



**The enteric nervous system is a potential autoimmune target in  
multiple sclerosis**

**Das enterische Nervensystem als mögliche Zielstruktur der  
Autoimmunreaktion in der Multiplen Sklerose**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

**Marie Wunsch**

aus

**Soest**

Würzburg 2018



**Eingereicht am:** .....

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzender: .....

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Paul V. Lehmann

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunde ausgehändigt am:** .....

*Für Benni und Mila*

# INHALTSVERZEICHNIS

Summary .....	7
Zusammenfassung .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1 Einleitung .....	13
1.1 Übersicht und klinisches Bild der Multiplen Sklerose.....	13
1.2 Pathogenese der MS .....	14
1.2.1 Läsionstypen .....	14
1.2.2 Toleranzmechanismen .....	16
1.2.3 Pathomechanismus der MS .....	18
1.3 Die Rolle der B-Zellen und Antikörper in der MS.....	21
1.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	24
1.5 MP4-induzierte EAE .....	25
1.5.1 Philosophische Einordnung.....	30
1.5.2 Neurone des ENS .....	33
1.5.3 Gliazellen des ENS .....	35
1.6 Das intestinale Immunsystem .....	37
1.7 Die Rolle der Mikrobiota im Darm bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen .....	40
1.8 Zielsetzung .....	43
2 Material und Methoden .....	45
2.1 Material .....	45
2.1.1 Geräte .....	45
2.1.2 Puffer.....	46
2.2 Methoden .....	49
2.2.1 Mäuse .....	49
2.2.2 Immunisierung .....	49
2.2.3 Klinischer Score .....	50
2.2.4 Immunhistochemie.....	51
2.2.5 Auswertung der Immunhistochemie .....	52
2.2.5.1 Infiltration von Immunzellen .....	52
2.2.5.2 GFAP- und $\beta$ III-Tubulin-Expression .....	53

2.2.5.3	Western Blot .....	54
2.2.6	RNA-Isolation .....	57
2.2.7	RNA-Expressionsprofil .....	58
2.2.8	Histologie .....	59
2.2.8.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	59
2.2.8.2	Masson-Goldner Färbung .....	60
2.2.8.3	Silberimprägnation nach Holmes .....	60
2.2.8.4	Luxol-Fast-Blue Färbung .....	62
2.2.9	Ultrastrukturelle Analyse .....	62
2.2.10	Auswertung der ultrastrukturellen Aufnahmen .....	64
2.2.11	Gastrointestinaler Transit .....	66
2.2.12	Myographie .....	67
2.2.13	Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien .....	69
2.2.14	Isolation von murinem Serum .....	69
2.2.15	Muriner ELISA .....	70
2.2.16	Immunpräzipitation und Massenspektrometrie .....	71
2.2.17	Patienten .....	73
2.2.18	Immunhistochemie der humanen Darmresektate .....	73
2.2.19	Humaner ELISA .....	74
2.2.20	Statistik .....	75
3	Ergebnisse .....	76
3.1	Inflammation des Plexus myentericus in MP4-immunisierten Mäusen .....	76
3.2	Axonpathologie im Plexus myentericus von MP4-immunisierten Mäusen .....	83
3.3	Das autonome Nervensystem in der MP4-induzierten EAE .....	88
3.4	Muskelatrophie und Fibrose der Darmwand in MP4-immunisierten Mäusen .....	93
3.5	Erniedrigte gastrointestinale Motilität in MP4-immunisierten Mäusen .....	94
3.6	MP4-immunisierte Mäuse zeigen eine Antikörperreaktivität gegen enterische Neurone und enterische Gliazellen .....	100
3.7	Autoantikörper in MP4-immunisierten Mäusen binden an enterische Autoantigene .....	104
3.8	Erste Hinweise für eine Autoimmunantwort gegen das ENS in MS-Patienten .....	105
4	Diskussion .....	115
4.1	Epitope spreading .....	115
4.2	Die Autoimmunreaktion gegen das ENS in der EAE .....	118

4.3 Die Autoimmunreaktion gegen das ENS in der MS .....	123
4.4 Entzündliche und neurodegenerative Darmerkrankungen in MS-Patienten .....	125
4.5 Die Beteiligung des ENS in anderen neurodegenerativen Erkrankungen .....	127
4.6 Weiterführende Experimente .....	129
Literatur .....	133
Curriculum Vitae .....	153
Affidavit .....	156
Eidesstattliche Erklärung .....	156
Danksagung .....	157

## SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease, in which the immune system attacks the central nervous system (CNS). Clinical symptoms and the course of the disease can vary among patients, depending on the region of the brain primarily affected. Besides the neurological symptoms caused by CNS lesions, a great amount of MS patients display functional gastrointestinal impairments. Gastrointestinal symptoms were previously explained by the presence of spinal cord lesions rather than being linked to the autoimmune pathomechanisms of the disease.

Here, the enteric nervous system (ENS) was studied in a B cell- and antibody-dependent mouse model of MS, in which the myelin basic protein (MBP) - proteolipid protein (PLP) fusion protein MP4 was used to initiate the autoimmune attack. Immunohistochemistry and electron microscopy were performed at different stages of the disease. We noted that in addition to the immune pathology in the CNS itself, the ENS also showed signs of degeneration. ENS degeneration was evident prior to the manifestation of CNS lesions and to the onset of neurological deficits in mice. ENS pathology was antibody-mediated and accompanied by impaired gastrointestinal motility, ENS gliosis and neurodegeneration. Using immunoprecipitation and mass spectrometry, four autoimmune targets expressed by enteric glia and/or neurons could be identified suggesting that epitope spreading to antigens of the ENS had occurred. MS patients displayed plasma antibodies against three of the ENS autoantigens. Studying human colon resectates provided preliminary evidence for gliosis and neurodegeneration of the ENS in MS patients, which was absent in non-MS controls.

Overall, this study establishes a pathomechanistic link between the well-established autoimmune attack on the CNS and a simultaneous attack on the ENS that has not been described so far. These findings can initiate a paradigm shift in the current understanding of the pathomechanism of MS with diagnostic and therapeutic implications.

## ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Abhängig von der betroffenen ZNS-Region kann es zu vielfältigen Symptomen kommen. Neben neurologischen Symptomen verursacht durch ZNS-Läsionen leidet ein Großteil der MS-Patienten auch unter gastrointestinalen Funktionsstörungen. Diese gastrointestinalen Symptome wurden bisher eher auf Läsionen im Rückenmark zurückgeführt und nicht direkt in Verbindung mit der autoimmunen Ätiologie der Erkrankung gebracht.

In dieser Studie wurde das enterische Nervensystem (ENS) in einem B-Zell- und Antikörper-abhängigen Mausmodell der MS untersucht. Dafür wurde der Autoimmunprozess durch Immunisierung mit MP4, einem Fusionsprotein aus dem Myelin-Basischen-Protein (MBP) und dem Proteolipid-Protein (PLP), ausgelöst. Das ZNS und ENS wurden in den unterschiedlichen Erkrankungsstadien immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch analysiert. Neben der Immunpathologie des ZNS konnte dabei eine Degeneration des ENS schon vor dem Einsetzen der ersten neurologischen Defizite nachgewiesen werden. Die ENS-Pathologie war antikörper-mediert und ging einher mit einer verringerten gastrointestinalen Motilität sowie mit einer Gliose und Neurodegeneration des ENS.

Mithilfe von Immunpräzipitation und Massenspektrometrie konnten im ENS vier mögliche Zielstrukturen des Autoimmunprozesses identifiziert werden, was auf sog. *epitope spreading* hindeutet. Auch im Plasma von MS-Patienten konnten Antikörper gegen drei dieser Antigene nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten sich in Kolon-Resektaten von MS-Patienten erste Ansätze einer Neurodegeneration und Gliose des ENS.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen der Autoimmunreaktion gegen das ZNS und einer simultanen Reaktion gegen das ENS gezeigt.

Dies kann einen Paradigmenwechsel im Verständnis der Immunpathogenese der MS anstoßen und neue therapeutische und diagnostische Ansätze initiieren.



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIRE	<i>autoimmune regulator</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BAFF	<i>b cell-activating factor</i>
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CCh	Carbachol
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans
CVF	<i>cobra venom factor</i>
CXCL12	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
DECRL1	<i>mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase 1</i>
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
eIF3D	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D</i>
ENS	Enterisches Nervensystem
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GABA	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GALT	Gastrointestinal-assoziiertes lymphatisches Gewebe
GDNF	<i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>

HEL	<i>hen egg lysozyme</i>
IBMX	Phosphodiesterase-Inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthin
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IPAN	Intrinsische primäre afferente Neurone
L-NAME	<i>N(<math>\omega</math>)-nitro-L-arginine methyl ester</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAG	Myelin-Assoziiertes-Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches-Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose
NGS	<i>normal goat serum</i>
NMO	Neuromyelitis optica
NPG	n-Propylgallat
NP40	Nonidet P40
OVA	Ovalbumin
P0	Myelinprotein 0

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
PSA	Polyssaccharid A
RDR	<i>false discovery rate</i>
RIN	RNA-Integritäts-Nummer
SFB	Segmentiertes filamentöses Bakterium
SmD2	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
SM	glatte Muskulatur
SPF	Spezifisch pathogen-frei
TNF- $\alpha$	<i>tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens 1

# 1 Einleitung

## 1.1 Übersicht und klinisches Bild der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter und kann zu vielfältigen bleibenden neurologischen Ausfallerscheinungen führen. Die durchschnittliche Prävalenz liegt im Bereich von 50 in 100.000 Einwohnern, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer [1].

Histopathologische Untersuchungen und die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Mausmodell legen nahe, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) handelt, die zu einer Demyelinisierung der Nerven und dadurch zu einer gestörten Impulsweiterleitung im Axon führt. Vorwiegend in der weißen Substanz in der Nähe von Blutgefäßen sind multiple Entmarkungsherde nachweisbar, die später von Glia ausgefüllt werden und verhärten, was die Namensgebung erklärt [2].

MS wird inzwischen als eine multifaktorielle Erkrankung angesehen, wobei genetische Prädisposition sowie Infektionen und Umwelteinflüsse den Autoimmunprozess auslösen können [3].

Insgesamt weist ein Großteil der Patienten einen schubförmig-remittierenden Verlauf auf, bei dem es zwischen den Schüben zu einem Rückgang der Symptomatik kommt. Bei 80 % der Patienten entwickelt sich in der späten Phase ein sekundär progredienter Verlauf, welcher mit einem graduellen Verlust neurologischer Funktionen assoziiert ist und auf irreversible Schädigung der Axone zurückzuführen ist [4, 5].

Nur in etwa 10 % der Fälle tritt die MS in Form eines primär progredienten Verlaufs auf, bei dem es schon von Beginn an zu einem kontinuierlichem Abbau neurologischer Funktionen kommt [2].

Als häufigste Frühmanifestation der Erkrankung gelten die Retrobulbärneuritis und das Doppelbildersehen durch eine Läsion im Fasciculus longitudinalis medialis [6]. Abhängig von der Lokalisation des Entzündungsherds kann es zu weiteren sensiblen, motorischen und

vegetativen Ausfällen wie Sensibilitätsstörungen, Lähmungen oder Beeinträchtigung der Harnblasenfunktion kommen [7].

## **1.2 Pathogenese der MS**

Die drei Hauptmerkmale der ZNS-Pathologie sowohl bei MS-Patienten als auch im Mausmodell sind Entzündung, Demyelinisierung und Axonschaden [8-10]. Die allgemein akzeptierte Hypothese ist, dass es sich bei der MS um eine autoimmune Erkrankung handelt, bei der Lymphozyten in der Peripherie aktiviert werden, durch die Blut-Hirn-Schranke migrieren und im ZNS nach Reaktivierung durch Antigenerkennung Oligodendrozyten und auch die Axone schädigen (Abb. 1). Der genaue Pathomechanismus konnte bisher jedoch nicht entschlüsselt werden.

### **1.2.1 Läsionstypen**

Die Arbeitsgruppe um Lucchinetti und Lassmann konnte durch histologische Studien an Hirnbiopsien von MS-Patienten vier Läsionstypen unterscheiden [9, 11]. In allen Läsionen konnten aktive Demyelinisierung und Axonschäden festgestellt werden, auch Zellinfiltrationen waren in allen Läsionen vorhanden. Trotz dieser Gemeinsamkeiten wiesen die Läsionen ein heterogenes immunopathologisches Bild auf.

Läsionstyp I war durch die Infiltration von T-Zellen charakterisiert und die Demyelinisierung war mit makrophagen-mediierter Inflammation assoziiert. Die Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen konnte in den aktiven Läsionen nachgewiesen werden und es war eine Akkumulierung von Makrophagen-Toxinen vorhanden.

Läsionstyp II ähnelte diesem Bild, jedoch konnte zusätzlich eine Ablagerung von IgG-Antikörpern und eine damit assoziierte Komplementaktivierung am Myelin detektiert werden. Die Demyelinisierung wurde hier vorrangig auf die Lyse der Oligodendrozyten durch

Komplementaktivierung und auf die Aktivierung der Makrophagen über die Antikörperbindung zurückgeführt. Dieser zweite Läsionstyp hatte die höchste Prävalenz. Beide Läsionstypen wurden speziell im perivaskulären Bereich von kleinen Venen gefunden und zeichnen sich durch eine klar abgegrenzte Form aus.

Läsionstyp III war definiert über die Infiltration von T-Zellen, Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen ohne eine Beteiligung von Antikörpern und des Komplementsystems. Im Unterschied zu Läsionstyp I war dieser Läsionstyp eher auf einen primären Untergang der Oligodendrozyten zurückzuführen, woraufhin scheinbar erst sekundär eine Beteiligung des Immunsystems ausgelöst wurde. Die Läsionen waren nicht auf den perivaskulären Bereich des Gewebes limitiert, sondern zeigten eine großflächige, diffuse Verteilung in der weißen Substanz des ZNS. Außerdem wurde insbesondere das Myelin-Assoziierte-Glykoprotein (MAG) der Oligodendrozyten abgebaut, während andere Myelinproteine wie das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Proteolipid-Protein (PLP) oder das Myelin-Basische-Protein (MBP) erhalten blieben. Ein Großteil der Oligodendrozyten im Läsionsbereich zeigte apoptotische Veränderungen.

Der Läsionstyp IV, bei dem die Demyelinisierung auf einen kompletten Untergang der Oligodendrozyten zurückzuführen ist, war mit einem progredienten klinischen Verlauf assoziiert. Es wird eine Dystrophie der Oligodendrozyten durch metabolische Defekte, weniger eine immunologische Ursache vermutet.

Insgesamt zeigte die Charakterisierung der Hirnbiopsien die zentrale Rolle der T-Lymphozyten mit Beteiligung von B-Zellen/Antikörpern, die sekundär entzündliche Reaktionen wie Makrophagenaktivierung nach sich zogen. Primär T-Zellen vom Typ  $T_H17$  sind Mediatoren der *Delayed-Type-Hypersensitivity* (DTH) oder Typ IV-Reaktion, einer Entzündungsreaktion die vor allem durch die Aktivierung von Makrophagen charakterisiert ist [12].

Lucchinetti und Kollegen konnten mit ihren Arbeiten auch zeigen, dass beim Großteil der MS-Patienten die Läsionen im ZNS mit einer Aktivierung des Immunsystems einhergehen. Es stellt sich die Frage, wie es zu einer Aktivierung dieser ZNS-spezifischen Immunreaktion bei MS-Patienten kommen kann und welche Mechanismen beim gesunden Menschen dafür sorgen, dass das ZNS nicht vom Immunsystem angegriffen wird. Diese Toleranzmechanismen werden im nächsten Kapitel erläutert.

### **1.2.2 Toleranzmechanismen**

Die dreidimensionale Struktur von Epitopen körpereigener oder körperfremder Proteine kann sehr ähnlich oder gleich sein. Auch kurze Peptide von körpereigenen und körperfremden Proteinen, welche nach Prozessierung auf antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, können die gleiche Sequenz haben [13]. Sowohl im Menschen als auch in der Maus zirkulieren myelin-spezifische autoreaktive Lymphozyten durch die Peripherie [14, 15]. Normalerweise werden diese naiven Lymphozyten nicht aktiviert und verbleiben in einem anergen Zustand. Die Anergie autoreaktiver Lymphozyten wird durch zentrale und periphere Toleranzmechanismen gewährleistet [13, 16, 17] .

Bei der Reifung von T-Zellen im Thymus entsteht die Spezifität des T-Zell-Rezeptors durch zufällige Verknüpfungen von Genen [18]. Dies führt zu einer extrem hohen Diversität der T-Zell-Spezifitäten und gewährleistet, dass das Immunsystem extrem viele verschiedene Antigene erkennen kann. Im Rahmen dieser T-Zell-Reifung entstehen jedoch auch T-Zell-Rezeptoren, die spezifisch für körpereigenes Gewebe sind. Um diese autoreaktiven T-Zellen auszuschalten, existieren im Thymus zentrale Toleranzmechanismen. Dabei werden im Thymus körpereigene Antigene aus den unterschiedlichen Organen exprimiert und den T-Zellen präsentiert. Wird eine T-Zelle von diesen körpereigenen Antigenen aktiviert, durchläuft sie Apoptose und wird damit aus dem Körper eliminiert [18]. Dasselbe gilt für B-

Zellen im Knochenmark. Der Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*) ist dafür verantwortlich, die vielen verschiedenen körpereigenen Antigene im Thymus zu exprimieren, und ein Defekt des AIRE-Gens führt zu autoimmunen Entzündungen und Schädigung von verschiedenen Geweben im Körper [13].

Generell sind naive junge Lymphozyten, die gerade erst ihren Antigenrezeptor exprimiert haben, besonders sensitiv für Inaktivierung, wenn Antigene an den Rezeptor binden, wohingegen reife Lymphozyten aktiviert werden, wenn sie auf ihr Antigen treffen [13].

Auch Myelinantigene wie MBP lösen im Thymus zentrale Toleranzmechanismen aus [19]. Besitzen T-Zellen jedoch eine geringe Affinität für das Autoantigen oder wird das Autoantigen nicht im Thymus oder Knochenmark exprimiert, können sie der zentralen Selektion entkommen und werden in die Peripherie entlassen [18]. Diese Zellen befinden sich dann in der Peripherie als naive T-Zellen, die ihr Antigen noch nicht gesehen haben und keine Zytokine sezernieren.

Neben der zentralen Toleranz gibt es die periphere Toleranz. Trifft dabei ein autoreaktiver Lymphozyt auf sein Antigen, ohne dass pro-inflammatorische Zytokine (wie IL-6 oder IL-12) oder Kostimulatoren (wie B7.1) des adaptiven Immunsystems vorhanden sind, führt der Kontakt mit dem Autoantigen zu einer Inaktivierung [13, 18]. Das inflammatorische Niveau, welches für eine Aktivierung der Lymphozyten nötig ist, wird häufig durch eine Infektion und die dadurch bedingte Aktivierung des angeborenen Immunsystems gebildet. Fehlt dieses inflammatorische Milieu, werden naive Lymphozyten, welche auf ihr Antigen treffen, inaktiviert oder in regulatorische Lymphozyten ausgereift [13]. Dieser Mechanismus verhindert also, dass körpereigenes Gewebe von den Lymphozyten angegriffen wird.

Ein weiterer peripherer Toleranzmechanismus ist die Konzentration des Antigens. Ist das Antigen konstant in einer hohen Konzentration verfügbar und wird von vielen verschiedenen Zelltypen im Körper exprimiert, löst das eine starke und konstante Aktivierung der Lymphozyten aus, sodass eine Toleranz gegen das Antigen induziert wird [13].



Diese Mechanismen verhindern in der Regel, dass eine Autoimmunerkrankung entsteht und ermöglichen dem Immunsystem, zwischen Fremdartigen und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden, ohne die Diversität des Immunsystems einzuschränken. Autoimmunerkrankungen wie MS scheinen multifaktoriell bedingt zu sein, wobei genetische Prädisposition, infektiöse Trigger und fehlerhafte Toleranzmechanismen im Zusammenspiel die Erkrankung auslösen können.

### 1.2.3 Pathomechanismus der MS

Der Entzündung des ZNS liegen drei wesentliche Ereignisse zugrunde:

Zunächst die Umwandlung von naiven potentiell autoreaktiven T-Zellen ohne Effektorfunktion in autoreaktive Effektor-Gedächtniszellen, welche Inflammation medieren können.

Zweitens die Differenzierung in einen  $T_H1$ - und einen  $T_H17$ -Zelltyp, welcher im Gegensatz zu  $T_H2$ -Zellen inflammatorische Zytokine wie  $IFN-\gamma$  sezerniert.

Und drittens die Infiltration dieser Zellen in das ZNS. Um initial in das ZNS zu gelangen, müssen die T-Zellen zunächst in der Peripherie aktiviert werden, da sie nur als Effektorzellen die nötigen Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules* = CAMs), Chemokinrezeptoren und Integrine exprimieren, die die Migration durch die Barrieren des ZNS ermöglichen [20].

Im Tiermodell der MS konnten die klinischen Symptome und die ZNS-Pathologie deutlich reduziert werden, indem das Integrin  $\alpha4\beta1$ , welches auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, inaktiviert wurde [21]. Auch beim Menschen konnte die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Natalizumab, einem  $\alpha4$ -Antagonisten, sehr gute Ergebnisse erzielen. So konnte in 90 % der behandelten Patienten die Ausbildung neuer Läsionen im ZNS verhindert werden und die Schubrate konnte um 50 % reduziert werden [22]. Nachteilig sind die ausgeprägten Nebenwirkungen wie Hypersensitivitätsreaktionen, ein erhöhtes Risiko

für die Ausbildung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie und allgemein ein erhöhtes Infektionsrisiko [23].

Wie es zu einer Aktivierung myelinreaktiver T-Zellen in der Peripherie kommt, bevor eine Inflammation des ZNS vorhanden ist, ist bisher nicht vollständig verstanden. Erklärungsmodelle umfassen das *molecular mimicry* und die *bystander activation*. Das *molecular mimicry* basiert darauf, dass es virale oder bakterielle Pathogene gibt, welche Moleküle exprimieren, die in ihrer Struktur Myelinproteinen ähneln. Diese kreuzreaktiven Moleküle aktivieren Lymphozyten, welche sekundär auch autoreaktiv gegen Myelinproteine gerichtet sind. *Bystander activation* beschreibt, dass es im Rahmen einer Entzündungsreaktion im Körper und damit verstärkter Antigenpräsentation zu einer vermehrten Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten kommt [24].

Das Parenchym des ZNS wird oft als immunprivilegiertes Organ beschrieben, unter anderem da im physiologischen Zustand die Blut-Hirn-Schranke mit den endothelialen Tight Junctions und die Blut-Liquor-Schranke die Migration von Lymphozyten und Makromolekülen in das ZNS limitiert [20]. Unter pathologischen Bedingungen, die bei der MS vorliegen, bricht die Blut-Hirn-Schranke zusammen und es kommt zu Zellinfiltrationen in das Gewebe. Histologisch zeigen die Kapillarwände bei MS-Patienten einen Defekt der Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke [25].

Es lassen sich drei unterschiedliche Migrationswege in das ZNS unterscheiden [3].

Zum einen können die Lymphozyten durch das Gefäßendothel in den Plexus choroideus migrieren, von dort in den Liquor und schließlich in das Parenchym des ZNS gelangen [20].

Zum anderen ist es möglich, dass die Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke von den Blutgefäßen direkt in das Hirnparenchym migrieren oder durch die Blut-Liquor-Schranke in den Subarachnoidalraum gelangen, von wo aus die Migration in das Parenchym erfolgt.

Die Reaktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erfolgt dann im Liquor oder im ZNS-Parenchym durch die Präsentation von Myelinantigenen auf MHC-II-Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen (APZ) [3]. Die daraufhin von den T-Zellen sezernierten Zytokine initiieren eine Entzündungsreaktion, die zum einen zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führt und zum anderen weitere inflammatorische Leukozyten rekrutiert und aktiviert [26]. Diese Initiierung der DTH durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist charakteristisch für die MS und findet sich auch im Mausmodell wieder. Unter den CD4<sup>+</sup> Zellen sind es insbesondere die T<sub>H</sub>17-Zellen, die die DTH auslösen [27]. Lange Zeit wurde angenommen, dass alleine T<sub>H</sub>1-Zellen die DTH auslösen können. Studien an IFN- $\gamma$ -Knockout-Mäusen zeigten jedoch klar, dass dies nicht der Fall ist [28].

Sowohl humane als auch murine Studien bringen myelin-spezifische Antikörper und die dadurch vermittelte Aktivierung des Komplementsystems und der Makrophagen in direkten Zusammenhang mit dem Verlust des Myelins [29-33]. Eine Inaktivierung des Komplementsystems konnte im Mausmodell das Einsetzen der klinischen Symptome verzögern, die neuroantigen-spezifische Immunantwort vermindern, und auch das histologische Bild zeigte eine reduzierte ZNS-Pathologie, wenn das Komplementsystem inaktiviert wurde [29, 34, 35]. Histologische Untersuchungen konnten zeigen, dass Gewebeschäden außerdem mit der Sekretion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffoxiden durch aktivierte Makrophagen assoziiert sind [36] und auch autoreaktive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen scheinen eine Rolle bei der Entstehung der ZNS-Pathologie zu spielen [37]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Antikörper die Erkrankung beschleunigen, jedoch alleine nicht pathogen sind, sondern nur in Kombination mit T-Zellen [38].

Lange Zeit wurde die Demyelinisierung als Hauptmerkmal der MS definiert. Neue Studien beschreiben jedoch einen Axonschaden schon im frühen Stadium der Erkrankung [39-42], und potentielle Autoantigene des Axons im Bereich der Ranvierschen Schnürringe wurden studiert [43, 44].

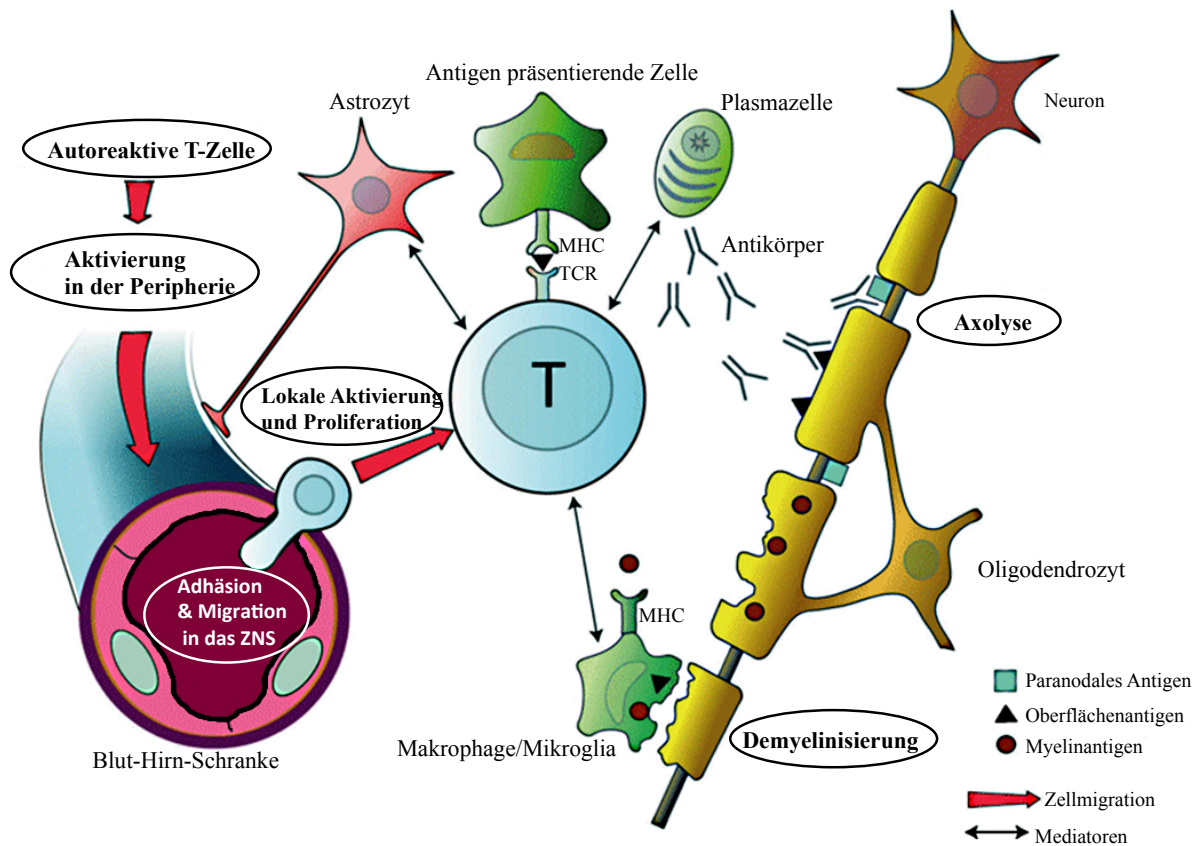


Abbildung 1 Schematische Abbildung der zell-vermittelten pathologischen Mechanismen im ZNS, die zu Inflammation, Demyelinisierung und Axonschaden führen. Modifiziert nach Gold und Wolinsky, 2011 [45], mit Genehmigung des Journals *Acta neurologica Scandinavica*.

### 1.3 Die Rolle der B-Zellen und Antikörper in der MS

Die Rolle der B-Zellen in der MS wurde lange Zeit unterschätzt. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die klassischen Tiermodelle der MS vorrangig T-Zell-abhängig sind [46, 47]. Dabei besitzen B-Zellen zentrale Eigenschaften, die bei der Entstehung und Chronifizierung der MS essentiell sind. B-Zellen präsentieren Antigene und können so T-Zellen aktivieren. Dabei sind sie um ein 10.000-faches effizienter als dendritische Zellen oder Makrophagen [48].

B-Zellen, die auf ihr Antigen treffen, differenzieren sich in den lymphatischen Organen in Plasmazellen und sezernieren Antikörper. Diese kurzlebigen Plasmazellen zirkulieren und sind auch in der Peripherie nachweisbar. Plasmazellen können in das Knochenmark

migrieren, wo sie auf essentielle Überlebensfaktoren wie CXCL12 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 12*), BAFF (*b cell-activating factor*) und APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) treffen und dort als langlebige Gedächtniszellen verbleiben [48]. Diese Zellen sezernieren kontinuierlich IgG-Antikörper und können so die Chronifizierung von Autoimmunerkrankungen bedingen [49]. Es gibt zahlreiche Studien, die zeigen, dass auch in MS-Patienten IgG-Antikörper an der Gewebeschädigung des ZNS beteiligt sind. So konnte durch Plasmapherese in MS-Patienten eine signifikante Verbesserung neurologischer Funktionen erzielt werden [50]. Es wird vermutet, dass MS-Patienten mit Läsionstyp II von der Plasmapherese profitieren, jedoch keine Patienten mit Läsionstyp I oder III [50]. Neben Plasmapherese konnten MS-Therapeutika, welche die B-Zellen beeinflussen, klinische Erfolge erzielen [51-53]. So wurde nach B-Zell-Depletion mit Rituximab, einem monoklonalen anti-CD20-Antikörper, eine reduzierte Schubrate und verminderte ZNS Inflammation [54] sowie eine Abnahme der Anzahl der B-Zellen im Liquor [55] bei bis zu 40 % der Patienten erzielt. In anderen Patientenkohorten konnten nach B-Zell-depletierenden Therapien kaum Effekte verzeichnet werden [53, 56, 57]. Glatirameracetat beeinflusst die Anzahl der ZNS-spezifischen B-Zellen im Blut in einer Untergruppe von MS-Patienten und die Länge der Glatirameracetat-Behandlung korrelierte mit einer reduzierten Schubrate [51].

Ein diagnostischer Marker der MS sind oligoklonale Banden im Liquor von MS-Patienten. Dabei handelt es sich zum Großteil um IgG-Antikörper, und die oligoklonalen Banden sind in 90 % der Patienten beim ersten klinischen Schub detektierbar [48]. Außerdem konnten klonal expandierte B-Zellen im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden [52], und die Anzahl und Größe der Läsionen im ZNS korrelierte mit der Anzahl der Plasmablasten und B-Zellen im Liquor [58]. In 79,1 % der MS-Patienten ließen sich ZNS-reaktive B-Zellen auch im Blut nachweisen [59], und eine aktive B-Zell-Immunität gegen das ZNS korrelierte mit dem Auftreten von klinischen Schüben [60].

In *in vitro* Experimenten konnte die ZNS-reaktive Pathogenität der Serum IgGs von MS-Patienten nachgewiesen werden [61]. Dafür wurde aus Rückenmarkspräparationen eine Zellkultur mit Axonen und Oligodendrozyten hergestellt, und diese Zellen wurden mit prozessiertem Serum von MS-Patienten und Kontrollen inkubiert. Dabei konnte ein antikörpervermittelter und komplementabhängiger Myelinschaden und Axonschaden in 30 % der MS-Patienten und in keiner Kontrolle nachgewiesen werden [61]. Dieser Zellschaden ging mit einer Akkumulierung und Bindung der Serum IgGs an die Oberfläche der Oligodendrozyten einher [61]. Diese Experimente bestätigen die oben beschriebenen Ergebnisse von Lucchinetti und Kollegen, die eine Antikörperablagerung und Komplementaktivierung in einem Großteil der Läsionen von MS-Patienten detektieren konnten [9, 62]. Auch in Folgestudien wurden in ZNS-Läsionen Antikörperakkumulierung, Komplementaktivierung und Myelinschaden nachgewiesen [62]. Die Antikörper, welche aus dem entzündeten Nervengewebe isoliert wurden, sind unter anderem gegen MOG [63] und MBP [64] gerichtet. In aktiven Läsionen werden außerdem Chemokine wie CXCL12, CXCL13 [65] und BAFF [52] exprimiert, welche die Rekrutierung und das Überleben von B-Zellen im ZNS mediiieren.

Des Weiteren bilden sich in den Meningen von MS-Patienten nach chronischer Inflammation lymphfollikelartige Strukturen, in welchen es zu einer Proliferation, klonalen Expansion [66, 67] und somatischen Hypermutation [52] von B-Zellen kommt.

Die klinischen Daten deuten zusammenfassend darauf hin, dass sich die MS in Untergruppen mit verschiedenen immunpathologischen Eigenschaften gliedern lässt. In einer dieser Untergruppen scheint eine besondere Beteiligung der B-Zellen an der ZNS-Pathologie vorzuliegen. Diese Patienten scheinen in hohem Maße von einer B-Zell-gerichteten Therapie zu profitieren [51, 54], die Läsionen im ZNS zeichnen sich durch Antikörperablagerung und B-Zell-Akkumulierung aus [9], und es lassen sich ZNS-spezifische B-Zellen im Blut dieser Patienten nachweisen [59, 60].

#### 1.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Den Pathomechanismus am Menschen zu untersuchen ist nur eingeschränkt möglich, daher wird hierfür häufig das Tiermodell der EAE genutzt. Bei der EAE handelt es sich um eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die sowohl klinisch als auch pathophysiologisch der MS ähnelt.

Eine der ersten Arbeiten zur EAE stammt von Rivers und Kollegen Anfang des 20. Jahrhunderts. Ursprünglich sollte die Wirkung eines Tollwut-Lebendimpfstoffes auf das ZNS von Affen untersucht werden. Die Studie beinhaltete eine Kontrollgruppe, die Injektionen mit nicht-infiziertem Hirnlysat aus Kaninchen erhielt. Überraschenderweise litt die Kontrollgruppe unter Lähmungen und Muskelschwäche und histologische Untersuchungen des ZNS zeigten perivaskuläre Zellinfiltrate und Demyelinisierung [68]. In darauf folgenden Studien konnte dieses Phänomen auch bei zahlreichen anderen Spezies ausgelöst werden [69]. Kurz darauf wurde von Wolf und Kollegen die Verbindung zu demyelinisierenden Erkrankungen beim Menschen gezogen [70].

Inzwischen hat sich die Induktion der EAE in Mäusen als experimentelles Modell für die MS etabliert. Dabei wird eine Immunreaktion gegen Myelinproteine ausgelöst, was zu einer entzündlichen Erkrankung des ZNS führt. Die EAE lässt sich auf drei Wegen auslösen: durch die aktive Immunisierung mit ZNS-Antigenen, den adoptiven Transfer von ZNS-reaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen [46] und in transgenen Tieren, welche myelin-spezifische T-Zell-Rezeptoren exprimieren [71]. Als enzephalitogene Antigene für die Immunisierung werden häufig Peptide von ZNS-Proteinen wie PLP, MBP oder MOG in Kombination mit komplettem Freund-Adjuvans und Pertussis-Toxin verwendet [72]. Um eine T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Polarisation der Immunreaktion gegen die ZNS-Antigene auszulösen, wird CFA genutzt [73]. Pertussis-Toxin wird zum einen eingesetzt, um die Blut-Hirn Schranke zu öffnen, zum anderen hilft es bei der Aktivierung der in sehr geringer Anzahl vorkommenden naiven ZNS-reaktiven T-Zellen. Insbesondere bei der Immunisierung mit MBP, welches im Thymus exprimiert wird

und so eine Anergie der MBP-spezifischen T-Zellen auslöst, wird Pertussis-Toxin eingesetzt, um in Kombination mit der Immunisierung mit MBP diese Zellen zu aktivieren [73].

Der klinische Verlauf der EAE zeichnet sich durch eine fortschreitende Parese der Extremitäten aus. Zunächst tritt eine Schwanzparese auf, gefolgt von einer Parese der Hinterläufe. Die fortgeschrittene EAE ist durch Parese der Hinter- und Vorderläufe charakterisiert [74]. Die klassischen histologischen Merkmale sind perivaskuläre Zellinfiltrationen unter anderem von Lymphozyten, Makrophagen und aktivierten Mikroglia assoziiert mit Demyelinisierung und Axonschaden [46].

Abhängig vom genetischen Hintergrund des Versuchstiers und dem verwendeten Antigen lassen sich unterschiedliche ZNS-Pathologien und damit zusammenhängend unterschiedliche klinische Verläufe (schubförmig oder chronisch) auslösen [18, 75].

Die Forschung am Tiermodell konnte zahlreiche Fortschritte auf dem Weg zur Entschlüsselung des Pathomechanismus der MS hervorbringen. Zum einen konnten potentielle Autoantigene der Myelinscheide identifiziert werden, zum anderen lassen sich die ZNS-Pathologie und der Einfluss verschiedener Effektorzellen des Immunsystems charakterisieren.

### **1.5 MP4-induzierte EAE**

Seit der Etablierung der EAE als Tiermodell der MS haben sich verschiedene EAE-Modelle durchgesetzt. Am häufigsten als Antigen verwendet werden MOG:35–55, PLP:139–151 oder MBP. Alle Modelle unterscheiden sich in ihrem histopathologischen Erscheinungsbild und im klinischen Verlauf. Die oben genannten Modelle sind vorrangig abhängig von T-Zellen und Makrophagen. Hjelmstrom und Kollegen konnten zeigen, dass B-Zell-defiziente Knockout-Mäuse, welche mit MOG:35-55 immunisiert wurden, eine ausgeprägte EAE mit einer Inflammation und Demyelinisierung des ZNS entwickelten. Diese ZNS-Pathologie war vergleichbar zu den immunisierten Wildtyp-Mäusen [76]. Auch die Injektion von ZNS-



reaktiven Antikörpern aus MOG:35-55-immunisierten Tieren in Wildtyp-Mäusen konnte keine EAE auslösen [77, 78]. Diese frühen Studien führten dazu, dass sich ein T-Zell-Paradigma bildete, und es wurde viele Jahre davon ausgegangen, dass sowohl in der EAE als auch in der MS die B-Zellen kaum zur ZNS Pathologie beitragen. Wie jedoch im vorigen Kapitel beschrieben, gibt es zahlreiche klinische und experimentelle Hinweise, dass in der Immunpathologie der MS die B-Zellen eine essentielle Rolle spielen und es bestand die Notwendigkeit, ein Tiermodell zu entwickeln, welches die MS in diesem Punkt besser widerspiegelt.

