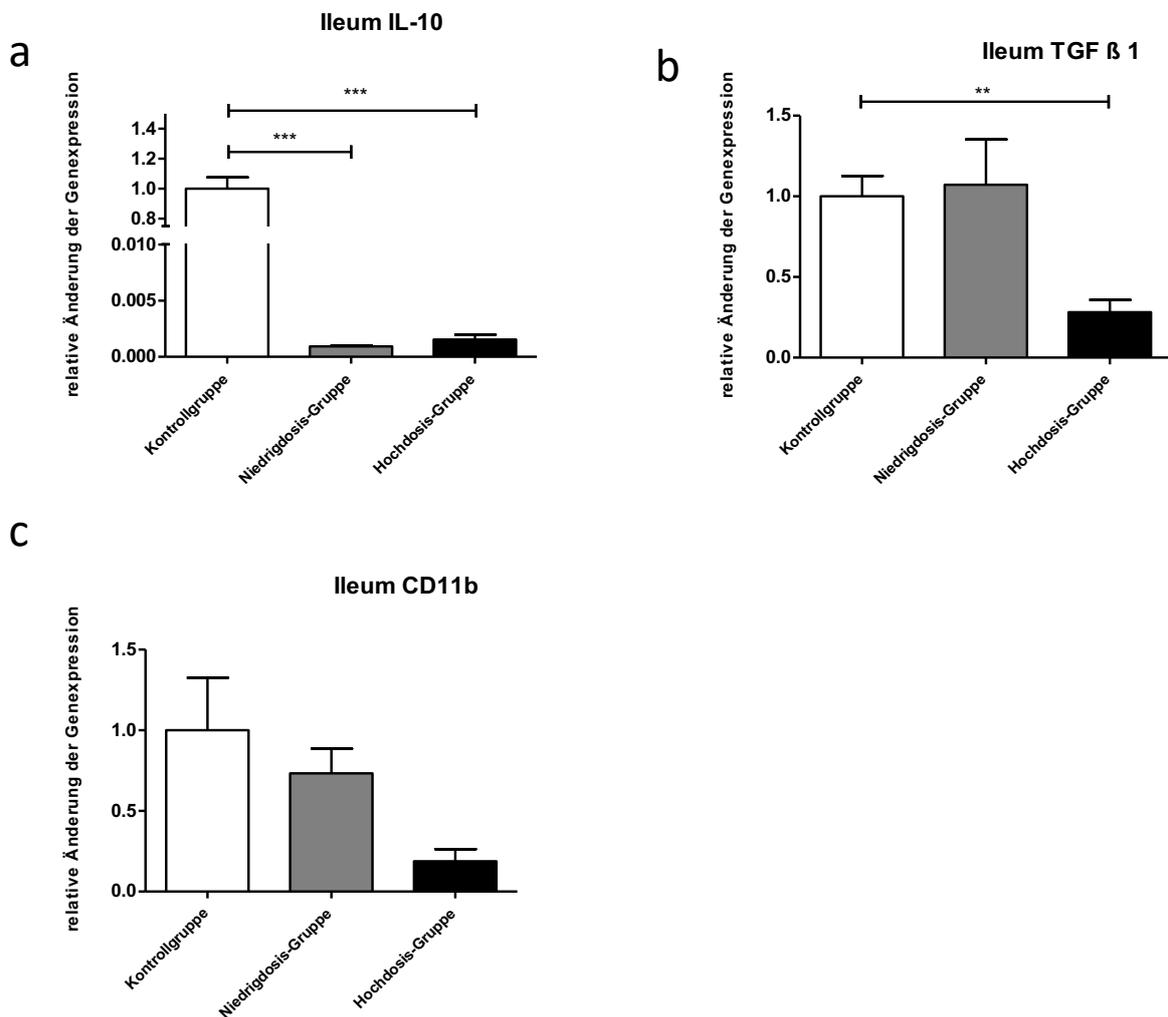


Abbildung 17: Veränderung der Genexpression von IL-10, TGF-β1 und CD11 b im Ileum.

Die Genexpression ist normalisiert auf die Expression des Haushaltsgens 18S und mit der Genexpression der unbehandelten Kontrollproben verglichen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Sowohl in der Hochdosis- wie auch in der Niedrigdosis-Gruppe war die Genexpression von IL-10 (Abb.17 a) im Ileum im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert. Im Versuch zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verringerung der Genexpression von TGF-β1 (Abb.17 b) im Ileum in der Hochdosis-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich eine dosisabhängige Verringerung der Genexpression von CD11b (Abb.17 c), jedoch ohne statistische Signifikanz.

Hinsichtlich der untersuchten antiinflammatorischen Zytokine zeigte sich insgesamt ein dosisabhängiger Trend hin zur Verringerung der Genexpression.

Einfluss auf die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Kolon

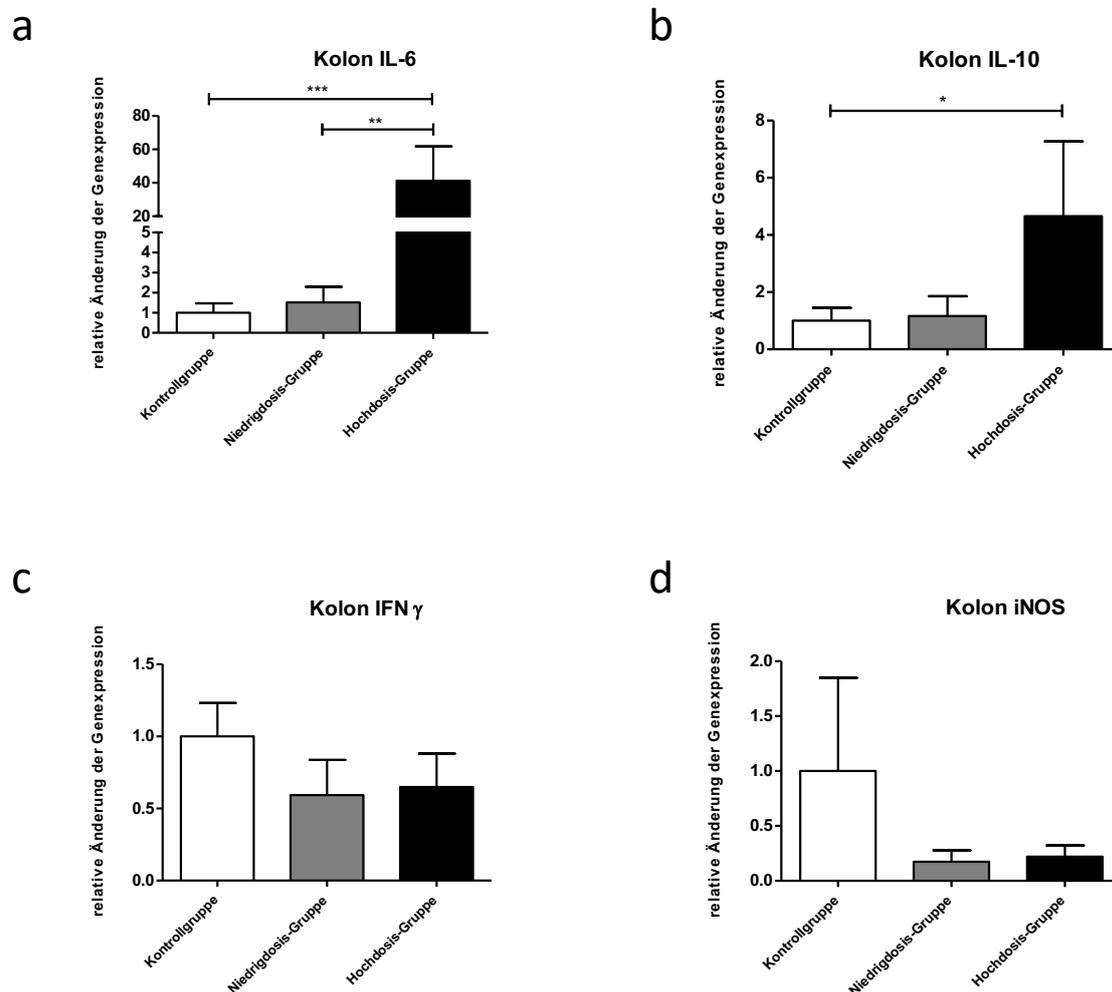


Abbildung 18: Genexpression verschiedener Zytokine im Kolon.

