

Aus der medizinischen Poliklinik (CCM)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Räumliche Organisation der fäkalen Bakterien bei Patienten
mit multipler Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Rejmus

aus Starogard Gdanski

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abstrakt.....	IV
Abstract.....	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Geschichte der Multiplen Sklerose.....	1
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Histopathologie	2
1.4 Immunpathogenese	3
1.4.1 Toleranzmechanismen	4
1.4.2 Zielantigene	5
1.4.3 T-Lymphozyten und ihre Rolle im Immunsystem.....	5
1.5 Klinischer Verlauf.....	8
1.6 Therapie.....	13
1.6.1 Symptomatische Therapie.....	13
1.6.2 Immunmodulatorische Schubtherapie	13
1.6.3 Verlaufsbeeinflussende Langzeittherapie	14
1.7 Ätiologie	17
1.7.1 Genetische Faktoren	18
1.7.2 Breitengrade	19
1.7.3 Erreger.....	20
1.7.4 Ultraviolett-Strahlung-B.....	21
1.7.5 Rauchen	22

1.7.6 Hygiene-Hypothese	22
1.8 Autoimmunität und die intestinale Mikroflora	24
1.9 Herleitung der Aufgabenstellung	26
2. Material und Methode	27
2.1 Patienten und Probanden	29
2.2 Probenpräparation	30
2.3 Hybridisierung	31
2.3.1 Vorbereitungen für die Hybridisierung	31
2.3.2 Oligonukleotidsonden	31
2.3.3 Gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe	33
2.3.4 Hybridisierung	34
2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Mikroskopie	35
2.4.1 Funktionsweise	35
2.4.2 Zelldifferenzierung	37
2.4.3 Fotodokumentation	38
2.5 Statistik	38
3. Ergebnisse	40
3.1 Deskriptive Statistik	40
3.2 Häufigkeiten	41
3.3 Konzentrationen	45
3.4 Subgruppenanalyse	62
4. Diskussion	65
4.1 Hintergründe und Stand der Wissenschaft	65
4.1.1 Das mukosale Immunsystem und die Autoimmunität	65
4.1.2 Die Darmflora und die Entwicklung des Immunsystems	66
4.2 Material und Methode	68
4.2.1 Patientenauswahl	68

4.2.2	Verwendete Proben	68
4.2.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	68
4.3	Ergebnisse	70
4.3.1	Leukozyten und Mucusschicht.....	70
4.3.2	Biostruktur der fäkalen Flora bei der multiplen Sklerose	71
4.3.3	Zusammensetzung der Darmflora bei Autoimmunerkrankungen	74
4.3.4	Einfluss der Darmflora auf die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	75
4.4	Metabolische Aspekte der Darmfloraveränderungen	77
4.5	Externe Faktoren und die kommensale Darmflora.....	79
4.5.1	Zeitfaktor.....	79
4.5.2	Alter	80
4.5.3	Ernährung.....	81
4.6	Darmflora und die Epidemiologie der multiplen Sklerose.....	82
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	86
	Eidesstattliche Versicherung	VIII
	Lebenslauf.....	IX
	Danksagung	IX

Abstrakt

Einleitung: Die Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte, chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems deren Ätiologie immer noch unklar bleibt. Mehrere wissenschaftliche Studien zeigten, dass das mukosale Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Autoimmunität spielen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora bei MS-Patienten untersucht.

Methodik: Stuhlproben von MS-Patienten (N=54) aus dem ambulanten MS-Zentrum der Oberhavel Kliniken in Hennigsdorf und von Probanden (N=54) aus einer internistischen Spezialsprechstunde der Charité in Berlin wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht. Es wurden Oligonukleotidsonden spezifisch für sechs Bakteriengruppen (*Atopobium*, *Bacteroidaceae*, *Bifidobacteriae*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacterium rectale* und *Faecalibacterium prausnitzii*) verwendet.

Ergebnisse: *Atopobium*-Bakterien treten statistisch signifikant häufiger bei MS-Patienten auf. *Atopobium* und *Bifidobacteriae* erreichen bei MS-Patienten statistisch signifikant höhere und *Bacteroidaceae* niedrigere Konzentrationen. Die Konzentrationen von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* bei MS-Patienten erreichten das Niveau der üblich dominierenden *Firmicutes*- und *Bacteroidetes*-Gruppen. Die Zusammensetzung der Darmflora bei MS-Patienten war unabhängig von der klinischen Form der Erkrankung, der Krankheitsaktivität, des Behinderungsgrades, der Therapieform und des Wohnortes.

Schlussfolgerung: Die Struktur der fäkalen Flora bei MS-Patienten entspricht den früheren Beobachtungen bei anderen Autoimmunerkrankungen. Die Dysbiose der Darmflora bei MS könnte die immunologischen und metabolischen Eigenschaften der Patienten beeinflussen. Die neuen Erkenntnisse über die Entwicklung der menschlichen Darmflora und deren umweltabhängige Veränderung lassen einen Zusammenhang mit den bisher bekannten, MS-typischen, epidemiologischen Mustern vermuten.

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated, inflammatory disease of the central nervous system. Although its etiology remains unclear, some scientific studies indicate, that the mucosal immune system may play an important role in the regulation of autoimmunity. The purpose of this study was to evaluate the changes in the composition of the intestinal flora of patients with MS

Methods: Stool samples were collected from MS outpatients (N = 54) in the MS Center of Oberhavel Kliniken in Hennigsdorf and from control persons (N = 54) attending the General Internal Medicine Outpatient Clinic of the Charité Hospital in Berlin. They were investigated with fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques, with probes specific for six bacterial groups: *Atopobium*, *Bacteroidaceae*, *Bifidobacteriae*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacterium rectale* and *Faecalibacterium prausnitzii*.

Results: *Atopobium* bacteria occurred significantly more often in MS patients than in controls. Concentrations of *Atopobium* and *Bifidobacterium* were significantly higher, while the concentration of *Bacteroidaceae* was significantly lower in MS patients. The concentrations of *Atopobium* and *Bifidobacteriae* in MS patients reached levels, which are typically for *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. The composition of the intestinal flora in patients with MS did not depend on the clinical form of the disease, disease activity, degree of disability, type of therapy and the place of residence.

Conclusion: The structure of the fecal flora in MS patients in regards to the presence of bacterial groups corresponded to results of previous observations in other autoimmune diseases. The evidence suggests that bacterial dysbiosis of the intestinal flora could affect the immunological and metabolic characteristics of MS patients. Some factors related to the evolution of the human intestinal flora and its environmentally induced changes may suggest a connection to the known MS-typical epidemiological patterns.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus von FISH	33
Abbildung 2: Funktionsweise der Fluoreszenzmikroskopie	36
Abbildung 3: Altersverteilung der Gruppen	40
Abbildung 4: Häufigkeit des Auftretens von Leukozyten	42
Abbildung 5: Häufigkeit des Auftretens von einer Mucusschicht	42
Abbildung 6: Häufigkeit des Auftretens von <i>Atopobium</i> - Gruppen insgesamt	43
Abbildung 7: Breite der Mucusschicht - Gruppen insgesamt	45
Abbildung 8: Leukozyten-Konzentration - Gruppen insgesamt	46
Abbildung 9: <i>Atopobium</i> -Konzentration	47
Abbildung 10: <i>Atopobium</i> -Konzentration - Gruppen insgesamt	48
Abbildung 11: <i>Bacteroidaceae</i> -Gattung Konzentration	49
Abbildung 12: <i>Bacteroidaceae</i> -Konzentration - Gruppen insgesamt	50
Abbildung 13: <i>Bifidobacteriae</i> -Konzentration	51
Abbildung 14: <i>Bifidobacteriae</i> -Konzentration - Gruppen insgesamt	52
Abbildung 15: <i>Enterobacteriaceae</i> -Konzentration	53
Abbildung 16: <i>Enterobacteriaceae</i> -Konzentration - Gruppen insgesamt	53
Abbildung 17: <i>Eubacterium rectale</i> -Konzentration	54
Abbildung 18: <i>Eubacterium rectale</i> -Konzentration - Gruppen insgesamt	55
Abbildung 19: <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> -Konzentration	56
Abbildung 20: <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> -Konzentration - Gruppen insgesamt	56
Abbildung 21: <i>Atopobium</i> -Konzentration bei Frauen	58
Abbildung 22: <i>Bifidobacteriae</i> -Konzentration bei Frauen	58
Abbildung 23: <i>Bacteroidaceae</i> -Konzentration bei Frauen	59
Abbildung 24: <i>Atopobium</i> -Konzentration bei Männern	60
Abbildung 25: <i>Bifidobacteriae</i> -Konzentration bei Männern	61
Abbildung 26: <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> -Konzentration bei Männern	61
Abbildung 27: <i>Eubacterium rectale</i> -Konzentration in Abhängigkeit vom Symptombeginn	63
Abbildung 28: <i>Bifidobacteriae</i> -Konzentration in Abhängigkeit vom Symptombeginn	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit des Auftretens neurologischer Symptome	9
Tabelle 2: Expanded Disability Status Scale	12
Tabelle 3: Immunmodulatorische Stufentherapie	16
Tabelle 4: Geräte	27
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 6: Reagenzien	28
Tabelle 7: Oligonukleotidsonden	28
Tabelle 8: Software	28
Tabelle 9: Oligonukleotidsonden	32
Tabelle 10: Sondenkombinationen	34
Tabelle 11: Hybridisierungs- und Waschlösung	35
Tabelle 12: Größen- und Gewichtsverteilung der Gruppen.	40
Tabelle 13: Häufigkeit des Auftretens von Bakteriengruppen, Leukozyten und Mucus	44
Tabelle 14: Durchschnittliche Konzentration von Bakterien und Leukozyten	57
Tabelle 15: Durchschnittliche Konzentration von Bakterien bei Frauen	60
Tabelle 16: Durchschnittliche Konzentration von Bakterien bei Männern	62

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
BRRF2	Epstein-Barr Virus - Antigen
CD4+	Cluster of differentiation 4 positiv
CD8+	Cluster of differentiation 8 positiv
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CLASI-FISH	combinatorial labeling and spectral imaging – fluorescence-in-situ hybridization
CU	Colitis ulcerosa
Cy3	Indocarbocyanin - Farbstoff
Cy5	Indodicarbocyanin - Farbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol - Farbstoff
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBNA-1	Epstein-Barr Virus - nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
FISH	Fluoreszenz-in-situ-hybridization
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Farbstoff
FS	funktionelles System
GA	Glatirameracetat
GKS	Glukokortikosteroide
HHV-6	menschlicher Herpesvirus-6
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin 10
IL-17	Interleukin 17
IL-2	Interleukin 2
KIS	klinisch isoliertes Syndrom
MBP	Myelin-basisches Protein
MC	Morbus Crohn
MHC	major histocompatibility complex
MS	Multiple Sklerose

MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
PPMS	primär progrediente multiple Sklerose
PSA	Polysaccharid A
RRMS	relapsing remitting multiple Sklerosis
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	standard deviation
SPMS	sekundär progrediente multiple Sklerose
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th17	T-Helfer-Zellen Typ 17
Th2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
Treg	regulatorische T- Helfer-Zelle
UVB	Ultraviolett-Strahlung-Typ B
VCAM-1	vascular cell adhesion Protein
VLA-4	very late antigen-4
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte, chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die histopathologisch in unterschiedlicher Ausprägung zu Demyelinisierung und axonalem Schaden führt. Es ist die häufigste neurologische Erkrankung, die im jungen Erwachsenenalter zu bleibender Behinderung und vorzeitiger Verrentung führt (1).

1.1 Geschichte der Multiplen Sklerose

Vielleicht ist die früheste Beschreibung der MS die von der heiligen Lidwina von Schiedham. Sie lebte im späten 14. Jahrhundert in Holland. Die Vatikanarchive enthalten eine sehr vollständige zeitgenössische Dokumentation ihrer Lebensqualität und Symptome, welche bei der Vorbereitung auf ihre Heiligsprechung gesammelt wurden. Im Alter von 16 Jahren fiel sie wegen einer Beinschwäche beim Schlittschuhlaufen auf. Sie erholte sich teilweise von diesem kleinen Unfall, erlebte aber danach wiederkehrende Symptome wie den Verlust des Gleichgewichts, Schwäche des linken Armes und Sehstörungen, welche durch Remissionen nachließen. Ihr Beichtvater bezeichnete die Krankheit als Prüfung Gottes und sie nahm es als ihre Mission, für die Sünden anderer zu leiden. Sie verstarb mit 53 Jahren während einer Pestepidemie (2).

In der Literatur wird als Erstbeschreiber der MS Jean Cruveilhier (1793-1873) genannt. In seinem Anatomieatlas beschreibt er eine Paraplegie und weist gleichzeitig auf die harte Konsistenz der Entzündungsherde hin. Die erste klinische Beschreibung erfolgte durch Friedrich Theodor von Frerichs in Göttingen, der 1849 von einer Hirnsklerose sprach (2). 1868 bezeichnete Jean-Martin Charcot bei seinen Vorlesungen die Erkrankung als „sclerose en plaques“ und wies auf Markscheidenverlust, Gliaproliferation und erhaltene Achsenzyylinder hin. Zudem beschrieb er die typischen Symptome Nystagmus, Intentionstremor und skandierende Sprache (3). In den folgenden Jahren brachten die Arbeiten von Babinski, Quinke, Marburg und anderen nicht nur ein besseres Verständnis für die Histopathologie der Erkrankung mit sich, sondern auch neue ätiologische und therapeutische Ideen (4).

1.2 Epidemiologie

Schätzungsweise sind weltweit ca. 2 Mio. Menschen an MS erkrankt. Die Krankheit erreicht die höchste Prävalenz bei der Bevölkerung des kaukasischen Ursprungs (5) und variiert zwischen 60-200/100.000 in Gebieten mit hoher Inzidenz wie dem nördlichen Europa, den USA und Neuseeland, bzw. 6-20/100.000 in Gebieten niedrigen Erkrankungsrisikos (6). Die Krankheit manifestiert sich bei der Mehrzahl der Betroffenen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei die MS immer häufiger bei Kindern und Jugendlichen diagnostiziert wird (7) und die Ersterkrankung jenseits des 45. Lebensjahres zunehmend häufiger auftritt. In Deutschland wird die Zahl der Erkrankten auf mindestens 120.000 geschätzt, was einer Prävalenz von ca. 150 pro 100.000 Einwohner entspricht (8). Die jährliche Inzidenz der MS wird auf ca. 3,5–5 pro 100.000 Einwohner geschätzt (9). An der schubförmig-remittierenden Verlaufsform erkranken Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer (Inzidenz von 3,6 bei Frauen und 2,0 bei Männer), während das Verhältnis bei der primär chronisch-progredienten Verlaufsform in etwa gleich ist (6).

1.3 Histopathologie

Als Plaques werden Herde einer entzündlichen Demyelinisierung im Bereich des ZNS bezeichnet. Sie sind ein typisches pathologisches Merkmal einer MS-Läsion (10), (11) und die entzündliche Infiltration ist oft um ein Gefäß herum lokalisiert. Der Verlust, der von Oligodendrozyten gebildeten, Myelinscheiden von Axonen in diesem Bereich ist das Hauptelement der Pathophysiologie der Erkrankung und verantwortlich für die klinische Symptomatik. Zu den typischen Bestandteilen einer akuten Plaque zählen Lymphozyten (vorwiegend T-Zellen), Monozyten und Makrophagen sowie Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHCII)-exprimierende Zellen (11). Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Plaque in dieser Phase ist die Oligodendrozytenapoptose (12). In der zeitlichen Entwicklung der Entzündung kommt es zentral zur Ausbildung eines zellarmen Raumes mit dem Verlust von Myelin und der Bildung von Narben durch Gliazellen. Die Grenzen der chronisch-aktiven Plaques werden mit aktivierten Mikroglia-Zellen und Makrophagen sowie reaktiven Astrozyten besiedelt. Die Aktivität von Antikörpern und Komplement ist in diesem Bereich sehr präsent (11). Neben den destruktiven Prozessen finden auch Reparationsmechanismen statt, welche für die spontane Rückbildung der klinischen Symptomatik verantwortlich

sind. Eine Remyelinisierung von Axonen wird zwar am häufigsten am Rand der Läsionen beobachtet, insgesamt betrifft es aber die gesamte Plaque (13). Chronische, stille Läsionen sind einerseits durch den Verlust der entzündlichen Eigenschaften gekennzeichnet, andererseits sind die Remyelinisierung und die Oligodendrozytenregeneration hier sehr selten (14).

Obwohl eine umfangreiche axonale Läsion nicht zu dem typischen Bild einer akuten MS-Plaque gehört, können axonale Verletzungen auch im Akutstadium einer Läsion durchaus gefunden werden (15), (16). Die diffuse Schädigung der so genannten normal erscheinenden weißen Substanz und die kortikale Demyelinisierung sind vor allem für die primär und sekundär progrediente MS charakteristisch (17), (18), (19), (20), (21). Interessanterweise enthalten die Hirnhäute, die über den kortikalen Läsionen liegen, oft Ansammlungen von B-Lymphozyten, die in ihrer Struktur ektopischen B-Zell-Follikel ähneln (22), (18), (23).

Basierend auf dem Muster der Lymphozytenmarker, der Myelinproteine und dem Anteil von Immunglobulinen und Komplementproteinen in Läsionen, lassen sich vier verschiedene Muster der Plaques identifizieren (24). Muster I ist durch die Dominanz von T-Lymphozyten und Makrophagen gekennzeichnet. Muster II ist erkennbar durch eine T-Zellen und Makrophagen Infiltrationen zusammen mit Immunglobulinablagerungen und der Anwesenheit von Myelinabbauprodukten in Makrophagen. Muster III weist einen ausgeprägten Oligodendrozytenverlust und einen deutlichen Verlust von Myelin-assoziiertem Glycoprotein auf. Muster IV zeichnet sich aus durch eine Oligodendrozytendystrophie und das Fehlen der Remyelinisierung. Diese unterschiedlichen Muster zeigen dabei eine viel größere intraindividuelle Konstanz im Vergleich zu einer interindividuellen, was möglicherweise für eine unterschiedliche Ätiologie bei einzelnen Individuen oder unterschiedliche Pathomechanismen in verschiedenen Phasen der Erkrankung sprechen könnte (25).

1.4 Immunpathogenese

Die multiple Sklerose wurde weitgehend unter Verwendung eines Tiermodells - der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) untersucht. Die EAE wird durch Immunisierung mit Myelin-Antigenen unter Beteiligung von Adjuvantien oder durch den

Transfer von aktivierten Myelin-spezifischen T-Zellen induziert (26), (27). Seit 1947, als die histopathologischen Veränderungen der EAE mit denen der MS zum ersten Mal als vergleichbar anerkannt wurden (28), wurden die autoimmunologischen Pathogenesemodelle der MS entwickelt.

Nach diesem Modell werden die autoreaktiven "Cluster of differentiation 4 positive" (CD4+) T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1) in der Peripherie des Immunsystems aktiviert. Dadurch gewinnen sie die Fähigkeit in das ZNS mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen zu migrieren (29), (30). Nach der Restimulation der T-Zellen im perivaskulären Raum kommt es zu einem Zusammenspiel mit den hirneigenen Zellen und der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und dadurch zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und Migration von weiteren Immunzellen ins Hirnparenchym (31).

1.4.1 Toleranzmechanismen

Autoimmunität bei der MS erfordert nicht nur die Expression eines MHC-Klasse-II-Moleküls, das mindestens ein Peptid von Myelin binden kann, sondern auch die Fähigkeit einiger Myelin-spezifischen T-Zellen der zentralen Toleranz zu entweichen, sodass diese für die Aktivierung in der Peripherie des Immunsystems zur Verfügung stehen. Zentrale Toleranz ist ein Prozess, bei dem die T-Lymphozyten, die eine hohe Avidität für einen Selbst-Antigen-MHC-Komplex im Thymus aufweisen, gelöscht werden. Die T-Lymphozyten, welche nur eine sehr geringe Avidität aufweisen, können den Mechanismen einer zentralen Toleranz entweichen (32). Die veränderten Eigenschaften des T-Zell-Rezeptors (TCR) bei den selbstreaktiven T-Lymphozyten führen wahrscheinlich zur Störung im Prozess der zentralen Toleranz und ermöglichen die Autoreaktivität (33). So fanden sich z. B. bei MS-Patienten gehäuft T-Zellen, die degenerierte TCR aufweisen (34). Die Anwesenheit solcher degenerierter TCR erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass T-Zellen in Reaktion auf ein bestimmtes Umweltpathogen eine Autoimmunantwort gegen ein Myelin-Antigen initiieren. Das wiederum ist die Grundlage für die Hypothese der molekularen Mimikry, wo die Kreuzreaktivität mit einem viralen oder bakteriellen Antigen die Kaskaden der Autoimmunität initiieren könnte (35). Die Kreuzreaktivität mit den Myelin-Antigenen konnte in den EAE-Modellen z. B. für *Chlamydia pneumoniae* (36) oder *Haemophilus influenzae* (37) gezeigt werden.

1.4.2 Zielantigene

Die CD4⁺ der MS-Patienten erkennen als spezifische Ziele im ZNS eine ganze Reihe von Antigenen. Als eines der Hauptziele konnte das Myelin-basische Protein (MBP) identifiziert werden (38) (39). Bei MS-Patienten konnte im Blut und Liquor eine erhöhte Anzahl von T-Zellen gefunden werden, die in einer in vitro Stimulation mit Myelinprotein-Antigenen Interferon-Gamma (IFN- γ) - ein stark proinflammatorisches Zytokin sezernieren (40). IFN- γ aus diesen Zellen ist in der Lage Makrophagen und MHC-Gene zu aktivieren, und die T-Zell-Migration zu fördern (41).

Inzwischen konnten auch weitere Zielantigene identifiziert werden, wie das Proteolipidprotein (42), das Myelin-assoziierte Oligodendrozyten-basische Protein (43), und das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein. Die Antigene werden dem TCR der CD4⁺ -Zellen durch spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen (APC) im Kontext des MHC II und unter Einfluss der co-stimulierenden Moleküle präsentiert. Die Funktion der APC ist substantiell für die Initiierung der Immunantwort (44), (45). Als APC könnten vor allem dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten (46), aber auch Microglia-Zellen agieren, welche auf dem hämatogenem Weg das ZNS besiedeln und hier große Mengen von MHC II- und co-stimulierenden Molekülen in einer entzündlichen Umgebung produzieren (47).

1.4.3 T-Lymphozyten und ihre Rolle im Immunsystem

Vom Konzept her greifen APC außerhalb des ZNS nach einem exogenen oder endogenen Antigen und stimulieren naive CD4⁺ -Zellen. Als Ergebnis beginnen diese, sich je nach entzündlichem Milieu in vier verschiedene Subtypen zu differenzieren. Die erste ist die Th1-Zelle, die in erster Linie Makrophagen-aktivierende und Leukozyten-rekrutierende Effektormoleküle wie IFN- γ und Tumornekrosefaktor - Alpha (TNF- α) sowie Interleukin 2 (IL-2) sezerniert und hauptsächlich für die Abwehr gegen intrazelluläre Erreger verantwortlich ist. Die zweite ist eine T-Helfer-Typ 2-Zelle (Th2), welche primär die humorale Immunität mittels B-zellaktivierender Moleküle wie Interleukin 10 (IL-10) und Transforming growth factor Beta (TGF- β) fördert. Die dritte ist eine regulatorische CD4⁺ -T-Zelle (Treg), welche eine regulierende Funktion unter anderem durch Sekretion von IL-10 bei der Immunantwort ausübt. Schließlich gibt es die stark proinflammatorischen CD4⁺-Typ 17-Zellen (Th17), die hauptsächlich

Interleukin 17 (IL-17), aber auch IL-21 und IL-22 sezernieren (48) und deren Differenzierung durch Infektion mit gramnegativen Bakterien, Pilzen und Protozoen induziert wird.

CD4+ Th1

Basierend auf den pathophysiologischen EAE-Modellen wird die MS als eine Th1-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen. Wesentlich für diese Annahme ist die Tatsache, dass Th1 mit ihren starken proinflammatorischen Eigenschaften die wichtigste Effektorzelle bei vielen Autoimmunerkrankungen ist, während Th2 mit ihren entzündungshemmenden Eigenschaften positive Effekte auf diese Erkrankungen (49) ausübt. Diese Ansicht wurde zum Teil durch die Erkenntnis bekräftigt, dass die klinische Aktivität bei Multipler Sklerose mit der Expression von IFN- γ und IL-2 im ZNS und Liquor korreliert (50) und dass in den aktiven entzündlichen Plaques bei MS-Patienten massive Infiltration von Th1 gefunden wurde (51).

CD4+ Th17

Die Beobachtungen der letzten Jahre, dass die für IL-12, IFN- γ und TNF- α (Zytokine der Th1) defizienten Mäuse schwere EAE entwickeln (52), (53), (54) und im Gegensatz dazu IL-23-defiziente Mäuse völlig resistent gegen die EAE sind (55), führten zu der Überzeugung, dass das Th1-Modell nicht der einzige Weg in der Immunpathogenese der MS sein kann. IL-23 ist entscheidend für die Differenzierung der naiven CD4+ Zellen in die Th17-Zellen (56), (57), (58). Th17 produziert IL-17 und IL-22 (59), sowie IL-6, IL-21 und IFN- γ (60). Durch die IL-17 Sekretionen wird eine CD4+ - spezifische Antwort mit Stimulation der Makrophagen und Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke (61) induziert. Bei MS-Patienten findet man höhere Konzentrationen von Th17 im Blut und Liquor im Vergleich mit gesunden Probanden (62), (63). Auch ist die Konzentration der Th17 im Schub höher als in schubfreien Phasen (64).

CD8+

In manchen pathologischen Studien bei MS-Patienten konnte in der normal erscheinenden weißen Substanz die Dominanz der MHC-Klasse-I-restringenten "Cluster of differentiation 8 positive" (CD8 +)-Zellen gezeigt werden (65). Auch die therapeutischen Modelle, welche auf die CD4+ -Immunantwort zielen, zeigten nicht die erwartete Wirksamkeit (66), (67). Dagegen scheint die gleichzeitige Depletion von

CD4⁺- und CD8⁺ - Populationen bei Patienten mit Multipler Sklerose durch den monoklonalen Antikörper Alemtuzumab vorteilhaft zu sein (68). Die CD8⁺ -Zellen unterscheiden sich in ihrer Funktionsweise deutlich von den CD4⁺ -Zellen. Bei der Antigenerkennung interagieren sie mit der MHC Klasse I und nicht mit der Klasse II wie die CD4⁺ -Zellen. Im normalen ZNS wird Klasse I MHC nur in vaskulären Zellen und seltener in meningealen Zellen beobachtet. Jedoch wird bei einem entzündlichen Prozess wie der MS die MHC I-Expression in Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen und sogar selten auf Axonen beobachtet (69). Es gibt inzwischen immer mehr histopathologische Hinweise für die Rolle der CD8⁺ in der Immunpathogenese der MS (70), (71), (72), (73) (74).

CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg

Interessant bleibt die Beobachtung, dass die autoreaktiven CD4⁺ -Zellen und CD8⁺ -Zellen gleichermaßen bei den MS-Patienten und Gesunden im peripherem Blut nachweisbar sind (75). Anscheinend ist die durch diese Zellen realisierte Autoimmunität ein sehr wichtiger Aspekt in der Pathogenese der MS, aber nicht die treibende Kraft dieses Prozesses. Weitere Mechanismen müssen bei der Entstehung der entzündlichen Reaktion im ZNS beteiligt sein.

Eine der möglichen Ebenen, die in letzter Zeit an Bedeutung gewinnen, sind die CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ natürlichen regulatorischen T-Zellen (Treg). Die Treg spielen eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der übermäßigen und auch unnötigen Immunantworten durch zellkontaktabhängige Mechanismen und Sekretion von hemmenden Zytokinen (76). Dies wird vor allem durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β realisiert (77). Menschliche Treg, ähnlich wie die Maus-CD4⁺ CD25⁺ Suppressor-Zellen, sind anergisch zu einer in vitro Antigenstimulation und unterdrücken die Proliferation von Responder-T-Zellen (78). Treg müssen über ihre TCR aktiviert werden, um in den funktional suppressiven Zustand zu gelangen (79), (80). Die suppressive Wirkung der Treg erstreckt sich nicht nur auf andere CD4⁺ -Zellen, sondern auch auf die Unterdrückung der Proliferation und Zytokinproduktion durch CD8⁺ -Zellen, B-Lymphozyten, APC und die natürlichen Killerzellen (81).

In EAE-Modellen konnte gezeigt werden, dass Treg den Ausbruch der Erkrankung durch Unterdrückung der Aktivierung der Myelin-spezifischen CD4⁺ -Zellen in der

Peripherie verhindern konnten (82). Auch bei der MS finden sich immer mehr Beweise für eine sehr bedeutungsvolle Rolle der Treg in der Immunpathogenese der Erkrankung. So fanden sich z. B. bei den Gewebeschnitten der MS-Patienten keine Treg (72). Die Zahl der Treg -untersucht im Blut und Liquor der MS-Patienten - wurde im Schub im Vergleich zu Remissions- und Kontrollgruppen in einem größeren Ausmaß reduziert (83). Andere Studien konnten diese Ergebnisse nicht reproduzieren, zeigten jedoch einen Defekt der Suppressionsfunktion der Treg auf eine antigenspezifische T-Zell-Proliferation bei MS-Patienten (84), (85). Aktuelle Daten unterstreichen die Schlüsselrolle der Treg in der Kontrolle der Th1- und Th17- vermittelten Immunantwort. Diese Zellen sind jedoch die Hauptquelle von IL-2, welches wiederum essentiell für die Expansion von Treg ist. Manche Autoren vermuten, dass nicht die quantitativen oder qualitativen Eigenschaften der Treg, sondern die gestörte Homöostase zwischen den Zelllinien bei MS-Patienten beeinträchtigt ist (86). In den Genomanalysenstudien ist es bisher nicht gelungen, eine bedeutende Rolle für die molekularen Marker der Treg in der MS-Ätiologie zu implizieren. Andererseits konnte der Hauptwachstumsfaktor für Treg, die IL-2-Rezeptor α -Kette, eindeutig mit der MS-Suszeptibilität verbunden werden (87).

1.5 Klinischer Verlauf

Klinisch beginnt die MS bei über 80% der Patienten mit einem schubförmigen Verlauf (1). Da die entzündlichen Plaques der weißen Substanz in verschiedenen Lokalisationen auftreten können, wundert auch nicht die Vielzahl der möglichen klinischen Symptome. Zu den häufigsten gehören eine einseitige Optikusneuritis, spastische Paresen, Ataxie, Hyperreflexie, Spastizität, Gangstörungen, Sensibilitätsstörungen, Müdigkeit, kognitive und vegetative Störungen (88). Bei den meisten Patienten bilden sich die Symptome eines Schubes innerhalb von 6-8 Wochen zurück. Beim natürlichen Verlauf der unbehandelten Erkrankung liegt die Schubrate initial bei ca. 1,8 Schüben pro Jahr und nimmt dann in den Folgejahren kontinuierlich ab (89).

Tabelle 1: Häufigkeit des Auftretens neurologischer Symptome bei Erstmanifestation und im Gesamtverlauf der MS (90)

Symptom	Häufigkeit bei Erstmanifestation (%)	Häufigkeit im Gesamtverlauf (%)
Spastik oder Babinski-Zeichen	29	85
Paresen	45	85
Hirnstamm- oder zerebelläre Symptome	24	79
Sensibilitätsstörungen	42	86
Blasen- und Darmstörungen	9	61
Optikusneuritis	33	62
Mentale und psychische Störung	4	39
Funktionsstörung des N. trigeminus oder N. facialis	10	30
Störung der Okulomotorik	14	36

Verlaufsformen

Der Krankheitsverlauf der MS ist sehr variabel und nicht vorhersehbar. Sie kann mit einem einzigen milden Schub enden, kann auch in extremen Fällen einen rasanten manchmal lebensbedrohlichen Verlauf annehmen (91).

Man unterscheidet folgende Stadien und Verläufe:

- das klinisch isolierte Syndrom,
- die schubförmige („relapsing-remitting“),
- die sekundär progrediente und
- die primär progrediente Verlaufsform (92)

Als Anfangsstadium der klinischen Erkrankung wird das klinisch isolierte Syndrom (KIS) beschrieben. Der dominierende schubförmige („relapsing-remitting“) Verlauf (RRMS) wandelt sich in der Regel über Jahre in eine sekundär-progrediente Krankheitsform (SPMS). Eine hohe Anzahl von Schüben innerhalb der ersten beiden Krankheitsjahre ist oft mit rascherer Progredienz verbunden (88). Ähnlich ist der Verlauf bei einer hohen Entzündungsaktivität mit zahlreichen Herden in der T2-gewichteten MRT (93). Ebenso konnte gezeigt werden, dass pathologische somatosensibel evozierte Potenziale und motorisch evozierte Potenziale in der Frühphase der Erkrankung (94) sowie eine

intrathekale IgM-Produktion (95) mit einem höheren Risiko der frühen Krankheitsprogression verbunden sein können.