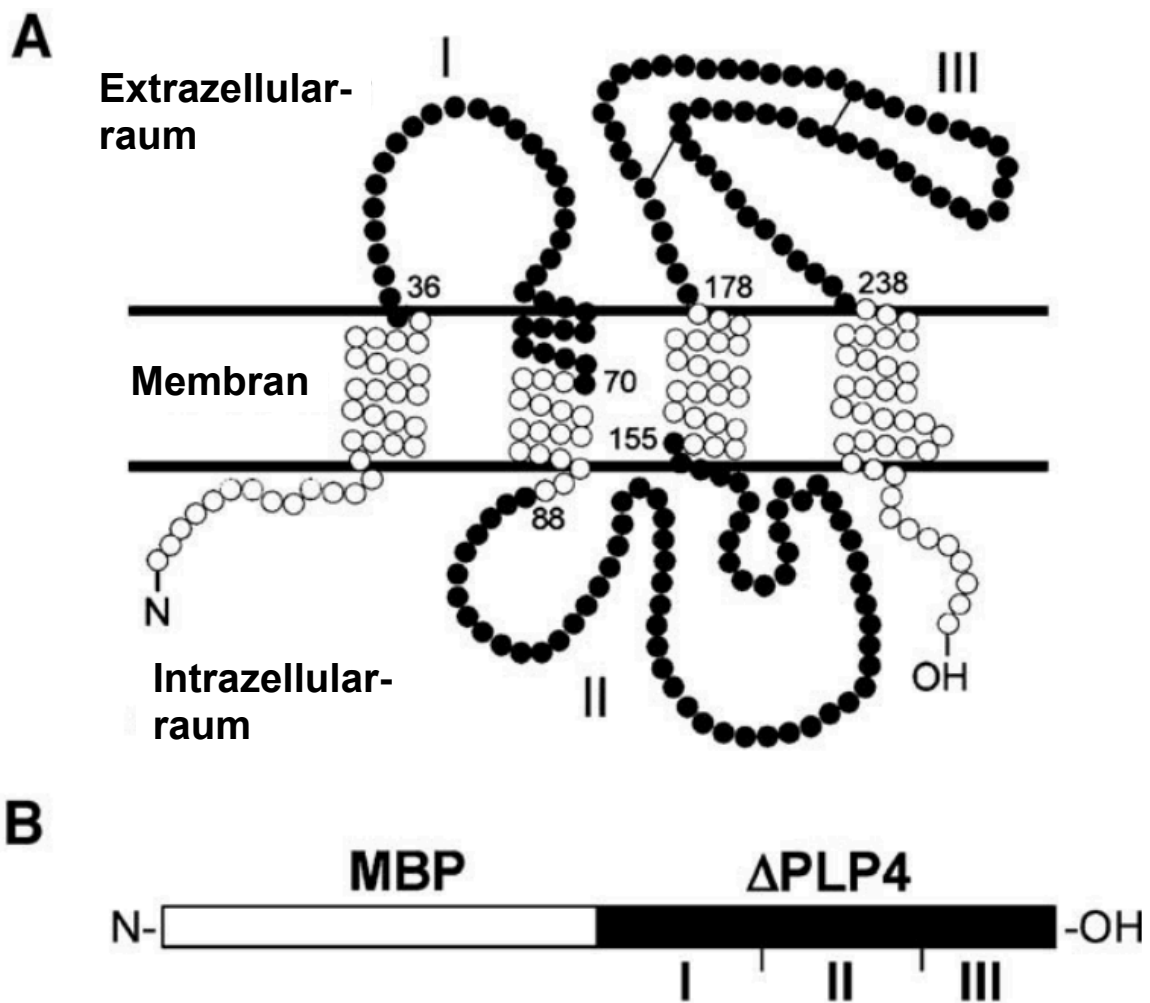
Erst in neueren Studien wurden dann EAE-Modelle eingeführt, die eine Beteiligung der B-Zellen implizieren. So konnten in der durch das humane MOG-induzierten EAE pathologische Antikörper nachgewiesen werden [79]. Der N-terminale Anteil des MOG befindet sich auf der Oberfläche der Myelinscheide, was das Protein gut erreichbar für Antikörper macht [73]. Auch die Immunisierung mit der 120-Aminosäure-langen extrazellulären Domäne des MOG-Proteins aus der Ratte führte zu einer B-Zell abhängigen EAE. B-Zell-defiziente Mäuse entwickelten in diesem Modell nur eine EAE, wenn sie nach der Immunisierung Injektionen mit MOG-spezifischen Antikörpern oder MOG-spezifischen B-Zellen erhielten [80].

Ein weiteres B-Zell-abhängiges Modell ist die spontane EAE, welche sich in transgenen Tieren entwickelt, die einen MOG:92-106-spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren [71]. Die SJL/J-Tiere zeigten einen schubförmigen Verlauf mit Bildung von MOG-spezifischen Antikörpern und einer Ablagerung im ZNS von Antikörpern und Infiltration von B-Zellen. Nach B-Zell-Depletion entwickelten diese Tiere keine EAE [71].

Es konnte also gezeigt werden, dass MOG-spezifische B-Zellen und Antikörper in der EAE pathogen sind und essentiell zu Inflammation und Demyelinisierung im ZNS beitragen. Es stellte sich dann die Frage, ob auch eine B-Zell-Reaktion gegen andere Myelinproteine eine

EAE auslösen kann. In diesem Zusammenhang wurde von Kuerten und Kollegen das MP4 Modell eingeführt und intensiv charakterisiert [29, 73, 81-83].

MP4 ist ein Fusionsprotein aus den drei hydrophilen Domänen des PLP (wovon zwei Domänen extrazellulär sind), gekoppelt an die 21.5 kD Isoform des MBP und es wurde ursprünglich als MS-Therapeutikum getestet [73, 84].



**Abbildung 2 Struktur des Fusionsproteins MP4 bestehend aus MBP und PLP.** Bei PLP handelt es sich um ein Transmembranprotein bestehend aus zwei extrazellulären (I und III) und einer intrazellulären (II) Domäne sowie vier Transmembran-Domänen (A). Die drei hydrophilen PLP-Domänen wurden fusioniert und verknüpft mit der 21.5-kD-Isoform des humanen MBP (B). Aus: Kuerten et al., 2006 [73] mit Genehmigung des *Journal of neuroimmunology*.

Die MP4-induzierte EAE zeichnet sich durch einen chronischen Verlauf aus, bei dem die mit Lähmungen an Tag 10-12 nach Immunisierung einsetzen. Der klinische Score bleibt nach dem Höhepunkt der Lähmung weitestgehend konstant. Nach Immunisierung kommt es zu einer CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort, welche T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zytokine generiert. Bei der MP4-induzierten EAE handelt es sich um ein B-Zell- und Antikörper-abhängiges Modell, da B-Zell-defiziente *muMT*- und J<sub>H</sub>T-Mäuse keine EAE entwickelten. Ein Transfer von MP4-reaktivem Serum löste bei diesen Mäusen jedoch eine vollständig ausgeprägte EAE aus [81]. Außerdem zeigten immunhistologische Untersuchungen an Hirnschnitten, dass die Demyelinisierung mit der Ablagerung von Antikörpern in der MP4-induzierten EAE assoziiert war. Dabei spielt das Komplementsystem eine wesentliche Rolle bei der pathologischen Funktion dieser Antikörper. Entsprechend führte eine Eliminierung des Komplementsystems in den Tieren zu einer signifikant verringerten Erkrankungsinzidenz [29].

Im chronischen Verlauf bilden sich im ZNS der Mäuse tertiäre lymphatische Organe, die sich durch Aggregation von B-Zellen auszeichnen sowie durch die Präsenz von Markern für lymphatisches Gewebe wie hochendotheliale Venolen, retikulären Fasern, follikulär dendritische Zellen, Plasmazellen und Marker für Proliferation. In diesen Follikeln findet eine intrathekale Ausweitung der myelin-spezifischen T-Zell-Antwort auf MOG und eine Ausweitung der B-Zell-Antwort auf neuronale Antigene statt [85, 86].

Die Gemeinsamkeit der verschiedenen EAE-Modelle sind Inflammation, Demyelinisierung, und Axonschaden ausschließlich im ZNS. Es gibt nur vereinzelte Studien, die eine Pathologie des peripheren Nervensystems in der EAE beschreiben [87].

Der Großteil der EAE-Studien schließt eine Beteiligung des peripheren Nervensystems aus [46, 47]. Aus immunologischer Sicht macht dies wenig Sinn, denn myelinisierende Schwann-Zellen in der Peripherie exprimieren ebenfalls Myelinantigene wie MAG [88], MBP [89] oder PLP [90], und sogar im nicht-myelinisierten Nervengewebe des Darms werden MBP und PLP

von enterischen Gliazellen exprimiert [91]. Tabelle 1 zeigt die Myelinzusammensetzung im PNS und ZNS. Viele Proteine werden sowohl vom Myelin des ZNS als auch vom Myelin des PNS exprimiert, wobei sich der Anteil der einzelnen Proteine am Gesamtmyelin unterscheidet. So besteht das Myelin im ZNS zum Großteil aus PLP, in der Peripherie macht es weniger als 1% aus [92-94]. Tabelle 2 zeigt die Expression der Myelinproteine im ENS.

Myelinprotein	PNS-Myelin	ZNS-Myelin
P0	21%	nicht nachgewiesen
PLP	0,2%	17%
Periaxin	16%	nicht nachgewiesen
MBP	8%	8%
PDE	0,5%	4%
MOG	nicht nachgewiesen	1%
MAG	0,3%	1%
Sirtuin 2	nicht nachgewiesen	1%
Claudin 11	nicht nachgewiesen	1%
Fettsäuresynthase	1%	nicht nachgewiesen
<i>Band 4.1-like Protein G</i>	1%	nicht nachgewiesen
Andere	52%	67%

**Tabelle 1 Myelinzusammensetzung im PNS und ZNS nach Nave und Werner (2014) [94].** Abkürzungen: Enterisches Nervensystem (ENS), Myelin-Assoziiertes-Glykoprotein (MAG), Myelin-Basische-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Myelinprotein 0 (P0), *Cyclic nucleotide phosphodiesterase* (PDE), Proteolipid-Protein (PLP), Peripheres Nervensystem (PNS), Zentrales Nervensystem (ZNS).

Myelinprotein	Enterische Gliazellen
P0	nachgewiesen, nicht quantifiziert [91]
PLP	ca. 25-50% [91]
Periaxin	nachgewiesen, nicht quantifiziert [91]
MBP	nachgewiesen, nicht quantifiziert [91]
<i>Cyclic nucleotide phosphodiesterase</i>	nachgewiesen, nicht quantifiziert [91]
MOG	nicht nachgewiesen [91]
MAG	nicht nachgewiesen [91]
Fettsäuresynthase	nachgewiesen, nicht quantifiziert [95]
S100β	76-85% [91]
GFAP	35-54% [91]
Sox 10	74,4% [96]

**Tabelle 2 Expression der Myelinproteine im ENS.** Dargestellt ist die Anzahl der myelinprotein-exprimierenden Gliazellen in Prozent von der Gesamtanzahl der Gliazellen. Abkürzungen: Enterisches Nervensystem (ENS), Myelin-Assoziiertes-Glykoprotein (MAG), Myelin-Basische-Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Myelinprotein 0 (P0), Proteolipid-Protein (PLP).

Man sollte also annehmen, dass die myelin-reaktiven T-Zellen auch das periphere bzw. enterische Nervensystem angreifen können. Außerdem ist bekannt, dass sich die Immunantwort in der EAE ausweitet und Myelinantigene einschließt, die nicht für die Immunisierung verwendet wurden [97].

### 1.5.1 Philosophische Einordnung

In der chinesischen und japanischen Tradition wird dem Bauchraum eine besondere Stellung zugesprochen. Der Bauch repräsentiert zum einen das anatomische Zentrum unseres Körpers

und den Sitz lebenswichtiger Organe. Zum anderen befindet sich dort das Hara, das „vitale Zentrum“ des Menschen [98]. Dem Hara kann kein einzelnes anatomisches Korrelat zugeordnet werden. Es umfasst den kompletten Bauchraum vom Beckenboden bis zum Diaphragma.

Das Hara wurde zum ersten Mal von Nan Jing ca. 300 vor Christus beschrieben als das energetische Zentrum eines Menschen, die Quelle der Lebensenergie, der Ort, aus dem das Leben entsteht.

Die Annahme, dass sich das Zentrum des Menschen, also das, was ihn ausmacht, sein Kern, im Körper und nicht im Kopf befindet, unterscheidet sich grundlegend von dem Menschenbild unserer abendländischen Kultur. Die abendländische Kultur wurde stark geprägt von der griechischen Philosophie, dem anschließenden Aufstieg des Christentums und schließlich dem Zeitalter der Aufklärung. Seit dem Zeitalter des Barock zählt die Frage nach der Trennung von Leib und Seele zu einer der Grundfragen der Philosophie. Über Jahrhunderte ging man davon aus, dass die Seele völlig getrennt vom Körper existiert. Beginnend mit Descartes („Ich denke also bin ich“) über Spinoza und Leibniz war der Trend dieser Zeit, den Menschen als ein rein rationales Wesen zu beschreiben und aus der Vorherrschaft der Vernunft eine Ethik und Gottesbeweise abzuleiten [99]. Diese Sicht ist durch neurobiologische Erkenntnisse zwar aufgelockert worden, dennoch wird in unserer Kultur weiterhin weitestgehend der Verstand als Zentrum des Menschen definiert. Zahlreiche Probleme der westlichen Zivilisation fußen auf der Entfremdung vom Körper. Bewegungsmangel, unausgewogene Ernährung und Rauchen zählen zu den Hauptrisikofaktoren für Herz-Kreislaufkrankungen, welche zu den häufigsten Erkrankungen unserer Zivilisation gehören und in der EU jährliche Ausgaben von 169 Milliarden Euro verursachen [100, 101].

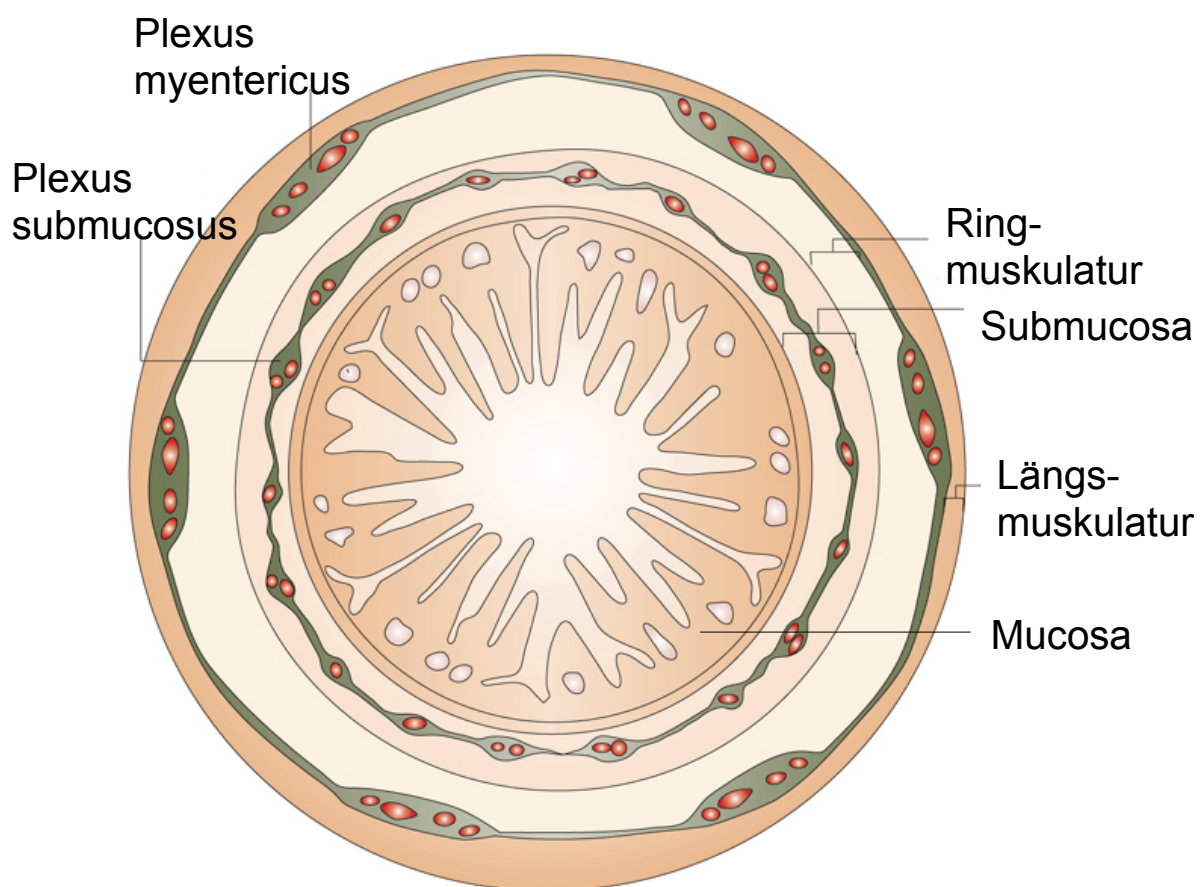
Die frühen chinesischen Philosophen gingen davon aus, dass sich die Seele über den Körper manifestiert. Dabei ähneln sich der Konfuzianismus, Taoismus und Mohismus in dem Streben

nach der rechten Mitte zwischen den Extremen und Gegensätzlichkeiten und dem Bestreben nach einer Synthese der Gegensätze in einer höheren Einheit [99]. Insbesondere Lao Tzu begründete eine Philosophie, die den Menschen in seiner Spontaneität und Natürlichkeit unterstützt hat, ohne zu sehr einzugreifen in den natürlichen Lauf der Dinge. Durch indische Einflüsse hat sich dann der Buddhismus entwickelt und eine jahrhundertalte Meditationskultur begründet.

Kiiko Matsumoto beschreibt den Bauch und das Gehirn als zwei Zentren, die eine Manifestation desselben Phänomens darstellen [98]. Dieses Konzept ist durchaus haltbar im Kontext anatomischer und neurobiologischer Erkenntnisse. In der Wand des gastrointestinalen Trakts befindet sich ein ausgedehntes ENS, welches mehr Neurone als das Rückenmark besitzt und auch als Bauchhirn bezeichnet werden kann. Dabei zeichnet sich das ENS im Vergleich zum peripheren Nervensystem durch seine Größe und die komplexe Verschaltung aus. Es ist durch Reflexkreise autonom, jedoch existieren zahlreiche sensorische Fasern, die das ENS mit dem ZNS verknüpfen. Eine Störung dieser Verbindung bzw. Funktionsstörungen des ENS werden mit einigen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [102]. Kinder mit Autismus-Spektrum-Störung leiden durchschnittlich 3-4 mal häufiger unter gastrointestinalen Symptomen als Kinder der Kontrollgruppe [103], und einige Gene, die bei Autismus-Patienten Mutationen aufweisen, sind an der Neurogenese des ENS beteiligt [104, 105]. Morbus Parkinson zeichnet sich durch die Bildung von Lewy-Körperchen in Neuronen des ZNS und des ENS aus [106], was einhergeht mit neurologischen und gastrointestinalen Funktionsstörungen [107]. Und auch bei Morbus-Alzheimer-Patienten gibt es erste Hinweise für eine Akkumulierung des  $\beta$ -Amyloid in Neuronen des ENS [108, 109]. Ebenso werden psychiatrische Erkrankungen wie die klinische Depressionen mit einem beeinträchtigten Input des ENS zum ZNS in Verbindung gebracht [110].

### 1.5.2 Neurone des ENS

Das ENS beinhaltet Neurone und Gliazellen und lässt sich in den Plexus submucosus in der Tunica mucosa und den Plexus myentericus zwischen den beiden Schichten der Tunica muscularis unterteilen (Abbildung 3). Der Plexus myentericus zieht sich netzartig längs durch die Tunica muscularis in Form von zahlreichen Ganglien, die über Nervenfasern verbunden sind [111].



Nature Reviews | Neuroscience

**Abbildung 3 Schematische Zeichnung eines Dünndarm-Querschnitts.** Der Darm lässt sich unterteilen von außen nach innen in eine Tunica muscularis, eine Tunica submucosa und eine Tunica mucosa. Der Plexus myentericus befindet sich in der Tunica muscularis. Modifiziert nach Heanue et al., 2007 [112] mit Genehmigung des Journals *Nature Reviews Neuroscience*.



Es befinden sich motorische, sensorische und Interneurone im ENS. Im Plexus myentericus befinden sich außerdem die für die Darmmotorik essentiellen interstitiellen Zellen von Cajal. Diese fibroblastenähnlichen Zellen sind keine Neurone, sondern modifizierte Muskelzellen mesenchymalen Ursprungs und fungieren als autonome Schrittmacher. Sie aktivieren direkt die Muskelzellen in der Darmwand. Bei den sensorischen Neuronen unterscheidet man zwischen intrinsischen primären afferenten Neuronen (IPAN), intrinsischen sensorischen Neuronen und enterischen sensorischen Neuronen [111]. IPANs projizieren zu Interneuronen und Motoneuronen innerhalb des ENS und der Mukosa und leiten Informationen über den physikalischen Zustand des Darms (z.B. Spannung der Darmwand oder physikalische Einwirkung auf die Mukosa) und über die chemische Zusammensetzung des Darminhalts weiter [113]. Durch intrinsische Feedback-Mechanismen wird dadurch die Peristaltik, Durchblutung und Enzymsekretion im Gastrointestinaltrakt angepasst [114].

Die Peristaltik im Dünndarm ist hauptsächlich autonom über intrinsische Reflexkreise gesteuert, wohingegen die Muskelkontraktionen im Ösophagus weitestgehend vom zentralen Nervensystem (neuronalen Schaltkreise in der Medulla oblongata) kontrolliert werden [115]. Die ersten experimentellen Arbeiten zur funktionellen Charakterisierung des enterischen Nervensystems im Dünndarm stammten von Thomas und Kuntz (1926). Die Autoren konnten zum ersten Mal zeigen, dass das ENS autonom fungiert und auch nach Durchtrennen der zentralnervösen Eingänge die Peristaltik aufrecht erhalten kann [116]. Das ENS steht jedoch unter dem Einfluss des Sympathikus und Parasympathikus. Ein Input des sympathischen Nervensystems kann die intrinsischen Reflexkreise inhibitorisch beeinflussen und so die Peristaltik verlangsamen und die Sphinkter kontrahieren [114].

Sensible Fasern verbinden das ENS mit dem ZNS und auch der Nervus vagus leitet sensible Informationen aus dem Darm an das ZNS. Außerdem führen zahlreiche afferente Fasern durch den N. vagus und über spinale afferente Wege (Grenzstrang) zum gastrointestinalen

Trakt [117]. Es handelt sich also um eine extensive reziproke Verbindung zwischen ZNS und ENS.

### 1.5.3 Gliazellen des ENS

Neben den Neuronen gibt es im ENS zwei Gliazelltypen: die nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen und die enterischen Gliazellen. Die enterischen Gliazellen ähneln den Astrozyten im ZNS und sind nach neusten Erkenntnissen aktiv involviert in die Kontrolle der gastrointestinalen Funktionen [118]. Die meisten enterischen Gliazellen befinden sich in den Ganglien des ENS. Dort sind sie eng gepackt und ummanteln die Neurone [119]. Es wurden jedoch auch enterische Gliazellen in der Mukosa gefunden, wo die Ausläufer bis zu den Epithelzellen reichen und dort an der Integrität des Darms mitwirken. Dieser Mechanismus scheint über den Einfluss des ENS auf die Expression des mit den Tight Junction assoziierten Proteins Zonula occludens 1 (ZO-1) reguliert zu sein [120].

Die enterischen Gliazellen exprimieren das saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*; GFAP), dies ist jedoch ein dynamischer Prozess. Das GFAP-Level ist extrem heterogen und immunhistochemische GFAP-Färbungen am Darm weisen durch das dynamisch regulierte GFAP-Level eine hohe Variabilität auf [121]. Es konnte gezeigt werden, dass enterische Gliazellen ausgelöst durch Inflammation oder Nervenschädigung die GFAP-Expression erhöhen können und, dass das GFAP-Expressionslevel die Aktivität der Zelle repräsentiert [119]. Insbesondere Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), *Tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), und Lipopolysaccharide (LPS) führen zu einem Anstieg des GFAP-Levels [122].

Außerdem können enterische Gliazellen als Antwort auf chronische Inflammation proliferieren und Glianarben bilden [122, 123]. Bradley und Kollegen konnten in einem

Tiermodell zeigen, dass mit BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) markierte enterische Gliazellen im Plexus myentericus nach Auslösen einer Inflammation im Darm proliferieren und sich sieben Tage nach Auslösen der Inflammation signifikant mehr Gliazellen im Plexus myentericus befinden. Diese Ergebnisse konnten in Zellkulturexperimenten bestätigt werden [122]. Bush und Kollegen konnten zeigen, dass ein Untergang von enterischen Gliazellen zu einer Neurodegeneration führt [124]. Dafür wurden transgene Mäuse generiert, bei welchen GFAP-exprimierende Zellen ausgeschaltet werden konnten. Daraufhin bildeten sich insbesondere im Dünndarm Einblutungen, Entzündungen, Fibrose und mukosale Hyperplasie aus. Das Nervengewebe im Darm war zu 31 % reduziert im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Daten zeigen eindrucksvoll, wie essentiell die enterischen Gliazellen an der Integrität des Darms und dem Schutz der Neurone beteiligt sind. Diese Funktion wird nach Rühl [119] im wesentlichen durch drei Mechanismen aufrecht erhalten: 1) durch mechanische Stabilisierung des Plexus. Insbesondere der Plexus myentericus zwischen den Muskelschichten ist extremen mechanischen Einflüssen ausgesetzt. Das GFAP in den enterischen Gliazellen stabilisiert das ENS und gibt ihm strukturelle Stabilität. 2) Durch die Sezernierung von neurotrophen Botenstoffen wie dem *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) [125]. 3) Durch homöostatische Funktion und die Bereitstellung von Metaboliten. Die Aktivierung von Neuronen führt zu einer Anreicherung von Kationen im extrazellulären Spalt. Kationen wie Kalium müssen jedoch streng reguliert und im Gewebe reduziert werden, um das Membranpotential und die Signalweiterleitung in den Neuronen zu gewährleisten. Enterische Gliazellen tragen durch die Aufnahme von Kationen und die Bereitstellung von Glukose dazu bei [126].

Außerdem konnte ein GABA-Transporter in der Plasmamembran von enterischen Gliazellen des Plexus myentericus immunhistochemisch nachgewiesen werden [127]. Enterische Gliazellen scheinen daher auch am Abbau von Neurotransmittern und dem Beseitigen von GABA aus dem extrazellulären Raum beteiligt zu sein. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass

enterische Gliazellen direkt auf Neurotransmitter reagieren, was zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumlevel führt [128].

Das Nervengewebe im Darm wird von Kapillaren versorgt, die sich außerhalb der Plexus befinden. Diese Kapillaren bilden eine kontinuierliche geschlossene Endothelschicht und sind umzogen von den Fortläufern der enterischen Gliazellen. Gershon und Busztajn konnten mithilfe von intravenös injiziertem Evans Blue nachweisen, dass es eine Blut-Plexus myentericus-Barriere gibt, die eine Diffusion von Makromolekülen in das Nervengewebe verhindert [129].

Enterische Gliazellen haben außerdem einen direkten Einfluss auf Immunreaktionen im Darm. In einer umfangreichen Arbeit von Hollenbach und Kollegen konnte gezeigt werden, dass enterische Gliazellen phagozytotische Eigenschaften besitzen und APZ sind [130]. Stimulation von enterischen Gliazellen mit Interferon- $\gamma$  führte zu einer Expression von MHC-II Molekülen und ICAM-I auf der Zelloberfläche. Dieselben Autoren konnten zeigen, dass es nach Kultivierung von enterischen Gliazellen mit Ovalbumin (OVA) und anschließender Inkubation dieser enterischen Gliazellen mit OVA-spezifischen T-Zellen zu einer Aktivierung der T-Zellen kommt. Es konnte außerdem eine phagozytotische Aufnahme von FITC-Dextran in die enterischen Gliazellen demonstriert werden.

Für die Transformation von ruhenden enterischen Gliazellen in Zellen mit antigenpräsentierenden Eigenschaften scheint ein inflammatorischer Trigger nötig zu sein. Auch im Darm von Patienten mit Morbus Crohn konnte die Expression von MHC-II auf enterischen Gliazellen gezeigt werden [131].

## **1.6 Das intestinale Immunsystem**

Das gastrointestinale Immunsystem ist täglich einer extrem hohen Anzahl von Antigenen ausgesetzt. Diese umfassen Antigene aus der Nahrung sowie Pathogene, die oral aufgenommen werden. Zusätzlich ist der Dünndarm mit einer Vielzahl von verschiedenen

Mikrobiota besiedelt, die je nach Ernährungsgewohnheiten und Umweltfaktoren variieren können. Diese Variabilität der Antigene stellt eine große Herausforderung für das Immunsystem dar. Zum einen besteht die Herausforderung darin, zwischen pathogenen Bakterien und Viren und der physiologischen Darmflora zu unterscheiden. Zum anderen bietet die Präsenz dieser Vielzahl von Antigenen eine Schwachstelle für Kreuzreaktivitäten.

Das gastrointestinal-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) umfasst die Peyer-Plaques, die Lymphozyten in der Lamina propria und die intraepithelialen Lymphozyten. Bei den Peyer-Plaques handelt es sich um lymphatische Organe, die in der Tunica mucosa lokalisiert sind. Wie andere periphere lymphatische Organe bestehen Peyer-Plaques aus einer B-Zell-Zone (Keimzentrum) in der Rinde und einer T-Zell-Zone sowie hochendothelialen Venolen und Lymphgefäßen [132].

Die Lymphozyten in der Lamina propria sind lose im Parenchym verteilt und bei einem Großteil der Zellen handelt es sich um IgA-sezernierende B-Zellen sowie um  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen. Das von den B-Zellen sezernierte IgA sammelt sich auf dem Epithelium und verhindert so die Anhaftung von Bakterien auf der Oberfläche des Epithels [133].

Bei den intraepithelialen Lymphozyten handelt es sich hauptsächlich um  $CD8^+$  T-Zellen, die sich zwischen den Epithelzellen befinden und dort in aktivierter Form vorliegen, auch wenn keine akute Infektion mit Pathogenen vorhanden ist [13].

Funktionell wird eine Immunreaktion des Darms in den Peyer-Plaques induziert, wohingegen die Lamina propria und das Epithel vorrangig Effektorzellen beinhalten.

Neben den immunologischen Mechanismen bietet die epitheliale Barriere im Darm einen primären Schutz vor Pathogenen. Diese Barriere umfasst zum einen die Tight junctions zwischen den Epithelzellen. Zum anderen sorgen die M-Zellen für einen gezielten Transfer von luminalen Antigenen in das Darmparenchym. M-Zellen befinden sich im Follikel-

assoziierten Teil des Epithels und transportieren so die Antigene direkt zu den Peyer-Plaques [134]. Ein dritter Mechanismus umfasst die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, die ihre Fortläufer zwischen die Epithelzellen senden ohne die Tight junctions zu beeinflussen und so lumenale Antigene phagozytieren. Über die Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen können die dendritischen Zellen dann CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. Die dendritischen Zellen sind essentiell an den intestinalen Toleranzmechanismen beteiligt. Antigene aus Nahrungsmitteln und mikrobielle Antigene stimulieren in den dendritischen Zellen die Expression von CD103, welches insbesondere regulatorische T-Zellen aktiviert [135]. Eine Infektion mit Pathogenen, die das Epithel penetrieren, führt zu einer Expression von IL-12 und Kostimulatoren, was insbesondere T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen aktiviert [136]. Außerdem induzieren Antigene der Mikrobiota und aus der Nahrung die Aktivierung von IgA-produzierenden B-Zellen [133].

Aktiviert Lymphozyten verlassen die Peyer-Plaques über Lymphgefäße und migrieren dann über die mesenterialen Lymphknoten in den Blutkreislauf. Über kleine Blutgefäße wandern diese Lymphozyten dann wieder zurück in die Lamina propria, wo sie als Effektorzellen verbleiben. Naive Lymphozyten, die im GALT aktiviert werden, exprimieren darm-spezifische Homingrezeptoren wie  $\alpha 4\beta 7$ -Rezeptoren und CCR9 [137]. Über diese Rezeptoren migrieren und verbleiben diese Lymphozyten nach der Blutzirkulation in der MAdCAM-exprimierenden Lamina propria [138].

Die im Darm aktivierten Lymphozyten migrieren also durch die gesamte Peripherie, bevor sie als Effektorzellen wieder im Darm landen. Dies verdeutlicht, wie wichtig es ist, dass die Immunaktivierung im Darm streng reguliert ist. Die intestinalen Lymphozyten sind einer extrem hohen Anzahl von Antigenen ausgesetzt, und eine Fehlregulation könnte (z.B. über Kreuzreaktivitäten) drastische Folgen für den ganzen Organismus haben.

In der Lamina propria befinden sich eine hohe Anzahl von Effektorzellen wie T<sub>H</sub>17-, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sowie ein hoher Spiegel von inflammatorischen Zytokinen. Dieser konstante Zustand von Inflammation wird balanciert durch die Präsenz von IL-10-exprimierenden regulatorischen T-Zellen. Eine Störung dieser Balance und ein unkontrollierter Anstieg der inflammatorischen Effektorzellen führt zu inflammatorischen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa [13].

### **1.7 Die Rolle der Mikrobiota im Darm bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen**

Eine Studie von Berer und Kollegen aus dem Jahr 2011 zeigte eindrucksvoll den Einfluss der Mikrobiota im Darm auf die Entstehung der EAE und löste eine Welle von Forschungsansätzen aus, die sich mit dem Mikrobiom im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen befasst haben.

Berer und Kollegen untersuchten ein spontanes, schubförmig verlaufendes Mausmodell, in welchem MOG T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse genutzt wurden. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogen-freien (SPF) oder unter völlig keimfreien Konditionen gehalten. Dabei entwickelten die Mäuse unter keimfreien Bedingungen keine EAE, im Gegensatz zu den SPF-Tieren, von denen 80 % eine spontane EAE entwickelten. Wurde den keimfreien Tieren eine konventionelle Darmflora zugeführt, entwickelten 80 % dieser Tiere 30 Tage nach der Behandlung eine EAE [139].

Keimfreie Tiere zeichneten sich durch eine Defizienz von T<sub>H</sub>17-Zellen in der Lamina propria und den Peyer-Plaques im Vergleich zu den SPF-Tieren aus und die MOG-spezifischen T-Zellen der Milz zeigten eine reduzierte Zytokinsekretion nach Stimulation. Außerdem waren keine MOG-spezifischen Serumantikörper in den keimfreien Tieren nachweisbar. MOG-spezifische Antikörper konnten jedoch nach Kolonisation mit konventioneller Darmflora induziert werden und waren dann vergleichbar mit den Titern der SPF-Tiere.

Außerdem kam es bei den keimfreien Tieren zu einer reduzierten Rekrutierung von B-Zellen aus den zervikalen Lymphknoten [139].

Diese Ergebnisse konnten in anderen EAE-Modellen, wie der EAE-Induktion durch Immunisierung mit dem MOG:35-55 Peptid, bestätigt werden [140]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass insbesondere die dendritischen Zellen in keimfreien Tieren eine reduzierte Fähigkeit aufweisen, autoreaktive T-Zellen zu aktivieren. Ebenso war in keimfreien Tieren die Anzahl regulatorischer FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen im GALT erhöht. Dabei scheinen die segmentierten filamentösen Bakterien (SFB) in der Darmflora eine besondere Rolle bei der Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten zu spielen [140]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch erzielt werden, wenn die Darmflora durch Breitbandantibiose eliminiert wurde [141].

Neben den Darmbakterien, die den Autoimmunprozess verstärken, scheint es auch Bestandteile der Darmflora zu geben, die einen protektiven Einfluss auf die Entstehung der EAE haben. Dazu gehören *Candida kefyr* und *Lactococcus lactis*. Die Behandlung mit diesen Mikrobiota führte zu einer Reduktion der EAE-Inzidenz nach MOG:35-55-Peptid-Immunisierung und einem reduzierten inflammatorischen Milieu im Darm [142, 143]. Außerdem kann das Polysaccharid A (PSA), welches im Darm von *Bacteroides fragilis* sezerniert wird, die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Darm erhöhen und den klinischen Verlauf der EAE mildern [144]. In Zellkulturexperimenten mit humanen PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) konnte eine stimulierende Wirkung von PSA auf FoxP3<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden [145].

Neben der initialen Studie von Berer und Kollegen gibt es auch Arbeiten, die gegenteilige Ergebnisse zeigen. Eine Studie von Arndt und Kollegen hat gezeigt, dass Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen mit einer erhöhten Keimbelastung gehalten werden, eine reduzierte EAE-Inzidenz nach MP4-Immunisierung zeigten. Außerdem konnte eine reduzierte IgG-Sekretion in den Peyer-Plaques dieser Tiere gezeigt werden, die Keimzentren im Darm waren verkleinert und die MP4-spezifische T<sub>H</sub>17-Antwort in der Milz war reduziert [83].



Den Effekt der Darmflora auf die Entstehung der MS im Patienten zu untersuchen ist nur sehr eingeschränkt möglich. Zwar gibt es Studien, die eine veränderte Darmflora in MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen [146], trotzdem müssen diese Studien mit Vorbehalten gesehen werden, da kein kausaler Zusammenhang gezogen werden kann und die Darmflora natürlich stark durch die Ernährung und Umweltfaktoren beeinflusst wird. Insgesamt konnte bereits demonstriert werden, dass auch die Ernährung einen starken Effekt auf den Verlauf der MS hat. Insbesondere kurzkettige Fettsäuren und eine ketogene Ernährung scheinen protektive Effekte zu haben [147]. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Zusammensetzung der Darmbakterien in 34 Zwillingspaaren untersucht, von denen jeweils bei einem Zwilling eine klinisch definierte MS diagnostiziert wurde und der andere Zwilling eine gesunde Kontrolle war [148]. Es konnte bei den unbehandelten MS-Patienten eine veränderte Zusammensetzung der Darmflora im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden. In einem weiteren Ansatz wurde eine Stuhltransplantation von MS-Patienten und gesunden Kontrollen in transgene Mäuse, die MOG-spezifische T-Zell-Rezeptoren exprimieren, durchgeführt. Dabei zeigten die Mäuse, die den Stuhl von MS-Patienten erhielten eine deutlich höhere EAE-Inzidenz sowie eine verminderte IL-10-Produktion im Vergleich zu den Mäusen, die den Stuhl von den gesunden Kontrollen erhielten [148].

Berer und Kollegen stellen sich ein Zwei-Phasen-Szenario bei der Entstehung der EAE vor, welches im Darm startet. Zunächst werden ZNS-autoreaktive T-Zellen im GALT aktiviert, bevor sie expandieren und autoantikörperproduzierende B-Zellen rekrutieren. Zusammen wandern diese ZNS-reaktiven T- und B-Zellen dann ins ZNS und führen zu Demyelinisierung und Axonschaden [139]. Wie diese autoreaktiven Lymphozyten im Darm durch Mikrobiota aktiviert werden, konnte bisher nicht erklärt werden. Es ist vorstellbar, dass dabei das *molecular mimicry* oder die *bystander activation* eine Rolle spielen. Die Darmbakterien

können theoretisch Oberflächenmoleküle oder sezernierte Proteine herstellen, die in ihrer Struktur ZNS-Antigenen ähneln und so über Kreuzreaktivitäten autoreaktive Lymphozyten aktivieren. Außerdem könnte eine Verschiebung des Milieus im Darm zu einem proinflammatorischen Typ eine Polarisation der T-Zellen bewirken und zu einer Aktivierung naiver autoreaktiver Zellen führen.

Mit unserer Studie möchten wir ein anderes Modell vorschlagen. Wir postulieren, dass die ZNS-reaktiven Lymphozyten zwar auch im Darm aktiviert werden, dies jedoch geschieht, weil sie dort im ENS auf ihr tatsächliches Target, die Myelinantigene MBP und PLP, treffen. Daraufhin findet eine Ausweitung der Immunantwort statt, wodurch weitere Antigene des ENS immundominant werden. Es kommt also zu einem simultanen Angriff des ZNS und des ENS.

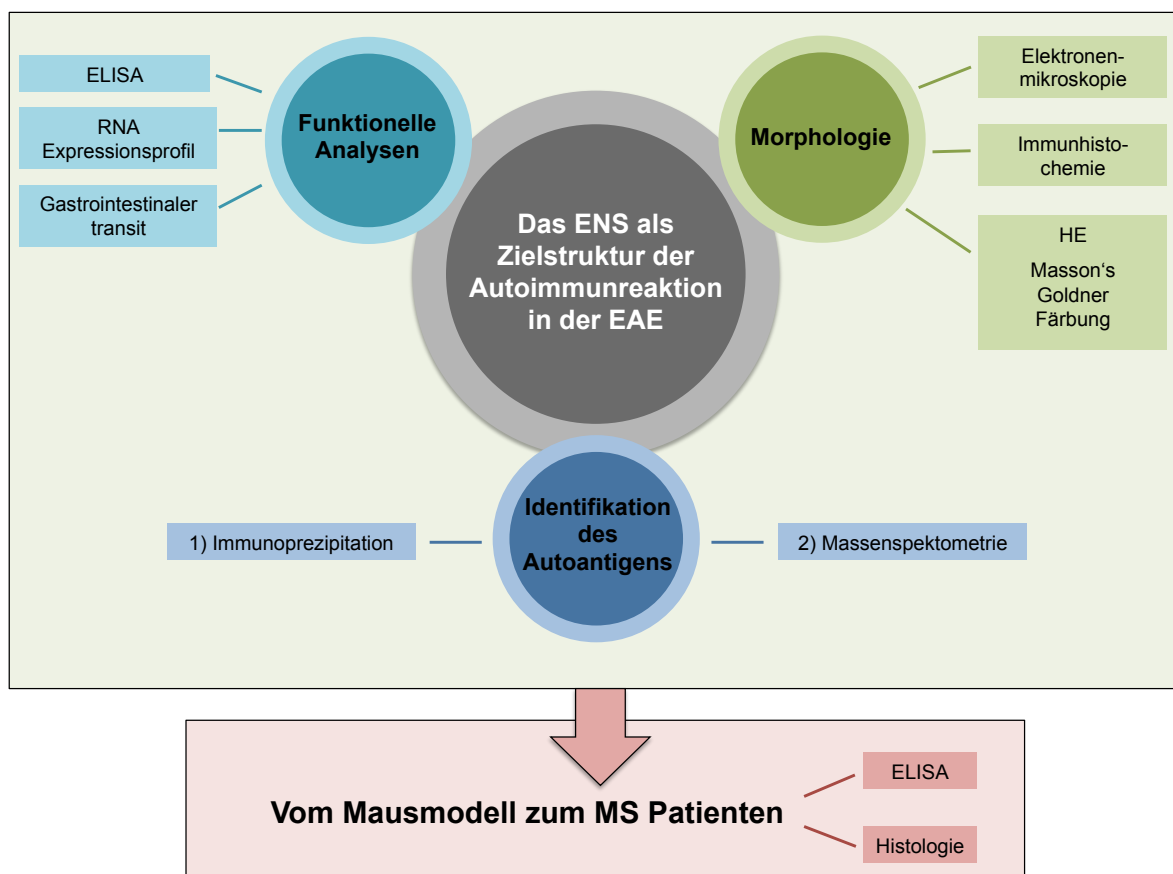
## **1.8 Zielsetzung**

Die Studie lässt sich in zwei Teile gliedern (Abbildung 4). Zunächst sollte untersucht werden, ob das ENS eine Zielstruktur der Autoimmunreaktion in der EAE ist. Dies sollte morphologisch und funktionell gezeigt werden. Die morphologischen Analysen beinhalteten histologische Färbungen, ultrastrukturelle Untersuchungen des ENS und immunhistochemische Färbungen, um Neurodegeneration, Muskelatrophie und Inflammation nachzuweisen. Die funktionellen Analysen fokussierten sich auf eine Antikörperreaktivität in den EAE-Tieren gegen ENS-Antigene. Die Analyse der RNA-Expressionsprofile von inflammatorischen Genen im Darm sollte darlegen, ob eine ausgedehnte Inflammation vorhanden ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Darmperistaltik der EAE Tiere eingeschränkt ist.

