

Neurologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Conrad)

Fokale Leukoenzephalitis der Ratte
durch intrazerebrale Injektion von Enterotoxinen
und periphere Injektion aktivierter Milzzellen
als Tiermodell der Multiplen Sklerose

Carolin Ganz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation 1. Priv.-Doz. Prof. Dr. Dr. Chr. Franke
2. Univ.-Prof. Dr. B. Conrad

Die Dissertation wurde am 21.01.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2002 angenommen.

Inhalt

1.	Einleitung	Seite 5
1.1	Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose	
1.2	Histologische Besonderheiten	
1.3	Klinische Symptomatik und Verlauf	
1.4	Diagnostik	
1.5	Immunologie der Blut-Hirnschranke (BHS)	
1.6	Pathogenese der Entzündungsreaktion	
1.7	Aktivierung des Immunsystems	
1.8	Pathogenese der Entmarkung und Gewebedestruktion	
1.9	Mechanismen der Remyelinisierung	
1.10	Superantigene und ihre Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen	
1.11	Tiermodelle	
1.11.1	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE)	
1.11.2	Theiler Virus Enzephalomyelitis (TVME)	
1.11.3	Vergleich der bisherigen Tiermodelle und deren Bedeutung für die MS	
1.12	Zielsetzung der Studie	
2.	Material und Methoden	Seite 20
2.1	Superantigene	
2.2	TSST 1	
2.3	Concanavalin A	
2.4	Nährmedium	
2.5	PBS	
2.6	Ammoniumchlorid	
2.7	Tiere	
2.8	Operationen	
2.8.1	Intrazerebrale Inokulation des Superantigens	
2.8.2	Intravenöse Injektion von aktivierten Lymphozyten	
2.9	Gehirnentnahmen und Erstellung der histologischen Schnitte	
2.10	Milzentnahmen und Aufbereitung der Lymphozyten	
2.11	Statistische Auswertung	

3. Ergebnisse	Seite 28
3.1 Superantigenwirkung per se	
3.1.1 Vergleich der Superantigene SEA, SEE, SEB mit TSST1 und Kochsalz	
3.1.2 Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Konzentration des Superantigens	
3.1.3 Beobachtung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf	
3.2 Superantigenwirkung im Zusammenspiel mit peripher injizierten T-Zellen	
3.2.1 T- Zellproliferation nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen	
3.2.2 Vergleich der Superantigene SEA und SEB mit Kochsalz	
3.2.3 Beobachtung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf	
3.2.4 Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Konzentration des Superantigens	
3.2.5 Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Menge der T-Zellen	
3.3 Vergleich der Entzündungsreaktion mit und ohne periphere Injektion von T-Zellen	
3.4 Ergebnisse der Liquor und - Blutuntersuchungen	
4. Diskussion	Seite 43
4.1 Wanderung von Immunzellen ins Gehirn	
4.2 Superantigenenzephalitis	
4.2.1 Verlauf der Leukoenzephalitis	
4.2.2 Intensität der Leukoenzephalitis	
4.3 Rolle der myelinspezifischen T-Zellen	
4.4 Modellvorstellung	
4.4.1 Einfluss von Retrovirus und Superantigenen auf den Verlauf der MS	
4.4.2 Einfluss der Superantigene auf die labortechnischen Besonderheiten der MS	
4.5 Wissenschaftliche und therapeutische Perspektiven	
5. Schlussfolgerung	Seite 49
6. Zusammenfassung	Seite 50
7. Literatur	Seite 52
8. Danksagung	Seite 60

Abbildungen

1.1	Bluthirnschranke	Seite 11
1.2	TCR-SA-MHC Interaktion	Seite 15
2.1	Rattenhirn schematisch	Seite 23
2.2	Gehirnschnitt mit entzündlich veränderten Gefäßen	Seite 24
2.3	Platte mit Mitogenen	Seite 26
3.1	Schnitt ohne entzündlich veränderte Gefäße	Seite 28
3.2	Schnitt mit entzündlich veränderten Gefäßen	Seite 28
3.3	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der SA Konzentration	Seite 30
3.4	Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf, SEA	Seite 32
3.5	Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf, SEE	Seite 32
3.6	Histologisches Bild: entzündliche Infiltration von Gefäßen	Seite 33
3.7	Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf, nach T-Zellinjektion	Seite 37
3.8	Gehirnschnitt mit entzündlich infiltrierten Gefäßen	Seite 37
3.9	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der SA Konzentration bei konstanter T-Zellmenge	Seite 39
3.10	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Anzahl der T-Zellen bei konstanter SA Konzentration	Seite 40
3.11	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Anzahl der T-Zellen	Seite 41
3.12	Vergleich der Entzündungsreaktion mit und ohne T-Zellinjektion	Seite 42

Tabellen

3.1.	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der SA Konzentration	Seite 29
3.2	Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf, SEA und SEE	Seite 30
3.3	Lymphozytenproliferation unter verschiedenen Mitogenen	Seite 34
3.4	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der SA Konzentration nach T-Zellinjektion	Seite 35
3.5	Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf, nach T-Zellinjektion	Seite 36
3.6	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der SA Konzentration bei konstanter T-Zellmenge	Seite 38
3.7	Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Anzahl der T-Zellen bei konstanter SA Konzentration	Seite 40

1. Einleitung

1.1 Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose, oder auch Enzephalomyelitis disseminata ist eine entzündlich demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Noch ist die Ätiologie weitgehend unbekannt, jedoch spielen genetische, immunologische sowie Umweltfaktoren eine Rolle. Man geht von einer Attacke autoreaktiver T-Zellen gegen das zentrale Nervensystem aus, was zu einer chronischen Entzündungsreaktion und schließlich zu vorherrschender Destruktion der Myelinscheiden und Oligodendrozyten führt (Storch und Lassmann, 1997).

Der zumindest zum Teil genetische Ursprung der Erkrankung wurde durch zahlreiche Familienstudien sowie Prävalenzvergleiche von unterschiedlichen ethnischen Gruppen nachgewiesen. Während die Prävalenz in Nordamerika und Nordeuropa durchschnittlich bei 60/100.000 liegt, sind gerade Ureinwohner wie Indianer, Eskimos oder die Bantu Afrikaner so gut wie gar nicht betroffen (Waksman et al., 1984). Diesen geographischen Unterschieden könnten natürlich sowohl genetische als auch umweltbedingte Ursachen zugrundeliegen. Migrationsstudien zeigten in diesem Zusammenhang z.B. eine niedrige Prävalenz bei erwachsenen Japanern von 2 bis 4 pro 100.000 unabhängig ihres Wohnortes. Jedoch wurde gezeigt, dass bei einem Umzug vor der Pubertät die Prävalenz der neuen Heimat erworben wird, während nach der Pubertät die Prävalenz des Geburtslandes beibehalten bleibt (Dean et al., 1976 und 1971). Dies bedeutet, dass neben den unbestrittenen genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren zum Krankheitsausbruch beitragen. In diversen Familienstudien wurde bei 13-19% der MS Patienten eine positive Familienanamnese beschrieben (Sadovnick et al., 1988; Ebers GC., 1983). Dabei waren vor allem Verwandte ersten Grades betroffen, aber auch Verwandte zweiten und dritten Grades scheinen einem erhöhten Erkrankungsrisiko ausgesetzt zu sein (Oksenberg et al., 1997). Ein wichtiger Hinweis auf eine genetische Ursache ist die 26%ige Konkordanz zwischen monozygoten Zwillingen, während sie bei dizygoten Zwillingen den 2,3% der normalen Geschwister entspricht (Ebers et al., 1986). In Magnetresonanztomographie Studien wurde bei zwei Fünftel der monozygoten Zwillinge zumindest eine subklinische MS festgestellt. Die dennoch unvollständige Konkordanz zwischen monozygoten Zwillingen lässt eine multifaktorielle Pathogenese der Multiplen Sklerose vermuten, an der sowohl multiple Gene als auch Umweltfaktoren beteiligt sind.

Gene, die mit der MS in Verbindung gebracht wurden, sind neben dem α 1 Antitrypsin vor allem die HLA Gene sowie die T-Zellrezeptorgene (McCombe et al., 1985; Pandey et al., 1981; Boylan et al., 1990). Schon lange ist ein Zusammenhang mit den HLA-A3 und HLA-B7 Genen auf Chromosom 6 bekannt. Erst später entdeckte man zumindest bei der schubweise remittierenden MS die stärkere Verknüpfung zu den HLA II Molekülen (Tiwari et al., 1985), wogegen für den primär chronischen Verlauf keine eindeutigen Assoziationen belegt sind (Thompson et al., 1997). Dabei ist das HLA-DR2 Gen vor allem in Nordeuropa und Amerika vorherrschend, während andere HLA-DR Typen mit unterschiedlichen ethnischen Gruppen verknüpft sind (Marrosu et al., 1988; Kurdi et al., 1977; Naito et al., 1978; Gorodezky et al., 1986). Neben HLA-DQB1 werden außerdem die Gene DQw6 sowie DQ α und DQ β mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht.

Neben der genetischen Disposition ist man heute der Annahme, dass letztlich Umweltfaktoren zum Durchbruch der Erkrankung führen. Beweise hierfür fand man in epidemiologischen Studien. Da ist zum einen die geographische Verteilung der MS, deren Prävalenz in kühleren Klimazonen beider Hemisphären deutlich erhöht ist. Zudem das schon erwähnte Phänomen der Prävalenzunterschiede bei Migration vor bzw. nach der Pubertät. Weiterhin sind z.B. auf den Faröer Inseln Epidemien der Erkrankung beschrieben worden (Kurtzke et al., 1979). All dies lässt vermuten, dass eine im Kindesalter erworbene Infektion letztlich zum späteren Ausbruch der Erkrankung führen könnte. In diesem Zusammenhang werden neben den schon länger diskutierten Viren, wie Masern, EBV oder das Hundestaubevirus (Edwards et al., 1998), auch das Humane Herpesvirus 6 oder Chlamydia pneumoniae verdächtigt (Willer and Ebers, 2000). Auch Retroviren wie das Humane T-Zell Lymphom Virus (HTLV-1) werden als mögliche Auslöser der MS diskutiert (z.B. Meinl, 1999). Die durch das Visna Virus oder Theilers Virus ausgelöste Enzephalomyelitis diente z.B. als eines der ersten Tiermodelle für die MS. Anhand der Aktivität seiner reversen Transkriptase im Liquor von MS Patienten wurde erst kürzlich ein neues Retrovirus als Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus (MSRV) bekannt (Perron et al., 1997). Jedoch konnte bislang keines der Viren als eindeutiger Auslöser der MS identifiziert werden.

1.2 Histologische Besonderheiten

Morphologisches Korrelat der Erkrankung sind die sogenannten Plaques, die grundsätzlich überall in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems vorkommen können. Es gibt jedoch einige Prädilektionstellen, wie die periventrikuläre weiße Substanz, das Corpus callosum oder den Sehnerv sowie die Sehbahn. Im Rückenmark sind vor allem die Hinterstränge und die lateralen Bereiche des Halsmarks betroffen (Lucchinetti et al., 1996). In neueren Studien wurden allerdings auch Plaques in der grauen Substanz beschrieben (Kidd et al., 1999). Makroskopisch erscheinen die Plaques scharf begrenzt und heben sich je nach Alter auch farblich vom gesunden Gewebe ab (Martin et al., 1992). Frische Plaques erscheinen eher rötlich glänzend während ältere chronische Plaques eher gräulich aussehen. Histologisch erkennt man umschriebene Bezirke der Demyelinisierung mit intakten nackten Axonen. Oligodendrozyten sind noch vorhanden, jedoch verringert sich ihre Anzahl im Laufe der Entzündung. Die entzündlichen Infiltrate befinden sich vor allem perivenös und unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung je nach Alter des Plaques. Akute Plaques bestehen hauptsächlich aus nackten Axonen, umgeben von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen (Raine CS., 1983). Eine genauere Differenzierung der Lymphozyten ergab einen großen Anteil an CD4 positiven Zellen am Rand und CD8 positiven Zellen im Zentrum der Plaques (Traugott et al., 1983). Die Expression von Interleukin 2 Rezeptoren und MHC II auf ihrer Oberfläche deutet auf einen aktiven immunologischen Prozess hin (Hofman et al., 1986). Sie produzieren außerdem Interferon γ , welches die MHC II Expression auf Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten induziert (Traugott et al., 1983). Die Demyelinisierung geht wohl hauptsächlich von Makrophagen aus, welche über oberflächliche Vesikel die jeweils äußeren Lamellen der Myelinscheide phagozytieren (Raine CS., 1983). An der endgültigen Zerstörung der Myelinscheide sind neben Immunglobulinen auch Komplementfaktoren und proteolytische Enzyme beteiligt (Sanders et al., 1986). Chronische Plaques zeichnen sich dagegen durch eine geringere entzündliche Infiltration aus, dafür stehen eine reaktive Fasergliose und Versuche einer Remyelinisierung im Vordergrund. Die T-Lymphozyten tragen jetzt eher γ/δ Rezeptoren, zudem wurden Hitzeschockproteine identifiziert (Selmaj et al., 1991).