Nur ca. 10–15% der Patienten haben im Verlauf der Erkrankung keine Schübe. Bei ihnen beginnt die Erkrankung bereits mit einer schleichenden Zunahme neurologischer Symptome. Dies wird als primär progredienter Verlauf (PPMS) bezeichnet. Es entwickelt sich dann häufig eine über Jahre zunehmende spastische Gangstörung, seltener auch ein progredientes zerebelläres Syndrom (96).

Diagnostik und diagnostische Kriterien

Die klassische Diagnose einer MS stützt sich auf die Anamnese (Hinweise für bereits früher stattgehabte neurologische Ereignisse mit Schubcharakter), die Objektivierung klinisch neurologischer Ausfälle, sowie den klinischen oder paraklinischen Nachweis einer zeitlichen und örtlichen Dissemination bei Ausschluss anderer Ursachen (1).

Gerade die räumliche und zeitliche Dissemination stellte von Anfang an die Grundlage der diagnostischen Bemühungen dar. Gründe dafür sind einerseits die unterschiedlichste und nicht berechenbare klinische Symptomatik, andererseits die Tatsache, dass viele andere ZNS-Erkrankungen ein ähnliches klinisches Bild und ebenso ähnliche paraklinische Befunde präsentieren können. Bereits die ersten diagnostischen Kriterien nach Schumacher von 1965, welche sich lediglich auf die anamnestischen Angaben und den klinischen Befund stützten, forderten zwei Schübe und die Beteiligung von zwei oder mehreren ZNS-Abschnitten (97). In den nächsten Kriterien nach Poser von 1983 (98) wurde die wachsende Rolle der Elektrophysiologie und vor allem der Liquordiagnostik mit dem Nachweise der intrathekalen IgG-Synthese und der oligoklonalen Banden berücksichtigt (99).

Nachdem in den 80iger Jahren die MRT-Bildgebung ihren Zugang zur neurologischen Diagnostik fand, wurde schnell klar, dass diese enorme Möglichkeiten bietet, die Diagnostik der MS zu verändern und vor allem zu beschleunigen. Zum ersten Mal wurde die Diagnose einer MS möglich, ohne die Voraussetzung des 2. Schubes. Nach den neuesten, international anerkannten Kriterien (100) kann die MS-Diagnose bereits gestellt werden, wenn nach einem ersten Krankheitsschub klinisch nachweisbare Auffälligkeiten in mindestens einem Funktionssystem bzw. durch Untersuchung der

visuell evozierten Potenziale vorliegen und sich zusätzlich zwei oder mehr charakteristische Läsionen in der initialen MRT finden. Das darüber hinaus erforderliche Kriterium der zeitlichen Dissemination ist dann erfüllt, wenn eine nicht symptomatische, Kontrastmittel aufnehmende Läsion zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung vorliegt oder eine neue Läsion in einem später durchgeführten MRT-Scan zur Darstellung kommt.

In gleichem Maße gewinnt die sichere differenzialdiagnostische Abgrenzung gegenüber ähnlichen Krankheitsbildern wie Neuromyelitis optica, Kollagenosen, Borreliose, Sarkoidose, zerebrovaskulären oder metabolischen Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. In den neuesten Diagnosekriterien wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die vorliegenden neurologischen Symptome durch „nichts besser als durch das Vorliegen einer MS“ erklärt werden können (100).

Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Eine valide Beschreibung des neurologischen Defizites stellt eine große Herausforderung dar angesichts der durch die MS verursachten, sehr differenzierten Symptome und der unterschiedlichen Akkumulation der Defizite. Hierfür sind mehrere Bewertungsmaßstäbe in Gebrauch. Der meist verbreitete ist die EDSS, auch genannt „Kurtzke-Scala“ (101). Hier werden acht Funktionssysteme (Visus, Hirnstamm, Kleinhirn, Motorik, Sensibilität, Blase und Mastdarm, mentale Funktionen) in Stufen von 0 bis 6 bewertet. Aus dieser Bewertung wird dann der Grad der Behinderung ermittelt, wobei in den höheren Graden die Gehfähigkeit und Pflegebedürftigkeit zusätzlich zur Auswertung herangezogen werden. Die genaue Beschreibung der einzelnen Grade vom EDSS findet sich in der Tabelle 2.

Tabelle 2: Expanded Disability Status Scale

Grad	Genaue Beschreibung
0.0	Stufe 0 in allen funktionellen Systemen (FS). Normale neurologische Untersuchung.
1.0	Stufe 1 in einem FS. Minimale Abnormität in einem funktionellen System.
1.5	Stufe 1 in mehr als einem FS. Minimale Abnormität in mehr als 1 FS.
2.0	Stufe 2 in einem FS (andere 0 oder 1).
2.5	Stufe 2 in mehr als einem FS (andere 0 oder 1).
3.0	Stufe 2 in 3–4 FS oder Stufe 3 in einem FS (andere 0 oder 1). Voll gehfähig.
3.5	Stufe 3 in 1 FS und Stufe 2 in 1–2 FS oder Stufe 3 in 2 FS oder Stufe 2 in 5 FS, (andere 0 oder 1). Voll gehfähig.
4.0	Stufe 4 in einem FS (andere 0 oder 1). Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m.
4.5	Stufe 4 in einem FS (andere 0 oder 1). Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m.
5.0	Stufe 5 in einem FS (andere 0 oder 1) oder Kombination niedrigerer Stufen, aber über Grad 4.0. Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m.
5.5	wie Grad 5.0. Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m.
6.0	Kombinationen von Stufe 3 in mehr als 2 FS oder mehr. Bedarf intermittierend oder auf einer Seite konstant der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene) um etwa 100 m ohne Rast zu gehen.
6.5	wie Grad 6.0. Benötigt konstant beidseits Hilfsmittel (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 20 m ohne Rast zu gehen.
7.0	Kombinationen von Stufe 4 in mehr als 2 FS und mehr. Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu gehen. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbständig.
7.5	wie Grad 7.0. Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu gehen. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbständig.
8.0	Kombinationen meist von Stufe 4 und mehr in mehreren FS. Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden; pflegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme.
8.5	wie Grad 8.0. Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden; pflegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme.
9.0	Kombinationen meist Stufe 4 und mehr. Hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren.
9.5	Kombinationen von fast ausschließlich Stufe 4 und mehr. Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren.
10.0	Tod infolge MS.

1.6 Therapie

Die Therapie der MS blieb zunächst über Jahrhunderte unverändert empirisch. Es wurden ohne Erfolg Goldchlorid, Zinksulfat, Belladonna- und Mutterkornpräparate sowie Arsen und Quecksilber verwendet. Erst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts fand Kortison seinen Weg in die MS-Therapie (102) und bot als erstes Medikament zwar nur eine symptomatische, aber erfolgreiche Behandlung.

1.6.1 Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie beinhaltet sowohl medikamentöse als auch nicht medikamentöse Maßnahmen, die auf die Behandlung von Spastik, Schmerzen, Sensibilitätsstörungen, Einschränkungen der Blasen-, Darm- und sexuellen Funktionen, Ataxie, kognitiven Störungen, Fatigue, Depression sowie Dysphagie und Dysarthrie zielen. Insgesamt soll damit eine Steigerung der Lebensqualität der MS-Betroffenen erzielt werden (1).

1.6.2 Immunmodulatorische Schubtherapie

Die Behandlung des akuten MS-Schubes mit Glukokortikosteroiden (GKS) ist als etablierter Therapiestandard anzusehen (103), (104).

Die Wirkung der intravenösen GKS-Pulstherapie auf den akuten MS-Schub wird unter anderem durch die Suppression der Entzündungsreaktion erklärt, die sich auf zelluläre (wie Apoptoseinduktion, Hemmung der Migration von Immunzellen) und humorale (Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IFN- γ und TNF- α) Immunprozesse, die Inhibition von Arachidonsäuremetaboliten, Abnahme der Gefäßdilatation sowie die Restauration der Blut-Hirn-Schranke (1) erstreckt. Während die Effekte der intravenösen GKS-Pulstherapie auf eine raschere Symptomrückbildung im Rahmen des MS-Schubes konstant belegt sind, gibt es aktuell keine ausreichenden Hinweise dafür, dass die GKS-Pulstherapie einen Einfluss auf die Langzeitprognose funktioneller Beeinträchtigungen der MS hat (105), (106).

Bei Symptompersistenz im Rahmen eines Schubes nach der GKS-Pulstherapie wird eine Plasmapherese bzw. eine Immunadsorption durchgeführt (107), (108), (109).

1.6.3 Verlaufsbeeinflussende Langzeittherapie

Die auf den Tiermodellen basierende Erforschung der immunpathogenetischen Vorgänge bei der MS führte zur Entwicklung von immunmodulatorischen Medikamenten, bei denen in großen klinischen Studien zum ersten Mal ein positiver Effekt auf den Langzeitverlauf der Erkrankung nachgewiesen werden konnte. Zu dieser Medikamentengruppe zählen das als erstes Immunsuppressivum angewendete Azathioprin, gefolgt von Interferon- β -Präparaten, Glatirameracetat, i.v. Immunglobulinen, Mitoxantron und die zuletzt zugelassenen Natalizumab und Fingolimod.

Interferon- β

Interferone zählen zu den Zytokinen und sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems. Sie weisen starke immunmodulatorische, antiproliferative und antivirale Wirkungen auf. Die Rezeptoren für IFN- β finden sich auf praktisch allen Zellen. IFN- β beeinflusst die IL-27-Produktion durch Zellen des angeborenen Immunsystems, was eine kritische Rolle bei der Hemmung der Th17 bei der MS spielt (110), (111). Darüber hinaus ist der therapeutische Effekt von IFN- β auf die Induktion der regulatorischen IL-10 zurückzuführen (112), was wahrscheinlich über die regulatorischen Eigenschaften der B-Zellen realisiert wird (113).

Glatirameracetat

Glatirameracetat (GA) ist ein synthetisches Polymerisat aus den Aminosäuren L-Glutamin, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin. Die Kombination der Aminosäuren ähnelt in ihren Verhältnissen dem MBP. GA übt seine Wirkung bei der MS über die Verminderung der Expression von IFN - γ und die Erhöhung der Expression von IL-4 aus (114). Darüber hinaus verbessert GA die suppressiven Wirkungen der Treg (115) und induziert IL-4- und IL-10-sezernierende Th2 Zellen (116) .

Mitoxantron

Mitoxantron ist ein Zytostatikum vom Anthrachinolin-Typ mit immunmodulatorischen Eigenschaften (117). Mitoxantron erhöht die Produktion der Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-5 (118) und unterdrückt die Entwicklung von B- und T-Lymphozyten, wie bereits aus den Leukämiestudien bekannt ist (119).

Natalizumab

MS-Patienten zeigen eine drei- bis vierfache Erhöhung der Expression der α 4-Untereinheit des Integrin VLA-4 (very late antigen-4), ein Molekül, das normalerweise auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten und anderen Zelltypen im Liquor und Kreislauf exprimiert wird und für die Migration von Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich ist (120), (121). Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen die α 4-Untereinheit von VLA-4. Die Blockade verhindert die Interaktion mit vascular cell adhesion Protein 1 (VCAM-1), das auf aktivierten zerebrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird. Damit wird die Infiltration von enzephalitogenen T-Zellen in das Hirnparenchym verhindert (122).

Fingolimod

Fingolimod ist ein funktioneller Antagonist des Sphingosin-1-Phosphat-(S1P)-Rezeptors (123). Der S1P-Rezeptor wird hauptsächlich durch Immunzellen, neuronale Zellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimiert (124), (125). Fingolimod hemmt die Funktion der S1P-Rezeptoren und verursacht die Retention von Lymphozyten in den Lymphknoten einschließlich der naiven T-Zellen und zentralen Gedächtnis-T-Zellen. Dies reduziert die Infiltration von Entzündungszellen ins ZNS (126).

Stufentherapie

Die sehr unterschiedlichen Nebenwirkungs- und Sicherheitsprofile der Medikamente führten nach Bearbeitung durch die Konsensusgruppe des Ärztlichen Beirats der Deutschen Multiplen Sklerose Gesellschaft (MSTKG) zu einer immunmodulatorischen Stufentherapie, welche seit 1999 (127) regelmäßig aktualisiert wird, zuletzt im Jahre 2006 (128).

Tabelle 3: Immunmodulatorische Stufentherapie

Indikation	CIS	RRMS		SPMS	
Eskalationstherapie		1. Wahl Fingolimod Natalizumab	2. Wahl Mitoxantron Cyclophosphamid	mit Schüben	ohne Schübe
Basistherapie	Glatirameracetat Interferon-β 1a Interferon-β 1b	Glatirameracetat Interferon-β 1a Interferon-β 1b Azathioprin Immunoglobuline		Interferon-β 1a Interferon-β 1b Mitoxantron Cyclophosphamid	Mitoxantron Cyclophosphamid
Schubtherapie	2. Wahl Plasmapherese 1. Wahl Methylprednisolonpuls				

Neue Medikamente

In Folge der intensiven Forschung an der Kontrolle des Immunsystems konnten in letzten zwei Jahren drei weitere immunmodulatorische Substanzen für die Therapie der RRMS in Europa zugelassen werden, welche noch keinen Zugang in die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie oder in die Empfehlungen der Konsensusgruppe des Ärztlichen Beirats der Deutschen Multiplen Sklerose Gesellschaft fanden.

Alemtuzumab

Alemtuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen das CD52-Oberflächenprotein, welches auf allen reifen Lymphozyten exprimiert wird. Die Behandlung mit Alemtuzumab bewirkt eine Antikörper-abhängige, zellvermittelte Lyse der betroffenen lymphatischen Zellen. Während die B-Lymphozyten sich relativ schnell nach der Lymphopeniephase erholen, hält die tiefgreifende Reduktion der CD4+ -Zellen bis zu fünf Jahren an (129). Es wird vermutet, dass der therapeutische Wirkmechanismus von Alemtuzumab nicht nur in der Reduktion der Effektor-T-Zellen,

sondern auch in der komplexen Reorganisation des Immunrepertoires nach der Behandlung liegt (130).

Dimethylfumarat

Dimethylfumarat, ein Ester-Derivat der Fumarsäure, besitzt zahlreiche immunmodulierende Eigenschaften. Sein Wirkmechanismus beruht vor allem auf der Reduktion der transendothelialen Migration von aktivierten Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke sowie auf der Aktivierung von neuroprotektiven und antioxidativen Effekten (131), (132).

Teriflunomid

Teriflunomid inhibiert selektiv und reversibel die Dihydro-orotat-dehydrogenase, ein Schlüsselenzym in der Pyrimidin-de novo-Synthese, welcher für die sich schnell teilende Lymphozyten erforderlich ist (133). Teriflunomid hemmt die Proliferation der stimulierten T- und B-Lymphozyten in der Peripherie und reduziert dadurch die Anzahl der aktivierten T- und B-Zellen, die ins ZNS migrieren könnten (134). Die Behandlung mit Teriflunomid hat dagegen keine Auswirkung auf die ruhenden Lymphozyten oder die normale Immunüberwachung, die von einem alternativen Syntheseweg abhängig sind (135).

1.7 Ätiologie

In Folge der Erkenntnis, dass MS eine organische Erkrankung ist, wurden im Laufe der Zeit sehr unterschiedliche Theorien zur Erklärung der Ätiologie entwickelt. Weil die meisten Plaques in der Umgebung kleiner Venen zu finden sind, wurde bereits sehr früh (136) über eine vaskuläre Genese der MS diskutiert. Später präsentierte Marburg seine Toxintheorie, bei der ein myelinolytischer Faktor die Krankheit verursachen sollte (137).

Die Tatsache, dass das pathologische Bild der MS den Veränderungen anderer bakterieller und vor allem viraler Erkrankungen des ZNS ähnelt, führte zu der Überzeugung, dass es sich um eine infektiöse Ursache handelt. Letztendlich brachten die Entdeckung des Immunsystems und die Tierexperimente, besonders die EAE, die Autoimmuntheorie (138) auf. Trotz der jahrzehntelangen Forschung und der immer tiefer werdenden Einblicke in die zelluläre und sogar genetische Ebene der MS bleibt

bis heute die primäre Ursache der Erkrankung unbekannt und ist wahrscheinlich auch nicht bei allen Betroffenen gleich. In letzter Zeit werden primäre, degenerative Prozesse (12), infektiöse Ursachen (139), andere Umweltfaktoren wie UVB-Strahlung (140) und die „Hygiene–Hypothese“ (141) diskutiert. Immer deutlicher wird dabei, dass es sich bei der MS wahrscheinlich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung bei genetisch prädisponierten Personen handelt, wobei der zeitliche Zusammenhang der einzelnen Faktoren nicht ohne Bedeutung bleibt.

1.7.1 Genetische Faktoren

Bei bestimmten ethnischen Gruppen tritt die MS vergleichsweise häufiger auf. Die höchste Prävalenz erreicht dabei die Bevölkerung kaukasischen Ursprungs (5). Nahezu resistent gegenüber der MS scheinen hingegen beispielsweise die Aborigines in Australien oder die Maori in Neuseeland zu sein (142), (143). Auf der Basis der großen epidemiologischen Studien wird die allgemeine alterskorrigierte Erkrankungswahrscheinlichkeit für die MS mit 0,3% angegeben (144). Diese beträgt bei Frauen 0,66% und bei Männern 0,13%. Das Risiko an MS zu erkranken, liegt bei Verwandten 1. Grades eines MS-Patienten bei 2,77% und ist damit ca. 10-mal höher als in der Allgemeinbevölkerung. Auch bei Verwandten 2. Grades (1,02%) und 3. Grades (0,88%) bleibt die Erkrankungswahrscheinlichkeit höher. Anders gesagt, es existiert eine deutliche genetische Anfälligkeit für MS und die familiäre Belastung ist der höchste identifizierte Risikofaktor. Auch die 25%ige Konkordanz bei eineiigen Zwillingen im Vergleich mit nur 5%iger Konkordanz bei zweieiigen Zwillingen (145), (146) sowie die Tatsache, dass das MS-Risiko bei Halbgeschwistern und Adoptivkindern nur mit den biologischen Verwandten korreliert (147), unterstreichen zweifellos die Bedeutung des Genoms in der MS-Ätiologie.

In der neuesten genetischen Studie konnten bei der MS signifikante Assoziationen für insgesamt 52 Gene gezeigt werden. Sie bestätigt den MHC-Verband (Human Leucocyte Antigen -HLA), besonders HLA-DRB1- und HLA-A-Allele, als genetischen Hauptrisikofaktor für die MS. Von den nicht HLA-assoziierten Genen stellen Immunogene wie z. B. T-Zell-Rezeptor-Gene, Immunglobulinloci, Interleukin 10-Rezeptor- α , IL-4-Rezeptor- β , IL2-Rezeptor- β sowie Interferon-Gamma die große Mehrheit dar (148). Insgesamt weisen diese Erkenntnisse auf die bedeutungsvolle Rolle

der genetischen Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der immunologischen Prozesse bei der MS hin.

Andererseits sprechen die Erkenntnisse über die Penetranz des MS-spezifischen Genotyps eindeutig für den notwendigen Einfluss von weiteren Faktoren, welche zum Ausbruch der Erkrankung bei genetisch prädisponierten Personen führen. Diese Schlussfolgerung konnte aus Zwillingsstudien gewonnen werden, bei denen lediglich eine ca. 25%ige Konkordanz für eineiige Zwillinge festgestellt wurde (149). Die Studie an Geschwistern und Halbgeschwistern liefert hier weitere interessante Daten, welche das Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren in der MS-Genese hervorheben. Bei Halbgeschwistern wird die Anfälligkeit für die MS doppelt so stark an die Mutter wie an den Vater angekoppelt (150) und die Konkordanzrate bei zweieiigen Zwillingen ist doppelt so hoch wie bei Vollgeschwistern (149), was aus genetischer Sicht schwer zu erklären ist. Es könnte bedeuten, dass die Anfälligkeit nicht nur mit den genetischen Vererbungsprozessen, sondern auch mit Umweltfaktoren verbunden ist, welche sehr früh im Leben durch die Mutter und die nähere Umgebung vermittelt werden.

1.7.2 Breitengrade

Die geographische Verteilung der MS zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Breitengrad (geographische Entfernung eines Punktes vom Äquator) und regionaler Krankheitsprävalenz (151). Demzufolge neigen Bereiche mit höherer Prävalenz der Krankheit (Skandinavien bis 105/100.000, Großbritannien bis 287/100.000) dazu, weiter vom Äquator entfernt zu sein als diese mit niedriger (Südamerika und Zentralafrika <5/100.000). Interessanterweise führte die Migration aus Gebieten mit hoher Prävalenz (z. B. Großbritannien) in Regionen mit geringer Prävalenz (z. B. Südafrika, Australien) dazu, dass die Prävalenz des Herkunftslandes auf das Niveau des Ankunftslandes reduziert wurde, wenn sie vor dem 15. Lebensjahr stattfand (152), (153), (154). Die Re-Migranten wiederum erreichten erneut die Prävalenz des Heimatlandes, wenn sie vor dem 15. Lebensjahr ausreisten und behielten das Risiko des Migrationslandes, wenn die Rückkehr später stattfand (155). Umgekehrt führte die Einwanderung aus Indien (Gebiet mit niedrigem Erkrankungsrisiko) nach Großbritannien zu keinem Risikoanstieg bei den

Einwanderern, aber ihre in Großbritannien geborenen Kinder zeigten ein Risikoniveau vergleichbar mit ihren britischen Spielkameraden (156).

Diese Beobachtungen lassen entweder einen schützenden Umweltfaktor in Regionen mit niedriger Prävalenz oder einen auslösenden Faktor in Gebieten mit höherer Prävalenz vermuten. Wenn man den Daten Glauben schenkt, müsste der schützende Faktor seine Wirkung in der Kindheit entfalten oder der auslösende Faktor erst in der Adoleszenz seine negative Wirkung entfalten, zudem müsste er weltweit ungleich verteilt sein. Die erste Annahme stützt die zuletzt immer häufiger diskutierte Hygiene-Hypothese, wogegen die zweite mit den Prinzipien der Erreger-Hypothese übereinstimmt.

1.7.3 Erreger

Die Erreger-Hypothese stützt sich vor allem auf die sogenannte MS-Epidemie auf den Färöer-Inseln (157). Hier wurden bis 1940 keine MS-Fälle gemeldet. Nach der Stationierung von britischen Truppen auf den Inseln kam es zwischen 1943 und 1990 zu vier MS-Epidemien, welche insgesamt 54 Fälle beinhalteten. Es wird spekuliert, dass die britischen Truppen einen neuen Erreger verbreiteten, welcher auf den Inseln bisher nicht bekannt gewesen war. Leider konnte dieses Muster nirgendwo anders reproduziert werden (158). Im Laufe der Zeit wurden bei zahlreichen Erregern die epidemiologischen und pathologischen Daten auf die Übereinstimmung mit den bekannten MS-Mustern untersucht. So konnte z.B. bei der *Chlamydia pneumoniae* im Liquor der MS-Patienten nicht nur gehäuft *Chlamydia*-spezifische Antigene, sondern auch spezifische Antikörper nachgewiesen werden (159), (160).

Die Tatsache, dass vor allem virale Infektionen des ZNS mit einer Demyelinisierung der weißen Substanz, einem chronischen Verlauf und der Produktion von oligoklonalen Banden im Liquor einhergehen, lenkte die Suche auf einen möglichen viralen Erreger. Bei dem menschlichen Herpesvirus-6 (HHV-6) konnten die virale DNS in den Plaques der MS-Patienten (161) und in den Zellen aus dem Liquor (162) nachgewiesen werden. Zudem treten HHV-6-spezifische IgM-Antikörper bei Patienten mit RRMS im Vergleich mit anderen Patientenpopulationen gehäuft auf (163).

Die Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion führt zu einer lebenslangen Persistenz des Virus in den B-Lymphozyten und wurde mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, einschließlich systemischer Lupus erythematoses, Sjögren-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis und rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht (164). Es gibt Hinweise, dass eine EBV-Infektion einen Risikofaktor auch für die Entwicklung der MS darstellen könnte. Eine EBV-Seropositivität wurde in bis zu 95% der allgemeinen Bevölkerung und bei fast 100% der MS-Patienten (165) gefunden. Das MS-Risiko scheint äußerst gering bei EBV-negativen Personen zu sein (166) und steigt bei einer Infektion im Adoleszenz- oder Erwachsenenalter (167). Eine andere Studie zeigte, dass die Erkrankung an der infektiösen Mononukleose in der Kindheit und dem Jugendalter (EBV-Infektion) als Risikofaktor für MS anzusehen ist (168). Epstein-Barr-Virus-Antigene (BRRF2 und EBNA-1) konnten als Ziele der Immunantwort bei MS-Patienten identifiziert werden (169), (170). Serafini et. al. fanden EBV-Antigene in ZNS-infiltrierenden B-Zellen bei Patienten mit MS, aber nicht bei anderen entzündlichen ZNS Erkrankungen (171). Inwieweit die Daten einen tatsächlichen ätiopathogenetischen Weg aufzeigen und nicht nur Ähnlichkeiten der Immunreaktion zwischen der MS und einer EBV-Infektion darstellen, bleibt noch unklar.

1.7.4 Ultraviolett-Strahlung-B

Immer häufiger werden protektive Einflüsse der UV-Strahlung aufgrund ihrer nachweislich immunmodulatorischen Wirkung im Zusammenhang mit der Biosynthese von Melatonin und Vitamin D diskutiert (172). Die MS-Prävalenz ist empirisch nicht nur eng mit der geographischen Breite verbunden, sondern korreliert auch mit der jährlichen Ultraviolettstrahlung (173), (174). Manche Studien zeigen eine inverse Korrelation zwischen Serumkonzentrationen von 25-Hydroxyvitamin-D und der Inzidenz der MS sowie der Schwere der Erkrankung (175). Zudem wird in den neuesten Berichten der Zusammenhang zwischen der reduzierten Ultraviolett-Strahlung-B, MS-Prävalenz und dem EBV hergestellt. Es wird vermutet, dass der niedrige Vitamin D-Spiegel zu einem Anstieg der EBV-Infektion führt und dadurch den Ausbruch der MS begünstigt (140).

1.7.5 Rauchen

Nicht nur die epidemiologischen Daten selbst, sondern auch ihre zeitliche Veränderung lassen vermuten, dass weitere Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der MS-Entstehung spielen. Eine der Entwicklungen ist die stets zunehmende Inzidenz und Prävalenz der MS bei Frauen (6), (176), (177). Frauen sind heute von der schubförmig verlaufenden MS etwa zweimal häufiger betroffen als Männer (6). Das Frau-zu-Mann-Verhältnis nahm in den letzten fünf Jahrzehnten deutlich zu (6). Diese Änderung wird eher durch eine zunehmende MS-Inzidenz bei Frauen als einen Rückgang bei Männern verursacht (177) und lässt sich durch genetische, hormonale oder erregerabhängige Faktoren schlecht erklären. Epidemiologische Daten zeigen ein ungefähr um 40-50% erhöhtes Risiko für eine MS verbunden mit dem Rauchen sowie eine Dosis-Wirkung-Korrelation (178), (179), (180), (166). Internationale länderspezifische Daten zeigen, dass sich das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Rauchern im Laufe des vergangenen Jahrhunderts dramatisch veränderte. Vor hundert Jahren kamen auf eine rauchende Frau 2,5 Männer, wogegen das Verhältnis heute ausgeglichen ist (181). Dies könnte eine Zunahme in der Inzidenz und Prävalenz der MS bei Frauen erklären.

1.7.6 Hygiene-Hypothese

Die steigende Inzidenz und Prävalenz der MS in den letzten hundert Jahren verbunden mit dem gleichzeitigen Verwischen des Breitengradgradienten, gekennzeichnet durch die steigende MS-Inzidenz in den äquatornahen Gebieten (182), lassen nach einem Umweltfaktor suchen, welcher in den letzten hundert Jahren weltweit ebenso eine Veränderung durchmachte. In einer amerikanischen epidemiologischen Studie wurden stetig steigende Prävalenzraten von 1915 bis 1985 beobachtet, welche dann aber stagnierten (9). Eine ähnlich deutliche Veränderung der Prävalenzdaten wurde auch in Japan registriert. Der Zeitpunkt der Veränderung lässt vermuten, dass die Übernahme des „westlichen Lebensstils“ in Japan in den 60er Jahren dabei eine bedeutende Rolle spielen könnte (183), (184). Im Jahr 1966 stellten Leibowitz und Kollegen fest, dass das Auftreten von MS in Israel positiv mit dem Niveau der Abwasserentsorgung korrelierte (185) und lenkten damit die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der Hygiene in der Ätiologie und Pathogenese der MS.

Die Hygiene-Hypothese existiert seit 1870, als Charles Harrison Blackley bemerkte, dass Aristokraten und Stadtbewohner häufiger als Bauern Heuschnupfen bekamen (186). Es folgten weitere Hinweise, dass andere chronisch entzündliche Erkrankungen in den westlichen Gesellschaften zunehmen würden (187) (188) (189). Es wurde letztendlich vermutet, dass häufige Infektionen in der Kindheit oder eine mangelhafte Hygiene aus irgendeinem Grund für das sich entwickelnde Immunsystem von großer Bedeutung sein müssen.

Die Hygiene-Hypothese besagt, dass die im Rahmen der Evolution entwickelten symbiotischen Zusammenhänge mit den bakteriellen Kommensalen und Würmern zu einer Herunterregulation des Immunsystems führen, um eine unnötige oder nicht gewünschte Immunantwort auf diese Organismen zu vermeiden. Mit der zunehmenden Vertreibung dieser Mikroorganismen durch verschärfte Hygiene, Antibiotikatherapie und veränderte Essgewohnheiten wird das Immunsystem unter anderen Bedingungen entwickelt und kann bei genetisch prädisponierten Individuen zu autoimmunen Krankheiten führen.

Mit dieser These wird angenommen, dass eine geringere Exposition gegenüber Infektionserregern in der Kindheit die Entwicklung einer Th1-abhängigen proinflammatorischen Immunantwort und anschließend ein erhöhtes Risiko für Autoimmunerkrankungen birgt, während die Exposition gegenüber mehreren Infektionserregern in der Kindheit die Immunantwort in Richtung Th2-Antwort und regulatorischen T-Zellen moduliert (190), was zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber der Autoimmunität führt.

Der andere Aspekt der Hygiene-Hypothese berücksichtigt genetische Einflüsse der Erreger auf den Wirt. Es konnte gezeigt werden, dass große Variabilität für bestimmte immunaktive Gene wie z. B. Interleukine (IL-1, -2, -4, -7, -10, -15) (191) oder HLA-Klasse-I (192) mit dem Pathogenreichtum in der Population korreliert. Sobald der immunregulatorische Einfluss der Organismen durch den modernen Lebensstil deutlich reduziert wird, könnte das Immunsystem in Richtung der Autoimmunität gesteuert werden (191).

Übereinstimmend mit der Hygiene-Hypothese wurde bisher die immunregulatorische Rolle der Helminthen am besten bei allergischen Erkrankungen untersucht (193). Es wird geschätzt, dass noch im Jahr 1947 etwa 36% der Bevölkerung in Europa Kontakt mit solchen Helminthen wie *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* und *Ascaris lumbricoides* hatte (194). MS ist äußerst selten in Ländern mit einer Prävalenz von *T. trichiura* größer als 10%, steigt jedoch dramatisch in Gebieten mit geringerer Prävalenz (141). MS-Patienten, die sich mit Helminthen infizierten, hatten eine auffallend reduzierte Krankheitsprogression und entwickelten zirkulierende myelinspezifische Treg, welche IL-10 und TGF- β als Reaktion auf MBP-Antigen freisetzten (195).

Neben den Helminthen rückten in letzten Jahren immer häufiger auch die kommensalen Darmbakterien und deren Einfluss auf das Immunsystem und die Autoimmunität in den Fokus der Forschung.

1.8 Autoimmunität und die intestinale Mikroflora

Die Schleimhautflächen des Menschen bilden einen riesigen Bereich. Der menschliche Dünndarm hat beispielweise eine Fläche von 300 m², das heißt 200-mal so groß wie die Hautoberfläche (196). Die Durchlässigkeit und Fragilität der Schleimhäute verursacht dabei eine große Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Es ist nicht verwunderlich, dass gerade hier effektive Abwehrmechanismen zur Verfügung stehen, welche einerseits gegenüber den Pathogenen schützen, andererseits aber bei zahlreichen kommensalen Mikroorganismen und nicht pathogenen Nahrungsantigenen eine ressourcensparende Vorgehensweise garantieren. Der gastrointestinale Trakt der Säugetiere ist eine komplexe ökologische Umwelt, die eine heterogene Population von $>10^{14}$ Mikroorganismen enthält, also 10-mal mehr als die eigenen Zellen des Menschen. Diese Mikroorganismen gehören ~1.000 Arten an (197), (198). Die Billionen kommensaler Mikroorganismen, die die Darmflora bilden, gehören in erster Linie zu den fünf bakteriellen Stämmen *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* und *Firmicutes*. Sie stellen ~90% der gesamten Darmflora dar (199).