Mithilfe von Immunpräzipitation und Massenspektrometrie sollten die Serumantikörper der EAE-Tiere genutzt werden, um mögliche Autoantigene des ENS zu identifizieren.

Im zweiten translationalen Teil sollte das ENS im MS-Patienten untersucht werden. Dafür sollten Serumproben von MS-Patienten genutzt werden, um eine Antikörperantwort gegen die im Mausmodell identifizierten Autoantigene des ENS zu untersuchen. Außerdem sollten Darmbiopsien von MS-Patienten genutzt werden, um immunhistochemisch eine Neurodegeneration oder Inflammation des ENS nachzuweisen. Abbildung 4 fasst den Studienaufbau zusammen.

Ein großer Vorteil der Studie ist, dass sie translational ist. Die ersten Beweise für eine Beteiligung des ENS bei der MS stammten aus dem Tiermodell, und das Tiermodell lieferte auch die Identifikation der Autoantigene des ENS. Der zweite essentielle Teil der Arbeit war darauf aufbauend die Untersuchung, ob sich diese Ergebnisse auch im MS-Patienten wiederfinden.



**Abbildung 4 Aufbau der Studie.** Nach der intensiven Analyse des ENS im Rahmen der Autoimmunantwort in der EAE und der Identifikation der Autoantigene folgten auch im MS-Patienten die Untersuchung einer Serumantwort gegen ENS-Antigene und histologische/immunhistochemische Analysen des ENS.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Cryotom Jung CM3000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- SDS-PAGE Gelkammer Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Wetblot Transfer Unit TE 62 Amersham Biosciences (GE Healthcare GmbH, München, Deutschland)
- SDS-PAGE Gelkammer Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- UV Transilluminator TFX-35M (Life Technologies, New York, NY, USA)
- Wetblot Transfer Unit TE 62 Amersham Biosciences (GE Healthcare GmbH, München, Deutschland)
- Keyence Biorevo BZ-9000 Mikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Perkin Elmer Victor 3 1420 Multilabel Zähler (Hamburg, Deutschland)
- Leica SM 2010 R Mikrotom (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
- Leica DM2000 LED Mikroskop (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- LEO AB912 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss NTS, Oberkochen, Deutschland)

## 2.1.2 Puffer

- Krebs-Henseleit Lösung pH 7,4

- 118 mM NaCl
- 4.7 mM KCl
- 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>
- 25 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 7.5 mM glucose

- PBS(-T) / phosphate buffered saline  
pH 7,4

- 137 mM NaCl
- 12 mM Phopshat
- 2,7 mM KCl
- für PBS-T: Zugabe von 0,1% Tween-20

- RIPA

- 50 mM Tris pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 1% Triton-X

- SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer

- 5 mM Tris pH 8,0
- 50 mM Glycin

- 0,02% SDS
  
- SDS-Gelelektrophorese-Ladepuffer
  - 50 mM Tris pH 6,3
  - 100 mM DTT
  - 10% Glycerin
  - 0,1% Bromphenolblau
  - 2% SDS
  
- Trenngel für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
  - 6,6 ml H<sub>2</sub>O
  - 8 ml 30% Acrylamid-Lösung
  - 5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
  - 200 µl 10% APS
  - 20 µl TEMED
  
- Sammelgel für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
  - 2,1 ml H<sub>2</sub>O
  - 0,5 ml 30% Acrylamid-Lösung
  - 380 ml 1 M Tris (pH 6,8)
  - 30 ml 10% APS
  - 3 ml TEME

- TBS(-T)

- 20 mM Tris pH 7,5

- 150 mM NaCl

- 2 mM EDTA–Na<sub>2</sub>

- für TBS-T: Zugabe von 0,1% Triton-X

- Wetblot-Transferpuffer

- 50 mM Tris pH 8,3

- 380 mM Glycin

- 1,6 mM EDTA–Na<sub>2</sub>

- 0,1% SDS

- 20% Methanol

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mäuse

Für die Experimente wurden weibliche 6-8 Wochen alte C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von Janvier (Saint Berthevin Cedex in Frankreich) oder Harlan/ENVIGO (Horst, Niederlande) bezogen und im Tierstall der Zahnklinik der Universität Würzburg in Typ II Käfigen mit bis zu sechs Tieren gehalten. Es herrschten ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, eine Raumtemperatur von 20°C und eine Luftfeuchtigkeit von 65%. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten in einer eingestreuten Markrolonbox (Ebeco, Bioscape, Castrop-Rauxel, Deutschland) und hatten autoklaviertes Wasser und Futterpellets (Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Lage, Deutschland) zur Verfügung. Alle Tierversuche wurden entsprechend der *ARRIVE guidelines* und dem Tierschutzgesetz (NIH Publikation Nr. 86-23, veröffentlicht 1985) durchgeführt und sind im Tierantrag 114/13 und 91/14 verzeichnet.

### 2.2.2 Immunisierung

Inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA) wurde hergestellt, indem Paraffinöl (EMScience, Gibbstown, NJ, USA) und als Emulgator Mannid-Monooleat (Sigma-Aldrich, Steinhaus, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:9 suspendiert wurden. Paraffinöl kann nicht verstoffwechselt werden und sorgt so für eine Depotwirkung [149]. Komplettes Freund-Adjuvans (CFA) wurde dann erzeugt, indem 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) hinzugefügt wurde. *Mycobacterium tuberculosis* wird zugegeben, um das angeborene Immunsystem der Tiere zu aktivieren und so eine Inflammation und stärkere myelin-spezifische Immunantwort zu generieren. Außerdem polarisiert das CFA die Immunantwort zu einer T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Aktivierung [149].



Die Immunisierungslösung beinhaltete 100 µl CFA und 100 µg MP4 (Alexion Pharmaceuticals Inc.) oder als Kontrolle 100 µg *hen-egg lysozyme* (HEL) (Sigma, L6876).

Nach einwöchiger Eingewöhnung nach der Lieferung wurden die Tiere immunisiert. Dafür wurde ein totales Volumen von 200 µl der Immunisierungslösung subkutan in beide Flanken injiziert. Die Mäuse erhielten außerdem am Tag der Immunisierung 200 ng Pertussis-Toxin (List Biological Laboratories, Hornby, ONT, Canada) in 500 µl sterilem PBS gelöst (Dulbeccos PBS without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Achtundvierzig Stunden später erfolgte eine erneute Injektion mit Pertussistoxin.

### 2.2.3 Klinischer Score

Der klinische Verlauf wurde beurteilt, indem das folgende klassische Scoresystem angewendet wurde.

Score	Symptome
0	Keine Symptome
1	Schwanzparese
2	Parese der Hinterläufe, Gangstörung
3	Vollständige Parese beider Hinterläufe
4	Parese der Vorder- und Hinterläufe (Quadriplegie)
5	Tod

**Tabelle 3** Scoresystem nach Beeton [74]

#### 2.2.4 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die Tiere mit 4% PFA in PBS perfundiert und das Gewebe über Nacht bei 4°C in 4% PFA postfixiert. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet (siehe Abschnitt 2.2.8 Histologie) und in 5 µm dicke Schnitte geschnitten.

Die Schnitte wurden entparaffiniert, dehydriert (siehe Abschnitt 2.2.8 Histologie) und in 10 mM Citratpuffer demaskiert. Darin wurden die Schnitte 6 Min. in der Mikrowelle gekocht. Die Schnitte wurden 35 Min. bei Raumtemperatur im Citratpuffer belassen und danach 5 Min. unter fließendem destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Zum Blocken wurde 5 % *normal goat serum* (NGS) in PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf die Schnitte pipettiert. Folgende Antikörper wurden daraufhin auf die Schnitte pipettiert: CD3 (abcam, ab16669; Verdünnung 1:500), B220 (eBioscience, 14-0452-81; Verdünnung 1:500), F4/80 (abcam, ab6640; Verdünnung 1:100), βIII-Tubulin (abcam, ab18207; Verdünnung 1:2000) und GFAP (Sigma, G3893; Verdünnung 1:2000) in PBS. Die Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und die entsprechenden fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper von Dianova auf die Schnitte pipettiert: goat anti-rat Cy3 (Dianova, 65-006; Verdünnung 1:600), goat anti-mouse Cy5 (Dianova, 115-175-071; Verdünnung 1:400), goat anti-rabbit Cy3 (Dianova, 111-165-006; Verdünnung 1:600) and goat anti-rabbit Cy5 (Dianova, 111-175-144; Verdünnung 1:300). Für die Quantifizierung der βIII-Tubulin-Expression wurde eine enzymatische Entwicklung durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit DAPI als Kernmarker inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit NPG (n-Propylgallat, Fluka) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Keyence Biorevo BZ-9000 microscope (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland).

Um zu untersuchen, ob die purifizierte Serum-IgG von HEL- und MP4-immunisierten Mäusen direkt an das Nervengewebe im Darm binden, wurde ein ca. 3 cm langer Abschnitt

des Dünndarms einer nicht-immunisierten Maus entnommen und direkt schockgefroren in flüssigem Stickstoff. Das Gewebe wurde eingebettet in Tissue-Tek O.C.T.<sup>TM</sup> Compound (Sakura, AV Alphen aan den Rijn, Niederlande). Anschließend wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt, über Nacht luftgetrocknet und bei -20 °C für 10 Min postfixiert mit Aceton/Methanol (Verhältnis 1:2)... Die Schnitte wurden mit 5 % NGS für 2 h bei Raumtemperatur geblockt und mit gepoolten Serum-IgG von n = 5 MP4-immunisierten Mäusen oder n = 4 HEL-immunisierten Mäusen inkubiert. Das Serum wurde den Tieren an Tag 30 nach Immunisierung entnommen und die IgG mit einem Purifikationskit (Abcam, ab128745) isoliert. Die purifizierten IgG wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml auf die Schnitte gebracht zusammen mit anti-βIII-Tubulin (abcam, ab78078; Verdünnung 1:2000) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden goat anti-mouse Cy5 (Dianova, 115-175-071; Verdünnung 1:400) und goat anti-rabbit Cy3 (Dianova, 111-165-006; Verdünnung 1:600) verwendet. Die Schnitte wurden eingedeckt mit N-Propylgallat (Sigma, 02370).

## **2.2.5 Auswertung der Immunhistochemie**

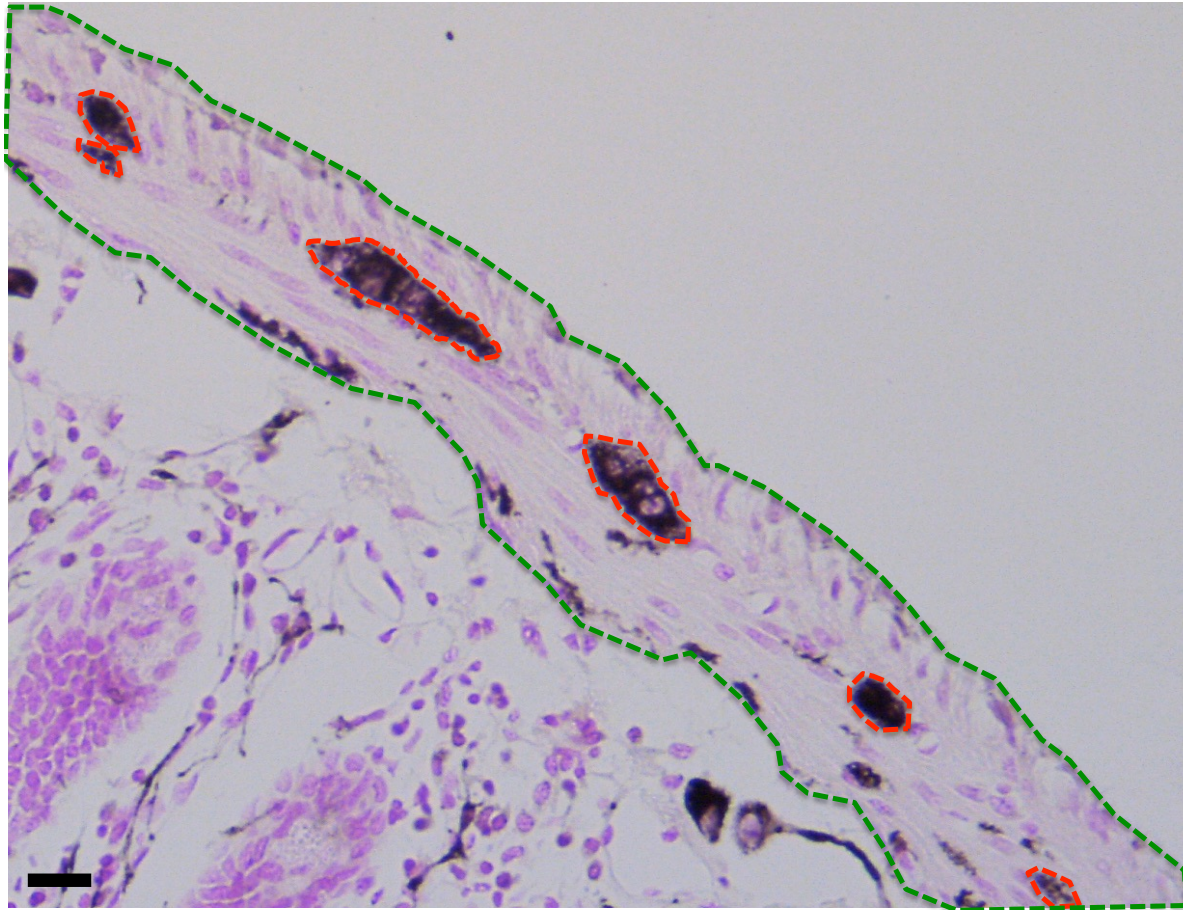
### **2.2.5.1 Infiltration von Immunzellen**

Um immunhistochemisch eine Inflammation nachzuweisen, wurden die Schnitte für F4/80 (Makrophagen), CD3 (T-Zellen) und B220 (B-Zellen) gefärbt. Es wurden n = 9 nicht-immunisierte Kontrolltiere, n = 8 HEL-immunisierte Kontrolltiere, n = 10 präklinische EAE-, n = 14 akute EAE- und n = 19 chronische EAE-Tiere eingeschlossen. Es wurden die Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen, die in die Tunica muscularis infiltriert waren, gezählt und für jedes Tier ein Mittelwert gebildet.

### 2.2.5.2 GFAP- und $\beta$ III-Tubulin-Expression

Zunächst wurde die Immunhistochemie genutzt, um eine Quantifizierung der  $\beta$ III-Tubulin und GFAP-Expression im Darm der Kontroll- und EAE-Tiere durchzuführen.  $\beta$ III-Tubulin wird von den Nervenzellen exprimiert und die Quantifizierung kann einen Hinweis auf eine Neurodegeneration geben. GFAP wird von Gliazellen exprimiert und durch die Messung der GFAP-Expression kann eine mögliche Gliose nachgewiesen werden.

Dafür wurden für die GFAP-Expression n = 8 nicht-immunisierte Kontrollen, n = 7 HEL-immunisierte Kontrollen, n = 7 präklinische EAE-, n = 8 akute EAE- und n = 8 chronische EAE-Tiere analysiert. Für die  $\beta$ III-Tubulin-Expression wurden n = 8 nicht-immunisierte Kontrollen, n = 7 HEL-immunisierte Kontrollen, n = 7 präklinische EAE-, n = 9 akute EAE- und n = 5 chronische EAE-Tiere eingeschlossen. Von jedem Tier wurden drei Schnitte von unterschiedlichen Dünndarmabschnitten (proximal, medial und distal) ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet. Es wurde die GFAP oder  $\beta$ III-Tubulin positive Fläche zwischen der Ring- und Längsmuskulatur der Tunica muscularis in  $\mu\text{m}^2$  ausgemessen und geteilt durch die Gesamtfläche der Tunica muscularis (ebenfalls in  $\mu\text{m}^2$ ). Enthielt der Schnitt mehrere abgegrenzte GFAP-positive oder  $\beta$ III-Tubulin-positive Flächen, wurden diese zu einem Gesamtwert addiert (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Quantifizierung der  $\beta$ III-Tubulin-positiven Fläche zwischen Ringmuskulatur und Längsmuskulatur der Tunica muscularis. In rot umkreist ist die Fläche der  $\beta$ III-Tubulin-Expression im Plexus myentericus, in grün umkreist die Gesamtfläche der Tunica muscularis. Der Messbalken stellt 50  $\mu$ m dar.

### 2.2.5.3 Western Blot

Um die immunohistochemischen Ergebnisse zu quantifizieren, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei sollte vor allem die Menge von GFAP und  $\beta$ III-Tubulin im Darm von Mäusen bestimmt werden. Dafür wurde zunächst der Darm von drei mit Ovalbumin (OVA) immunisierten Kontrollmäusen und drei akut erkrankten EAE Mäusen lysiert. Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> getötet, ein Teil des Dünndarms zügig entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der gefrorene Darm wurde dann in 2 ml Ripa-Puffer mit Proteasen (20  $\mu$ l PMSF, 2  $\mu$ l APR, 2  $\mu$ l Leu, 2  $\mu$ l Crep) zermörsert. Der zerkleinerte Darm wurde 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 10 Minuten bei 14000 rpm

zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Proteinkonzentration in einem Bradford-Test gemessen. Um die Proteine in dem Proteinlysat aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese genutzt. Dabei wurde das Proteinlysat zunächst bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert, um die Sekundär- und Tertiärstruktur der gefalteten Proteine aufzutrennen. Die Proteine wurden dann beladen mit SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat), welches eine starke negative Ladung besitzt und so dafür sorgt, dass alle Proteine den selben Ladungszustand erhalten. Die Proteine wurden dann auf ein Gel aufgetragen, welches an ein elektrisches Feld angeschlossen wird. Das Gel war zusammengesetzt aus einem Sammelgel, auf das die Proteine pipettiert wurden und einem Trenngel, welches sich darunter befand. Die Gele besaßen unterschiedliche Acrylamid-Konzentrationen.

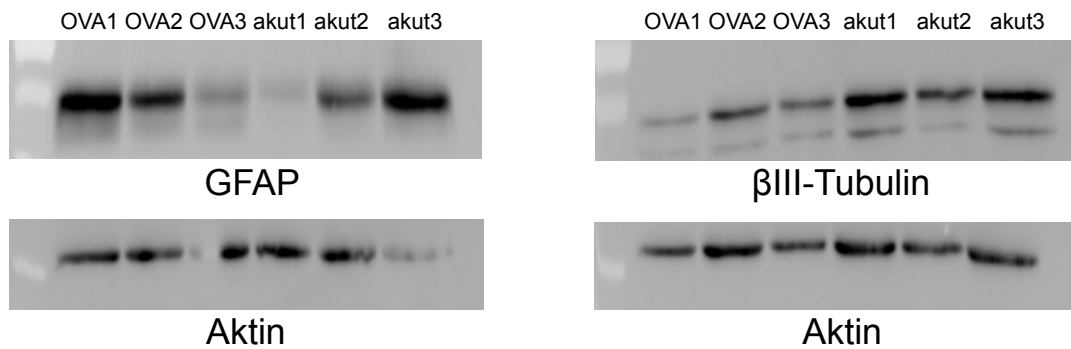
Alle aufgetragenen Proteine wandern dann in Richtung des positiven Feldes, werden jedoch nach ihrer Größe aufgetrennt. Stellt man die elektrische Ladung nach einer gewissen Zeit ab, so haben die kleineren Proteine auf dem Gel einen längeren Weg zurückgelegt als die größeren Proteine. Dies bedingt die typische bandenartige Verteilung der Proteine auf dem Gel.

Es wurden 200 µl des Proteinlysats entnommen und mit 100 µl SDS-Probenpuffer gemischt. 50 µg Protein aus dem Lysat wurden dann auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard aufgetragen, um die spätere Größenbestimmung der Proteine zu ermöglichen. Die Proteinauftrennung auf dem Gel erfolgte für 1,5 - 2 Stunden in einer Elektrophorese-Kammer bei 80 V. Die aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman Protran, GE Healthcare, München) übertragen. Dafür wurde die Membran in Wetlot-Puffer benetzt, auf das Gel gelegt und beides mit Whatman-Paper (Whatman 3MM Chr, GEHealthcare, München) umschlossen. Das Blotten wurde in einer Wetlot-Kammer bei 200 mA für 70 Minuten durchgeführt.

Zur Proteinbestimmung wurde die Membran anschließend für 1 Stunde in 5% Milchpulver in TBS-Tween überführt, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Danach wurde die Membran mit dem  $\beta$ III-Tubulin-Antikörper (abcam, ab18207) oder GFAP-Antikörper (Sigma, G3893) (beide 1:2000 verdünnt) in 5% Milchpulver in TBS-Tween über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3 x 10 Minuten gewaschen mit TBS-Tween und inkubiert mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Entwicklung erfolgte mit der Enhanced-Chemiluminescence-Methode. Dafür wurde die Membran in Luminol gelegt, welches durch die Peroxidase am Sekundärantikörper oxidiert wird und dabei blau leuchtet. Die Membran wurde im Luminol zwischen zwei Klarsichtfolien gebracht und die Lumineszenz auf einem Röntgenfilm detektiert.

Um eine Kontrolle über die aufgetragenen Proteinmenge zu erhalten, wurde die Membran nach der Aufnahme dreimal in TBS-Tween gewaschen und mit einem Aktin-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Verdünnung 1:1000) und entsprechenden Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit HRP, Bio-Rad Laboratories GmbH München; Verdünnung 1:20000) inkubiert. Die Aktinbanden sollten alle gleich breit ausfallen.

Trotz zahlreicher Versuche konnten keine gleich großen Aktinbanden generiert werden (Abbildung 6). Daher ist anzunehmen, dass unterschiedliche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden. Diese Varianz ist wahrscheinlich auf die hohe Enzymaktivität im Darm zurückzuführen, wodurch Proteine schon bei der Darmpräparation abgebaut bzw. gespalten werden und sich keine zuverlässige Proteinkonzentrationsbestimmung durchführen lässt. Daher wurde die Western Blot-Analyse nicht weiter verfolgt und ist auch im Ergebnisteil nicht aufgeführt. Die Quantifizierung der GFAP- und  $\beta$ III-Tubulin-Expression im Darm wurde dann mittels Immunhistochemie durchgeführt.



**Abbildung 6 Western Blot Banden der GFAP- und  $\beta$ III-Tubulin-Expression.** Darmlysate von OVA-immunisierten und MP4-immunisierten Mäusen im akuten Stadium wurden analysiert. Dabei war es nicht möglich einheitliche Aktinbanden zu generieren.

### 2.2.6 RNA-Isolation

Für die Erstellung eines RNA-Expressionsprofils des Dünndarms von HEL-immunisierten Kontrolltieren und akuten EAE-Tieren wurde zunächst aus einem Darmlysat RNA isoliert. Dafür wurden  $n = 2$  HEL-immunisierte Mäuse und  $n = 2$  akut erkrankte EAE-Tiere mit  $\text{CO}_2$  narkotisiert und nach Aussetzen der Atmung sofort auf Eis gelegt. Der Bauchraum wurde zügig eröffnet und ein ca. 4 cm langer Abschnitt des Dünndarms entnommen und in eiskaltem PBS ausgewaschen, um den Darminhalt zu entfernen. Der Darm wurde dann schockgefroren in flüssigem Stickstoff und unter ständiger Zufuhr von flüssigem Stickstoff zu einer Art Pulver zermörsert. Dann wurden 2 ml Trizol zugegeben und gut gemischt. Das Lysat wurde in ein Eppendorf Tube überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Lysat wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben und 15 Sekunden gevortext. Das Gemisch wurde 3 Minuten bei Raumtemperatur belassen und die Proben anschließend bei 13000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 250  $\mu\text{l}$  Isopropanol gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 10-minütigen Zentrifugieren bei 13000 g bei 4 °C wurde das Pellet erhalten und in 0,5 ml 75% Ethanol gelöst. Nach anschließender Zentrifugation bei 7500 g für 5 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand



abpipettiert und das Pellet in einem Eppendorf Tube bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in 25 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 60 °C für 10 Minuten gelöst. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Für die Erstellung des RNA-Expressionsprofils wurde die RNA an Dr. Claus Scholz (Core Unit Systemmedizin, Universität Würzburg) übergeben.

### **2.2.7 RNA-Expressionsprofil**

Die Analyse des RNA-Expressionsprofils wurde von Dr. Claus Scholz durchgeführt. Die RNA-Qualität wurde mit einem Bioanalyzer 2100 bestimmt (Agilent, Böblingen, Deutschland). Die mittlere RNA-Integritäts-Nummer (RIN) war 9,5 (zwischen 8,6 und 9,8), wobei 10 der bestmögliche Wert und 1 der schlechtmöglichste Wert ist. Die messenger RNA wurde revers transkribiert, amplifiziert, fragmentiert und markiert mit einem WT PLUS Kit (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA) und hybridisiert mit GeneChip Mouse Gene 2.0 ST microarrays (Affimetrix). Von den Intensitäten der Proben wurde das Hintergrundrauschen abgezogen, das Quantil normalisiert und die Expressionswerte wurden errechnet mit der Medianpolish-Methode [150]. Unterschiedlich exprimierte Gene wurden mit einem empirischen Bayesianischen Ansatz, der eine False Discovery Rate (FDR) von unter 5% erfordert, bestimmt [150]. Die Analysen wurde durchgeführt mittels R-Projekt ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) unter Benutzung des Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) in den Kategorien „affy“, „made4“, „pheatmap“ und „limma“. Die Microarray-Daten wurden hinterlegt im Gen-Expressions-Plattform Onmibus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) unter dem Eintrag GSE86494.

### **2.2.8 Histologie**

Für die histologische Gewebeanalyse wurden die Tiere mit 4% PFA perfundiert und anschließend der Bauchraum eröffnet. Es wurden drei Stücke des Dünndarms entnommen, jeweils ein Teil des Duodenums, Jejunums und Ileums. Das Gewebe wurde über Nacht bei 4°C in PFA nachfixiert und dann dreimal für 15 Minuten in PBS gewaschen. Für die Einbettung in Paraffin wurde das TP1020 Einbettkarussell von Leica Biosystems (Nussloch, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden entgast im Exsikkator für 3 x 15 s. Danach wurde das Gewebe aus dem PBS überführt in 70% Ethanol für zweimal 30 Min.. Es folgte eine Entwässerung des Gewebe über 24 Stunden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100% Ethanol) und anschließender Inkubation in Xylol. Nach dem Xylol wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin (Histotec Pastillen, Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt.

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Superfrost Objektträger (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgezogen. Für die histologischen Färbungen wurden die Schnitte in Xylol für zweimal 10 Min. entparaffiniert. Anschließend folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 5 Minuten in 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol und 70% Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. in destilliertes Wasser gebracht und dann in PBS überführt.

#### **2.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Um eine Übersicht über die Gewebestruktur zu erhalten, wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. Dafür wurden die entparaffinierten, dehydrierten Schnitte für 12 Min. in Hämalaun gebracht. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Min. gewaschen. Danach folgte die Färbung für 10 Min. mit Eosin, wonach die Schnitte wieder in destilliertem Wasser gewaschen und in eine

aufsteigende Alkoholreihe überführt wurden. Nach Inkubation in Xylol wurden die Schnitte eingedeckt mit DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland).

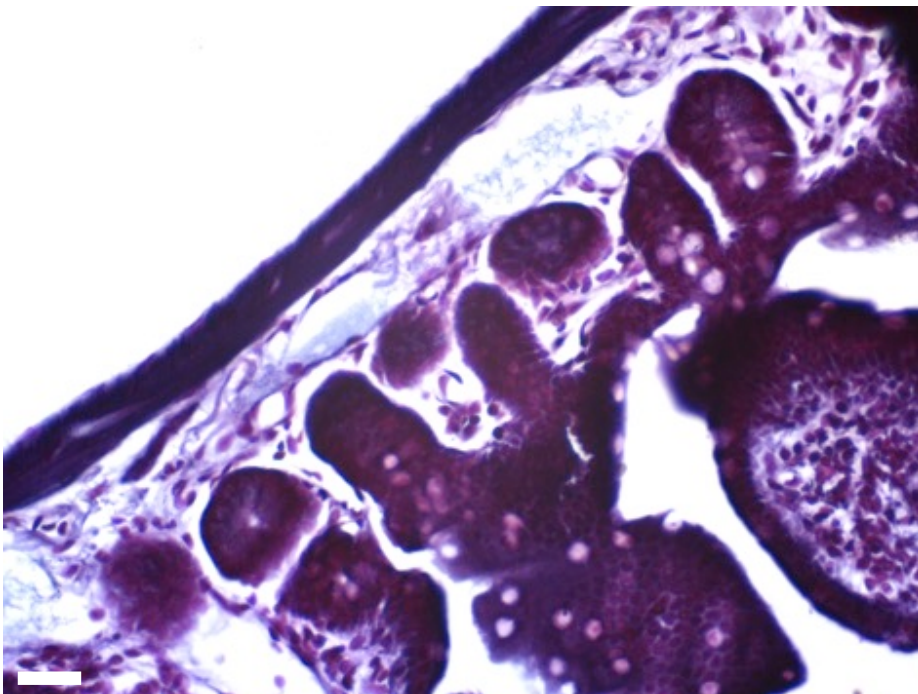
### **2.2.8.2 Masson-Goldner Färbung**

Anhand von Masson-Goldner gefärbten Schnitten wurden die Muskulatur und das Bindegewebe beurteilt. Für diese Färbung wurden die entparaffinierten und dehydrierten Schnitte in eine Lösung aus 0,2 g Chromotrop RR, 0,1 g Säurefuchsin und 300 ml 2%iger Essigsäure für 10 Minuten bei Raumtemperatur gebracht. Anschließend folgte ein Spülen mit 0,5 % Essigsäure. Danach wurden die Schnitte in einer Lösung aus 4 g Phosphowolframsäure, 2 g OrangeG und 100ml destilliertem Wasser für 30 s inkubiert. Es folgte erneut ein Spülen mit 0,5 % Essigsäure und schließlich wurden die Schnitte für 4 Min. in Lichtgrün (0,2 g in 100 ml 0,2% Essigsäure) gebracht. Es folgte erneutes Waschen in 0,5 % Essigsäure, eine aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken mit Entellan. Als Ergebnis der Färbung wird das kollagene Bindegewebe in grün dargestellt, die Muskulatur in rot und Erythrozyten in orange.

### **2.2.8.3 Silberimprägnation nach Holmes**

Als weitere Färbung sollte die Silberimprägnation nach Holmes durchgeführt werden, um das Nervengewebe im Darm darstellen und beurteilen zu können. Dafür wurden die Schnitte entparaffiniert und dehydriert und anschließend über Nacht bei 37 °C in eine Imprägnierlösung (0,124 g Borsäure, 0,19g Borax, 500 ml destilliertes Wasser, 5 ml 10% Pyridinlösung, 1 ml 1% Silbernitrat) gebracht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser für 15 Min. bei 30 °C in eine Entwicklerlösung (100 ml destilliertes Wasser, 10g Natriumsulfit, 1g Hydrochinon) überführt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Tönung erfolgte in 0,2 % Goldchlorid für 3 Min.. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und für 15 Min. in

0,2% Oxalsäure differenziert. Die Fixierung der Färbung wurde durchgeführt, indem die Schnitte für 5 Min. in 5% Natriumthiosulfat gebracht und anschließend für 10 Min. unter fließendem Leitungswasser gewaschen wurden. Als Kernfärbung wurde Kernechtrot verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol überführt und mit DPX eingedeckt. Mit dieser Färbung lassen sich Neurofibrillen in Axonen und Dendriten von Neuronen in dunkelgrau darstellen. Sie ist etabliert an Schnitten des ZNS. Für die Färbung des ENS scheint diese Färbung nicht geeignet zu sein. Selbst nach zahlreichen Versuchen und Variationen des Protokolls konnte keine zufriedenstellende Färbung durchgeführt werden. Es stellte sich als problematisch heraus, dass die komplette Muskulatur des Darms auch schwarz gefärbt wurde (Abbildung 7) und sich so die Neurone nicht abgrenzen ließen vom Muskelgewebe. Es ist anzunehmen, dass sich die Silberionen in gleichem Maße an Muskel- sowie an Nervengewebe anlagern. Daher wurde die Färbung nicht weiter durchgeführt und ist auch im Ergebnisteil nicht aufgeführt.



**Abbildung 7 Darmquerschnitt einer chronischen EAE-Maus nach der Silberimprägnation nach Holmes.** Gefärbt sind Muskulatur, Nervengewebe und Teile der Mucosa, sodass keine Differenzierung der einzelnen Gewebestrukturen möglich ist. Die Maus besaß einen Score von 2,5. Der Balken stellt 50  $\mu$ m dar.

#### **2.2.8.4 Luxol-Fast-Blue Färbung**

Nach dem Entparaffinieren und Dehydrieren wurden die Schnitte über Nacht bei 60 °C in eine 0,1% Luxol-Fast-Blue Lösung gestellt (1,0 g Luxol-Fast-Blue in 1000 ml 96 % Isopropanol). Nach anschließendem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für jeweils 1 min. in 96 % Isopropanol und anschließend in 50 % Isopropanol überführt. Es folgten 5 min. Waschen in destilliertem Wasser. Die Differenzierung erfolgt in 0,05 % Lithiumcarbonat für 10 s bis 1 min., gefolgt von 75 % Isopropanol für 10 s bis 1 min. und Abstoppen in destilliertem Wasser für 5 min.. Die Differenzierung dient der Entfärbung der überfärbten Schnitte. Dabei wurde ständig unter dem Mikroskop kontrolliert, ob noch eine weitere längere Differenzierung nötig ist oder ob die Färbung zufriedenstellend ist. Ziel ist es, dass nur die Markscheiden blau gefärbt sind und die Zellkörper bzw. das nicht-markscheidenhaltige Gewebe nicht gefärbt sind. Anschließend wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe gebracht und mit DPX eingedeckt.

#### **2.2.9 Ultrastrukturelle Analyse**

Die Perfusionslösung wurde hergestellt, indem 40 g Paraformaldehyd (PFA, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) in 400 ml Aqua bidest gebracht, erhitzt und mit 400 ml 0,2 M PBS aufgefüllt wurde. Der pH-Wert wurde dann auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit 160 ml 25% Glutardialdehyd (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt und der pH erneut auf 7,4 eingestellt.

Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> anästhesiert und anschließend wurde der Bauch- und Brustraum geöffnet. Die V. cava inferior wurde eingeschnitten und eine Schmetterlingskanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Über die Kanüle erfolgte dann für ca. 20 min. ein Einspülen der Perfusionslösung. Das Gewebe wurde anschließend über Nacht bei 4 °C in der Perfusionslösung nachfixiert.

Das Gewebe wurde dreimal für 15 bis 20 min. in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,35) gewaschen. Das anschließende Einlegen in 2% Osmiumtetroxid für 4 h auf Eis diente der Kontrastverstärkung. Daraufhin wurde das Gewebe erneut mit Cacodylatpuffer für 30 min. und anschließend zweimal in destilliertem Wasser auf Eis gewaschen. Eine Entwässerung erfolgte anschließend mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 % Ethanol). Eine weitere Kontrastierung wurde durch Inkubation für 1 h in 2 % Uranylacetat in 70 % Ethanol, erzielt. Anschließend wurde das Gewebe je 15 min. in eine ansteigende Alkoholreihe gebracht (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % Ethanol). Daraufhin wurden die Proben für zweimal 30 min. in Propylenoxid überführt. Nach Inkubation in reinem Propylenoxid wurde das Gewebe über Nacht in eine Lösung aus gleichen Teilen Propylenoxid und Epon gebracht. Nachdem das Gewebe dann für 2 h in Epon eingelegt worden war, erfolgte die Einbettung in Epon und die Polymerisierung wurde bei 60 °C für 48 h durchgeführt.

Nachdem das Epon ausgehärtet war, wurden die Gewebeblöcke getrimmt und die Anfertigung der 1 µm-dicken Semidünnschnitte erfolgte an einem Leica Ultracut UCT Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Nach dem Überführen auf einen Objektträger wurden die Schnitte auf einer Heizplatte getrocknet und anschließend ca. 1 min. mit einer Lösung aus Methylenblau, Azur (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Natriumtetraborat (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst in Aqua bidest. gefärbt. Nach dem Waschen mit Aqua bidest. wurden die Objektträger dann luftgetrocknet und mit Entellan eingedeckt.

Die Auswertung der Semidünnschnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Leica DM LB2, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden 80 nm-dicke Ultradünnschnitte mit dem Leica Ultracut UCT Ultramikrotom angefertigt und auf Kupfernetze gebracht. Eine Kontrastierung wurde durch 1% Uranylacetatlösung erreicht, die für 20 min. auf den Schnitten belassen wurde. Nach dem Spülen mit Aqua bidest wurden die Schnitte für 7 min.

mit einer Blei-Zitrat-Lösung kontrastiert. Es folgte das Spülen mit destilliertem Wasser und anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet. Die Auswertung der Ultradünnschnitte wurde mit einem Zeiss EM 902 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem LEO AB912 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss NTS) bei 6500- und 8000-facher Vergrößerung angefertigt.

### **2.2.10 Auswertung der ultrastrukturellen Aufnahmen**

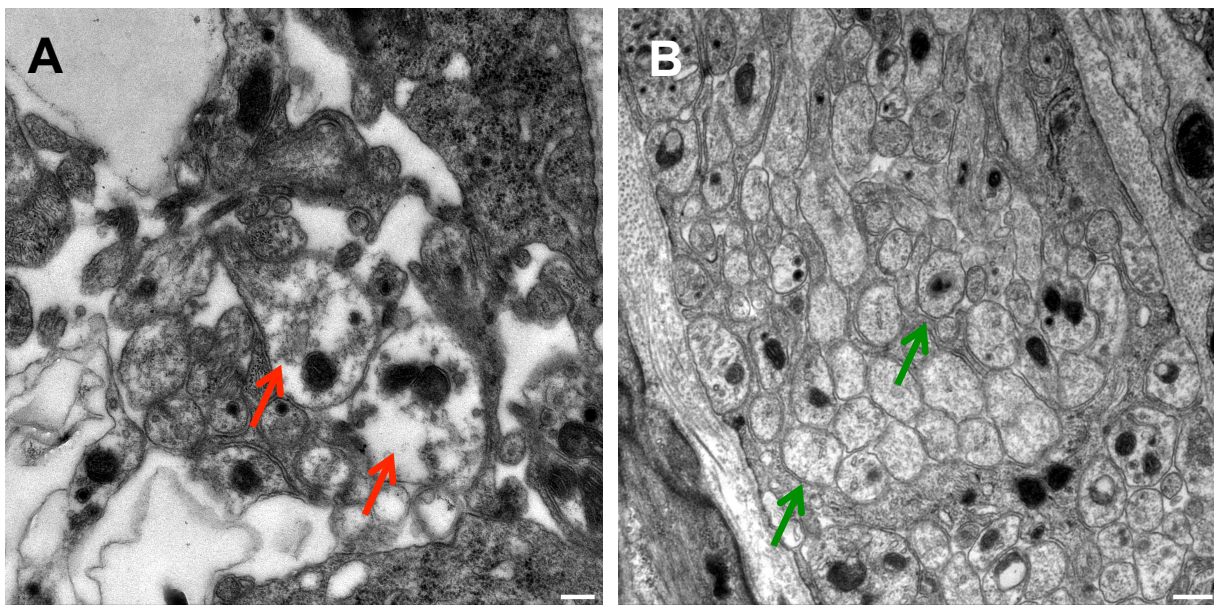
Um eine Darmwandpathologie bei EAE-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren zu bestimmen, wurde der Plexus myentericus analysiert. Dafür wurde die axonale Dichte bestimmt sowie die Anzahl axolytischer Axone und die Mito-ratio ermittelt. Für die Auswertung wurde das Programm ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA) verwendet.