1.3 Klinische Symptomatik und Verlauf

Die entzündlichen Veränderungen im Rahmen der Multiplen Sklerose führen schließlich zu großen, zum Teil konfluierenden Herden der Demyelinisierung. Obwohl die Axone der betroffenen Nervenscheiden anfangs relativ intakt bleiben, zeichnet sich im Laufe der chronisch progressiven Erkrankung doch eine zunehmende Axondegeneration und -atrophie ab. Diese sind vermutlich wesentlich für die neurologischen Ausfälle verantwortlich (Storch und Lassmann, 1997).

Die Klinik der Multiplen Sklerose ist entsprechend der PlaquerVerteilung sehr unterschiedlich. Jedoch gibt es bestimmte Symptome, die in fast allen fortgeschrittenen Fällen der MS zu finden sind. Dazu gehören spastische Paresen, Gang- und Extremitätenataxie, zentrale Visusminderung, Doppelbilder, Paraesthesien, Dysarthrie, Blasen- und Sexualstörungen und allgemeine Abgeschlagenheit. Diese Symptome sind zwar nicht einzig für die MS spezifisch, jedoch sind sie in ihrer Kombination typisch und sollten einen Hinweis auf die Diagnose MS geben. Relativ spezifische, dafür aber seltenere Symptome dagegen sind das Lhermitte Symptom (Kribbelparästhesien an Händen und Dysästhesien über der Wirbelsäule bei maximaler passiver Kopfbeugung), Gesichtsmuskulaturkrämpfe, tonische Spasmen und bestimmte Augenmuskelparesen, wie z.B. die internukleäre Ophthalmoplegie.

Die ersten Krankheitszeichen treten bei Beginn im Erwachsenenalter meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf. Gerade in Gebieten mit hoher Prävalenz steigt die Häufigkeit des Krankheitsbeginns in der Adoleszenz stark an, erreicht ihr Maximum um das 30. Lebensjahr und fällt dann bis zum 50. Lebensjahr wieder ab. Bei lediglich 11% liegt der Krankheitsbeginn vor dem 20. Lebensjahr, bei nur 7% nach dem 50. Jahr (Jürg Kesselring, 1993). Bei Frauen liegt der Beginn mit durchschnittlich 31 Jahren circa drei Jahre früher als bei Männern.

Die Multiple Sklerose kann von einem primär schubförmigen in einen sekundär chronisch progredienten Verlauf übergehen (ca. 59% der Fälle), oder aber von Beginn an chronisch progredient verlaufen, ohne dass man einzelne Schübe abgrenzen könnte (ca. 18% der Fälle). Unter einem Schub versteht man neue oder wieder aufgetretene Krankheitsmanifestationen, die länger als 48 Stunden anhalten und in mindestens sechs monatigem Abstand zum letzten Schub auftreten. Die Angaben zur durchschnittlichen Häufigkeit der Schübe schwanken zwischen 0,2 und 1,15 pro Jahr. Auslöser eines Schubes scheinen vor allem Infektionen zu sein, so stellten Edwards et al., 1998 einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Infektionen des oberen Respirationstraktes und Exazerbationen der Erkrankung fest. Jedoch werden auch

perimenstruelle oder peripartale Schübe vermehrt beobachtet. Besonders Interferon γ scheint eine schubauslösende Wirkung zu haben (Panitch et al., 1987). Unter einer vollständigen Remission versteht man eine komplette Rückbildung der im Schub aufgetretenen Symptome. Sie tritt in etwa der Hälfte der Fälle ein, während unvollständige Remissionen und fehlende Rückbildung zu je einem Viertel der Fälle beobachtet werden. Prinzipiell hängt die Rückbildungstendenz vom Schweregrad und der Dauer des Schubes ab, dabei haben schwere kurze Schübe die besten Remissionschancen. Ein primär chronisch-progredienter Verlauf der Multiplen Sklerose findet sich häufiger bei einem Krankheitsbeginn im höheren Lebensalter. Häufig beginnt diese Verlaufsform mit einer progredienten spastischen Paraparese, jedoch treten multiple Läsionen im Gehirn mit den entsprechenden Ausfällen im gleichen Maße auf wie bei den anderen Verlaufsformen. Letztlich spricht man von einem remittierend-progredienten Verlauf, wenn eine chronische Progredienz der Symptomatik nach frühestens zehn Jahren eines schubförmigen Verlaufs zu beobachten ist. Die Prognose der Erkrankung hängt entscheidend von der Verlaufsform und vom Alter bei der Erstmanifestation ab. Der Behinderungsgrad des Patienten wird international nach dem Kurtzke Score eingestuft, der sich nach der möglichen Gehstrecke des Patienten richtet. Die mittlere Krankheitsdauer bis zur irreversiblen Schädigung, vereinbar mit dem Kurtzke Score 4 (eingeschränkte Gehfähigkeit, aber mehr als 500 Meter möglich) ist beim schubförmigen Verlauf mit 11,4 Jahren signifikant länger als beim progredientem Verlauf (0 Jahre). Demgegenüber ist der Verlauf von Kurtzke Score 4 auf Kurtzke Score 6 (Gehstrecke ca. 100m) bei beiden Krankheitsverläufen mit 5,7 bzw. 5,4 Jahren in etwa gleich. Ebenso ist die Entwicklung von Kurtzke Score 4 ab beim primär progressiven Verlauf der Erkrankung unabhängig von überlagerten Schüben (Confavreux et al., 2000). Durchschnittlich liegt die Krankheitsdauer bei mindestens 25 bis 30 Jahren.

1.4 Diagnostik

Für die sichere Diagnose der Multiplen Sklerose wird in der Regel der Nachweis von mindestens zwei verschiedenen lokalisierten Läsionen gefordert. Eine Ausnahme stellt eine einzelne Läsion nur dann dar, wenn im Liquor oligoklonale Banden festzustellen sind und anamnestisch mindestens zwei Schübe eruiert werden können. Neben den klinischen Anzeichen einer Läsion, die durch Neurostatus erhoben werden, dienen vor allem elektrophysiologische Untersuchungen, Liquordiagnostik sowie die

Magnetresonanztomographie (MRT) zur eindeutigen Feststellung der Diagnose. Im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchungen geben die evozierten Hirnpotentiale Aufschluss über mögliche Läsionen. Dabei werden mittels Oberflächenelektroden visuell, akustisch oder somatosensibel evozierte Potentiale abgeleitet, welche im pathologischen Fall mit verzögerter Latenz und verringerter Amplitude auftreten. Ähnlich lassen sich auch mit Magnetstimulation transkortikal und radikulär motorisch evozierte Potentiale ableiten und so Aussagen hinsichtlich der Leitung in der Pyramidenbahn machen. Das sicherste Verfahren zur Feststellung von Läsionen stellt jedoch die MRT dar. Mit einer Sensitivität von 98,5% lassen sich mithilfe der T₂-Wichtung oder der FLAIR Wichtung im MRT die hellen Läsionen in der dunkel erscheinenden ‚weißen‘ Substanz nachweisen. Das charakteristische MRT- Bild des MS-Patienten zeigt demnach multifokale, unregelmäßig begrenzte, vor allem periventrikulär und im Balken gelegene Läsionen (Jürg Kesselring, 1993). Als Aktivitätsmarker für entzündliche Plaques wird das Kontrastmittel Gadolinium-DTPA benutzt. Es kann sich in aktiven Plaques anreichern, da dort die Permeabilität der Bluthirnschranke gestört ist. Teilweise erscheinen diese Anreicherungen noch bevor eine Signalveränderung in der T₂-Wichtung entsteht (Capra et al., 1992).

Zu den wichtigsten Liquorbesonderheiten gehört die autochthone Synthese von Immunglobulin G. Diese kann sehr sensitiv über den Nachweis oligoklonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung gesichert werden. Etwas weniger sensitiv ist der Delpech – Lichtblau – Quotient, für den z.B. Reiber empirische Normwerte erstellt hat (Reiber, 1987). Das Liquorprofil nach Tourtellotte und Walsh von 1984 geht von folgenden Werten aus:

- Aussehen: klar und farblos
- Druck: normal (< 20 cm H₂O)
- Zellzahl: in 66% der Fälle normal (< 5 Zellen/mm³), ab Zellzahlen > 50 Zellen/ mm³ Diagnose unwahrscheinlich
- Albumin: in 77% der Fälle normal (< 55g/l)
- Delpech-Lichtblau-Quotient: (IgG im Liquor x Albumin im Serum)/ (IgG im Serum x Albumin im Liquor) in 90% < 0,7 (normal < 0,66)
- Oligoklonale Banden: in > 90% der Fälle vorhanden
- IgG Neusynthese pro Tag: in 90% erhöht (normal 3mg/Tag)
- MBP im Liquor: abhängig vom Schub in 50-70% der Fälle erhöht

Oligoklonale Banden entsprechen intrathekal produzierten Antikörpern von wenigen Plasmazellklonen. Die Auftrennung der Immunglobuline erfolgt am sensitivsten durch die isoelektrische Fokussierung (Ebers 1984), falsch positive Befunde finden sich in weniger als

10% der Fälle. Von Bedeutung ist ein positiver Befund vor allem bei monosymptomatischen Läsionen, der dann die Diagnose MS zulässt und mit einer häufigeren Dissemination der Plaques einhergeht.

Der Nachweis von basischem Myelinprotein (MBP) im Liquor hängt vom Ausmaß der Demyelinisierung ab. Patienten, bei denen MBP auch während der Remission nachweisbar bleibt, erleiden häufiger einen erneuten Schub (Thompson et al., 1985).

Zu berücksichtigen bleibt, dass die Werte dieses Liquorprofils vor allem in der Kombination aussagekräftig werden, zusammen sichern sie die Diagnose zu 95%.

1.5 Immunologie der Blut-Hirnschranke (BHS)

Das zentrale Nervensystem wurde lange als immunologisch privilegiertes Organ angesehen, geschützt von der Immunüberwachung der BHS (Brocke et al., 1996). Die BHS besteht hauptsächlich aus den Endothelzellen der Hirnkapillaren. Diese sind im Gegensatz zu anderen Kapillaren durch tight junctions mit hohem elektrischen Widerstand verbunden, welche im gesunden Zustand undurchlässig für Blutzellen und Moleküle größer 20 kDa sind. Aufgrund ihres hohen Energiebedarfs besitzen sie zahlreiche Mitochondrien. Auf der luminalen Seite sind die Endothelzellen zusätzlich von einer Glykokalyx überzogen, welche eine negative Ladung aufrechterhält. Zur ZNS- Seite hin schließt sich eine Basallamina mit kontraktilen Zellen, sogenannten Perizyten an. Ferner lagern sich zahlreiche Astrozytenfortsätze an, welche über bestimmte Faktoren die Bildung der tight junctions induzieren können (Selmaj K., 1996), und damit von wesentlicher Bedeutung für die Impermeabilität der BHS sind.



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Bluthirnschranke. Aus Weller et al., 1966.