Wirbeltiere werden im Wesentlichen keimfrei geboren und erwerben ihre Darmflora kurz nach der Geburt. Die meisten dieser Organismen sind bei einem immunkompetenten Wirt nicht pathogen. In der Tat sind viele von denen nützlich, versorgen den Host mit

Vitaminen und füllen den verfügbaren mikrobiologischen Nischenzugang für die Krankheitserreger. Somit hängt die Gesundheit von Säugetieren an der Gegenseitigkeit von Host und seiner Darmflora (200).

Von den enormen Mengen von Organismen konnten bisher noch nicht alle identifiziert werden. Vergleichende Analysen der 16S rRNA-Sequenzen, amplifiziert von menschlichen Fäkalien, deuten darauf hin, dass weniger als 25% der identifizierten Sequenzen bekannten Organismen entsprechen. Ebenso sind nur etwa 60-80% der intestinalen Bakterien kultivierbar und somit ist ein Großteil der Flora nicht über eine Kultivierung erfassbar (201). Erst die technologische Entwicklung in den letzten 20 Jahren mithilfe neuer molekulargenetischer Methoden erlaubte große Erkenntnisgewinne über die intestinale Normalflora, ihre Zusammensetzung und Veränderung bei Krankheitsprozessen, besonders des Darmes (202), (203) und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (204), (205) (206), (207). Auch andere Krankheiten mit einem gesicherten autoimmunologischen Hintergrund zeigen Veränderungen der Darmflora.

Interessanterweise haben die in Russland lebenden Karelier ein sehr niedriges Niveau von Typ-1-Diabetes mellitus, welches wiederum sechsmal höher bei den im angrenzenden Finnland lebenden Kareliern ist. Die beiden Gruppen zeigen ähnliche genetische Eigenschaften, einschließlich ihrer schützenden HLA-DQ-Allele und leben in den gleichen nördlichen Breiten (208). Wie andere Studien zeigten, leben die russischen Karelier in einem ganz anderen mikrobiologischem Umfeld im Vergleich zu ihren finnischen Nachbarn (209). In zahlreichen Tiermodellen wurde inzwischen die Rolle der kommensalen Darmflora bei Typ-1-Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis und EAE untersucht (210). Dabei werden die durch die kommensalen Bakterien verursachten Veränderungen in den verschiedenen Kompartimenten des mukosalen Immunsystems immer klarer (211), (212), (213), (214).

Während eine umweltbedingt veränderte Darmflora mehrfach als Risikofaktor für die rheumatoide Arthritis (215), entzündliche Darmerkrankungen (216), menschliche Allergien und das Asthma bronchiale (217) diskutiert wurde, gibt es kaum Untersuchungen über die Darmflora als potentieller Risikofaktor für die MS.

1.9 Herleitung der Aufgabenstellung

Die MS ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche durch die Altersstruktur der Erkrankten besonders hohe sozio-ökonomische Kosten verursacht. Dank den EAE-Modellen der MS konnten die Pathomechanismen bei der Entstehung und Progression der Erkrankung immer besser verstanden werden und führten auch zur Etablierung von effektiven Therapiekonzepten. Trotz des unbestreitbaren Fortschritts bleiben bei der Erforschung der MS-Ätiologie viele Fragen offen. Die Untersuchungen des menschlichen Genoms bei der MS beweisen die Rolle des Immunsystems im Krankheitsprozess. Des Weiteren finden sich viele Hinweise, dass die Autoimmunität als fehlgesteuerte Immunantwort auf die körpereigenen Antigene der treibende Motor der Erkrankung ist. Die entscheidenden Faktoren in diesem Prozess scheinen das Erlernen und Regulieren von Toleranz zu sein. Seitdem entdeckt wurde, dass der Darmtrakt nicht nur der Ernährung des Menschen dient, sondern auch durch das mukosale Immunsystem die Koexistenz mit zahlreichen Mikroorganismen sichert, konnte inzwischen in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass die Toleranzprozesse hier eine besonders wichtige Rolle spielen. Es finden sich inzwischen zahlreiche wissenschaftliche Beweise dafür, dass Veränderungen in diesem System zu Erkrankungen führen, auch zu solchen mit einem autoimmunogenen Hintergrund.

Das Ziel dieser Arbeit ist anhand von Stuhlproben zu klären, ob bei der MS Veränderungen in der Zusammensetzung und der Konzentration der Darmflora zu finden sind. Ferner soll überprüft werden, ob bestimmte Faktoren auf die bakterielle Darmflora bei der MS Einfluss nehmen.

2. Material und Methode

Tabelle 4: Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Bezugsfirma</i>
CO ₂ - Inkubator	IR Auto Flow	NuAire, Plymouth, USA
Feinwaage	SAC 51	Scaltec instruments, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse 80i	Nikon, Tokio, J
Hg-Hochdrucklampe	C-SHG1	Nikon, Tokio, J
Hybridisierungsöfen	Hybaid Mini Oven	MWG-Biotech, Ebersberg
Kamera	DXM 1200F	Nikon, Tokio, J
Trockenschrank	ULM400	Memmert, Schwabach
Vortexgerät	Labinco L24 Vortex	Labinco, Breden NL
Wärmeschrank	Function Line BB16	Heraeus instruments, Hanau
Wasserbad	Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zählgitter	Okularstrichplatte MXK 23002	Nikon, Tokio, J
Mikrotom	Microm cool-cut HM 325	Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Wärmeschrank	BS 50	MLW
Eppendorfpipetten	Research 10, 40, 200, 1000 µl	Eppendorf AG Hamburg
Paraffin-Streckbad	SB 80	MICROM, Walldorf
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus instruments, Hanau

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Bezugsfirma</i>
1,5ml; 2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
50ml PP Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
10µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
200µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
1000µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Langenbrinck, Emmendingen
Immersionsöl	Carl Zeiss Jena, Jena
PAP-Stift	Kisker-Biotech, Steinfurt
SuperFrost plus Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Paraplast Plus	MC Cormick Scientific
Ratilabo ®Einbettkassetten	Simport
Klingen S-35 für Mikrotom	Feather, Japan

Tabelle 6: Reagenzien

<i>Reagenzien</i>	<i>Bezugsfirma</i>
Bidestilliertes Wasser	Charité Berlin
Chloroform, min. 99%, DAB9	Merck, Darmstadt
DAPI, min. 98%	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%, Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, 96%, EMSURE	Merck, Darmstadt J.T.
HPLC analysiertes Wasser	Baker, Deventer NL
NaCl	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37% zur Analyse	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS Pufferan 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid zur Analyse	Merck, Darmstadt
Xylol zur Analyse	J.T. Baker, Deventer NL

Tabelle 7: Oligonukleotidsonden

<i>Oligonukleotidsonden</i>	<i>Bezugsfirma</i>
Ato291, Cy3	BioTeZ, Berlin
Bac303, Cy5	BioTeZ, Berlin
Bif164, Cy3	BioTeZ, Berlin
Ebac, Cy5	BioTeZ, Berlin
Eub338, FITC	BioTeZ, Berlin
Erec482,Cy5	BioTeZ, Berlin
Ffrau645,Cy3	BioTeZ, Berlin

Tabelle 8: Software

<i>Software</i>	<i>Bezugsfirma</i>
Mikroskopie FotosoftwareACT 1	Nikon, Tokio, J
MS Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
MS Access 2000	Microsoft, Redmond, USA
MS Word 2010	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Version 16	IBM, Armonk, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, New York, USA

2.1 Patienten und Probanden

Die Patienten wurden in dem Ambulanten MS-Zentrum der Oberhavelkliniken GmbH in Hennigsdorf in einem Zeitraum von vierzehn Monaten rekrutiert. Die Probanden der Studie wurden in einer internistischen Spezialsprechstunde am Campus Mitte der Charité Universitätsmedizin Berlin in einem Zeitraum von sechs Monaten rekrutiert. Es wurden 54 Patienten mit einer nach den geltenden diagnostischen Kriterien gesicherten Multiplen Sklerose eingeschlossen. Als Kontrollgruppe dienten 54 Patienten ohne anamnestisch bekannte chronisch entzündliche Darmerkrankungen und ZNS-Erkrankungen, die die internistische Sprechstunde der Charité aus anderen Gründen besuchten. Die einzelnen Gruppen waren hinsichtlich der Geschlechtsverteilung vergleichbar. Alle Patienten und Probanden wurden mündlich und schriftlich über die Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Es lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité und der Brandenburgischen Ärztekammer vor. Zudem wurden alle Untersuchungen in Einklang mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt .

Datenerfassung

Von jedem Patienten wurden folgende Daten erfasst und in der Folge statistisch analysiert:

- Alter
- Geschlecht
- Größe
- Gewicht
- Verlaufstyp der Multiplen Sklerose
- Zeitpunkt der Erstdiagnose
- Zeitpunkt der Erstsymptome
- EDSS
- Auftreten eines Schubes in den letzten 14 Tagen
- Therapie des Schubes in den letzten 14 Tagen
- aktuelle Medikation bezüglich der multiplen Sklerose
 - Immunmodulatoren
 - Eskalationstherapie
- Begleitmedikation
 - Antibiotika

- Chemotherapie
- Begleiterkrankungen
 - akute infektiöse Erkrankungen
 - Neoplasie
 - Sprue
 - Schlaganfall
 - chronisch entzündliche Darmerkrankungen
- Lebensort (Stadt/Land)
- Ernährungsgewohnheiten
 - Mischköstler
 - Vegetarier
 - Veganer
- Auftreten der Multiplen Sklerose bei Familienangehörigen
- Transaminasen

Verblindung

Die im Labor eingehenden Proben wurden mit einer fortlaufenden neunstelligen Nummer versehen. Diese Nummer erlaubte keinen Rückschluss auf jedwede Patientendaten. Die anonymisierten Patientendaten wurden mit der gleichen Nummer versehen und in einer separaten Datenbank gespeichert. Die Entblindung erfolgte erst nach der mikroskopischen Auswertung der Proben zur statistischen Analyse.

2.2 Probenpräparation

Die Stuhlproben wurden durch die Patienten und Probanden in Form von 4-10mm langen fäkalen Zylindern mit Hilfe eines Kunststoffstrohhalmes mit einem 3mm Innendurchmesser (Schlecker, Deutschland) gestanzt. Die Strohhälme wurden in 4cm lange Stücke geschnitten und zusammen mit einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 30ml Carnoy-Lösung (6/6/1 vol. Ethanol/ Eisessig/ Chloroform) an die Teilnehmer der Studie verteilt. Die Teilnehmer wurden über die Vorgehensweise bei der Punktion der Stuhlzylinder angewiesen. Die Strohhälme mit den Stuhlproben wurden in die Falcon-Röhrchen eingeworfen und in der Carnoy-Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur

fixiert, anschließend bei 4°C gekühlt und innerhalb von ein bis zwei Wochen ins Labor geliefert.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden bei den Studienteilnehmern jeweils im Abstand von drei bis sieben Tagen mehrere Stuhlproben abgenommen. Bei allen 54 Probanden waren es drei Proben. Bei den MS-Patienten waren es bei 48 Patienten drei Proben, bei drei Patienten zwei Proben und bei vier Patienten eine Probe.

Im Labor wurden zunächst die Strohhalme und die Carnoy-Lösung entfernt und durch Xylol ersetzt. Nach 24 Stunden wurden die fäkalen Zylinder unter Verwendung von Standardverfahren in Paraffin eingebettet und am nächsten Tag in 4µm dicke, längliche Präparate geschnitten, auf SuperFrost-Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) (206) fixiert und für 60 Minuten bei 50°C durchbacken. Um die Proben mit allen ausgewählten Oligonukleotidsonden untersuchen zu können, wurde jede Probe auf drei Objektträger aufgebracht.

2.3 Hybridisierung

2.3.1 Vorbereitungen für die Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurden die auf den Objektträgern liegenden Schnitte durch ein dreiminütiges Bad zunächst 4-mal in Xylol und dann 4-mal in 96%igem Ethanol entparaffiniert. Anschließend mussten sie 30 Minuten bei 50°C trocknen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem PAP-Pen umkreist. Die Markierung sorgte dafür, dass sich aufgetragene Flüssigkeiten nur im definierten Bereich ausbreiten konnten. Die Markierung mittels PAP-Pen hat zudem den Vorteil, dass sie nicht mit den später aufgetragenen Chemikalien reagierte, temperaturstabil ist und bei der anschließenden Mikroskopie wenig störende Autofluoreszenzen erzeugt.

2.3.2 Oligonukleotidsonden

Bei den verwendeten Sonden handelt es sich um rRNA-basierte Oligonukleotidsonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. In dieser Studie wurden 16S rRNA-

und 23S rRNA-basierte Sonden verwendet. Diese binden spezifisch an die komplementäre Zielsequenz der bakteriellen rRNA und markieren hierdurch die Bakterien. Insgesamt wurden sechs verschiedene Oligonukleotidsonden verwendet, die entweder spezifisch alle Bakterien, einzelne Familien und Gruppen oder einzelne Spezies markieren. Welche Sonden im Einzelnen genutzt wurden ist in der Tabelle 9 ersichtlich. Die Sequenzen der verwendeten Sonden sowie weitere Informationen wie Spezifität, Zielmolekül und Molekulargewicht sind auf ProbeBase einsehbar (219).

Da bisher keine Studien veröffentlicht wurden, welche die Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora bei multipler Sklerose untersuchten, erfolgte die Auswahl der Sonden angelehnt an die Ergebnisse bei Voruntersuchungen in Tiermodellen, vor allem bei der EAE (220). Ebenso wurden autoimmune Erkrankungen, bei denen der Einfluss der Darmflora auf die Ätiologie diskutiert wurde berücksichtigt (221), (206), um einen möglichst großen Teil der vorkommenden Bakterien abzubilden (222), (199).

Tabelle 9: Oligonukleotidsonden. Die angegebene Referenz verweist auf die Erstbeschreibung.

<i>Sondenname</i>	<i>Ziel</i>	<i>Farbstoff</i>	<i>Referenz</i>
Eub338	Alle Bakterien, Kingdom eubacteria	FITC	(223)
Ato291	<i>Atopobium</i>	Cy3	(224)
Bac303	<i>Bacteroidaceae</i>	Cy5	(225)
Bif164	<i>Bifidobacteriae</i>	Cy3	(226)
Ebac	<i>Enterobacteriaceae</i>	Cy5	(227)
Erec482	<i>Eubacterium rectale</i>	Cy5	(228)
Ffrau645	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Cy3	(229)
DAPI	Gegenfärbung, alle DNA- und RNA-haltigen Strukturen		(230)

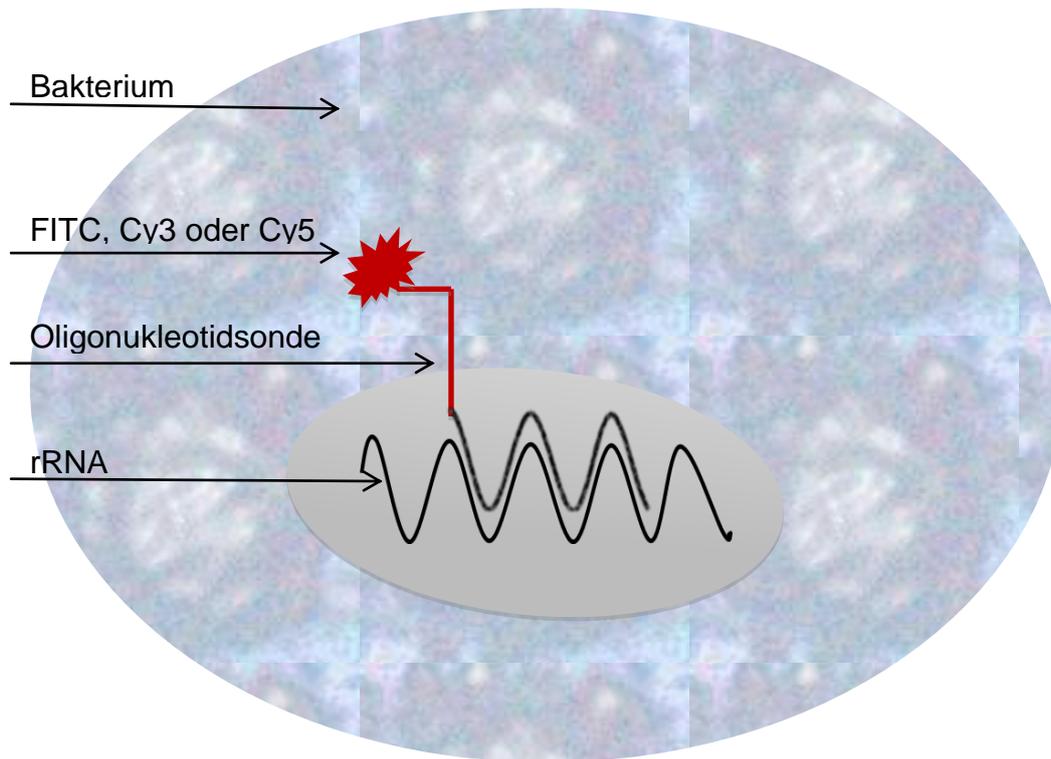


Abbildung 1: Mechanismus von FISH. Die Abbildung zeigt die fluorochrommarkierte Sonde, die an bakterielle rRNA bindet.

2.3.3 Gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe

Beide Sondengruppen (Zielmolekül 16S rRNA oder 23S rRNA) binden an die bakterielle rRNA und der gekoppelte Farbstoff sendet, wenn er angeregt wird, Licht aus und macht die Bakterien so sichtbar. Insgesamt waren drei unterschiedliche Farbstoffe, Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Cyanine Cy3 und Cy5 an die Sonden gekoppelt (Abbildung 1). Die Farbstoffe werden bei unterschiedlichen Wellenlängen maximal angeregt, FITC bei $\lambda_{(\max)}=495\text{nm}$, Cy3 bei $\lambda_{(\max)}=548\text{nm}$ und Cy5 bei $\lambda_{(\max)}=647\text{nm}$, und emittieren die gespeicherte Energie wiederum als Licht. Auch das emittierte Licht hat je nach Farbstoff unterschiedliche Wellenlängen (FITC: $\lambda_{(\max)}=519\text{nm}$; Cy3: $\lambda_{(\max)}=561\text{nm}$; Cy5: $\lambda_{(\max)}=665\text{nm}$), sodass FITC unter dem Fluoreszenzmikroskop als grün, Cy3 als orange und Cy5 als dunkelrot erscheint. Die Wellenlängen, bei denen Licht maximal absorbiert und emittiert wird, sind der Datenbank PubSpectra entnommen (231).

Die Wellenlänge des von Cy5 emittierten Lichts ($\lambda_{(\max)}=665\text{nm}$) wird vom menschlichen Auge nicht mehr oder nur noch schwach erkannt, sodass hier auf die Analyse von Fotos zurückgegriffen werden muss. Die unterschiedlichen Farbspektren der Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen es in einem Präparat bis zu drei verschiedene Bakterienspezies zu markieren und ihre Konzentration und räumliche Verteilung zu analysieren.

2.3.4 Hybridisierung

Die Zusammensetzung der Basislösung für die anschließende Hybridisierung ist aus Tabelle 11 zu ersehen. Zu je 50 μl dieser Lösung wurden dann 2 μl der FITC-gelabelten Sonde und je 0,5 μl der Cy3- und der Cy5-gelabelten Sonde gegeben. Von der so hergestellten Hybridisierungslösung wurden je 50 μl auf die PAP-markierten Objektträger gegeben. Jeder der drei Objektträger der Probe wurde mit einer anderen Sondenkombination hybridisiert. Die Sondenkombinationen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Sondenkombinationen

<i>Sondenname</i>	<i>Cy3</i>	<i>FITC</i>	<i>Cy5</i>
Objektträger 1	Ato291	Eub338	Erec482
Objektträger 2	Fprau645	Eub338	Ebac
Objektträger 3	Bif164	Eub338	Bac303

Anschließend wurden die Präparate für 45 Minuten bei 50°C hybridisiert. Um die ungebundenen Sonden zu entfernen, wurden sie dann nach Spülung mit destilliertem Wasser für fünf Minuten in einer Waschlösung bei 50°C gewaschen und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Die Objektträger wurden dann erneut bei 50°C fünf Minuten getrocknet, bevor sie mit DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) für fünf Minuten bei Raumtemperatur dunkel gegengefärbt, anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und das letzte Mal fünf Minuten bei 50°C getrocknet wurden.

Tabelle 11: Hybridisierungs- und Waschlösung

Für 2ml Hybridisierungs-Lösung			Für 50ml Waschlösung		
Menge	Konzentration	Stoff	Menge	Konzentration	Stoff
360µl	5M	NaCl	1ml	1M	Tris-HCl
40µl	1M	Tris-HCl	9ml	5M	NaCl
10µl	10%	SDS	30µl	10%	SDS
20µl	zur Analyse	Formamid	auf 50ml		Aqua dest.
1580µl		Aqua dest.			

2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Mikroskopie

2.4.1 Funktionsweise

Bei einem Fluoreszenzmikroskop wird das Präparat, im Gegensatz zu einem normalen Lichtmikroskop, nicht von unten durchleuchtet, sondern spezifische Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten angeregt. Dazu wird das Licht einer Quecksilberdampfhochdrucklampe durch einen ersten Spektralfilter, den Anregungsfilter, über einen Teilerspiegel auf das Präparat gelenkt. Der Anregungsfilter lässt nur ein schmales Lichtspektrum durch und zwar eben jenes, das den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff (DAPI, FITC, Cy3 oder Cy5) maximal anregt. Der angeregte Farbstoff emittiert wiederum Licht, das dann durch einen weiteren Spektralfilter, den Sperrfilter und durch das Okular zum Auge des Untersuchers oder zu einer Kamera gelenkt wird. Der Sperrfilter hat dabei die Aufgabe nur die Wellenlängen durchzulassen, die spezifisch für das jeweilige Fluorochrom sind und anderes Licht, wie zum Beispiel vom Präparat reflektiertes Anregungslicht, aufzuhalten (232). Die Funktionsweise der Fluoreszenzmikroskopie wird auch durch Abbildung 2 verdeutlicht.

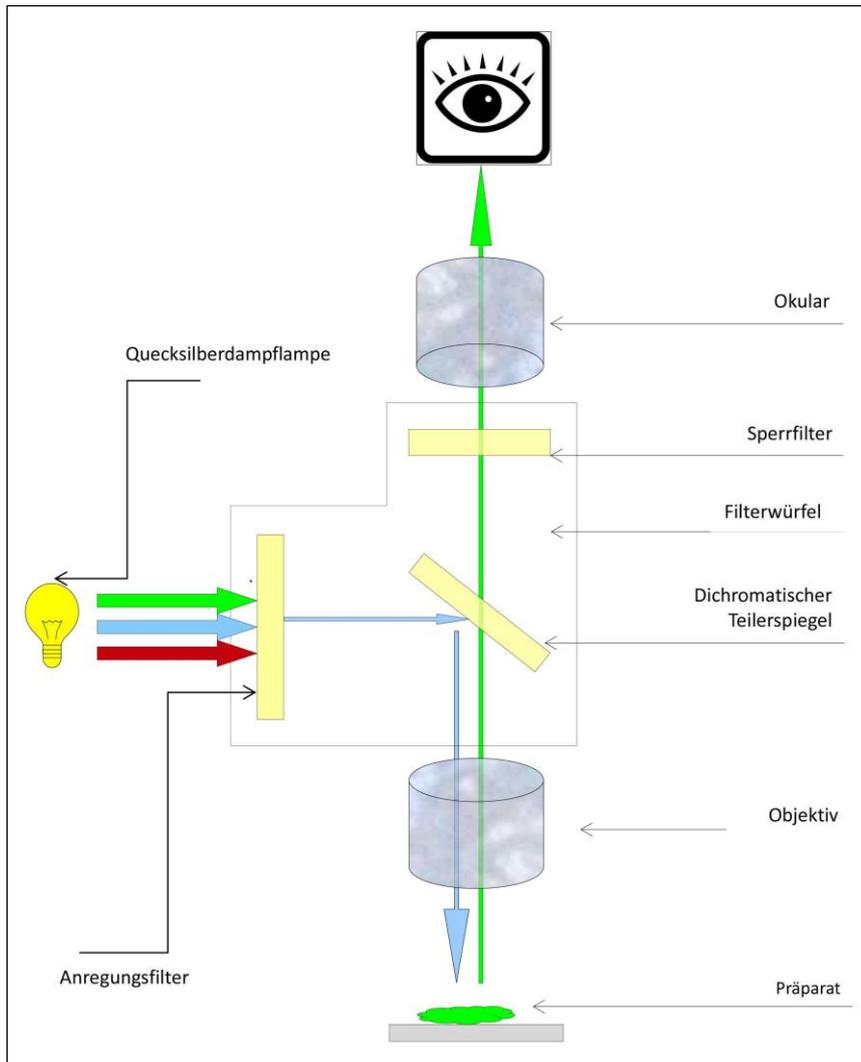


Abbildung 2: Funktionsweise der Fluoreszenzmikroskopie

2.4.2 Zelldifferenzierung

Leukozyten

Die Leukozyten lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Morphologie in der Gegenfärbung mit DAPI und ihrer Größe eindeutig von bakteriellen Zellen unterscheiden. Auch die Form des organisierten Zellkerns kann als Differenzierungsmerkmal dienen.

Standards zur Identifikation von Bakterien

Bakterien sind aufgrund von unspezifischen Signalen oft schwierig von eukaryonten Zellverbänden und Artefakten zu unterscheiden. Um dennoch valide Aussagen über Bakterien treffen zu können, sind einige Standards notwendig.

Bakterien werden unabhängig von einem positiven Signal in der spezies-spezifischen Sonde nur als solche gezählt, wenn sie auch in der Gegenfärbung mit DAPI erkennbar sind. Es muss auch in der Eub338-Sonde, die alle Bakterien darstellt, ein positives Signal nachweisbar sein. Zudem wird eine bakterientypische Form gefordert, um die Gefahr der Verwechslung mit Artefakten zu minimieren. Die Bakterien dürfen auch nicht mit anderen Oligonucleotidsonden kreuzhybridisieren, sondern nur mit ihrer gruppen-, bzw. spezies-spezifischen Sonde hybridisieren (233).

Quantitative Bestimmung bakterieller Subpopulationen

Um einen genaueren Überblick über die Zusammensetzung der Bakterien zu bekommen, wurde jede der beobachteten Bakteriengruppen (Tabelle 13) einzeln beurteilt. Die Konzentration der einzelnen Bakteriengruppen wurde mit Hilfe eines Zählgitters bei 1000facher Vergrößerung geschätzt. Hochkonzentrierte Bakterien wurden in einem $10 \times 10 \mu\text{m}$ großen und für die Region repräsentativen Feld gezählt. Bakterien mit ungleichmäßiger Verteilung oder insgesamt niedrigeren Konzentrationen wurden in einem $100 \times 100 \mu\text{m}$ großen Feld oder sogar auf der gesamten Oberfläche des fäkalen Zylinders ausgezählt. Die Umwandlung der Zahlen der registrierten Signale innerhalb eines definierten mikroskopischen Bereiches auf die Konzentrationen von Bakterien pro ml basierte auf folgendem Modell:

Eine 10µl Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 10^7 Zellen pro ml, die auf eine kreisförmige Glasoberfläche von einem Zentimeter aufgebracht wird, führt zu einer Konzentration von 40 Zellen pro durchschnittliches mikroskopisches Feld mit einem Durchmesser von 200µm bei einer Vergrößerung von $\times 1.000$. Somit wäre ein Bakterium in einem Bereich von $785\mu\text{m}^2$ zu finden. Die Präparate haben eine Dicke von 4µm. Ein Bakterium ist im Durchschnitt 0,8µm groß. Unter diesen Annahmen, wenn eine Oberfläche von $100\mu\text{m}^2$ ein Bakterium aufweist, entspricht es einer Konzentration von $0,4 \times 10^9$ Zellen pro ml. 250 Bakterien pro $100\mu\text{m}^2$ erlauben keine visuelle Unterscheidung eines einzelnen Bakteriums, obwohl Bereiche zwischen den einzelnen Bakterien noch zu sehen sind; Fällen wie diesem wurde eine Konzentration von 10^{11} Zellen pro ml zugewiesen. Ein homogener Bakterienteppich ohne abgrenzbare Zwischenräume tritt bei Keimzahlen von 2.500 Zellen/ $100\mu\text{m}^2$ auf; Fällen wie diesem wurde eine Konzentration von 10^{12} Zellen pro ml zugewiesen (204).

2.4.3 Fotodokumentation

Um die Befunde nachvollziehbar zu dokumentieren, wurden alle Präparate bei 400facher Vergrößerung fotodokumentiert. Es wurden besonders typische Stellen der Präparate in allen Filtern (DAPI, Cy3, Cy5 und FITC) fotografiert. Die Bilder wurden, versehen mit der fünfstelligen Probennummer, anonymisiert im JPEG-Format gespeichert und archiviert.

2.5 Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Version 16.

Die Häufigkeit des Auftretens von einzelnen Bakterien, Leukozyten und der Mucusschicht in den Stuhlproben wurde zwischen der MS-Gruppe und der Kontrollgruppe mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet.

Die Überprüfung der Normalverteilung der Leukozyten- und Bakterienkonzentrationen pro Milliliter sowie der Mucusschichtbreite erfolgten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Die Bakterienkonzentration pro Milliliter wurde mithilfe von arithmetischem Mittel

und Standardabweichung ("standard deviation"; SD) dargestellt. Die graphische Darstellung erfolgte mit Box-Plot-Diagrammen, bei denen der Median, die beiden Quartile, die maximalen und minimalen Werte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes sowie die extremen und milden Ausreißer dargestellt wurden. Variablen, die mit einer ausreichenden Sicherheit normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test $p > 0,05$), wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben nach Student ausgewertet. Wenn die Normalverteilung nicht mit ausreichender Sicherheit gegeben war, wurde die Variable mit dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney analysiert.

Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von 5% abgelehnt ($p < 0,05$). Das heißt, ab $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant, ab $p < 0,01$ als hochsignifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik

Die beiden untersuchten Gruppen, MS-Gruppe und Kontroll-Gruppe, bestanden aus jeweils 54 Personen. Beide Gruppen waren in Bezug auf die geschlechtliche Verteilung identisch und bestanden aus 35 (64,8%) Frauen und 19 (35,2%) Männern.

Ähnlich waren Größe und Gewicht beider Gruppen vergleichbarer (Tabelle 12).

Tabelle 12: Größen- und Gewichtsverteilung der Gruppen.

Gruppe	Größe in cm				Gewicht in kg			
	Mittelwert	Min	Max	SD	Mittelwert	Min	Max	SD
MS	171,88	156	192	9,05	72,31	43	120	16,54
Kontrolle	168,65	154	194	8,39	66,46	47	93	10,07

In Bezug auf das Alter war die MS-Gruppe statistisch signifikant jünger als die Kontroll-Gruppe ($p < 0,0001$). Das durchschnittliche Alter betrug in der MS-Gruppe 43,04 (SD 12,25) Jahre und in der Kontroll-Gruppe 55,83 (SD 15,0) Jahre (Abbildung 3).

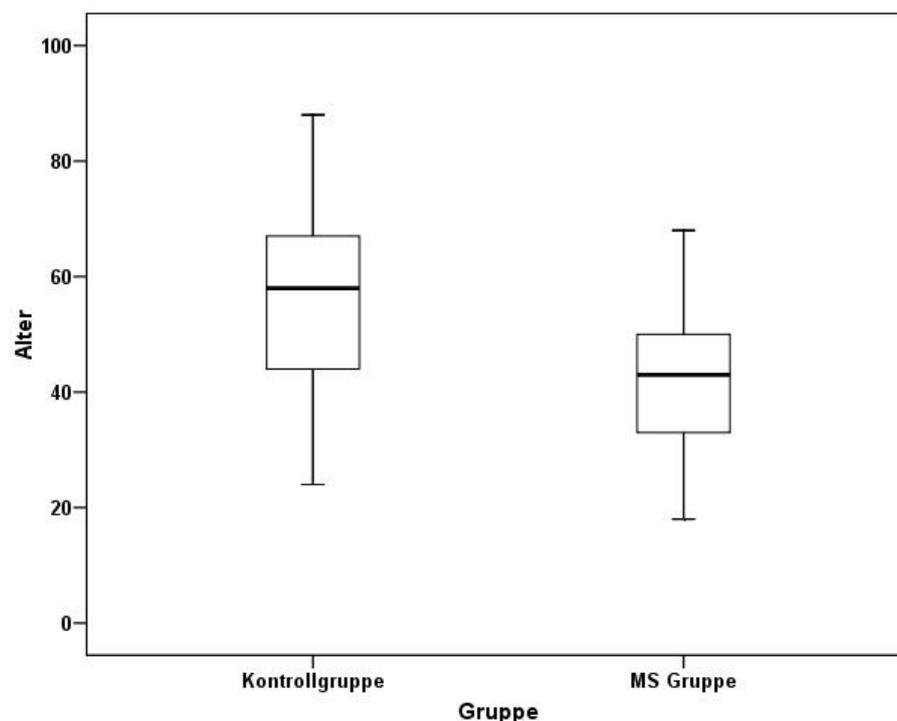


Abbildung 3: Altersverteilung der Gruppen

45 Patienten (83,3%) hatten eine schubförmig-remittierende, sechs eine sekundär-progrediente (11,1%) und ein Patient (1,9%) eine primär-progrediente Form der MS. Bei zwei Patienten fehlten die Angaben bezüglich der Krankheitsform.