Je nachdem, wieviele Plexus auf dem Schnitt zu finden waren, wurden bei den nicht-immunisierten Kontrolltieren zwischen 5 und 12 Plexus pro Tier analysiert, bei den HEL-immunisierten Tieren 1-7, bei den präklinischen EAE Tieren 3-8 Plexus, bei den akuten EAE Tieren 1-17 Plexus und bei den chronischen EAE-Tieren 4-8 Plexus. Insgesamt wurden die Plexus von n = 5 Kontrolltieren, n = 7 HEL-immunisierten Mäusen, n = 7 präklinischen EAE-Tieren, n = 10 akuten EAE-Tieren und n = 13 chronischen EAE-Tieren analysiert. Es wurden 43 Plexus aller Kontrolltiere ausgewertet, 36 Plexus aller HEL-immunisierten Kontrollen, 44 Plexus aller präklinischen EAE Tiere, 63 Plexus aller akuten EAE Tiere und 59 Plexus aller chronischen EAE Tiere.

Die axonale Dichte wurde bestimmt, indem die Axone in einem Plexus gezählt wurden und die Plexusfläche in  $\mu\text{m}^2$  ausgemessen wurde. Die Anzahl der Axone wurde geteilt durch die Plexusfläche, um die Anzahl der Axone pro  $\mu\text{m}^2$  zu bestimmen. Die Anzahl der axolytischen Axone wurde in Prozent von der Anzahl der Axone insgesamt angegeben. Dafür wurden die



axolytischen Axone gezählt und in ein prozentuales Verhältnis zur Gesamtanzahl der Axone gesetzt. Axolytische Axone wurden über eine morphologische Degeneration des Axons bestimmt. Abbildung 8 A zeigt mit roten Pfeilen markiert Axone, welche Degeneration aufweisen. Die Membran ist teilweise aufgelöst, die Neurofilamente abgebaut und das Zytoplasma weist eine diffuse und unregelmäßige Struktur auf. Abbildung 8 B zeigt intakte Axone mit abgegrenzter Membran und intaktem Zytoplasma und physiologisch erscheinenden Organellen.



**Abbildung 8** Ultrastrukturelle Aufnahmen von Axonen im Plexus myentericus. Axone in einer MP4-immunisierten Maus im akuten EAE-Stadium (A). Der Pfeil markiert die axolytischen Axone, die sich auszeichnen durch eine Auflösung des Axoplasmas und der Zellmembran. Axone in einer HEL-immunisierten Kontrolle (B). Die Pfeile zeigen auf intakte Axone mit einer durchgängigen Membran und einem intaktem Zytoplasma. Der Balken stellt 1  $\mu\text{m}$  dar.

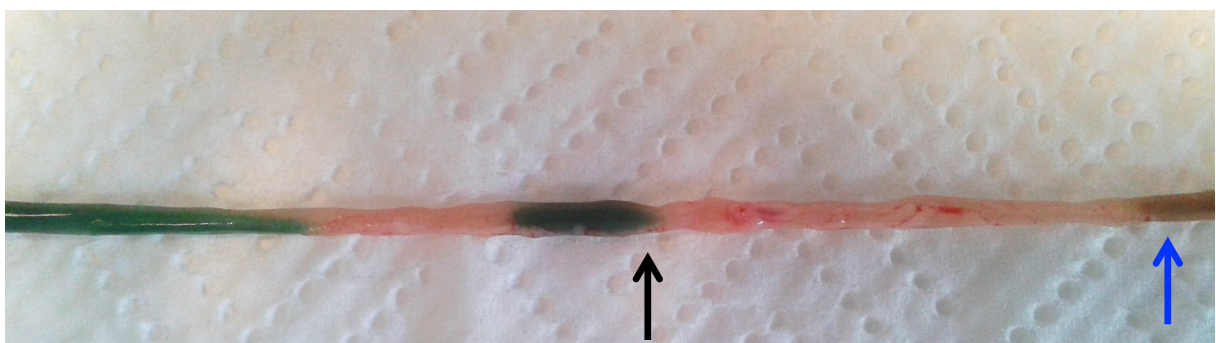
Ein Marker, um einen beginnenden Axonschaden nachzuweisen, ist die Mito-Ratio [8, 151-153]. Dafür wird mitochondriale Vergrößerung nachgewiesen, indem alle Mitochondrien im Axon ausgemessen werden und die Gesamtfläche der Mitochondrien in Verhältnis gesetzt wird zu der Fläche des Axons. Für die nicht-immunisierten Kontrollen wurde bei insgesamt 397 Axonen die Mito-Ratio bestimmt, bei den HEL-immunisierten Tieren für 441 Axone, bei



den präklinischen EAE-Tieren für 535 Axone, bei den akuten EAE-Tieren für 497 Axone und bei den chronischen EAE-Tieren für 304 Axone. Dabei wurde für jeden Plexus ein Mittelwert der Mito-Ratios gebildet und aus den Mittelwerten der Plexus wurde dann wiederum ein Mito-Ratio-Mittelwert für jedes Tier gebildet.

### 2.2.11 Gastrointestinaler Transit

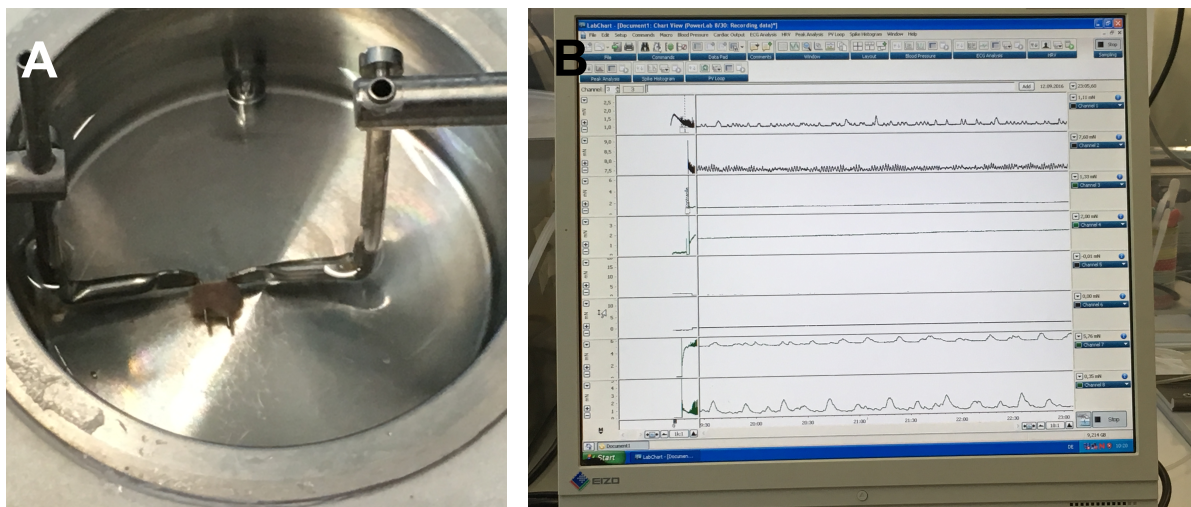
Um die Darmperistaltik *in vivo* zu untersuchen, wurde gemessen, welche Strecke der Darminhalt in einer bestimmten Zeit im gastrointestinalen Trakt zurücklegt. Dafür wurden nicht-immunisierten und HEL-immunisierten Kontrolltieren sowie präklinischen, akuten und chronischen EAE-Tieren über eine Sonde 200 µl grüne Lebensmittelfarbe (Dr. Oetker, Bielefeld, Deutschland) in den Magen gegeben. Nach 25 min. wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> anästhesiert und der Dün- und Dickdarm der Tiere entfernt. Die Lebensmittelfarbe ist durch die Darmwand gut zu erkennen (Abbildung 9). Die Gesamtlänge des gastrointestinalen Trakts wurde gemessen und in Verhältnis gesetzt zu der Strecke, die die Lebensmittelfarbe zurückgelegt hat.



**Abbildung 9 Dünndarmabschnitt nach oraler Gabe von Lebensmittelfarbe.** Die Lebensmittelfarbe ist durch die Darmwand gut erkennbar und lässt sich klar unterscheiden von den Resten der aufgenommenen Nahrung vor Gabe der Lebensmittelfarbe (der schwarze Pfeil markiert die erste Bande der Lebensmittelfarbe, der blaue Pfeil die vorher aufgenommene Nahrung).

## 2.2.12 Myographie

Die Tiere wurden über Genickbruch getötet und das Abdomen mit einem Längsschnitt eröffnet. Anschließend wurde das Ileum entnommen, in eine Krebs-Henseleit-Lösung gegeben und mit 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub> begast. Das Ileum wurde dann in Ringe geschnitten und in Krebs-Henseleit-Lösung in einem 4-Kammer-Myographen (Myograph 610; Danish Myo Technology) zwischen zwei Drähte gespannt (Abbildung 10). Die Därme wurden dann für 1 h in der Apertur belassen, um zu adaptieren.



**Abbildung 10 Myographie-Aperatur.** Der Darmabschnitt befindet sich in Krebslösung eingespannt von 2 Drähten, welche an Sensoren gekoppelt sind (A) und so die Darmkontraktionen aufzeichnen welche in Form von Kontraktionswellen dargestellt werden können (B).

Die Kontraktionen des Darms können in dieser Apertur gemessen und synchron als Kontraktionswellen am Bildschirm dargestellt werden (Abbildung 10). Der Einfluss verschiedener Reagenzien auf die Kontraktilität des Darms wurde gemessen. Zunächst wurde der Einfluss von *N*( $\omega$ )-nitro-*L*-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma, N5751; 200  $\mu$ M) und Carbachol (CCh) (Sigma, C4382; 10  $\mu$ M) auf die Aktivität der glatten Muskulatur des Darms analysiert und dargestellt als der prozentueller Anstieg des Kontraktionslevels. L-NAME ist ein bekannter Inhibitor der NO-Synthase [154] und sorgt so für einen Abfall der inhibierenden NO-Konzentration im Gewebe. Unter physiologischen Bedingungen wird die

Darmmuskulatur durch die konstante Ausschüttung des inhibitorischen Transmitters NO durch nitrerge Neurone gehemmt. Im intakten Darm sollte die Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME zu einer erhöhten Kontraktilität der glatten Muskulatur führen. Ist eine ausgeprägte Degeneration des Nervengewebes im Darm vorhanden, wird dadurch basal ohnehin schon weniger NO ausgeschüttet und der Effekt von L-NAME wäre in dem Fall gering.

Des Weiteren wurde eine Elektrofildstimulation (0,5 ms, 8 Hz) mit anschließender Gabe von L-NAME durchgeführt, um nicht nur die basale NO-Ausschüttung zu inhibieren, sondern auch die stimulierte NO-Ausschüttung. Die Elektrofildstimulation führt dazu, dass unspezifisch alle Transmitter ausgeschüttet werden, sowohl die inhibierenden als auch die aktivierenden. Wird dies kombiniert mit der Gabe von L-NAME, sollte die Kontraktion des Darms eine höhere Amplitude haben, da die Ausschüttung des inhibierenden NO gehemmt wird. Dieser Teil des Experiments kann Aufschluss geben über die Funktionalität der Neurone im Darm.

CCh als Strukturanalogen von Acetylcholin sollte durch Bindung an die Acetylcholin-Rezeptoren auf der glatten Muskulatur zu einer Kontraktion führen. Im Fall einer Degeneration oder Fibrose der Muskulatur sind weniger Rezeptoren für Acetylcholin vorhanden und der Effekt von CCh fällt gering aus.

Am Ende jedes Experiments wurde der unselektive Phosphodiesterase-Inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma, I5879; 100  $\mu$ M) eingesetzt, um eine komplette Erschlaffung der glatten Muskulatur auszulösen und ein Referenzwert für den entspannten Darm wurde generiert. Für die Analyse der Kontraktionskurven wurde die LabChart Software (ADInstruments) genutzt. Die Myographie-Experimente und Analysen wurden von Dr. Barbara Voußen (Physiologisches Institut, Universität Würzburg) durchgeführt.

### **2.2.13 Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien**

Es wurden Lysate aus folgenden Zelllinien hergestellt: einer postnatalen enterischen neuronalen Zelllinie aus H-2Kb-tsA58-transgenen Mäusen (zur Verfügung gestellt von Shanthi Srinivasan, Emory University, Atlanta, USA), einer enterischen Gliazelllinie aus Ratten (CRL-2690, zur Verfügung gestellt von Francois Cossais, Universität Kiel), einer murinen Mamakarzinom-Zelllinie (4T1), einer Fibrosarkom-Zelllinie (MT-6) und einer Pankreasendothel-Zelllinie (SVR) von ATCC.

Für die Herstellung der Lysate wurde NP40-Puffer genutzt (Invitrogen) (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Nonidet P40 (NP40), 0,02% NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF), um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Die Zellen wurden zunächst in eiskaltem PBS gewaschen und das Zellpellet dann in NP40 Puffer auf Eis gelöst. Jede 10 min. wurden die Zellen in dem Puffer gevortext. Nach Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 10 min. wurde der Überstand bei -80 °C gelagert.

### **2.2.14 Isolation von murinem Serum**

Den Mäusen wurde vor der Perfusion für die Gewebeanalysen Blut aus dem Herzen entnommen. Dafür wurde der Thorax eröffnet, das Sternum durchtrennt und das Perikard eröffnet. Nach dem Freilegen des Herzens wurde die V. cava durchtrennt, indem das Herz leicht angehoben wurde. Das aus der V. cava austretende Blut wurde mit einer 1 ml-Spritze (ohne Aufsatz) aus dem Thoraxraum gezogen. Das so gewonnene Blut wurde für 2 Tage bei 4°C in Eppendorf-Tubes stehen gelassen, sodass sich das Serum an der Oberfläche sammelte und die geronnenen zellulären Anteile als Sediment abfielen. Das Serum wurde von der Oberfläche abpipettiert und bei -80°C gelagert.

### 2.2.15 Muriner ELISA

Der Maus-ELISA wurde durchgeführt, um Serum-Antikörper der Mäuse gegen enterische Antigene und Kontrollantigene nachzuweisen.

ELISA-Maxisorb-Platten (Thermo Scientific) wurden über Nacht bei 4 °C *gecoatet* mit einem Lysat einer enterischen neuronalen Zelllinie aus H-2Kb-tsA58-transgenen Mäusen (6 µg/ml), einer enterischen Gliazelllinie aus Ratten (CRL-2690) (6µg/ml), murinem Apolipoprotein A-I (abcam, ab202174), *mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase 1* (DECRI; MyBioSource, MBS9229683), *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D* (eIF3D; BIORBYT, orb319154), *small nuclear ribonucleoprotein* (SmD2; abcam, ab104481), HEL (3 µg/ml) oder MP4 (3 µg/ml) in PBS. Als Kontrollantigene wurden die Lysate aus den murinen Tumorzelllinien von ATCC genutzt (alle 6 µg/ml).

Nach dem *coaten* wurden die ELISA-Platten dreimal mit PBS-0,05% Tween gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Platten mit 1 % Milchpulver in PBS-Tween für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Serumproben der Tiere wurden 1:1000 in 1 % Milchpulver verdünnt (für die DECRI, eIF3D und SmD2 ELISAs 1:100), nach dem Blocken auf die Platten pipettiert (100 µl pro *well*) und über Nacht bei 4 °C darauf belassen. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal gewaschen mit PBS-Tween und anschließend mit biotinyliertem anti-Maus-IgG (eBioscience, 13-4013-85) in 0,1 % Milchpulver in 1:800 Verdünnung und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen mit PBS-Tween und für 2 h bei Raumtemperatur mit Streptavidin-HRP (BD Biosciences) 1:1000 verdünnt in 0,1% Milchpulver, 100 µl pro *well* inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Tween und PBS wurde 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) als Substrat in die *wells* pipettiert und die Entwicklung wurde nach wenigen Minuten gestoppt mit 25 %-iger Schwefelsäure. Die optische Dichte wurde ausgelesen mit einem Perkin Elmer Victor 3 1420 Multilabel Zähler mit einer Wallac 1420 Software Version 3.00,

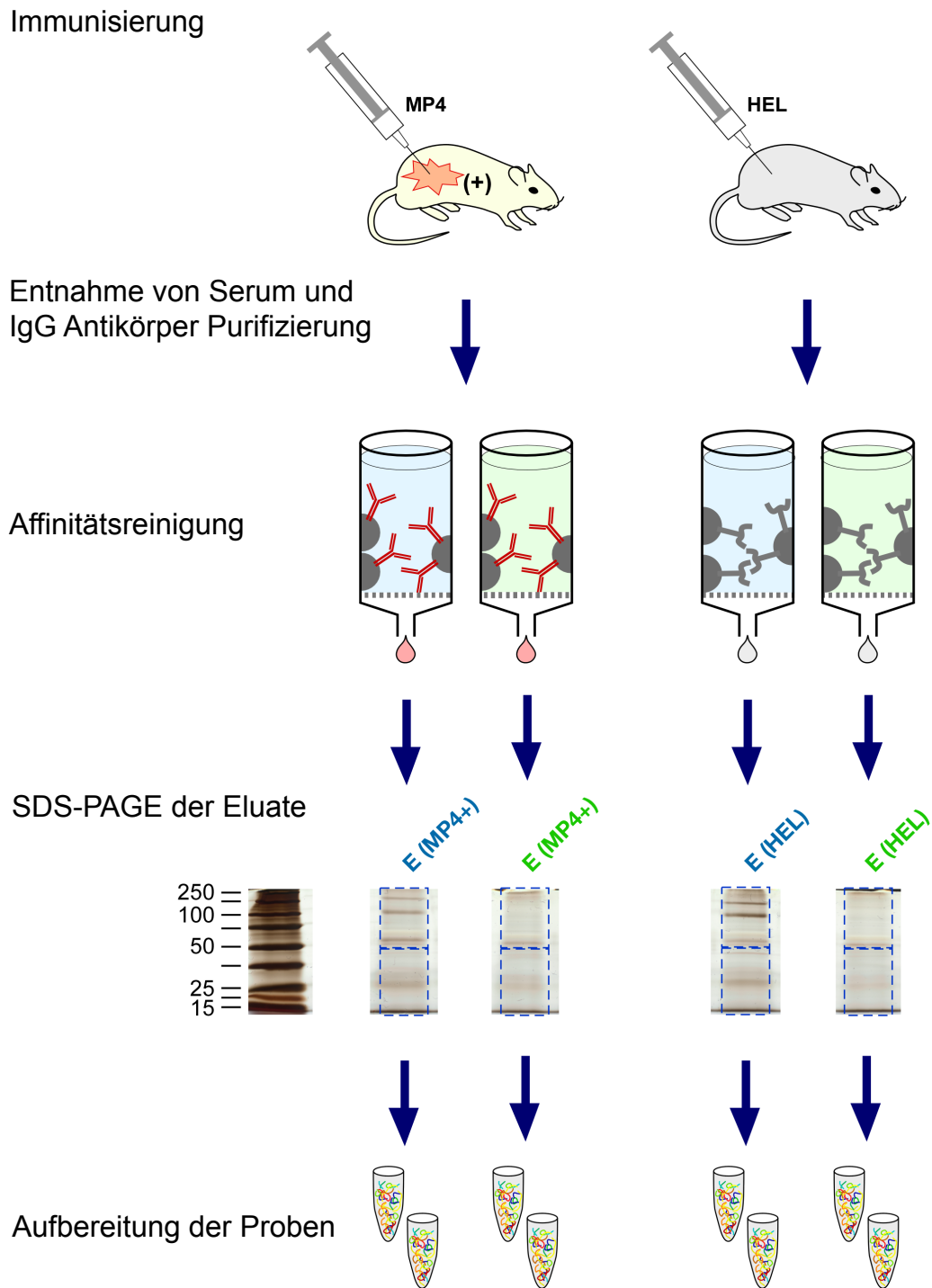
Revision 5. Die Antigene wurden in Duplikaten *gecoatet*; daher wurde im Anschluss ein Mittelwert der optischen Dichte für zwei Wells berechnet.

### **2.2.16 Immunpräzipitation und Massenspektrometrie**

Um mögliche Zielantigene der Immunantwort im Darm zu finden, wurde von der Firma Logopharm (March, Deutschland) eine Immunpräzipitation und anschließende Massenspektrometrie durchgeführt. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass die Serumantikörper direkt genutzt werden, um das Zielantigen aus einem ENS-Lysat zu isolieren (Abbildung 11). Die anschließende Massenspektrometrie wurde dann genutzt, um das Zielantigen zu identifizieren.

Für die Immunpräzipitation wurde Serum von den Tieren genutzt, die im ELISA stark positiv auf die ENS-Lysate reagiert hatten. Serum von  $n = 5$  MP4-immunisierten Mäusen wurden gepoolt und als Kontrolle wurde Serum von  $n = 4$  HEL-immunisierten Mäusen gepoolt. Für die Isolation der IgG-Antikörper aus den gepoolten Seren wurde das resin-basierte Purifikationskit von Abcam genutzt (Abcam ab128745, Cambridge, UK).

Die Firma Logopharm koppelte in Folge  $20 \mu\text{g}$  der IgG an Beads. Die immobilisierten IgG wurden dann inkubiert mit 1 ml der Zellysate. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und über eine SDS-Page getrennt und eine Silberfärbung wurde durchgeführt. Die Banden auf der SDS-Page wurden ausgeschnitten und die Proteine in Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide wurden extrahiert, gelöst und in einem LC-MS/MS Gerät (Ultimate 3000 nano-HPLC mit Orbitrap Velos Elite, Thermo Scientific) analysiert. Um die Peptide zu identifizieren, wurden die MS/MS Daten in einer Swiss-Prot/UniProt-Database gesucht unter Benutzung von MASCOT (Matrix Science).



**Abbildung 11 Identifikation der enterischen Zielantigene.** IgG aus gepoolten Seren von MP4-immunisierten Mäusen und HEL-immunisierten Kontrollen wurde immobilisiert und mit Lysaten der enterischen neuronalen Zelllinie (blaue Schrift) und enterischen Gliazelllinie (grüne Schrift) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und die gewonnenen Proben in der Massenspektrometrie identifiziert. Die Abbildung wurde erstellt von Dr. Uwe Schulte (Logopharm, March, Deutschland) und anschließend modifiziert. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

### **2.2.17 Patienten**

In die Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen eine MS nach den 2010 McDonald-Kriterien diagnostiziert wurde. Die Ausschlusskriterien waren vergangene oder aktuelle schwere systemische oder psychiatrische Erkrankungen oder andere Autoimmunerkrankungen. Patienten, welche Plasmapherese oder anti-B-Zell-Therapie erhielten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die schriftlichen Einverständniserklärungen aller Patienten und gesunden Kontrollen liegen vor. Tabelle 5 zeigt die Patientencharakteristika. Für die ELISA-Experimente ist ein positives Ethikvotum der Universität Köln vorhanden (Ziffer 10-221).

Paraffinschnitte von fixierten humanem Darmresektaten von MS-Patienten stammen vom Institut für Pathologie des Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim und Darmresektate von Nicht-MS-Kontrollen stammen aus dem Institut für Anatomie der Universität Erlangen-Nürnberg. Für die immunhistochemischen Färbungen der Darmresektate ist ein positives Ethikvotum der Universität Würzburg (Ziffer 81/14) und der Universität Erlangen-Nürnberg (Ziffer 2550) vorhanden.

### **2.2.18 Immunhistochemie der humanen Darmresektate**

Die Schnitte wurden entparaffiniert, dehydriert und demaskiert in 10 mM Citratpuffer. Darin wurden die Schnitte 6 min. in der Mikrowelle gekocht. Die Schnitte wurden 35 min. bei Raumtemperatur im Citratpuffer belassen und danach 5 min. unter fließendem destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Zum Blocken wurde 5% NGS in PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Schnitte pipettiert. Folgende Antikörper wurden in Folge verwendet: anti-CD3 (abcam, ab16669; Verdünnung 1:500), anti-CD20 (Thermo Scientific, PA5-16701; Verdünnung 1:400), anti-Iba1 (Wako, 019-19741; Verdünnung 1:250), anti- $\beta$ III-Tubulin (abcam, ab78078; Verdünnung 1:2000)



und anti-GFAP (Sigma, G3893; Verdünnung 1:2,000) in PBS. Die Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und die entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper goat anti-rat Cy3 (Dianova, 65-006; Verdünnung 1:600), goat anti-mouse Cy5 (Dianova, 115-175-071; Verdünnung 1:400), goat anti-rabbit Cy3 (Dianova, 111-165-006; Verdünnung 1:600) und goat anti-rabbit Cy5 (Dianova, 111-175-144; Verdünnung 1:400) auf die Schnitte pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit DAPI als Kernmarker inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit NPG eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Keyence Bioevo BZ-9000 Mikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland).

### **2.2.19 Humaner ELISA**

Für den humanen ELISA wurden die ELISA-Platten *gecoatet* mit einem kommerziell erhältlichen humanen Dünndarmlysate (Novus Biologicals, NB820-59255) sowie mit den 3 Zielantigenen, die in der Immunpräzipitation/Massenspektrometrie identifiziert wurden: DECR1 (antibodies-online, ABIN2128859), SmD2 (Biomatik, RPC141174) und humanes Apolipoprotein A-I (abcam, ab90760). Die Antigene wurden alle 10 µg/ml verdünnt in PBS und in Duplikaten über Nacht bei 4°C auf die Platte gebracht. Danach wurden die Platten dreimal gewaschen mit PBS-0,05% Tween und unspezifische Bindungen wurden geblockt mit 1% Milchpulver in PBS-Tween für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Das Patientenserum wurde 1:100 verdünnt in 1% Milchpulver und über Nacht bei 4 °C auf der Platte belassen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde der Sekundärantikörper auf die Platte pipettiert. Dafür wurde biotinyliertes anti-humanes IgG aus der Maus (Mabtech, 3850-6-250, 0,1 µg/ml) für die Apolipoprotein A-I- und die SmD2-Platten verwendet und biotinyliertes anti-humanes IgG aus der Maus (Sigma, B3773, 1:20,000) für die Dünndarmlysate- und

DECRI-Platten. Der Sekundärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C auf den Platten belassen. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS-Tween gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Streptavidin-HRP (BD Biosciences) 1:1000 verdünnt in 0,1% Milchpulver (100 µl pro *well*) inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Tween und PBS wurde TMB-Substrat in die *wells* pipettiert und die Entwicklung wurde nach wenigen Minuten mit 25% Schwefelsäure gestoppt.

Für die Detektion von Serumantikörpern gegen eIF3D wurde ein ELISA-Kit verwendet (MyBioSource, MBS9318039).

Die optische Dichte wurde ausgelesen mit einem Perkin Elmer Victor 3 1420 Multilabel Zähler mit einer Wallac 1420 software Version 3.00, Revision 5. Die Antigene wurden in Duplikaten *gecoatet*, daher wurde im Anschluss ein Mittelwert der optischen Dichte für zwei *wells* berechnet.

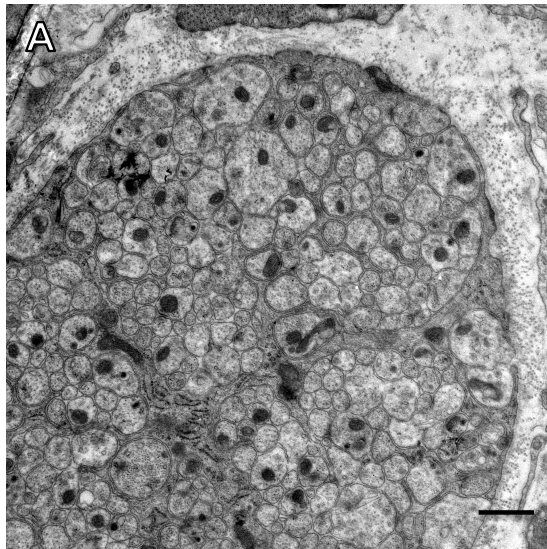
### 2.2.20 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Wurden mehr als zwei Gruppen untereinander verglichen, wurde zunächst ein Test auf Normalverteilung der Daten (D'Agostino-Pearson Test und Shapiro-Wilk-Test) durchgeführt. Waren die Daten normal verteilt, wurde ein ANOVA-Test durchgeführt. Waren die Daten nicht normal verteilt, wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde in drei Stufen unterteilt:  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$  und  $***P \leq 0.001$ . Um die Korrelationen der optischen Dichte der ELISA-Experimente zu analysieren, wurde eine Spearman's Korrelation berechnet.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Inflammation des Plexus myentericus in MP4-immunisierten Mäusen**

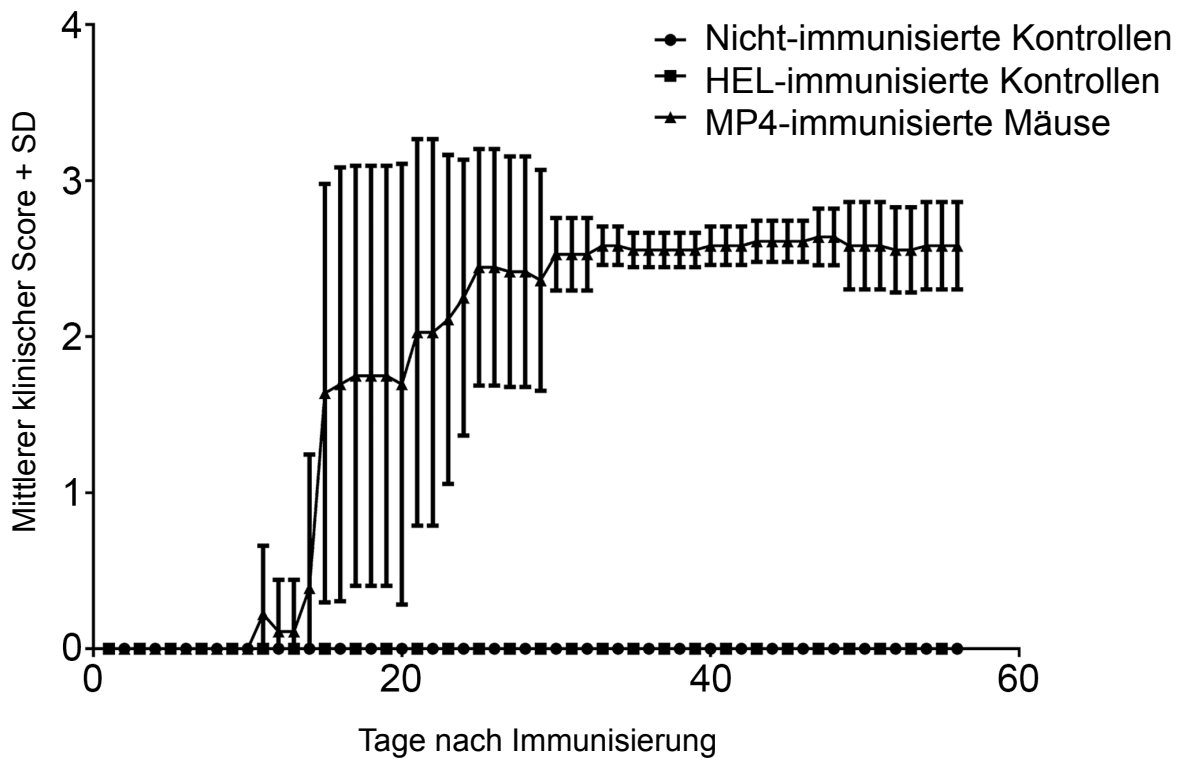
Da PLP von enterischen Gliazellen exprimiert wird, war es Ziel dieser Studie herauszufinden, ob EAE-Tiere durch die Immunisierung mit dem MBP-PLP-Fusionsprotein MP4 eine Immunpathologie des ENS entwickeln. Neben den MP4-immunisierten Mäusen war es notwendig, eine adäquate Kontrollgruppe mit einzuschließen. Zum einen wurden nicht-immunisierte Kontrollen genutzt. Des Weiteren sollten Kontrolltiere integriert werden, die zwar eine Immunisierung erhalten hatten, welche CFA und Pertussis einschließt, jedoch mit einem körperfremden Antigen, welches keine Autoimmunantwort gegen körpereigene Strukturen hervorruft. Zunächst wurde dazu eine Immunisierung mit Ovalbumin (OVA) durchgeführt. Die Tiere wiesen ultrastrukturell intakte Plexus myentericus auf (Abbildung 12). Im ELISA zeigten die Tiere jedoch eine Antikörperantwort gegen das enterische neuronale Proteinlysate (OD 0,698 +/- 0,707). Die MP4-immunisierten Mäuse zeigten ähnliche Antikörpertiter (OD 0,983 +/- 0,386). Daher wurden als Kontrollgruppe HEL-immunisierte Tiere verwendet. In diesen Tieren wurde keine Degeneration oder Gliose des Plexus myentericus gefunden (Abbildung 17). Außerdem besaßen die Tiere keine Serumreaktivität gegen das enterische neuronale Lysat und das enterische Glialysat und es konnte immunhistochemisch keine Infiltration von Lymphozyten in die Plexus nachgewiesen werden (Abbildung 14 und Abbildung 22).



<b>B</b>	<b>OD enterisches neuronales Lysat</b>	<b>OD MP4</b>
Chronisch 1	1,33	0,29
Chronisch 2	1,09	1,80
Chronisch 3	0,33	0,83
Chronisch 4	1,18	2,66
OVA 1	0,17	0,13
OVA 2	2,06	0,03
OVA 3	0,21	0,02
OVA 4	0,71	0,18
OVA 5	0,34	0,22

**Abbildung 12 ENS-Antikörperreaktivität in OVA-immunisierten Mäusen.** Die Ultrastruktur des Plexus myentericus in OVA-immunisierten Mäusen war unauffällig (A), es konnten jedoch Serumantikörper gegen das enterische neuronale Lysat sowohl in MP4-immunisierten Mäusen als auch in OVA-immunisierten Mäusen gefunden werden. Antikörper gegen MP4 wurden nur in den MP4-immunisierten Tieren gefunden (B).

Um den Erfolg der MP4-Immunsierung zu verifizieren, wurde zunächst ein Profil des klinischen Scores der MP4-immunisierten Mäuse und der Kontrollmäuse erstellt. Es wurde bei  $n = 9$  MP4-immunisierten Mäusen,  $n = 7$  HEL-immunisierten Mäusen und  $n = 7$  nicht-immunisierten Mäusen über 56 Tage alle zwei Tage der Score bestimmt. Die ersten klinischen Symptome der EAE traten in den MP4-immunisierten Mäusen zwischen Tag 14 und Tag 20 nach Immunisierung auf. An Tag 30 waren alle Tiere mit einem mittleren Score von  $2,42 \pm 0,22$  erkrankt. Der Verlauf der MP4-induzierten EAE war chronisch, d.h. der klinische Score blieb nach dem Peak der Erkrankung relativ konstant und es traten keine Schübe auf (Abbildung 13).

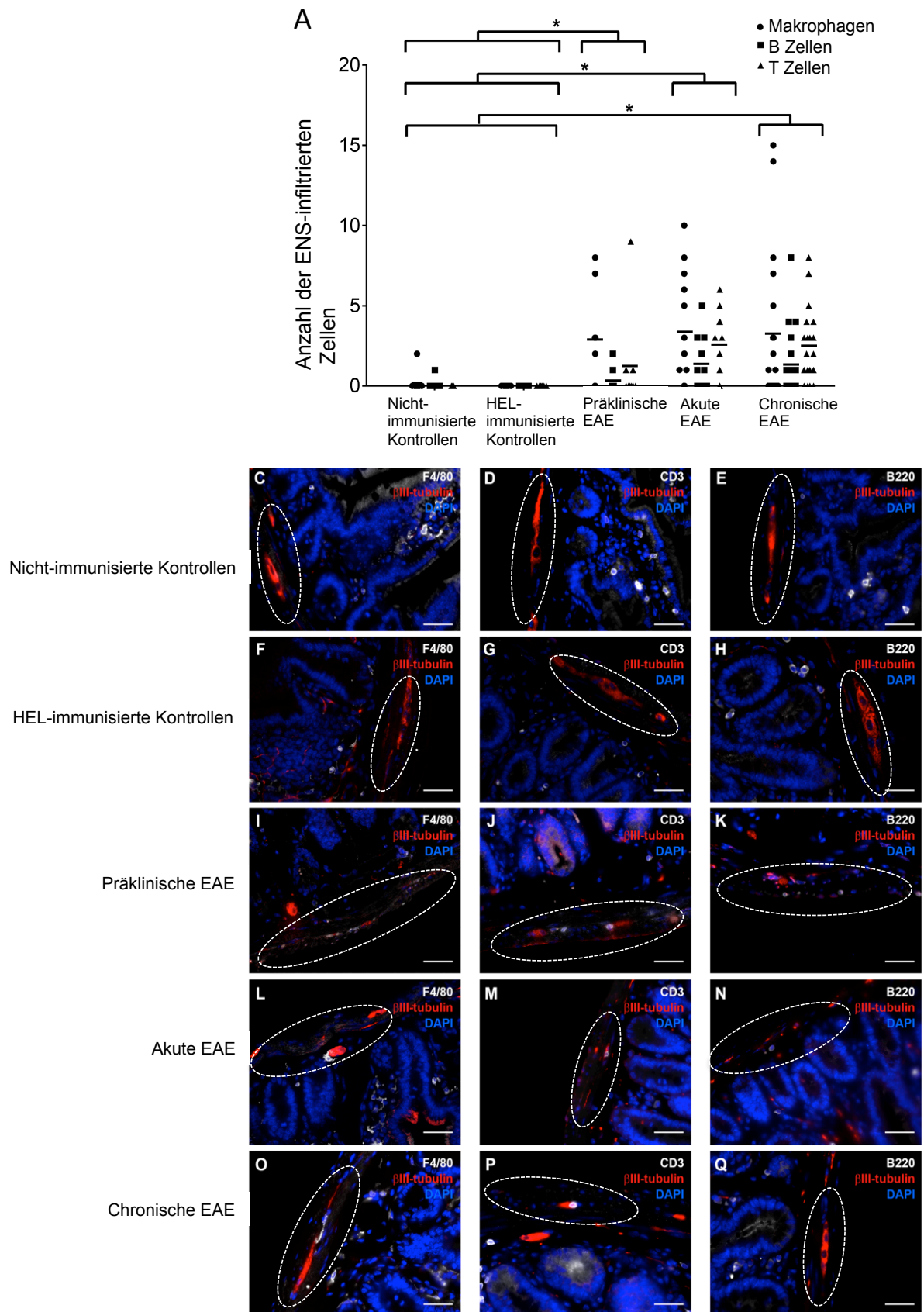


**Abbildung 13 Klinischer Score der MP4-immunisierten Mäuse und Kontrolltiere.** B6 Mäuse wurden immunisiert mit MP4 (n = 9), HEL (n = 7) oder blieben nicht-immunisiert (n = 7). MP4-immunisierte Mäuse entwickelten die klinischen Zeichen einer chronischen EAE. Abgebildet ist der mittlere klinische Score +/- Standardabweichung für jede Gruppe. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

In einem anderen Experiment wurde den Mäuse dann in verschiedenen Stadien der Erkrankung der Dünndarm und das Gehirn entnommen und immunhistochemisch untersucht. Abbildung 14 zeigt den Plexus myentericus dieser Tiere. Mäusen im chronischen Stadium der EAE (n = 19) wurde an Tag 40 nach Immunisierung der Dünndarm entnommen und immunhistochemisch analysiert. Mäusen der akuten EAE-Gruppe (n = 14) wurde an Tag 5 nach dem Peak der Erkrankung der Dünndarm entnommen. Für die Analyse der präklinischen EAE-Tiere (n = 10) wurden nach der MP4-immunsierung sechs Mäuse in einem Käfig gehalten. Sobald eine Maus im Käfig die ersten Symptome der EAE zeigte, wurde den anderen fünf Tieren der Dünndarm entnommen und immunhistochemisch analysiert. Außerdem wurden n = 9 nicht-immunisierte Kontrolltiere und n = 8 HEL-immunisierte Tiere eingeschlossen. Der Dünndarm der Tiere wurde nach der Perfusion mit 4 % PFA nachfixiert,

in Paraffin eingebettet und die Schnitte immunhistochemisch gefärbt. Es wurden T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen mittels anti-CD3-, anti-B220- und anti-F4/80-Antikörpern detektiert. Außerdem wurde das Nervengewebe mit anti- $\beta$ III-Tubulin-Antikörpern gefärbt. Es wurde die Anzahl der infiltrierten Immunzellen in das Nervengewebe des Plexus myentericus bestimmt (Abbildung 14 A). In den nicht-immunisierten Kontrolltieren wurden 0,22 +/- 0,63 Makrophagen, 0,11 +/- 0,31 B-Zellen und keine T-Zellen im Plexus gefunden. Die HEL-immunisierten Tiere wiesen keine Makrophagen, B-Zellen oder T-Zellen im Plexus myentericus auf. Die präklinischen EAE-Tiere zeigten 2,88 +/- 2,76 Makrophagen, 0,33 +/- 0,66 B-Zellen und 1,22 +/- 2,78 T-Zellen im Plexus myentericus. In den akuten EAE-Tieren konnten 3,36 +/- 3,15 Makrophagen, 1,36 +/- 1,5 B-Zellen und 2,57 +/- 1,84 T-Zellen im Plexus myentericus nachgewiesen werden. Die chronischen EAE-Tiere zeigten 3,26 +/- 4,53 Makrophagen, 1,32 +/- 2,05 B-Zellen und 2,53 +/- 2,26 T-Zellen im Plexus myentericus.