Jedoch besitzt die BHS mehrere Transportwege, mit Hilfe derer nicht zelluläre Stoffe ins Gehirn gelangen können. Durch Diffusion gelangen Gase und fettlösliche Stoffe ins Gehirn, darunter fallen auch manche zentral wirksame Medikamente wie Diazepam oder Phenobarbital, außerdem Ethanol. Auch Wasser diffundiert durch die BHS hindurch. Weniger fettlösliche Stoffe werden dagegen über ein Carrier- vermitteltes System transportiert. Glucose, der wichtigste Energielieferant des Gehirns wird über einen Endothelständigen Carrier namens GLUT 1 eingeschleust (Selmaj K., 1996). Auch essentielle Aminosäuren, Choline und Vitamine gelangen auf diesem Weg ins Gehirn. Weitere Transportsysteme sind die Pinozytose und die Rezeptor vermittelte Transzytose, mit der hauptsächlich Proteine, das heißt auch Immunglobuline die BHS überqueren (Selmaj K., 1996). Während diese Transportmechanismen einen Teil der intakten BHS darstellen, treten gerade im Rahmen entzündlicher Prozesse Veränderungen an der BHS auf, welche deren Impermeabilität schwächen können. Verschiedene Faktoren, u.a. Entzündungszellen und deren Zytokine, bewirken ein Lösen der tight junctions in sogenannte Endothelvenolen, das sind Tunnel ähnliche Strukturen, durch welche Lymphozyten wandern können (Selmaj K., 1996). Es entstehen außerdem Poren, die den Fenestrae der übrigen Kapillaren ähneln (Selmaj K., 1996). Es wird allerdings angenommen, dass Lymphozyten mit Hilfe proteolytischer Enzyme auch auf direktem Wege durch die Endothelzellen gelangen können. Es wurde gezeigt, daß z.B. MBP spezifische T-Zell-Linien MHC II positive Endothelzellen lysieren und so schnell ins Gehirn eindringen können (Selmaj K., 1996). Es werden vor allem Metalloproteinasen diskutiert, die die Basalmembran auflösen und so die Migration ermöglichen.

1.6 Pathogenese der Entzündungsreaktion

Unter physiologischen Umständen, das heißt bei intakter BHS können T-Zellen die BHS kaum überwinden (Wekerle et al., 1986). Allerdings kann die Zahl der einwandernden T-Zellen durch vorangehende Aktivierung um ein vielfaches gesteigert werden (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991). Dabei ist lediglich die Aktivierung selbst entscheidend und nicht die Antigenpezifität. Dennoch wandern ZNS spezifische Zellen, z.B. gegen MBP gerichtete Zellen, früher ins Parenchym ein und verbleiben vorwiegend perivaskulär, während unspezifisch aktivierte T-Zellen erst später einwandern und dafür weiter ins Gehirn vordringen (Selmaj K., 1996). Unabhängig vom Grad der Aktivierung überwinden Lymphozyten die BHS mit Hilfe verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der

Endotheloberfläche. Dies sind zum einen die Selektine, die für das sog. Lymphozyten-Rolling verantwortlich sind und damit wichtig für schnelles Anhaften und Ablösen von der Gefäßwand (Selmaj K., 1996). Zum anderen exprimieren aktivierte Lymphozyten Integrine, welche an bestimmte Endothelimmunglobuline binden können (Selmaj K., 1996). Es wurde gezeigt, dass das Integrin $\beta 1$, VLA-4, welches an das vaskuläre Adhäsionsmolekül (VCAM-1) aus der Immunglobulingruppe bindet, von großer Bedeutung für das sogenannte Lymphozyten Homing ist (Selmaj K., 1996). Andere wichtige Adhäsionsmoleküle sind die Adressine, welche wohl als Liganden für Lymphozyten Homing Rezeptoren dienen (Selmaj K., 1996) und die Cadherine, verantwortlich für Gewebisdifferenzierung (Selmaj K., 1996). Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass während der Entzündungsphase in der EAE die Expression der Immunglobuline ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1) und VCAM-1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül 1) wesentlich ansteigt und damit auch die Lymphozyteninfiltration korreliert (Selmaj K., 1996).

Nach ihrer Adhäsion können die aktivierten T- Zellen also die BHS überwinden und ins Hirnparenchym eindringen. Dieser Prozess ist zwar abhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen, nicht jedoch von ihrer Antigenpezifität. Ein Entzündungsherd entsteht jedoch nur dann, wenn diese T-Zellen im Nervensystem ihr passendes Antigen auf MHC II Molekülen präsentiert vorfinden. In diesem Fall werden Entzündungsmediatoren wie Interleukin 2, Interferon- γ und Tumor Nekrose Faktor α gebildet, welche eine massive Expression von MHC II Molekülen auf der Endothelzelloberfläche induzieren. Dadurch kommt es zur Rekrutierung von hämatogenen Immunzellen und zum Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke. Die massive Produktion von proinflammatorischen Zytokinen unterstützt nicht nur die weitere Entzündungsreaktion, sondern führt auch über einen direkt zytotoxischen Effekt zur Schädigung von Nervengewebe und so zur neurologischen Symptomatik (Wekerle et al., 1986; Lassmann et al., 1991). Der zugrundeliegende Mechanismus für den selbstlimitierenden Charakter der MS typischen Entzündungsreaktion ist noch nicht völlig geklärt. Eine Ausschaltung der pathogenen T-Zellen durch andere T-Zellpopulationen (Sun et al., 1988) wird ebenso diskutiert, wie eine Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, wie Transforming Growth Factor- β (Racke et al., 1991), welche schließlich eine Apoptose der pathogenen T-Zellen auslösen (Pender et al., 1992).

1.7 Aktivierung des Immunsystems

Eine Aktivierung von T-Zellen kann durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF α oder Interferon γ hervorgerufen werden (Panitch et al., 1987). Potenteste Aktivatoren sind jedoch Bakterien und Viren, von denen einige in Zusammenhang mit der Entstehung der Multiplen Sklerose gebracht wurden (Edwards et al., 1998). Ein möglicher Aktivierungsmechanismus wäre das sogenannte Molekulare Mimikri. Es beruht auf einer Strukturähnlichkeit zwischen eigenen und viralen bzw. bakteriellen Peptiden, welche beide vom gleichen MHC Molekül präsentiert und schließlich vom gleichen T-Zell Rezeptor erkannt werden (Wekerle, 1993). Eine weitere Möglichkeit wäre eine antigenunabhängige Aktivierung durch bakterielle oder virale Superantigene.

1.8. Pathogenese der Entmarkung und Gewebedestruktion

Die oben beschriebene (vgl. 1.6) T-Zell vermittelte Immunantwort führt zwar zu einer Entzündungsreaktion, jedoch nicht zur Zerstörung des Myelins. Eine Demyelinisierung kann prinzipiell durch primäre Schädigung der Oligodendroglia mit sekundärer Entmarkung oder durch direkte Zerstörung der Myelinscheiden entstehen. Im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose werden verschiedene Mechanismen der Demyelinisierung untersucht. Für eine Antikörper vermittelte Demyelinisierung sprechen Immunglobulin- und Komplementablagerungen in den Plaques. Diese Antikörper richten sich hauptsächlich gegen das Myelin- Oligodendroglia- Glykoprotein (MOG), welches sowohl auf den Oligodendrozyten als auch auf den Myelinscheiden selbst exprimiert wird (Storch und Lassmann, 1997). Auch die hohe Konzentration an TNF α in den akuten Plaques ließ eine Beteiligung dieses Zytokins an der Entmarkung vermuten. Tatsächlich kann TNF α sowohl in vitro als auch in vivo eine Demyelinisierung mit Apoptose der Oligodendroglia induzieren (Brosnan und Raine, 1996). Völlig unabhängig von TNF α können auch zytotoxische T-Zellen einen Untergang der Oligodendroglia auslösen. Dabei sind sowohl CD4+ Zellen als γ/δ T-Lymphozyten involviert, während die Zielantigene wohl bestimmte Stressproteine oder das Fas Antigen sind (Storch und Lassmann, 1997). Letztlich könnte eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten auch direkt durch ein infektiöses Agens, z.B. durch Viren bedingt sein (Storch und Lassmann, 1997).

1.9 Mechanismen der Remyelinisierung

Schon lange ist es bekannt, dass Oligodendrozyten die Fähigkeit zur Remyelinisierung besitzen. Typische Zeichen sind die abnorm dünnen Myelinscheiden im Verhältnis zur Axondicke, die verkürzten Myelininternodien und die vergrößerten Ranvier- Schnürringe (Prineas, 1986). Remyelinisierende Areale befinden sich vor allem in den Randgebieten der Plaques. Auch der Mechanismus der Remyelinisierung ist noch nicht eindeutig geklärt. Möglich wären aber eine Remyelinisierung durch überlebende Oligodendrozyten (Lassmann, 1983), oder durch Ausdifferenzierung von Oligodendrozyten aus Gliastammzellen (Prineas, 1986). Allerdings scheint das Ausmaß der Remyelinisierung gerade in den chronischen Verläufen der MS eher gering zu sein, was möglicherweise durch eine zusätzliche Zerstörung der Vorläuferzellen bedingt ist (Ludwin, 1980). Auch ist die Auswirkung der Myelinneubildung auf die neurologische Funktion und somit die Beeinträchtigung des Patienten eher begrenzt.

1.10 Superantigene und ihre Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten

Prinzipiell unterscheidet man zwischen endogenen und exogenen Superantigenen. Endogene Superantigene sind körpereigene Antigene, welche eine nur gering stimulierende Wirkung auf Lymphozyten besitzen. Sie werden deshalb auch ‚minor lymphocyte stimulating antigens‘ genannt. Ihre Rolle im Rahmen der Autoimmunität ist noch nicht geklärt (Kotzin BL., 1993). Exogene Superantigene dagegen werden von Retroviren und grampositiven Kokken gebildet. Diese Enterotoxine sind biologisch hochaktive Proteine mit enormer Stimulationskraft auf T-Lymphozyten. Neben den Staphylokokkenenterotoxinen A bis E werden außerdem das Toxin 1 des toxischen Schocksyndroms und das Exfoliativtoxin gebildet (Kotzin BL., 1993, 1994). Ähnlich wie Peptidantigene binden auch die Superantigene an das MHC II Molekül der Antigen präsentierenden Zelle und stimulieren im Komplex die V β Kette des T-Zellrezeptors (Fields et al., 1996). Jedoch können Superantigene auch direkt und unabhängig vom MHC II Molekül mit geringer Affinität an den T-Zellrezeptor binden.

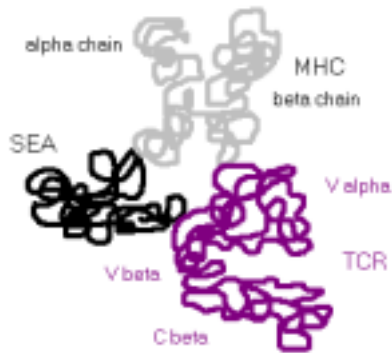


Abbildung 1.2: Hypothetisches Bild der TCR-SA-MHC Interaktion. Das Superantigen verbindet das MHC Molekül mit der V α Region des TCR, während es selbst an die V β Region des TCR bindet. (aus Fields et al., 1996)

Analog zu den T-Zell stimulierenden Superantigenen bestehen auch Superantigene, welche via Bindung an die Fab Komponente (V(H) Region) der Immunglobuline ausschließlich B-Lymphozyten stimulieren (Neshat et al., 2000).

Superantigene wurden schon mit mehreren Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei sind nicht nur der toxische Schock oder das Multiple Organversagen zu nennen (Brocke et al., 1996), sondern neuerdings auch die chronisch lymphatische Leukämie (Duan et al., 1992) oder der Insulin abhängige Diabetes mellitus (Meinl et al., 1999). Zusätzlich wird den Superantigenen eine große Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugesprochen.

1.11 Tiermodelle

Zu den geläufigen Tiermodellen der Multiplen Sklerose gehören die experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE) und die virusinduzierten Modelle entzündlicher Entmarkung. Die EAE ist aufgrund der Ähnlichkeit der Läsionen besonders für die Untersuchung der immunologischen Mechanismen geeignet. Sie entsteht jedoch aus einem Autoimmunprozess gegen ZNS Antigene heraus und entspricht damit nicht der vermuteten Ursache der MS. Das wichtigste unter den virusinduzierten Modellen ist Theilers Virus Enzephalomyelitis (TVME).