Bei 27 Patienten (51,9%) wurden die ersten Krankheitssymptome vor dem Jahr 2003 festgestellt und bei 25 (48,1%) im Jahr 2003 und später. 29 Patienten (55,8%) wiesen einen EDSS von 3,5 und kleiner und 23 (44,2%) einen EDSS von 4,0 und größer auf. 27 Patienten (50%) hatten einen Schub und 28 (51,9%) wurden mit Methylprednisolon-Hochdosistherapie behandelt. 28 Patienten (51,9%) wurden im Rahmen der Basistherapie mit einem der β -Interferone oder dem Glatirameracetat behandelt. Bei 15 von ihnen (27,8%) fand eine Eskalationstherapie (Natalizumab, Fingolimod, Mitoxantron) statt. 33 Patienten gaben die Stadt und 19 das Land als Wohnort an.

3.2 Häufigkeiten

Die Häufigkeit des Auftretens von einzelnen Bakterien, Leukozyten und der Mucusschicht in den Stuhlproben wurde zwischen der MS-Gruppe und der Kontroll-Gruppe mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet.

Leukozyten

Die Leukozyten waren nicht in jeder Probe nachweisbar. Bei der Kontrollgruppe wurde sie bei 13 Personen (24,1%) identifiziert. Bei den MS-Patienten fanden sich leukozytenpositive Proben bei sieben Personen (7,5%). Die Ergebnisse zeigten sich statistisch signifikant bei einem p-Wert von 0,019 (Abbildung 4).

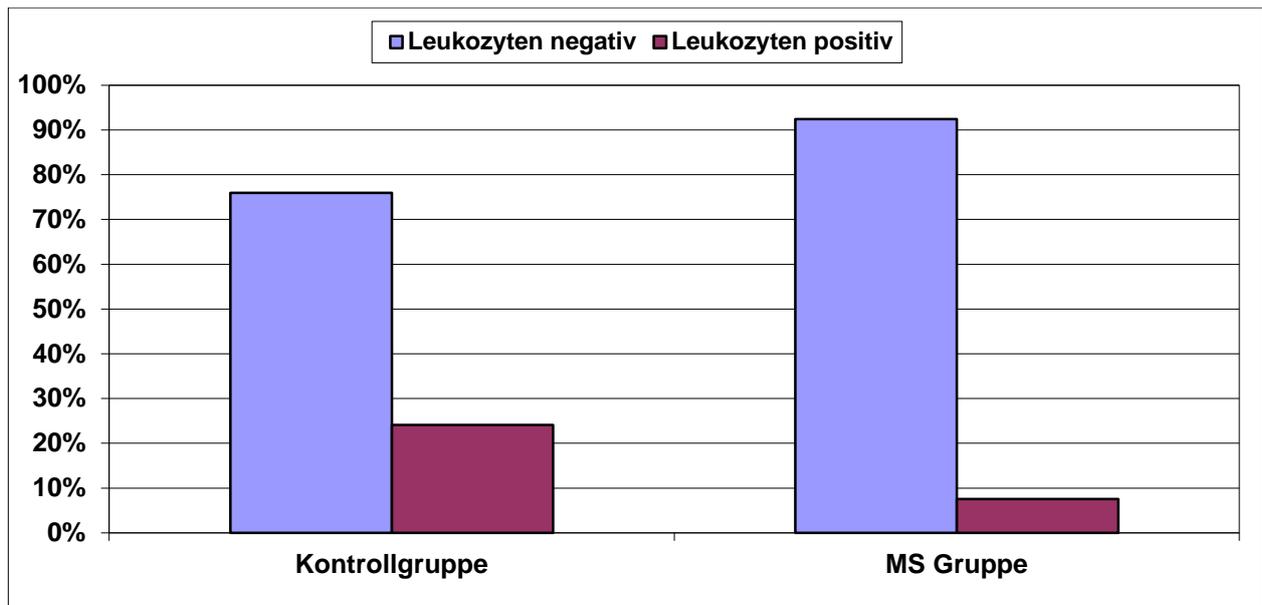


Abbildung 4: Häufigkeit des Auftretens von Leukozyten - Gruppen insgesamt

Mucus

Die Mucusschicht war ähnlich den Leukozyten nicht in jeder Probe nachweisbar. Bei der MS-Gruppe (n=45; 84,9%) kommt der Mucus statistisch signifikant häufiger vor ($p=0,045$) als bei der Kontrollgruppe (n=37; 68,5%) (Abbildung 5).

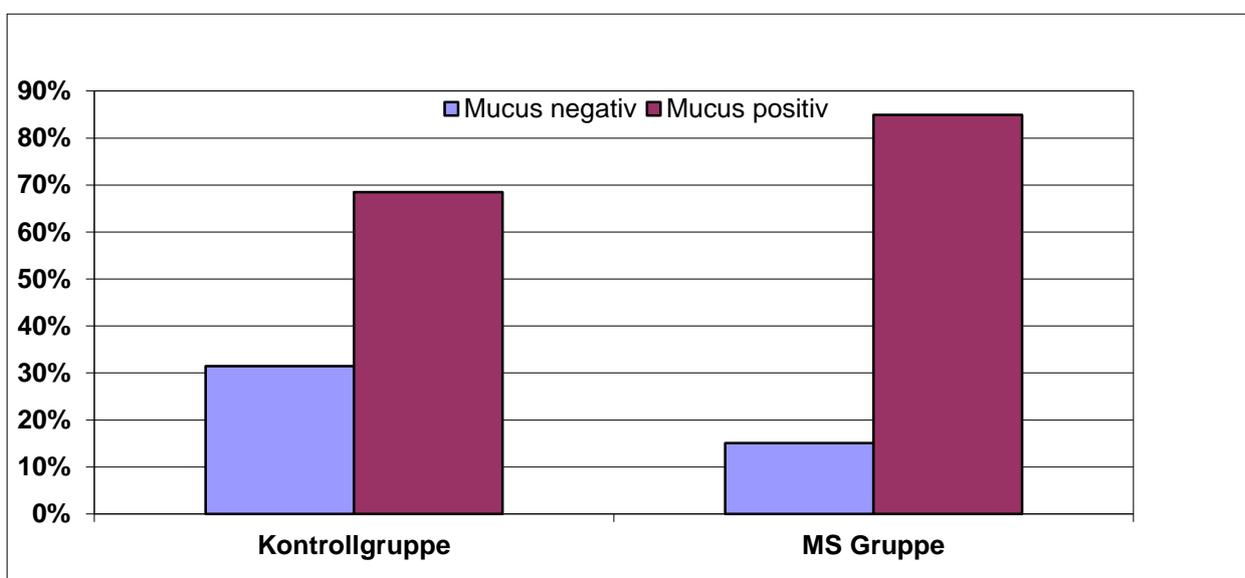


Abbildung 5: Häufigkeit des Auftretens von einer Mucusschicht - Gruppen insgesamt

Bakterien-Gruppen

Atopobium

Die *Atopobium*-Gattung wurde bei der großen Mehrheit der MS-Patienten registriert (n=50; 92,6%), aber bei deutlich weniger Probanden der Kontrollgruppe (n=39; 72,2%). Bei der statistischen Analyse ergab sich ein p-Wert von 0,005 und damit eine statistische Signifikanz des häufigeren Auftretens der Bakterien der *Atopobium*-Gattung bei MS-Patienten (Abbildung 6).

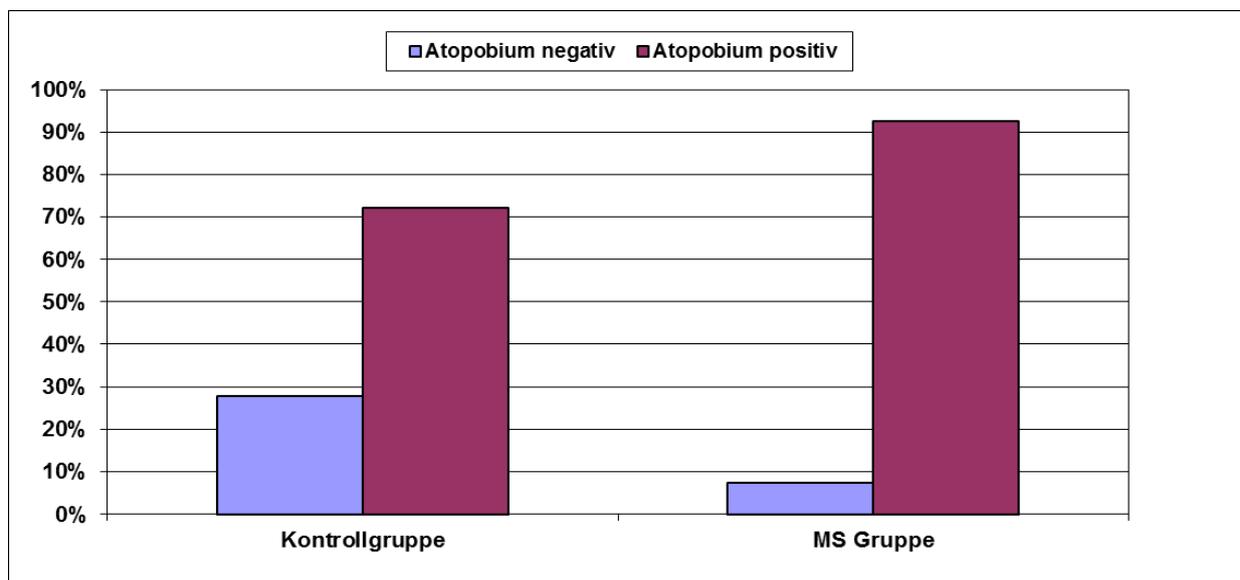


Abbildung 6: Häufigkeit des Auftretens von *Atopobium* - Gruppen insgesamt

Bacteroidaceae

Die Vertreter der *Bacteroidaceae*-Gattung wurden entsprechend bei 51 MS-Patienten (94,4%) und bei allen 54 Probanden (100%) nachgewiesen. Die statistische Auswertung zeigte bei einem p-Wert von 0,079 keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Bifidobacteriae

Die *Bifidobacteriae*-positiven Signale wurden bei 50 MS-Patienten (92,6%) und bei 45 Probanden (83,3%) registriert. Auch hier konnten keine statistisch relevanten Unterschiede bei einem p-Wert von 0,139 nachgewiesen werden.

Enterobacteriaceae

Die Bakterien der *Enterobacteriaceae*-Familie konnten in den Stuhlproben von 24 (44,4%) Personen der MS-Gruppe und bei 33 (61,1%) Personen der Kontroll-Gruppe gefunden werden. Nach der statistischen Analyse zeigte sich ein p-Wert von 0,083 und damit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Eubacterium rectale

Das *Eubacterium rectale*, eine Spezies der *Eubacteriaceae*-Familie, fand sich in den Stuhlproben von 54 Personen (100%) der MS-Gruppe und bei 53 Personen (98,1%) der Kontroll-Gruppe. Die statistische Analyse der beiden Gruppen zeigte bei einem p-Wert von 0,315 keine relevanten Unterschiede in der Häufigkeit. Diese Bakterien gehören auch zur normalen Darmflora.

Faecalibacterium prausnitzii

Faecalibacterium prausnitzii, ein Vertreter der *Clostridiaceae*-Familie, fand sich in den Proben von 52 MS-Patienten (96,3%) und bei allen 54 Probanden (100%). Die statistische Analyse mit dem Chi-Quadrat-Test zeigte einen p-Wert von 0,153 und damit keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Zusammenstellung der Häufigkeiten des Auftretens findet sich in der Tabelle 13.

Tabelle 13: Häufigkeit des Auftretens von Bakteriengruppen, Leukozyten und Mucus bei MS-Patienten und Probanden

Parameter	MS-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert
	Anzahl	proz. Anteil	Anzahl	proz. Anteil	
Leukozyten	4	7,5%	13	24,1%	0,019
Mucus	45	84,9%	37	68,5%	0,045
<i>Atopobium</i>	50	92,6%	39	72,2%	0,005
<i>Bacteroidaceae</i>	51	94,4%	54	100%	0,079
<i>Bifidobacteriae</i>	50	92,6%	45	83,3%	0,139
<i>Enterobacteriaceae</i>	24	44,4%	33	61,1%	0,083
<i>Eubacterium rectale</i>	54	100%	53	98,1%	0,315
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	52	96,3%	54	100%	0,153

3.3 Konzentrationen

Die Konzentration von einzelnen Bakterien-Gruppen und Leukozyten sowie die Breite der Mucusschicht wurden zur weiteren Auswertung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Hierbei ergab sich, dass die Konzentrationen in keiner Gruppe zu einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit normalverteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test in allen Gruppen $<0,05$), sodass zur weiteren statistischen Analyse der Mann-Whitney-U-Test verwendet wurde.

Mucus

Bei der Auswertung der Mucusschichtdicke fanden sich größere Breiten in den Proben von MS-Patienten. In den Proben der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Breite von $25,15\mu\text{m}$ (SD: $49,7\mu\text{m}$). Die Proben der MS-Patienten zeigten eine Breite von durchschnittlich $41,87\mu\text{m}$ (SD: $41,58\mu\text{m}$). Beim Vergleich der MS-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergab sich beim Mann-Whitney-U-Test ein p-Wert von 0,000. Somit war der Breitenunterschied statistisch hoch signifikant (Abbildung 7).

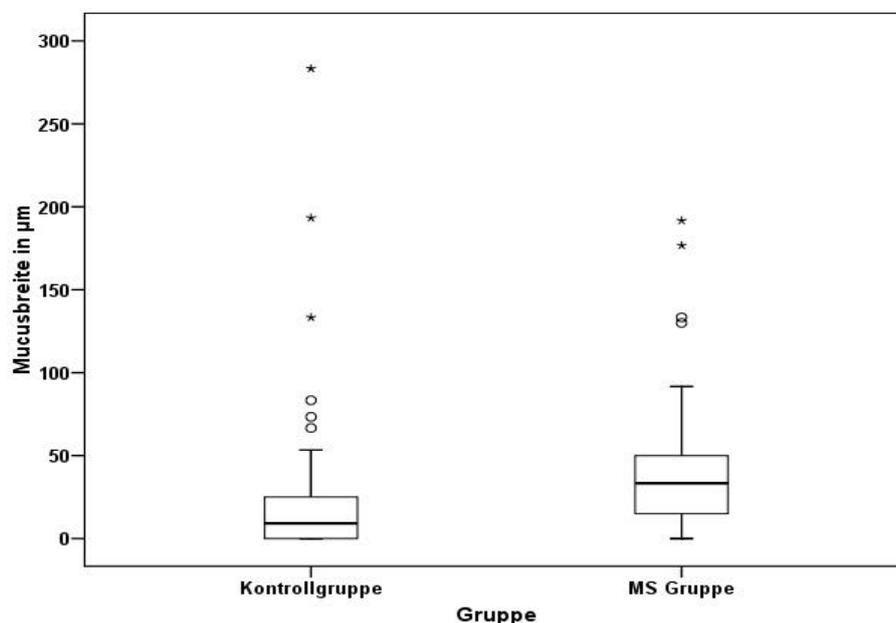


Abbildung 7: Breite der Mucusschicht - Gruppen insgesamt

Leukozyten

Die Proben der Kontrollgruppe enthielten durchschnittlich $0,93 \times 10^5$ Leukozyten pro ml (SD: $2,59 \times 10^5$), wohingegen in den Proben der MS-Gruppe im Durchschnitt $0,47 \times 10^5$ pro ml (SD: $2,43 \times 10^5$) enthalten waren. Die Unterschiede der Leukozyten-Konzentrationen waren statistisch signifikant, so zeigte sich in der statistischen Testung ein p-Wert von 0,022 (Abbildung 8).

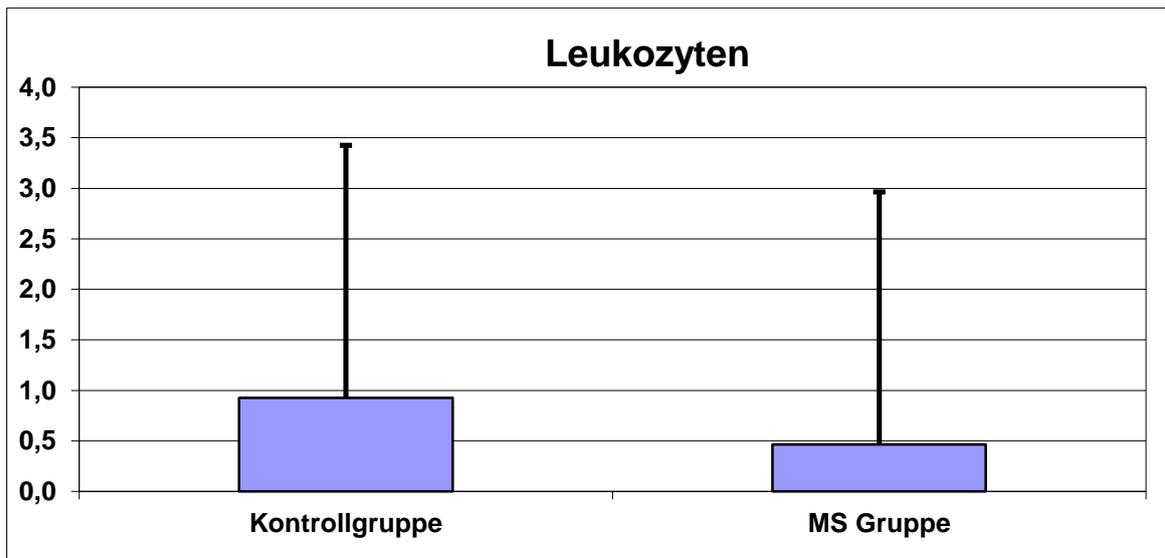
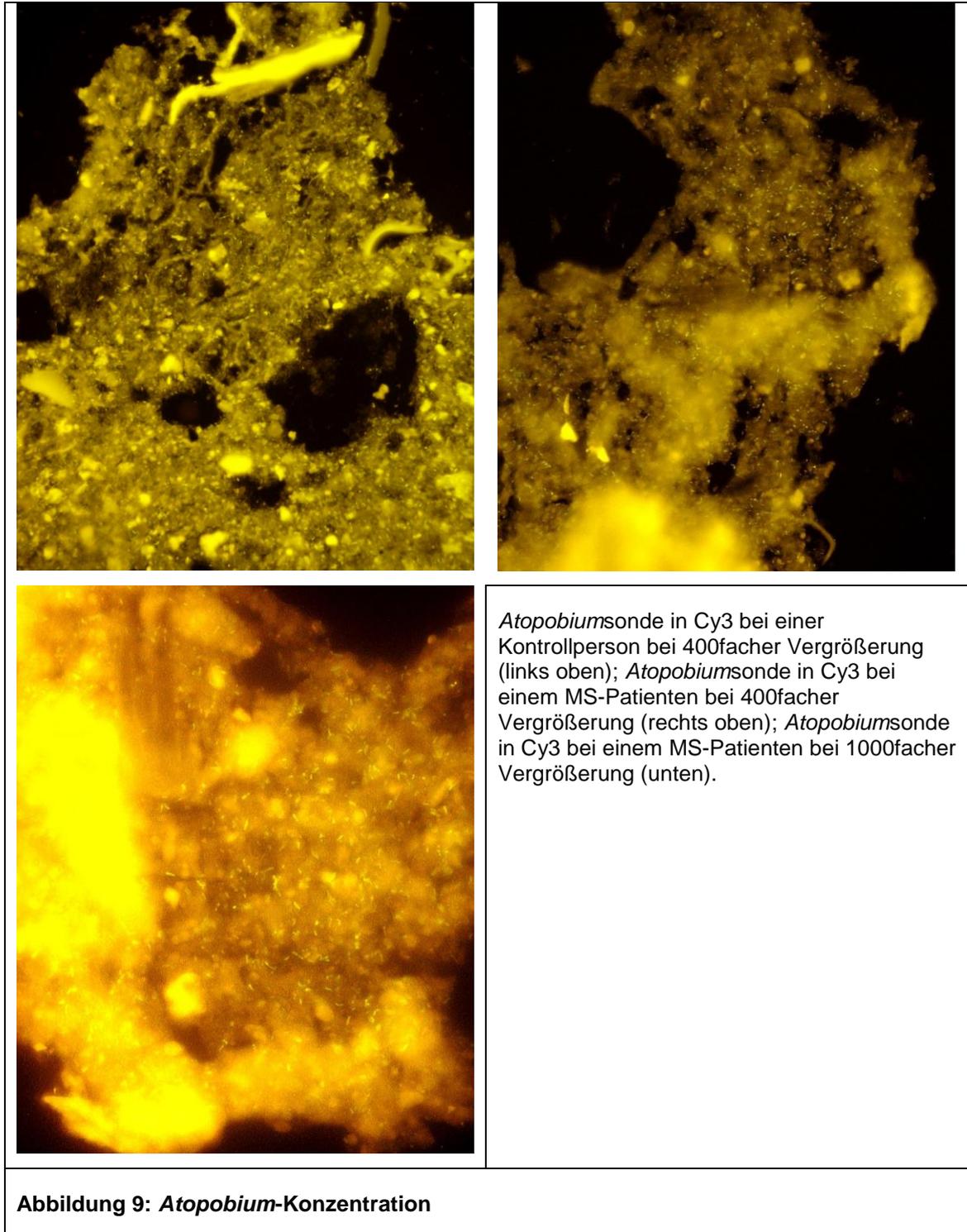


Abbildung 8: Leukozyten-Konzentration - Gruppen insgesamt

Atopobium

Atopobium ist ein Vertreter des *Actinobacteria*-Stammes. Typischerweise sind diese Bakterien diffus in den Stuhlproben verteilt (Abbildung 9).



Bei der Untersuchung der Konzentrationen von *Atopobium* fanden sich höhere Bakterienkonzentrationen in den Proben von MS-Patienten. In den Proben der Kontrollgruppe wurde eine durchschnittliche Konzentration von $1,82 \times 10^9$ Bakterien pro Milliliter (SD: $1,65 \times 10^9$ pro ml) gefunden. Die Proben der MS-Patienten enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $5,31 \times 10^9$ pro Milliliter (SD: $2,94 \times 10^9$). Beim Vergleich der MS-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergab sich ein p-Wert von 0,000. Ein hochsignifikanter Unterschied der Konzentrationen von *Atopobium* konnte somit nachgewiesen werden (Abbildung 10).

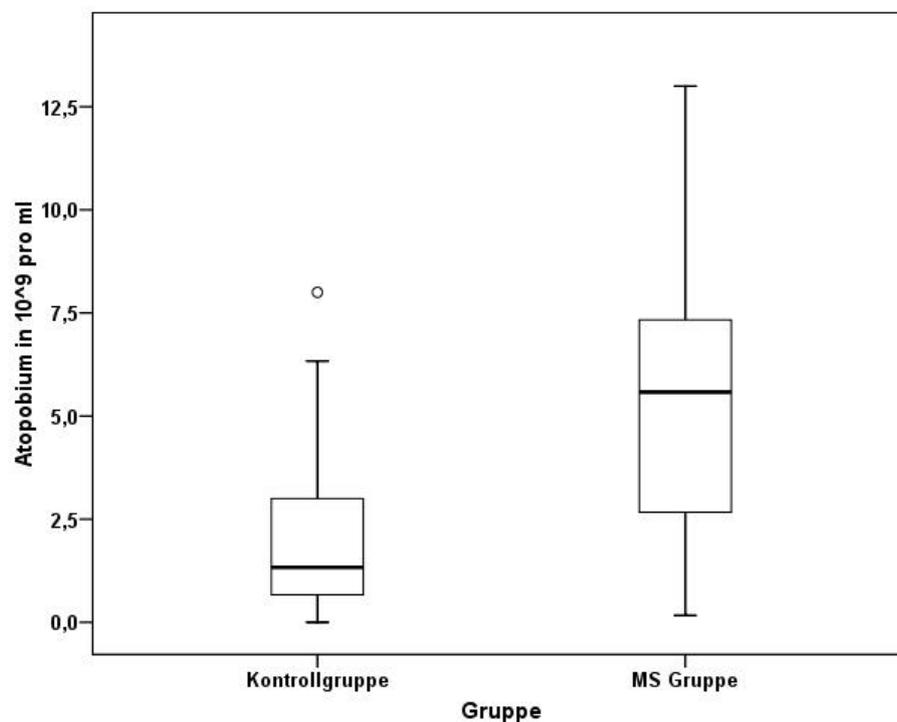
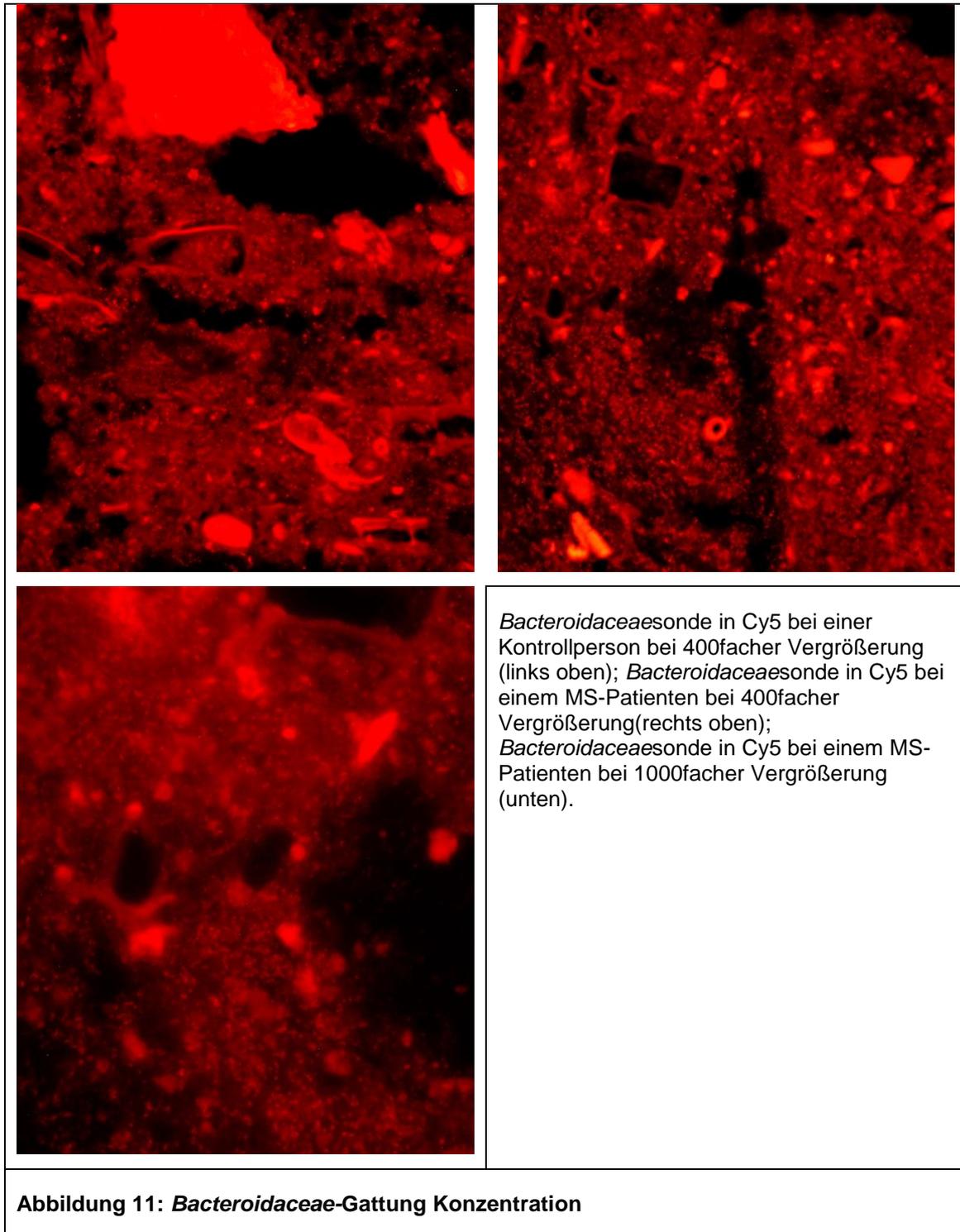


Abbildung 10: *Atopobium*-Konzentration - Gruppen insgesamt

Bacteroidaceae

Die *Bacteroidaceae*-Gattung ist eine der am häufigsten im Stuhl vorkommenden kommensalen Bakteriengruppen. Ähnlich wie *Atopobium* ein Vertreter der diffus im Stuhl auftretenden Bakterien (Abbildung 11).



Die statistische Auswertung der *Bacteroidaceae*-Gattung ergab eine niedrigere Bakterienkonzentration in den Proben von MS- Patienten. In den Proben der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Konzentration von $11,16 \times 10^9$ Bakterien pro Milliliter (SD: $3,87 \times 10^9$ pro ml). Die Proben der MS-Patienten enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $8,16 \times 10^9$ pro Milliliter (SD: $3,76 \times 10^9$ pro ml). Beim Vergleich der Gruppen ergab sich ein hochsignifikanter p-Wert von 0,000. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Konzentrationen der *Bacteroidaceae*-Gattung konnte somit nachgewiesen werden (Abbildung 12).