Die Genexpression ist normalisiert auf die Expression des Haushaltgens 18S und mit der Genexpression der unbehandelten Kontrollproben verglichen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Die Genexpression von IL-6 im Kolon (Abb.18 a) war wie zuvor auch im Ileum (Abb.16 a) in der Hochdosis-Gruppe gegenüber der Niedrigdosis- und Kontrollgruppe signifikant erhöht. In der Hochdosisgruppe zeigt sich außerdem eine signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-10 gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 18 b), was deutlich im Kontrast zur Verringerung der Genexpression im Ileum (Abb.17 a) steht. Hinsichtlich IFN- γ (Abb.18 c) zeigte sich ein ähnlicher Trend hin zur dosisabhängigen Verringerung der Genexpression unter der Zufuhr von SEFA. Für die Genexpression von iNOS im Kolon (Abb.18 d) zeigte sich im Kontrast zur erhöhten Expression im Ileum (Abb. 16 c) eine Verringerung in der Niedrigdosis- und Hochdosis-Gruppe.

So zeigte sich auch im Kolon ein gemischtes Bild hinsichtlich proinflammatorischer (IL-6, iNOS) und antiinflammatorischer (IL-10, IFN- γ) Zytokine.

Histologische Analyse des Ileums

Weiterhin wurden für unseren Versuch histologische Analysen für das Ileum ergänzt.

Histologisch besteht die Schleimhaut des Dünndarms aus fingerförmigen Fortsätzen (Villi), die von einer Epithelschicht bedeckt sind. Die Bindegewebsschicht unter dem Epithel wird als Lamina propria bezeichnet. Sie beherbergt die meisten Immunzellen des Darms. Lymphatische Zellen kommen sowohl verstreut in der Lamina propria und dem Oberflächenepithel, sowie organisiert in sogenanntem darmassoziiertem lymphatischem Gewebe (*gut associated lymphatic tissue*, GALT) vor. Das Epithel enthält vor allem Lymphozyten, vorwiegend CD8⁺ T-Zellen. Innerhalb der Lamina propria sind verschiedene Zelltypen anzutreffen: insbesondere CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen, dendritische Zellen sowie Mastzellen und eosinophile Zellen. Das Vorhandensein zahlreicher Effektorzellen der Immunantwort ist das Ergebnis eines ständigen Kontakts dieser Immunzellen mit z.B. Nahrungs-Antigenen, welche partiell die Epithelschicht passieren (7).

Zur Unterscheidung der Immunzellen werden immunhistochemischen Färbungen von unterschiedlichen Oberflächenmarkern herangezogen.

Der Oberflächenmarker CD45 wird auf allen kernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, d.h. allen Leukozyten ausgebildet. Es wird alternativ auch als *leukocyte common antigen* (LCA) bezeichnet.

CD3 ist ein Oberflächenmarker von T-Zellen. Bei den intraepithelialen Lymphozyten handelt es sich meist um CD8⁺ Immunzellen. Der CD3-Komplex bildet eine funktionelle Grundeinheit mit dem T-Zell-Rezeptor zur Signalübertragung ins Zellinnere.

Immunhistochemischer Nachweis von CD45 + Zellen im Ileum

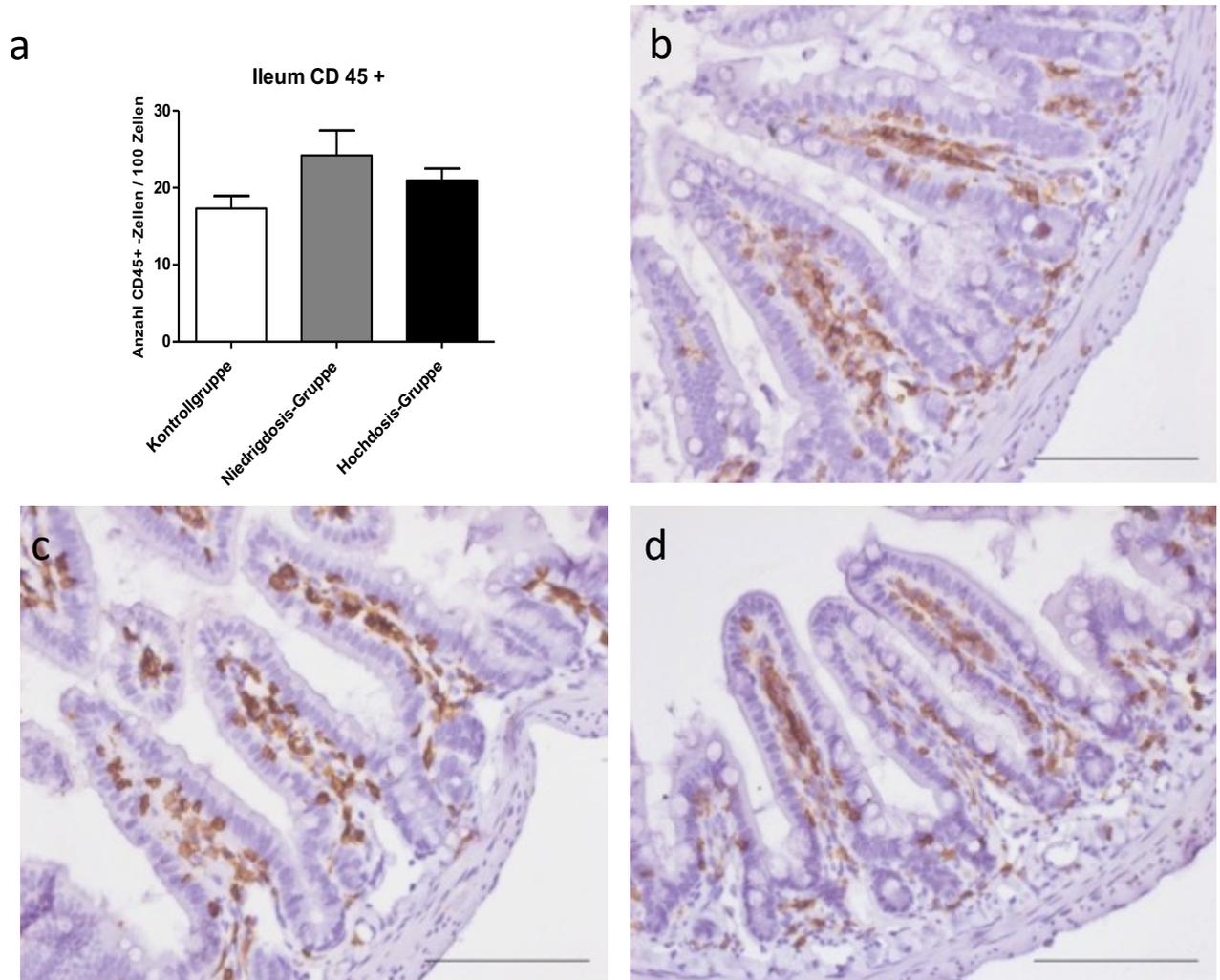


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von CD45+ Zellen im Ileum. (a) zeigt den Anteil der CD45+ Zellen pro 100 Zellen der gesamten Lamina propria mucosae. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. (b) zeigt ein Ileumschnitt eines Tiers der Kontrollgruppe, (c) der Niedrigdosis-Gruppe und (d) der Hochdosis-Gruppe. Maßstab (b)-(d) = 100 μ m

Eine graphische Darstellung des Anteils an CD45+ Zellen pro 100 Schleimhautzellen im Ileum aller Gruppen zeigt (Abb.19 a). Demnach ergab sich keine signifikante Differenz im Anteil in Kontroll- und Versuchsgruppen. (Abb. 19 b) zeigt ein Präparat aus dem Ileum eines Kontrolltieres in der CD45-Färbung in 400-facher Vergrößerung. (Abb.19 c und d) zeigen jeweils Schnitte von Versuchstieren aus der Niedrigdosis- sowie Hochdosis-Gruppe. In allen Gruppen sehen wir eine für den Darm charakteristische, hohe Infiltration der Mucosa mit Immunzellen.