1.11.1 Experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE ist eine CD4+ T-Zell-vermittelte, Myelinantigen - spezifische Autoimmunreaktion, welche zu entzündlicher Reaktion und zum Teil nachfolgender Demyelinisierung im ZNS in einigen Tierarten führt (Dal Canto et al., 1995). Sie ist das experimentelle Pendant zur postinfektiösen Enzephalomyelitis (Dal Canto et al., 1995) und wird außerdem als das führende Tiermodell der Multiplen Sklerose angesehen. Während die ersten Versuche weniger dem typischen Verlauf der MS entsprachen, entwickelten Brown und McFarlin 1981 ein Modell der chronisch rezidivierenden EAE an der Maus. Wie auch bei der TVME Infektion sind bestimmte Mäuse- und Rattenarten besonders empfänglich für die EAE. Die Sensibilisierung der Tiere erfolgt entweder mit komplettem Rückenmark Homogenat (Brown and McFarlin, 1981) oder mit gereinigtem basischen Myeloprotein (MBP) bzw. Proteolipoprotein (PLP), beides Bestandteile der physiologischen Myelinscheide (Dal Canto et al., 1995). Eine weitere, besser reproduzierbare Form der Sensibilisierung erzeugt durch Transfer myelinspezifischer CD4+ Zellen eine passive EAE (Dal Canto et al., 1995). In beiden Formen entstehen periphere aktivierte myelinspezifische T-Zellen, welche in der Lage sind, die BHS zu überwinden. Dort lösen sie antigenabhängig und MHC II gebunden eine Entzündungsreaktion aus, welche über ein Öffnen der BHS und Zytokinausschüttung schließlich zur Aktivierung von Makrophagen und Monozyten mit folgender Demyelinisierung führt (Bradl und Linington, 1996). Erste klinische Zeichen machen sich etwa 6-8 Tage nach Sensibilisierung bemerkbar. Zunächst fallen die Tiere durch eine zunehmende Ataxie auf. Eine Schwäche der Hinterläufe wird schließlich zur Plegie, zusätzlich tritt eine Harninkontinenz auf. Diese Klinik bildet sich innerhalb von zwei Wochen wieder zurück, das erste Rezidiv folgt allerdings meist in der vierten Woche (Dal Canto et al., 1995). Histologisch zeichnet sich die EAE durch lymphozytäre Infiltration der Meningen und des perivaskulären Gewebes aus (Dal Canto et al., 1995). Auch zahlreiche Makrophagen sind zu beobachten. In der Remissionsphase tritt die entzündliche Reaktion in den Hintergrund und eine reaktive Fasergliose breitet sich an den Läsionsorten aus. Die Anzahl der nackten demyelinisierten Axone ist geringer als bei der TVME Infektion. Ähnlich wie bei der Multiplen Sklerose verbleiben die Makrophagen über Wochen im Gewebe, während die lymphozytäre Infiltration mit der Remission zurückgeht (Dal Canto et al., 1995). Der Remyelinisierungsprozess in der EAE wird unterschiedlich bewertet. Während Raine et al., 1984 von einer deutlichen Remyelinisierung sprachen, konnte diese bei Dal Canto et al., 1995 in dieser ausgeprägten Form nicht nachgewiesen werden.

1.11.2 Theiler Virus Enzephalomyelitis (TVME)

Das Theiler Virus ist ein Picornavirus, welches natürlich in Mäusen vorkommt (Theiler, 1937). In der Natur löst es eine Enteritis mit eventuell folgender Paralyse aus. Das Virus wird in verschiedene Untergruppen unterteilt, von denen die GDVII und FA Viren eine fulminante, rasch tödlich verlaufende Enzephalitis auslösen, während die DA und BeAn 8386 Viren eine chronische Entzündung mit nachfolgender Demyelinisierung bewirken (Dal Canto et al., 1995). Im Modell werden circa 3×10^6 PFU (Plaque forming Units) des Virus intrazerebral inokuliert. Die ersten klinischen Zeichen entwickeln sich nach etwa fünf Wochen. Die Tiere entwickeln zunächst eine Ataxie, schließlich kommen eine Paralyse der Hinterläufe und eine Harninkontinenz hinzu. Histologisch sind die ersten Zeichen nach drei bis vier Wochen zu erkennen. Je nach Mäuseart zeigen sich in unterschiedlicher Ausprägung Entzündungsreaktion, Demyelinisierung und Axondestruktion. Die TMEV induzierte Demyelinisierung ist eine virusspezifische Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ. Die intrazerebrale Inokulation führt zur Virämie mit nachfolgender persistierender Entzündung des ZNS. Es kommt zu einer klonalen Expansion von MHC II gebundenen TMEV spezifischen TH1 Zellen. Über Zytokine wie IFN- γ und TNF- α werden Monozyten und Makrophagen aktiviert, welche schließlich die Myelindestruktion auslösen (Dal Canto et al., 1995). Auch die Remyelinisierung sowie die reaktive Fasergliose treten je nach Mäuseart unterschiedlich ausgeprägt auf.

1.11.3 Vergleich der bisherigen Modelle und deren Bedeutung für die MS

Beide Tiermodelle weisen in Bezug auf den klinischen Verlauf und die Pathologie Ähnlichkeiten zur MS auf. Während die TMEV Infektion einen chronischen Verlauf aufweist, ist es in der EAE Forschung gelungen, einen chronisch rezidivierenden Verlauf zu entwickeln (Brown und McFarlin 1981). Wie bei der MS bestehen die entzündlichen Infiltrate zum großen Teil aus T-Lymphozyten und Makrophagen, es kommt zu Myelindestruktion mit nachfolgender Gliose und zur teilweisen Axondegeneration. Auch Remyelinisierungsprozesse sind in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten.

Der Demyelinisierungsprozess verläuft in beiden Tiermodellen über eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ, welche zu einer Aktivierung von Makrophagen führt. Der Hauptunterschied liegt jedoch im auslösenden Agens, welches bei

der EAE das jeweilige Myelinantigen, bei der TMEV Infektion das Virus selbst darstellt. Eben dieses auslösende Agens ist bei der Multiplen Sklerose weiterhin unbekannt.

Allerdings erklärt keines der Modelle den Verlauf in Schüben und gleichzeitig die schleichende Progression als klinische Grundphänomene derselben Krankheit, oder die bekannte Schubauslösung durch Immunstimuli. Zudem reflektiert die Histologie der MS Plaques nur partiell eine entzündliche Pathogenese. Der andere Teil besteht aus einer Oligodendrozytendestruktion nicht entzündlicher Genese (Luchinetti et al., 2000).

1.12 Zielsetzung der Studie

Experimentelle Modelle besitzen in der Multiple Sklerose Forschung einen wichtigen Stellenwert. Fast alle pathogenetischen und immunologischen Erkenntnisse beruhen auf den Ergebnissen dieser Studien. Dies betrifft alle Aspekte der MS Pathologie wie Entzündung, Entmarkung, Remyelinisierung, Gliose und Gefäßveränderungen. Dennoch kann die Erkrankung nur bruchstückhaft nachgestellt werden, da die eigentliche Ursache noch immer unbekannt ist. Aufgrund ihrer stark aktivierenden Wirkung auf das Immunsystem werden Superantigene mit der Genese einiger Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Scherer et al., 1993; Rudge P., 1991). Zwar wurden Superantigene schon zur peripheren Aktivierung von T-Zellen und Verstärkung der EAE benutzt (Racke et al., 1994), jedoch wurden sie in unserer Studie erstmalig intrazerebral injiziert. Unter der Annahme, dass eine lokale Expression des Superantigens auf MHC II Molekülen in Zusammenspiel mit unspezifisch aktivierten T-Zellen eine Entzündungsreaktion auslösen kann, injizierten wir zusätzlich mit Concanavalin A unspezifisch aktivierte T-Zellen peripher. Das Ziel unserer Studie war letztlich die Entwicklung eines neuen Tiermodells unter der Annahme von intrazerebralen retroviralen Superantigenen als MS auslösenden Faktor.

2. Material und Methoden

2.1 Superantigene

Superantigene werden von bestimmten Bakterien und Retroviren exprimiert (Duan et al., 1992; Fields et al., 1996) und sind potente T- Zell-Stimulatoren. Sie wirken über Bindung an antigenpräsentierende MHC-Moleküle der Klasse II und an einen T-Zell-Rezeptor außerhalb der normalen Antigenbindungsstelle und stimulieren dadurch unspezifisch eine ungleich größere Anzahl an T-Zellen, als ein übliches Antigen (Herman et al., 1990; Peter Rudge, 1991).

Da besonders bakterielle Exotoxine für Versuchszwecke an der Lewis-Ratte geeignet sind (Rott et al, 1992), wurden dementsprechend die Staphylokokkenenterotoxine A und E, abgekürzt SEA und SEE, verwendet. Auch das Enterotoxin SEB kann eine Lymphozytenproliferation bewirken (Brocke et al., 1996). Es wurde in unserer Studie aufgrund der nur geringen inflammatorischen Wirkung bei Lewis Ratten (Rott et al., 1992) zu Vergleichszwecken herangezogen. Die Superantigene bezogen wir von Toxin Technology, Sarasota, USA.

2.2 TSST 1

Neben den oben genannten Superantigenen wird auch dem Toxin 1 des toxischen Schock Syndroms eine T-Zell stimulierende Wirkung zugesprochen (Rott et al., 1992). Wir verwendeten es ebenfalls hauptsächlich zu Vergleichszwecken. Bezogen wurde TSST 1 ebenfalls über Toxin Technology, Sarasota, USA.

2.3 Concanavalin A

Dieses pflanzliche Mitogen wurde zur Stimulation der Milzzellen in vitro verwendet. Es führt über Interleukin 2 Produktion zu einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung, so dass diese in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Wekerle et al., 1986). Das Concanavalin A bezogen wir von Pharmacia, Uppsala, Schweden.

2.4 Nährmedium

Das zur Zellkultur verwendete Nährmedium bestand aus Clicks RPMI, 5% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Glutamin und 0,1% Mercaptoethanol. Clicks RPMI bezogen wir von Seromed, Berlin, das FCS von Vitromex, Selters.

2.5. PBS

Natriumphosphatpuffer (Phosphate buffered saline, 10mM) wurde zum Waschen der Zellsuspension sowie als Medium zur Herstellung der gewünschten Verdünnung verwendet.

Ansatz für 5 l Stammlösung, 100mM:

- 400 g NaCl
- 72 g wasserfreies Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
- 10 g Kaliumchlorid (KCl)
- 10 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

ad 5 l Aqua dest. gelöst, ggf. pH Wert- Einstellung auf 7,4.

Die benötigten Chemikalien bezogen wir von Firma Merck, Darmstadt.

2.6 Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

Ammoniumchlorid, bezogen von F. Merck, Darmstadt wurde zur Lyse von Erythrozyten in der Zellsuspension verwendet.

(8,3 g NH_4Cl ad 1 l Aqua dest. gelöst)

2.7 Tiere

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Verwendet wurden männliche Lewis-Inzuchtratten mit einem Gewicht von circa 300g. Im Vergleich zu bestimmten Meerschweinchen- oder Mäusearten sind diese Ratten für die EAE stärker suszeptibel (Paterson et al., 1970). Eine periphere Injektion der Immunzellen kann problemlos erfolgen.

Die Tiere wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen (Makrolonkäfige, pelletiertes Rattenalleinfutter, Holzgranulateinstreu und täglich frisches Wasser) gehalten und dort von geprüften Versuchstierpflegern betreut.

Vor der jeweiligen Versuchsdurchführung wurden die Tiere mindestens 1 Woche gehandelt. Die Tiere bezogen wir über Charles River Wiga, Sulzemoos.

2.8 Operationen

2.8.1 Intrazerebrale Inokulation des Superantigens

Zur Vorbereitung der Operation wurden die Tiere jeweils gewogen und markiert, sowie das Fell am Schädel rasiert. Die Inhalationsnarkose wurde mithilfe eines speziellen Inhalationsgerätes für Kleintiere mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (2% Isofluran) durchgeführt. Das Narkosegemisch wurde dabei über eine Kopfkammer appliziert. Isofluran wirkt stark hypnotisch und muskelrelaxierend, eine Analgesie tritt mit Beginn der Narkose ein. Die vollständige Ausschaltung der Schmerzempfindung wurde vor Beginn der Operation anhand von peripheren Schmerzreizen sichergestellt. Zur Überwachung wurde bei den ersten Operationen ein Pulsoxymeter eingesetzt. Aufgrund der guten Toleranz konnte auf ihn im Verlauf des Versuchs verzichtet werden. Über einen kurzen sagittalen Hautschnitt wurde die Schädelkalotte freigelegt und das Periost zur Seite gedrängt. Nach Orientierung anhand der Schädelnähte wurde die Einstichstelle 1 mm hinter dem Bregma, 1,5 bis 2 mm rechts lateral der Mittellinie gewählt. Zur Trepanation der Kalotte wurde ein Zahnbohrer mit 1 mm Durchmesser benutzt. Im nächsten Schritt wurden mithilfe einer kleinen Kanüle circa 50 µl Superantigenlösung in 3,5 mm Tiefe injiziert. Nach erfolgter Inokulation wurde der Hautschnitt mit zwei Stichen versorgt, das Trepanationsloch wurde unter der Haut offen belassen. Nach Narkoseausleitung wurden die Tiere noch einige Zeit überwacht, die postoperative Schmerzbekämpfung erfolgte mit Metamizol Tropfen per os. Die Narkosedauer betrug in etwa 20 Minuten, die eigentliche Operation etwa 10 Minuten. Nach einer kurzen Erholungsphase erschienen die Tiere klinisch weitgehend unbeeinträchtigt, vorübergehende Hemiparesen wurden nicht beobachtet. Von den ungefähr 100 operierten Tieren verstarben lediglich zwei intraoperativ, davon eines durch eine zu tiefe Narkose, das andere durch eine venöse Blutung.