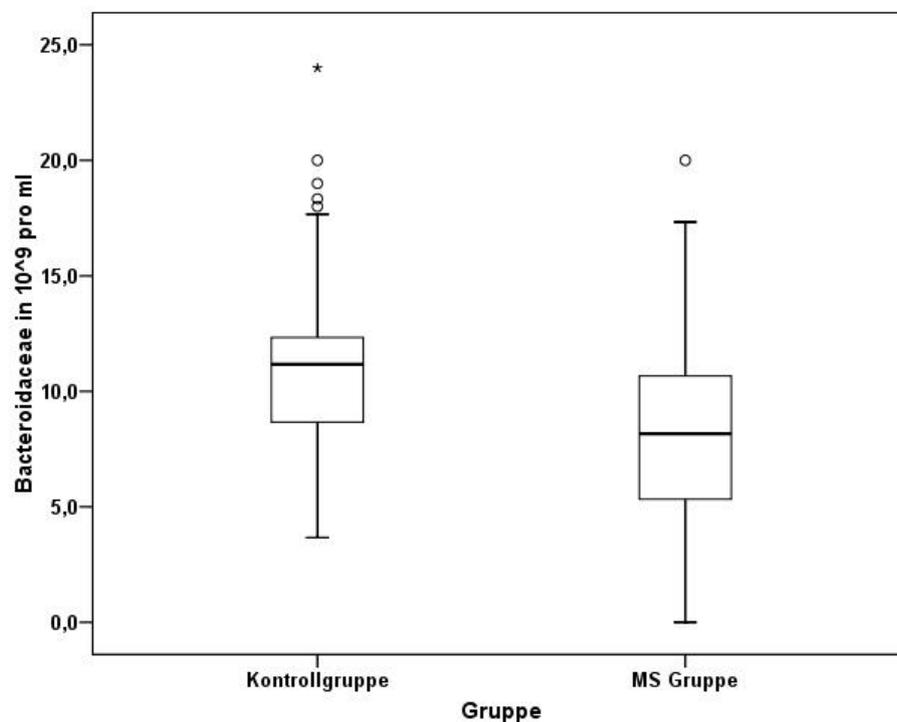
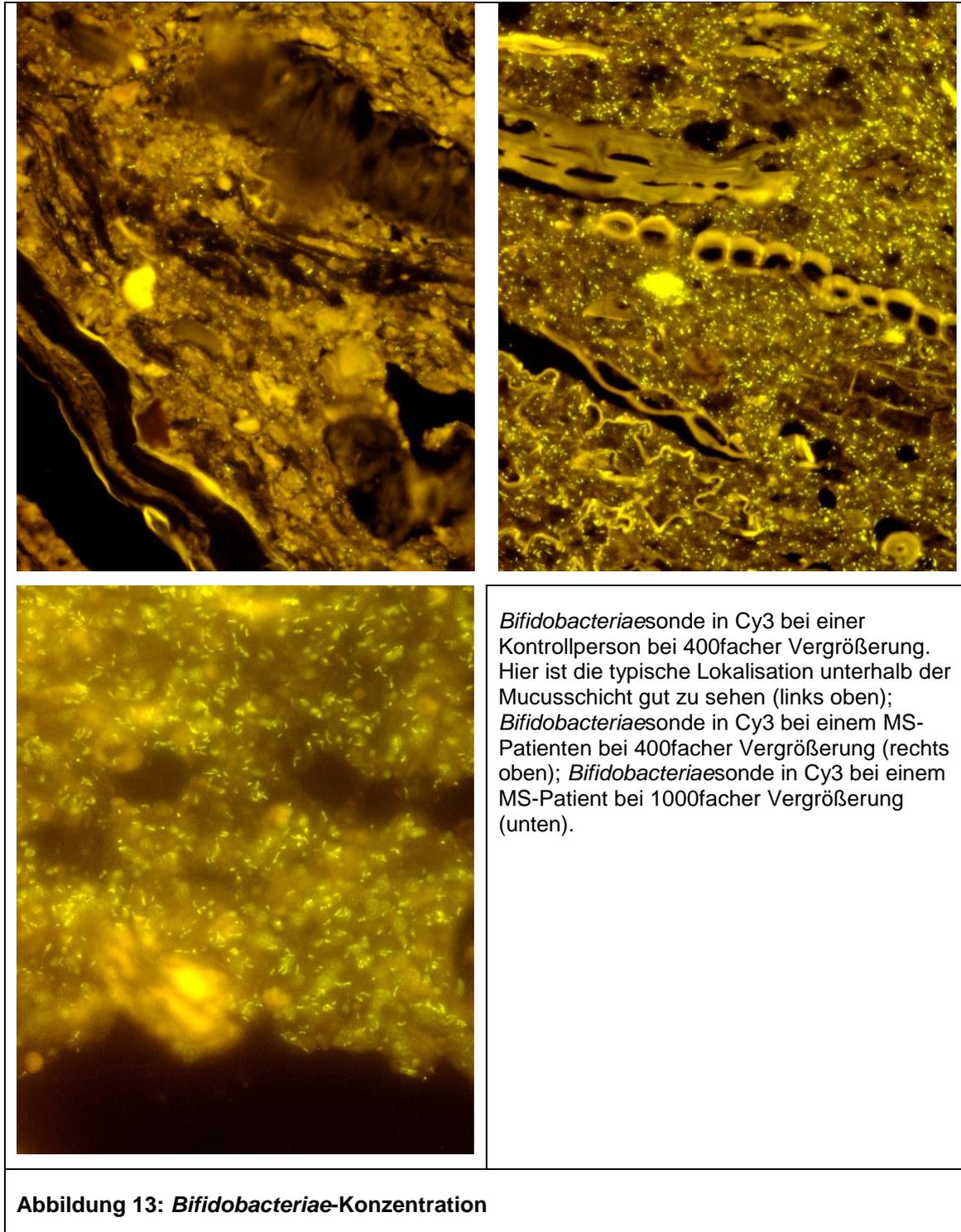


Abbildung 12: *Bacteroidaceae*-Konzentration - Gruppen insgesamt

Bifidobacteriae

Die *Bifidobacteriae* gehören ähnlich wie *Atopobium* zum *Actinobacteria*-Stamm. Sie sind am häufigsten in einer gewissen Entfernung von der Stuhloberfläche zu finden (Abbildung 13).



Bei der statistischen Analyse der Konzentrationen der *Bifidobacteriae* fanden sich höhere Bakterienkonzentrationen in den Proben von MS-Patienten. In den Proben

der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Konzentration von $1,09 \times 10^9$ Bakterien pro Milliliter (SD: $1,20 \times 10^9$ pro ml). Die Proben der MS-Patienten enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $5,26 \times 10^9$ pro Milliliter (SD: $3,76 \times 10^9$). Beim Vergleich der MS-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergab sich ein p-Wert von 0,000. Ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen konnte somit nachgewiesen werden (Abbildung 14).

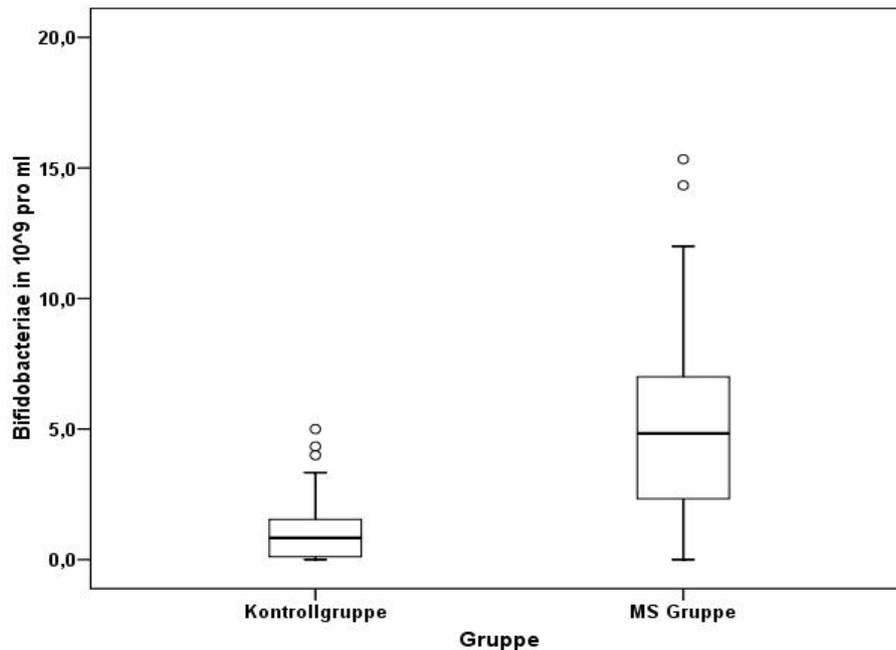
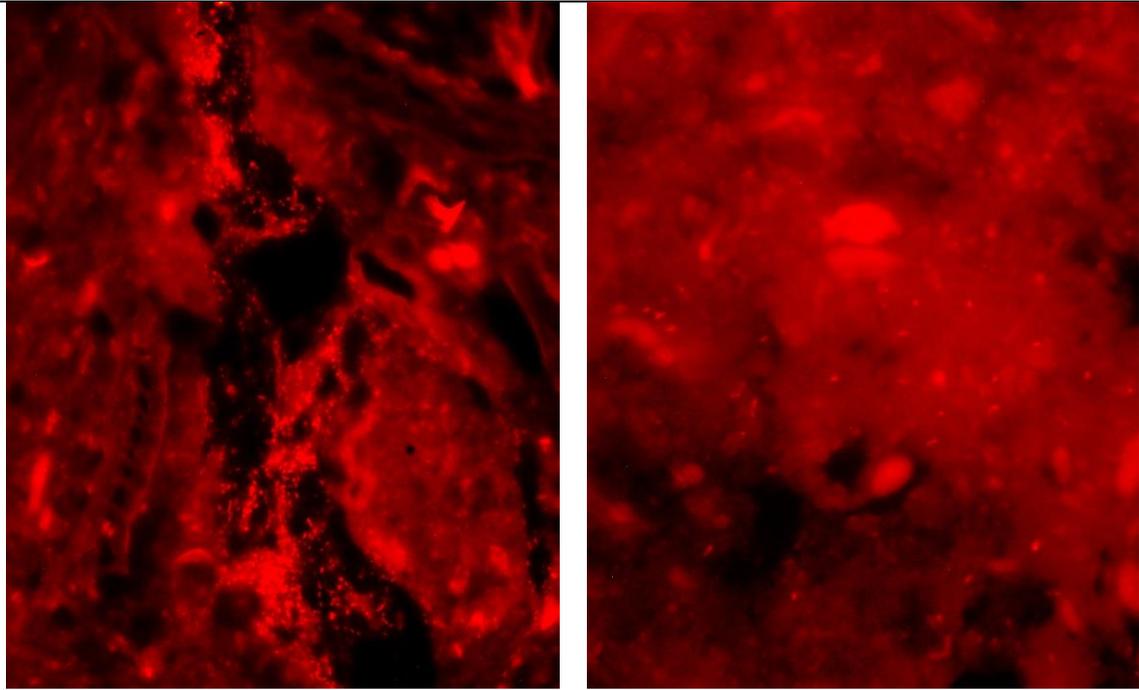


Abbildung 14: *Bifidobacteriae*-Konzentration - Gruppen insgesamt

Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae sind Vertreter des *Proteobacteria*-Stammes. Sie zeigten die geringsten Konzentrationen und waren vor allem an der Stuhloberfläche lokalisiert (Abbildung 15).

Bei der statistischen Auswertung der Konzentrationen von *Enterobacteriaceae* pro Milliliter Stuhl fanden sich höhere Bakterienkonzentrationen in den Proben von MS-Patienten, der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,100$). In den Proben der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Konzentration von $0,69 \times 10^9$ Bakterien pro Milliliter (SD: $1,42 \times 10^9$ pro ml). Die Proben der MS-Patienten enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $0,58 \times 10^9$ pro Milliliter (SD: $1,46 \times 10^9$).



*Enterobacteriaceae*sonde in Cy5 bei 400facher Vergrößerung (links); *Enterobacteriaceae*sonde in Cy5 bei 1000facher Vergrößerung. Hier sind die typisch oberflächennahen Lokalisationen sowie die insgesamt sehr spärlichen Signale zu sehen (rechts).

Abbildung 15: *Enterobacteriaceae*-Konzentration

Die Ergebnisse werden in der Abbildung 16 dargestellt.

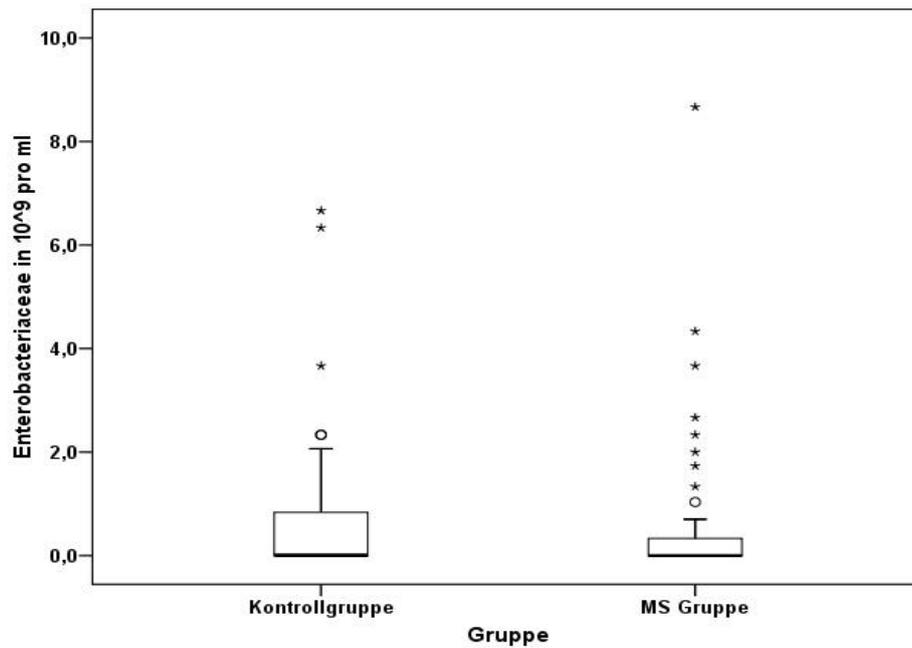
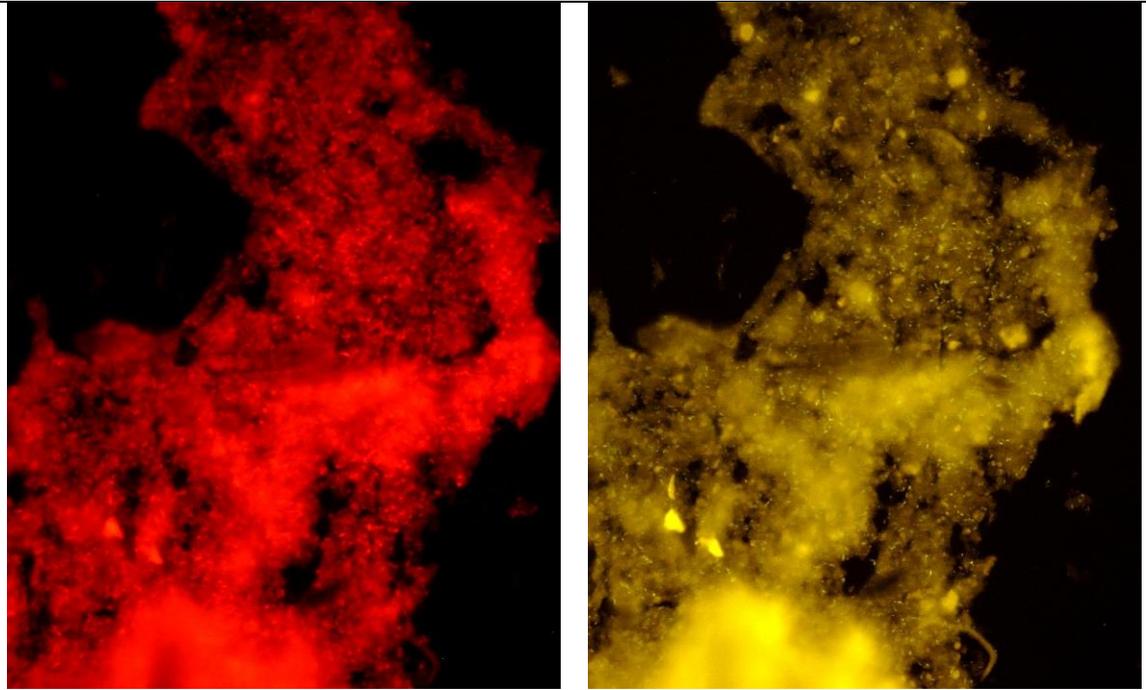


Abbildung 16: *Enterobacteriaceae*-Konzentration - Gruppen insgesamt

Eubacterium rectale

Eubacterium rectale, ein Vertreter des *Firmicutes*-Stammes, gehört zu den am häufigsten auftretenden, kommensalen Stuhlbakterien mit diffusem Verteilungsmuster (Abbildung 17).



Eubacterium rectale in Cy5 bei 400facher Vergrößerung mit einem diffusem Verteilungsmuster (links); zum Vergleich die gleiche Probe eines MS-Patienten mit *Atopobium*sonde in Cy3 (rechts) (s. auch Abb. 9 rechts oben).

Abbildung 17: *Eubacterium rectale*-Konzentration

Die Konzentrationen von *Eubacterium rectale* waren höher in den Proben von MS-Patienten, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,069$). In den Proben der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Konzentration von $8,83 \times 10^9$ Bakterien pro Milliliter (SD: $3,42 \times 10^9$ pro ml). Die Proben der MS-Patienten enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $10,15 \times 10^9$ pro Milliliter (SD: $3,74 \times 10^9$) (Abbildung 18).

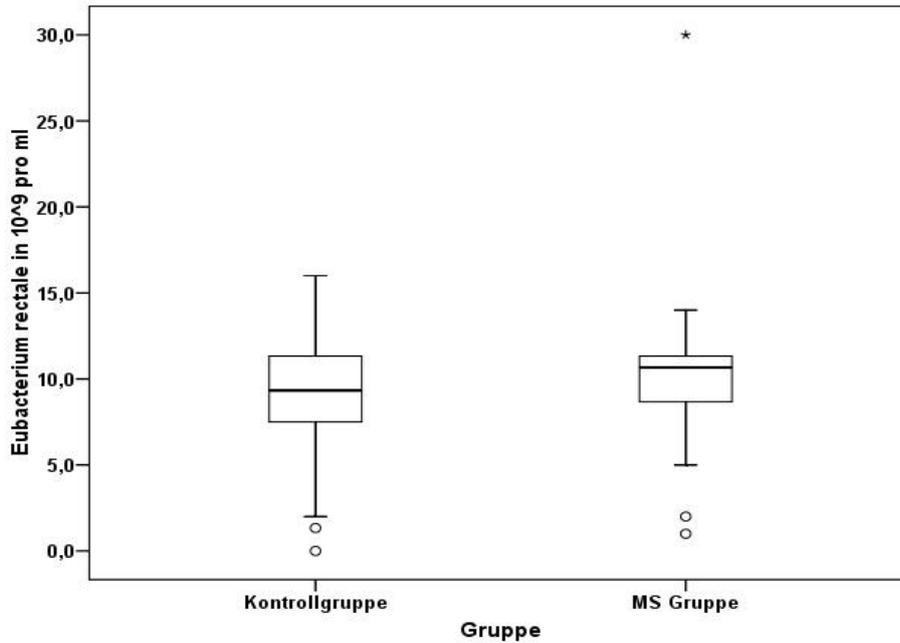
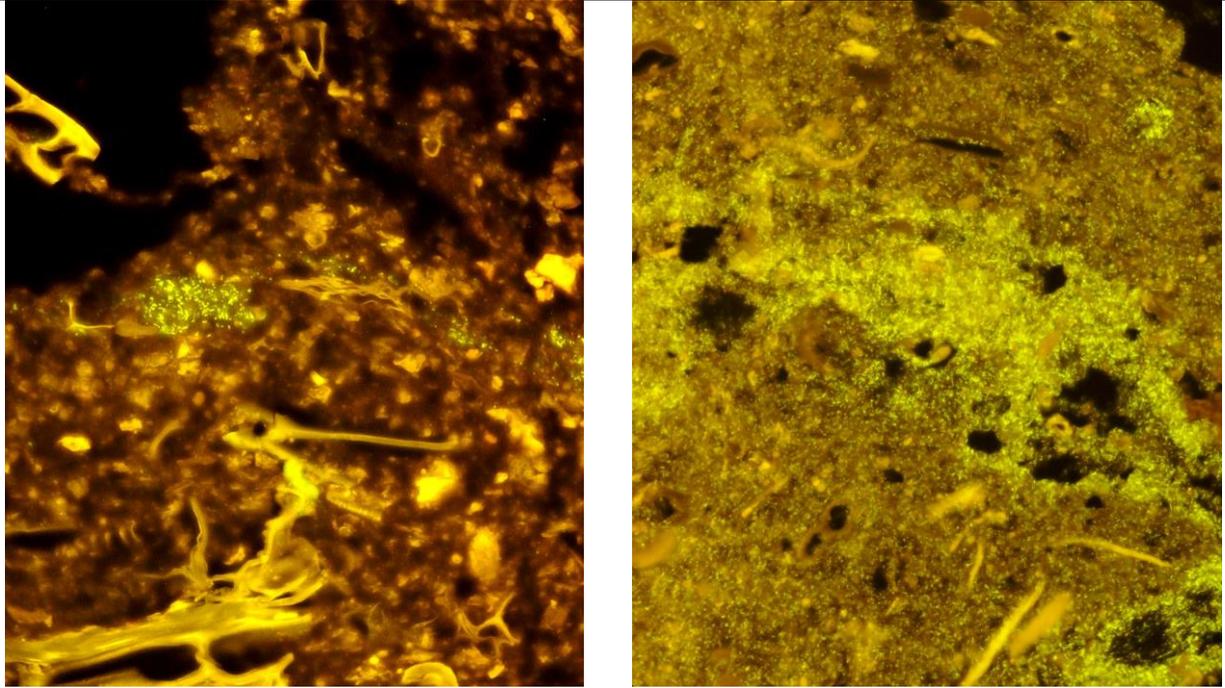


Abbildung 18: *Eubacterium rectale*-Konzentration - Gruppen insgesamt

Faecalibacterium prausnitzii

Faecalibacterium prausnitzii ist ein weiterer Vertreter des *Firmicutes*-Stammes. Die registrierten Signale waren sehr zahlreich bei typisch diffuser Verteilung innerhalb der Stuhlproben (Abbildung 19). Die Konzentrationen vom *Faecalibacterium prausnitzii* pro Milliliter Stuhl waren in den Proben der MS-Patienten niedriger, aber der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,572$). In den Proben der Kontrollgruppe fand sich eine durchschnittliche Konzentration von $9,90 \times 10^9$ Bakterien pro Milliliter (SD: $4,48 \times 10^9$ pro ml). Die Proben der MS-Patienten enthielten eine Konzentration von durchschnittlich $9,05 \times 10^9$ pro Milliliter (SD: $5,47 \times 10^9$).



Faecalibacterium prausnitzii - Sonde in Cy3 bei 400facher Vergrößerung von zwei unterschiedlichen MS-Patienten. Besonders rechts gut zu sehen, die für *Faecalibacterium prausnitzii* typische, diffuse Verteilung.

Abbildung 19: *Faecalibacterium prausnitzii*-Konzentration

Die Ergebnisse werden auch in der Abbildung 20 dargestellt.

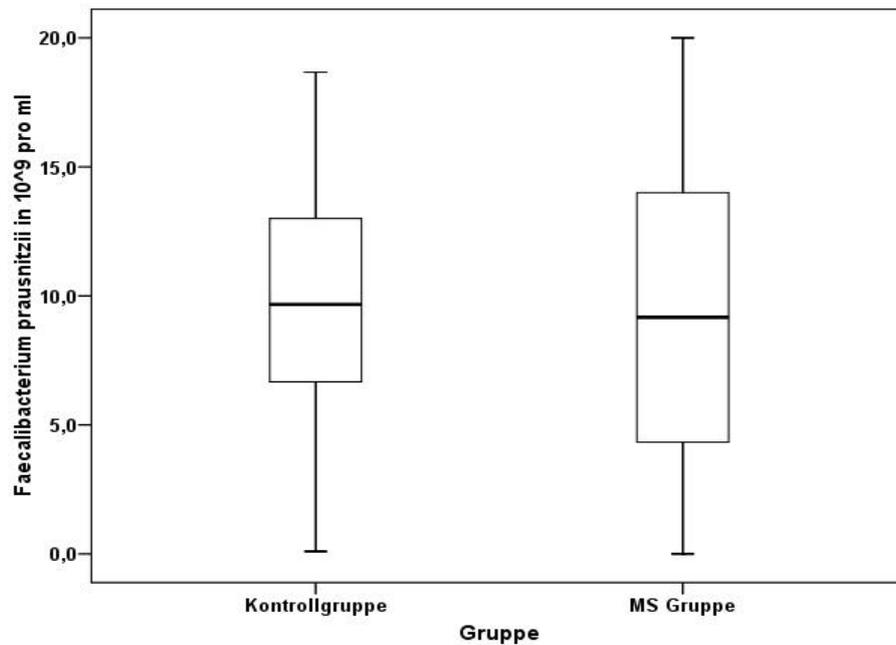


Abbildung 20: *Faecalibacterium prausnitzii*-Konzentration - Gruppen insgesamt

Die Zusammenstellung der statistischen Parameter der Konzentrationen von Bakterien und Leukozyten findet sich in der Tabelle 14.

Tabelle 14: Durchschnittliche Konzentration von Bakterien und Leukozyten bei MS-Patienten und Kontrollgruppe.

Parameter	MS-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert
	Mittelwert x 10 ⁹ /ml	SD 10 ⁹ /ml	x x 10 ⁹ /ml	SD 10 ⁹ /ml	
Leukozyten	0,47	2,43	0,93	2,59	0,022
<i>Atopobium</i>	5,31	2,94	1,82	1,65	0,000
<i>Bacteroidaceae</i>	8,16	3,76	11,16	3,87	0,000
<i>Bifidobacteriae</i>	5,26	3,76	1,09	1,20	0,000
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,58	1,46	0,69	1,42	0,100
<i>Eubacterium rectale</i>	10,15	3,74	8,83	3,42	0,069
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	9,05	5,47	9,90	4,48	0,572

Zusammenfassend konnten in den Stuhlproben von MS-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe statistisch relevant höhere Konzentrationen von *Atopobium* und den *Bifidobacteriae* und niedrigere Konzentrationen von *Bacteroidaceae* gefunden werden.

Geschlechtsgetrennte Auswertung

Bei der geschlechtlich getrennten Analyse der Konzentrationen von Bakterien zwischen der MS-Gruppe und der Kontrollgruppe zeigten sich weitere statistisch signifikante Unterschiede.

Frauen

Bei der Auswertung der Daten der Patientinnen und Probandinnen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Bakterienkonzentration pro Milliliter für *Atopobium* ($p=0,000$). Hier war die durchschnittliche Konzentration der MS-Gruppe ($5,54 \times 10^9$ pro ml, SD: $3,00 \times 10^9$ pro ml) höher als die durchschnittliche Konzentration in der Kontrollgruppe ($1,54 \times 10^9$ pro ml; SD: $1,41 \times 10^9$ pro ml). Die Ergebnisse zeigt auch die Abbildung 21.

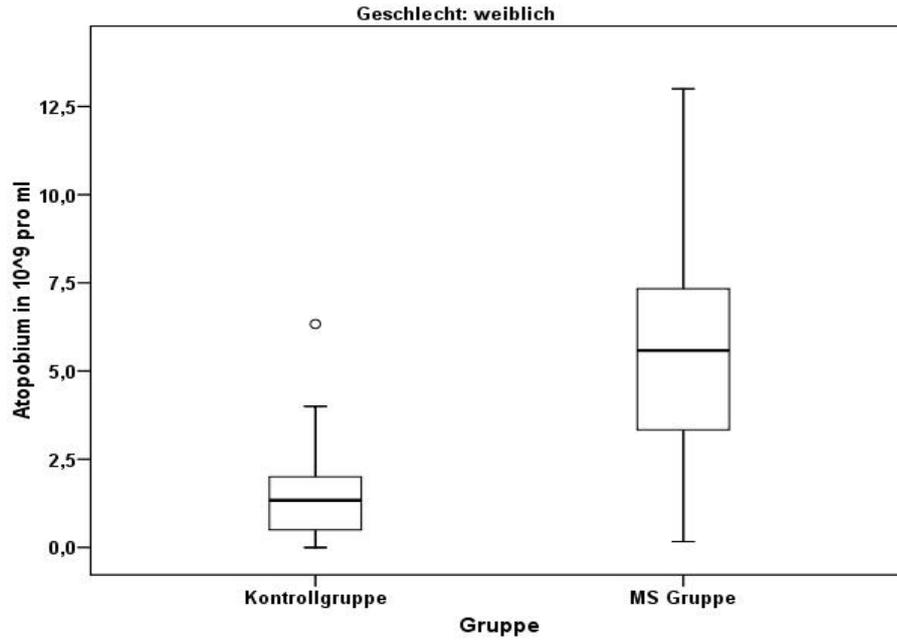


Abbildung 21: Atopobium-Konzentration bei Frauen

Ähnlich war die durchschnittliche Konzentration der *Bifidobacteriae* statistisch signifikant höher in der MS-Gruppe ($5,25 \times 10^9$ pro ml; SD: $3,88 \times 10^9$ pro ml) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($1,08 \times 10^9$ pro ml; SD: $1,12 \times 10^9$ pro ml). Die statistische Auswertung ergab einen hochsignifikanten Wert ($p=0,000$) (Abbildung 22).

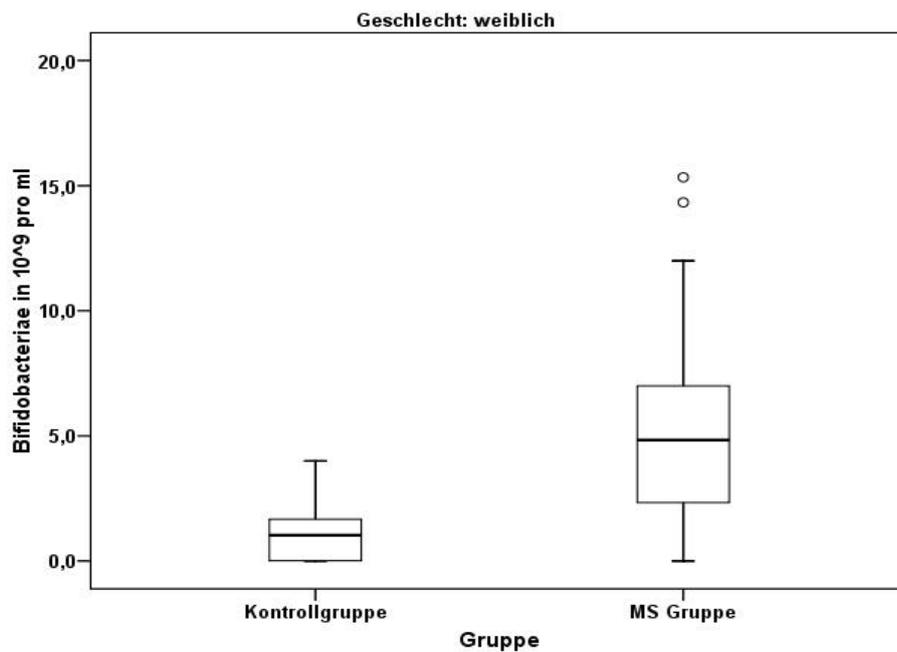


Abbildung 22: Bifidobacteriae-Konzentration bei Frauen

Die durchschnittliche Konzentration der *Bacteroidaceae* war ähnlich der Verteilung im gesamten Kollektiv, niedriger in der MS-Gruppe ($7,17 \times 10^9$ pro ml, SD: $2,98 \times 10^9$ pro ml) zum Vergleich mit der Kontrollgruppe ($10,96 \times 10^9$ pro ml, SD: $4,09 \times 10^9$ pro ml). In der statistischen Analyse erhielten wir einen p-Wert von $p=0,000$ (Abbildung 23).

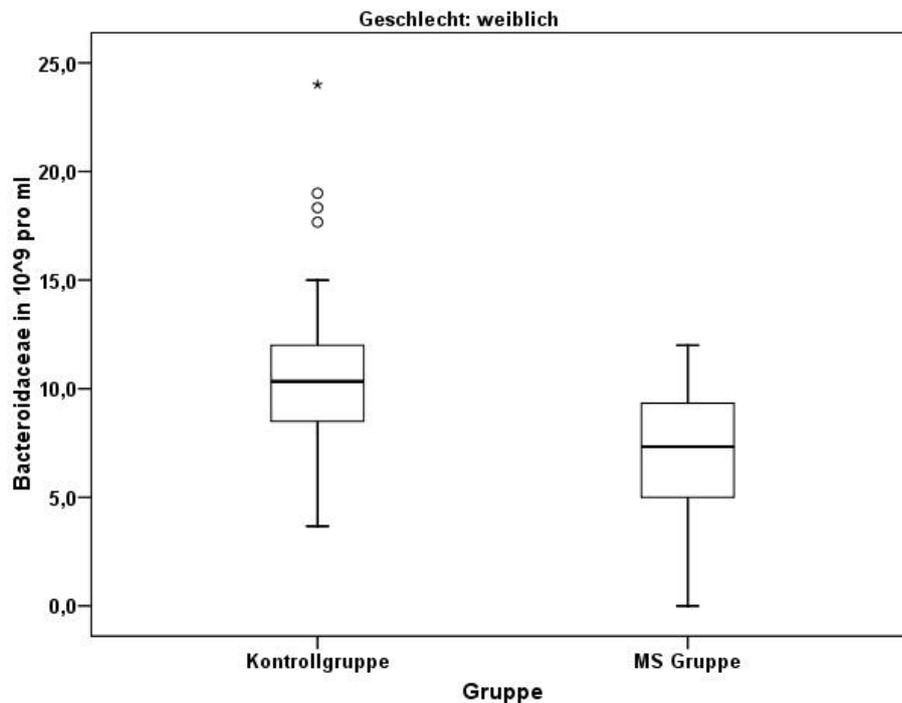


Abbildung 23: *Bacteroidaceae*-Konzentration bei Frauen

Bei den *Enterobacteriaceae*, dem *Eubacterium rectale* und den *Faecalibacteriae prausnitzii* konnten statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen der weiblichen MS- und der Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Die einzelnen Parameter der statistischen Auswertung bei Frauen finden sich zusammengefasst in der Tabelle 15.

Tabelle 15: Durchschnittliche Konzentration von Bakterien in der MS- und Kontroll-Gruppe Frauen.

Parameter	MS-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert	
	Mittelwert	SD	x	Mittelwert		SD
	x 10 ⁹ /ml	10 ⁹ /ml	x 10 ⁹ /ml	10 ⁹ /ml		
<i>Atopobium</i>	5,54	3,00	1,54	1,41	0,000	
<i>Bacteroidaceae</i>	7,17	2,98	10,96	4,09	0,000	
<i>Bifidobacteriae</i>	5,25	3,88	1,08	1,12	0,000	
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,36	0,90	0,68	1,29	0,115	
<i>Eubacterium rectale</i>	9,55	2,82	8,39	3,10	0,062	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	8,04	5,83	10,52	4,82	0,088	

Männer

Analysiert man nur die Proben der männlichen Patienten und Probanden in Bezug auf die Bakterienkonzentrationen im Stuhl, so finden sich in der MS-Gruppe statistisch signifikant höhere Bakterienkonzentrationen pro Milliliter für *Atopobium* ($p=0,011$) (Abbildung 24), *Bifidobacteriae* ($p=0,001$) (Abbildung 25) und für *Faecalibacterium prausnitzii* ($p=0,351$) (Abbildung 26).