Immunhistochemischer Nachweis von CD3 + Zellen im Ileum

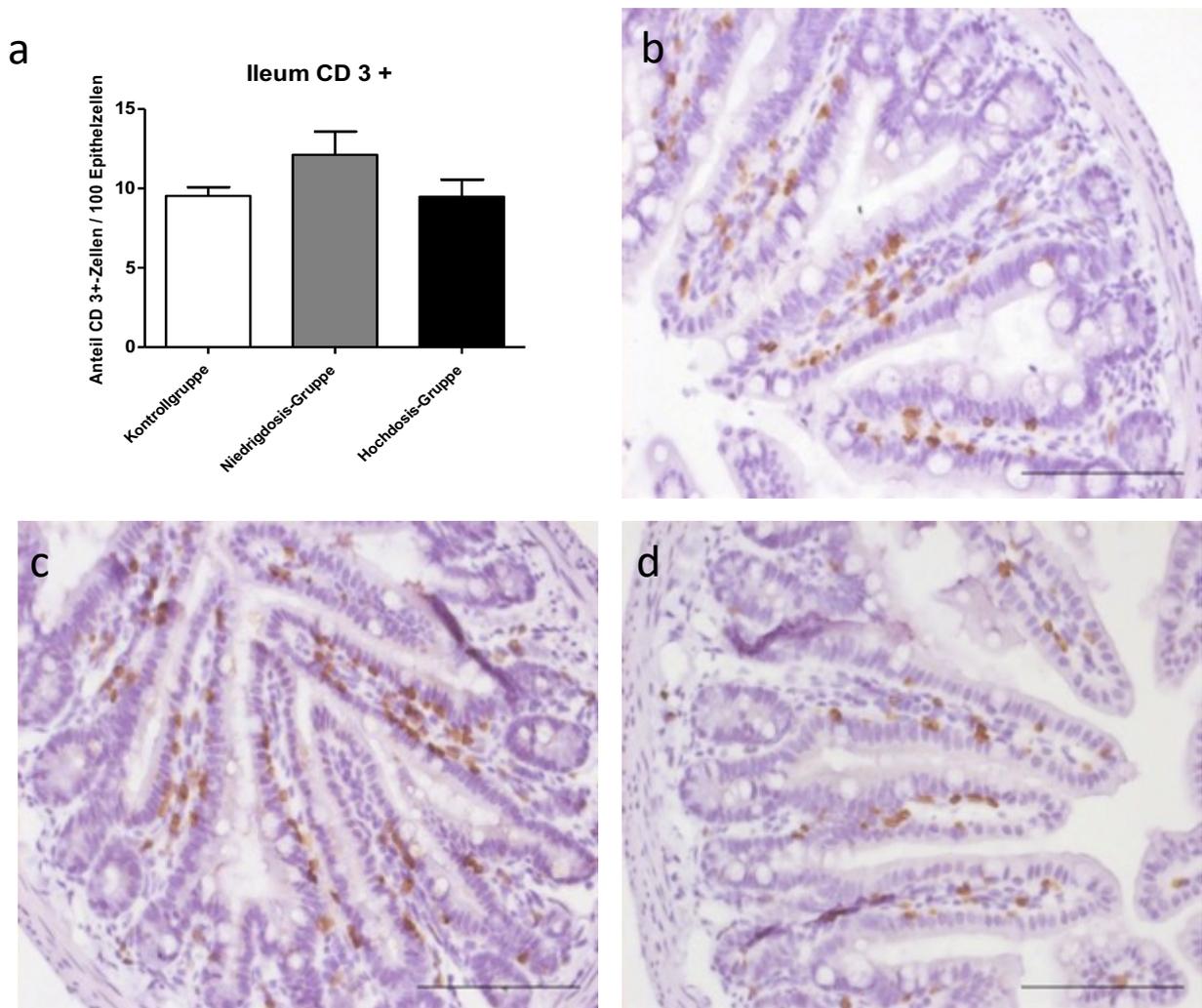


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von CD3+ Zellen im Ileum.

(a) zeigt den Anteil von CD3+ Zellen pro 100 Epithelzellen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. (b) zeigt einen Ileumschnitt eines Kontrolltiers. (c) zeigt einen Ileumschnitt aus der Niedrigdosis-Gruppe, (d) aus der Hochdosis-Gruppe. Maßstab (b) – (d) = 100 µm

Die Ergebnisse der Zellzählung für intraepitheliale CD3 + Zellen pro 100 Epithelzellen (Abb.20 a) zeigte keine statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen. (Abb.20 b) zeigt CD3+ -Zellen in einem 400-fach vergrößerten Abschnitt des Ileums eines Kontrolltieres. (Abb.20 c und d) zeigen jeweils Vertreter aus der Niedrigdosis- sowie Hochdosis-Gruppe. Wir sehen in jeder Gruppe eine Infiltration des Epithels mit CD3 + T-Zellen. In der Regel kommen im murinen Dünndarm auf 100 Epithelzellen zehn bis 25 Lymphozyten (84).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der klinische Verlauf der EAE als Modell der humanen Multiplen Sklerose unter der Zufuhr von SEFA-6207, einer mittelkettigen, chemisch modifizierten einfach ungesättigten Fettsäure, charakterisiert. Es war der erstmalige Einsatz der SEFA-6207 in einem präklinischen Modell für die Multiple Sklerose. Neben dem Krankheitsbeginn, der Krankheitsaktivität und dem Gewichtsverlust wurden außerdem histologische Korrelate im ZNS verglichen sowie durch immunhistochemische Färbungen Immunzellen im Ileum dargestellt und untersucht. Um Unterschiede auf zellulärer Ebene im Darm zu evaluieren, wurden daneben Genexpressionsanalysen mittels qPCR durchgeführt.

Tiermodelle der MS und ihre Grenzen

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine komplexe Autoimmunerkrankung, deren Ätiologie bis heute nicht vollständig geklärt ist (85). Trotz intensiver Forschungsarbeit ist bis heute keine Heilung der Erkrankung möglich. Die Krankheit tritt oft im jungen Erwachsenenalter auf und führt langfristig zu Einschränkungen und Behinderungen (25).

Die medizinische Forschung ist auf Tiermodelle angewiesen, um die Ätiologie der Erkrankung zu erforschen sowie neue therapeutische Ansätze für die Behandlung zu entwickeln. Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich allerdings um eine sehr heterogene Erkrankung. Zunächst werden verschiedene Verlaufstypen unterschieden. Außerdem sind die Verläufe und Symptome auch innerhalb der Erkrankungstypen von Patient zu Patient unterschiedlich.

Für die Multiple Sklerose gibt es zahlreiche Tiermodelle, die jeweils nur einen Teilaspekt der Erkrankung abbilden können. Die Vielzahl der Modelle für die MS unterstreicht die Komplexität der Erkrankung. Oft verwendet wird das EAE-Modell, viral induzierte Modelle (v.a. TMEV-Infektionen) und Toxin-induzierte Modelle (Cuprizon oder Lysolecithin-Modell).

In der vorliegenden Arbeit wurde das EAE-Modell herangezogen, bei dem durch Immunisierung eine MS-ähnliche Erkrankung, die EAE, in Versuchstieren herbeigeführt wird.

Damit unterscheidet sie sich von der humanen MS offensichtlich schon in der Initiierung der Erkrankung, die bei dem EAE-Modell artifiziell herbeigeführt wird (86). Auch der zeitliche Verlauf in der EAE zeigt deutliche Abweichungen: Innerhalb von wenigen

Tagen manifestiert sich die Erkrankung in den Versuchstieren, während beim Menschen pathologische Prozesse, die der Erkrankung zugrunde liegen, jahrelang im Verborgenen ablaufen (86). Somit unterscheidet sich auch der Zeitpunkt der Therapie: Beim Menschen wird die MS meist erst in einer späteren Phase diagnostiziert und therapiert, im Immunisierungsmodell wird meist gezielt und früh therapiert (86). Dementsprechend wählte ich ebenfalls einen Therapiebeginn (Tag 7) vor Auftreten erster Symptome (im Mittel an Tag 11).

Selbst die EAE äußert sich in verschiedenen genetischen Mauslinien nicht homogen. Mäuse mit einem C57BL6/J-Hintergrund, wie in dieser Arbeit verwendet, entwickeln einen chronischen Verlauf, während SJL/J-stämmige Mäuse nach der Immunisierung einen schubförmig remittierenden Verlauf der Erkrankung zeigen (63).

EAE-Modelle werden eingesetzt, um den Nutzen neuartiger MS-Therapien zu bewerten (86). Die Ergebnisse von EAE-Versuchen erlaubten die präklinische Testung zahlreicher vielversprechender Therapien, darunter auch moderne immunmodulatorische Medikamente. Glatiramertacetat, Mitoxantron und Natalizumab sind die wichtigsten Beispiele für erfolgreich im EAE-Modell getestete Therapien aus der präklinischen Forschung (87).

Es gibt allerdings auch kritische Stimmen gegen das EAE-Modell. Aussichtsreiche Therapien aus EAE-Versuchen zeigten sich häufig nicht effektiv oder sogar schädlich für MS-Patienten (87).