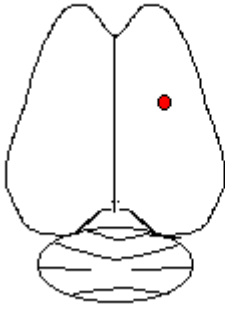


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Rattenhirns von dorsal mit markierter Einstichstelle.

2.8.2 Intravenöse Injektion von aktivierten Lymphozyten

Zur peripheren Injektion eignen sich bei der Ratte vor allem die Schwanz- sowie die Penisvenen. Von beiden Möglichkeiten wurde je nach Venenbeschaffenheit Gebrauch gemacht. Um die Tiere möglichst schmerzfrei zu halten, wurde auch bei diesem Eingriff eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. In Narkose wurden die Tiere punktiert und das Zell-PBS-Gemisch intravenös in der jeweiligen Menge verabreicht. Nach Narkoseausleitung wurden die Tiere für einige Zeit nachbeobachtet. Von ungefähr 50 punktierten Tieren verstarb eines in Narkose, die übrigen blieben intra- wie postoperativ klinisch unauffällig.

2.9 Gehirnentnahmen und Erstellung der histologischen Schnitte

Die Tötung der Tiere erfolgte in einer CO₂ gefüllten abgeschlossenen Kammer. Nach sicher eingetretenem Tod wurde über einen tiefen Hautschnitt die Schädelkalotte freigelegt. Je nach Fragestellung wurde zu diesem Zeitpunkt eine subokzipitale Liquorpunktion vorgenommen, bevor anschließend der Schädel eröffnet wurde. Nach weitgehender Freilegung des Gehirns wurde die Dura entfernt und das Gehirn unter Durchtrennung der Hirnnerven von okzipital aus dem Schädel gelöst. Das Gehirn wurde zunächst in Formalin 4% eingelegt. Zur Herstellung der histologischen Schnitte wurden die Gehirne in Paraffinblöcken geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop histologisch untersucht und die entzündlich veränderten Gefäße getrennt für beide Hemisphären dokumentiert. Bei Bedarf einer Serumprobe wurden die Tiere vor der Gehirnentnahme kardial punktiert. Blut- und Liquorproben wurden durch isoelektrische

Fokussierung und Silberfärbung der Agarose Gele auf das Vorkommen von oligoklonalen Banden hin ausgewertet (Staugaitis et al., 1985).

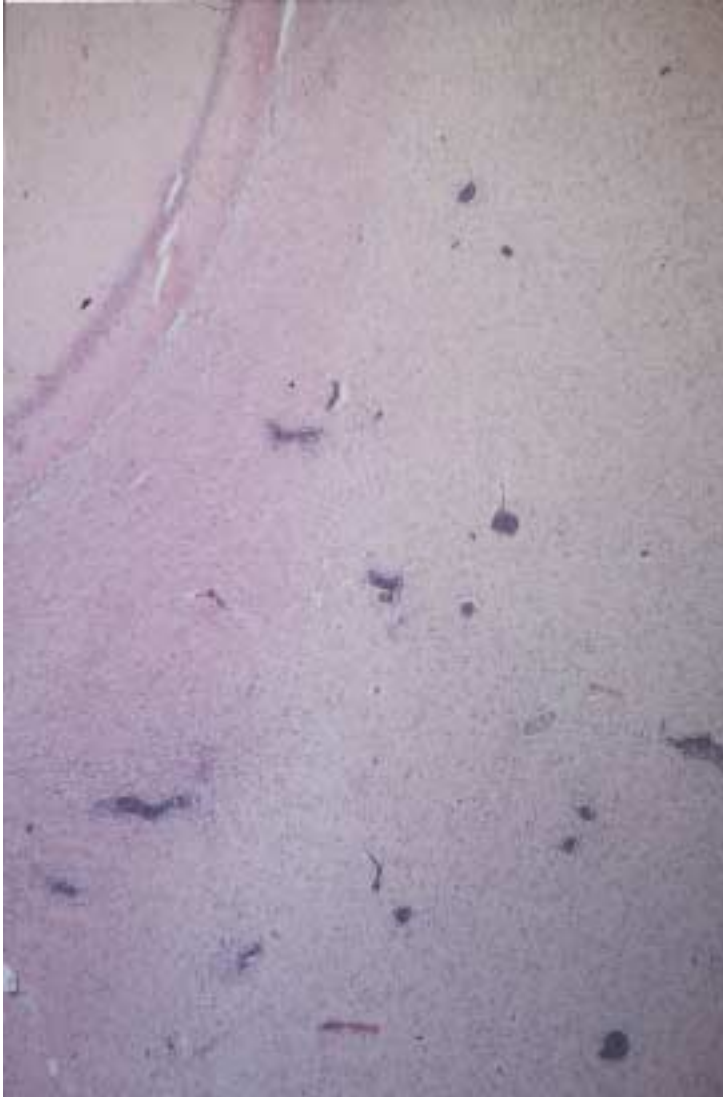


Abbildung 2.2: Beispiel Gehirnschnitt mit entzündlich veränderten Gefäßen. 70- fache Vergrößerung.

2.10 Milzentnahmen und Aufbereitung der Lymphozyten

Wie bei den Gehirnentnahmen erfolgte auch hier die Tötung durch CO₂. Anschließend wurde nach Eröffnen der Bauchhöhle die Milz entnommen und vorübergehend in 0,9 % Kochsalzlösung eingelegt. Die Aufbereitung der Milzzellen erfolgte direkt im Anschluss. Dazu wurde die Milz zunächst durch ein Sieb zerkleinert und in mehreren Durchgängen in PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde mehrmals zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Um die noch enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, wurde die Suspension mit 3 ml Ammoniumchlorid (NH₄Cl) 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Schonung der Lymphozyten wurde dabei der Niederschlag mit 3ml fetalem Kälberserum (FCS) vorsichtig unterspritzt. Die Zellsuspension wurde dann nochmals mit PBS gründlich gewaschen und zentrifugiert. Der schließlich erhaltene Niederschlag wurde in erwärmtem Nährmedium aufgenommen. Um die Anzahl der gewonnenen Lymphozyten bestimmen zu können, wurden einige Mikroliter der Zellsuspension mit Eosin angefärbt, die Leukozyten in einer Zählkammer ausgezählt und dann auf die gesamte Menge hochgerechnet. (Anzahl der Zellen in sechzehn ausgezählten Quadraten x Verdünnungsfaktor des Suspension-Eosin-Gemischs x 10.000 x ml.)

Die gewonnenen Lymphozyten wurden dann für drei Tage mit einem Mitogen stimuliert. Um ein geeignetes Mitogen in der notwendigen Konzentration zu bestimmen, wurden im Vorfeld der eigentlichen Versuche die Lymphozyten einer entnommenen Milz mit verschiedenen Mitogenen in einer Verdünnungsreihe inkubiert und anschließend ihre Proliferation gemessen. Dazu wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension, dies entsprach circa 1 Million Zellen, mit je 100 µl der Mitogene SEA, SEE sowie Concanavalin A in absteigender Konzentration in ein Well einer Kulturplatte gegeben. Je Mitogen und Konzentration wurden vier Wells angesetzt. Die Zellproliferation wurde nach drei Tagen gemessen (siehe Punkt 3.2.1).

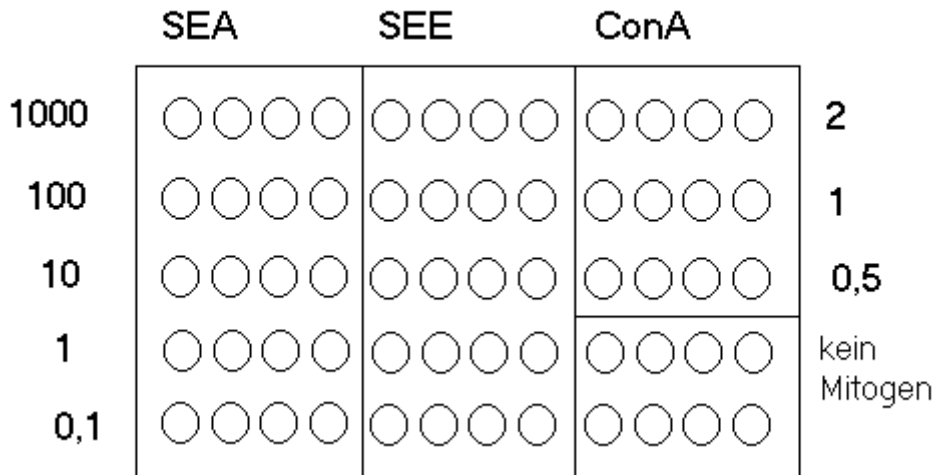


Abbildung 2.3: Platte mit Zellsuspension und jeweiligem Mitogen, Konzentrationsangaben in $\mu\text{g/ml}$

Nachdem Concanavalin A als geeignetes Mitogen identifiziert worden war, wurden danach alle Milzzellen mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A für drei Tage inkubiert.

Am dritten Tag wurde zunächst unter dem Lichtmikroskop geprüft, ob tatsächlich eine Proliferation stattgefunden hatte. Proliferierende Zellen erkannte man daran, dass sie in Zellhaufen zusammenlagen. Bei positivem Proliferationsnachweis wurden die Zellen zentrifugiert und mehrmals in PBS gewaschen, bis eine milchige Zell – PBS – Suspension entstand. Da den Tieren nicht mehr als 1 ml peripher injiziert werden sollte, wurde eine geeignete Verdünnung mit PBS je nach zu verabreichender Zellzahl hergestellt. Die intravenöse Injektion erfolgte direkt im Anschluss an die Zellernte, zudem wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Eine Schädigung der Zellen vor i.v. Injektion ist daher wenig wahrscheinlich.

2.11 Statistische Auswertung

Für jede Versuchseinheit wurden zumindest zwei Tiere verwendet. Da man nicht sicher von einer Normalverteilung der Werte ausgehen konnte, und mehr als zwei Größen verglichen werden sollten, wurde zur Prüfung der Signifikanz der Kruskal Wallis Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt, eine Tendenz entspräche demnach einem p zwischen 0,05 und 0,10. Passend zum Test wurden für die einzelnen Versuchseinheiten Boxplots angefertigt. Die Berechnungen sowie das Erstellen der Grafiken erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 10 unter der Anleitung von

Frau Dipl.-Math. R. Busch, Institut für med. Statistik u. Epidemiologie, Klinikum rechts der Isar.

3. Ergebnisse

3.1 Superantigenwirkung per se

3.1.1 Vergleich der Superantigene SEA, SEE, SEB mit TSST1 und Kochsalz

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Effekte verschiedener Superantigene auf das Hirn der Ratte untersucht. Neben den Staphylokokken Superantigenen A, B und E wurden auch TSST1 und Kochsalz hinsichtlich ihrer entzündungsauslösenden Wirkung untersucht. Während die Superantigene SEA und SEE sowie TSST eine Entzündungsreaktion auslösen konnten, wurden nach Injektion von SEB und Kochsalz keine entzündeten Gefäße beobachtet.



Abbildung 3.1:

Schnitt ohne entzündlich veränderte Gefäße

20- fache Vergrößerung



Abbildung 3.2:

Schnitt mit entzündlich veränderten Gefäßen

20- fache Vergrößerung

3.1.2 Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Konzentration des Superantigens

Um die minimale entzündungsauslösende Konzentration des Superantigens SEA zu bestimmen sowie eine Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Superantigenkonzentration aufzuzeigen, wurde dem ersten Versuch eine Konzentrationsreihe angeschlossen. Dabei wurde sechs verschiedenen Tieren jeweils 50 µl SEA in verschiedenen Konzentrationen intrazerebral injiziert. Die Gehirnentnahmen erfolgten am vierten postoperativen Tag. Die Auswertung der histologischen Schnitte ergab einen nachweisbaren Bezug zwischen SEA Konzentration und beobachteter Entzündungsherde in den Gehirnen der Ratten. Die entzündlich veränderten Gefäße lagen hierbei vor allem periventrikulär und um den Stichkanal in der rechten Hemisphäre. Die linke Hemisphäre war nur in den höheren Konzentrationen und dort nur in geringem Maße betroffen.