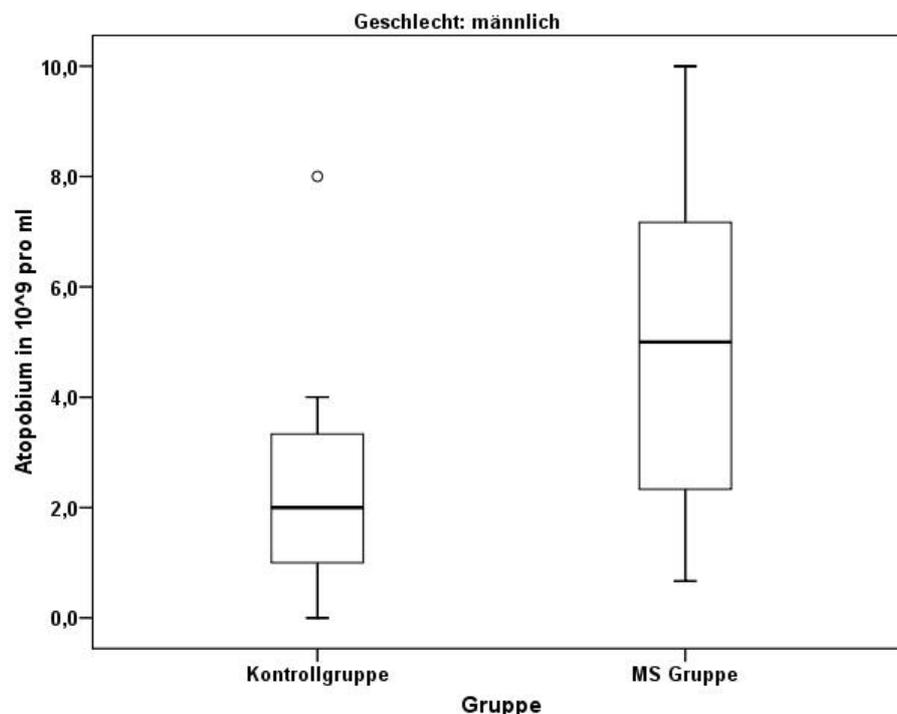


Abbildung 24: *Atopobium*-Konzentration bei Männern

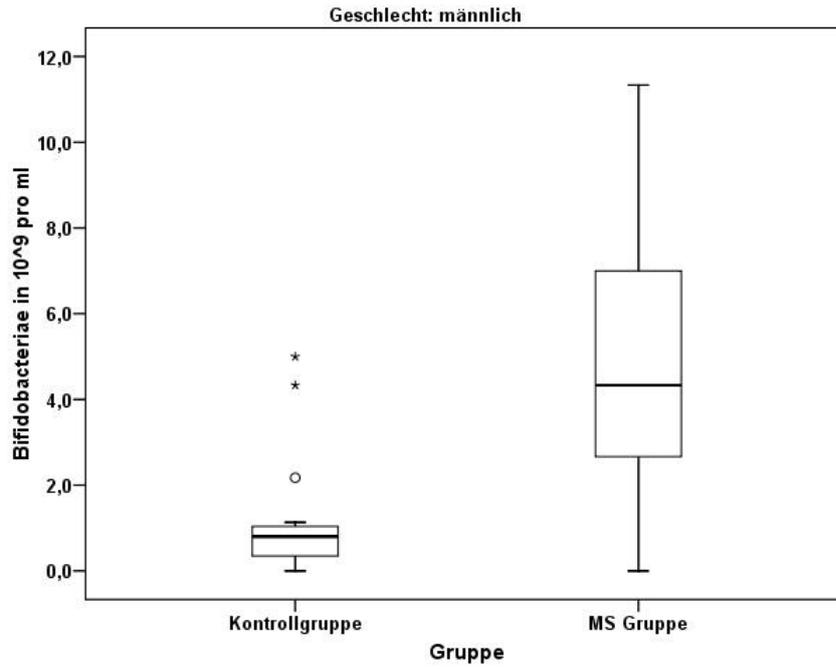


Abbildung 25: *Bifidobacteriae*-Konzentration bei Männern

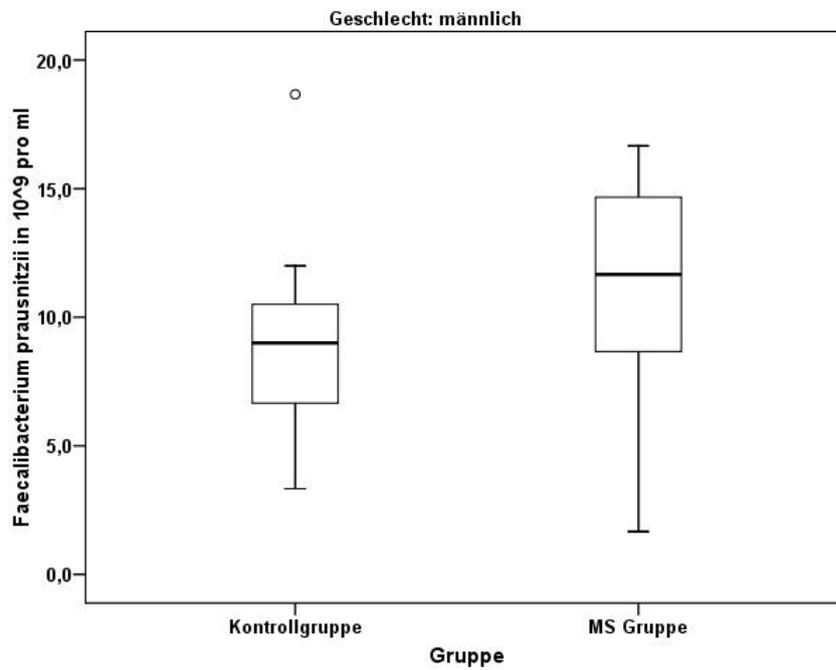


Abbildung 26: *Faecalibacterium prausnitzii*-Konzentration bei Männern

Die einzelnen Parameter der statistischen Auswertung bei Männern finden sich zusammengefasst in der Tabelle 16.

Tabelle 16: Durchschnittliche Konzentration von Bakterien in der MS- und Kontroll-Gruppe Männer.

Parameter	MS-Gruppe		Kontroll-Gruppe		p-Wert
	Mittelwert x 10 ⁹ /ml	SD x 10 ⁹ /ml	Mittelwert x 10 ⁹ /ml	SD x 10 ⁹ /ml	
<i>Atopobium</i>	4,81	2,90	2,33	1,93	0,011
<i>Bacteroidaceae</i>	10,35	3,83	11,51	3,50	0,160
<i>Bifidobacteriae</i>	4,96	3,45	1,11	1,35	0,001
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,99	2,12	0,70	1,64	0,595
<i>Eubacterium rectale</i>	11,33	4,92	9,36	3,90	0,618
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	11,16	4,13	8,76	3,59	0,035

Zusammenfassend werden die statistisch signifikanten Unterschiede im gesamten Kollektiv in der geschlechtlich getrennten Auswertung größtenteils widergespiegelt. Dies betrifft die höhere Konzentration von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* in der MS-Gruppe. Die niedrigere Konzentration von *Bacteroidaceae* in der MS-Gruppe wurde zwar bei beiden Geschlechtern reproduziert, war aber bei den Frauen stärker ausgeprägt als bei den Männern. Als einziges geschlechtsspezifisches Merkmal mit statistischer Signifikanz konnte bei den Männern eine erhöhte Konzentration von *Faecalibacterium prausnitzii* in der MS-Gruppe nachgewiesen werden.

3.4 Subgruppenanalyse

Die statistische Analyse der Konzentrationen der Bakterien sowie der Mucusschichtdicke wurde für MS-Patienten auch in weiteren Subgruppen durchgeführt. Hier konnten keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Stadt- und Landbewohnern festgestellt werden. Auch ein Schub im Rahmen der schubförmig-remittierenden MS führte zu keinen relevanten Unterschieden der untersuchten Parameter im Vergleich zu Patienten ohne Schubaktivität. Auch ergab die statistische Analyse zwischen der schubförmig-remittierenden und sekundär-progredienten sowie

primär-progredienten Form der MS keine signifikanten Unterschiede der Bakterien- und Leukozytenkonzentrationen sowie der Mucusschichtdicke.

In dem nächsten Schritt wurden auch therapeutische Aspekte bei MS-Patienten statistisch verglichen. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede für das Merkmal Methylprednisolon-Hochdosistherapie, Eskalationstherapie, Basistherapie festgestellt werden. Beim Vergleich der MS-Patienten in Abhängigkeit vom Behinderungsgrad wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt ($EDSS \leq 3,5$ und $EDSS \geq 4,0$). Auch hier zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezogen auf Bakterien- und Leukozyten-Konzentrationen sowie die Mucusschichtdicke.

Lediglich für die Dauer der Erkrankung wurden zwischen den einzelnen Gruppen statistisch relevante Unterschiede festgestellt. Die Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt, wobei als Marke der Symptombeginn vor oder nach dem Jahr 2003 ausgewählt wurde. Hier zeigte sich, dass bei einem Symptombeginn nach 2003 die durchschnittliche Konzentration von *Eubacterium rectale* ($10,3 \times 10^9$ pro ml; SD: $2,6 \times 10^9$ pro ml) signifikant höher war als bei einem Symptombeginn vor dem Jahr 2003 ($9,34 \times 10^9$ pro ml; SD: $2,55 \times 10^9$ pro ml). Der im U-Test berechnete p-Wert betrug $p=0,049$ (Abbildung 27).

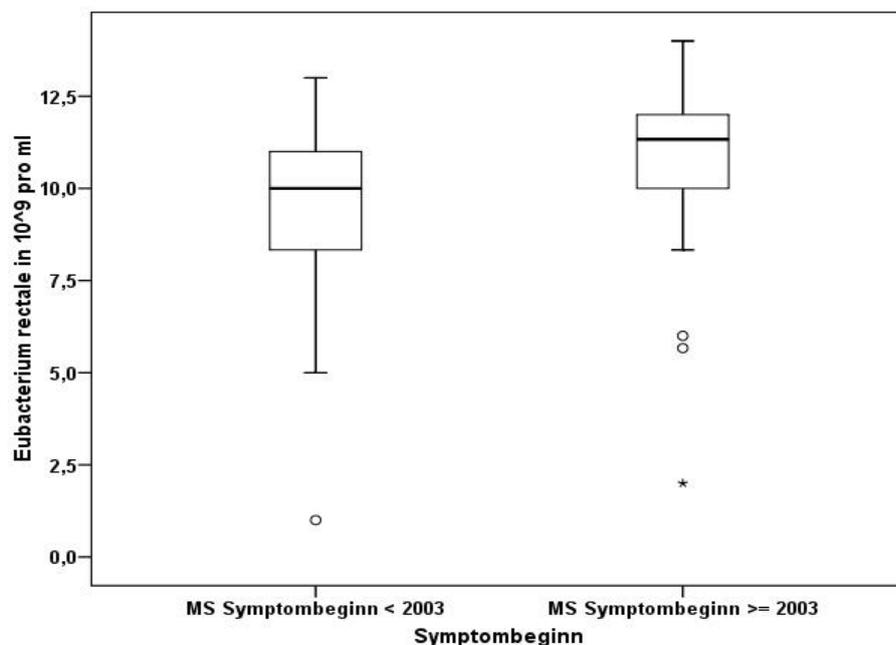


Abbildung 27: *Eubacterium rectale*-Konzentration in Abhängigkeit vom Symptombeginn

Bei der statistischen Auswertung der Konzentration der *Bifidobacteriae* zeigte sich wiederum, dass bei einem Symptombeginn vor 2003 die durchschnittliche Konzentration höher ($6,46 \times 10^9$ pro ml; SD: $3,76 \times 10^9$ pro ml) war als bei einem Symptombeginn nach 2003 ($3,80 \times 10^9$ pro ml; SD: $3,13 \times 10^9$ pro ml). Der im Mann-Whitney-U-Test berechnete p-Wert betrug hier $p=0,011$ (Abbildung 28).

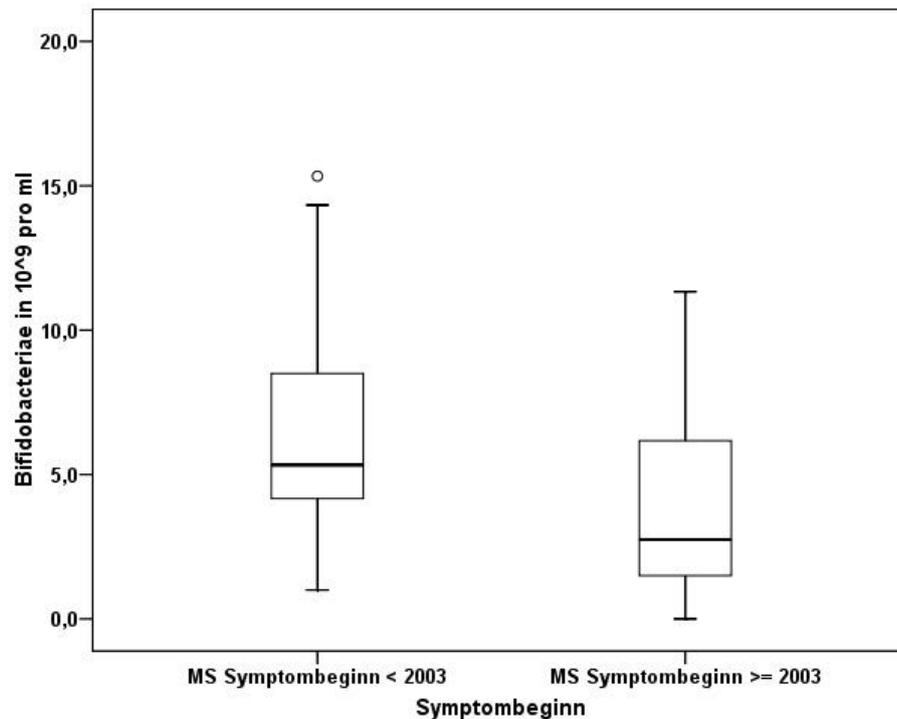


Abbildung 28: *Bifidobacteriae*-Konzentration in Abhängigkeit vom Symptombeginn

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine längere Krankheitsdauer (Beginn vor 2003) mit signifikant höheren Konzentrationen von *Bifidobacteriae* im Stuhl verbunden war. Die kürzere Krankheitsdauer (Beginn nach 2003) ging dagegen mit signifikant höheren Konzentrationen vom *Eubacterium rectale* einher.

4. Diskussion

4.1 Hintergründe und Stand der Wissenschaft

Die genetischen Daten zeigen einerseits, dass das Genom der bedeutendste Risikofaktor für die MS-Entstehung ist (145), (147), (146) und andererseits, dass weitere Umweltfaktoren an diesem Prozess beteiligt sein müssen (149), (150) und zwar solche, die sehr früh in der Entwicklung und wahrscheinlich durch die Mutter ihre Wirkung entfalten. Die steigende Inzidenz und Prävalenz der MS in den letzten hundert Jahren verbunden mit dem gleichzeitigen Verwischen des Breitengradgradienten (183), (9), (184), (182) lassen nach einem Umweltfaktor suchen, welcher in den letzten hundert Jahren ebenso eine Veränderung durchmachte und zwar weltweit. Ausgehend von der Hygiene-Hypothese (186) und der Beobachtung von Leibowitz über die steigende MS-Prävalenz bei verbessertem Hygiene-Niveau (185) gelangten im letzten Jahrzehnt die kommensalen Darmbakterien bei der Autoimmunität in den Fokus der Wissenschaft.

4.1.1 Das mukosale Immunsystem und die Autoimmunität

Die chronisch-entzündlichen Erkrankungen (Allergien, entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes mellitus Typ1, Multiple Sklerose), die in Europa seit Mitte des neunzehnten Jahrhunderts deutlich zunehmen, zeigen in ihrer Pathogenese Hinweise auf eine gestörte Immunregulation z. B. auf der Ebene von Treg (234), (84), (235). Bei dem vorgeschlagenen Mechanismus wird angenommen, dass eine veränderte Exposition gegenüber einer einzelnen Art von Kommensalen in der Kindheit die Entwicklung einer proinflammatorischen zellulären Th1-Immunantwort und anschließend eines hohen Autoimmunität-Risikos begünstigt, während die Exposition gegenüber mehreren Arten von Kommensalen in der Kindheit die Immunantwort in Richtung Th2 und Treg moduliert, was zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber autoimmunen Erkrankungen führt. Zu berücksichtigen ist hier die spezifische Rolle des mukosalen Immunsystems, welches den größten Teil der Immungewebe im Körper bildet, dreiviertel aller Lymphozyten beinhaltet und den größten Teil der Immunglobuline produziert (236). Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass sich die Interaktionen zwischen den spezialisierten Zellen des mukosalen Immunsystems und den kommensalen Mikroorganismen auf vielen Ebenen abspielen. Dabei wird immer

klarer, dass diese Vorgänge nicht auf dem Zufallsprinzip basieren, sondern wahrscheinlich geprägten Mustern folgen, welche durch die gemeinsame Evolution entstanden sind (192), (191). Die Hauptaufgabe des mukosalen Immunsystems besteht darin, das dynamische Gleichgewicht zwischen der Toleranz auf kommensale Antigene und der effektiven Immunantwort auf Pathogene aufrechtzuerhalten. Dies wird unter anderem durch spezifische Eigenschaften der hier ansässigen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (237), (238), Makrophagen (212) und der besonderen Rolle der Treg (78), (79), (80) realisiert. Lathrop et al. konnten zuletzt zeigen, dass das TCR-Repertoire dieser darmansässigen Immunzellen von den Darmbakterien abgeleitet wird (213). Das Fehlen von suppressiven Eigenschaften dieser Zellen führt zu einer Th1- und Th17-Antwort auf die kommensalen Antigene und damit zu einem Zusammenbruch der Toleranz (214). Interessanterweise werden die menschlichen Treg innerhalb der ersten 18 Monate des Lebens im Darm durch Kontakt mit der kommensalen Flora stimuliert und in sogenannte Gedächtnis-Treg umgewandelt. Erst danach wechselt der Homing-Rezeptor vom Darm auf eine extraintestinale Lokalisation (239), damit würden auch extraintestinale Wirkungsgebiete dieser kommensal-spezifischen Zellen oder auch die Konsequenzen ihrer fehlenden Funktionen bei gestörter Entwicklung im Bereich des mukosalen Immunsystems denkbar.

4.1.2 Die Darmflora und die Entwicklung des Immunsystems

Studien mit keimfreien Tieren, welche in sterilen Bedingungen geboren und aufgewachsen sind, zeigen, dass die frühe Exposition gegenüber pathogenen und nicht-pathogenen Mikroben für die Entwicklung des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe notwendig ist. Keimfreie Mäuse haben wenige Keimzentren und schlecht ausgebildete T- und B-Zell-Zonen, hypoplastische Peyer-Plaques, niedrigere Zahlen der CD4⁺ Zellen in der Lamina propria und IgA-produzierende Plasmazellen (240). Darüber hinaus zeigen sie eine 5 - bis 10-fach reduzierte IL-10- und Foxp3 mRNA - Expression im Vergleich mit normalen Mäusen (241). Der Einfluss der Darmflora erstreckt sich auch auf das extraintestinale Immunsystem. Keimfreie Tiere zeigen reduzierte Populationen von Milz-CD4⁺, weniger und kleinere Keimzentren in der Milz sowie reduzierte Zahlen von Plasmazellen und niedrigere IgG-Spiegel (242), (243), (244). Diese Beispiele zeigen, dass Veränderungen des Immunsystemprofils mindestens teilweise durch Veränderungen in der Mikroflora angetrieben werden können. Die Mikroflora besitzt die

Fähigkeit die angeborene und erworbene Immunantwort zu modulieren. Daher könnte der Verlust oder die Änderung von bestimmten mikrobiellen Gemeinschaften möglicherweise zu einer Änderung des Immunprofils und dessen Funktion zumindest in bestimmten Teilen des Immunsystems führen (245). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bakterienstämme Veränderungen von Bestandteilen des Immunsystems verursachen. *Bifidobacterium* (*Actinobacteria*) (246) und *Lactobacillus* (*Firmicutes*) (247) führten zur verstärkten Expression der Treg und IL-10 im mesenterialen Immunsystem bei Mäusen (248). *Faecalibacterium prausnitzii* (*Firmicutes*), ein Bakterium mit inzwischen etablierter Bedeutung bei den entzündlichen Darmerkrankungen, führte in peripheren mononukleären Zellen zu deutlich geringerer IL-12 und IFN- γ Produktion und höherer Sekretion von IL-10 (249). Die Exposition bestimmter bakterieller Antigene von segmentierten Fadenbakterien *Candidatus arthromitus* (*Firmicutes*) führte dagegen zum Anstieg von Th17 in der Lamina propria. Es wird angenommen, dass *Candidatus arthromitus* eine wichtige Rolle bei der Reifung des adaptiven mukosalen Immunsystems im Darm spielt. Andererseits führte der fehlende Einfluss von bakteriellen Antigenen von *Flavobacter* (*Bacteroidetes*) nicht nur zur Reduktion der Th17-Zellen, sondern auch zur Erhöhung von Treg in der Lamina propria (250).

Auch in humanen Studien finden sich inzwischen Hinweise für einen Einfluss der Darmflora auf die Eigenschaften des Immunsystems. So konnte z. B. eine negative Korrelation zwischen der Ebene der *Bifidobacterium*-Spezies in den Stuhlproben und dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α beobachtet werden. Das Vorkommen von *Bifidobacterium longum* und *Bifidobacterium animalis* korrelierte mit reduzierten IL10-Spiegeln und von *Bifidobacterium breve* mit erhöhten TGF- β -Spiegeln (251). Die immer klarer werdende Bedeutung der kommensalen Darmflora für die Gesundheit des Menschen und deren inzwischen bewiesene Einflüsse auf das Immunsystem suggerieren, dass die Dysbiose, also das Ungleichgewicht zwischen den einzelnen Bakteriengruppen, zumindest die Pathogenese oder sogar die Ätiologie von Autoimmunerkrankungen betreffen kann.

4.2 Material und Methode

4.2.1 Patientenauswahl

In der vorliegenden Studie waren die Kollektive aufgrund der Verfügbarkeit von Proben und Patienten nicht nach Alter und Geschlecht gematcht um sichere Ergebnisse zu erzielen. Die beiden Gruppen zeigten sich zwar identisch was die Geschlechtsverteilung angeht, waren aber in der Altersstruktur signifikant unterschiedlich (durchschnittliches Alter der Kontrollgruppe um ca. 12 Jahre höher). Der Einfluss des Alters auf die Zusammensetzung der Darmflora wird im weiteren Teil der Arbeit noch ausführlich diskutiert. Im Allgemeinen erlaubt die gegenwärtige Studienlage die Annahme, dass der Altersunterschied von lediglich 12 Jahren bei Erwachsenen eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse in beiden Gruppen legitimiert. In folgenden Untersuchungen sollte jedoch ein Matching erfolgen, um eine noch bessere Vergleichbarkeit der Kollektive und eine höhere Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen. Desweiteren haben wir uns in dieser Untersuchung für Patienten aus der Poliklinik und nicht für Gesunde als Kontrollgruppe entschieden, um vergleichbare Populationen in Bezug auf die Medikation und die chronischen Erkrankungen zu gewinnen.

4.2.2 Verwendete Proben

Stuhlproben, welche als Stanze entnommen wurden, haben im Vergleich zu Biopsien den Vorteil, dass hier nicht nur die bakterielle Besiedlung an der Schleimhaut des Darmes, also am Ort des Immungeschehens, beurteilt werden kann, sondern auch in den benachbarten Kompartimenten des Darmtraktes. Mehrere Studien haben die Aussagekraft der Stuhlprobendiagnostik mittels FISH bei verschiedensten Krankheiten bestätigt (201), (203), (206), (221).

4.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Kulturen waren in der Vergangenheit der Goldstandard zur Identifizierung von Bakterien besonders im Blut, Urin oder bei Pleuraergüssen. Die Empfindlichkeit der Kultur ist hoch für die meisten Stämme. Unter optimalen Bedingungen können sogar einzelne Bakterien detektiert werden. Jedoch in einer komplexen Bakterienpopulation wie in den Stuhlproben, überwuchern schnell wachsende Bakterien die Kulturplatte, so dass die

Quantifizierung und Identifizierung von langsam wachsenden Bakterien unmöglich ist. Selektive Medien können helfen dieses Problem zu überwinden, aber nur bei bekannten Arten. Da ein großer Teil der ansässigen Flora bei Erwachsenen bisher nicht identifiziert werden konnte, ist es nicht möglich, Bedingungen zu schaffen, nach denen alle oder mindestens die Mehrheit der Darmbakterien gleichzeitig ausgewertet werden können. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich bei den kulturabhängigen Methoden aus der sehr hohen Konzentration von Darmbakterien.

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung hat den Vorteil, dass sie sowohl eine Aussage über die Konzentration von Bakterien, als auch über ihre räumliche Verteilung liefern kann. Gegenüber konventionellen Färbemethoden gelingt mit FISH eine Bakterienidentifikation auf Speziesebene, wodurch eine deutlich exaktere Aussage über die vorhandenen Spezies und deren Konzentration möglich ist. Auf der anderen Seite gibt FISH im Gegensatz zu PCR- und Kulturtechniken Aufschluss über die räumliche Beziehung der Bakterien zueinander.

Trotz der Möglichkeiten der beschriebenen Methoden gab es in letzter Zeit einige Entwicklungen, die die Möglichkeiten von FISH noch deutlich erweitern könnten. Die verwendete Methodik, die Standard-rRNA-FISH, verlangte, dass drei verschiedene Objektträger verwendet werden, um sechs verschiedene Bakteriengruppen zu analysieren. Diese Herangehensweise hatte den Nachteil, dass die verschiedenen Bakterienspezies nicht auf ihre räumliche Verteilung zueinander untersucht werden konnten. Um diese Untersuchung zu ermöglichen, könnte man in Folgestudien den Ansatz der combined labeling and spectral imaging - fluorescence in situ hybridization (CLASI-FISH) anwenden. Hierbei werden 8 verschiedenen Fluorochrome eingesetzt, wodurch allerdings der Einsatz eines konfokalen Lasermikroskops unerlässlich wird (252).

Durch CLASI-FISH würde dann die gleichzeitige Analyse von bis zu 28 verschiedenen Spezies ermöglicht. Auf diese Art und Weise könnte auch die Anzahl der untersuchten Bakterien deutlich erhöht werden. Allerdings ist dieser Ansatz noch unzureichend validiert, sodass dieser erst in Zukunft eine Alternative zur jetzigen Methodik darstellt. Die Standard-rRNA-FISH hat zudem den Nachteil, dass Bakterien nur markiert

werden, wenn sie eine gewisse Anzahl an Ribosomen enthalten, also stoffwechselaktiv sind. Um die Leuchtkraft und somit die Sensitivität der Sonden zu erhöhen, hätten auch doppelt gelabelte Sonden verwendet werden können. Diese sind sowohl am 3'-Ende, als auch am 5'-Ende mit einem Fluorochrom markiert, wodurch die zum Nachweis benötigte Ribosomenanzahl in den Bakterien deutlich reduziert wird (253). Diese Sonden waren zum Zeitpunkt der Studie leider noch nicht verfügbar.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Leukozyten und Mucusschicht

In der vorliegenden Arbeit traten die Leukozyten bei der Kontrollgruppe in den Stuhlproben statistisch signifikant häufiger und in höheren Konzentrationen auf (Kontrollgruppe $0,93 \times 10^5$ pro ml, MS-Gruppe $0,47 \times 10^5$ pro ml). Bei Darmerkrankungen dient die Anwesenheit von Leukozyten in den Stuhlproben als Indikator einer Immunantwort. Diese kann als Ausdruck einer physiologischen Abwehr gegen Pathogene sowie Reparaturmechanismen wie zum Beispiel bei Durchfallerkrankungen, Pankreatitis, Leberzirrhose, Refluxkrankheiten oder als Zeichen einer fehlgesteuerten Autoimmunreaktion wie bei entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) gesehen werden, wo die dysregulierte Rekrutierung von Leukozyten in die Darmwand ein charakteristisches Merkmal der Erkrankung ist (254). Bei Personen ohne entzündliche Darmerkrankungen sind die Leukozyten nur sehr selten und in niedrigen Zahlen in den Stuhlproben nachweisbar, wogegen z. B. bei der Colitis ulcerosa häufig Werte von 100×10^5 pro ml erreicht werden (206). Das gehäufte Vorkommen von Leukozyten und deren höhere Konzentration bei unseren aus einer internistischen Spezialambulanz und nicht aus einem Gesunden-Kollektiv rekrutierten Probanden spiegelt wahrscheinlich im Einklang mit den erwähnten Daten eine unspezifische Immunantwort im Bereich der Darmwand bei dieser Gruppe wieder.

Bei den MS-Patienten kommt der Mucus signifikant häufiger als bei der Kontrollgruppe (84,9% vs. 68,5%) vor. Zudem waren die beobachteten Mucusschichten bei den MS-Patienten signifikant dicker als in der Kontrollgruppe ($41,87 \mu\text{m}$ vs. $25,15 \mu\text{m}$). Bei Gesunden ist üblicherweise die in den Stuhlproben beobachtete Mucusschicht moderat ausgeprägt und erreicht eine Dicke von ca. $27 \mu\text{m}$. Sie wird bei Durchfallerkrankung

signifikant dicker (156 μm) (202), und dünner bei chronisch entzündlichen Darmerkrankung, besonders bei der Colitis ulcerosa (8,2 μm) (206). Die erhöhte intestinale Permeabilität bei CED-Patienten und deren Angehörigen weist auf die Bedeutung einer intakten Funktion der Darmbarriere in der Ätiologie der entzündlichen Darmerkrankungen hin (255), (256). Manche Autoren vermuten, dass eine umweltbedingte Störung der Deaktivierung von Proteasen im Magen-Darm-Trakt zu einem überproportionalen Abbau der Mucusschicht führen und damit die Exposition gegen bestimmte Kommensale erleichtern könnte, was wiederum zu einer chronischen Aktivierung des Immunsystems führen würde (257). Die Anzahl von Mucus-sezernierenden Becherzellen ist bekanntermaßen bei CED – Patienten reduziert (258). Die Reduktion der Dicke der Mucusschicht führt zum Eindringen der Bakterien in die Epithelzellen und zum Auslösen einer Kolitis (259). Zusätzlich kann die gestörte Expression von Mucin–Genen bei CED Patienten die Integrität der Darmbarriere beeinflussen (260). Mäuse, bei denen das Gen für MUC2, eine wichtige Mucin - Komponente gelöscht wurde, entwickeln Darmentzündungen (261). Andererseits scheint die Expression der einzelnen Mucin-Gene von bestimmten Bakterienarten abhängig zu sein (262). Damit wäre die Funktion der Darmbarriere nicht nur von den Umweltfaktoren oder der genetischen Prädisposition sondern auch von der Art der bakteriellen Besiedlung abhängig. Diese These wird auch durch Beobachtung unterstützt, dass keimfreie Mäuse nur eine sehr dünne Mucusschicht besitzen, welche unter dem Einfluss von bakteriellen Lipopolysacchariden und Peptidoglycanen schnell eine physiologische Breite erreicht (263). Interessanterweise sind mehrere kommensale Bakterien der *Lactobacilli*-und *Bacteroidetes* – Gruppe im Gegensatz zu pathogenen Bakterien nicht in der Lage Mucus-verdauende Proteasen zu synthetisieren (264) und sind in einem intakten Darm für die funktionale Stabilität der Mucusbarriere verantwortlich. Die größere Dicke der Mucusschicht bei MS-Patienten im Vergleich mit unseren Probanden spricht nicht für eine CED-ähnliche Störung der Darmbarriere bei der MS. Ob diese Eigenschaft eine pathophysiologische Bedeutung besitzt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4.3.2 Biostruktur der fäkalen Flora bei der Multiplen Sklerose

Die menschliche Darmflora ist in Bezug auf die Stammebene erstaunlich einfach strukturiert. Mehr als 90% aller bakteriellen phylogenetischen Arten gehören nur zu zwei

der 70 bekannten Stämmen *Bacteroidetes* und *Firmicutes*. Im Gegensatz dazu bietet die Darmflora eine sehr große interindividuelle Vielfalt und gleichzeitig eine erstaunliche zeitliche Stabilität hinsichtlich der Arten (265), (266), (267), (268). Wie auch in vorherigen Arbeiten (269), (270) konnte in der vorliegenden Arbeit eine Dominanz von *Bacteroidetes* und den zu dem *Firmicutes*-Stamm gehörenden *Eubacterium rectale* und *Faecalibacterium prausnitzii* in beiden untersuchten Gruppen gezeigt werden. Die einzelnen Bakteriengruppen schwanken in ihrer Zusammensetzung und Konzentration zwischen den einzelnen Messungen unwesentlich. Die beiden oben erwähnten habituellen Hauptbakteriengruppen treten hoch konzentriert (bis 10^{10} /ml) auf und sind gleichmäßig verteilt. Andere Bakterienstämme (*Bifidobacterium*-Stamm *Actinobacteria*, *Enterobacteriaceae*-Stamm *Proteobacteria*) sind niedriger konzentriert (10^9 /ml und niedriger) oder fehlen bei einzelnen Personen, ähnlich den individuellen Bakteriengruppen (*Atopobium*-Stamm *Actinobacteria*). Zudem haben die Bakterien eine charakteristische räumliche Verteilung in Hinblick auf die Mucusschicht und die fäkale Oberfläche und konnten in mukotrop, mukophob oder fecomucös unterteilt werden. Zu den mukotropen Bakterien gehören vor allem *Enterobacteriaceae*. Die Vertreter der *Bifidobacteriae* sind dagegen mukophob. Sie meiden die Mucusschicht und werden meistens in einem Abstand von 0-5µm von der Stuhloberfläche gefunden. Alle anderen Bakterien (*Atopobium*, *Bacteroides*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*) sind fecomucös (diffus verteilt) (202).