Das zeigt, dass Ergebnisse aus EAE-Versuchen nur bedingt übertragbar auf die humane Multiple Sklerose sind. Bedeutsam für die Interpretation der Ergebnisse ist deshalb neben der Wahl des Tiermodells auch ggf. der Einsatz verschiedener, komplementärer MS Modelle. Wir wählten das EAE-Modell für diese erste Testung, da es häufig und auch erfolgreich verwendet wurde, um neben einem klinischen therapeutischen Effekt auch die durch die Intervention modifizierte Immunantwort und Neuroinflammation zu charakterisieren (86).

SEFA: vielversprechende modifizierte Fettsäuren für die Therapie entzündlicher (Leber-) Erkrankungen

Die Firma NorthSea Therapeutics, die die im Rahmen dieser Arbeit getestete modifizierte Fettsäure zur Verfügung gestellt hat, hat sich der Erforschung und Entwicklung oraler Lipidtherapeutika für metabolische, entzündliche und fibrotische Erkrankungen verschrieben. Mit der SEFA-Technologie hat das Unternehmen einen neuartigen und einzigartigen therapeutischen Ansatz in diesem Bereich. Die SEFA sind dahingehend modifiziert, dass sie primär als Signalmolekül agieren und kaum verstoffwechselt oder in Lipide und Zellmembranen integriert werden.

Die Leitsubstanz des Unternehmens, Icosabutat (Abb. 21), als metabolisch stabile Variante der ω 3-Fettsäure EPA (*eicosa-pentaenoic acid*), konnte bereits *in vitro* und *in vivo* vielversprechende Ergebnisse erzielen (88):

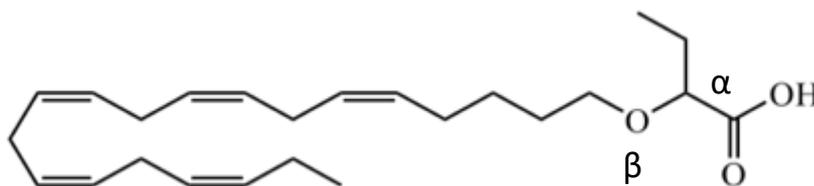


Abbildung 21: Icosabutat, ein langkettiges Omega-3-FS Analogon.

Die chemischen Modifikationen des SEFA verhindern eine Metabolisierung und Integration in Lipide und Zellmembranen, wodurch Icosabutat vorrangig Funktionen als Signalmolekül ausübt.

Die modifizierte Fettsäure moduliert Signalwege, die in Zusammenhang mit entzündlichen Lebererkrankungen stehen, darunter insbesondere die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) mit dem assoziierten metabolischen Syndrom. Neben antifibrotischen und antiinflammatorischen Effekten in NASH-Modellen zeigte Icosabutat in präklinischen Studien außerdem antidiabetische und antiatherogene Effekte (88-93). Dies ist bedeutsam, da NASH-Patienten zwar eine erhöhte leberassoziierte Mortalität aufweisen, etwa durch Zirrhose, Leberversagen oder Leberzellkarzinom, die Hauptursache der frühen Morbidität und Mortalität allerdings auch bei NASH-Patienten metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen (94).

In einer Phase-2-Studie zeigte sich unter der Zufuhr von Icosabutat eine Normalisierung von Leberenzymen in hyperlipidämischen Patienten (95). Das Produkt wurde additiv zur Statingabe zugeführt, was eine Wirksamkeit und Verträglichkeit mit Standardtherapeutika zur Senkung des kardiovaskulären Risikos sichert (96). In präklinischen Studien wurde außerdem eine Verbesserung des Glukosestoffwechsels und

Insulinsensitivität unter der Zufuhr von Icosabutat festgestellt (88). Die Substanz befindet sich derzeit außerdem in einer Phase-2b-Studie mit 264 NASH-Patienten, deren primärer Endpunkt die Rückbildung der Steatohepatits ohne Zunahme der Fibrose bildet (ICOsabutate in NASH, ICONA). Interimsergebnisse dieser Studie zeigen bei den ersten 90 Patienten, die 16 Wochen behandelt wurden, „dosisabhängige, signifikante und klinisch bedeutsame Verbesserungen aller Leberfunktionen sowie entzündlicher und Fibrose-relevanter Biomarker“ (NorthSea Therapeutics) (81, 82). Dies bestätigte somit den starken entzündungshemmende, antifibrotische und antioxidativen Effekt von Icosabutat im präklinischen Mausmodell der NASH (97).

Neben Icosabutat hat NorthSea weitere erfolgversprechende SEFA-Produkte in der Pipeline: SEFA-1024 und SEFA-6179 (98). In präklinischen Studien zeigte SEFA-1024 eine cholesterinsenkende Wirkung, ebenfalls additiv zur Statingabe, was eine Kombination mit kardiovaskulären Therapien erlaubt (98). Auch an Diabetes erkrankte Hyperlipidämie-Patienten könnten von einer Zugabe profitieren, da SEFA-1024 außerdem zu einer Verbesserung der Blutzuckerkontrolle führt (98). Die Phase-1-Studie zu SEFA-1024 ist nahezu abgeschlossen, ein Antrag auf klinische Prüfung gestellt. Des Weiteren wurde erst kürzlich ein weiteres Projekt unserer Arbeitsgruppe zu SEFA-1024 in Abstractform veröffentlicht: in DSS-Mäusen, einem präklinischen Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, führte die Zufuhr von SEFA-1024 bei frühem Einsatz zu einer Verhinderung der Erkrankung (99). Dabei handelt es sich um einen weiteren aussichtsreichen Anwendungsbereich der SEFAs auf dem Gebiet entzündlicher Erkrankungen.

Ein weiteres vielversprechendes Produkt von NorthSea Therapeutics ist SEFA-6179. Es wird als orale Therapie für die durch langfristige parentale Ernährung bedingte Lebererkrankung (PNALD) entwickelt (98). Mehrere präklinische Modelle der PNALD zeigten eine vollständige Erholung der im Rahmen einer PNALD entstandenen Steatohepatitis unter der Zufuhr von SEFA-6179 (98).

So stellt NorthSea Therapeutics sichere orale Therapiezusätze für die Behandlung von Lebererkrankungen in Aussicht. Daneben erhofft sich das Unternehmen auch übertragbare Ergebnisse auf andere entzündliche Erkrankungen, etwa die Multiple Sklerose.

Uns wurde SEFA-6207 zur präklinischen Testung zur Verfügung gestellt. Zu diesem Produkt gibt es noch keine Veröffentlichungen. Die chemischen Modifikationen der Fettsäure zeigt Abbildung 21.

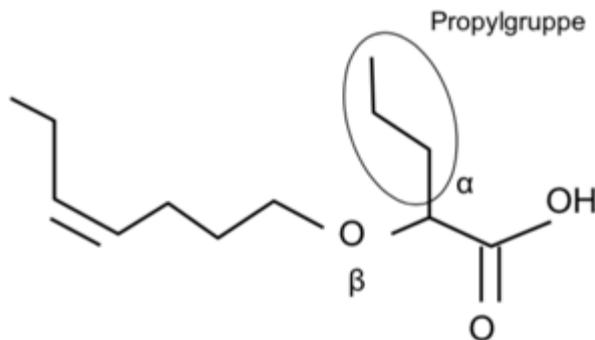


Abbildung 22: Chemische Modifikationen von SEFA-6207.

Eine Propylgruppe an der α -C-Position führt zur sterischen Hinderung, das Sauerstoff-Atom an der β -Position des Moleküls behindert die Veresterung des Moleküls: SEFA-6207 hat nahezu ausschließlich die Funktion eines Signalmoleküls und wird kaum verstoffwechselt oder in komplexe Lipide eingebaut.