SEA Konzentration	Anzahl entzündete Gefäße					
	rechte Hemisphäre		MW	linke Hemisphäre		MW
1,0 mg/ml	10	9	9,5	0	0	0
0,5 mg/ml	3	4	3,5	1	1	1
0,05 mg/ml	3	3	3	1	1	1
0,005 mg/ml	2	1	1,5	0	0	0
0,0005 mg/ml	1	1	1	0	0	0
0,00005 mg/ml	1	1	1	0	0	0

Tabelle 3.1: Konzentrationsabhängigkeit der Entzündungsreaktion bei Gehirnentnahme am Tag 4 nach OP. Pro Gehirn wurden je zwei Schnitte ausgewertet. MW steht für Mittelwert.

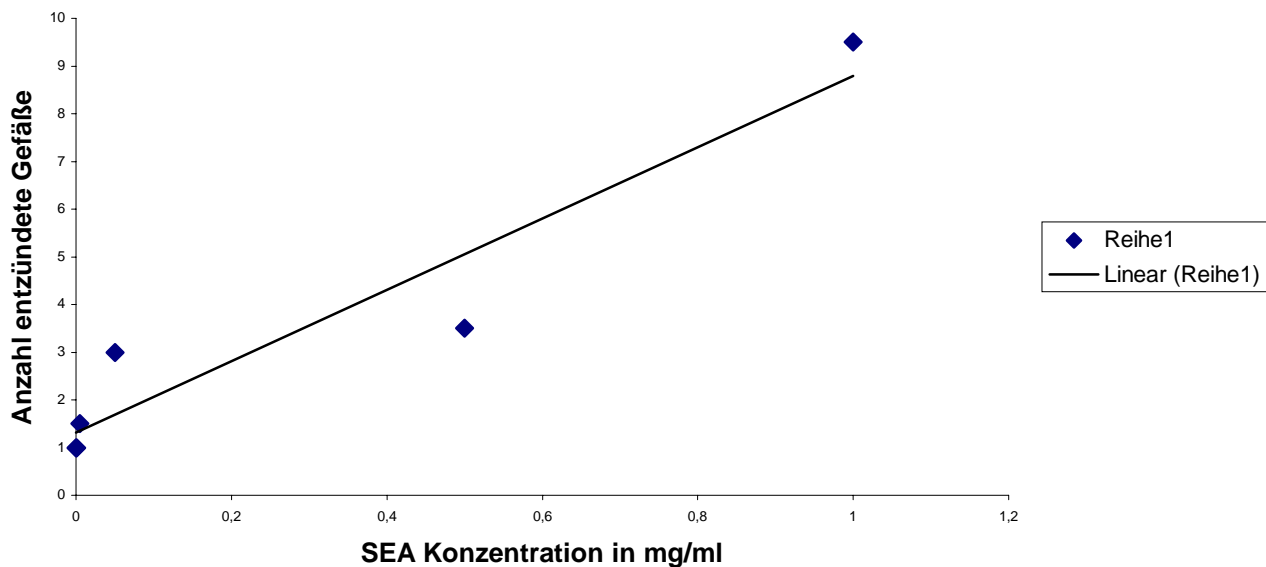


Abbildung 3.3: Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Superantigenkonzentration

Nachdem eine deutliche Zunahme der Reaktion in den höheren Konzentrationen zu beobachten war, behielten wir für die nachfolgenden Versuche eine SEA Konzentration von 1mg/ml bei.

3.1.3 Beobachtung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf

Um über den Verlauf der Entzündungsreaktion Aufschluss zu gewinnen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Superantigenkonzentration konstant gehalten wurde, die Gehirnentnahme jedoch an verschiedenen Tagen erfolgte. Dieser Versuch wurde an 14 Tieren mit SEA und an 26 Tieren mit SEE durchgeführt.

Gehirnentnahme	Anzahl entzündete Gefäße										
	rechte Hemisphäre					MW	linke Hemisphäre				MW
SEA											
Stunde 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tag 1	2	2	0	1	1,25	0	0	0	0	0	0
Tag 5	2	3	10	9	6	0	0	0	0	0	0
Tag 6	8	9	16	13	11,5	0	0	0	0	0	0
Tag 12	0	0	2	0	0,5	0	0	0	0	0	0
Tag 32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tag 68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SEE																		
Tag 1	1	1	1	1	1	0	0	0	0,625	0	0	0	0	1	0	0	0	0,125
Tag 4	3	3	2	2	3	5	2	2	2,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tag 6	4	4	6	6	2	2	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
Tag 6	0	0	0	0					2,08									0
Tag 8	3	3	0	0	1	1	1	1	1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tag 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tag 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.2: Anzahl der entzündeten Gefäße je nach Tag der Gehirnentnahme. Pro Tag wurden zwei Tiere im Versuch mit SEA bzw. vier Tiere im Versuch mit SEE untersucht. An Tag 6 wurden ausnahmsweise 6 Tiere untersucht. Pro Tier wurden zwei Schnitte ausgewertet. MW steht für Mittelwert.

Da sich die Entzündungsreaktion bis auf einen Fall ausschließlich in der rechten Hemisphäre abspielte, wurden die Werte für die linke Hemisphäre für die statistische Auswertung außer Betracht gelassen. Für beide Zeitfolgen ergaben sich nach Auswertung mithilfe des Kruskal Wallis Testes eine signifikante Abhängigkeit der Entzündungsreaktion vom Tag der Gehirnentnahme ($p < 0,05$), wobei sich eindeutigere Ergebnisse nach SEE Inokulation ergaben ($p = 0,017$ statt $0,047$ nach SEA). Das Maximum der Entzündungsreaktion lag bei beiden Superantigenen am sechsten Tag, wobei nach Inokulation von SEE eine etwas stärkere und früher beginnende Entzündungsreaktion beobachtet werden konnte. Die Entzündung verlief in beiden Fällen innerhalb von 12 bis 13 Tagen selbstlimitierend.

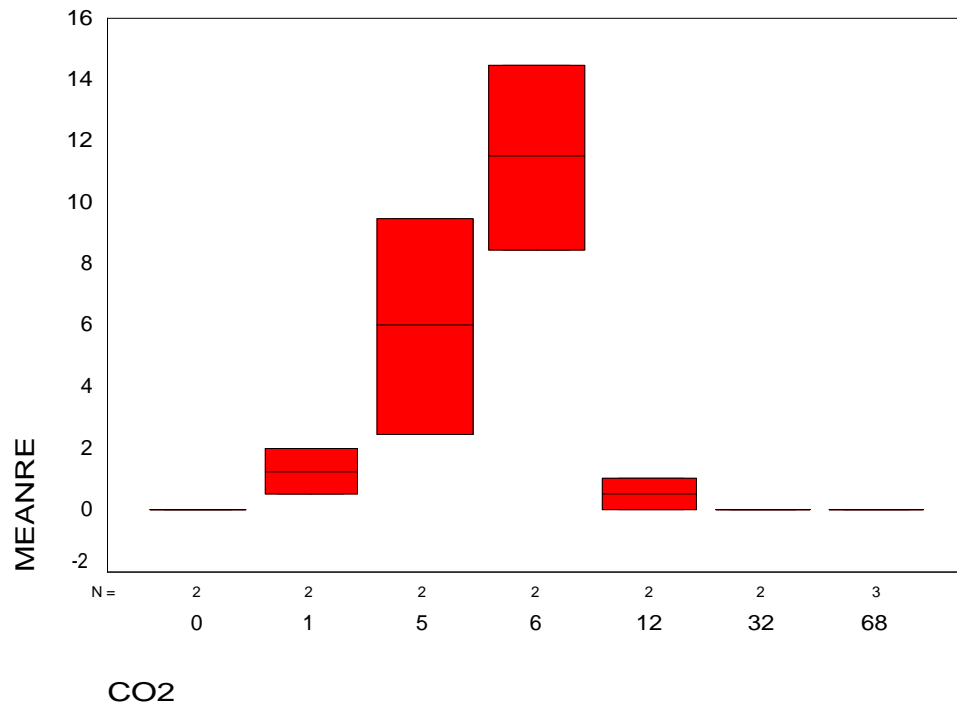


Abbildung 3.4: Entzündungsreaktion nach SEA Inokulation in Abhängigkeit vom Tag der Gehirnentnahme. Mit MEANRE wurde die mittlere Anzahl entzündeter Gefäße der rechten Hemisphäre, mit CO2 der Tag der Gehirnentnahme bezeichnet. ($p = 0,047$)

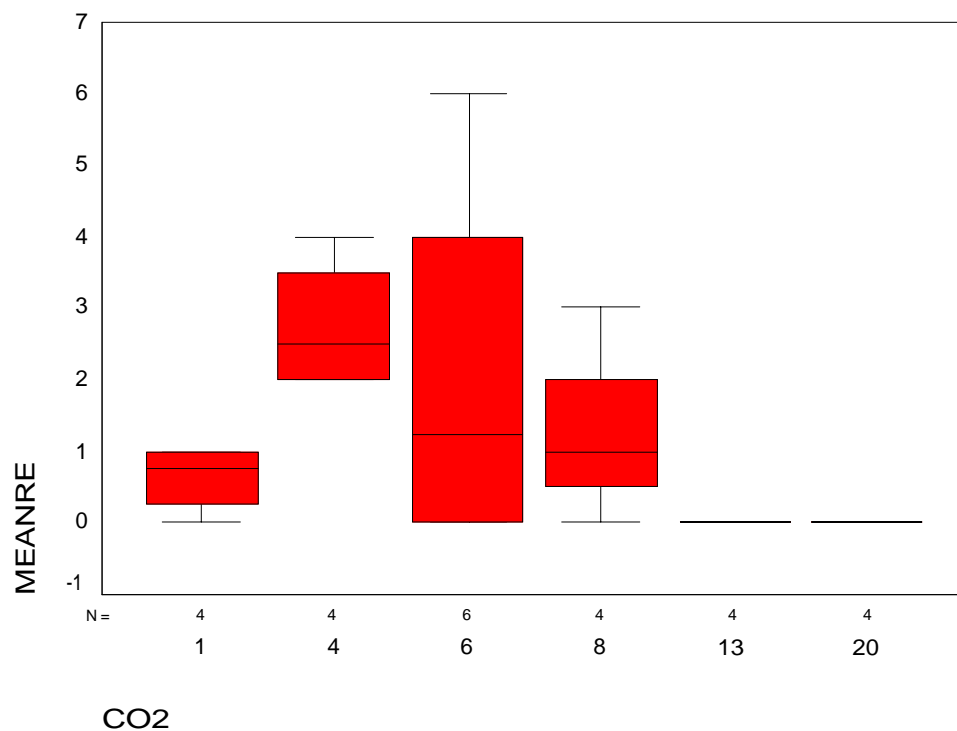


Abbildung 3.5: Entzündungsreaktion nach SEE Inokulation in Abhängigkeit vom Tag der Gehirnentnahme. Mit MEANRE wurde die mittlere Anzahl entzündeter Gefäße der rechten Hemisphäre, mit CO2 der Tag der Gehirnentnahme bezeichnet. ($p = 0,017$)

Die Entzündungsreaktion spielte sich hauptsächlich in der periventrikulären weißen Substanz und im Corpus Callosum ab, vereinzelt war eine meningeale Reaktion zu sehen. Die Gefäße waren dabei zum Teil von mehreren Lagen mononukleärer Rundzellen umgeben, die von uns nicht näher differenziert wurden.