Die Struktur der fäkalen Flora bei MS-Patienten in Bezug auf die Anwesenheit der Vertreter der Haupt- und Nebengruppen sowie auf die räumliche Verteilung der Bakterien entspricht den früheren Beobachtungen (269), (270), (202) und war in beiden untersuchten Gruppen vergleichbar. Lediglich die Vertreter der *Atopobium*-Gruppe treten statistisch signifikant häufiger bei den MS-Patienten auf (92,6% vs. 72,2%; $p=0,005$). Bei der Betrachtung der Konzentration der einzelnen bakteriellen Gruppen konnten wir eine statistisch signifikante Reduktion von *Bacteroidaceae* bei gleichzeitigem Anstieg von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* den Hauptvertretern des *Actinobacteria*-Stammes bei MS-Patienten bei vergleichbaren Konzentrationen von *Firmicutes*- und *Proteobacteria*-Vertretern feststellen. Die Konzentrationen von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* erreichten bei MS-Patienten sogar das Niveau der üblicherweise dominierenden *Firmicutes*- und *Bacteroidetes*-Gruppen.

Die statistisch signifikanten Unterschiede im gesamten Kollektiv werden in der geschlechtlich getrennten Auswertung größtenteils widergespiegelt. Dies betrifft die höheren Konzentrationen von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* in der MS-Gruppe. Die niedrigere Konzentration von *Bacteroidaceae* in der MS-Gruppe wurde zwar bei beiden Geschlechtern reproduziert, war aber nur bei den Frauen statistisch signifikant. Als einziges geschlechtsspezifisches Merkmal mit statistischer Signifikanz konnte bei den Männern eine erhöhte Konzentration von *Faecalibacterium prausnitzii* in der MS-Gruppe nachgewiesen werden.

Die Subgruppenanalyse der MS-Patienten zeigte eine Stabilität der Darmflora in Bezug auf die klinische Form der Erkrankung, Krankheitsaktivität, Behinderungsgrad, Therapieform und Wohnort. Lediglich eine längere Krankheitsdauer (>10 Jahre) war mit signifikant höheren Konzentrationen von *Bifidobacteriae* und eine kürzere Krankheitsdauer (<10Jahre) dagegen mit signifikant höheren Konzentrationen von *Eubacterium rectale* verbunden.

Studien, die systematisch die Zusammensetzung der kommensalen Darmflora bei der MS untersuchen, fehlen bisher. In einer einzelnen Studie aus dem Jahre 1991 wurde eine Reduktion von *Bifidobacterium adolescentis* Typ a und c bei MS-Patienten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe beobachtet (271). Die Bakterien wurden in dieser Arbeit jedoch aus den Stuhlproben kultiviert und nicht direkt dargestellt, sodass die Vergleichbarkeit der Daten kaum möglich ist, zudem die erhöhte Konzentration der *Bifidobacteriae* in der vorliegenden Arbeit die gesamte Familie und nicht die einzelnen Gattungen betrifft.

Aufgrund von fehlenden vergleichbaren Daten, die die Zusammensetzung der Darmflora und deren Bedeutung bei MS-Patienten beurteilen, ist die Interpretation der einzelnen Ergebnisse erschwert. Nachfolgend werden der Einfluss der Dysbiose der kommensalen Darmbakterien bei anderen autoimmunologischen Krankheiten sowie die metabolischen Eigenschaften der einzelnen Bakteriengruppen dargestellt.

4.3.3 Zusammensetzung der Darmflora bei Autoimmunerkrankungen

Die veränderte Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora scheint ein gemeinsames Merkmal bei vielen autoimmunologischen Erkrankungen zu sein. Zu den häufigsten autoimmunologischen Krankheiten des gastrointestinalen Traktes gehören der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU), auch unter dem Namen chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) zusammengefasst. Hier sind die Veränderungen der bakteriellen Darmflora am besten untersucht. Die Mikroflora der CED-Patienten zeigt eine Reduktion von *Bacteroides* und *Firmicutes* und gleichzeitig eine Zunahme von *Proteobacteria* und *Actinobacteria* (205) (207). MC-Patienten zeigen einen deutlichen Verlust in der Komplexität des *Firmicutes*-Stammes im Vergleich zu gesunden Probanden (272). Aktive Formen des MC konnten mit einer Reduktion der relativen Anteile von *Faecalibacterium prausnitzii* (*Firmicutes*) eindeutig assoziiert werden (207), (206). Die Konzentrationen von *Bifidobacteriaceae* und *Atopobium* (beide *Actinobacteria*) steigen bei der CU, aber nicht beim MC. Die Konzentrationen von *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*) steigen dagegen bei der zunehmenden Krankheitsaktivität beim MC und bleiben unverändert bei der CU (206). Die oben beschriebene Reduktion von *Bacteroides* sowie steigende Konzentration von *Bifidobacteriaceae* und *Atopobium* (beide *Actinobacteria*) wurde in der vorliegenden Arbeit auch bei MS-Patienten beobachtet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Autoimmunität einem ähnlichen Dysbiose-Muster unabhängig vom Wirkungsort des Immunsystems folgt.

Neben den entzündlichen Darmerkrankungen zeigen auch andere Krankheiten mit einem gesicherten autoimmunologischen Hintergrund Veränderungen der Darmflora. Bei Diabetes-mellitus-Typ-1-Modellen konnte die Bedeutung der segmentierten Fadenbakterien (*Firmicutes*) bei der Krankheitsinduktion (273), (274) und der schützende Einfluss von *Bacteroidetes* gezeigt werden (273). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der segmentierten Fadenbakterien mit ihren krankheitsinduzierenden Eigenschaften wurden zuletzt bei rheumatoide Arthritis-Modellen präsentiert (275). In einer Studie von Patienten mit rheumatoider Arthritis fanden sich in den Stuhlproben seltener *Bifidobacteriaceae* und *Bacteroides fragilis* (*Bacteroidaceae*) im Vergleich zu den Fibromyalgie-Patienten (221). Bei allergischen Erkrankungen fand sich eine höhere Anzahl von *Bifidobacterium* und *Bacteroides* (276), (277) im Stuhl. Kinder mit Kuhmilchallergie zeigten höhere Anteile von *Atopobium* (278).

Die Autoimmunerkrankungen stellen eine heterogene Gruppe mit sehr unterschiedlichen und zum Teil nicht vollständig erforschten pathophysiologischen Immunprozessen dar. Es ist also nicht verwunderlich, dass die Veränderungen auch unterschiedliche Vertreter der Darmflora betreffen. Interessanterweise konnten bisher bei allen Autoimmunerkrankungen dysbiotische Veränderungen beobachtet werden. Übereinstimmend mit unserer Arbeit scheint das erhöhte Niveau von *Atopobium* und das reduzierte von *Bacteroidaceae* der Darmflora ein reproduzierbares Muster bei mehreren Autoimmunerkrankungen zu sein. Bei den *Bifidobacteriaceae* zeigen sich zum Teil widersprüchliche Daten. Eine der Ursachen dafür könnte die Identifizierung von unterschiedlichen taxonomischen Zielen im Bereich der *Bifidobacteriaceae*-Familie in den einzelnen Studien sein. Ähnliches wird im Bereich der *Firmicutes*-Familie beobachtet, wo z. B. den segmentierten Fadenbakterien eine proinflammatorische Rolle und dem *Faecalibacterium prausnitzii* eine eher immunmodulatorische und schützende Funktion zugeschrieben wird. Dem zufolge wäre die erhöhte Konzentration von *Faecalibacterium prausnitzii* bei den männlichen Patienten in der vorliegenden Arbeit nicht mit den immunmodulatorischen Daten übereinstimmend. Möglicherweise spielen hier weitere, von uns nicht untersuchte Faktoren wie hormoneller Status, besondere Medikation oder unterschiedliche Essgewohnheiten eine Rolle.

4.3.4 Einfluss der Darmflora auf die EAE

Die möglichen immunologischen Effekte der Darmfloraveränderungen bei MS veranschaulichen die EAE-Modelle. So zeigen zum Beispiel keimfreie Mäuse, welche für die EAE induziert wurden, einen abgeschwächten Krankheitsphänotyp, was wahrscheinlich mit der bereits erwähnten Unterentwicklung des gesamten Immunsystems bei fehlender bakterieller Besiedlung in Zusammenhang steht. Die Darmkolonisation dieser Tiere mit segmentierten Fadenbakterien verursacht dagegen eine Progression von EAE durch den Anstieg der IL-17 produzierenden Zellen im ZNS (279). Auf der anderen Seite kann eine Antibiotikum-vermittelte Modifikation der Darmflora die Schwere der EAE bei Mäusen reduzieren. Der Effekt wird durch spezifische Treg (280) oder durch einen signifikanten Anstieg von IL-10 produzierenden B-Zellen (281) verursacht und ist in beiden Fällen auch durch passiven Transfer dieser Zellen auf andere Tiere übertragbar. Ähnliche, durch IL-10-produzierende-Treg vermittelte, schützende Effekte wurden in EAE-Modellen nach der Verabreichung einer

Mischung aus kommensalen Mikroorganismen beobachtet. Diese konnte für den *Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus plantarum* (282) sowie für das Milchsäurebakterium *Pediococcus acidilactici* (*Firmicutes*) (283) gezeigt werden. *Bacteroides fragilis* (*Bacteroidaceae*), ein kommensales Bakterium aus dem menschlichen Darm, welches in unserer Arbeit wahrscheinlich in reduzierter Zahl bei MS-Patienten vorkommt, stimuliert dank seinem Polysaccharid A (PSA) über TLR2-Wege die Treg, unterdrückt durch IL-10 die Th17 und ruft somit eine symbiotische Reaktion mit dem Wirt hervor (284). Im EAE-Modell konnte kürzlich gezeigt werden, dass PSA gegen die entzündliche Demyelinisierung des ZNS schützen kann. Die orale Verabreichung von gereinigtem PSA schützte die Mäuse gegen EAE. Die Wirkung konnte im prophylaktischen und therapeutischen Sinne gezeigt werden. Die PSA-Exposition induzierte die Umwandlung von naiven CD4 + in IL-10 produzierende Treg. Interessanterweise konnte auch eine vorher nie beobachtete Migration der durch PSA stimulierten antigenpräsentierenden Zellen aus dem mukosalen Immunsystem in die Halslymphknoten, also in das zentrale Immunsystem, gezeigt werden (220). Denkbar wäre, dass die reduzierte Exposition auf die *Bacteroidaceae*-Antigene in der Kindheit zu einem anderen immunologischen Umfeld führt und dadurch die Entwicklung der Autoimmunreaktion begünstigt (285).

Die in den EAE Modellen beobachtete Rolle der *Bacteroidaceae* wird durch die bereits präsentierten Studien an menschlichen Autoimmunerkrankungen unterstützt, wo in den meisten Fällen die reduzierte Konzentration der Vertreter dieser Familien beobachtet wurde. Auch bei den MS-Patienten in der vorliegenden Arbeit traten *Bacteroidaceae* in statistisch niedrigeren Konzentrationen auf, was auf eine potenzielle Rolle dieser Darmkommensalen in der MS-Pathophysiologie schließen lässt. Besonders interessant erscheint die Tatsache, dass nur bei den weiblichen Patienten in unserer Arbeit der Unterschied eine statistische Relevanz erreichte. Neben den hormonellen Faktoren und dem bereits vorgestellten Einfluss des Rauchens auf die Inzidenz und Prävalenz der MS bei Frauen könnte auch die reduzierte Konzentration von *Bacteroidaceae* ein neuer geschlechtsspezifischer Faktor in der Ätiopathogenese der MS darstellen.

4.4 Metabolische Aspekte der Darmfloraveränderungen

Die Bedeutung der Darmflora für den Wirt beinhaltet nicht nur die immunologischen Prozesse, sondern auch die metabolischen Aspekte mit Energiegewinnungskontrolle und Vitaminsynthese (200). Welche Rolle die einzelne Bakterien-Spezies dabei spielen, ist immer noch unklar. Die wissenschaftlichen Ergebnisse der letzten Jahre zeigen, wie umfangreich und komplex vernetzt diese Einflüsse sein können.

Für die bei unseren Patienten in höherer Konzentration vorkommenden *Atopobium* – Bakterien wurde zum Beispiel in einer Studie eine höhere Konzentration der *Atopobium*-Gruppe bei Personen mit höherer Konzentration von Enteroloacton und Enterodiol produzierenden Bakterien gefunden (*Peptostreptococcus productus* und *Eggerthella lenta*) (286). Enteroloacton und Enterodiol werden von Phytoöstrogenen durch die Darmbakterien metabolisiert und wirken agonistisch und antagonistisch auf den Östrogen-Rezeptor in menschlichen Zellen (287). Andererseits wird bereits seit längerer Zeit der Einfluss des hormonellen Haushaltes bei der MS diskutiert. Epidemiologische Daten unterstreichen deutlich die erhöhte Anfälligkeit für MS bei Frauen im Vergleich zu Männern. Die Rolle der Hormone wird auch durch Veränderungen in der Krankheitssymptomatik während der Schwangerschaft unterstützt, wobei es insbesondere im letzten Trimester zu einer wesentlichen Reduktion der Schubaktivität kommt (288), (289). In der Schwangerschaft wird ein hoher Spiegel von Progesteron, Östradiol und Östriol gemessen. Während Progesteron und Östradiol auch während der verschiedenen Phasen des weiblichen Menstruationszyklus vermehrt auftreten, ist Östriol nur während der Schwangerschaft nachweisbar (290). Niedrige Konzentrationen von Östrogenen und Prolaktin sind durch Verschiebung der Immunreaktion in Richtung der Th1-Antwort für ein entzündungsförderndes Profil verantwortlich. Im Gegensatz dazu sind höhere Spiegel von Östrogenen während der Schwangerschaft mit einer Th2-Verschiebung verbunden. Progesteron reduziert in vitro die Schwere der EAE (291). Zudem wird eine Erhöhung des Niveaus von Treg-Populationen und eine Abnahme der Th1 und Th17 in der Schwangerschaft beobachtet (292). Der Anstieg der Treg wird dabei wahrscheinlich durch die Wirkung von Östradiol auf das Immunsystem vermittelt (293). Ob die erhöhten Konzentrationen der *Atopobium*-Gruppe bei MS-Patienten mit erhöhten Konzentrationen von Enteroloacton und Enterodiol korrelieren und ob dies einen Einfluss auf die Krankheitsaktivität hat, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Weitere Informationen über die metabolischen Eigenschaften von *Atopobium* kommen aus den Beobachtungen bei der bakteriellen Vaginose, wo diese Bakterien einen der Haupterreger darstellen (294). Bei Frauen mit bakterieller Vaginose korrelierte die erhöhte Zahl von *Atopobium vaginae* mit einer erhöhten Sialidaseaktivität (295). Diese spielt zum einen eine wichtige Rolle beim Abbau der komplexen Oligosaccharide von Mucin im Darm (296) und kann damit die Funktion der Darmbarriere beeinflussen, zum anderen kann sie die Bindungsstellen für Lymphozyten auf den Venolen peripherer Lymphknoten inaktivieren (297). Diese Daten zeigen wie komplex sich die Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora auf die Gesundheit des Menschen auswirken können.

Die Rolle der intakten Darmbarriere für die Funktion des mukosalen Immunsystems wurde bereits diskutiert. Ein anderer Aspekt der Funktionalität dieser Barriere ist die Energieversorgung des Darmepithels. Hier spielen kommensale Darmbakterien eine entscheidende Rolle. Die bei unseren Patienten in höheren Konzentrationen vorkommenden *Bifidobacteriae* sind einer der Haupterzeuger von Laktat und Butyrat (298). Butyrat ist die Hauptenergiequelle für Kolonepithelzellen (299). Darüber hinaus reguliert Butyrat die Funktion der zellulären Verbindungen (Tight Junctions) zwischen den Epithelzellen und damit die Darmpermeabilität (300). Ein anderer Vertreter der sogenannten Butyrat-Gemeinschaft des Darmes ist *Eubacterium rectale*, welches in der vorliegenden Arbeit in höherer Konzentration bei Patienten mit kürzerer Krankheitsgeschichte vorkommt. *Eubacterium rectale* gehört zu den prominentesten Butyrat – Herstellern im Darm (301). Die reduzierte Anzahl von *Eubacterium rectale* bei CU-Patienten korreliert mit einer reduzierten Aktivität der Butyryl – Acetat -Transferase, welche verantwortlich für die Butyratproduktion ist (302). Damit wird die Bedeutung der entsprechenden Energieversorgung des Kolonepithels in der Pathophysiologie der Erkrankung untermauert. Warum bei MS-Patienten mit kurzer Krankheitsgeschichte bei der Butyratherstellung *Eubacterium rectale* und bei langer Krankheitsgeschichte *Bifidobacteriae* so prominent sind, ist unklar. Wahrscheinlich werden die erhöhten Konzentrationen durch andere Faktoren wie Ernährung oder Alter beeinflusst.

4.5 Externe Faktoren und die kommensale Darmflora

4.5.1 Zeitfaktor

Die MS ist eine immunvermittelte, chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems. Gerade die Chronizität mit unterschiedlichen Phasen der Krankheitsaktivität und dem noch unklaren Zeitpunkt der Krankheitsentstehung verursachen viele Probleme bei der Interpretation der Studienergebnisse, welche in einem engen Zeitraum der Erkrankung gesammelt wurden. Wenn man die Bedeutung der kommensalen Darmflora in der Ätiopathogenese von chronisch entzündlichen Erkrankungen diskutiert, müssen auch die zeitlichen Abfolgen der Darmfloraveränderungen berücksichtigt werden.

Die menschliche Darmflora stellt keine zufällig zusammengestellte mikrobielle Gemeinschaft dar. Sie zeigt vor allem ein erhebliches Maß an Individualität und Stabilität (265), (266), (267), (268). Obwohl die genauen Faktoren, die die beiden Merkmale bestimmen, unklar bleiben, wird eine Reihe von Variablen, einschließlich genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse postuliert (303). Menschen erwerben ihre spezifische Darmflora während und kurz nach der Geburt. Im Alter von 2-4 Jahren erreicht die Darmflora das Erwachsenenmuster (304), (305), welches dann abgesehen von Krankheitsprozessen des Darmes und Antibiotikatherapien stabil bleibt. Fäkale mikrobielle Profile von Säuglingen zeigen eine auffallende Ähnlichkeit mit der mütterlichen Scheide und der Muttermilch (305). Zudem zeigen die Mitglieder der gleichen Familien die größten Ähnlichkeiten der bakteriellen Gemeinschaften. Zwischen den Proben von ein- und zweieiigen Zwillingen finden sich keine signifikanten Unterschiede (306). Die Zusammensetzung der bakteriellen Flora bei einzelnen Individuen wird damit zunächst vor allem durch die mütterliche Flora und die direkte Umgebung geprägt. Die genetischen Faktoren scheinen hier eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Möglicherweise bestimmt das Genom die stabile bakterielle Zusammensetzung auf Stammebene und die Umweltfaktoren sind für die Artenvielfalt verantwortlich. Bei Säuglingen dominieren vor allem Vertreter von *Bifidobacteriae*. Höher als bei Erwachsenen ist auch der Anteil von *Bacteroidetes* im Vergleich zu *Firmicutes* (307). Manche Autoren vermuten, dass die *Bifidobakterium*-Dominanz bei Säuglingen eine direkte Folge des Stillens ist (308), wobei andere diesen Zusammenhang nicht bestätigen (307). Eine frühzeitige Umstellung der Ernährung auf

Formelmilch führt zu einer schnelleren Kolonisierung des Darmes durch *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum*, *Prevotella* und *Atopobium* (309) und damit zur beschleunigten Reduktion von *Bifidobacteriae* und *Bacteroidetes*.

Auch die Art der Entbindung spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der kommensalen Darmflora. Bei Kindern, die durch Kaiserschnitt (Sectio caesarea) geboren wurden, sind spezifische Veränderungen sichtbar, welche vor allem die Reduktion von *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium* (310), (311) und *Atopobium* (312), (309) betreffen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Frühgeborenen berichtet (313). Gleichzeitig wurde bei diesen Kindern auch eine erhöhte Zahl von Immunoglobulinproduzierenden Zellen noch ein Jahr nach der Geburt beobachtet (311). Interessanterweise berichtet eine neue Studie über ein erhöhtes Risiko für die MS-Entwicklung bei der Geburt durch eine Sectio caesarea bei Frauen im Vergleich zu ihren gesunden Geschwistern, die durch vaginale Entbindung (314) geboren wurden. Zudem entwickelte sich die Sectio caesarea in den letzten Jahrzehnten weltweit von einem lebensrettenden Eingriff in ca. 6% der Lebendgeburten zu einer Routineprozedur bis zu 40% in manchen Ländern (315).

Ob diese im frühen Leben veränderte Zusammensetzung der Darmflora bis zum erwachsenen Alter unverändert übertragen wird, muss noch in weiteren Studien untersucht werden. Auf jeden Fall würde es mit den in unserer Arbeit beobachteten erhöhten Konzentrationen von *Atopobium* und der Reduktion von *Bacteroidetes* übereinstimmen.

4.5.2 Alter

Die Veränderung der Darmflora im Verlauf des menschlichen Lebens wurde bisher nicht ausführlich untersucht. Es gibt wenige und zum Teil widersprüchliche Berichte über die Zusammensetzung der Darmflora bei älteren Menschen, wobei auch die Definition des Alters in den Studien unterschiedlich war. Eine Reduktion von *Firmicutes* wurde bei älteren Menschen in Japan (316), Italien (317) und Finnland (318) beobachtet. Für die deutsche Population wurde dagegen über einen Anstieg (317) berichtet. Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich für *Faecalibacterium prausnitzii* mit einer Reduktion in Italien, aber einer Zunahme in Deutschland, Frankreich und Schweden

(317). Die Auswirkung der Alterung auf Bakterien, die zum Stamm *Bacteroidetes* gehören, ist ziemlich verwirrend. Ein Rückgang der *Bacteroidetes* wurde für italienische, gesunde Personen über 60 Jahre (317) und ältere Probanden aus Nordeuropa (319) beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigten Deutschland, Österreich und Finnland (317), (320), (318) einen inversen Trend. Die Reduktion von *Bifidobacteriaceae* in der Darmflora wird zwar als ein allgemeiner Alterungsprozess akzeptiert (321), (317), allerdings scheinen einige neuere Studien diese Ergebnisse nicht zu bestätigen (319), (322). Abgesehen von den verwirrenden Ergebnissen konnte für die deutsche Bevölkerung die Steigerung von *Atopobium* und *Bacteroidetes* mit zunehmendem Alter und eine unveränderte Konzentration von *Bifidobacteriaceae* ermittelt werden (317).

In der vorliegenden Arbeit war die Probanden-Gruppe signifikant älter als die der MS-Patienten. Der durchschnittliche Unterschied betrug ca. 12 Jahre. Die oben beschriebenen Veränderungen der Darmflora im Laufe der Zeit betreffen vor allem Menschen in einem fortgeschrittenen und sehr fortgeschrittenen Alter und sind somit nicht auf einen Unterschied von lediglich 12 Jahren übertragbar. Zudem zeigten die beobachteten Veränderungen für die deutsche Population in Bezug auf die *Bifidobacteriaceae* keine Veränderungen und in Bezug auf *Atopobium* eine inverse Veränderung im Vergleich mit unseren Daten. Lediglich bei den *Bacteroidetes* wurde eine Steigerung in hohem Alter beobachtet, somit könnte das Alter der Probanden in unserer Arbeit die höhere Konzentration der *Bacteroidetes* erklären. Um den Einfluss des Alters auf die Zusammensetzung der Darmflora eindeutig zu bereinigen, müssten in den neuen Studien die Gruppen auch nach dem Alter gematcht werden.

4.5.3 Ernährung

Ein weiterer Faktor, der die Zusammensetzung der Darmflora langfristig verändern kann, ist die Art der Ernährung. Vom evolutionären Standpunkt aus betrachtet hängt der Charakter der Darmflora stark von den Hauptnahrungsquellen der Tiere (Allesfresser, Fleischfresser, Pflanzenfresser) ab (323). Wenn man keimfreie, mit menschlicher Darmflora besiedelte Mäuse einer westlichen Ernährung (hoher Fett-, Zuckergehalt) statt einer fettarmen, pflanzlichen Diät unterzieht, kommt es zu einer signifikanten Veränderung der Darmflora mit einem Anstieg von *Firmicutes* und einer Reduktion von *Bacteroides* (324). Ähnliche Ergebnisse konnten auch beim Menschen reproduziert

werden. Beim Vergleich der bakteriellen Zusammensetzung in Stuhlproben von Kindern aus der Europäischen Union und Afrika fiel ein höherer Anteil von *Bacteroides*, besonders der Gattung *Prevotella* und *Xylanibacter*, und ein niedrigerer Anteil von *Firmicutes* bei den afrikanischen Kindern auf. Diese Veränderungen wurden mit einer Ernährung mit sehr hohem Ballaststoffgehalt in den ländlichen Gebieten in Verbindung gebracht. Zudem konnte hier auch ein Verlust der Vielfalt in der Darmflora bei europäischen Kinder demonstriert werden (325). Bei dem Versuch die Darmflora in Abhängigkeit von Ernährungstypen zu unterscheiden, wurden drei sogenannte Enteromuster identifiziert. *Bacteroides* (*Bacteroidetes*-Stamm), *Prevotella* (*Bacteroidetes*-Stamm) und *Ruminococcus* (*Furmicutes*- Stamm), welche unabhängig von Nationalität, Geschlecht, Alter und Body Mass Index sind (222). Die Enterotypen zeigen eine starke Assoziation mit bestimmten Diäten. Der *Bacteroides*-Enterotyp assoziierte stark mit tierischem Eiweiß, einer Vielzahl von Aminosäuren und gesättigten Fettsäuren, was bedeutet, dass der Fleischkonsum (wie in einer westlichen Ernährung typisch) diesen Enterotyp charakterisiert. Der *Prevotella*-Enterotyp hingegen wurde mit niedrigen Werten für diese Gruppen, aber mit hohen Werten für Kohlenhydrate und einfachen Zucker assoziiert, also mit einer Ernährung typisch für Agrargesellschaften. Ein Vergleich der langfristigen und kurzfristigen Diätdateen zeigte, dass nur eine langfristige Diät mit dem Enterotyp korreliert und die Veränderungen in der Bakterienzusammensetzung durch kurzfristige Diäten eine ebenso kurzfristige Bedeutung haben (326). Die Rekrutierung der beiden in unserer Arbeit untersuchten Gruppen aus einem engen Gebiet garantiert, dass die kurzfristigen Einflüsse durch die Ernährung bereinigt wurden. Interessant erscheint dabei die Frage, ob die bereits mehrmals hervorgehobene Reduktion von *Bacteroidetes* bei MS-Patienten in unserer Arbeit auf eine andere Diät bei den MS-Patienten zurückzuführen wäre.

4.6 Darmflora und die Epidemiologie der Multiplen Sklerose

Die epidemiologischen und genetischen Studien an der MS bezeichnen sie als eine genetisch bedingte Erkrankung (145), (147), (146), bei der noch unbekannte Umweltfaktoren eine sehr wichtige Rolle spielen müssen (149), (150). Die epidemiologischen Daten sprechen dafür, dass die Wirkung der Umwelt bei der MS sehr wahrscheinlich mit der Mutter (150) und möglicherweise auch mit den Geschwistern (149) zusammenhängt. Sie beginnt in der Kindheit, wahrscheinlich

spätestens bis zum Erreichen des 15. Lebensjahres und spielt anschließend keine bzw. eine deutlich geringere Rolle (152), (153), (154). Der Einfluss der Umweltfaktoren auf die MS-Entstehung ist zwar weltweit ungleich verteilt (151), zeigt aber im letzten Jahrhundert neben einer generellen Zunahme des Auswirkungsgrades auch eine Ausbreitungstendenz auf die bisher nicht betroffenen Gebiete (183), (9), (184), (182). Der Einblick in die Entwicklung der menschlichen Darmflora und deren Veränderung lässt vermuten, dass zumindest manche davon mit den MS-typischen Mustern übereinstimmen. Die individuelle Darmflora entwickelt und verändert sich in den ersten Lebensjahren sehr dynamisch (304), (305). Sie zeigt eine sehr große Abhängigkeit von der Mutter (305) und den Geschwistern (306). Sie unterliegt auch Veränderungen, die durch länderunabhängige und weltweite Merkmale wie Art der Entbindung (310), (311), (312), (309) oder Form der Ernährung (325), (222), (326), (309) verursacht werden.

5. Zusammenfassung

Dank den EAE-Modellen konnten die Pathomechanismen bei der Entstehung und Progression der MS immer besser verstanden werden und führten auch in den letzten Jahrzehnten zur Etablierung von effektiven Therapiekonzepten. Trotz des unbestreitbaren Fortschritts bleiben jedoch bei der Erforschung der MS-Ätiologie viele Fragen offen. Das menschliche Genom stellt den bedeutendsten bekannten Risikofaktor bei der MS-Entstehung dar und weist gleichzeitig auf die besondere Rolle des Immunsystems hin. Andererseits beweisen die epidemiologischen Daten einen deutlichen Einfluss von Umweltfaktoren, welche die steigende Inzidenz und Prävalenz der MS in den letzten hundert Jahren mit gleichzeitigem Verwischen des Breitengrad-Gradienten verursachten. Ausgehend von der Hygiene-Hypothese, die die Bedeutung der veränderten Antigenexposition auf die mögliche Fehlentwicklung des Immunsystems und seine Lenkung in Richtung Autoimmunität hervorhebt, lieferten in letzten Jahren mehrere wissenschaftliche Studien Hinweise dafür, dass das mukosale Immunsystem, welches durch Toleranzmechanismen die Koexistenz mit zahlreichen Mikroorganismen sichert, eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Autoimmunität spielen kann. Veränderungen in diesem System (Dysbiose) können auch zu Erkrankungen mit einem autoimmunogenen Hintergrund führen. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora bei MS-Patienten und mögliche Einflüsse von verschiedenen Faktoren auf diese Veränderungen untersucht.

Wir fanden Hinweise auf eine ungestörte Rekrutierung der Leukozyten im Bereich der Darmbarriere und wahrscheinlich eine normale Funktion der Mucusschicht bei MS-Patienten. Die Struktur der fäkalen Flora bei MS-Patienten in Bezug auf die Anwesenheit der Vertreter der bakteriellen Haupt- und Nebengruppen sowie auf die räumliche Verteilung der Bakterien entspricht den früheren Beobachtungen bei anderen Autoimmunerkrankungen. Die Vertreter der *Atopobium*-Gruppe treten statistisch signifikant häufiger bei MS-Patienten auf. Bei der Betrachtung der Konzentrationen der einzelnen bakteriellen Gruppen konnten wir eine statistisch signifikante Reduktion von *Bacteroidaceae* bei gleichzeitigem Anstieg von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* den Hauptvertretern des *Actinobacteria*-Stammes bei MS-Patienten mit vergleichbaren

Konzentrationen von *Firmicutes*- und *Proteobacteria*-Vertretern feststellen. Die Konzentrationen von *Atopobium* und *Bifidobacteriae* erreichten bei MS-Patienten das Niveau der üblich dominierenden *Firmicutes*- und *Bacteroidetes*-Gruppen. Die niedrigere Konzentration von *Bacteroidaceae* in der MS-Gruppe wurde zwar bei beiden Geschlechtern reproduziert, war aber nur bei den Frauen statistisch signifikant. Als einziges geschlechtsspezifisches Merkmal mit statistischer Signifikanz konnte bei den Männern eine erhöhte Konzentration von *Faecalibacterium prausnitzii* in der MS-Gruppe nachgewiesen werden. Die Darmflora bei MS-Patienten zeigte sich unabhängig von der klinischen Form der Erkrankung, der Krankheitsaktivität, des Behinderungsgrades, der Therapieform und des Wohnortes. Lediglich eine längere Krankheitsdauer (>10 Jahre) war mit signifikant höheren Konzentrationen von *Bifidobacteriae* und eine kürzere Krankheitsdauer (<10 Jahre) dagegen mit signifikant höheren Konzentrationen von *Eubacterium rectale* verbunden.