Wie bei den anderen SEFA, handelt es sich bei SEFA-6207 (Abbildung 22) um eine strukturell modifizierte, einfach ungesättigte ω -3-Fettsäure (88). Wie eingangs dargestellt, haben langkettige ω -3-Fettsäuren als Nahrungsfaktoren in der Regel einen antiinflammatorischen Effekt (78). An der α -C-Position des Moleküls befindet sich in SEFA-6207 eine Propylgruppe. Dies führt zu einer sterischen Hinderung von biochemischen Reaktionen (90). Anstelle eines Kohlenstoffatoms befindet sich an der β -Position ein Sauerstoff-Atom. Diese chemischen Modifikationen behindern die Veresterung des Moleküls, was zu einer raschen Aufnahme in den Pfortaderkreislauf führt und eine Verstoffwechslung bereits im Darm verhindert (90). So blockieren die Propyl- und Sauerstoffsubstitution die Verstoffwechslung der Fettsäure als zelluläre Energiequelle (100). Sie verhindern außerdem den Einbau in komplexe Lipide, insbesondere der Zellmembran. Damit entfaltet SEFA-6207, wie auch die anderen SEFAs, primär Eigenschaften als Signalmolekül für diverse Fettsäurerezeptoren auf u.a. Immunzellen. Es wird eine hohe hepatische Konzentration der freien Säureform erzielt (95). Die Struktur der mittelkettigen SEFA-6207 ist sicher für die Entwicklung von leberspezifischen Therapeutika von Vorteil, der Effekt auf entzündliche Erkrankungen anderer Organe, wie beispielsweise auf die Multiplen Sklerose, war aber unklar.

Klinischer Verlauf der EAE unter Zufuhr von SEFA-6207

Im Hinblick auf den klinischen Verlauf und Gewichtsreduktion konnte im Rahmen dieser Arbeit zwischen den einzelnen Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden. Der Krankheitsbeginn lag bei allen drei Gruppen um den 12. Tag nach Immunisierung, wobei er in der Hochdosis-Gruppe im Mittel bei 12,22 Tagen ($\pm 0,46$), und damit am spätesten, zeigte. Im Scoring zeigte sich am Versuchsende, Tag 15, keine Differenz zwischen den einzelnen Gruppen. Auch an den vorangegangenen Tagen zeigte sich keine signifikante Differenz in der Klinik der Tiere. Der Gewichtsverlust der Gruppen korrelierte weiterhin mit dem klinischen Verlauf. Insgesamt verloren die einzelnen Gruppen zwischen 19,24 % und 26,67% ihres Körpergewichts, wobei in der Niedrigdosis-Gruppe der größte Gewichtsverlust verzeichnet wurde.

Somit zeigte sich keine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität in der mit SEFA therapierten Versuchsgruppen. Dies könnte zum einen auf die chemischen Modifikationen zurückzuführen sein: Sie sind prinzipiell entwickelt, um nicht systemisch, sondern über den Pfortaderkreislauf speziell auf die Leber und bestimmte Fettsäurerezeptoren zu wirken (90).

Zum anderen gab es keine vorangegangenen Versuche mit der von uns getesteten SEFA-6207. Zwar wurden Dosen gewählt, die mit den in anderen präklinischen Studien der SEFA gewählten Dosierungen übereinstimmt (95), diese Dosen sind aber keineswegs direkt auf SEFA-6207 übertragbar. Deshalb sind weitere Versuche mit anderen Dosen gerechtfertigt. In unserem Versuch gab es auf jedoch auch keine Hinweise auf schwere Unverträglichkeiten oder unerwünschte Wirkungen durch die Zufuhr. Alternativ kann es sinnvoll sein, andere, z.B. langkettige SEFAs, wie SEFA-1022 (Icosabutat) und SEFA-1024 im EAE Modell zu testen. Neben der Wirksamkeit von SEFA-6207 wurde auch Sicherheit und Verträglichkeit der Substanz überprüft. Nach der Induktion und Boost des Immunsystems kommt es zwischen Tag 9 und spätestens Tag 14 zu signifikanten Symptomen, beginnend mit Schwäche und Lähmung im Schwanz der Versuchstiere. Der Hersteller des Immunisierungscocktails gibt einen Krankheitsbeginn an Tag 11,3 ($\pm 1,4$ SD) für Mäuse, die in der 11.-13. Woche immunisiert wurden (101), an. Somit zeigten unsere Versuchstiere nicht nur einen untereinander, sondern auch im Vergleich zu unbehandelten Tieren ähnlichen Krankheitsbeginn, was einen ersten Hinweis auf die Verträglichkeit der verabreichten SEFA-6207 liefert. Auch im Hinblick auf den Krankheitsverlauf bot sich kein nachteiliger Effekt durch die orale Zufuhr per

Schlundsonde. Wie auch bei unbehandelten Tieren verlief die EAE bei allen Gruppen progredient. Nach Herstellerangaben liegt das mittlere Erkrankungsmaximum bei einem Score zwischen 3,18 ($\pm 0,15$ SD) und 3,46 ($\pm 0,56$ SD) (101) und damit höher als der von uns ermittelte Score bei Beendigung des Tierversuchs an Tag 15 p.i. (siehe Abb. 8). Dies liegt wahrscheinlich an unserer bestens definierten Diät, die keine pro-entzündlichen Proteine, wie die Weizen-Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI), enthält (102-104). In Folgeversuchen könnte deshalb eine Weizen- oder ATI-haltige Diät oder ein längerer Beobachtungszeitraum gewählt werden, um festzustellen, ob wenngleich kein milderer Verlauf, doch eventuell eine Verringerung der Krankheitsaktivität insgesamt erzielt werden kann.

Bedeutung der *gut-brain-axis*

Seit über einer Dekade ist das neue Paradigma der *gut-brain-axis* immer weiter in den Fokus der MS-Forschung gerückt (67).

Möglicherweise handelt es sich beim Darmmikrobiom und insbesondere auch den bisher wenig untersuchten Ernährungsfaktoren um die wichtigsten umweltbedingten Risikofaktoren für die entzündliche Demyelinisierung des ZNS (67, 75, 105). Beide Faktoren wirken unabhängig voneinander, interagieren aber auch, denn die Zusammensetzung des Darmmikrobiom wiederum wird maßgeblich über unsere Ernährung reguliert, entweder direkt über Nahrungskomponenten, oder indirekt über Metabolite (74). Eine Dysbiose im Darmmikrobiom wird mit verschiedenen „Zivilisationskrankheiten“ sowie Autoimmunerkrankungen assoziiert, darunter auch die Multiple Sklerose. Das Mikrobiom ist essenziell für die Balance zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen, die Voraussetzung für ein intaktes Immunsystem ist (73).

Mäuse, die unter sterilen Bedingungen gehalten wurden, verfügen über ein verändertes Immunsystem. Die Differenzierung von Immunzellen hin zu proinflammatorischen TH17- und TH1-CD4-Zellen ist reduziert, wohingegen eine verstärkte Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen zu verzeichnen ist (72). Über eine Modulierung des Mikrobioms sowie direkte Interaktionen mit Immunzellen führen Antibiotika oder Nahrungskomponenten zur pro- oder antiinflammatorischen Differenzierung naiver CD4 + T-Zellen. Schließlich kommt es zur Migration der differenzierten Zellen vom Darm in das ZNS (76). Während eine erhöhte Zufuhr von Salz (106, 107) oder gesättigten Fettsäuren (70) („*Western diet*“) und Weizen-Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) (103,

104) die Differenzierung zu TH17-Zellen begünstigt und über IL-17 und IFN- γ zu einem aggravierten Verlauf der EAE führen (68), hat die Zufuhr von Vitaminen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, etwa die zweifach ungesättigte Linolsäure, (105), oder Ballaststoffen über antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-13 einen mildernden Effekt auf die ZNS-Autoimmunität.

Speziell für Fettsäuren als natürlicher Bestandteil unserer Ernährung oder Metabolite von Darmkeimen gibt es Hinweise auf entzündungsmodulierende Eigenschaften. Während langkettige Fettsäuren naive T-Zellen im Dünndarm zur Differenzierung zu TH1- und TH-17-Zellen anregen und zu einer Verschlimmerung der EAE führte, zeigt die Erkrankung unter Behandlung mit kurzkettige Fettsäuren einen milderen Verlauf über Differenzierung und Proliferation von CD4 + CD25 + Foxp3 Treg (71). Je nach Position der Doppelbindung von ungesättigte Fettsäuren wirken sie pro- oder antiinflammatorisch: ω -3-Fettsäuren, etwa aus Fischöl, hat eine entzündungshemmende Wirkung, wohingegen ω -6-Fettsäuren aus Fleisch eine entzündungsfördernde Wirkung zeigt (78).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer oral zugeführten, strukturell veränderten ω -3-Fettsäure, SEFA-6207, auf den Verlauf der EAE als Modell der humanen MS untersucht. Zwar zeigte sich nur geringe Unterschiede in Bezug auf Krankheitsbeginn, -aktivität und histologische Korrelate, allerdings konnten hinsichtlich der Genexpression verschiedene interessante Beobachtungen gemacht werden.