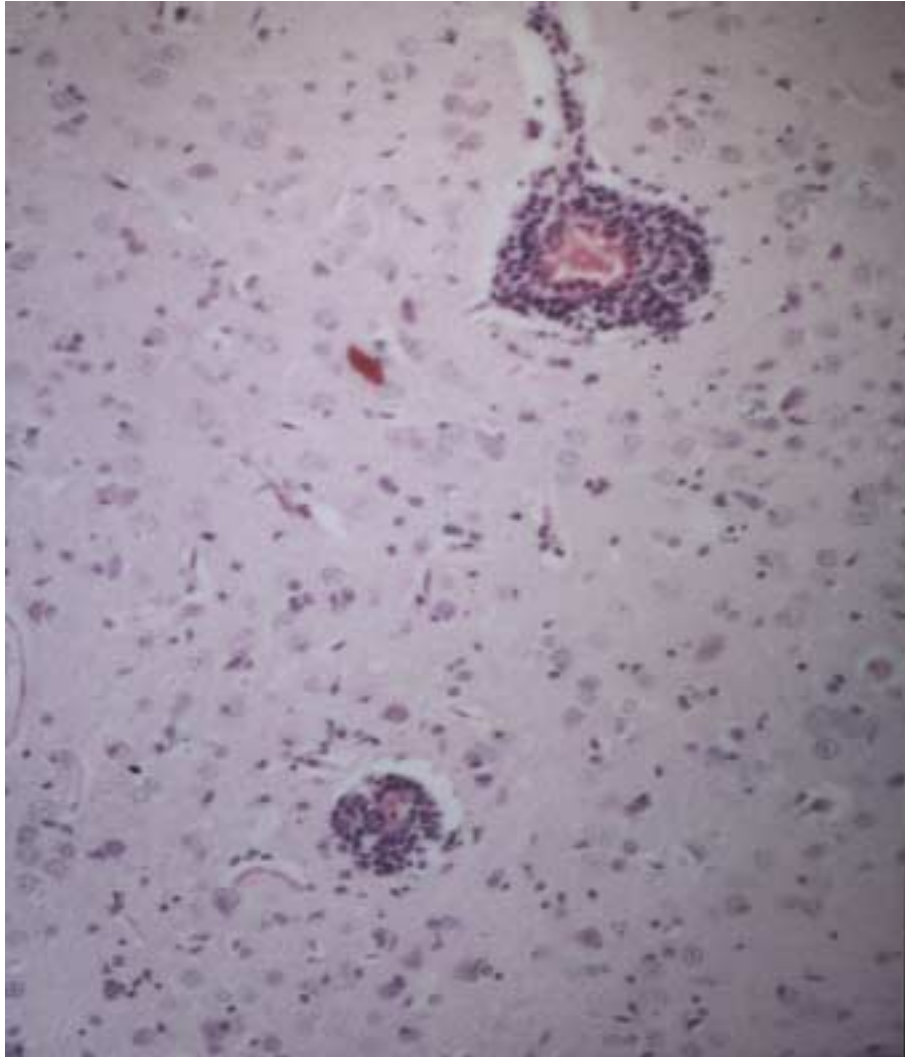


Abbildung 3.6: Infiltration von Gefäßen mit Entzündungszellen. 200- fache Vergrößerung

Insgesamt waren zwar Entzündungsreaktionen in signifikanter Abhängigkeit von der Superantigenkonzentration sowie von der Zeit zu beobachten, jedoch traten sie nicht in der von uns erwarteten Intensität auf.

3.2 Superantigenwirkung im Zusammenspiel mit peripher injizierten T-Zellen

Die Ursache für die bisher eher mäßige entzündliche Reaktion auf die Superantigeninokulation mag in einer begrenzten Zahl von aktivierten T-Lymphozyten im Gehirn liegen. Da lediglich aktivierte T-Zellen in der Lage sind, die Blut-Hirnschranke zu überwinden (Wekerle et al., 1986), wollten wir eine Verstärkung der Reaktion durch periphere Injektion von aktivierten T-Zellen erreichen. Der T-Zelltransfer erfolgte jeweils drei Tage nach der intrazerebralen Inokulation.

3.2.1 T- Zellproliferation nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen

Zur Bestimmung eines geeigneten Mitogens wurden die gewonnenen Milzzellen mit verschiedenen Mitogenen inkubiert (siehe Punkt 2.10). Drei Tage nach Ansetzen der Lymphozyten mit den Mitogenen wurde die Zellproliferation mithilfe von radioaktiv markierten DNS-Bausteinen (Tritium- Thymidin) bzw. deren Einbau in neu synthetisierte DNS quantifiziert.

Konzentration SEA/SEE	Zellzahl unter SEA	Zellzahl unter SEE	Konzentration ConA	Zellzahl unter ConA	Zellzahl ohne Stimulation
1000µg/ml	26075	20916	2 µg/ml	21466	1257
100 µg/ml	28477	20322	1 µg/ml	14822	1793
10 µg/ml	26711	20176	0,5 µg/ml	8370	
1 µg/ml	30844	12658			
0,1 µg/ml	22736	2998			

Tabelle 3.3: Proliferation der Lymphozyten unter den Mitogenen SEA, SEE und ConA. Die Zellzahlen sind Mittelwerte aus den jeweils vier angesetzten Wells. Die fettgedruckten Werte beschreiben eine ausreichende Stimulation.

Eine ausreichende Stimulation von etwa 20.000 Zellen pro Well konnte nach diesen Messungen mit den Mitogenkonzentrationen 2 µg/ml Con A, ≥ 10 µg/ml SEE sowie SEA in allen gemessenen Konzentrationen erreicht werden. Zudem war eine Kontrollplatte mit Milzzellen und Nährmedium angesetzt worden. Die dort gemessene Zellproliferation fiel dementsprechend gering aus. In den weitergehenden Versuchen erfolgte die Aktivierung der Milzzellen mit 2 µg/ml Concanavalin A wie im Kapitel Methodik beschrieben (siehe Punkt 2.10).

3.2.2 Vergleich der Superantigene SEA und SEB mit Kochsalz

Wiederum wurde zunächst ein Vergleich der Superantigene SEA und SEB sowie eine Kontrolle mit Kochsalz durchgeführt. Die Menge der peripher injizierten Immunzellen betrug 30 Millionen Zellen. Die Gehirnentnahme erfolgte 4 Tage nach peripherer Injektion. Wie schon im ersten Versuch waren die Gehirnschnitte nach SEB- und Kochsalzinokulation unauffällig, während die mit SEA behandelten Tiere eine Reaktion zeigten. Auffällig war, dass diesmal auch in der kontralateralen Hemisphäre entzündete Gefäße auftraten.

Konzentration	Anzahl entzündete Gefäße									
	rechte Hemisphäre				MW	linke Hemisphäre				MW
SEA 1mg/ml	2	2	9	12	6,25	1	1	6	4	3
SEB 1mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.4: Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Art des Superantigens nach zusätzlicher peripherer Injektion von aktivierten T-Zellen. Pro Tier wurden zwei Schnitte ausgewertet. MW steht für Mittelwert.

3.2.3 Beobachtung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf

Von Interesse war neben der Verstärkung der Entzündungsreaktion durch die Gabe aktivierter Zellen natürlich auch wiederum der zeitliche Verlauf der Entzündung. Hierzu wurden insgesamt 27 Tieren 50 µl SEA in einer konstanten Konzentration von 1mg/ml intrazerebral injiziert. Die Menge der peripher injizierten T-Zellen betrug 5 Mio pro Tier. Die Gehirnentnahmen erfolgten an den Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 8, 14, 18 nach peripherer Injektion.

Gehirnentnahme	Anzahl entzündete Gefäße									
	rechte Hemisphäre				MW	linke Hemisphäre				MW
Tag 1	8	7	0	2		13	12	0	0	
Tag 1	14	18	0	2	6,375	12	12	0	0	6,125
Tag 2	16	14	12	10		8	9	4	4	
Tag 2	8	10	4	3	9,625	8	8	3	2	5,75
Tag 3	16	16	15	4		25	20	14	13	
Tag 3	12	12	4	3	10,25	0	0	0	0	9

Tag 4	19	22	35	37		0	0	0	0	
Tag 4	18	17	24	28	25	0	0	0	0	0
Tag 7	16	15	21	10		0	0	0	0	
Tag 7	24	22			18	0	0			0
Tag 8	12	12	2	3		0	0	0	0	
Tag 8	0	0	0	0	3,625	0	0	0	0	0
Tag 14	1	2	0	0	0,75	0	0	0	0	0
Tag 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.5: Anzahl der entzündeten Gefäße je nach Tag der Gehirnentnahme. Pro Tag wurden vier Tiere untersucht, lediglich an Tag 7, 14 und 18 mussten wir uns auf 3 bzw. 2 Tiere beschränken. Pro Tier wurden zwei Gehirnschnitte ausgewertet. MW steht für Mittelwert.

Wie schon im vorigen Versuch fiel auch hier eine Beteiligung der kontralateralen Hemisphäre auf, welche sich aber auf die ersten drei Tage beschränkte und nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurde. Wiederum zeigt sich im Kruskal Wallis Test eine signifikante Abhängigkeit der Entzündungsreaktion vom Tag der Gehirnentnahme ($p = 0,007$). Die Entzündungsreaktion fiel mit maximal 37 entzündeten Gefäßen wesentlich stärker aus als ohne T-Zellinjektion (maximal 16), ebenso lag der Zeitpunkt der stärksten Reaktion schon am Tag 4, also etwas früher. Die Zeit bis zum Abklingen der Reaktion blieb in etwa gleich, fiel also ungefähr auf den 14. Tag.

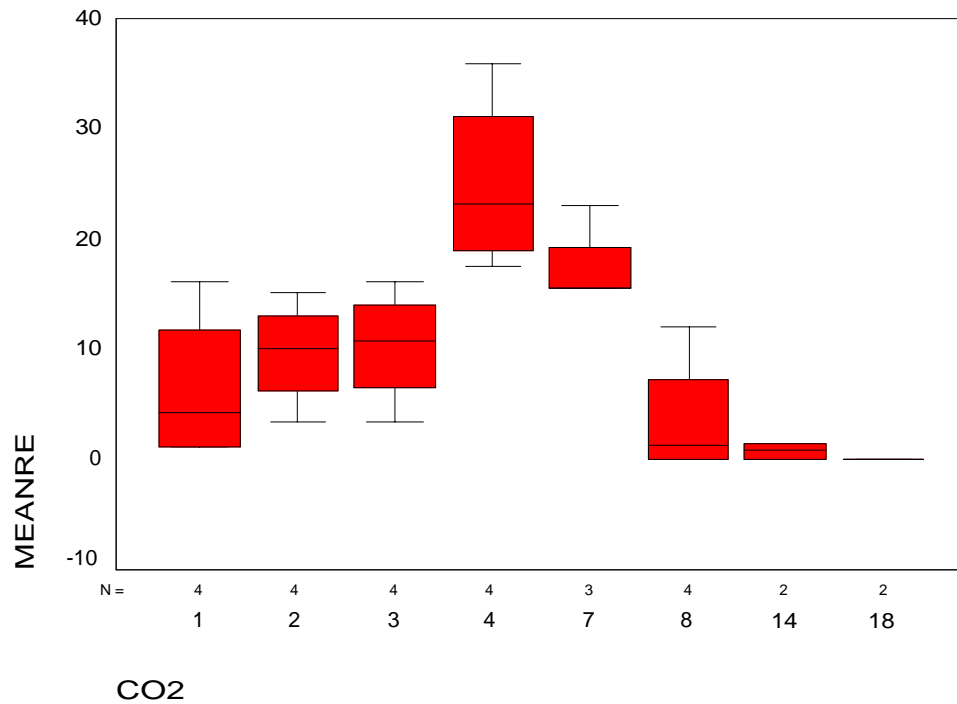


Abbildung 3.7: Entzündungsreaktion nach SEA Inokulation und peripherer Zellinjektion in Abhängigkeit vom Tag der Gehirnentnahme. Mit MEANRE wurde die mittlere Anzahl entzündeter Gefäße der rechten Hemisphäre, mit CO2 der Tag der Gehirnentnahme bezeichnet. ($p = 0,007$)

In den ersten drei Tagen lagen die Entzündungsherde wiederum hauptsächlich in der periventriculären weißen Substanz sowie im Corpus Callosum. Nachfolgend fanden sich lediglich auf der Injektionsseite über den gesamten Kortex verteilte, zum Teil auch meningeale Reaktionen. Auch nach T-Zellinjektion verschwanden die entzündlichen Infiltrate nach 14 bis 18 Tagen.