In allen Tieren konnten Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen in der Mucosa nachgewiesen werden (Abbildung 14 C-Q). Hier bilden die Lymphozyten und Makrophagen das GALT und sammeln sich vor allem in der Lamina propria. In den MP4-immunisierten Tieren konnten T-Zellen und Makrophagen jedoch auch im Plexus myentericus gefunden werden. Abbildung 14 L-Q zeigt bei den akuten und chronischen EAE-Tieren eine Infiltration von inflammatorischen Zellen in das Nervengewebe des Plexus myentericus. Diese Zellen sind schon in der präklinischen Phase im Plexus myentericus zu finden, und die Anzahl der infiltrierten Zellen erhöht sich mit Fortschreiten der EAE.

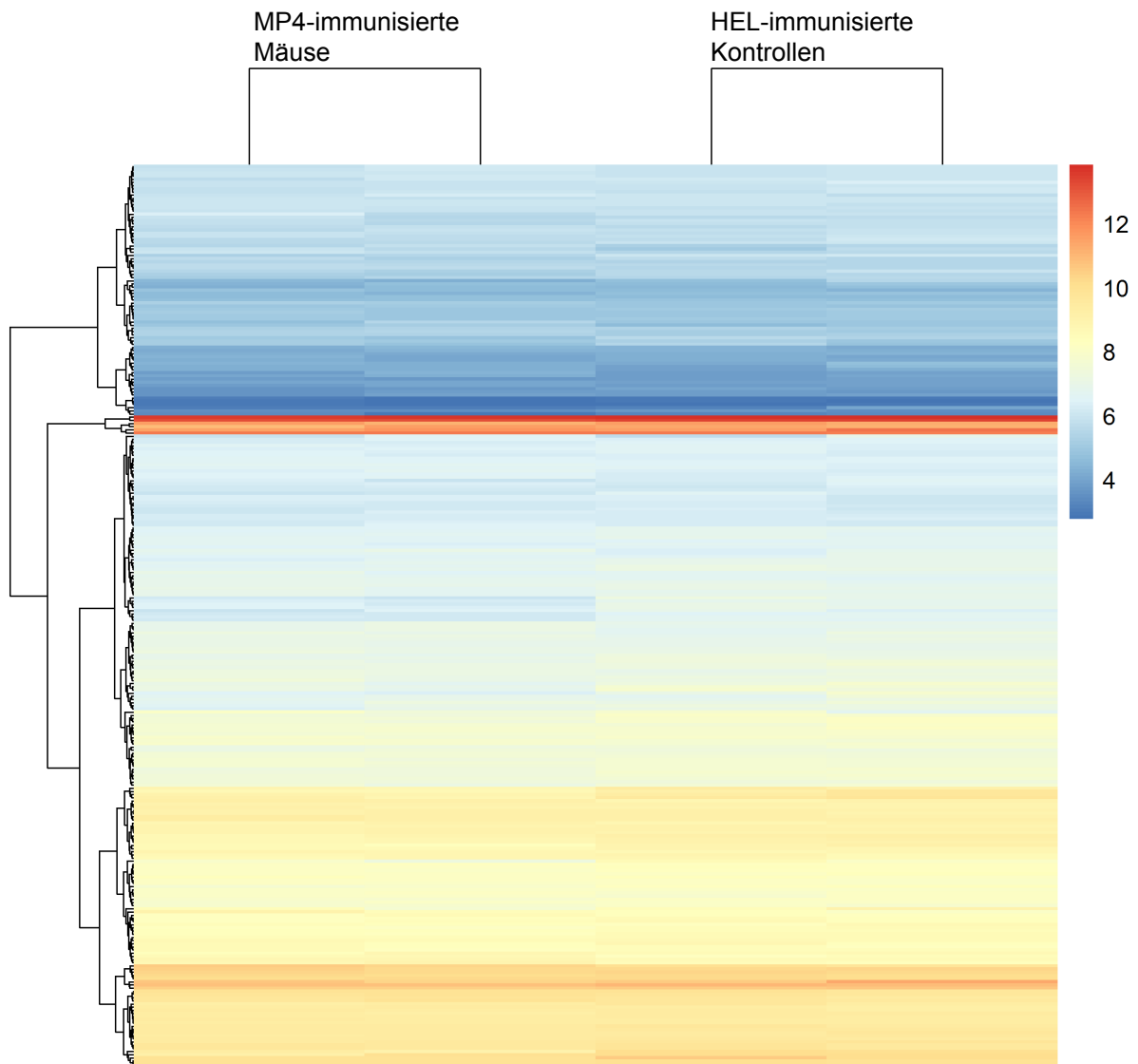


**Abbildung 14 Infiltration von inflammatorischen Zellen in den Plexus myentericus von MP4-immunisierten Mäusen.** MP4-immunisierte Mäuse wurden exekutiert an Tag 40 nach Immunisierung

(chronische EAE), 5 Tage nach dem Peak der Erkrankung (akute EAE) und vor Einsetzen der klinischen Symptome (präklinische EAE). Außerdem wurden HEL-immunisierte Kontrolltiere und nicht-immunisierte Kontrolltiere eingeschlossen. Paraffinschnitte des Dünndarms wurden gefärbt mit anti-F4/80 um Makrophagen zu zeigen, anti-CD3 um T-Zellen zu färben, anti-B220 um B-Zellen zu färben und anti- $\beta$ III-Tubulin um Nervengewebe darzustellen. Die Anzahl der infiltrierten Zellen in das Nervengewebe des Plexus myentericus wurde bestimmt (A) sowie repräsentative Aufnahmen für jede Gruppe erstellt (C-Q). Der Plexus myentericus wurde auf den repräsentativen Aufnahmen in weiß umrandet. Der Messbalken stellt 50  $\mu$ m dar. \* $p \leq 0.05$ . Aus Wunsch et al., 2017 [155].

Insgesamt waren nur vereinzelte lose Zellen im Plexus myentericus zu sehen ohne Zellverbund. In der Lamina propria befinden sich in der Maus bis zu  $160 \times 10^5$  Lymphozyten [156]. Die vereinzelt Lymphozyten im Plexus myentericus der MP4-immunisierten Mäuse waren im Vergleich dazu verschwindend gering. Es handelt sich also um eine sehr schwache Inflammation. Dies spiegelte sich auch im RNA-Expressionsprofil wider. Hierfür wurde ein ca. 2 cm langer Dünndarmabschnitt von  $n = 2$  akuten EAE-Tieren und  $n = 2$  HEL-immunisierten Kontrollen lysiert und die RNA extrahiert. Ein RNA Expressionsprofil wurde erstellt, indem Gene analysiert wurden, die bei einer Inflammation hochexprimiert werden und unter anderem für Vasodilatation, Ödembildung und Akkumulation von Lymphozyten verantwortlich sind (die Liste der Gene kann unter der Gene-Ontology-Terms Nummer: GO:0006954 nachvollzogen werden). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektiert werden (Abbildung 15).

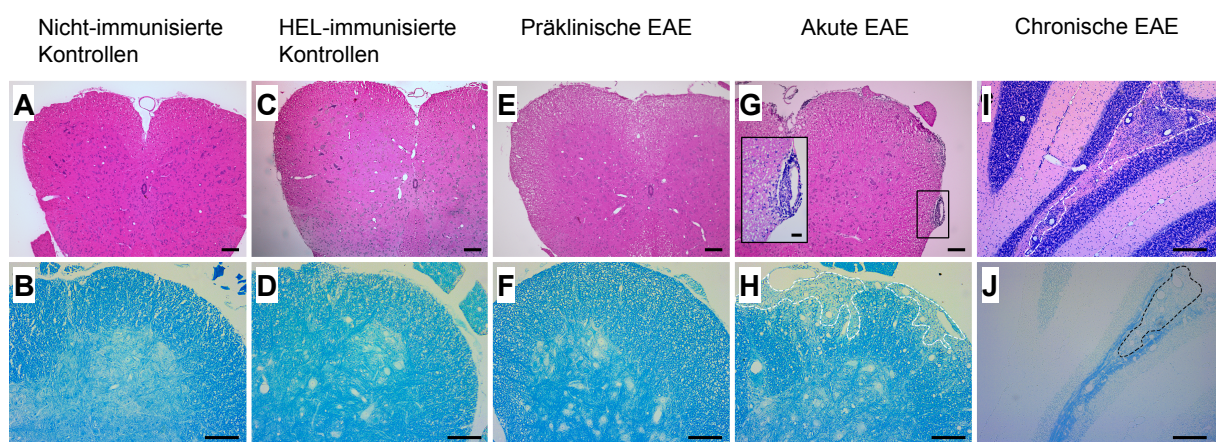




**Abbildung 15 RNA Expressionsprofil des Dünndarmgewebes.** RNA wurde isoliert aus schockgefrorenem Dünndarmgewebe von  $n = 2$  MP4-immunisierten Mäusen im akutem Krankheitsstadium und  $n = 2$  HEL-immunisierten Kontrollen. Eine Auswahl von inflammatorischen Genen (Gene-Ontology-Terms GO:0006954) wurde analysiert und zwischen den Gruppen verglichen. Es waren keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel vorhanden. Abbildung erstellt von Dr. Claus Scholz. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

Wie gering die Inflammation des Plexus myentericus in den MP4-immunisierten Mäusen ist, wird besonders deutlich, wenn man sich im Vergleich das ZNS dieser Tiere anschaut. Dort finden sich dicht gepackte, perivaskuläre Zellinfiltrate, die einige hundert Immunzellen enthalten können. Abbildung 16 zeigt repräsentative Aufnahmen des Rückenmarks (A, C, E, G) sowie des Kleinhirns (I) in einer HE-Färbung und Luxol-Fast-Blue-Färbung (B, D, F, H,

J). Die HE-Färbung färbt Zellkerne dunkel an, sodass Zellinfiltrationen dargestellt werden. Die Luxol-Fast-Blue-Färbung färbt das Myelin, so dass Demyelinisierung durch schwächere Färbung in den Läsionsgebieten detektierbar ist. Zu sehen sind die dichten Zellinfiltrationen in das Rückenmark bei akuten EAE-Tieren (G) und ausgedehnte Kleinhirninfiltrationen bei chronischen EAE-Tieren (I). Diese Zellinfiltrationen waren kolokalisiert mit Demyelinisierung (H und J). Die präklinischen EAE-Tiere wiesen keine ZNS-Pathologie auf.



**Abbildung 16 Repräsentative Aufnahmen des ZNS von MP4-immunisierten Mäusen und Kontrolltieren.** Paraffinschnitte des Rückenmarks (A, C, E, G) und des Kleinhirns (I) wurden HE-gefärbt und Luxol-Fast-Blue (B, D, F, H, J) gefärbt. Eingeschlossen wurden nicht-immunisierte Kontrollen, HEL-immunisierte Kontrollen, präklinische EAE Tiere, akute EAE Tiere und chronische EAE Tiere. Infiltrationen von Immunzellen und Demyelinisierung wurde in akuten und chronischen EAE Tieren gefunden. Läsionsgebiete sind umkreist. Der Messbalken stellt 50 um dar. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

### 3.2 Axonpathologie im Plexus myentericus von MP4-immunisierten Mäusen

PLP wird von enterischen Gliazellen exprimiert und es gibt keine Hinweise darauf, dass PLP auch von enterischen Neuronen exprimiert wird [91]. Dennoch ist es denkbar, dass auch die Neurone unspezifisch durch die Inflammation im Plexus myentericus geschädigt werden. Außerdem könnten die enterischen Neurone auch direkt Ziel der Immunreaktion in der EAE durch eine Ausweitung der Immunantwort auf neuronale Antigene sein (im Rahmen des

*epitope spreading*). Um zu untersuchen, ob enterische Neurone degeneriert sind, wurden ultrastrukturelle Analysen durchgeführt. Die typische Morphologie des Plexus myentericus in nicht-immunisierten und HEL-immunisierten Mäusen ist in Abbildung 17 A und B dargestellt. Dabei sind die einzelnen Nervenfasern gut abgrenzbar, die Membranen sind durchgängig intakt, und es ist ein kompaktes Axoplasma mit intakten Zellorganellen wie Mitochondrien erkennbar. Zwischen den dicht gepackten Axonen sind die Ausläufer der enterischen Glia und Schwann-Zellen zu erkennen. Innerhalb der Plexus befinden sich keine Blutgefäße, Bindegewebe oder Kollagenfibrillen. Die Plexus sind umgeben von einer Basallamina, welche in Abbildung 17 A und B durchgängig und intakt ist. Außerhalb dieser Basallamina befinden sich kollagenes Bindegewebe, vereinzelte Fibroblasten und Blutgefäße. Die Struktur des Plexus myentericus der MP4-immunisierten Mäuse war jedoch verändert. Schon vor Beginn der neurologischen Symptome (in der präklinischen Kohorte) konnte ultrastrukturell eine Degeneration des Plexus festgestellt werden. Die Axone zeigten einen axolytischen Phänotyp mit einer Auflösung der Membran und Auflockerung des Zytoplasmas und der Neurofibrillen (Abbildung 17 C roter Pfeil). Außerdem waren Spalträume im Plexus entstanden, die auf eine Ödembildung hinweisen. Diese Spalträume zeichneten sich dadurch aus, dass sie nicht klar abgegrenzt vom umliegenden Gewebe waren, sondern einhergingen mit einer Auflösung des Gewebes und eine diffuse aufgelockerte Begrenzung aufwiesen. Spalträume im Gewebe können auch fixationsbedingt entstehen oder wenn die Konzentration der Perfusionslösung nicht isotonisch ist. Diese Spalträume konnten auch in den Kontrolltieren vereinzelt gesehen werden, sie gingen jedoch nicht einher mit einer Auflösung/Schädigung des Gewebes, sondern waren klar abgegrenzt und das umliegende Gewebe war intakt.

Die ENS-Pathologie in den MP4-immunisierten Mäusen zeigte eine ansteigende Tendenz mit Fortschritt der Erkrankung. In der akuten Phase kam es zu einer Ausweitung der Spalträume im Gewebe mit einer allgemeinen Auflockerung der Gewebestruktur. Die einzelnen Axone

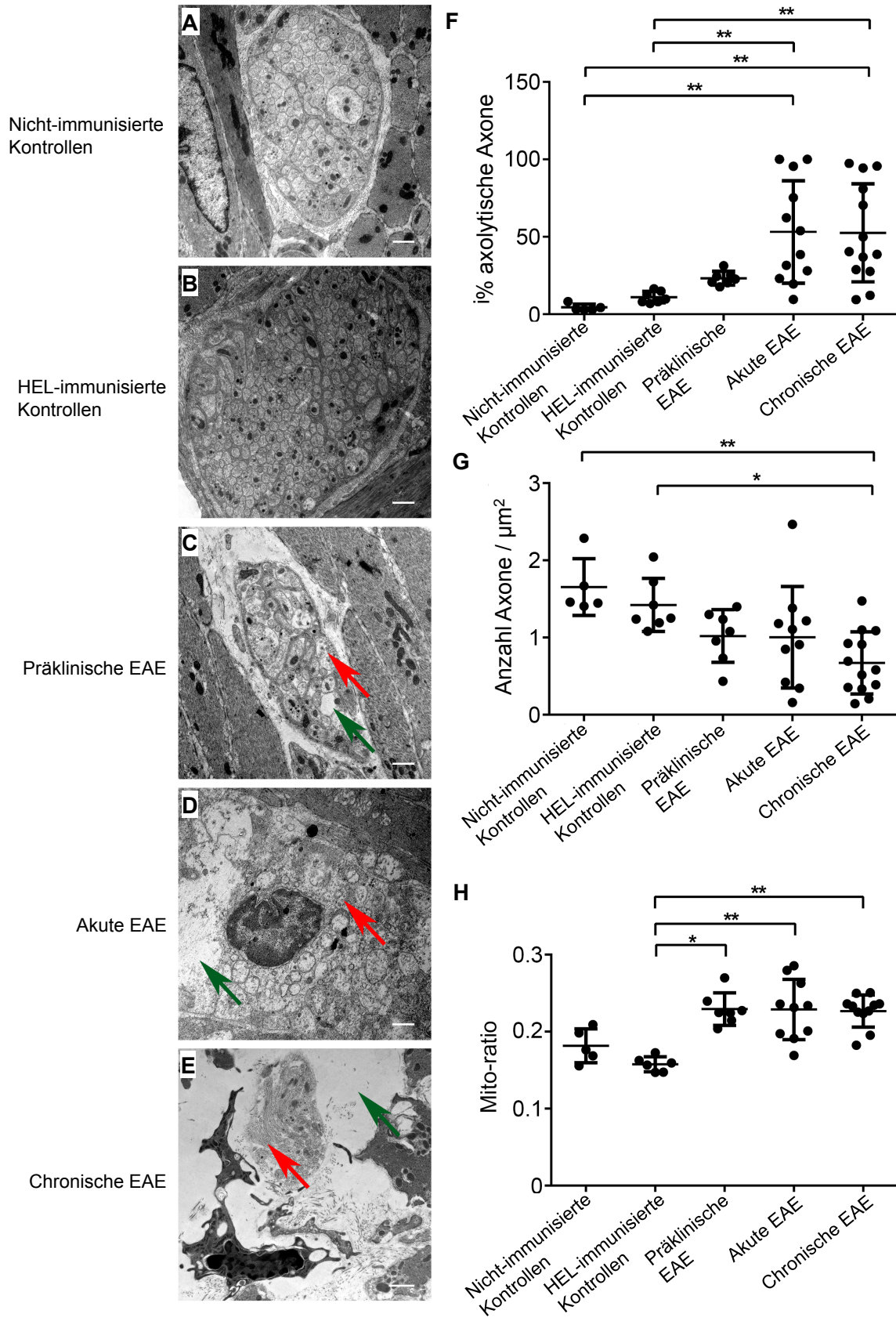
konnten teilweise nicht mehr voneinander abgegrenzt werden, da sie vollständig degeneriert waren und sich die Membranen aufgelöst hatten. In der chronischen Phase war der gesamte Plexus teilweise vollständig degeneriert (Abbildung 17 E) und durch kollagenes Bindegewebe ersetzt. Dabei war die Basallamina aufgelöst und auch die einzelnen Nervenfasern degeneriert. Vereinzelt konnte auch eine Infiltration von Zellen in den Plexus beobachtet werden.

Die Auswertungen der ultrastrukturellen Aufnahmen sind in Abbildung 17 F-H gezeigt. Die Anzahl der axolytischen Axone wurde als Prozent der Gesamtanzahl der Axone innerhalb eines Plexus bestimmt. Die nicht-immunisierten Tiere zeigten im Mittel 4,405 +/- 2,19 % axolytische Axone, die HEL-immunisierte Kontrollen 11 +/- 3,726 %, die präklinischen EAE-Tiere 23,22 +/- 4,416 %, die akuten EAE-Tiere 53,13 +/- 33,02 % und die chronischen EAE-Tiere 52,55 +/- 31,66 %.

Die Quantifizierung der axolytischen Axone gibt Aufschluss darüber, in welchem Ausmaß sich die Axone im Prozess der Degeneration befinden. Um nun auch auszuwerten, wie viele Axone bereits degeneriert und untergegangen sind, wurde die Anzahl der Axone pro  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Es konnte ein kontinuierlicher Verlust von Axonen im Plexus myentericus mit fortschreitender EAE detektiert werden (Abbildung 17 G). Die nicht-immunisierten Kontrollmäuse besaßen im Mittel 1,654 +/- 0,368 Axone pro  $\mu\text{m}^2$ , die HEL-immunisierten Kontrollen 1,421 +/- 0,344, die präklinischen EAE-Tiere 1,02 +/- 0,342, die akuten EAE-Tiere 1,003 +/- 0,657 und die chronischen EAE-Tiere 0,6705 +/- 0,402.

Ein weiterer Marker für axonalen Schaden ist eine Vergrößerung der Mitochondrien [8, 157, 158]. Um dies zu quantifizieren, wurde die Mito-Ratio bestimmt. Dafür wurde die Größe der Mitochondrien in einem Axon in Verhältnis zu der Gesamtfläche des Axons gesetzt. Abbildung 17 H zeigt eine signifikante Vergrößerung der Mitochondrien schon in den präklinischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Vergrößerung der

Mitochondrien war in den akuten und chronischen EAE-Tieren noch ausgeprägter. Die nicht-immunisierte Kontrollen zeigten eine Mito-Ratio von 0,182 +/- 0,02, die HEL-immunisierten Kontrollen 0,158 +/- 0,01, die präklinischen EAE-Tiere 0,229 +/- 0,02, die akuten EAE-Tiere 0,229 +/- 0,04 und die chronischen EAE-Tiere 0,227 +/- 0,02.



**Abbildung 17 Axonpathologie im ENS der MP4-immunisierten Mäuse.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Plexus myentericus von MP4-immunisierten oder Kontroll-immunisierten

Mäusen (A-E). Die roten Pfeile markieren Axone, welche axolytisch sind. Die grünen Pfeile zeigen auf ödematöse Spalträume innerhalb des Plexus. Die Quantifizierungen der ultrastrukturellen Aufnahmen sind dargestellt in F-H wobei jeder Punkt eine individuelle Maus darstellt. Die Messbalken stellen 1  $\mu\text{m}$  dar. \* $p \leq 0.05$  und \*\* $p \leq 0.01$ . Aus Wunsch et al., 2017 [155].

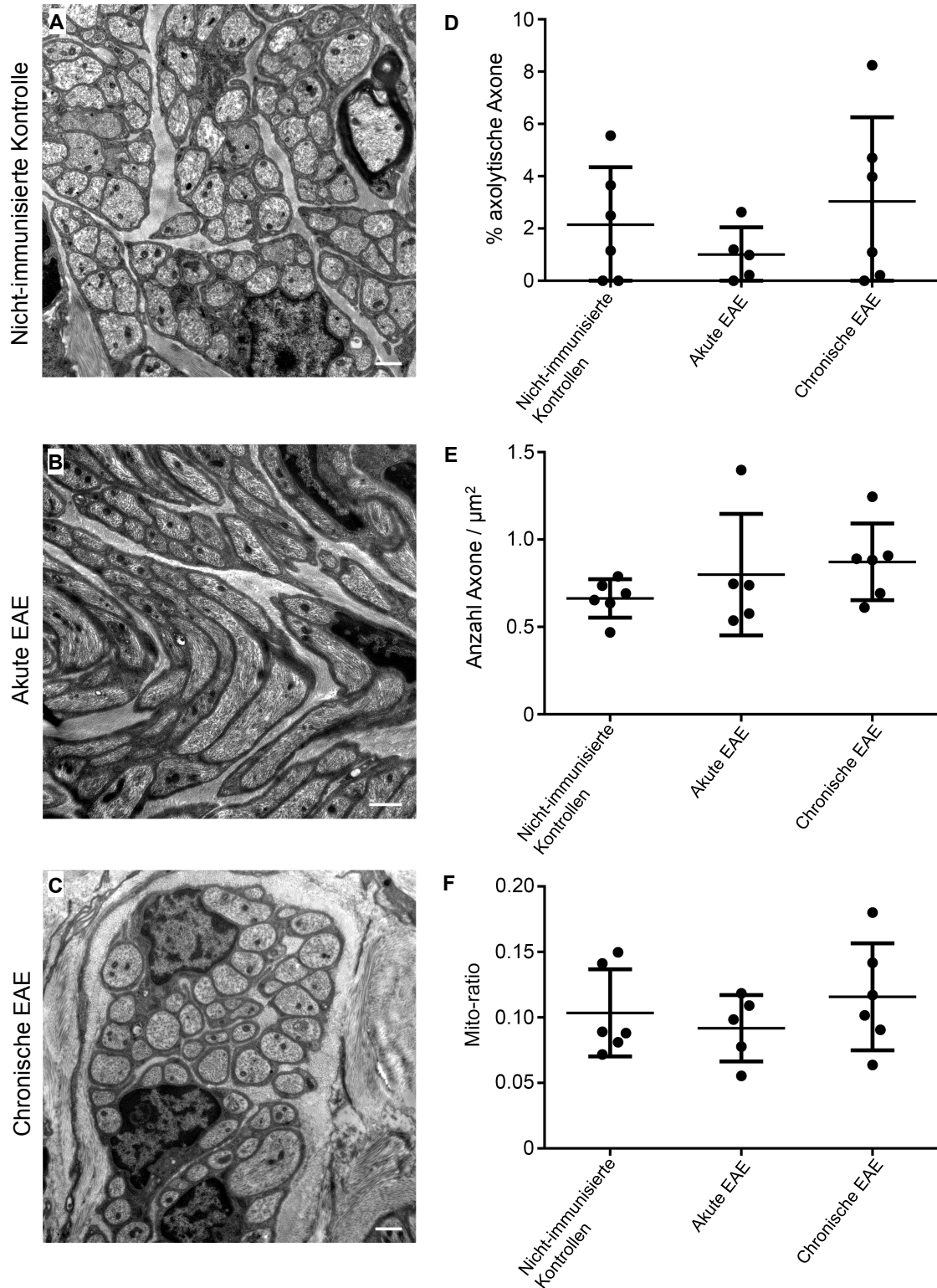
### **3.3 Das autonome Nervensystem in der MP4-induzierten EAE**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die oben beschriebene ENS-Pathologie in den MP4-immunisierten Mäusen direkt auf den Autoimmunprozess zurückzuführen waren und spezifisch das ENS-Ziel der Autoimmunreaktion ist, oder ob auch das autonome/periphere Nervensystem betroffen war. Falls das autonome Nervensystem in MP4-immunisierten Mäusen ebenfalls eine Pathologie ausweist, würde dies dafür sprechen, dass die Degeneration des ENS nur als Epiphänomen auftritt.

Um das autonome Nervensystem zu untersuchen, wurde zunächst das Nervengewebe in der Blasenwand von  $n = 6$  nicht-immunisierten Kontrolltieren,  $n = 5$  akuten EAE-Tieren und  $n = 6$  chronischen EAE-Tieren untersucht. Abbildung 18 A-C zeigt repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen. Die einzelnen Nervenfasern ließen sich gut voneinander abgrenzen und die Membranen waren intakt. Wie zu sehen, handelt es sich um nicht-myelinisierte Nervenfasern und zwischen einzelnen Nervenbündeln sind die Ausläufer der Schwann-Zellen zu erkennen. Außerdem sind vereinzelte Zellkerne von Schwann-Zellen vorhanden. Das Axoplasma ist intakt und kompakt. Es waren keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und MP4-immunisierten Tieren zu erkennen. Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, wurden der prozentuale Anteil der axolytischen Axone (D), die Anzahl der Axone pro  $\mu\text{m}^2$  (E) und die Mito-Ratio (F) bestimmt. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden. Die Anzahl der Axone pro  $\mu\text{m}^2$  betrug bei den nicht-immunisierten Kontrollen  $0,662 \pm 0,099$ , bei den akuten EAE-Tieren  $0,824 \pm 0,315$  und bei den chronischen EAE-Tieren  $0,797 \pm 0,121$ . Der prozentuale Anteil der

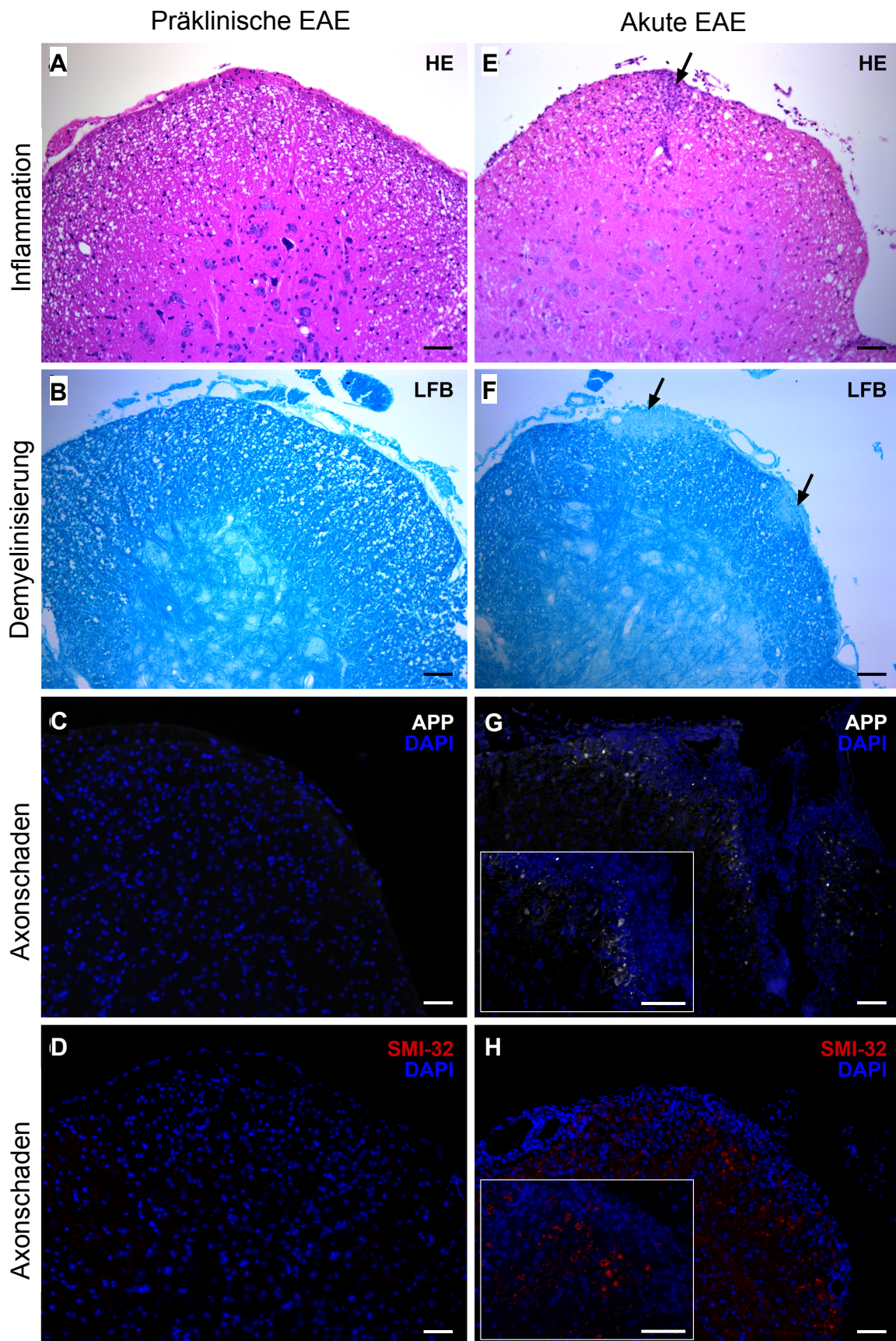
axolytischen Axonen an der Gesamtanzahl der Axone war bei den nicht-immunisierten Kontrollen  $2,143 \pm 2,009$ , bei den akuten EAE-Tieren  $1,006 \pm 0,929$  und bei den chronischen EAE-Tieren  $3,040 \pm 2,936$ . Die Mito-Ratio betrug bei den nicht-immunisierten Kontrollen  $0,104 \pm 0,03$ , bei den akuten EAE-Tieren  $0,101 \pm 0,015$  und bei den chronischen EAE-Tieren  $0,111 \pm 0,039$ .





**Abbildung 18** Ultrastrukturelle Analyse des autonomen Nervensystems in der Blasenwand von nicht-immunisierten und MP4-immunisierten Tieren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Nervenfasern sind dargestellt in A-C. Die Quantifizierung der axolytischen Axone in Prozent der Gesamtanzahl der Axone (D), die Anzahl der Axone pro  $\mu\text{m}^2$  (E) und die Mito-ratio (F) sind dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Messbalken stellen  $1\mu\text{m}$  dar. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

Die pathologischen Veränderungen des ENS konnten bereits in den präklinischen EAE-Tieren nachgewiesen werden, also bevor die ersten neurologischen Symptome auftraten. Dennoch könnte vermutet werden, dass es nach der Immunisierung mit MP4 zu einer Schädigung des kaudalen Rückenmarks und damit zu einer fehlenden Impulsweiterleitung des ZNS zum ENS kommt, was sekundär zu einer Degeneration des ENS führt. Um dies auszuschließen und zu zeigen, dass das ENS direkt Ziel der Autoimmunreaktion ist, wurden histologische und immunhistochemische Färbungen des kaudalen Rückenmarks von n = 7 präklinischen und n = 4 akuten EAE-Tieren durchgeführt. Es wurden HE-Färbungen durchgeführt, um die Infiltration von Zellen nachzuweisen, Luxol-Fast-Blue-Färbungen um Demyelinisierung zu zeigen sowie Färbungen mit anti-APP- und SMI-32-Antikörpern als Marker für Axonschaden. APP wird in intakten Axonen entlang des Zytoskeletts transportiert und lässt sich immunhistochemisch nicht nachweisen. Im Fall eines Axonschadens und einem damit zusammenhängenden Verlust des Zytoskeletts kann APP nicht abtransportiert werden, akkumuliert an den geschädigten Stellen und ist immunhistochemisch nachweisbar [159]. SMI-32 färbt die leichten und schweren Epitope des nicht-phosphorylierten Neurofilaments, welches von geschädigten Axonen exprimiert wird [160]. In keinem der präklinischen EAE-Tiere konnten Inflammation, Demyelinisierung oder Axonschaden nachgewiesen werden (Abbildung 19 A-D). Alle dieser Tiere zeigten jedoch eine ENS-Pathologie. In den akuten EAE-Tieren waren in der HE-Färbung Infiltrationen von Zellen erkennbar (Abbildung 19 E), was assoziiert war mit einem Verlust von Myelin (Abbildung 19 F). Ebenso konnte eine Aggregation von APP in der weißen Substanz des Rückenmarks sowie eine SMI-32 Expression detektiert werden (Abbildung 19 G und H).



**Abbildung 19** Histologische und immunhistochemische Färbungen des kaudalen Rückenmarks. Paraffinschnitte von n = 7 präklinischen und n = 4 akuten EAE-Tieren wurden HE gefärbt (A, E), um

Inflammation zu zeigen (der Pfeil deutet auf die Infiltration von Zellen) sowie LFB gefärbt (B, F), um Demyelinisierung zu zeigen (der Pfeil deutet auf die weißen Flächen, welche durch den Verlust von Myelin entstehen). Immunhistochemische Färbungen von APP (C, G) und SMI-32 (D, H) detektieren axonalen Schaden (Vergrößerungen in G und H). Die Messbalken stellen 50  $\mu\text{m}$  dar. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

### **3.4 Muskelatrophie und Fibrose der Darmwand in MP4-immunisierten Mäusen**

Die Erhaltung und Funktionalität von Muskelgewebe wird durch die neuronale Innervation ermöglicht. Acetylcholin ausgeschüttet von Neuronen der neuromuskulären Endplatte bindet an die Acetylcholinrezeptoren auf den Muskelfasern und führt zu einer Kontraktion der Muskulatur. Kommt es zu einer Unterbrechung des neuronalen Inputs, erhält die Muskulatur also zu wenig Stimuli, führt dies sekundär zu einer Atrophie der Muskulatur.

Ob dieses Phänomen auch durch die Neurodegeneration des Plexus myentericus in MP4-immunisierten Mäusen auftritt, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden. Dafür wurde eine Goldner-Trichrom-Färbung durchgeführt, welche die Muskulatur in rot darstellt und Bindegewebe in grün. Abbildung 20 A zeigt einen Darmquerschnitt einer HEL-immunisierten Kontrollmaus. Die Tunica muscularis ist durchgehend in rot gefärbt. Die Tunica submucosa weitestgehend in grün. Die Muskelschicht der chronischen EAE-Maus zeigt eine ausgeprägte Muskelatrophie mit einer Fibrose der Muskulatur. Hier ist die Muskulatur stellenweise grün angefärbt.

Diese Muskelatrophie konnte auch elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Zwischen den einzelnen Muskelfasern der EAE-Mäuse hatten sich Spalträume gebildet, welche kollagenes Bindegewebe beinhalteten. Die HEL-immunisierte Kontrollmäuse zeigten keine Spalträume zwischen den Muskelfasern (Abbildung 20 C und D). Immunhistochemische  $\beta$ III-Tubulin-Färbungen zeigten eine signifikante Abnahme des  $\beta$ III-Tubulin-positiven Nervengewebes in EAE-Tieren. Für die Quantifizierung wurde die  $\beta$ III-Tubulin-positive Fläche in der Tunica muscularis ausgemessen und geteilt durch die gesamte Muskelfläche. Dabei konnte eine



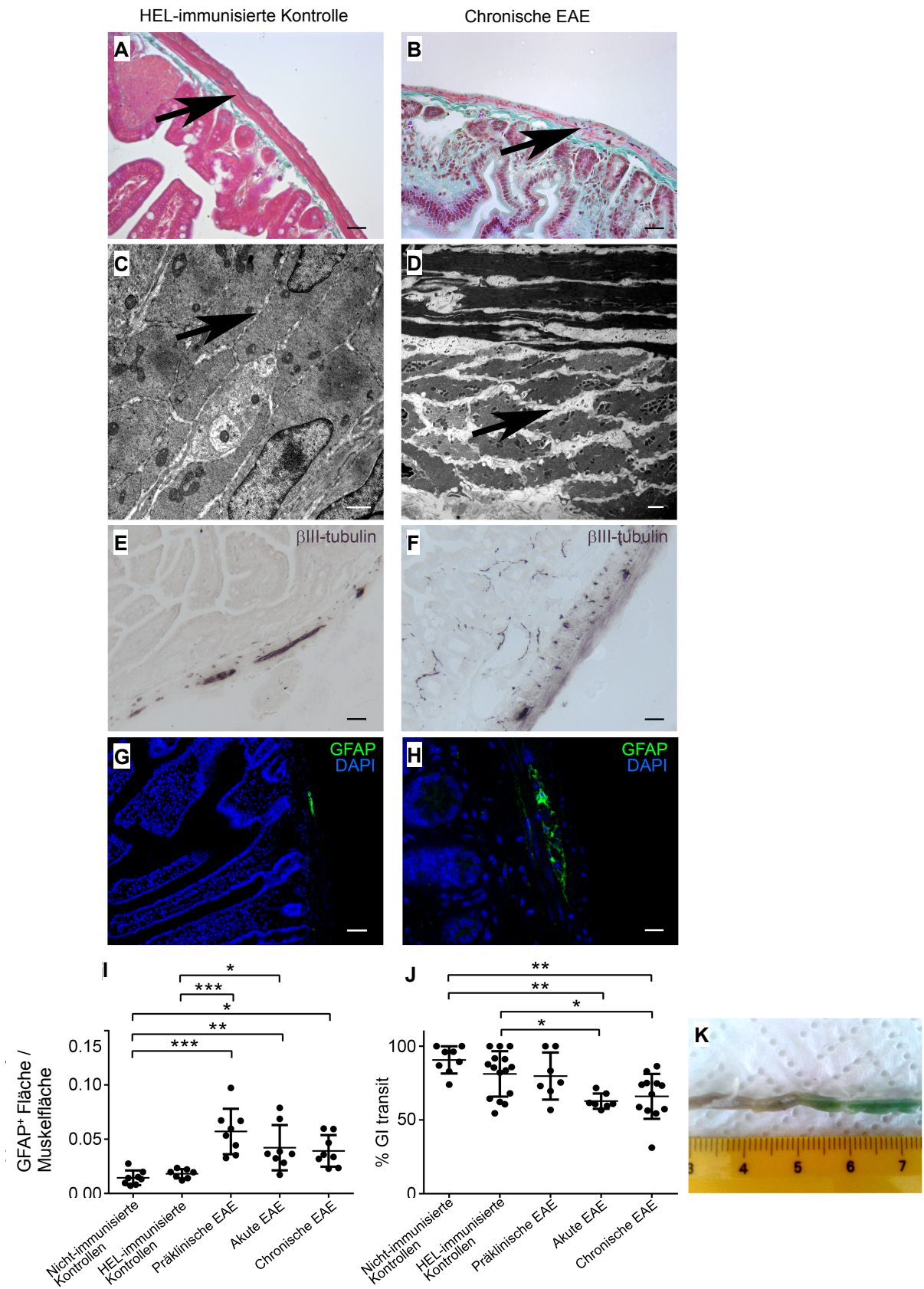
signifikante Reduktion des Nervengewebes in akuten und chronischen EAE-Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. In den nicht-immunisierten Kontrollen betrug die relative  $\beta$ III-Tubulin-positive Fläche 0,0725 +/- 0,014, in den HEL-immunisierten Kontrollen 0,0872 +/- 0,026, in den präklinischen EAE-Tieren 0,0875 +/- 0,0219, in den akuten EAE-Tieren 0,055 +/- 0,0215 und in den chronischen EAE-Tieren 0,0476 +/- 0,0165. Diese Ergebnisse stützen die Ergebnisse aus den ultrastrukturellen Analysen, die eine Neurodegeneration gezeigt haben.