Die Dysbiose der Darmflora bei der MS könnte die immunologischen und metabolischen Eigenschaften der Patienten beeinflussen. Der Einblick in die Entwicklung der menschlichen Darmflora und deren umweltabhängige Veränderungen lässt vermuten, dass manche davon mit den MS-typischen epidemiologischen Mustern übereinstimmen. Die Darmflora bei der MS stellt ein neues interessantes wissenschaftliches Zielgebiet dar, welches zum besseren Verstehen der Pathophysiologie und möglicherweise auch der Ätiologie der Erkrankung beitragen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Gold R, Hanschke S, Hemmer B. DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS. 2012.
2. Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *Journal of the neurological sciences*. 2009;277 Suppl 1:S3-8.
3. Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop*1868. p.554– 5, 7– 8, 66.
4. Schmidt RM, Hoffmann F. Multiple Sklerose: Elsevier Health Sciences Germany; 2013.
5. Ebers GC, Sadovnick AD. The geographic distribution of multiple sclerosis: a review. *Neuroepidemiology*. 1993;12(1):1-5.
6. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008;71(2):129-35.
7. Banwell B, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet neurology*. 2007;6(10):887-902.
8. Hein T, Hopfenmuller W. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Der Nervenarzt*. 2000;71(4):288-94. Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland.
9. Mayr WT, Pittock SJ, McClelland RL, Jorgensen NW, Noseworthy JH, Rodriguez M. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. *Neurology*. 2003;61(10):1373-7.
10. Charcot J-M. Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la salpetriere. 1880;Vol. 189.
11. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):942-55.
12. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of neurology*. 2009;66(6):739-53.
13. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C, Rodriguez M. Remyelination in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 1997;3(2):133-6.
14. Wilson HC, Scolding NJ, Raine CS. Co-expression of PDGF alpha receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology*. 2006;176(1-2):162-73.

15. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*. 1997;120 (Pt 3):393-9.
16. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 1998;338(5):278-85.
17. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 2001;50(3):389-400.
18. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
19. Suzuki K, Kamoshita S, Eto Y, Tourtellotte WW, Gonatas JO. Myelin in multiple sclerosis. Composition of myelin from normal-appearing white matter. *Archives of neurology*. 1973;28(5):293-7.
20. Filippi M, Campi A, Dousset V, Baratti C, Martinelli V, Canal N, et al. A magnetization transfer imaging study of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurology*. 1995;45(3 Pt 1):478-82.
21. Ceccarelli A, Rocca MA, Falini A, Tortorella P, Pagani E, Rodegher M, et al. Normal-appearing white and grey matter damage in MS. A volumetric and diffusion tensor MRI study at 3.0 Tesla. *Journal of neurology*. 2007;254(4):513-8.
22. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2004;14(2):164-74.
23. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 4):1089-104.
24. Lucchinetti CF, Bruck W, Lassmann H. Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2004;56(2):308.
25. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2008;63(1):16-25.
26. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols*. 2006;1(4):1952-60.
27. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(6):393-407.

28. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *The Journal of experimental medicine*. 1947;85(1):117-30.
29. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, et al. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(4):1940-9.
30. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(7):569-81.
31. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 1):200-11.
32. Harrington CJ, Paez A, Hunkapiller T, Mannikko V, Brabb T, Ahearn M, et al. Differential tolerance is induced in T cells recognizing distinct epitopes of myelin basic protein. *Immunity*. 1998;8(5):571-80.
33. Hahn M, Nicholson MJ, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Unconventional topology of self peptide-major histocompatibility complex binding by a human autoimmune T cell receptor. *Nature immunology*. 2005;6(5):490-6.
34. Zhang X, Tang Y, Sujkowska D, Wang J, Ramgolam V, Sospedra M, et al. Degenerate TCR recognition and dual DR2 restriction of autoreactive T cells: implications for the initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2008;38(5):1297-309.
35. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science (New York, NY)*. 1985;230(4729):1043-5.
36. Lenz DC, Lu L, Conant SB, Wolf NA, Gerard HC, Whittum-Hudson JA, et al. A *Chlamydia pneumoniae*-specific peptide induces experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(3):1803-8.
37. Croxford JL, Anger HA, Miller SD. Viral delivery of an epitope from *Haemophilus influenzae* induces central nervous system autoimmune disease by molecular mimicry. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(2):907-17.
38. Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, et al. Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(20):7968-72.

39. Valli A, Sette A, Kappos L, Oseroff C, Sidney J, Miescher G, et al. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(2):616-28.
40. Olsson T, Zhi WW, Hojberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, et al. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(3):981-5.
41. Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research*. 1996;45(4):322-33.
42. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(3):973-84.
43. de Rosbo NK, Kaye JF, Eisenstein M, Mendel I, Hoeflberger R, Lassmann H, et al. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein region MOBP15-36 encompasses the immunodominant major encephalitogenic epitope(s) for SJL/J mice and predicted epitope(s) for multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(2):1426-35.
44. Tompkins SM, Padilla J, Dal Canto MC, Ting JP, Van Kaer L, Miller SD. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(8):4173-83.
45. Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(7):3767-75.
46. Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*. 2011;29(2):257-78.
47. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology today*. 2000;21(3):141-7.
48. Murphy KM, Travers P, Walport M, Mablke K, Seidler L, Hauber-Siller I. *Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag*; 2009.
49. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology today*. 1995;16(1):34-8.
50. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1119-27.

51. Traugott U, Lebon P. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Annals of neurology*. 1988;24(2):243-51.
52. Krakowski M, Owens T. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *European journal of immunology*. 1996;26(7):1641-6.
53. Liu L, Huang D, Matsui M, He TT, Hu T, Demartino J, et al. Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3^{-/-} mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(7):4399-409.
54. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine*. 2007;13(2):139-45.
55. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.
56. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology*. 2011;12(6):568-75.
57. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International immunology*. 2009;21(5):489-98.
58. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology*. 2009;10(3):314-24.
59. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485-517.
60. Spolski R, Leonard WJ. Cytokine mediators of Th17 function. *European journal of immunology*. 2009;39(3):658-61.
61. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine*. 2007;13(10):1173-5.
62. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 12):3329-41.
63. Edwards LJ, Robins RA, Constantinescu CS. Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine*. 2010;50(1):19-23.
64. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Annals of neurology*. 2009;65(5):499-509.

65. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(3):393-404.
66. van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, et al. Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology*. 1997;49(2):351-7.
67. Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet neurology*. 2008;7(9):796-804.
68. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *Journal of neurology*. 2006;253(1):98-108.
69. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2009;66(2):132-41.
70. Berthelot L, Laplaud DA, Pettre S, Ballet C, Michel L, Hillion S, et al. Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *European journal of immunology*. 2008;38(7):1889-99.
71. Malmestrom C, Lycke J, Haghighi S, Andersen O, Carlsson L, Wadenvik H, et al. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *Journal of neuroimmunology*. 2008;196(1-2):159-65.
72. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American journal of pathology*. 2008;172(1):146-55.
73. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 11):2789-99.
74. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004;103(11):4222-31.
75. Hellings N, Baree M, Verhoeven C, D'Hooghe M B, Medaer R, Bernard CC, et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of neuroscience research*. 2001;63(3):290-302.

76. Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity. *European journal of immunology*. 2008;38(4):921-4.
77. Cabbage SE, Huseby ES, Sather BD, Brabb T, Liggitt D, Goverman J. Regulatory T cells maintain long-term tolerance to myelin basic protein by inducing a novel, dynamic state of T cell tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(2):887-96.
78. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of experimental medicine*. 2001;193(11):1303-10.
79. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(2):247-53.
80. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(3):1245-53.
81. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
82. Zhang H, Podojil JR, Luo X, Miller SD. Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(7):4638-47.
83. Correale J, Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010;67(5):625-38.
84. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(7):971-9.
85. Haas J, Hug A, Viehover A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2005;35(11):3343-52.
86. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(1):192-200.
87. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine*. 2007;357(9):851-62.

88. Weinschenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain : a journal of neurology*. 1989;112 (Pt 6):1419-28.
89. Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, Devonshire V. Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2008;79(12):1368-74.
90. Poser S RG. *Multiple Sklerose in Forschung, Klinik und Praxis*. Stuttgart, New York: Schattauer.; 1980.
91. Poser CM, Brinar VV. The nature of multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2004;106(3):159-71.
92. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-11.
93. Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2002;346(3):158-64.
94. Kallmann BA, Fackelmann S, Toyka KV, Rieckmann P, Reiners K. Early abnormalities of evoked potentials and future disability in patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2006;12(1):58-65.
95. Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Plaza J, Sadaba MC, Roldan E, et al. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002;59(4):555-9.
96. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi MMX, et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1997;120 (Pt 6):1085-96.
97. Schumacker GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965;122:552-68.
98. Poser Ch PD, Scheinberg L, et al. . New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guide-lines for research protocols. *The Diagnosis of Multiple Sclerosis*. Stuttgart.: Thieme.; 1984.
99. Bourahoui A, De Seze J, Gutierrez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, et al. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2004;11(8):525-9.

100. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011;69(2):292-302.
101. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
102. Miller H, Newell DJ, Ridley A. Multiple sclerosis. Trials of maintenance treatment with prednisolone and soluble aspirin. *Lancet*. 1961;1(7169):127-9.
103. MSTKG. Immunmodulierende Stufentherapie der Multiplen Sklerose. *Der Nervenarzt*. 1999;70:371–86
104. MSTKG R, P. Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose – aktuelle Therapieempfehlungen *Der Nervenarzt*. 2006;77:1506–18
105. Beck RW, Cleary PA, Trobe JD, Kaufman DI, Kupersmith MJ, Paty DW, et al. The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *The New England journal of medicine*. 1993;329(24):1764-9.
106. Beck RW. The optic neuritis treatment trial: three-year follow-up results. *Archives of ophthalmology*. 1995;113(2):136-7.
107. Keegan M, Pineda AA, McClelland RL, Darby CH, Rodriguez M, Weinschenker BG. Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology*. 2002;58(1):143-6.
108. Ruprecht K, Klinker E, Dintelmann T, Rieckmann P, Gold R. Plasma exchange for severe optic neuritis: treatment of 10 patients. *Neurology*. 2004;63(6):1081-3.
109. Schilling S, Linker RA, König FB, Koziol M, Bahr M, Müller GA, et al. [Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients]. *Der Nervenarzt*. 2006;77(4):430-8. Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben: Klinische Erfahrungen an 16 Patienten.
110. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(8):5418-27.
111. Sweeney CM, Lonergan R, Basdeo SA, Kinsella K, Dungan LS, Higgins SC, et al. IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(6):1170-81.
112. Krakauer M, Sorensen P, Khademi M, Olsson T, Sellebjerg F. Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2008;14(5):622-30.

113. Ramgolam VS, Sha Y, Marcus KL, Choudhary N, Troiani L, Chopra M, et al. B cells as a therapeutic target for IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(7):4518-26.
114. Valenzuela RM, Costello K, Chen M, Said A, Johnson KP, Dhib-Jalbut S. Clinical response to glatiramer acetate correlates with modulation of IFN-gamma and IL-4 expression in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2007;13(6):754-62.
115. Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(18):6449-54.
116. Jung S, Siglienti I, Grauer O, Magnus T, Scarlato G, Toyka K. Induction of IL-10 in rat peritoneal macrophages and dendritic cells by glatiramer acetate. *Journal of neuroimmunology*. 2004;148(1-2):63-73.
117. Wang BS, Murdock KC, Lumanglas AL, Damiani M, Silva J, Ruzsala-Mallon VM, et al. Relationship of chemical structures of anthraquinones with their effects on the suppression of immune responses. *International journal of immunopharmacology*. 1987;9(6):733-9.
118. Vogelgesang A, Rosenberg S, Skrzipek S, Broker BM, Dressel A. Mitoxantrone treatment in multiple sclerosis induces TH2-type cytokines. *Acta neurologica Scandinavica*. 2010;122(4):237-43.
119. Levine S, Gherson J. Morphologic effects of mitoxantrone and a related anthracenedione on lymphoid tissues. *International journal of immunopharmacology*. 1986;8(8):999-1007.
120. Elovaara I, Ukkonen M, Leppakynnas M, Lehtimaki T, Luomala M, Peltola J, et al. Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Archives of neurology*. 2000;57(4):546-51.
121. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA, Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(1):57-68.
122. von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. 2003;348(1):68-72.
123. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427(6972):355-60.
124. Harada J, Foley M, Moskowitz MA, Waeber C. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *Journal of neurochemistry*. 2004;88(4):1026-39.

125. Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, et al. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(7):959-70.
126. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(24):21453-7.
127. Rieckmann P, Toyka KV. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis. Austrian-German- Swiss Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group [MSTCG]. *European neurology*. 1999;42(3):121-7.
128. Rieckmann P. [Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006)]. *Der Nervenarzt*. 2006;77(12):1506-18. Immunomodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. Aktuelle Therapieempfehlungen (September 2006).
129. Hill-Cawthorne GA, Button T, Tuohy O, Jones JL, May K, Somerfield J, et al. Long term lymphocyte reconstitution after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2012;83(3):298-304.
130. Cox AL, Thompson SA, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, et al. Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2005;35(11):3332-42.
131. Lee DH, Linker RA, Gold R. Spotlight on fumarates. *International MS journal / MS Forum*. 2008;15(1):12-8.
132. Moharrehg-Khiabani D, Linker RA, Gold R, Stangel M. Fumaric Acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis. *Current neuropharmacology*. 2009;7(1):60-4.
133. Palmer AM. Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*. 2010;11(11):1313-23.
134. Claussen MC, Korn T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2012;142(1):49-56.
135. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta neurologica Scandinavica*. 2011;124(2):75-84.
136. von Leyden E. Die graue Degeneration der hinteren Rückenmarksstränge: Klin. Bearb: Hirschwald; 1863.
137. Marburg O. Die sogenannte akute multiple Sklerose (Encephalomyelitis periaxialis scleroticans): F. Deuticke; 1906.

138. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology*. 2000;47(6):707-17.
139. Gilen D. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet neurology*. 2005;4(3):195-202.
140. Ramagopalan SV, Handel AE, Giovannoni G, Rutherford Siegel S, Ebers GC, Chaplin G. Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England. *Neurology*. 2011;76(16):1410-4.
141. Fleming JO, Cook TD. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*. 2006;67(11):2085-6.
142. Hammond SR, English D, de Wyt C, Maxwell IC, Millingen KS, Stewart-Wynne EG, et al. The clinical profile of MS in Australia: a comparison between medium- and high-frequency prevalence zones. *Neurology*. 1988;38(6):980-6.
143. Skegg DC, Corwin PA, Craven RS, Malloch JA, Pollock M. Occurrence of multiple sclerosis in the north and south of New Zealand. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1987;50(2):134-9.
144. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 (Pt 2):449-55.
145. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *The New England journal of medicine*. 1986;315(26):1638-42.
146. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Bronnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2005;11(5):504-10.
147. Dymant DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet neurology*. 2004;3(2):104-10.
148. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
149. Willer CJ, Dymant DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12877-82.
150. Ebers GC, Sadovnick AD, Dymant DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet*. 2004;363(9423):1773-4.

151. Kurtzke JF. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*. 1995;161:23-33.
152. Alter M, Leibowitz U, Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Archives of neurology*. 1966;15(3):234-7.
153. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *British medical journal*. 1971;3(5777):725-9.
154. Detels R, Visscher BR, Haile RW, Malmgren RM, Dudley JP, Coulson AH. Multiple sclerosis and age at migration. *American journal of epidemiology*. 1978;108(5):386-93.
155. Cabre P, Signate A, Olindo S, Merle H, Caparros-Lefebvre D, Bera O, et al. Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 12):2899-910.
156. Dean G, Elian M. Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1997;63(5):565-8.
157. Kurtzke JF, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome. *Journal of clinical epidemiology*. 2001;54(1):1-22.
158. Poser CM. The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Annals of neurology*. 1994;36 Suppl 2:S180-93.
159. Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, et al. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1999;46(1):6-14.
160. Bagos PG, Nikolopoulos G, Ioannidis A. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2006;12(4):397-411.
161. Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'Ambrosia J M, Ludwin SK, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(9):1377-87.
162. Liedtke W, Malessa R, Faustmann PM, Eis-Hubinger AM. Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. *Journal of neurovirology*. 1995;1(3-4):253-8.
163. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature medicine*. 1997;3(12):1394-7.

164. Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya JM, Shoenfeld Y. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1108:567-77.
165. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000;55(2):178-84.
166. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 2007;61(4):288-99.
167. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010;67(6):824-30.
168. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Annals of neurology*. 2006;59(3):499-503.
169. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1352-60.
170. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2005;293(20):2496-500.
171. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(12):2899-912.
172. Beretich BD, Beretich TM. Explaining multiple sclerosis prevalence by ultraviolet exposure: a geospatial analysis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2009;15(8):891-8.
173. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta psychiatrica Scandinavica Supplementum*. 1960;35(147):132-47.
174. Ponsonby AL, Lucas RM, van der Mei IA. UVR, vitamin D and three autoimmune diseases--multiple sclerosis, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis. *Photochemistry and photobiology*. 2005;81(6):1267-75.
175. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Taylor BV, Kilpatrick T, et al. Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *Journal of neurology*. 2007;254(5):581-90.
176. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet neurology*. 2006;5(11):932-6.

177. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet neurology*. 2010;9(5):520-32.
178. Villard-Mackintosh L, Vessey MP. Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence. *Contraception*. 1993;47(2):161-8.
179. Thorogood M, Hannaford PC. The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1998;105(12):1296-9.
180. Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *American journal of epidemiology*. 2001;154(1):69-74.
181. Palacios N, Alonso A, Bronnum-Hansen H, Ascherio A. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Annals of epidemiology*. 2011;21(7):536-42.
182. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *Journal of the neurological sciences*. 2011;311(1-2):58-63.
183. Kira J, Yamasaki K, Horiuchi I, Ohyagi Y, Taniwaki T, Kawano Y. Changes in the clinical phenotypes of multiple sclerosis during the past 50 years in Japan. *Journal of the neurological sciences*. 1999;166(1):53-7.
184. Osoegawa M, Kira J, Fukazawa T, Fujihara K, Kikuchi S, Matsui M, et al. Temporal changes and geographical differences in multiple sclerosis phenotypes in Japanese: nationwide survey results over 30 years. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2009;15(2):159-73.
185. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1966;29(1):60-8.
186. Blackley C. *Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus (Hay-fever and Hay-asthma)*. Baillière Tindall and Cox. 1873.
187. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed)*. 1989;299(6710):1259-60.
188. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine*. 2002;347(12):911-20.
189. Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes*. 2002;51(12):3353-61.
190. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2003;8(3):223-46.

191. Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Riva S, Clerici M, et al. Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(6):1395-408.
192. Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V, Balloux F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current biology : CB*. 2005;15(11):1022-7.
193. Yazdanbakhsh M, Wahyuni S. The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005;5(5):386-91.
194. Stoll NR. This wormy world. 1947. *The Journal of parasitology*. 1999;85(3):392-6.
195. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2007;61(2):97-108.
196. Moog F. The lining of the small intestine. *Scientific American*. 1981;245(5):154-8, 60, 62 et passiom.
197. Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us. *Molecular microbiology*. 2006;59(6):1639-50.
198. Booiijink CC, Zoetendal EG, Kleerebezem M, de Vos WM. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future microbiology*. 2007;2(3):285-95.
199. Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental microbiology*. 2007;9(9):2125-36.
200. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in immunology*. 2007;19(2):59-69.
201. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology*. 1999;65(11):4799-807.
202. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology*. 2008;135(2):568-79.
203. Doerffel Y, Pavel M, Loening-Baucke V, Swidsinski A. Common biostructure of the fecal flora in celiac disease, Crohn's disease, and carcinoid tumors. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(11):1613-4.
204. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(7):3380-9.

205. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13780-5.
206. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Doerffel Y. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(2):147-61.
207. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(8):1183-9.
208. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, et al. A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Annals of medicine*. 2005;37(1):67-72.
209. Pakarinen J, Hyvarinen A, Salkinoja-Salonen M, Laitinen S, Nevalainen A, Makela MJ, et al. Predominance of Gram-positive bacteria in house dust in the low-allergy risk Russian Karelia. *Environmental microbiology*. 2008;10(12):3317-25.
210. Berer K, Krishnamoorthy G. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta neuropathologica*. 2012;123(5):639-51.
211. Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, et al. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nature immunology*. 2009;10(1):83-91.
212. Smythies LE, Shen R, Bimczok D, Novak L, Clements RH, Eckhoff DE, et al. Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced I κ B α expression and NF- κ B inactivation. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(25):19593-604.
213. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. 2011;478(7368):250-4.
214. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*. 2011;34(5):794-806.
215. Nieuwenhuis EE, Visser MR, Kavelaars A, Cobelens PM, Flier A, Harmsen W, et al. Oral antibiotics as a novel therapy for arthritis: evidence for a beneficial effect of intestinal *Escherichia coli*. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(11):2583-9.
216. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity reviews*. 2004;3(5):394-400.
217. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature immunology*. 2002;3(8):715-20.

218. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Journal of the Indian Medical Association*. 2009;107(6):403-5.
219. Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M. probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic acids research*. 2007;35(Database issue):D800-4.
220. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Wang Y, Begum-Haque S, Dasgupta S, Kasper DL, et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal immunology*. 2010;3(5):487-95.
221. Vaahtovuori J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(8):1500-5.
222. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
223. Amann RL, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology*. 1990;172(2):762-70.
224. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4523-7.
225. Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-flavobacter-bacteroides* in the natural environment. *Microbiology (Reading, England)*. 1996;142 (Pt 5):1097-106.
226. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and environmental microbiology*. 1995;61(8):3069-75.
227. Bohnert J, Hubner B, Botzenhart K. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *International journal of hygiene and environmental health*. 2000;203(1):77-82.
228. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(9):3336-45.
229. Suau A, Rochet V, Sghir A, Gramet G, Brewaeys S, Sutren M, et al. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Systematic and applied microbiology*. 2001;24(1):139-45.

230. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 1995;70(5):220-33.
231. McNamara G, Gupta A, Reynaert J, Coates TD, Boswell C. Spectral imaging microscopy web sites and data. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2006;69(8):863-71.
232. Spring K DM. Introduction to fluorescence microscopy. . Nikon Microscopy, retrieved. 2011.
233. Swidsinski A. Standards for bacterial identification by fluorescence In situ hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(8):824-6; author reply 6-7.
234. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(9):1285-91.
235. Badami E, Sorini C, Coccia M, Usuelli V, Molteni L, Bolla AM, et al. Defective differentiation of regulatory FoxP3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(8):2120-4.
236. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(4):331-41.
237. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(8):1381-94.
238. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1757-64.
239. Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Jarbrink M, Waldenstrom J, Adlerberth I, Wold AE, et al. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(7):4360-70.
240. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(6):478-85.
241. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*. 2009;31(4):677-89.

242. Bauer H, Horowitz RE, Levenson SM, Popper H. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. The American journal of pathology. 1963;42:471-83.
243. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell. 2005;122(1):107-18.
244. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature reviews Immunology. 2009;9(5):313-23.
245. Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host-bacterial symbiosis in health and disease. Advances in immunology. 2010;107:243-74.
246. Zhang LL, Chen X, Zheng PY, Luo Y, Lu GF, Liu ZQ, et al. Oral Bifidobacterium modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. Journal of gastroenterology and hepatology. 2010;25(5):928-34.
247. Livingston M, Loach D, Wilson M, Tannock GW, Baird M. Gut commensal Lactobacillus reuteri 100-23 stimulates an immunoregulatory response. Immunology and cell biology. 2010;88(1):99-102.
248. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell. 2009;139(3):485-98.
249. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(43):16731-6.
250. Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. Cell host & microbe. 2008;4(4):337-49.
251. Ouwehand AC, Bergsma N, Parhiala R, Lahtinen S, Gueimonde M, Finne-Soveri H, et al. Bifidobacterium microbiota and parameters of immune function in elderly subjects. FEMS immunology and medical microbiology. 2008;53(1):18-25.
252. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(10):4152-7.
253. Stoecker K, Dorninger C, Daims H, Wagner M. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. Applied and environmental microbiology. 2010;76(3):922-6.
254. Bamias G, Clark DJ, Rivera-Nieves J. Leukocyte Traffic Blockade as a Therapeutic Strategy in Inflammatory Bowel Disease. Current drug targets. 2013.

255. Soderholm JD, Olaison G, Lindberg E, Hannestad U, Vindels A, Tysk C, et al. Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut*. 1999;44(1):96-100.
256. Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, McElree C, Delahunty T, Dadufalza VD, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology*. 1989;97(4):927-31.
257. Qin X. Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(15):1708-22.
258. Matricon J. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease]. *Medecine sciences : M/S*. 2010;26(4):405-10. Immuno- pathogenese des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.
259. Johansson ME, Gustafsson JK, Sjoberg KE, Petersson J, Holm L, Sjovall H, et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PloS one*. 2010;5(8):e12238.
260. Moehle C, Ackermann N, Langmann T, Aslanidis C, Kel A, Kel-Margoulis O, et al. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2006;84(12):1055-66.
261. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006;131(1):117-29.
262. Bergstrom A, Kristensen MB, Bahl MI, Metzdorff SB, Fink LN, Frokiaer H, et al. Nature of bacterial colonization influences transcription of mucin genes in mice during the first week of life. *BMC research notes*. 2012;5:402.
263. Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, Gendler SJ, Velcich A, Lundberg JO, et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(2):G327-33.
264. Subramani DB, Johansson ME, Dahlen G, Hansson GC. Lactobacillus and Bifidobacterium species do not secrete protease that cleaves the MUC2 mucin which organises the colon mucus. *Beneficial microbes*. 2010;1(4):343-50.
265. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(10):3854-9.
266. Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrom K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM, et al. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(7):4153-5.

267. Scanlan PD, Shanahan F, O'Mahony C, Marchesi JR. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(11):3980-8.
268. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
269. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5728):1635-8.
270. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5778):1355-9.
271. Wagenfeld K. Occurrence of bifidobacteria in the stool of multiple sclerosis patients. *Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology*. 1991;275(4):541-8.
272. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55(2):205-11.
273. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008;455(7216):1109-13.
274. Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu HJ, Benoist C, Mathis D. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(28):11548-53.
275. Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*. 2010;32(6):815-27.
276. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1999;29(3):342-6.
277. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;107(1):129-34.
278. Thompson-Chagoyan OC, Fallani M, Maldonado J, Vieites JM, Khanna S, Edwards C, et al. Faecal microbiota and short-chain fatty acid levels in faeces from infants with cow's milk protein allergy. *International archives of allergy and immunology*. 2011;156(3):325-32.

279. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4615-22.
280. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, et al. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(10):6041-50.
281. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Haque-Begum S, Kasper LH. Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora. *Gut microbes*. 2010;1(2):103-8.
282. Lavasani S, Dzhambazov B, Nouri M, Fak F, Buske S, Molin G, et al. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PloS one*. 2010;5(2):e9009.
283. Takata K, Kinoshita M, Okuno T, Moriya M, Kohda T, Honorat JA, et al. The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PloS one*. 2011;6(11):e27644.
284. Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6032):974-7.
285. Sjogren YM, Tomicic S, Lundberg A, Bottcher MF, Bjorksten B, Sverremark-Ekstrom E, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(12):1842-51.
286. Clavel T, Henderson G, Alpert CA, Philippe C, Rigottier-Gois L, Dore J, et al. Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(10):6077-85.
287. Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2004;80(1):14-25.
288. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. *The New England journal of medicine*. 1998;339(5):285-91.
289. Finkelsztejn A, Brooks JB, Paschoal FM, Jr., Fragoso YD. What can we really tell women with multiple sclerosis regarding pregnancy? A systematic review and meta-analysis of the literature. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2011;118(7):790-7.

290. Voskuhl RR, Palaszynski K. Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2001;7(3):258-70.
291. Garay L, Deniselle MC, Lima A, Roig P, De Nicola AF. Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;107(3-5):228-37.
292. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2010;63(6):601-10.
293. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, et al. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *Journal of cellular physiology*. 2008;214(2):456-64.
294. Libby EK, Pascal KE, Mordechai E, Adelson ME, Trama JP. *Atopobium vaginae* triggers an innate immune response in an in vitro model of bacterial vaginosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2008;10(4):439-46.
295. Marconi C, Donders GG, Parada CM, Giraldo PC, da Silva MG. Do *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? *Sexually transmitted infections*. 2013;89(2):167-73.
296. Hoskins LC, Boulding ET. Mucin degradation in human colon ecosystems. Evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. *The Journal of clinical investigation*. 1981;67(1):163-72.
297. Rosen SD, Chi SI, True DD, Singer MS, Yednock TA. Intravenously injected sialidase inactivates attachment sites for lymphocytes on high endothelial venules. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1989;142(6):1895-902.
298. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(10):5810-7.
299. Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1996;55(3):937-43.
300. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1619-25.
301. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental microbiology*. 2010;12(2):304-14.
302. Vermeiren J, Van den Abbeele P, Laukens D, Vigsnaes LK, De Vos M, Boon N, et al. Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale*

species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment. *FEMS microbiology ecology*. 2012;79(3):685-96.

303. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(4):279-90.

304. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4578-85.

305. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*. 2007;5(7):e177.

306. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.

307. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Dore J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*. 2009;9:123.

308. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;30(1):61-7.

309. Tsuji H, Oozeer R, Matsuda K, Matsuki T, Ohta T, Nomoto K, et al. Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Beneficial microbes*. 2012;3(2):113-25.

310. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early human development*. 2010;86 Suppl 1:13-5.

311. Huurre A, Kalliomaki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):236-40.

312. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(1):77-84.

313. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernandez N, Solis G, Hernandez-Barranco A, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS microbiology ecology*. 2012;79(3):763-72.

314. Maghzi AH, Etemadifar M, Heshmat-Ghahdarjani K, Nonahal S, Minagar A, Moradi V. Cesarean delivery may increase the risk of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2012;18(4):468-71.

315. Niino Y. The increasing cesarean rate globally and what we can do about it. *Bioscience trends*. 2011;5(4):139-50.
316. Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiology and immunology*. 2003;47(8):557-70.
317. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(2):1027-33.
318. Makivuokko H, Tiihonen K, Tynkkynen S, Paulin L, Rautonen N. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *The British journal of nutrition*. 2010;103(2):227-34.
319. Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, et al. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental microbiology*. 2009;11(7):1736-51.
320. Zwieler J, Liszt K, Handschur M, Lassi C, Lapin A, Haslberger AG. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. *Experimental gerontology*. 2009;44(6-7):440-6.
321. Hopkins MJ, Macfarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection. *Journal of medical microbiology*. 2002;51(5):448-54.
322. Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PloS one*. 2010;5(5):e10667.
323. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (New York, NY)*. 2008;320(5883):1647-51.
324. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*. 2009;1(6):6ra14.
325. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14691-6.
326. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, NY)*. 2011;334(6052):105-8.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Rejmus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Räumliche Organisation der fäkalen Bakterien bei Patienten mit multipler Sklerose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. med. Yvonne Dörffel für die Überlassung des Themas, die Übernahme der Betreuung, die kritische Begutachtung der Dissertationsschrift und vor allem für Ihre endlose Geduld. Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Karl Baum danke ich für die organisatorische Betreuung des gesamten Projektes. Dem gesamten Team des Ambulanten MS-Zentrums in Hennigsdorf für Ihre Unterstützung in der Rekrutierungsphase der Studie. Frau Gabriele May danke ich für Ihre Hilfe und Begleitung bei meinen ersten Schritten im Labor. Professor Dr. med. Markus Magerl danke ich für die vielen praktischen Hinweise bei der Verfassung der Arbeit. Johannes Schilling und Murat Karaman gilt mein Dank für ihre Beratung in statistischen Fragen. Zahlreichen Freunden und Bekannten für immer unterstützende Worte und viele hilfreiche Tipps. Nicht zuletzt und ohne große Worte gilt mein ganz besonderer Dank meiner Ehefrau Ewa.

Widmung

Meinen Eltern