So kam es durch die Zufuhr der SEFA im Ileum dosisabhängig zu einer Verringerung (IFN- γ , TNF- α), wie auch eine Erhöhung (IL-6, iNOS) proinflammatorischer Zytokine. Dies könnte darauf hindeuten, dass myeloide Zellen (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) aktiviert, lymphozytäre Zellen hingegen in einer vorteilhaften, antiinflammatorischen Weise gehemmt werden.

Bei den untersuchten antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β 1) und bei dem myeloiden Zellmarker CD11b kam es hingegen zu einer Verringerung im Ileum der Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um genauer zu untersuchen, ob es zur Unterdrückung antiinflammatorischer Signale von polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophile), ggf. auch Eosinophilen, Basophilen und Monozyten-Makrophagen kommt, sollten weitere Analysen z.B. für CD68, Ym1, Arg 1 und CD206 als Marker für M2-polarisierte (antiinflammatorische) Makrophagen ergänzt werden.

Auch im Kolon zeigte sich ein gemischtes Bild hinsichtlich proinflammatorischer (IL-6, iNOS) und antiinflammatorischer (IL-10, IFN- γ) Zytokine. Dies kann Ausdruck dessen

sein, dass SEFA primär im Dünndarm resorbiert werden und nur zu einem kleinen Anteil im Kolon.

So wurde zumindest eine Aktivität der SEFA auf zellulärer Ebene verzeichnet, wenn auch ein klinischer Effekt in gewählter Dosis ausblieb. Weitere immunologische Untersuchungen, beispielsweise über eine Durchflusszytometrie (FACS-Analyse), ergänzende immunhistochemische Färbungen und weitere qPCR-Untersuchungen, sollten in künftigen Projekten den immunologischen Aspekt weiter charakterisieren. Weiter sollten Analysen des Darmmikrobioms angeschlossen werden, um einen Unterschied in der Zusammensetzung bei behandelten und unbehandelten Tieren zu zeigen. Dies würde weiter zum Verständnis der Darm-Hirn-Achse beitragen.

Gut verträgliche, orale modifizierte Fettsäuren, wie sie NorthSea Therapeutics schon erfolgreich für verschiedene leberassoziierte Erkrankungen entwickelt hat, stellen eine attraktive Ergänzung zu den herkömmlichen MS-Therapien dar. Nahrungskomponenten, besonders strukturell modifizierte und optimierte Fettsäuren, sollten deshalb weiterhin auf ihre Wirksamkeit in EAE-Modellen untersucht werden.

Die weitere Erforschung der *gut-brain-axis* wird in Zukunft mehr Klarheit in Bezug auf Ätiologie und Pathomechanismus der Multiplen Sklerose liefern. Wünschenswert wäre die Entwicklung von neuen, gut verträglichen Therapeutika über eine Modulation des Darmmikrobioms, oder sogar zur Primärprävention der Erkrankung.

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die sich gegen Myelinscheiden des Zentralen Nervensystems richtet und zu vielfältigen progredienten neurologischen Ausfällen führt. Histopathologisch zeichnet sie sich durch entzündliche, demyelinisierende Herde mit axonalem Schaden im ZNS aus. Die MS ist die häufigste Ursache für eine Gehbehinderung im jungen Erwachsenenalter und gegenwärtig nicht heilbar.

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht bekannt, es gibt jedoch dringende Hinweise darauf, dass Umweltfaktoren eine Rolle in der Entstehung der Erkrankung spielen. Besonders die Ernährung rückt immer weiter in den Fokus wissenschaftlicher Forschung. Die *gut-brain-axis* als bidirektionale Verbindung zwischen dem Darm(-mikrobiom) und dem Gehirn ist ein erst kürzlich aufgekommenes neues Paradigma in der MS Forschung. Gezielte diätetische Modifikationen oder auch primär auf das Darm-Immunsystem wirkende Pharmaka könnten eine attraktive Ergänzung oder sogar Alternative zu den aktuellen Therapiesäulen bei der Behandlung der MS darstellen.

Tiermodell und Methoden

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss einer sogenannten *structurally engineered fatty acid* (SEFA) der Firma Northsea Therapeutics, ein nicht oxidativ abbaubares und nicht in zelluläre Membranen inkorporiertes Analogon einer Omega-3 Fettsäure mit günstigen *Signaling*-Eigenschaften auf Immunzellen, in einem Tiermodell der MS (EAE) auf den Krankheitsverlauf untersucht. Ferner wurde das Rückenmark auf den Demyelinisierungsgrad untersucht, Immunzell-Subtypen im Ileum immunhistochemisch quantifiziert und die Genexpressionsanalysen relevanter Zytokine im Ileum und Kolon quantifiziert.

Ergebnisse

Es konnte das Mausmodell der EAE mit exzellenter Reproduzierbarkeit etabliert werden. Im Hinblick auf den Beginn und Krankheitsverlauf konnten in den beiden Versuchsgruppen, die per Schlundsonde SEFA-6207 in unterschiedlicher Dosis zusätzlich zur Basisnahrung erhielten, keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Ebenso zeigte sich keine statistisch signifikante

Differenz hinsichtlich des Gewichtsverlusts. Wenngleich eine klinische evidente Wirksamkeit fehlte, so zeigte sich die getestete SEFA im präklinischen Mausmodell jedoch sicher und verträglich. In den angefertigten Gewebeschnitten des Rückenmarks konnten in verschiedenen neuropathologischen Färbungen entzündliche und demyelinisierende Infiltrate, die mit einer Nervenfaserschädigung einhergehen, gezeigt werden. Auch hier fanden sich nur geringfügige Unterschiede zwischen der Niedrigdosis- der Hochdosis- und der Kontrollgruppe.

Bei der Betrachtung von immunhistochemische Färbungen für die gesamten Immunzellen (CD45+) und T-Lymphozyten (CD3+) im Ileum zeigte sich keine signifikante Differenz hinsichtlich der mucosalen Infiltration von Immunzellen.

Genexpressionsanalysen bestätigten jedoch eine dosisabhängige Veränderung der Expression sowohl pro-, wie auch antiinflammatorischer Zytokine im Ileum. Auch im Kolon konnte ein Einfluss von SEFA-6207 auf die Genexpression pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine gezeigt werden.

Schlussfolgerung

Diese Untersuchungen geben erste Hinweise auf die Funktionsweise der getesteten SEFA und deren Wirkebene. Festgestellte Unterschiede in der Genexpression im Darm auf zellulärer Ebene scheinen ohne klinische Relevanz im EAE-Modell der MS. Die Veränderung der Genexpression hatte weder begünstigende noch benachteiligende Effekte auf den Erkrankungsverlauf, das Körpergewicht oder histologische Korrelate der Versuchstiere. Weitere Studien und eventuelle Modifikationen der SEFA für die MS müssen durchgeführt werden, um einen entscheidenden Einfluss auszuüben. Eine verträgliche und hocheffektive SEFA wie Icosabutat (SEFA-1022), welches NorthSea bereits für die Therapie der nicht-alkoholischen Steatohepatitis, einer verbreiteten entzündlichen und fibrosierenden Lebererkrankung, erfolgreich klinisch entwickelt hat, oder SEFA-1024, welche im Mausmodell der chronisch entzündlichen Darmerkrankung hochwirksam die Darmentzündung hemmt (Promotion [1], TIM) zeigen, dass je nach struktureller Modifikation und ggf. intestinaler Resorption auch SEFA zur Therapie der ZNS-Entzündung bei MS möglich sein sollte.

Summary

Background and aims

Multiple sclerosis is an autoimmune disease targeting myelin sheaths of the central nervous system, leading to a variety of progressive neurological deficits. Histopathologically, it is characterized by inflammatory, demyelinating foci with axonal damage in the CNS. MS is the most common cause of walking disability in young adulthood and to date is incurable.

The etiology of the disease is unknown, but there is strong evidence that environmental factors play a role in the development of the MS. Nutrition, in particular, is an ever-increasing focus of scientific MS research. The gut-brain axis as a bidirectional link between the gut (nutrition and microbiome) and the brain is a recently emerging novel paradigm in MS research. Specific dietary modifications or even pharmaceuticals acting primarily on the gut immune system could be an attractive addition or even alternative to current therapeutic pillars in the treatment of MS.

Animal model and methods

In the thesis presented here, the influence of a so-called structurally engineered fatty acid (SEFA) developed by NorthSea Therapeutics, a non-oxidatively degradable analogue of a medium chain omega-3 fatty acid with favorable signaling properties on immune cells that is not incorporated into cellular membranes, on the progression of the disease was investigated in an animal model of MS (EAE). Furthermore, the spinal cord was examined for the degree of demyelination, immune cell subtypes in the ileum were quantified by immunohistochemistry, and gene expression analyses of relevant cytokines in the ileum and colon were analyzed.