Wie in der Einleitung beschrieben, können enterische Gliazellen als Antwort auf Gewebeschädigung oder Inflammation proliferieren und das GFAP-Level erhöhen. Dies ist ein gut studiertes Phänomen, welches im ZNS von MS-Patienten auftritt und der MS ihren Namen gegeben hat [161-163]. Um eine mögliche Gliose im Plexus myentericus von MP4-immunisierten Mäusen und Kontrolltieren zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen GFAP durchgeführt. Abbildung 20 G und H zeigen repräsentative Bilder dieser Färbungen. Die GFAP<sup>+</sup> Fläche in der Tunica muscularis wurde ausgemessen und geteilt durch die Gesamtfläche der Tunica muscularis. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einem signifikanten Anstieg der GFAP<sup>+</sup> Fläche in allen drei EAE-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen kam. In den nicht-immunisierten Kontrolltieren betrug die relative GFAP<sup>+</sup> Fläche 0,0144 +/- 0,0067, in den HEL-immunisierten Tieren 0,0182 +/- 0,00425, in den präklinischen EAE-Tieren 0,057 +/- 0,0209, in den akuten EAE-Tieren 0,0422 +/- 0,0209 und in den chronischen EAE-Tieren 0,03923 +/- 0,0146.

### **3.5 Erniedrigte gastrointestinale Motilität in MP4-immunisierten Mäusen**

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es in der Darmwand der MP4-immunisierten Tiere zu einer Neurodegeneration, Glianarbenbildung, Atrophie der Muskulatur und Fibrose der Muskulatur kommt. Diese pathologischen Phänomene sollten zu funktionellen Einschränkungen der Darmperistaltik führen. Ob dies tatsächlich der Fall war,

wurde in einem Experiment zum gastrointestinalen Transit überprüft. Dafür wurde den Mäusen Lebensmittelfarbe über eine Sonde in den Magen gegeben und nach 25 min. der Gastrointestinaltrakt entfernt und gemessen, wie weit die Lebensmittelfarbe gewandert war. Diese Strecke wurde in Verhältnis gesetzt zur Gesamtlänge des Gastrointestinaltrakts. Abbildung 20 K zeigt ein exemplarische Aufnahme, auf der zu sehen ist, wie die Bande der Lebensmittelfarbe im Dünndarm ausgemessen wurde. Insgesamt kam es in den akuten und chronischen EAE-Tieren zu einer signifikanten Reduktion des gastrointestinalen Transits im Vergleich zu den Kontrollgruppen. In den präklinischen Mäusen war der gastrointestinale Transit vergleichbar mit den Kontrollen. Die nicht-immunisierten Kontrolltiere zeigten einen gastrointestinalen Transit von  $90,65 \pm 9,176\%$ , die HEL-immunisierten Kontrollen von  $81,15 \pm 15,38\%$ , die präklinischen EAE-Tiere von  $79,71 \pm 15,96\%$ , die akuten EAE-Tiere von  $62,71 \pm 5,183\%$  und die chronischen EAE-Tiere von  $65,98 \pm 15,21\%$ .



**Abbildung 20** Fibrotische Veränderungen des Dünndarms in MP4-immunisierten Mäusen. Repräsentative Aufnahmen von HEL-immunisierten Mäusen in der linken Spalte (A, C, E, G) und von MP4-immunisierten Mäusen in der chronischen Phase der EAE in der rechten Spalte (B, D, F, H). In A und B ist eine Masson-

Goldner-Färbung gezeigt, welche Muskelgewebe in rot anfärbt und Bindegewebe in grün. Die Pfeile deuten auf die Tunica muscularis, wo der Plexus myentericus zu sehen ist. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Tunica muscularis (das Bindegewebe ist durch Pfeile gekennzeichnet) (C, D). Immunhistochemische  $\beta$ III-Tubulin-Färbung, um Nervengewebe darzustellen (E, F). Immunhistochemische GFAP-Färbung, welche Gliazellen darstellt (G, H). Quantifizierung der GFAP Färbung (I). Der gastrointestinale Transit wurde in den unterschiedlichen Gruppen gemessen (J). Jeder Punkt stellt eine individuelle Maus dar. Repräsentative Aufnahme eines murinen Darms nach oraler Gabe der Lebensmittelfarbe, um den gastrointestinalen Transit zu bestimmen (K). Die Messbalken stellen 50  $\mu$ m dar, außer in Abbildungen C und D, hier 1  $\mu$ m. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  und \*\*\* $p \leq 0.001$ . Aus Wunsch et al., 2017 [155].

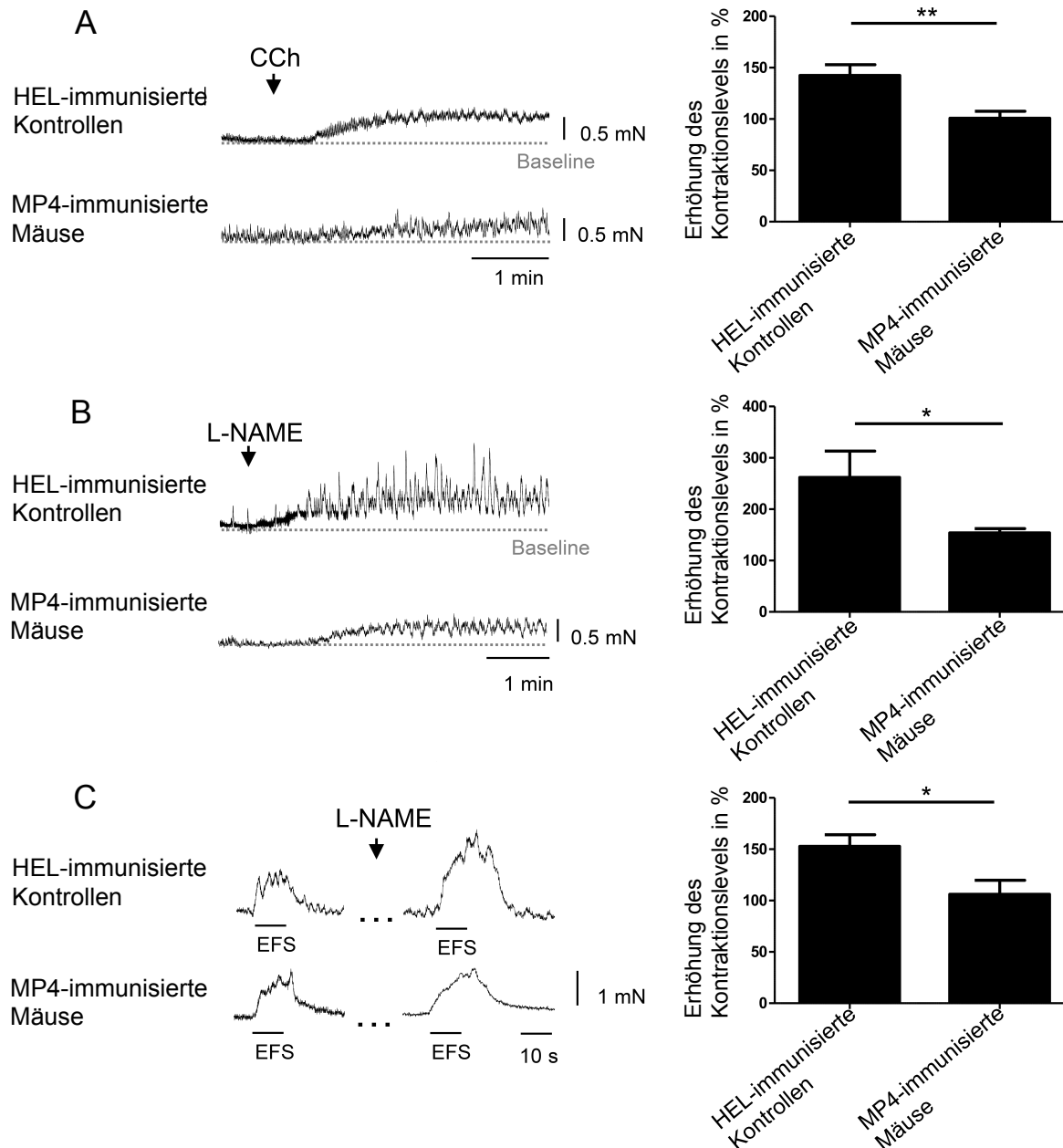
Um den Effekt der MP4-Immunsierung auf die Kontraktilität der Darmwand weiter zu spezifizieren, wurden Myographie-Experimente von Dr. Barbara Voussen (Universität Würzburg) durchgeführt. Dafür wurde von  $n = 6$  HEL-immunisierten Kontrollen und  $n = 6$  akuten EAE-Tieren ein ca. 1 cm breites Stück des Dünndarms entnommen und in begaste Ringerlösung überführt. Der Darm wurde in der Myographie-Aperatur zwischen zwei Drähte gespannt und die Kontraktionen der Darmwand aufgezeichnet. Zunächst wurde der Effekt von CCh auf die Kontraktionswellen analysiert. In den HEL-immunisierten Mäusen führte CCh zu einem Anstieg des Kontraktionslevels von  $142,4 \pm 20,915\%$ . Dieser Effekt war signifikant reduziert in den MP4-immunisierten Mäusen. Hier führte CCh zu einer Erhöhung des Kontraktionslevels um nur  $100,8 \pm 13,703\%$  (Abbildung 21 A). Die muskuläre Funktionalität war somit in den MP4-immunisierten Mäusen eingeschränkt, was sich in einer reduzierten cholinergen Signalweiterleitung äußert.

Des Weiteren wurde der Einfluss von L-NAME auf die Kontraktionslevels des Darms untersucht. Die Einspülung von L-NAME in die Ringerlösung führte in den Därmen der HEL-immunisierten Tieren zu einer Erhöhung des Kontraktionslevels um  $261,75 \pm 89,242\%$ . Bei den MP4-immunisierten Mäusen war der Effekt signifikant reduziert. Hier wurde eine Erhöhung des Kontraktionslevels um  $154 \pm 16,923 \%$  aufgezeichnet (Abbildung



21 B). In den MP4-immunisierten Mäusen war somit die basale NO Konzentration erniedrigt, was auf eine gestörte Funktion der nitrergen Neurone zurückgeführt werden kann.

Außerdem wurde eine Elektrofildstimulation (0,5 ms, 8 Hz) durchgeführt, was zu einer unspezifischen Ausschüttung aller Neurotransmitter führte. Da mehr aktivierende als inhibierende Neurotransmitter im Darm ausgeschüttet werden, führte die Elektrofildstimulation zunächst zu einem Anstieg des Kontraktionslevels. Anschließend wurde L-NAME eingespült, was in den HEL-immunisierten Tieren zu einer weiteren Erhöhung des Kontraktionslevels um  $152,429 \pm 27,73\%$  führte. Bei den MP4-immunisierten Mäusen war das Kontraktionslevel mit  $106,167 \pm 30,559\%$  signifikant erniedrigt (Abbildung 21 C). Dies war ein weiterer Hinweis für eine gestörte neuronale Funktionalität.

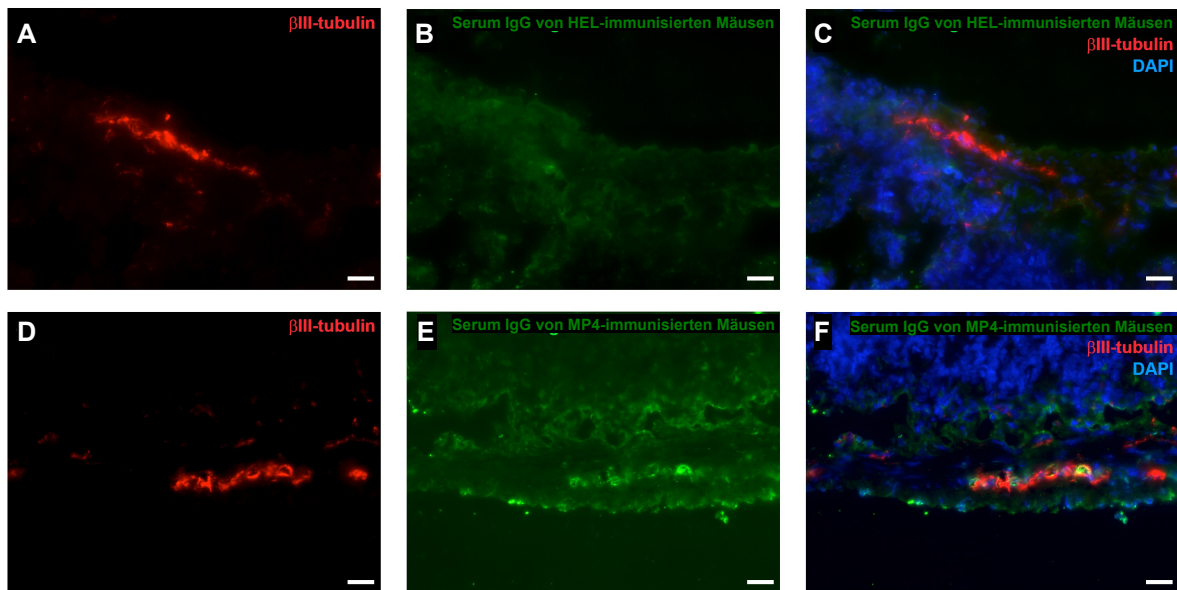


**Abbildung 21** Effekte von CCh, L-NAME und Elektrofildstimulation auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur (SM). Repräsentative Aufzeichnung der Kontraktionswellen (links) und statistische Analyse (rechts) der Kontraktionslevels des Ileum von HEL- und MP4-immunisierten Mäusen nach Einspülung von 10  $\mu$ M CCh (A) oder 200  $\mu$ M L-NAME (B). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 5$  Mäusen pro Gruppe ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ). Repräsentative Aufzeichnung der Kontraktionswellen (links) zeigt den Effekt der Elektrofildstimulation vor und nach der Gabe von L-NAME (200  $\mu$ M) auf die Kontraktionen der glatten Muskulatur (C). Die statistische Analyse (rechts) zeigt das Verhältnis der maximalen Kontraktion ausgelöst durch die Elektrofildstimulation vor und nach der Gabe von L-NAME. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 6$  Mäusen pro Gruppe ( $*p \leq 0.05$ ). Die Abbildung wurde von Dr. Barbara Vossen erstellt und anschließend von mir modifiziert. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

### **3.6 MP4-immunisierte Mäuse zeigen eine Antikörperreaktivität gegen enterische Neurone und enterische Gliazellen**

Es kann angenommen werden, dass das von den enterischen Gliazellen exprimierte PLP und MBP die primären Zielstrukturen der Autoimmunreaktion im Darm von MP4-immunisierten Mäusen sind. Chronische autoimmune Entzündung zeichnet sich jedoch auch dadurch aus, dass sich die Autoimmunreaktion gegen weitere Antigene ausweitet, die im entzündeten Gewebe vorliegen [97, 164]. Daher sollte zunächst geprüft werden, ob MP4-immunisierte Mäuse Serumantikörper gegen ein Zelllysate aus einer enterischen Gliazelllinie und einer enterischen neuronalen Zelllinie bilden. Im nächsten Schritt sollten dann die sekundären Zielantigene, welche durch *epitope spreading* entstanden sind, identifiziert werden.

Zunächst wurden aus gepoolten Seren von MP4- und HEL-immunisierten Mäusen die IgGs purifiziert. Diese purifizierten IgGs wurden auf Darmschnitte von nicht-immunisierten Kontrollmäusen inkubiert und die gebundenen IgGs mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper detektiert (Abbildung 22). Dabei wurde der Plexus myentericus von den Serum-IgGs der MP4-immunisierten Mäuse angefärbt, nicht jedoch durch die Serum-IgGs der HEL-immunisierten Mäuse.



**Abbildung 22 MP4-immunisierte Mäuse bilden ENS-spezifische Serumantikörper.** Purifiziertes Serum IgG von HEL-immunisierte Mäusen (A-C) und MP4-immunisierten Mäusen (D-F) wurde auf Dünndarmschnitten von nicht-immunisierten Kontrolltieren inkubiert. Es wurden Doppelfärbungen mit anti-βIII-Tubulin-Antikörpern durchgeführt um Nervengewebe zu markieren. Die Messbalken stellen 50  $\mu\text{m}$  dar. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

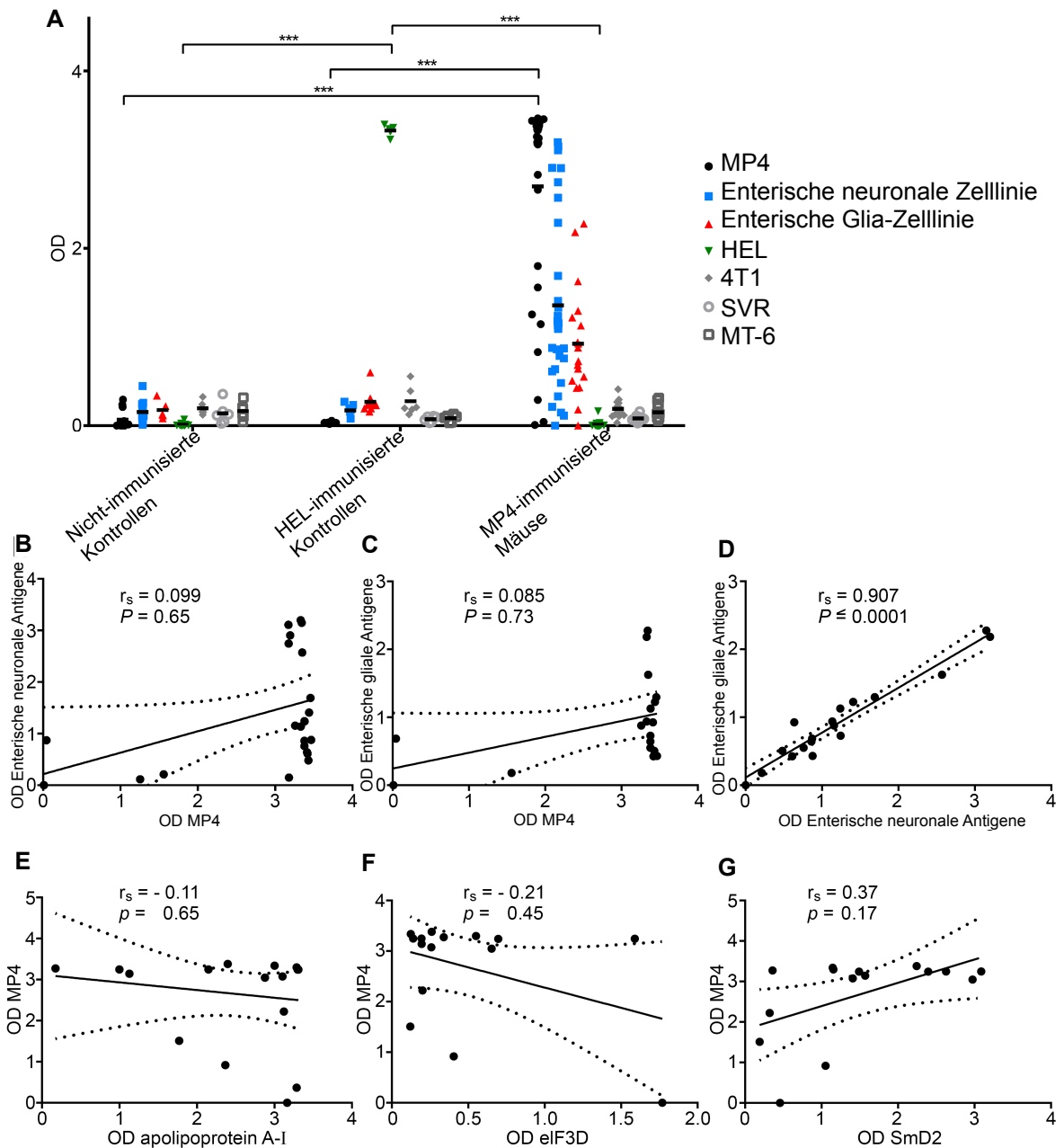
Um nun zelltyp-spezifische Antikörper zu detektieren, wurde ein Lysat aus einer enterischen neuronale Zelllinie und einer enterischen Gliazelllinie hergestellt und auf ELISA-Platten *gecoatet*. Als Kontrollproteine wurden Lysate aus einer murinen Mamakarzinomzelllinie (4T1), einer Fibrosarkomzelllinie (MT-6) und einer Pankreasendothelzelllinie (SVR) verwendet. Wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigten die nicht-immunisierten Tiere keine Serumreaktivität gegen die verschiedenen Antigene. Die HEL-immunisierten Tiere zeigten eine ausschließliche Antwort gegen HEL (OD 3,328  $\pm$  0,0522). Die MP4-immunisierten Tiere zeigten eine Antikörperreaktivität gegen enterische neuronale Proteine (OD 1,417  $\pm$  1,085), gegen die enterischen Gliaproteine (OD 0,8445  $\pm$  0,6383) und gegen MP4 (OD 2,897  $\pm$  1,042), nicht jedoch gegen die Kontrollproteine.

Würde es sich bei der Immunantwort gegen die enterischen neuronalen Proteine und die enterischen Gliaproteine um eine Kreuzreaktivität mit MP4 handeln, so müsste eine

Korrelation zwischen dem Antikörpertiter gegen die enterischen Proteine und MP4 existieren. Die Antikörper, die an MP4 binden, müssten in gleichem Umfang an die enterischen Proteine binden. Es wurde daher eine Korrelation für die individuellen Mäuse durchgeführt, wobei die MP4-spezifischen Antikörper-Titer mit den Titern gegen enterische Proteine korreliert wurden (Abbildung 23 B und C). Es konnte keine Korrelation der Antikörpertiter gezeigt werden. Weder zwischen MP4 und dem enterischen Gliazellysat, noch zwischen MP4 und dem enterischen neuronalen Lysat war eine Korrelation der Antikörpertiter vorhanden.

Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den Antikörpertitern gegen enterische neuronale Proteine und enterische Gliaproteine (Abbildung 23 D). Die Autoantikörper in den MP4-immunisierten Mäusen schienen also nicht nur PLP in den enterischen Zellysaten zu erkennen, sondern es schien auch eine Ausweitung der Immunantwort auf weitere Antigene stattgefunden zu haben. Diese Hypothese wird in den Folgeexperimenten weiter untersucht und, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, konnten vier Autoantigene des ENS in MP4-immunisierten Mäusen identifiziert werden: Apolipoprotein A-I, DECR1, SmD2 und eIF3D.

Um zu testen, ob diese Antigene eine Kreuzreaktivität mit MP4 aufweisen, wurden ebenfalls die Antikörpertiter korreliert. Abbildungen 23 E, F, G zeigen, dass keine Korrelation zwischen MP4 und Apolipoprotein A-I, eIF3D oder SmD2 existieren. Serumantikörper gegen DECR1 konnten im ELISA nicht detektiert werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass DECR1 nur als Peptid und nicht als Protein erhältlich war.



**Abbildung 23** Ergebnisse der ELISA Assays, um Serumantikörper Titer gegen ENS Antigene in MP4-immunisierten und HEL-immunisierten Mäusen zu bestimmen. Proteinlysate einer murinen Mamakarzinom-Zelllinie (4T1), einer Fibrosarkom-Zelllinie (MT-6) und einer Pankreasendothel-Zelllinie (SVR) wurden als Kontrollantigene verwendet. Symbole mit derselben Form repräsentieren die individuellen Mäuse. Korrelation zwischen den Antikörper Titern gegen enterische neuronale Antigene und MP4 (H), enterische Glia-Antigene und MP4 (I) und enterische neuronale Antigene und enterische Glia-Antigene (J) in individuellen Mäusen. K-M Korrelation zwischen Antikörpertitern gegen MP4 und Apolipoprotein A-I (K), eIF3D (L) oder SmD2 (M) in individuellen Mäusen. \*\*\* $p \leq 0.001$ . Aus Wunsch et al., 2017 [155].

### 3.7 Autoantikörper in MP4-immunisierten Mäusen binden an enterische Autoantigene

Im Folgenden sollten die Autoantigene in den enterischen Zelllysaten identifiziert werden. Dafür wurden die Lysate der enterischen neuronalen Zelllinie und enterischen Gliazelllinie mit purifiziertem IgG von MP4-immunisierten Mäusen (Serum gewonnen 30 Tage nach Immunisierung) und von HEL-immunisierten Mäusen inkubiert. Für die IgG-Purifizierung wurden Seren von n = 5 MP4- und n = 4 HEL-immunisierten Mäusen gepoolt. Die von den IgGs gebundenen Antigene wurden von der Firma Logopharm isoliert und DECR1, SmD2, EIF3D wurden aus dem Lysat der enterischen neuronalen Zelllinie präzipitiert. Apolipoprotein A-I wurde aus beiden Zelllysaten präzipitiert. Es konnten keine Autoantikörper gegen diese Antigene in den Seren der HEL-immunisierten Mäuse gefunden werden. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Autoantikörper in MP4-immunisierten Mäusen, die an enterische Proteine binden, nicht PLP-spezifisch sind. Es scheint also ein *epitope spreading* stattgefunden zu haben.

	Enterische neuronale Zelllinie	Enterische Gliazelllinie
Apolipoprotein A-I	+	+
DECR1	+	-
Sm D2	+	-
EIF3D	+	-

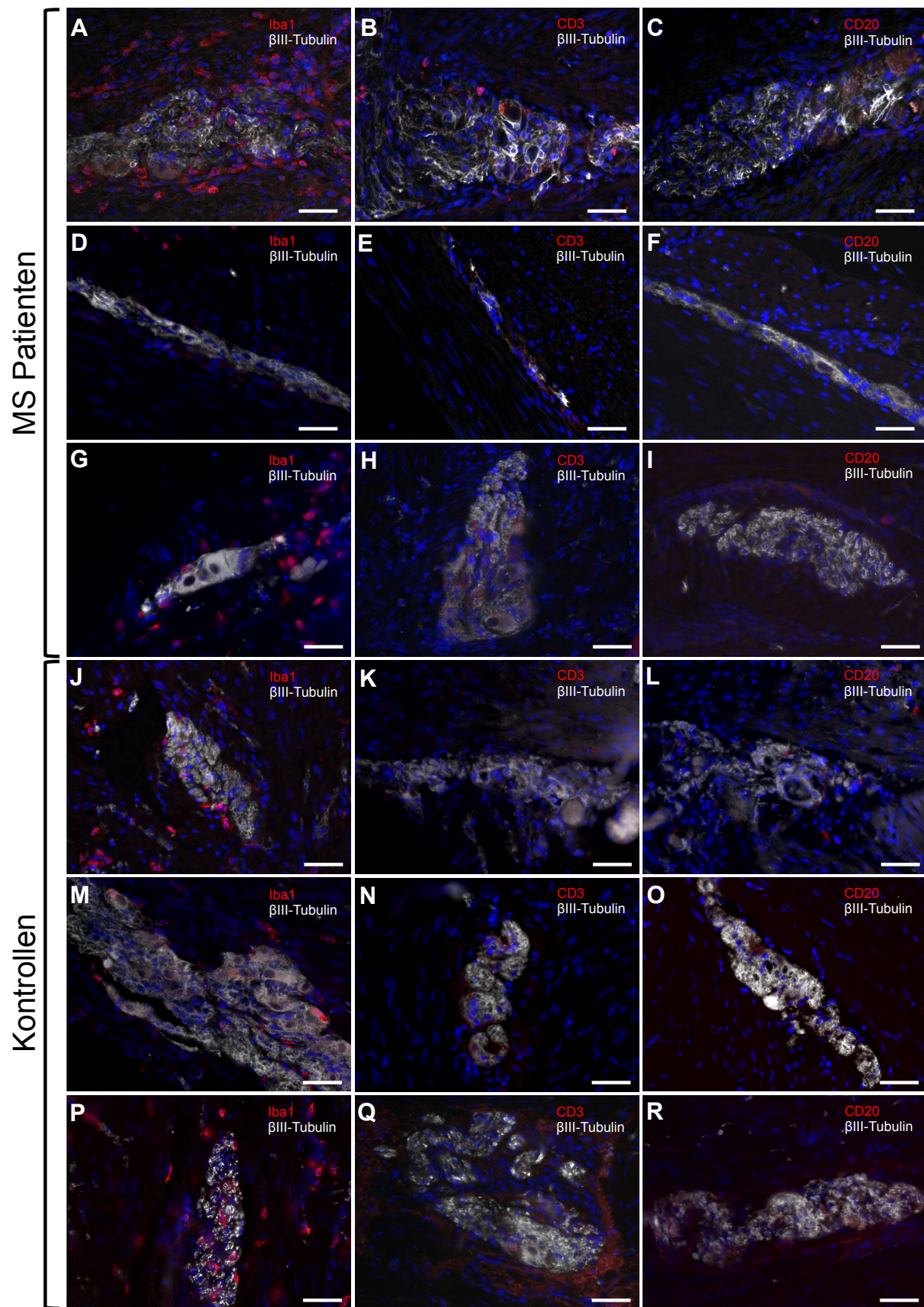
**Tabelle 4** Identifizierte Zielantigene der Autoimmunreaktion in MP4-immunisierten Mäusen.

Apolipoprotein A-I wurde aus dem Lysat der enterischen neuronalen und enterischen Gliazelllinie präzipitiert. Alle anderen Proteine wurden aus der enterischen neuronalen Zelllinie präzipitiert.

### **3.8 Erste Hinweise für eine Autoimmunantwort gegen das ENS in MS-Patienten**

MS-Patienten berichten häufig von persistierenden gastrointestinalen Symptomen. Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse aus dem MP4-Mausmodell ist es denkbar, dass diese gastrointestinalen Symptome auf eine Autoimmunreaktion gegen das ENS zurückzuführen sind. Um dies zu überprüfen, wurden Darmresektate von n = 3 MS-Patienten und n = 3 nicht-MS-Kontrollen gefärbt. Die Darmresektate wurden im Rahmen eines Kolonkarzinoms entnommen und enthielten tumorfreies Gewebe (ca. 10 cm entfernt vom Tumorgewebe). Das fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe wurde uns von der Pathologie des Caritas Krankenhaus Bad Mergentheim zur Verfügung gestellt. Es wäre wesentlich leichter gewesen Darmbiopsien aus einem weniger invasiven Eingriff zu bekommen. Darmbiopsien enthalten jedoch nicht die Tunica muscularis, sondern nur Teile aus der Tunica mucosa und Tunica submucosa. Daher mussten wir uns auf einen geringen Stichprobenumfang von n = 3 Resektate beschränken, welche die Tunica muscularis beinhalten. Es wurden 6 µm dicke Schnitte des Gewebes angefertigt und das Nervengewebe mit anti-βIII-Tubulin Antikörpern und inflammatorische Zellen (Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen) mit anti-Iba1-, anti-CD3- und anti-CD20-Antikörpern gefärbt. Abbildung 24 A-I zeigt repräsentative Aufnahmen der Färbung an Gewebe von MS-Patienten, Abbildung 24 J-R zeigt repräsentative Aufnahmen der Kontrollen. Sowohl bei allen drei Kontrollen (Abbildung 24 J, M, P) als auch bei zwei MS-Patienten (Abbildung 24 A und G) konnte eine Infiltration von Makrophagen in den Plexus myentericus gezeigt werden. Es befanden sich keine B oder T-Zellen im Nervengewebe des ENS bei Kontrollen oder MS-Patienten.





**Abbildung 24 Immunhistochemische Färbung inflammatorischer Marker im Plexus myentericus von MS-Patienten und nicht-MS-Kontrollen.** Paraffinschnitte der Darmresektate von n = 3 MS-Patienten (A-I) und n

= 3 nicht-MS-Kontrollen (J-R) wurden gefärbt mit Iba1 um Makrophagen darzustellen, CD3 um T-Zellen darzustellen und CD20 um B-Zellen darzustellen sowie mit  $\beta$ III-Tubulin um Nervengewebe darzustellen. Die gezeigten repräsentativen Bilder sind Ausschnitte aus dem Bereich zwischen Ringmuskulatur und Längsmuskulatur der Tunica muscularis. Messbalken stellen 50  $\mu$ m dar.

Da sich die immunhistochemischen Färbungen von inflammatorischen Markern nicht als zuverlässiges Indiz für eine Plexuspathologie herausgestellt haben, sollte im nächsten Ansatz das Nervengewebe an sich untersucht werden und auch eine mögliche Gliose dargestellt werden. Dafür wurden Färbungen mit anti- $\beta$ III Tubulin und anti-GFAP durchgeführt. Abbildung 25 A, C und E zeigen die Plexus myentericus der Kontrollen. Das Nervengewebe ist dicht gepackt und weist innerhalb des Plexus eine einheitliche Struktur auf. Zwei der MS-Patienten zeigten eine abweichende Struktur des Plexus. Das Nervengewebe erschien diffus verteilt, teilweise waren Spalträume innerhalb des Plexus vorhanden und das Nervengewebe war aufgefächert und aufgelöst (Abbildung 25 B und D). Dies kann ein Hinweis für eine Degeneration des Plexus sein. Das Nervengewebe des dritten MS-Patienten erschien intakt und ähnelte dem der nicht-MS-Kontrollen (Abbildung 25 F). Eine GFAP-Expression in der Darmwand konnte in keiner nicht-MS-Kontrollen nachgewiesen werden (Abbildung 25 G, I, K). Zwei der MS-Patienten zeigten eine erhöhte GFAP-Expression (Abbildung 25 H, J). Dabei handelte es sich um dieselben Patienten, die eine Auflösung des Nervengewebes aufwiesen. Der dritte MS-Patient zeigte keine GFAP-Expression in der Darmwand (Abbildung 25 L).

Leider war es nicht möglich, Darmmaterial von weiteren MS-Patienten zu erhalten. Wir konnten aber von zusätzlich 14 Nicht-MS-Kontrollen Darmresektate von der Universität Nürnberg/Erlangen erhalten und konnten GFAP-Färbungen und  $\beta$ III-Tubulin-Färbungen an den Paraffinschnitten durchführen. Bei diesen zusätzlichen Färbungen konnten wir in 6 von 12 Fällen eine schwache GFAP-Expression detektieren (Abbildung 26). Die Verteilung und

Intensität der GFAP-Färbung in diesen nicht-MS-Kontrollen war jedoch deutlich niedriger im Vergleich zu MS-Patient #1. Die  $\beta$ III-Tubulin-Färbung zeigte in den zusätzlichen 14 nicht-MS-Kontrollen eine regelmäßige Struktur auf. Die Plexus waren klar abgegrenzt und zeigten keine Anzeichen von Degeneration (Abbildung 27).

Neben den morphologischen Veränderungen des ENS wurde dann untersucht, ob in MS-Patienten Autoantikörper gegen die im vorherigen Abschnitt identifizierten Autoantigene des ENS nachweisbar sind. Dafür wurden ELISA-Platten *gecoatet* mit humanem Dünndarmlysät, humanem Apolipoprotein A-I, DECR1, SmD2 und eIF3D. Insgesamt wurden n = 33 MS-Patienten und n = 22 gesunde Kontrollen getestet.

Um eine Serumreaktivität gegen ein Antigen zu definieren, wurde der Grenzwert als Mittelwert plus die dreifache Standardabweichung der gesunden Kontrollen festgelegt. Keine der gesunden Kontrollen zeigte Autoantikörper gegen ENS-Antigene. Von den 33 MS-Patienten zeigten vier Patienten Antikörper gegen das Dünndarmlysät, zwei gegen Apolipoprotein A-I und vier gegen DECR1 (Abbildung 25 M-Q). Gegen SmD2 besaßen alle gesunden Kontrollen und MS-Patienten Serumantikörper.



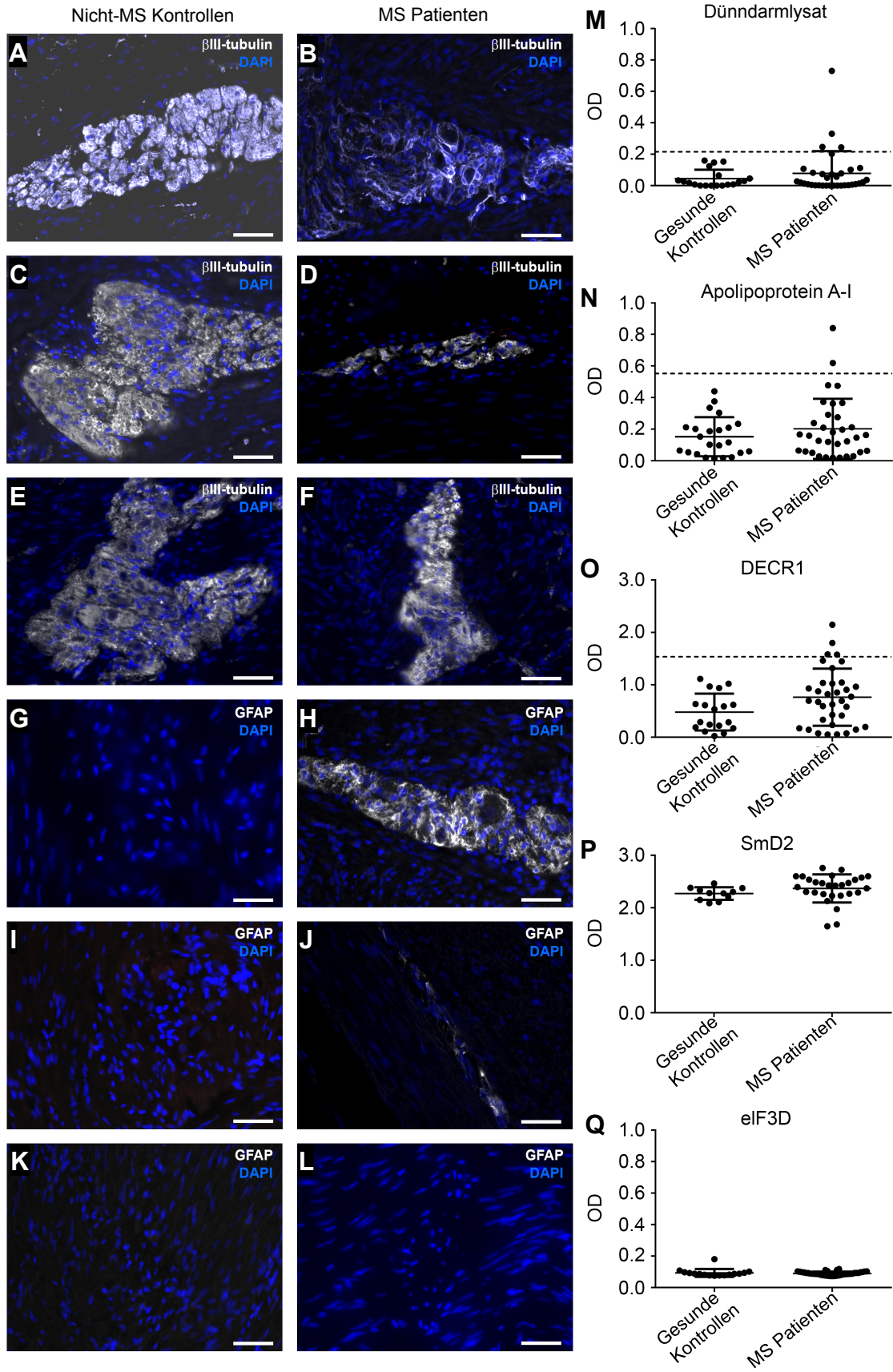
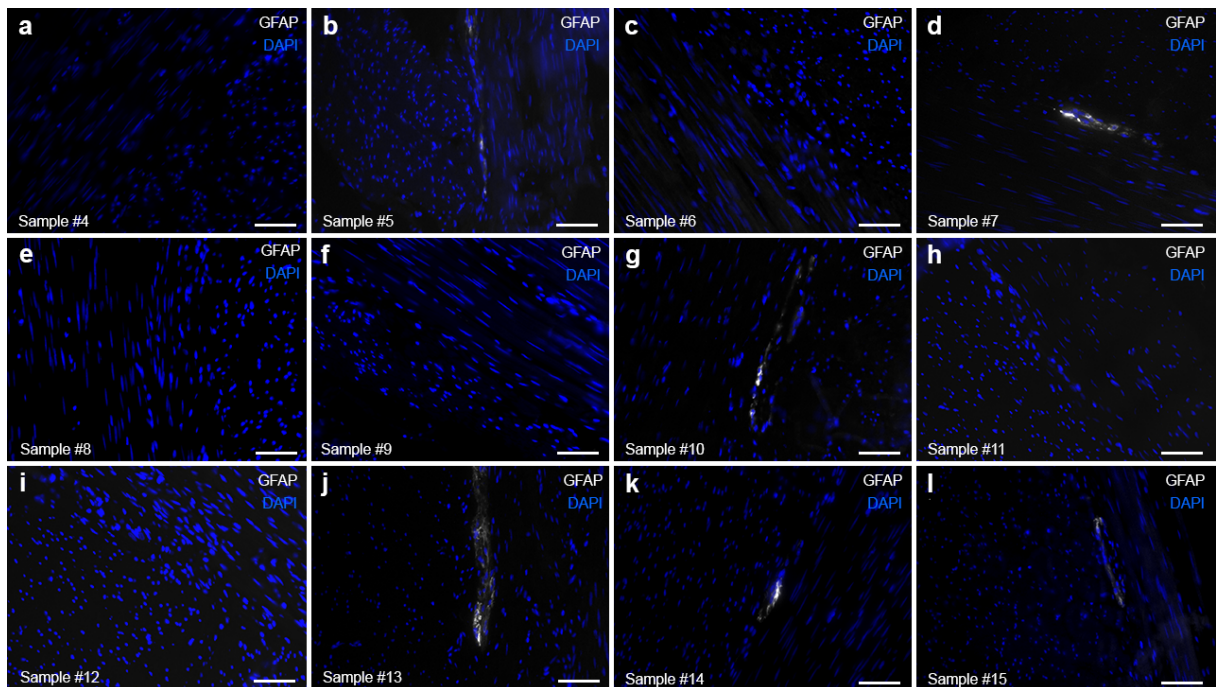
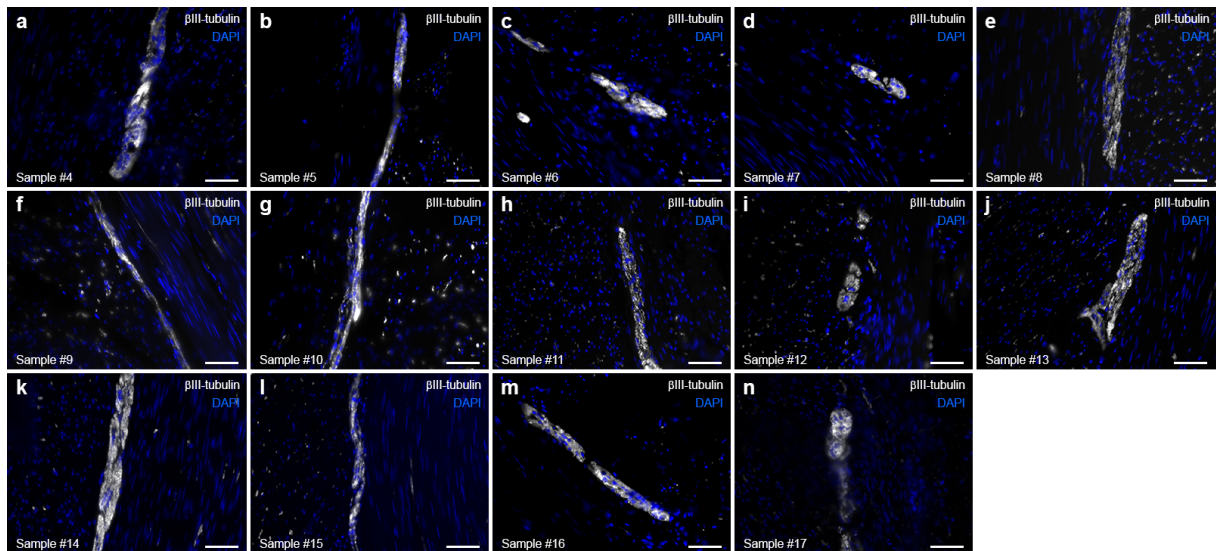


Abbildung 25 Neurodegeneration, Enteroglycose und die Bildung von Autoantikörpern gegen das ENS in MS-Patienten. Darmresektate von n = 3 MS-Patienten und n = 3 nicht-MS Kontrollen wurde mit anti-βIII-

Tubulin-Antikörpern gefärbt um Nervengewebe darzustellen (A-F). GFAP-Färbungen wurden durchgeführt um enterische Gliazellen darzustellen (G-L). Jede Abbildung zeigt einen repräsentativen Plexus myentericus eines individuellen Probanden. Die Messbalken stellen 50  $\mu$ m dar. Plasma-Proben von n = 33 MS-Patienten in der Remission und von n = 22 gesunden Kontrollen wurde in ELISA Assays auf die Präsenz von Antikörpern gegen ein Dünndarmlysat (M), Apolipoprotein (N), DECR1 (O), eIF3D (P) und Smd2 (Q) getestet. Jeder Punkt stellt einen individuellen Probanden dar. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für ein positives Testergebnis dar (berechnet als der Mittelwert der gesunden Kontrollen plus die dreifache Standardabweichung). Aus Wunsch et al., 2017 [155].