Results

The mouse model of MS (EAE) was established with an excellent reproducibility. With regard to the onset and course of the disease, no significant effects were shown in the two experimental groups receiving SEFA-6207 by oral gavage at different doses compared to the control group receiving placebo. However, although clinical evidence of efficacy was lacking, the SEFA tested was proved to be safe and tolerable in the preclinical mouse model. In the harvested tissue sections of the spinal cord, inflammatory and demyelinating infiltrates associated with nerve fiber damage were demonstrated in

various neuropathological stains. Again, only minor differences were found between the low-dose, high-dose, and control groups, except for the lumbar spinal cord where SEFA-6207 significantly ameliorated demyelination.

When immunohistochemical staining for total immune cells (CD45+) and T lymphocytes (CD3+) was performed, no significant difference was apparent with respect to mucosal infiltration of immune cells.

Nevertheless, gene expression analyses confirmed a dose-dependent modification of the expression of both pro-, and anti-inflammatory cytokines in the ileum, with an indication that, in contrast to myeloid cells, lymphocytes might have been modulated in a beneficial, anti-inflammatory way. An influence of SEFA-6207 on gene expression of pro- as well as anti-inflammatory cytokines could also be shown in the colon.

Conclusion

These studies provide first indications of the mechanism of function of the tested SEFA and its mode of action. Detected differences in intestinal gene expression at the cellular level appear to be without clinical effect in the EAE model of MS. Alteration of gene expression had neither beneficial nor adverse effects on disease progression (except for the lumbar spine), body weight, or histological correlates in the experimental animals. Further studies and possible use of other SEFAs for MS should be performed. A tolerable and highly effective SEFA such as icosabutate (SEFA-1022), which NorthSea has already successfully established clinically for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis, a common inflammatory and fibrosing liver disease, or SEFA-1024, which is highly effective in inhibiting intestinal inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease (PhD [redacted], TIM) show that depending on structural modification and possibly intestinal absorption, SEFAs may become a novel therapy for CNS inflammation in MS.

Literaturverzeichnis

1. W. Böcker HD, Ph. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe, H. Moch. Pathologie: Elsevier Urban & Fisher; 2012. 1001 p.
2. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in Immunopathology*. 2007;29(1):3.
3. Li D, Wang P, Wang P, Hu X, Chen F. The gut microbiota: A treasure for human health. *Biotechnology Advances*. 2016;34(7):1210-24.
4. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.
5. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 1999;11(1):13-8.
6. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;966(1):290-303.
7. K. Murphy PT, M. Walport. Janeway Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 2009. 1092 p.
8. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*. 2014;162(2, Part B):103-12.
9. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
10. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(12):823-36.
11. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-10.
12. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):223-46.
13. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
14. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, Farrelly C, et al. CD39⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2009;183(11):7602.
15. Klein J, Sato A. The HLA System. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(10):702-9.
16. Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol*. 1994;54(1-2):1-17.
17. Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J. Epidemiologie der Multiplen Sklerose—eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. 2017.
18. Cierny D, Lehotsky J, Hanysova S, Michalik J, Kantorova E, Sivak S, et al. The age at onset in Multiple Sclerosis is associated with patient's prognosis. *Bratisl Lek Listy*. 2017;118(6):374-7.
19. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010;9(5):520-32.

20. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Kyvik KO, Bronnum-Hansen H. Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Mult Scler.* 2005;11(5):500-3.
21. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12877-82.
22. Alcina A, Abad-Grau MDM, Fedetz M, Izquierdo G, Lucas M, Fernández O, et al. Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations. *PLoS One.* 2012;7(1):e29819-e.
23. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019;26(1):27-40.
24. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(9).
25. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol.* 1998;18(3):301-7.
26. Henze T, Rieckmann P, Toyka KV. Symptomatic Treatment of Multiple Sclerosis. *European Neurology.* 2006;56(2):78-105.
27. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 1995;47(4-5):425-48.
28. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2002;3(10):940-3.
29. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol.* 2004;3(12):709-18.
30. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama.* 2006;296(23):2832-8.
31. Riise T, Moen BE, Kyvik KR. Organic solvents and the risk of multiple sclerosis. *Epidemiology.* 2002;13(6):718-20.
32. Adamo AM. Nutritional factors and aging in demyelinating diseases. *Genes Nutr.* 2014;9(1):360.
33. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3).
34. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol.* 1993;33(2):137-51.
35. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006;129(8):1953-71.
36. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology.* 2015;14(2):183-93.
37. Greenfield AL, Hauser SL. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol.* 2018;83(1):13-26.
38. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.
39. Noyes K, Weinstock-Guttman B. Impact of diagnosis and early treatment on the course of multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 2013;19(17 Suppl):s321-31.
40. Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 2016;22(6 Suppl):s159-70.

41. Frohman EM, Shah A, Eggenberger E, Metz L, Zivadinov R, Stüve O. Corticosteroids for multiple sclerosis: I. Application for treating exacerbations. *Neurotherapeutics*. 2007;4(4):618-26.
42. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(2):96-120.
43. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. P t. 2012;37(3):175-84.
44. Achiron A, Kishner I, Dolev M, Stern Y, Dulitzky M, Schiff E, et al. Effect of intravenous immunoglobulin treatment on pregnancy and postpartum-related relapses in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2004;251(9):1133-7.
45. Crayton HJ, Rossman HS. Managing the symptoms of multiple sclerosis: A multimodal approach. *Clinical Therapeutics*. 2006;28(4):445-60.
46. Krishnamoorthy G, Lassmann H, Wekerle H, Holz A. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2385-92.
47. Bettelli E, Baeten D, Jäger A, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2393-402.
48. Lorch Y, Friedmann A, Lipton HL, Kotler M. Theiler's murine encephalomyelitis virus group includes two distinct genetic subgroups that differ pathologically and biologically. *J Virol*. 1981;40(2):560-7.
49. Tsunoda I, Fujinami RS. Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2010;5(3):355-69.
50. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*. 2001;11(1):107-16.
51. Hall SM, Gregson NA. The in vivo and ultrastructural effects of injection of lysophosphatidyl choline into myelinated peripheral nerve fibres of the adult mouse. *J Cell Sci*. 1971;9(3):769-89.
52. Ousman SS, David S. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia*. 2000;30(1):92-104.
53. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129(Pt 8):1953-71.
54. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med*. 1933;58(1):39-53.
55. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med*. 1951;93(6):615-33.
56. Sakai K, Zamvil SS, Mitchell DJ, Mae L, Jonathan B R, Lawrence S. Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. *Journal of Neuroimmunology*. 1988;19(1):21-32.
57. Tuohy VK, Sobel RA, Lees MB. Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *The Journal of Immunology*. 1988;140(6):1868.

58. Kurschus FC. T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. *Biomed J.* 2015;38(3):183-93.
59. O'Brien K, Fitzgerald DC, Naiken K, Alugupalli KR, Rostami AM, Gran B. Role of the innate immune system in autoimmune inflammatory demyelination. *Curr Med Chem.* 2008;15(11):1105-15.
60. York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, et al. Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 2010;35(1):33-44.
61. Beeston T, Smith TRF, Maricic I, Tang X, Kumar V. Involvement of IFN- γ and perforin, but not Fas/FasL interactions in regulatory T cell-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology.* 2010;229(1-2):91-7.
62. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1079-106.
63. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* 2017;27(2):123-37.
64. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol.* 2009;118(6):723-36.
65. Riccio P, Rossano R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2018;15(1):75-91.
66. Bagur MJ, Murcia MA, Jiménez-Monreal AM, Tur JA, Bibiloni MM, Alonso GL, et al. Influence of Diet in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Advances in Nutrition.* 2017;8(3):463-72.
67. Fleck AK, Schuppan D, Wiendl H, Klotz L. Gut-CNS-Axis as Possibility to Modulate Inflammatory Disease Activity-Implications for Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
68. Manzel A, Muller DN, Hafler DA, Erdman SE, Linker RA, Kleinewietfeld M. Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(1):404.
69. Riccio P, Rossano R. Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro.* 2015;7(1).
70. Timmermans S, Bogie JF, Vanmierlo T, Lütjohann D, Stinissen P, Hellings N, et al. High fat diet exacerbates neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis by activation of the Renin Angiotensin system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014;9(2):209-17.
71. Haghikia A, Jörg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, et al. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity.* 2015;43(4):817-29.
72. Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology.* 2013;13(5):321-35.
73. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005;122(1):107-18.
74. Berer K, Krishnamoorthy G. Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Letters.* 2014;588(22):4207-13.

75. Joscelyn J, Kasper LH. Digesting the emerging role for the gut microbiome in central nervous system demyelination. *Mult Scler*. 2014;20(12):1553-9.
76. Bhutia Yangzom D, Ganapathy V. Short, but Smart: SCFAs Train T Cells in the Gut to Fight Autoimmunity in the Brain. *Immunity*. 2015;43(4):629-31.
77. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010;142(5):687-98.
78. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 2008;47(2):147-55.
79. Haase S, Haghikia A, Gold R, Linker RA. Dietary fatty acids and susceptibility to multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018;24(1):12-6.
80. Stokman G, van den Hoek AM, Denker Thorbekk D, Pieterman EJ, Skovgård Veidal S, Basta B, et al. Dual targeting of hepatic fibrosis and atherogenesis by icosabutate, an engineered eicosapentaenoic acid derivative. *Liver International*. 2020;40(11):2860-76.
81. Positive Phase 2b ICONA interim results for icosabutate in NASH patients 2021 [Available from: <https://www.northseatherapeutics.com/news/positive-phase-2b-icona-interim-results-for-icosabutate-in-nash-patients/>].
82. Harrison S. GN, Sheikh M.Y., Rudraraju M., Kohli A., Neff G., Fraser D., Round P., Beysen C., Rossi S., Sanyal A. Icosabutate, a novel structurally engineered fatty acid, significantly reduces relevant markers of NASH and fibrosis in 16 weeks: Results of an interim analysis of the Phase 2b ICONA trial. *EASL2021*.
83. Laboratories H. Mouse EAE Scoring 2008-2021 [Available from: <https://hookelabs.com/services/cro/eae/MouseEAEScoring.html>].
84. Veress B, Franzén L, Bodin L, Borch K. Duodenal intraepithelial lymphocyte - count revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2004;39(2):138-44.
85. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Laboratory Investigation*. 2001;81(3):263-81.
86. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2015;759:182-91.
87. Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2006;60(1):12-21.
88. van den Hoek AM, Pieterman EJ, van der Hoorn JW, Iruarrizaga - Lejarreta M, Alonso C, Verschuren L, et al. Icosabutate Exerts Beneficial Effects Upon Insulin Sensitivity, Hepatic Inflammation, Lipotoxicity, and Fibrosis in Mice. *Hepatology communications*. 2020;4(2):193-207.
89. Stokman G, van den Hoek AM, Denker Thorbekk D, Pieterman EJ, Skovgård Veidal S, Basta B, et al. Dual targeting of hepatic fibrosis and atherogenesis by icosabutate, an engineered eicosapentaenoic acid derivative. *Liver International*. 2020;40(11):2860-76.
90. Fraser D, Wang X, Skjaeret T, Kastelein J, Schuppan D. A structurally engineered fatty acid, icosabutate, displays optimised absorption, distribution and metabolism properties for targeting hepatic inflammation and normalises elevated liver enzymes in dyslipidemic patients. *Journal of Hepatology*. 2018;68:S119.
91. Fraser D, Wang X, Alonso C, Lek S, Skjaeret T, Schuppan D. Icosabutate, a novel structurally engineered fatty-acid, exhibits potent anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in a dietary mouse model resembling progressive human NASH. *AASLD2018*.

92. Fraser D, Thorbek D, Allen B, Thrane S, Skjaeret T, Friedman S, et al. A liver-targeted structurally engineered fatty acid, icosabutate, potentially reduces hepatic pro-fibrotic gene expression and improves glycemic control in an obese diet-induced mouse model of NASH. AASLD2018.
93. Fraser D, Wang X, Kim Y, Iruarrizaga-Lejarreta M, Skjaeret T, Alonso C, et al. Decline in NASH- and atherosclerosis-associated oxidised phospholipids and 7-ketocholesterol in response to icosabutate therapy. EASL 2020.
94. Kastelein JJ, Hallén J, Vige R, Fraser DA, Zhou R, Hustvedt SO, et al. Icosabutate, a structurally engineered fatty acid, improves the cardiovascular risk profile in statin-treated patients with residual hypertriglyceridemia. *Cardiology*. 2016;135(1):3-12.
95. Bays HE, Hallén J, Vige R, Fraser D, Zhou R, Hustvedt SO, et al. Icosabutate for the treatment of very high triglycerides: A placebo-controlled, randomized, double-blind, 12-week clinical trial. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016;10(1):181-91. e2.
96. Kastelein JJ, Hallen J, Vige R, Fraser DA, Zhou R, Hustvedt SO, et al. Icosabutate, a Structurally Engineered Fatty Acid, Improves the Cardiovascular Risk Profile in Statin-Treated Patients with Residual Hypertriglyceridemia. *Cardiology*. 2016;135(1):3-12.
97. Fraser D, Wang X, Skjaeret T, Schuppan D. Icosabutate, a Novel Structurally Engineered Fatty-Acid, Exhibits Potent Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects in a Dietary Mouse Model Resembling Progressive Human Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2018;68.
98. Therapeutics N. Pipeline 2019 [Available from: <https://www.northseatherapeutics.com/pipeline/>].
99. Matzner J, Pickert G, Thies D, Skjaeret T, Fraser DA, Schuppan D. Su1087 A Gut-targeted eicosapentaenoic acid derivate, SEFA-1204, ameliorates dextran sodium sulfatae (DSS)-induced intestinal inflammation *Gastroenterology*. 2020;158(6):S-505.
100. Larsen LN, Bremer J, Flock S, Skattebøl L. α - and β - alkyl-substituted eicosapentaenoic acids: Incorporation into phospholipids and effects on prostaglandin H synthase and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology*. 1998;55(4):405-11.
101. Laboratories H. Hooke Kits™ for EAE Induction in C57BL/6 Mice 2008-2021 [Available from: <https://hookelabs.com/products/EK-2110/>].
102. Schuppan D, Zevallos V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. *Dig Dis*. 2015;33(2):260-3.
103. Zevallos VF, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, et al. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1100-13.e12.
104. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2012;209(13):2395-408.
105. Fleck AK, Hucke S, Teipel F, Eschborn M, Janoschka C, Liebmann M, et al. Dietary conjugated linoleic acid links reduced intestinal inflammation to amelioration of CNS autoimmunity. *Brain*. 2021;144(4):1152-66.
106. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496(7446):518-22.
107. Jörg S, Kissel J, Manzel A, Kleinewietfeld M, Haghikia A, Gold R, et al. High salt drives Th17 responses in experimental autoimmune encephalomyelitis without impacting myeloid dendritic cells. *Exp Neurol*. 2016;279:212-22.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater _____ für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas, die Unterstützung meiner Promotion und den fachlichen Rat zu jeder Zeit in zahlreichen wertvollen Diskussionen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kollegen vom Institut für Translationale Immunologie. Danke für eure Hilfestellung, euren Rat und für die schöne Zeit mit euch. Ganz besonders möchte ich mich bei unserer ehemaligen Kollegin _____ bedanken, die uns mit Ihrer fröhlichen Art und ihrem offenen Ohr und Herzen immer ein Lächeln aufs Gesicht zaubern konnte.

Mein Dank geht auch an _____ von der Core Facility des FZI Mainz für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen.

Ebenso danke ich _____ für ihre Betreuung in der Anfangsphase dieses Projekts.

Ich danke besonders meinen Eltern und sowie meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit. Danke für zahlreiche Telefonate, euren Support während des Studiums und ganz besonders in den letzten Zügen dieser Arbeit. Ebenso meinen Freunden, danke für Eure aufmunternden Worte und eure Hilfe. Allen voran Danke an meine beste Freundin _____, für ihre konstruktive Kritik und Unterstützung.

Last but not least, an meinen Ehemann, _____: Danke für deine professionelle Betreuung, deinen fachlichen Rat, deinen emotionalen Support, deine kulinarischen Meisterwerke in unserem gemeinsamen Homeoffice und dein Vertrauen in meine Fähigkeiten, wenn ich selbst mein größter Kritiker war.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde.

Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt. Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades. Ein bisher erworbener Doktorgrad wurde mir nicht aberkannt. Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Laura Kazakis-Steinbach

Lebenslauf

Laura Maria Helena Kazakis-Steinbach (geb. Kazakis)

Persönliches

geboren am 24.07.1994 in Heidelberg