**Abbildung 26 Immunhistochemische Färbungen von enterischen Gliazellen in weiteren nicht-MS-Kontrollen.** Paraffinschnitte von Kolon Resektionsmaterial von n = 12 nicht-MS-Kontrollen mit kolorektalem Karzinom wurden mit anti-GFAP-Antikörpern gefärbt um Gliazellen zu detektieren. Die gefärbten Darmschnitte waren frei von Karzinomgewebe. Die Messbalken stellen 50  $\mu$ m dar. Aus Wunsch et al., 2017 [155].



**Abbildung 27 Immunhistochemische Färbungen von enterischen Neuronen in weiteren nicht-MS-Kontrollen.** Kolon Resektionsmaterial von n = 14 nicht-MS-Kontrollen mit kolorektalem Karzinom wurden mit Anti-βIII-Tubulin-Antikörpern gefärbt um Nervengewebe darzustellen. Die gefärbten Darmschnitte waren frei von Karzinomgewebe. Die Messbalken stellen 50 µm dar. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

Die MS-Patienten und gesunden Kontrollen wurden außerdem nach persistierenden gastrointestinalen Symptomen befragt. Eine Diarrhö wurde definiert, wenn es seit mehreren Monaten bei mehr als 2/3 der Darmentleerungen zu mehr als drei Darmentleerungen pro Tag kam mit flüssigem Stuhl. Eine Obstipation wurde nach den ROM-III Kriterien definiert: kam es in den letzten 6 Monaten zu weniger als drei Stuhlgängen pro Woche, war der Stuhlgang hart (bzw. nur weich unter Laxantien) und kam es zu einem Gefühl der unvollständigen Darmentleerung, wurde dies als Verstopfung definiert.

In Tabelle 5 wurden MS-Patienten mit einem hochgestellten a markiert, die ihre gastrointestinalen Symptome in zeitliche Verbindung mit einer Änderung / dem Beginn der medikamentösen MS-Therapie bringen konnten.

Ungefähr die Hälfte (45,2 %) der MS-Patienten (Frauen:Männer-Verhältnis 1,75, mittleres Alter  $42 \pm 10$  Jahre) berichteten von gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhö oder

Obstipation. Nur 13,6 % der gesunden Kontrollen (Frauen:Männer-Verhältnis 1,2, mittleres Alter 35,8 ± 12 Jahre) berichteten von gastrointestinalen Symptomen.

Donor	Verlauf	Geschlecht	Alter	EDSS	MS-Therapie	Schub- rate	GI Symptome	ENS- Antigen- Reaktivität
1	RRMS	m	49	1.5	Avonex	0.2	Diarrhö, Obstipation <sup>a</sup>	Keine
2	RRMS	m	51	2	Copaxone	0.22	Keine	Keine
3	RRMS	w	50	2.5	Tysabri	0.1	Obstipation	Keine
4	RRMS	w	37	0	Betaferon	0.5	Constipation <sup>a</sup>	Apo A-I
5	RRMS	m	47	0	Betaferon	0.2	Diarrhö	SI Lysat
6	RRMS	w	36	2.5	Tysabri	0.2	Keine	Keine
7	RRMS	m	49	1	Avonex	0.1	Diarrhö, Obstipation	Keine
8	RRMS	m	54	3.5	Rebif/Fampyra	0.2	Diarrhö*	Keine
9	RRMS	w	49	5	Tysabri	0.5	Keine	Keine
10	RRMS	w	32		Tysabri	0.16	Keine	Keine
11	RRMS	w	32	1.5	Avonex	0.25	Keine	DECR1
12	RRMS	w	29	1	Avonex	0.2	Obstipation	Keine
13	RRMS	m	45	1	Tysabri	0.25	Keine	Keine
14	SPMS	w	57	6.5	Mitoxantrone	n/a	Obstipation	Keine
15	RRMS	m	31	2	Tysabri	0.16	Diarrhö	Keine
16	CIS	w	55	1.5	none	N/A	Keine	Keine
17	SPMS	m	60	1.5	Betaferon	N/A	Keine	Keine
18	RRMS	w	33	1.5	Avonex	0.3	Keine	Apo A-I, DECR1
19	RRMS	m	38	3	Copaxone	N/A	N/A	Keine
20	RRMS	w	37	4.5	Copaxone	0.25	Obstipation	Keine

21	RRMS	m	27	1.5	Copaxone	0.25	Zölliakie	Keine
22	RRMS	m	33	0	Tysabri	0.16	Keine	Keine
23	SPMS	w	54	3	Copaxone	N/A	Obstipation	DECR1
24	RRMS	m	26	2	Copaxone	N/A	N/A	Keine
25	RRMS	w	25	2	Copaxone	0.16	Keine	Keine
26	RRMS	w	52	2.0	Avonex	0.5	Keine	Keine
27	RRMS	w	48	1.5	Copaxone	0.75	Keine	Keine
28	RRMS	w	41	5	Tysabri	0.25	Keine	SI Lysat
29	RRMS	w	34	3.5	Avonex	0.3	Keine	Keine
30	RRMS	m	41	1.5	Avonex	0.3	Keine	Keine
31	PPMS	w	50	2.5	Copaxone	N/A	Obstipation	SI Lysat
32	RRMS	m	32	2.0	Avonex	0.25	Keine	SI Lysat
33	SPMS	m	49	4	Mitoxantrone	N/A	Obstipation	DECR1

**Tabelle 5 Charakteristika der MS-Patienten**

<sup>a</sup>GI Symptome begannen mit Einsetzen der medikamentösen MS Therapie

Schubrate, Anzahl der Schübe pro Jahr; CIS, Klinisch isoliertes Syndrom; DECR1, mitochondriale 2,4-dienoyl-CoA Reduktase; EDSS, expanded disability status scale; ENS, enterisches Nervensystem; GI, gastrointestinal; PPMS, Primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS, Relapsierend-remittierende Multiple Sklerose; SPMS, Sekundär progrediente Multiple Sklerose; Apo A-I, Apolipoprotein A-I; SI Lysat, Dünndarmlysat.



<b>Donor</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>GI Symptome</b>
1	w	31	Keine
2	w	45	Obstipation
3	w	27	Keine
4	w	38	Keine
5	m	24	Keine
6	w	30	Keine
7	w	54	Keine
8	w	47	Keine
9	m	57	Keine
10	w	45	Keine
11	m	39	Keine
12	w	26	Keine
13	w	24	Keine
14	w	50	Keine
15	m	60	Keine
16	m	25	Keine
17	w	31	Diarrhö
18	m	40	Keine
19	w	25	Keine
20	m	24	Diarrhö
21	w	24	Keine
22	m	22	Keine

**Tabelle 6 Charakteristika der gesunden Kontrollen**

## 4 Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass das ENS in der EAE Ziel der Autoimmunantwort ist und es gibt erste Hinweise, dass dies auch in der MS der Fall sein könnte. Nach Immunisierung mit MP4 entwickelten die Tiere nicht nur eine Inflammation im ZNS, welche zu den neurologischen Symptomen der EAE führt, sondern auch im ENS. Ähnlich wie die Immunpathologie im ZNS zeigten die Mäuse auch im ENS Neurodegeneration, Gliose und funktionelle Einschränkungen der Motilität. Außerdem gibt diese Studie erste Hinweise auf eine Immunreaktion gegen das ENS in MS-Patienten. Es konnten eine Neurodegeneration, Gliose und bei vereinzelt Patienten Antikörperantworten gegen Proteine des ENS gezeigt werden.

### 4.1 Epitope spreading

Chronische Infektionen mit persistierenden Antigenen zeichnen sich durch eine hohe Diversität der B- und T-Zell-Antwort aus. Dabei kommt es zu einer Ausweitung der Autoimmunreaktion auf diverse Antigene. Zunächst reagiert das Immunsystem spezifisch gegen ein Antigen, was zu einer Inflammation in dem Gewebe führt, in welchem das Antigen exprimiert wird. Im Verlauf der chronischen Entzündung werden dann weitere Antigene erkannt (zum Teil auch intrazelluläre Antigene).

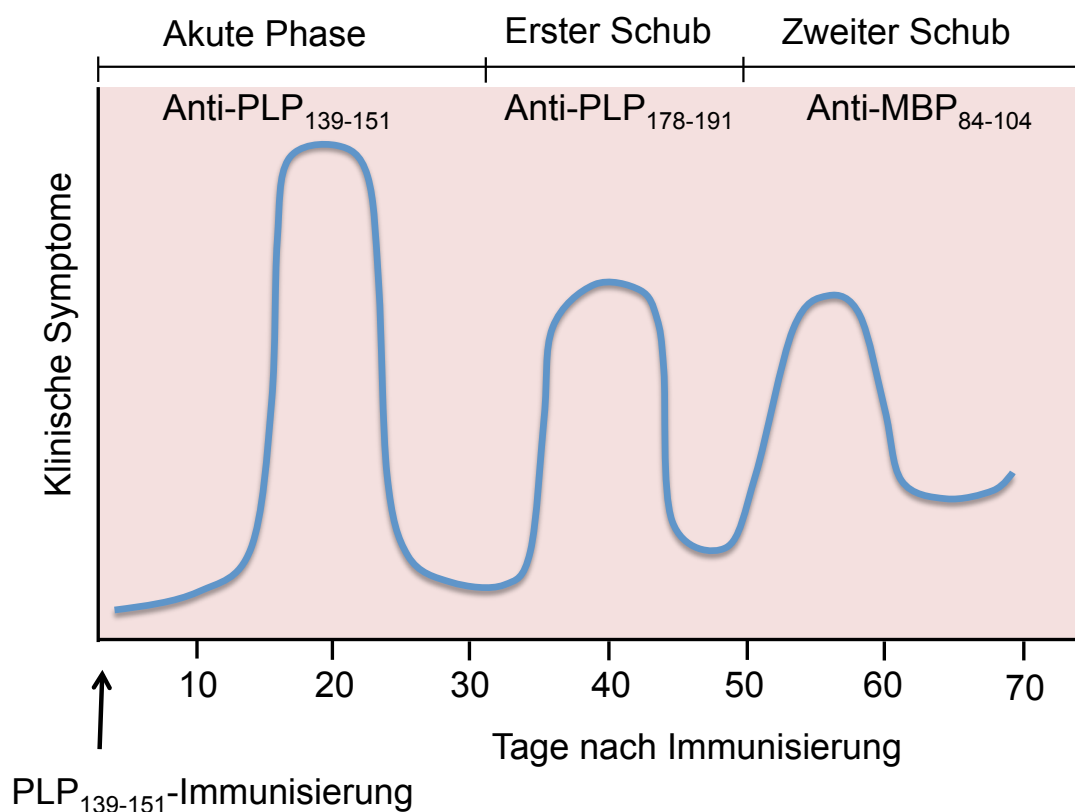
Diese Diversität der Immunantwort kann durch das Phänomen des *epitope spreading* erklärt werden. Erstmals wurde das *epitope spreading* 1992 von Lehmann und Kollegen beschrieben. Sie immunisierten (SJL x B10.PL)F1-Mäuse mit MBP:Ac1-11 und lösten so eine EAE aus. Zum Zeitpunkt des Höhepunkts der Erkrankung war MBP:Ac1-11 immundominant, und es konnte keine T-Zell-Antwort gegen andere Peptide des MBP-Proteins nachgewiesen werden (kryptische Peptide). In der chronischen Phase 40 Tage nach Immunisierung konnten dann T-Zell-Antworten gegen andere MBP-Peptide wie MBP:35-47,

MBP:81-100 und MBP:121-140 nachgewiesen werden, welche keine strukturellen Ähnlichkeiten mit dem immunisierten Peptid aufwiesen. Die neu erkannten MBP-Peptide wurden sogar von anderen MHC-II-Molekülen präsentiert. Vorher kryptische Peptide wurden im Verlauf der chronischen Inflammation immundominant [97]. Die lokale Inflammation und Gewebeschädigung im ZNS führt zu einer ausgedehnten Antigenpräsentation und so zu einer Ausweitung der Immunantwort auf weitere endogene Antigene. Dabei lösten MBP-Ac1-11 spezifischen T-Zellen eine erste Inflammationsreaktion im ZNS aus, wobei eine sekundäre Inflammation und Chronifizierung dann durch das *epitope spreading* verursacht wird [164]. Diese Ausweitung der Immunreaktion gegen unverwandte Peptide desselben Proteins nennt sich intramolekulares *epitope spreading*.

Der Angriff des Immunsystems auf das ZNS im Modell der EAE verläuft somit in Wellen. Die erste Welle, also die Expansion von autoreaktiven T- und B-Zellen, wird durch die Immunisierung ausgelöst und die autoreaktiven Lymphozyten sind spezifisch gegen das immunisierte Antigen gerichtet. Diese Lymphozyten erkennen das spezifische Antigen im ZNS und lösen dort eine Entzündungsreaktion aus, welche die Rekrutierung weiterer Lymphozyten und Makrophagen initiiert [165-167]. Der Höhepunkt der ZNS-Inflammation in der MP4-induzierten EAE findet zwischen Tag 10 und Tag 14 nach Immunisierung statt [73, 82]. Danach kommt es zu einem Abfall der Lymphozyten, welche spezifisch für das immunisierte Antigen sind (Abbildung 28) und die Chronizität der Erkrankung wird durch eine zweite Welle (Expansion) von Lymphozyten ausgelöst, welche spezifisch gegen andere Proteine des Gewebes reagieren (*epitope spreading*). Die zweite Welle führt also dazu, dass viele verschiedene Antigene angegriffen werden, die von dem Zielgewebe exprimiert werden. Damit einhergehend kommt es zu einer Expansion von autoreaktiven Lymphozyten mit diversen Spezifitäten. Welche Autoantigene in der zweiten Welle der Inflammation Zielstruktur der Autoimmunreaktion werden, lässt sich dabei nicht vorhersagen und ist

aleatorisch. Diese zufällige Auswahl der Antigene im Rahmen des *epitope spreading* führte zu dem Begriff „epitope du jour“ [168].

Die erste Studie von Lehmann und Kollegen zog zahlreiche weitere Untersuchungen nach sich und hatte einen durchbrechenden Einfluss auf die Erforschung von chronischen Infektionen und Autoimmunität. Neben dem intramolekularen *epitope spreading* konnte dann auch das intermolekulare *epitope spreading* beschrieben werden. Dabei kommt es nach Immunisierung von SJL-Mäusen mit PLP:139-151 im Verlauf zunächst im Rahmen des intramolekularen *epitope spreading* zu einer Immunreaktion gegen PLP:178-191 und 50 Tage nach Immunisierung zu einer Immunreaktion gegen MBP:84-104 [169] (Abbildung 28).



**Abbildung 28** Intramolekulares und intermolekulares *epitope spreading*. SJL-Mäuse immunisiert mit PLP:139-151 entwickeln eine schubförmige EAE. Dabei wird der erste akute Schub ausgelöst durch eine anti-PLP:139-151-Antwort. Die PLP:139-151-spezifischen T<sub>H</sub>1-Zellen werden dann herunterreguliert, was in einer Remission der EAE resultiert. Die Zerstörung des Myelins führt zu einer Freisetzung diverser Myelinproteine und zu einer Aktivierung von T-Zellen, welche spezifisch für andere Epitope des PLP oder andere

Myelinproteine sind. Die weiteren Schübe sind assoziiert mit dem intramolekularen *epitope spreading* auf PLP:178-191 und durch intermolekulares *epitope spreading* auf MBP:84-104. Modifiziert nach Vanderlugt und Miller, 2002 [169] mit Genehmigung des Journals *Nature Reviews Immunology*.

#### **4.2 Die Autoimmunreaktion gegen das ENS in der EAE**

In dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell wird die EAE durch Immunisierung mit MP4 ausgelöst. MP4 ist ein Fusionsprotein aus MBP und PLP. Die durch PLP-Immunisierung ausgelöste EAE wurde bisher wenig untersucht. Es ist zwar bekannt, dass die Immunisierung mit PLP enzephalitogen ist [170], jedoch gestaltet sich die Arbeit mit PLP schwierig, da es sich um ein Transmembranprotein handelt, welches fünf transmembrane hydrophobe Domänen besitzt [81]. Dadurch ist das Protein wasserunlöslich und schwierig zu isolieren oder experimentell einzusetzen. Die zwei extrazellulären Domänen des PLP machen das Protein jedoch zu einer exponierten Zielstruktur der Autoimmunreaktion in der EAE und MS [170]. MBP-spezifische Lymphozyten und Antikörper sind hingegen zumindest in der initialen Phase der EAE/MS nicht pathogen, da es sich um ein intrazelluläres Protein handelt, welches bei intaktem Myelin nicht zugänglich für Antikörper oder Lymphozyten ist [81] und die Rolle von MBP-spezifischen Antikörpern in der MS und EAE wird kontrovers diskutiert [171, 172]. MP4 wurde synthetisiert, um ein Protein zur Verfügung zu haben, welches wasserlöslich ist und die beiden Hauptbestandteile des Myelin enthält. Dafür wurden die drei hydrophilen extrazellulären und intrazellulären Domänen des PLP mit MBP fusioniert. Insbesondere die Chronizität der EAE, die Beteiligung von sowohl T-Zellen als auch B-Zellen und die Bildung von tertiär lymphatischen Organen macht die MP4-induzierte EAE zu einem bevorzugten Modell, da es der MS sehr nahe kommt. Auch die simultane Autoimmunreaktion gegen das ZNS und das ENS scheint eine Gemeinsamkeit zwischen MS und MP4-induzierter EAE zu sein.

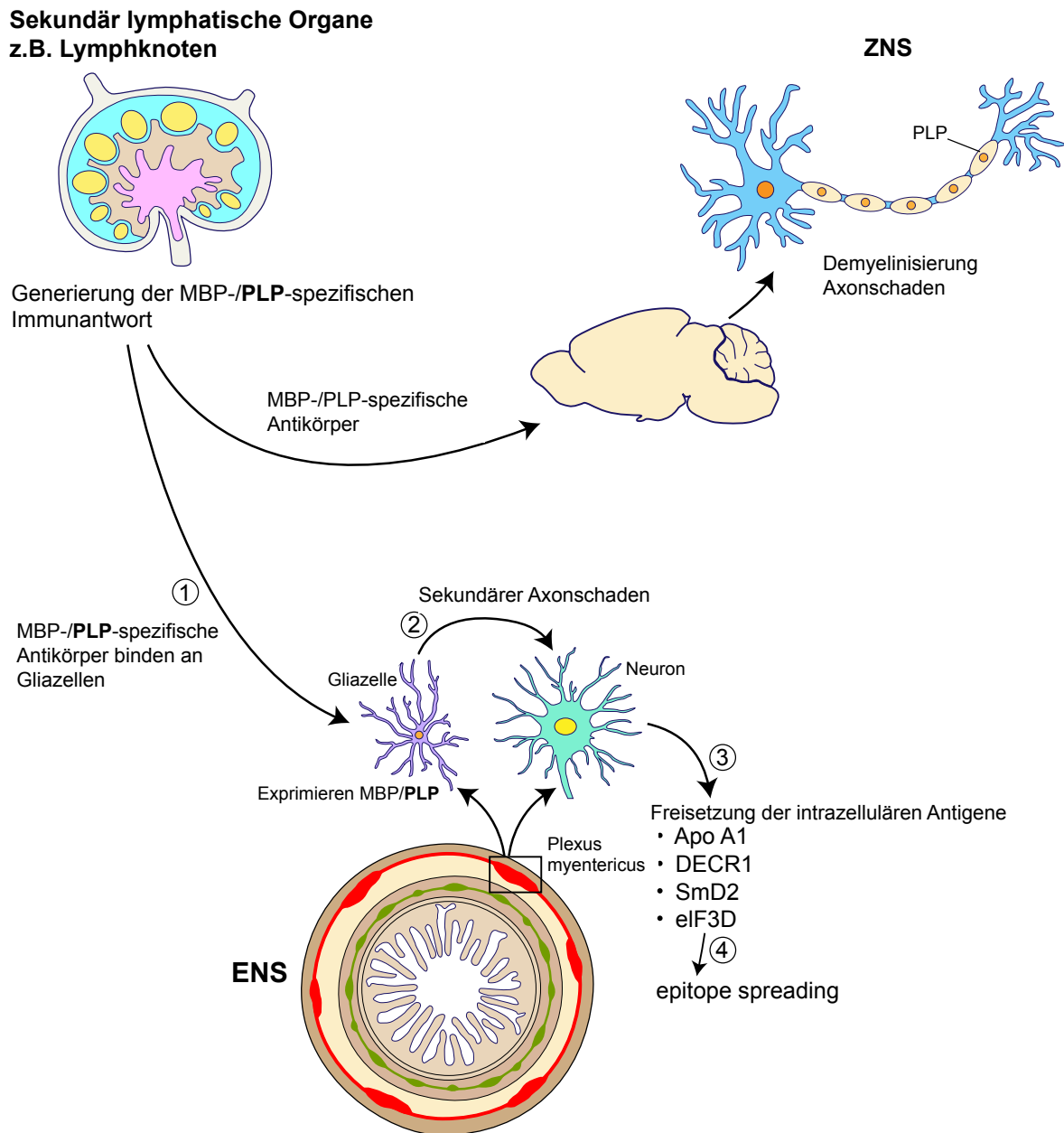
MBP und PLP sind sowohl im ZNS als auch im PNS zu finden. Im Vordergrund der MS-Forschung steht die Autoimmunreaktion gegen die Myelinscheiden im ZNS, da die neurologischen Symptome der EAE und der MS auf eine Demyelinisierung der Nerven zurückzuführen ist. Daraus folgt eine eingeschränkte Weiterleitung von Impulsen im Axon und schließlich eine Narbenbildung im ZNS. Da die Neurone und Axone im ENS ausschließlich von nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen ummantelt sind, wurde das ENS bisher in der MS-Forschung nicht berücksichtigt. Dennoch leiden über 50% der MS-Patienten unter einer eingeschränkten Darmfunktionalität und gastrointestinalen Symptomen [173], wofür bisher kein pathologisches Korrelat gefunden werden konnte. In einer klinischen Studie von Levinthal und Kollegen [173] wurden 218 MS-Patienten eingeschlossen und gastrointestinale Symptome nach den gängigen diagnostischen Verfahren diagnostiziert (Rom III, Inkontinenz Index (FISI), Anderson Dysphagie Index). Bei 65,5 % der MS-Patienten konnte mindestens ein persistierendes gastrointestinales Symptom wie Obstipation, Dysphagie oder Inkontinenz festgestellt werden. Funktionelle Obstipation wurde dabei in 31,7 % der MS-Patienten diagnostiziert. Die Dauer der Erkrankung an MS korrelierte dabei nicht mit dem Auftreten der gastrointestinalen Symptome. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass gastrointestinale Antigene Ziel der Autoimmunreaktion in der MS sind [174]. Banati und Kollegen konnten in MS-Patienten Serumantikörper gegen Gliadin, Transglutaminase, den intrinsischen Faktor und Parietalzellen finden. Sie untersuchten Serum von 85 MS-Patienten und 48 gesunden Kontrollen im ELISA und fanden in 28% der MS-Patienten Antikörper gegen mindestens eins der gastrointestinalen Antigene. Die Antikörperreaktivität gegen gastrointestinale Antigene konnte in nur 8 % der gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Das Auftreten der Serumreaktivität gegen gastrointestinale Antigene korrelierte mit gastrointestinalen Symptomen der Patienten [174].

PLP und MBP werden sowohl von Oligodendrozyten im ZNS [175] als auch von enterischen Gliazellen [91] exprimiert. Es liegt daher nahe, dass die simultane Autoimmunreaktion gegen das ZNS und das ENS nach MP4-immunisierung initial durch die gemeinsame Expression von PLP/MBP in ZNS und ENS ausgelöst wird (Abbildung 29). Die simultane Immunreaktion gegen dasselbe Antigen in ZNS und ENS scheint hauptsächlich zu Beginn der Erkrankung eine Rolle zu spielen. Der Unterschied zwischen ZNS- und ENS-Inflammation ist dabei, dass es im ZNS zu einer massiven perivaskulären Zellinfiltration kommt, wohingegen im ENS wenige Zellen infiltrieren und die Pathologie eher antikörpervermittelt ist. Dieser Vorgang kann als erste Welle der Immunantwort nach Immunisierung bezeichnet werden. Im Verlauf lässt sich die Immunpathologie im ENS eher durch *epitope spreading* erklären (Abbildung 29), da es durch die Zerstörung des Gewebes zu einer Freisetzung weiterer ENS-Antigene kommt. In dieser zweiten Welle der Immunantwort kommt es zu einer Ausweitung der Immunreaktion gegen Apolipoprotein A-I, welches von enterischen Neuronen und enterischen Gliazellen exprimiert wird, sowie DECR1, eIF3D und SmD2, welche von enterischen Neuronen exprimiert werden.

Obwohl PLP wird von enterischen Gliazellen exprimiert wird, wurden die identifizierten enterischen Autoantigene hauptsächlich in Neuronen gefunden, und auch die ultrastrukturellen Untersuchungen zeigen eine extensive Neurodegeneration im ENS. Wir erklären uns dies dadurch, dass es nach der Ablagerung PLP-spezifischer Antikörper an die enterischen Gliazellen sekundär zu einem Axonschaden kommt (Abbildung 29). Dieser sekundäre Axonschaden kann zum einen unspezifisch durch die Antikörper-vermittelte Schädigung der Gliazellen kommen, wodurch die Axone freigelegt werden. Es ist bekannt, dass es nach einer Schädigung von Gliazellen im ENS auch zu einer Neurodegeneration kommen kann, da die Gliazellen eine Schutz- und Stützfunktion haben und für die Funktion und den Erhalt der Axone essentiell sind [118, 119]. Zum andern kann der Axonschaden die

Folge des *epitope spreading* sein, da sich die Immunreaktion von Gliazellen auf andere Zelltypen ausweitet, die in dem Zielorgan vorhanden sind. Der Axon- und Gliazellschaden führt zu einer Exposition von diversen intrazellulären Antigenen und zu einer verstärkten Antigenpräsentation. Dabei weitet sich die Immunantwort auf neue unverwandte Antigene aus. Im Fall der MP4-induzierten EAE handelt es sich dabei um die enterischen Antigene Apolipoprotein A-I, DECR1, eIF3D und SmD2 (Abbildung 29).





**Abbildung 29** Schematische Darstellung der Immunpathologie und des *epitope spreading* im Darm von MP4-immunisierten Mäusen. Aus Wunsch et al., 2017 [155].

Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Degeneration des ENS in MP4-immunisierten Mäusen um ein Epiphänomen handelt, verursacht durch eine Pathologie des kaudalen Rückenmarks und damit zusammenhängenden Unterbrechung des ZNS-Inputs zum ENS. Bayliss und Kollegen konnten schon 1899 zeigen, dass das ENS unabhängig vom ZNS funktioniert [176]. Das ENS besitzt intrinsische sensorische Neurone, exzitatorische und inhibitorische Motoneurone und Interneurone. Diese neuronalen Zelltypen sind über

intrinsische Reflexkreise verbunden, wodurch die Peristaltik gesteuert wird. Diese intrinsischen Reflexkreise funktionieren unabhängig vom Input des ZNS [115]. Außerdem konnten wir schon in den präklinischen EAE-Tieren (die noch keine Anzeichen von Inflammation, Demyelinisierung oder Axonschaden im kaudalen Rückenmark aufwiesen) eine ENS-Pathologie zeigen. Des Weiteren war das Nervengewebe in der Blase der MP4-immunisierten Mäusen völlig intakt, was für einen spezifischen Angriff des Immunsystems auf das ENS spricht.

### **4.3 Die Autoimmunreaktion gegen das ENS in der MS**

Die Immunpathologie des ENS wurde zunächst im Tiermodell der MS, der EAE, intensiv studiert. Das EAE-Modell zeichnet sich durch die hohe Reproduzierbarkeit der Immunreaktion gegen bekannte Myelinantigene aus. Außerdem ist nach jahrelanger Analyse der Immunpathomechanismus gut bekannt [18, 29, 47, 69, 75, 77, 87].

Leider ist die MS im Patienten nicht so vorhersehbar und manifestiert sich sehr heterogen mit unterschiedlichen Immunpathologien zwischen den Patienten [11], auch ein und derselbe Patient kann im Verlauf der Erkrankung einen Shift der Immunantwort z.B. von einer T-Zell-basierten zu einer B-Zell-dominanten Form entwickeln [60]. Außerdem gibt es viele verschiedene Autoantigene in der MS und die MS-Forschung gestaltet sich sehr schwierig, da sich Biomarkerstudien oft nicht reproduzieren lassen [177, 178] bzw. bisher kein Biomarker gefunden wurde, der bei einem Großteil der MS-Patienten nachweisbar ist [179]. Ein großer Erfolg in der Suche nach Biomarkern war die Identifizierung von Antikörpern gegen Aquaporin 4, einem H<sub>2</sub>O-Kanal in den Fortläufern der Astrozyten und der Blut-Hirn-Schranke, in Neuromyelitis optica (NMO)-Patienten [180, 181]. Über den Nachweis dieser Antikörper kann die NMO von der MS unterschieden werden [181], und die Pathogenität der Aquaporin 4-Antikörper konnte gezeigt werden [182]. Die Biomarkerstudien zur MS sind weniger eindeutig und wurden zum Teil sehr kontrovers diskutiert. Eine Studie von

Srivastava und Kollegen wurde 2012 hochrangig im *New England Journal of Medicine* publiziert. Dabei wurden Serumantikörper gegen den Kaliumkanal KIR4.1 in 47 % von 397 MS-Patienten gefunden und als neuer Biomarker identifiziert [177]. In einer darauf folgenden Studie konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden. Brickshawana und Kollegen fanden in nur zwei von 286 Serumproben von MS-Patienten Antikörper gegen KIR4.1 und auch in 25 Liquorproben konnten keine IgG-Antikörper gegen KIR4.1 nachgewiesen werden.

In einer Studie von Kuerten und Kollegen konnten autoreaktive B-Zellen gegen ein ZNS-Proteinlysate in 80 % der MS-Patienten detektiert werden [59]. Dabei wurde mit aus dem Blut isolierten Lymphozyten gearbeitet, welche nach 96 Stunden polyklonaler Stimulation in *Enzyme-Linked Immunospot* (ELISPOT)-Assays auf ihre Reaktivität gegen ZNS-Antigene getestet wurden. Der Test zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus.

Der Vorteil ist, dass nicht nach Lymphozyten gesucht wurde, die spezifisch für ein bestimmtes ZNS-Antigen sind, sondern dass mit einem Proteinlysate gearbeitet wurde, welches alle ZNS-Antigene beinhaltet. Ein Nachteil ist bisher, dass das Testverfahren im Vergleich zu ELISA-Assays relativ aufwändig ist, unter anderem da die Lymphozyten zeitnah aus dem Blut isoliert werden müssen, unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden muss und die isolierten Lymphozyten drei Tage im Inkubator verbleiben müssen.

Auch die humanen ELISA-Daten dieser Studie müssen vor dem Hintergrund der Historie der Biomarkersuche in der MS betrachtet werden. Die MS ist eine heterogene Erkrankung [9, 183] und die Literatur zeigt, wie schwierig es ist, in ELISA-Assays Serumantikörper gegen diverse Autoantigene in MS-Patienten zuverlässig und spezifisch nachzuweisen.

Serumantikörper gegen ENS-Antigene konnten nur vereinzelt in MS-Patienten nachgewiesen werden. Dies kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass bei einigen MS-Patienten keine Immunpathologie des ENS auftritt. Zum anderen muss bedacht werden, dass die

Immunantwort gegen Autoantigene des ENS im Mausmodell auf das *epitope spreading* zurückzuführen ist. Beim *epitope spreading* lässt sich nicht vorhersehen, auf welche Antigene sich die Immunantwort ausweitet [168]. Es ist also durchaus möglich, dass auch im Patienten die Immunreaktion gegen PLP zu einer Pathologie des ENS führt und weitere enterische Antigene freigelegt und den T-Zellen präsentiert werden, und so ein *epitope spreading* stattfindet. Dabei muss es sich jedoch nicht notwendigerweise um die von uns im Mausmodell identifizierten Autoantigene des ENS (Apo A-I, eIF3D, SmD2, DECR1) handeln, sondern es kann eine Immunantwort gegen andere ENS-Antigene ausgelöst werden. Aussagekräftiger als die ELISA-Daten sind daher die immunhistochemischen Färbungen der Darmresektate der MS-Patienten und Nicht-MS-Kontrollen. Hier konnten wir in 2 von 3 Patienten eine Degeneration des Nervengewebes des Plexus myentericus zeigen und in denselben Patienten eine Gliose. Unter Berücksichtigung dieses bisher noch nie beschriebenen Phänomens in MS-Patienten und der Eindeutigkeit der ENS-Pathologie im Mausmodell kann man möglicherweise von einem Paradigmenwechsel in der MS-Forschung sprechen.

#### **4.4 Entzündliche und neurodegenerative Darmerkrankungen in MS-Patienten**

In einer Studie von Gupta und Kollegen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer inflammatorischen Darmerkrankung ein signifikant erhöhtes Risiko haben, eine MS zu entwickeln [184]. In dieser retrospektiven Studie wurden 7988 Patienten mit Morbus Crohn und 12185 Patienten mit Colitis ulcerosa sowie 80666 Kontrollen eingeschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass Colitis ulcerosa Patienten ein 2,63-fach erhöhtes Risiko haben, innerhalb eines Jahres nach der Diagnose eine MS zu entwickeln. Bei Morbus Crohn-Patienten ist das Risiko 2,12-fach erhöht [184].

In einer kleineren Studie konnten Geissler und Kollegen zeigen, dass entzündliche Darmerkrankungen mit Läsionen im ZNS assoziiert sind. Dabei konnten Läsionen in der weißen Substanz des ZNS mittels MRT in 11 von 24 (46%) Patienten mit Colitis ulcerosa, 20

von 48 (42%) Patienten mit Morbus Crohn und nur 8 von 50 (16%) Kontrollen nachgewiesen werden [185]. Diese Ergebnisse konnten später von Chen und Kollegen in einer retrospektiven Studie bestätigt werden [186]. Die Autoren zeigten, dass in 72 % der Patienten mit Morbus Crohn (n = 54) Läsionen in der weißen Substanz nachweisbar waren. Nur 34 % der Kontrollen (n = 100) zeigten diese Läsionen ( $p < 0.001$ ) [186].

Es ist durchaus denkbar, dass eine ausgedehnte Inflammation im Darm bei entzündlichen Darmerkrankungen auch zu einer Zerstörung der Plexus des ENS führt und so zu einer vermehrten Antigenpräsentation der ENS-Antigene. Unter den ENS-Antigenen können sich auch MBP und PLP befinden, welche von den enterischen Gliazellen exprimiert werden [91]. Die Aktivierung und Expansion MBP/PLP-spezifischer Lymphozyten im Darm kann dann sekundär zu einer Inflammation des ZNS führen. Wie in der Einleitung beschrieben, wandern Lymphozyten, die im Darm aktiviert werden, zunächst durch die Peripherie des Körpers, bevor sie wieder im Darm als Effektorzellen nachgewiesen werden. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass die PLP-spezifischen Zellen des Darms über die zervikalen Lymphknoten in das ZNS migrieren.

Andererseits könnte es sein, dass die ZNS-reaktiven Lymphozyten durch *epitope spreading* eine Entzündung des ENS oder auch anderer Teile des Darms ausgelöst haben. Es gibt einige Studien, die zeigen, dass entzündliche Darmerkrankung durch eine Expansion von inflammatorischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entstehen [13]. Die Balance im Darm zwischen Inflammation und anti-Inflammation (über regulatorische T-Zellen) kann dann nicht mehr aufrecht erhalten werden, und es kommt zu einer unkontrollierten Inflammation [13].

Ein weiterer Ansatz für eine klinische Studie ist die Frage, ob eine Korrelation zwischen MS und Morbus Hirschprung existiert. Meines Wissens nach gibt es dazu bisher keine Untersuchungen. Morbus Hirschprung ist eine Aganglionose, die sich durch einen Verlust der

Nerven des ENS insbesondere im Rektum auszeichnet. Die Erkrankung ist kongenital und hat einen genetischen Ursprung [187]. Neben dem kongenitalen Morbus Hirschprung scheint es jedoch auch eine seltene Form des erworbenen Morbus Hirschprung zu geben [188]. Dabei tritt das Megacolon erst im Erwachsenenalter auf [188, 189]. Außerdem scheint chronische Verstopfung bei einigen Menschen durch einen Verlust von Ganglien im Darm bedingt zu sein [190]. Des Weiteren gibt es Studien, die einen Untergang der Gliazellen im ENS von Patienten mit chronischer Obstipation zeigen [191]. Die Ursache für die Agangliose bzw. den Verlust von Gliazellen im ENS ist bisher nicht bekannt. Unter Berücksichtigung unserer Daten könnte es sich dabei um einen Autoimmunprozess handeln. Die betroffenen Patienten könnten eine subklinische Form der MS haben, welche sich nur durch die Symptome der ENS-Degeneration äußert, oder aber der Autoimmunprozess ist auf das ENS beschränkt und das ZNS ist unbeeinflusst.

#### **4.5 Die Beteiligung des ENS in anderen neurodegenerativen Erkrankungen**

Eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen gehen einher mit gastrointestinalen Symptomen [192]. Dabei konnte insbesondere bei Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer gezeigt werden, dass sich die Neurodegeneration auch im ENS manifestiert.

Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der vorrangig die dopaminergen Neurone der Substantia nigra untergehen. Die Degeneration der Neurone geht charakteristischerweise einher mit einer Aggregation von Proteinen wie  $\alpha$ -Synuclein, Neurofilamenten und Ubiquitin in den Neuronen, was histologisch darstellbar ist und schon 1912 als Lewy-Körperchen beschrieben wurde [193]. Der Untergang der Neurone führt zu einer Störung des extrapyramidal-motorischen Systems und letztlich zu motorischen Ausfallerscheinungen wie Tremor, Rigor, Verlangsamung der Bewegungen und Haltungsinstabilität. Neben den motorischen Symptomen kommt es bei 30 % der Patienten zu einer chronischen Obstipation, die oft schon vor dem Verlust neurologischer Funktionen

auftritt [194]. Auf der Suche nach dem pathologischen Korrelat dieser Darmfunktionsstörungen fand man die Lewy-Körperchen auch im Plexus submucosus und Plexus myentericus von Morbus Parkinson-Patienten [195-197]. In einer neueren Studie konnte dann nachgewiesen werden, dass die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein im Plexus submucosus schon im Frühstadium der Erkrankung auftritt. Dabei wurden Darmbiopsien von  $n = 9$  Morbus Parkinson-Patienten (welche noch keine medikamentöse Therapie erhielten) und  $n = 23$  gesunden Kontrollen untersucht. Die Ablagerung von  $\alpha$ -Synuclein konnte in allen Morbus Parkinson-Patienten nachgewiesen werden und in keiner gesunden Kontrolle [197].

Funktionell konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Lewy-Körperchen im Plexus submucosus mit dem Ausmaß der Obstipation in  $n = 29$  Morbus Parkinson-Patienten korrelierte [196]. Ungeklärt bleibt bis jetzt, ob die Lewy-Körperchen tatsächlich zu einer Degeneration der Neurone im ENS führen, welcher spezifische Neuronentyp von der  $\alpha$ -Synuclein-Aggregation betroffen ist und ob es sich bei der ENS-Pathologie um ein Epiphänomen handelt [109]. Giancola und Kollegen konnten in diesem Kontext zeigen, dass keine reduzierte Anzahl von Neuronen oder Ganglien im ENS von Morbus Parkinson-Patienten mit chronischer Obstipation im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden ist [198].

Auch das Tiermodell liefert interessante Ansätze. So konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuclein nach Injektion in die Darmwand über den Nervus vagus in das ZNS transportiert wird und dort als Proteinaggregat in Neuronen nachweisbar ist [199]. Um zukünftig den Darm in diagnostischen oder präventiven Strategien einzubeziehen, bedarf es weitergehender Forschung. Die Literatur zeigt jedoch, dass sich Morbus Parkinson schon im frühen Stadium im ENS manifestiert.

Weniger eindeutig ist die Studienlage bei Morbus Alzheimer. Morbus Alzheimer zeichnet sich aus durch einen graduellen Verlust der kognitiver Fähigkeiten und des Arbeitsgedächtnisses. Histologisch zeigen sich extrazelluläre Ablagerungen des  $\beta$ -Amyloids (*Plaques*) und intrazelluläre neurofibrilläre Aggregationen des Tau Proteins (*Tangles*) im ZNS der Patienten

[109]. Über die Beteiligung des ENS gibt es kontroverse Meinungen. Zum einen tritt Obstipation gehäuft bei Morbus Alzheimer-Patienten auf [191] und es konnte in zwei Biopsien eine Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid in der Submucosa detektiert werden [200]. Auch im Tiermodell konnten immunhistochemisch *Plaques* im ENS nachgewiesen werden sowie eine Erhöhung inflammatorischer Marker im Darmlysat der Tiere [201] und gastrointestinale Funktionsstörungen [109].

Andere Studien zeigen keinen Verlust von enterischen Neuronen in Morbus Alzheimer-Patienten [109, 191]. Biopsien von  $n = 18$  Morbus Alzheimer-Patienten zeigten keine veränderte neuronale Dichte im ENS oder Ablagerungen des Tau-Proteins [202].

Insgesamt lässt sich sagen, dass es nur wenige Studien gibt, in denen das ENS in Morbus Alzheimer-Patienten untersucht wurde. Hier bietet sich weitergehende Forschung mit einem höheren Stichprobenumfang an.

#### **4.6 Weiterführende Experimente**

In dieser Studie konnte erstmalig eine Verbindung zwischen der autoimmunen Schädigung des ZNS und des ENS in der EAE und MS gezeigt werden. Dabei kam es in der MP4-induzierten EAE im ZNS und ENS zu einer Ablagerung von Autoantikörpern und im Verlauf der Erkrankung zu einer Gliose, Neurodegeneration und neuronalem Funktionsverlust. Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es auch Unterschiede zwischen der ZNS- und ENS-Pathologie. Die Inflammation im ZNS der EAE-Tiere zeichnete sich durch eine massive perivaskuläre Zellinfiltration von Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen aus. Einige dieser Zellen migrierten weiter in das ZNS-Parenchym. Die in das Parenchym migrierten Zellen durchlaufen dort Apoptose durch Signale, die vom ZNS-Gewebe initiiert werden [203]. Im perivaskulären Areal (wo keine Apoptose der Lymphozyten ausgelöst wird) bilden sich dichte Immunzellinfiltrate und teilweise tertiär lymphatische Organe [85]. Im ENS konnten diese dichten Zellinfiltrate nicht gefunden werden. Es konnten eher vereinzelte infiltrierte



Makrophagen im ENS detektiert werden. Es bietet sich daher für weiterführende Studien an, die ENS-Pathologie und den zugrundeliegenden immunologischen Pathomechanismus genauer zu untersuchen. B-Zellen tragen anscheinend fundamental zur ENS-Pathologie bei, da sie ENS-reaktive Antikörper produzieren, welche an PLP/MBP im ENS sowie an enterische neuronale Antigene binden. Inwieweit die T-Zellen beteiligt sind, könnte in Folgestudien untersucht werden. Dafür könnten CD8 KO- und CD4 KO-Mäuse mit MP4 immunisiert werden und anschließend eine ultrastrukturelle, immunhistochemische, histologische und funktionelle Analyse des ENS durchgeführt werden.

Dieselben Untersuchungen können auch in B-Zell defizienten *muMT*- oder *J<sub>H</sub>T*-Mäusen durchgeführt werden, um die pathologische Rolle der B-Zellen zu bestätigen. Um die Pathogenität der ENS-reaktiven Autoantikörper zu bestätigen, könnten die *muMT*- oder *J<sub>H</sub>T*-Mäuse Injektionen mit Serum von MP4-immunisierten Mäusen erhalten, um im Anschluss das ENS zu untersuchen. Zeigt sich eine ENS-Pathologie nach den Seruminjektionen, ist die Pathogenität der Antikörper klar gezeigt. In diesem Kontext wurden bereits Untersuchungen von Spear und Kollegen veröffentlicht [204]. Sie induzierten die EAE durch Immunisierung mit MOG:35-55 oder Rückenmarkshomogenisat und konnten eine reduzierte gastrointestinale Motilität feststellen. Außerdem zeigten sie, dass Antikörper im Serum der EAE-Mäuse an enterische Neurone und enterische Gliazellen binden. Wurde in B-Zell defizienten *muMT*-Tieren die EAE ausgelöst, führte dies nicht zu einer reduzierten gastrointestinalen Motilität [204].

Außerdem kann das ENS in einem T-Zell-abhängigen Mausmodell untersucht werden. Dafür bietet sich die Immunisierung mit MOG:35-55 an. Des Weiteren lässt sich mit ELISPOT-Assays testen, ob in den Lymphknoten und/oder dem Blut der Tiere ENS-reaktive T-Zellen nachweisbar sind und um welche Art von T-Zell-Antwort ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$  usw.) es sich handelt. Dafür wird getestet, welche Zytokine die T-Zellen sezernieren, wenn sie in dem Assay auf die ENS-Antigene treffen [205].

Da wir keine ausgeprägte Zellinfiltration in das ENS der MP4-immunisierten Mäuse nachweisen konnten, ist eine Vermutung, dass die ENS-reaktiven Antikörper das Komplementsystem aktivieren, und es so zu einem Untergang der Neurone im ENS kommt. Um zu testen, ob sich Komponenten des Komplementsystems im ENS der MP4-immunisierten Mäuse ablagern, könnten immunohistochemische Färbungen mit Anti-C5b-9 und Anti-C3/C3b/iC3b Antikörpern durchgeführt werden. Diese Färbungen wurden bereits in früheren Studien genutzt und sind etabliert [29]. Es ist möglich das Komplementsystem in Mäusen auszuschalten, indem die Tiere Injektionen mit *cobra venom factor* (CVF) erhalten [29, 206]. Dabei verhindert CVF, dass sich die Proteine des Komplementsystems aneinanderlagern und so wird die Komplementkaskade unterbrochen. Bleibt das ENS nach der Dekomplementierung intakt, ist das ein Hinweis darauf, dass das Komplementsystem die antikörpervermittelte Neurodegeneration auslöst.

*Epitope spreading* im ZNS von MP4-immunisierten Tieren findet im ZNS in den tertiär lymphatischen Organen statt [85]. Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass ein *epitope spreading* auch auf enterische Antigene auftritt. Es bleibt die Frage, wo die Ausweitung der Immunantwort auf die enterischen Antigene stattfindet. Zu vermuten ist, dass in den Peyer-Plaques im Darm das *epitope spreading* stattfindet. Die Peyer-Plaques sind makroskopisch gut durch die Darmwand erkennbar und könnten nach dem Herauspräparieren des gastrointestinalen Trakts isoliert werden, und eine Zellsuspension aus den Peyer-Plaques hergestellt werden. In ELISPOT-Assays kann dann getestet werden, ob sich Apolipoprotein A-I-, DECR1-, eIF3D- und SmD2-spezifische Lymphozyten nachweisen lassen.

Des Weiteren bietet es sich an, das ENS in anderen EAE Modellen zu studieren. Dafür könnten die Mäuse mit humanem MOG-Protein immunisiert werden oder transgene Tiere genutzt werden, in denen sich die EAE spontan ausbildet.

Bei den MS-Patienten konnte nur in Einzelfällen eine Serumantikörperreaktivität gegen die enterischen Antigene gefunden werden. Dies passt zum einen in das Konzept des *epitope spreading*, zum anderen zeigt es aber die Notwendigkeit, den Stichprobenumfang weiter zu erhöhen. Auch die immunhistochemisch dargestellte Degeneration und Gliose des ENS könnte in Folgestudien an einer größeren Patientenkohorte untersucht werden. In dieser Studie lag der Fokus auf dem Plexus myentericus, wodurch ausschließlich Darmresektate genutzt werden konnten und keine Biopsien. Dies hat den Stichprobenumfang maßgeblich limitiert. Ein weiterer Ansatz wäre daher, auch den Plexus submucosus in der EAE zu analysieren. Ist im Tiermodell auch der Plexus submucosus degeneriert, kann dies auch in den MS-Patienten und nicht-MS-Kontrollen untersucht werden. Dafür eignen sich Darmbiopsien, was einige Vorteile bringt. Eine Darmbiopsie zu entnehmen ist ein weniger invasiver Eingriff und in vielen Fällen handelt es sich um intaktes, physiologisches Gewebe. Die pathologischen Institute haben eine große Anzahl von Biopsien, in welchen der Plexus submucosus untersucht werden kann. So lässt sich ein hoher Stichprobenumfang erzielen. Sollte sich herausstellen, dass auch der Plexus submucosus in MS-Patienten pathologische Veränderungen aufweist, könnte dies zukünftig auch diagnostisch genutzt werden.

Neben einer Ausweitung des Stichprobenumfangs könnte ein weiterer Ansatz für Folgestudien sein, die Darmfunktionalität bei MS-Patienten genauer zu studieren. Dabei ist unter anderem interessant, zu welchem Zeitpunkt der MS-Erkrankung Darmfunktionsstörungen auftreten und ob dies eventuell schon vor dem Ausbruch der MS der Fall ist. In der EAE tritt die ENS-Pathologie schon vor Auftritt der ersten neurologischen Symptome auf, daher stellt sich die Frage, ob dies auch im MS-Patienten beobachtet werden kann. Bestätigen sich unsere ersten klinischen Ergebnisse, könnten sich langfristig neue präventive und therapeutische Strategien entwickeln, die den Darm einbeziehen.

## LITERATUR

1. Benito-León, J., *Are the prevalence and incidence of multiple sclerosis changing?* Neuroepidemiology, 2011. **36**(3): p. 148-149.
2. Delank, H.-W. and W. Gehlen, *Neurologie*. Vol. 1. 2006: Georg Thieme Verlag.
3. Goverman, J., *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(6): p. 393-407.
4. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **162**(1): p. 1-11.
5. Rammohan, K.W., *Axonal injury in multiple sclerosis*. Current neurology and neuroscience reports, 2003. **3**(3): p. 231-237.
6. Group, O.N.S., *Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up*. Archives of neurology, 2008. **65**(6): p. 727.
7. Manrique-Hoyos, N., et al., *Late motor decline after accomplished remyelination: impact for progressive multiple sclerosis*. Annals of neurology, 2012. **71**(2): p. 227-244.
8. Recks, M.S., et al., *Early axonal damage and progressive myelin pathology define the kinetics of CNS histopathology in a mouse model of multiple sclerosis*. Clinical immunology, 2013. **149**(1): p. 32-45.
9. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. Annals of neurology, 2000. **47**(6): p. 707-717.
10. Barnett, M.H. and J.W. Prineas, *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion*. Annals of neurology, 2004. **55**(4): p. 458-468.
11. Lassmann, H., W. Brück, and C.F. Lucchinetti, *The immunopathology of multiple sclerosis: an overview*. Brain pathology, 2007. **17**(2): p. 210-218.
12. Steinman, L., *A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nature medicine, 2007. **13**(1): p. 139-145.

13. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Vol. 1. 1997: Current Biology.
14. Pette, M., et al., *Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals*. *Neurology*, 1990. **40**(11): p. 1770-1770.
15. Anderson, A.C., et al., *High Frequency of Autoreactive Myelin Proteolipid Protein-Specific T Cells in the Periphery of Naive Mice*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. **191**(5): p. 761-770.
16. Van Parijs, L. and A.K. Abbas, *Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off*. *Science*, 1998. **280**(5361): p. 243-248.
17. Jordan, M.S., et al., *Anergy and suppression regulate CD4<sup>+</sup> T cell responses to a self peptide*. *European journal of immunology*, 2000. **30**(1): p. 136-144.
18. Kuerten, S. and P.V. Lehmann, *The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis?* *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2011. **31**(12): p. 907-916.
19. Targoni, O.S. and P.V. Lehmann, *Endogenous myelin basic protein inactivates the high avidity T cell repertoire*. *Journal of Experimental Medicine*, 1998. **187**(12): p. 2055-2063.
20. Ransohoff, R.M., P. Kivisäkk, and G. Kidd, *Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system*. *Nature Reviews Immunology*, 2003. **3**(7): p. 569-581.
21. Yednock, T.A. and C. Cannon, *Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Antibodies Against (alpha) 4 (beta) 1 Integrin*. *Nature*, 1992. **356**(6364): p. 63.
22. Rudick, R.A. and A. Sandrock, *Natalizumab: alpha4-integrin antagonist selective adhesion molecule inhibitors for MS*. *Expert review of neurotherapeutics*, 2004. **4**(4): p. 571-580.

23. Frohman, E.M., M.K. Racke, and C.S. Raine, *Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(9): p. 942-955.
24. Cusick, M.F., J.E. Libbey, and R.S. Fujinami, *Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses*. Current opinion in rheumatology, 2013. **25**(4): p. 496.
25. Plumb, J., et al., *Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis*. Brain pathology, 2002. **12**(2): p. 154-169.
26. Sallusto, F., et al., *T-cell trafficking in the central nervous system*. Immunological reviews, 2012. **248**(1): p. 216-227.
27. Ishii, A., et al., *Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression*. Allergy International, 2010. **59**(4): p. 399-408.
28. Kobayashi, K., K. Kaneda, and T. Kasama, *Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity*. Microscopy research and technique, 2001. **53**(4): p. 241-245.
29. Hundgeburth, L.C., et al., *The complement system contributes to the pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis by triggering demyelination and modifying the antigen-specific T and B cell response*. Clinical Immunology, 2013. **146**(3): p. 155-164.
30. Liu, W., P. Vanguri, and M. Shin, *Studies on demyelination in vitro: the requirement of membrane attack components of the complement system*. The Journal of Immunology, 1983. **131**(2): p. 778-782.
31. Barnum, S.R., *Complement in central nervous system inflammation*. Immunologic research, 2002. **26**(1-3): p. 7-13.
32. Gasque, P., et al., *The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(7): p. 3543-3554.

33. Sellebjerg, F., et al., *Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis*. Journal of the neurological sciences, 1998. **157**(2): p. 168-174.
34. Terényi, N., et al., *Transient decompensation of mice delays onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and impairs MOG-specific T cell response and autoantibody production*. Molecular immunology, 2009. **47**(1): p. 57-63.
35. Linington, C., et al., *The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis*. Brain, 1989. **112**(4): p. 895-911.
36. Haider, L., et al., *Oxidative damage in multiple sclerosis lesions*. Brain, 2011: p. awr128.
37. Steinman, L., *Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(5): p. F27-F30.
38. Wolf, S.D., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(6): p. 2271-2278.
39. Ferguson, B., et al., *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions*. Brain, 1997. **120**(3): p. 393-399.
40. Kuhlmann, T., et al., *Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time*. Brain, 2002. **125**(10): p. 2202-2212.
41. Filippi, M., et al., *Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis*. Brain, 2003. **126**(2): p. 433-437.
42. De Stefano, N., et al., *Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability*. Archives of neurology, 2001. **58**(1): p. 65-70.
43. Derfuss, T., et al., *Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury*. Journal of molecular medicine, 2010. **88**(8): p. 753-761.

44. Lassmann, H., *Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models*. *Experimental neurology*, 2010. **225**(1): p. 2-8.
45. Gold, R. and J. Wolinsky, *Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide*. *Acta neurologica Scandinavica*, 2011. **124**(2): p. 75-84.
46. Rao, P. and B.M. Segal, *Experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Autoimmunity: Methods and Protocols*, 2012: p. 363-380.
47. Pender, M.P., *Experimental autoimmune encephalomyelitis*. 1995.
48. Krumbholz, M., et al., *B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy*. *Nature Reviews Neurology*, 2012. **8**(11): p. 613-623.
49. Hiepe, F., et al., *Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2011. **7**(3): p. 170-178.
50. Keegan, M., et al., *Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange*. *The Lancet*, 2005. **366**(9485): p. 579-582.
51. Rovituso, D.M., et al., *The brain antigen-specific B cell response correlates with glatiramer acetate responsiveness in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. *Scientific reports*, 2015. **5**.
52. Meinl, E., M. Krumbholz, and R. Hohlfeld, *B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation*. *Annals of neurology*, 2006. **59**(6): p. 880-892.
53. Barun, B. and A. Bar-Or, *Treatment of multiple sclerosis with anti-CD20 antibodies*. *Clinical immunology*, 2012. **142**(1): p. 31-37.
54. Hauser, S.L., et al., *B-cell depletion with rituximab in relapsing–remitting multiple sclerosis*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(7): p. 676-688.
55. Cross, A.H., et al., *Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*. *Journal of neuroimmunology*, 2006. **180**(1): p. 63-70.



56. Hawker, K., et al., *Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial*. *Annals of neurology*, 2009. **66**(4): p. 460-471.
57. Bar-Or, A., et al., *Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial*. *Annals of neurology*, 2008. **63**(3): p. 395-400.
58. Kuenz, B., et al., *Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis*. *PloS one*, 2008. **3**(7): p. e2559.
59. Kuerten, S., et al., *Identification of a B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood*. *Clinical Immunology*, 2014. **152**(1): p. 20-24.
60. Hohmann, C., et al., *Categorization of multiple sclerosis relapse subtypes by B cell profiling in the blood*. *Acta neuropathologica communications*, 2014. **2**(1): p. 138.
61. Elliott, C., et al., *Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis*. *Brain*, 2012. **135**(6): p. 1819-1833.
62. Breijl, E.C., et al., *Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis*. *Annals of neurology*, 2008. **63**(1): p. 16-25.
63. O'Connor, K.C., et al., *Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein*. *The Journal of Immunology*, 2005. **175**(3): p. 1974-1982.
64. Warren, K., I. Catz, and L. Steinman, *Fine specificity of the antibody response to myelin basic protein in the central nervous system in multiple sclerosis: the minimal B-cell epitope and a model of its features*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(24): p. 11061-11065.
65. Krumbholz, M., et al., *Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment*. *Brain*, 2005. **129**(1): p. 200-211.

66. Serafini, B., et al., *Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis*. *Brain pathology*, 2004. **14**(2): p. 164-174.
67. Magliozzi, R., et al., *Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology*. *Brain*, 2007. **130**(4): p. 1089-1104.
68. Rivers, T.M., D. Sprunt, and G. Berry, *Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys*. *Journal of Experimental Medicine*, 1933. **58**(1): p. 39-53.
69. Baxter, A.G., *The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Nature Reviews Immunology*, 2007. **7**(11): p. 904-912.
70. Wolf, A., E.A. Kabat, and A.E. Bezer, *The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1947. **6**(4): p. 333-357.
71. Pöllinger, B., et al., *Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells*. *Journal of Experimental Medicine*, 2009. **206**(6): p. 1303-1316.
72. Rangachari, M. and V.K. Kuchroo, *Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology*. *Journal of autoimmunity*, 2013. **45**: p. 31-39.
73. Kuerten, S., et al., *MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice*. *Journal of neuroimmunology*, 2006. **177**(1): p. 99-111.
74. Beeton, C., A. Garcia, and K.G. Chandy, *Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2007(5): p. e224-e224.

75. Batoulis, H., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis—achievements and prospective advances*. *Apmis*, 2011. **119**(12): p. 819-830.
76. Hjelmström, P., et al., *Cutting edge: B cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization*. *The Journal of Immunology*, 1998. **161**(9): p. 4480-4483.
77. Bernard, C.C. and P.R. Carnegie, *Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: immunologic response to mouse spinal cord and myelin basic proteins*. *The Journal of Immunology*, 1975. **114**(5): p. 1537-1540.
78. Lyons, J.-A., et al., *B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide*. *proteins*, 1999. **1**: p. 4.
79. Devaux, B., et al., *Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide*. *Journal of neuroimmunology*, 1997. **75**(1): p. 169-173.
80. Lyons, J.A., M.J. Ramsbottom, and A.H. Cross, *Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein*. *European journal of immunology*, 2002. **32**(7): p. 1905-1913.
81. Kuerten, S., et al., *Myelin-reactive antibodies mediate the pathology of MBP–PLP fusion protein MP4-induced EAE*. *Clinical Immunology*, 2011. **140**(1): p. 54-62.
82. Kuerten, S., et al., *The development of tertiary lymphoid organs in the central nervous system facilitates determinant spreading of the MP4-specific T cell response (P4164)*. 2013, Am Assoc Immunol.
83. Arndt, A., et al., *Conventional housing conditions attenuate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *PloS one*, 2014. **9**(6): p. e99794.

84. Elliott, E.A., et al., *Treatment of experimental encephalomyelitis with a novel chimeric fusion protein of myelin basic protein and proteolipid protein*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(7): p. 1602.
85. Kuerten, S., et al., *Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response*. Acta neuropathologica, 2012. **124**(6): p. 861-873.
86. Batoulis, H., et al., *Central nervous system infiltrates are characterized by features of ongoing B cell-related immune activity in MP4-induced experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clinical Immunology, 2015. **158**(1): p. 47-58.
87. Berger, T., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1997. **76**(3): p. 355-364.
88. Dulac, C., et al., *Molecular characterization of the Schwann cell myelin protein, SMP: structural similarities within the immunoglobulin superfamily*. Neuron, 1992. **8**(2): p. 323-334.
89. Taveggia, C., et al., *Characterization of a Schwann cell enhancer in the myelin basic protein gene*. Journal of neurochemistry, 2004. **91**(4): p. 813-824.
90. Jeserich, G., et al., *Molecular signaling and regulation in glial cells: a key to remyelination and functional repair*. 2012: Springer Science & Business Media.
91. Rao, M., et al., *Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system*. Glia, 2015. **63**(11): p. 2040-2057.
92. Garbern, J.Y., et al., *Proteolipid protein is necessary in peripheral as well as central myelin*. Neuron, 1997. **19**(1): p. 205-218.

93. Morell, P. and R.H. Quarles, *Characteristic composition of myelin*. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 1999. **6**.
94. Nave, K.-A. and H.B. Werner, *Myelination of the nervous system: mechanisms and functions*. Annual review of cell and developmental biology, 2014. **30**: p. 503-533.
95. Pochard, C., et al., *Defects in 15-HETE production and control of epithelial permeability by human enteric glial cells from patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2016. **150**(1): p. 168-180.
96. Boesmans, W., et al., *Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system*. Glia, 2015. **63**(2): p. 229-241.
97. Lehmann, P.V., et al., *Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen*. 1992.
98. Matsumoto, K. and S. Birch, *Hara diagnosis: reflections on the sea*. 1988: Paradigm Publications.
99. Störig, H.J., *Kleine Weltgeschichte der Philosophie*. 2013.
100. Steffel, J. and T. Luescher, *Herz-Kreislauf*. 2014: Springer-Verlag.
101. Hambrecht, R., et al., *Kommentar zu den neuen Leitlinien (2016) der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur kardiovaskulären Prävention*. Der Kardiologe, 2017. **11**(1): p. 21-26.
102. Zagon, A., *Does the vagus nerve mediate the sixth sense?* Trends in neurosciences, 2001. **24**(11): p. 671-673.
103. McElhanon, B.O., et al., *Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis*. Pediatrics, 2014. **133**(5): p. 872-883.
104. Bernier, R., et al., *Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development*. Cell, 2014. **158**(2): p. 263-276.

105. Veenstra-VanderWeele, J., et al., *Autism gene variant causes hyperserotonemia, serotonin receptor hypersensitivity, social impairment and repetitive behavior*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(14): p. 5469-5474.
106. Wakabayashi, K. and H. Takahashi, *Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease*. European neurology, 1997. **38**(Suppl. 2): p. 2-7.
107. Cersosimo, M.G. and E.E. Benarroch, *Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease*. Movement Disorders, 2008. **23**(8): p. 1065-1075.
108. Rao, M. and M.D. Gershon, *The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders*. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2016. **13**(9): p. 517.
109. Chalazonitis, A. and M. Rao, *Enteric nervous system manifestations of neurodegenerative disease*. Brain research, 2018.
110. Zhou, L. and J.A. Foster, *Psychobiotics and the gut-brain axis: in the pursuit of happiness*. Neuropsychiatric disease and treatment, 2015. **11**: p. 715.
111. Furness, J.B., *The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies*. Neurogastroenterology & Motility, 2008. **20**(s1): p. 32-38.
112. Heanue, T.A. and V. Pachnis, *Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies*. Nature Reviews Neuroscience, 2007. **8**(6): p. 466-479.
113. Furness, J., *Types of neurons in the enteric nervous system*. Journal of the autonomic nervous system, 2000. **81**(1): p. 87-96.
114. Furness, J.B., et al., *The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control*, in *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. 2014, Springer. p. 39-71.
115. Furness, J.B., *The enteric nervous system and neurogastroenterology*. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2012. **9**(5): p. 286-294.

116. Thomas, J. and A. Kuntz, *A study of gastro-intestinal motility in relation to the enteric nervous system*. American Journal of Physiology--Legacy Content, 1926. **76**(3): p. 606-626.
117. Furness, J.B., et al., *The enteric nervous system and its extrinsic connections*. Textbook of gastroenterology, 1999: p. 15-39.
118. Rühl, A., Y. Nasser, and K. Sharkey, *Enteric glia*. Neurogastroenterology & Motility, 2004. **16**(s1): p. 44-49.
119. Rühl, A., *Glial cells in the gut*. Neurogastroenterology & Motility, 2005. **17**(6): p. 777-790.
120. Neunlist, M., et al., *Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2003. **285**(5): p. G1028-G1036.
121. Jessen, K.R., R. Thorpe, and R. Mirsky, *Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes*. Journal of neurocytology, 1984. **13**(2): p. 187-200.
122. von Boyen, G.B.T., et al., *Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia*. Gut, 2004. **53**(2): p. 222-228.
123. Bradley Jr, J.S., E.J. Parr, and K.A. Sharkey, *Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum*. Cell and tissue research, 1997. **289**(3): p. 455-461.
124. Bush, T.G., et al., *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice*. Cell, 1998. **93**(2): p. 189-201.
125. Bar, K., et al., *Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease*. Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1381-1385.

126. Cataldo, A.M. and R.D. Broadwell, *Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: I. Neurons and glia*. Journal of electron microscopy technique, 1986. **3**(4): p. 413-437.
127. Fletcher, E.L., M.J. Clark, and J.B. Furness, *Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus*. Cell and tissue research, 2002. **308**(3): p. 339-346.
128. Zhang, W., et al., *Endothelin-activated calcium signaling in enteric glia derived from neonatal guinea pig*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1997. **272**(5): p. G1175-G1185.
129. Gershon, M.D. and S. Bursztajn, *Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa*. Journal of Comparative Neurology, 1978. **180**(3): p. 467-487.
130. Hollenbach, E., et al., *T cell activation by enteric glia—A novel pathway for the amplification of inflammatory responses in the enteric nervous system (ENS)*. Gastroenterology, 2000. **118**(4): p. A184-A185.
131. Geboes, K., et al., *Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1992. **103**(2): p. 439-447.
132. Butcher, E., et al., *Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation*. The Journal of Immunology, 1982. **129**(6): p. 2698-2707.
133. Fagarasan, S., et al., *In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria*. Nature, 2001. **413**(6856): p. 639-643.
134. Bye, W., C. Allan, and J. Trier, *Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum*. Gastroenterology, 1984. **86**(5 Pt 1): p. 789-801.



135. Worbs, T., et al., *Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(3): p. 519-527.
136. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends in immunology, 2002. **23**(9): p. 445-449.
137. Mora, J.R., et al., *Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 88-93.
138. Rott, L.S., et al., *Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **100**(5): p. 1204.
139. Berer, K., et al., *Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 538-541.
140. Lee, Y.K., et al., *Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(Supplement 1): p. 4615-4622.
141. Ochoa-Repáraz, J., et al., *Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(10): p. 6041-6050.
142. Takata, K., et al., *Dietary yeasts reduce inflammation in central nerve system via microflora*. Annals of clinical and translational neurology, 2015. **2**(1): p. 56-66.
143. Rezende, R.M., et al., *Hsp65-producing Lactococcus lactis prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+ LAP+ regulatory T cells*. Journal of autoimmunity, 2013. **40**: p. 45-57.
144. Wang, Y., et al., *An intestinal commensal symbiosis factor controls neuroinflammation via TLR2-mediated CD39 signalling*. Nature communications, 2014. **5**.

145. Telesford, K.M., et al., *A commensal symbiotic factor derived from Bacteroides fragilis promotes human CD39+ Foxp3+ T cells and Treg function*. Gut microbes, 2015. **6**(4): p. 234-242.
146. Chen, J., et al., *Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls*. Scientific Reports, 2016. **6**.
147. Haghikia, A., et al., *Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine*. Immunity, 2016. **44**(4): p. 951.
148. Berer, K., et al., *Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(40): p. 10719-10724.
149. Billiau, A. and P. Matthys, *Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases*. Journal of leukocyte biology, 2001. **70**(6): p. 849-860.
150. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. **19**(2): p. 185-193.
151. Ferreira, F., et al., *Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport*. The Journal of clinical investigation, 2004. **113**(2): p. 231-242.
152. Prinz, J., et al., *Time-Dependent Progression of Demyelination and Axonal Pathology in MP4-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. PloS one, 2015. **10**(12): p. e0144847.
153. Recks, M.S., K. Addicks, and S. Kuerten, *Spinal cord histopathology of MOG peptide 35–55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time-and score-dependent*. Neuroscience letters, 2011. **494**(3): p. 227-231.

154. Handy, R.L.C. and P.K. Moore, *A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity*. British journal of pharmacology, 1998. **123**(6): p. 1119-1126.
155. Wunsch, M., et al., *The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis*. Acta neuropathologica, 2017. **134**(2): p. 281-295.
156. Umesaki, Y., et al., *Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus*. Immunology, 1993. **79**(1): p. 32.
157. Schon, E.A. and G. Manfredi, *Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction*. The Journal of clinical investigation, 2003. **111**(3): p. 303-312.
158. Mao, P. and P.H. Reddy, *Is multiple sclerosis a mitochondrial disease?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2010. **1802**(1): p. 66-79.
159. Umehara, F., et al., *Axonal damage revealed by accumulation of  $\beta$ -amyloid precursor protein in HTLV-I-associated myelopathy*. Journal of the neurological sciences, 2000. **176**(2): p. 95-101.
160. Lovas, G., et al., *Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques*. Brain, 2000. **123**(2): p. 308-317.
161. Holley, J., et al., *Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar*. Neuropathology and applied neurobiology, 2003. **29**(5): p. 434-444.
162. Paty, D.W. and D.L. Arnold, *The lesions of multiple sclerosis*. 2002, Mass Medical Soc.
163. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends in neurosciences, 2009. **32**(12): p. 638-647.
164. Lehmann, P.V., et al., *Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire*. Immunology today, 1993. **14**(5): p. 203-208.

165. Sie, C., T. Korn, and M. Mitsdoerffer, *Th17 cells in central nervous system autoimmunity*. *Experimental neurology*, 2014. **262**: p. 18-27.
166. Robinson, A.P., et al., *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment*. *Handbook of clinical neurology*, 2014. **122**: p. 173.
167. Jiang, Z., J.X. Jiang, and G.-X. Zhang, *Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Immunology letters*, 2014. **160**(1): p. 17-22.
168. Tuohy, V.K. and R.P. Kinkel, *Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease*, in *Autoimmunity*. 2001, Springer. p. 39-48.
169. Vanderlugt, C.L. and S.D. Miller, *Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy*. *Nature Reviews Immunology*, 2002. **2**(2): p. 85-95.
170. Tuohy, V.K., *Peptide determinants of myelin proteolipid protein (PLP) in autoimmune demyelinating disease: a review*. *Neurochemical research*, 1994. **19**(8): p. 935-944.
171. Morris-Downes, M.M., et al., *Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice*. *Journal of neuroimmunology*, 2002. **125**(1): p. 114-124.
172. Jingwu, Z., et al., *Murine monoclonal anti-myelin basic protein (MBP) antibodies inhibit proliferation and cytotoxicity of MBP-specific human T cell clones*. *Journal of neuroimmunology*, 1989. **24**(1): p. 87-94.
173. Levinthal, D.J., et al., *Adding to the burden: gastrointestinal symptoms and syndromes in multiple sclerosis*. *Multiple sclerosis international*, 2013. **2013**.
174. Banati, M., et al., *Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system*. *European journal of neurology*, 2013. **20**(11): p. 1492-1495.
175. Pfeiffer, S.E., A.E. Warrington, and R. Bansal, *The oligodendrocyte and its many cellular processes*. *Trends in cell biology*, 1993. **3**(6): p. 191-197.

176. Bayliss, W. and E. Starling, *The movements and innervation of the small intestine*. The Journal of physiology, 1899. **24**(2): p. 99-143.
177. Srivastava, R., et al., *Potassium channel KIR4. 1 as an immune target in multiple sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(2): p. 115-123.
178. Brickshawana, A., et al., *Investigation of the KIR4. 1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study*. The Lancet Neurology, 2014. **13**(8): p. 795-806.
179. Bielekova, B. and R. Martin, *Development of biomarkers in multiple sclerosis*. Brain, 2004. **127**(7): p. 1463-1478.
180. Lennon, V.A., et al., *IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **202**(4): p. 473-477.
181. Roemer, S.F., et al., *Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis*. Brain, 2007. **130**(5): p. 1194-1205.
182. Pittock, S.J., et al., *Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression*. Archives of neurology, 2006. **63**(7): p. 964-968.
183. Lassmann, H., W. Brück, and C. Lucchinetti, *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends in molecular medicine, 2001. **7**(3): p. 115-121.
184. Gupta, G., J.M. Gelfand, and J.D. Lewis, *Increased risk for demyelinating diseases in patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 819-826.
185. Andus, T., et al., *Focal white-matter lesions in brain of patients with inflammatory bowel disease*. The Lancet, 1995. **345**(8954): p. 897-898.
186. Chen, M., et al., *Cerebral white matter lesions in patients with Crohn's disease*. Journal of Neuroimaging, 2012. **22**(1): p. 38-41.
187. Amiel, J., et al., *Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review*. Journal of medical genetics, 2008. **45**(1): p. 1-14.

188. Lesser, P.B., et al., *Adult-onset Hirschsprung's disease*. *Jama*, 1979. **242**(8): p. 747-748.
189. Chen, F., et al., *Hirschsprung's disease in a young adult: report of a case and review of the literature*. *Annals of diagnostic pathology*, 2006. **10**(6): p. 347-351.
190. Tomita, R., et al., *Hirschsprung's disease and its allied disorders in adults' histological and clinical studies*. *Hepato-gastroenterology*, 2003. **50**(52): p. 1050-1053.
191. Bassotti, G. and V. Villanacci, *Can "functional" constipation be considered as a form of enteric neuro-gliopathy?* *Glia*, 2011. **59**(3): p. 345-350.
192. Winge, K., D. Rasmussen, and L. Werdelin, *Constipation in neurological diseases*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2003. **74**(1): p. 13-19.
193. Spillantini, M.G., et al.,  *$\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 839.
194. Edwards, L., et al., *Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease*. *Movement Disorders*, 1991. **6**(2): p. 151-156.
195. Wakabayashi, K., et al., *Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses*. *Acta neuropathologica*, 1988. **76**(3): p. 217-221.
196. Lebouvier, T., et al., *Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms*. *PloS one*, 2010. **5**(9): p. e12728.
197. Shannon, K.M., et al., *Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease*. *Movement Disorders*, 2012. **27**(6): p. 709-715.
198. Giancola, F., et al., *Downregulation of neuronal vasoactive intestinal polypeptide in Parkinson's disease and chronic constipation*. *Neurogastroenterology & Motility*, 2017. **29**(5).
199. Holmqvist, S., et al., *Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats*. *Acta neuropathologica*, 2014. **128**(6): p. 805-820.
200. Joachim, C.L., H. Mori, and D.J. Selkoe, *Amyloid  $\beta$ -protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease*. *Nature*, 1989. **341**(6239): p. 226.

201. Puig, K.L., et al., *Overexpression of mutant amyloid- $\beta$  protein precursor and presenilin 1 modulates enteric nervous system*. Journal of Alzheimer's Disease, 2015. **44**(4): p. 1263-1278.
202. Shankle, W., et al., *Studies of the enteric nervous system in Alzheimer disease and other dementias of the elderly: enteric neurons in Alzheimer disease*. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 1993. **6**(1): p. 10-14.
203. Lehmann, P.V., *The fate of T cells in the brain: veni, vidi, vici and veni, mori*. The American journal of pathology, 1998. **153**(3): p. 677.
204. Spear, E., et al., *Altered gastrointestinal motility involving autoantibodies in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis*. Neurogastroenterology & Motility, 2018: p. e13349.
205. Kuerten, S., M. Wunsch, and P.V. Lehmann, *Longitudinal T cell-derived IFN- $\gamma$ /IL-17 balances do not correlate with the disease course in two mouse models of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of immunological methods, 2013. **398**: p. 68-75.
206. Van den Berg, C.W., P.C. Aerts, and H. Van Dijk, *Functional assay of C5-activating and nonactivating cobra venom factor preparations in the mouse system*. Journal of immunological methods, 1990. **133**(2): p. 199-206.

**CURRICULUM VITAE MARIE WUNSCH**







### **AFFIDAVIT**

I hereby confirm that my thesis entitled “The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis. Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical or similar form.

Köln,

Marie Wunsch

### **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation “Das enterische Nervensystem als Zielstruktur der Autoimmunreaktion in der Multiplen Sklerose” eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Köln,

Marie Wunsch

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Stefanie Kürten, die mir das Thema der Arbeit zur Verfügung gestellt hat und mich gefördert und unterstützt hat. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Außerdem ermöglichte sie den Kontakt zu Prof. Dr. Paul V. Lehmann. Ich danke ihm für die Betreuung meiner Masterarbeit und Doktorarbeit, für die Unterstützung und für alles, was ich von ihm lernen durfte. Die Zeit in seinem Labor in Cleveland war eine große Bereicherung für mich.

Ich danke der ganzen AG Kürten für den Austausch und die konstruktiven Diskussionen und allen Mitarbeitern der Anatomie Würzburg für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Brigitte Treffny, Eleonora Maier, Alla Ganscher, Andrea Schampel, Nicole Wagner, Michael Rodi, Erna Kleinschroth, Karin Reinfurt-Grehm und Sieglinde Schenk für die Unterstützung bei den Experimenten und Michael Christof für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen. Danke an Barbara Voussen und Andreas Friebe für die Myographie-Experimente und den hilfreichen Austausch über die Ergebnisse. Ich danke Samir Jabari für die whole mount-Färbungen und die Darmresektate. Shanthi Srinivasan und François Cossais für die Bereitstellung der Zellysate und Claus-Jürgen Scholz für die Erstellung des RNA Expressionsprofils. Mathias Mäurer und Matthias Wönckhaus danke ich für die Darmresektate der MS-Patienten. Uwe Schulte danke ich für die Durchführung der Immunpräzipitation und Massenspektrometrie, Bertal Aktas und Joachim Nickel für die Bereitstellung des eIF3D Plasmids und die Proteinsynthese.

Ich bin meinen Freunden Laiq-Jan, Monika, Elli, Yaser, Flo und Isa dankbar dafür, dass sie für mich da waren. Ich danke meiner Familie und Inge und Michael für das aufwändige Korrekturlesen. Vor allem danke ich Benni, der durch seine liebevolle Unterstützung wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich meine Ziele realisieren konnte.