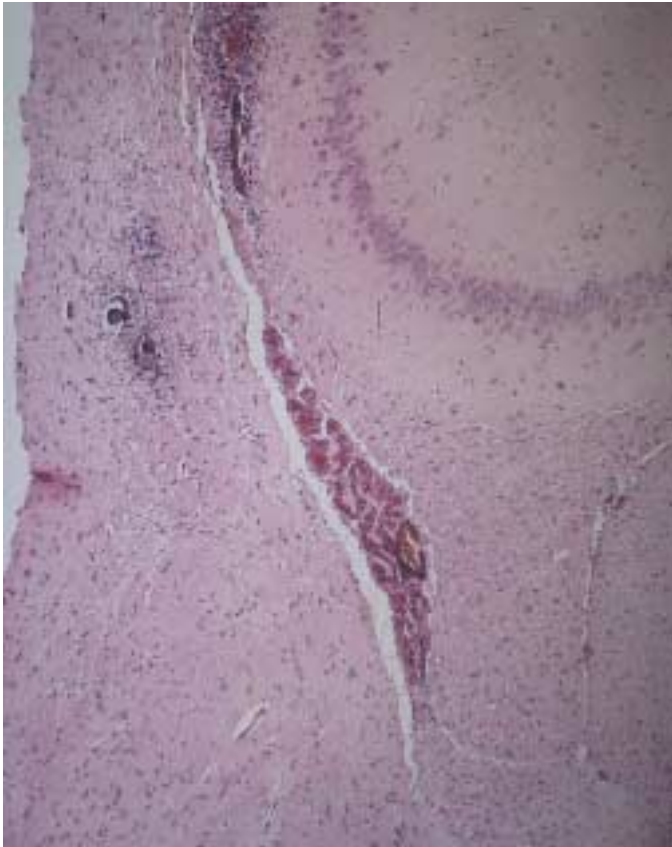


Abbildung 3.8: Gehirnschnitt mit entzündlich infiltrierten Gefäßen in der weißen Substanz. 70- fache Vergrößerung

3.2.4 Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Konzentration des Superantigens

Wiederum mit einer Konzentrationsreihe ließ sich der Bezug zwischen inokulierter Superantigenkonzentration und entzündlicher Reaktion nachweisen. Im Kruskal Wallis ließ sich zwar nur eine Tendenz nachweisen ($p = 0,09$), jedoch könnte man dies auf die relativ geringe Fallzahl zurückführen ($n = 4$ je Versuchseinheit).

Die Zahl der peripher injizierten Zellen lag bei 30 Mio, die Gehirnentnahmen erfolgten am Tag 4 nach peripherer Injektion, also am mutmaßlichen Tag der maximalen Entzündungsreaktion.

SEA Konzentration	Anzahl entzündete Gefäße									
	rechte Hemisphäre				MW	linke Hemisphäre				MW
0,5 mg/ml	10	12	5	4		0	0	0	0	
0,5 mg/ml	0	0	0	0	3,875	0	0	0	0	0
0,1 mg/ml	4	0	4	2		0	0	0	0	
0,1 mg/ml	6	6	4	2	3,5	2	2	5	3	1,5
0,05 mg/ml	3	4	3	2		0	0	0	0	
0,05 mg/ml	3	6	3	2	3,25	0	0	0	0	0
0,01 mg/ml	0	0	0	0		0	0	0	0	
0,01 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.6: Anzahl der entzündeten Gefäße in Abhängigkeit von der inokulierten SEA Konzentration bei konstanter T-Zell-Menge. Pro Konzentration wurden vier Tiere verwendet, von denen jeweils zwei Gehirnschnitte ausgewertet wurden. MW steht für Mittelwert.

Die stärkste Reaktion liegt mit 12 entzündeten Gefäßen unübersehbar im Bereich der höchsten SEA Konzentration von 0,5 mg/ml. Ergänzt man diesen Wert mit der maximalen Zahl von 37 Gefäßen bei 1 mg/ml, so lässt sich doch eine gewisse Abhängigkeit von der inokulierten Superantigenkonzentration erkennen. Zudem erscheint die Reaktion nach T-Zell Injektion gegenüber der ohne wesentlich ausgeprägter (siehe Punkt 3.3).

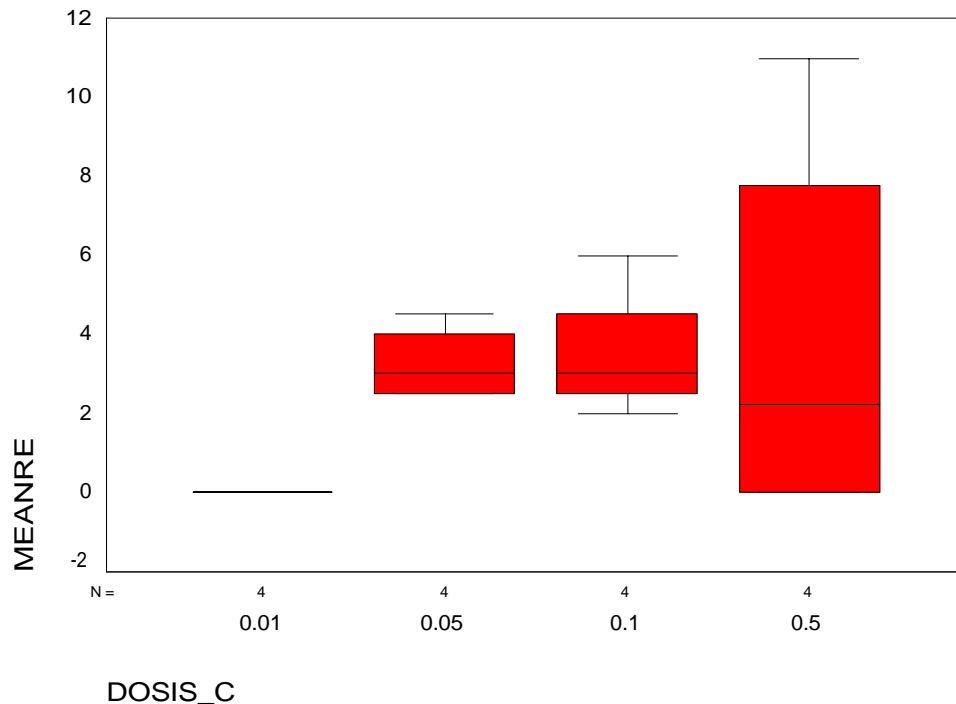


Abbildung 3.9: Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der inokulierten Superantigenkonzentration. Mit MEANRE wurde die mittlere Anzahl entzündeter Gefäße der rechten Hemisphäre, mit DOSIS_C die SEA Konzentration bezeichnet.

3.2.5 Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Menge der T-Zellen

Umgekehrt prüften wir die Korrelation zwischen der Menge der aktivierten T-Zellen und der Entzündungsreaktion bei konstanter SEA Konzentration von 1 mg/ml. Die Gehirnentnahmen erfolgten wiederum am vierten Tag nach peripherer Injektion. Zwar ergab sich in der statistischen Auswertung aufgrund der relativ geringen Fallzahl kein signifikanter Bezug ($p = 0,23$), jedoch ist im Diagramm ein linearer Bezug zu erkennen.

T-Zell Menge in Mio	Anzahl entzündete Gefäße									
	rechte Hemisphäre				MW	linke Hemisphäre				MW
50	38	41	44	38	40,25	12	14	17	18	15,25
10	29	37	12	10	22	0	0	0	0	0
5	16	15	21	10		4	4	0	0	
5	24	22			18	0	0			1,3
1	16	17	14	12	14,75	0	0	10	9	4,75

Tabelle 3.7: Anzahl der entzündeten Gefäße in Abhängigkeit von der Menge der peripher injizierten T-Zellen. Es wurden zwei Tiere pro Versuchseinheit untersucht, drei Tiere wurden mit 5 Mio Zellen behandelt. MW steht für Mittelwert.

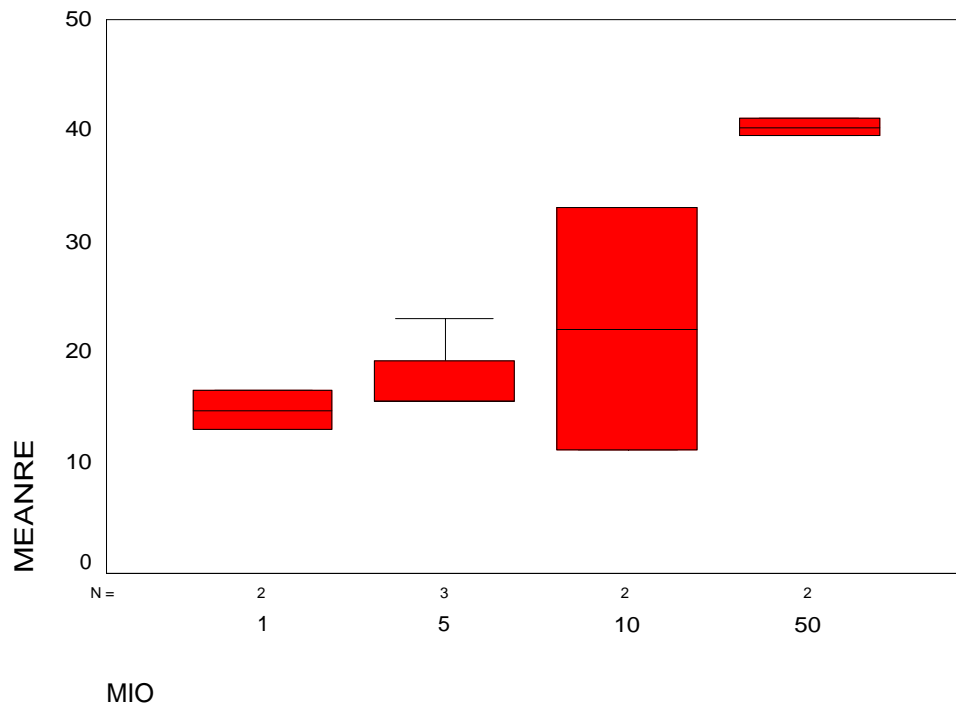


Abbildung 3.10: Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der injizierten T-Zellmenge. Mit MEANRE wurde die mittlere Anzahl entzündeter Gefäße der rechten Hemisphäre, mit MIO die Menge der Immunzellen in Millionen bezeichnet.

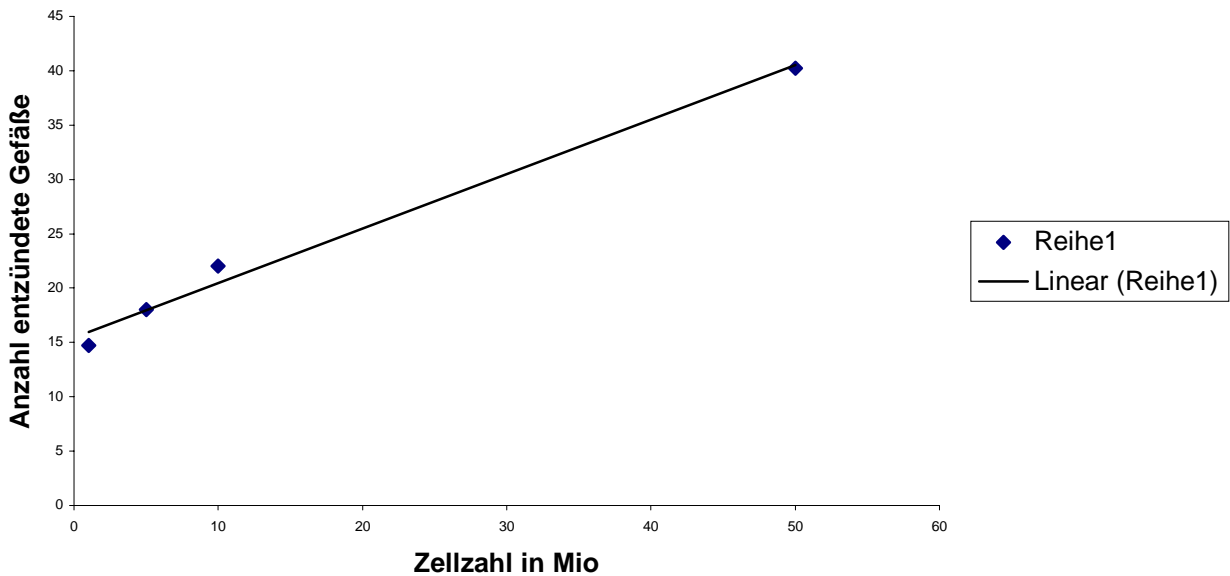


Abbildung 3.11: Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der injizierten T-Zellmenge.

3.3 Vergleich der Entzündungsreaktion mit und ohne periphere Injektion von T-Zellen

Wie schon erwähnt verhält sich der zeitliche Verlauf der Entzündungsreaktion ohne aktivierte T-Zellen ähnlich wie mit nachfolgender Injektion der Immunzellen. Jedoch erscheint die Reaktion mit Verstärkung früher und ausgeprägter als ohne. Zudem war eine eindeutige linksseitige Reaktion erst nach peripherer Injektion zu erkennen.

Vergleicht man daher die maximalen Reaktionen in Abhängigkeit von der Superantigenkonzentration mit und ohne Verstärkung durch aktivierte T-Zellen, so lässt sich besonders in den höheren Konzentrationen eindeutig eine Verstärkung der Reaktion durch die Immunzellen erkennen ($n = 10$, $p < 0,005$, t-test für Regressionskoeffizienten).

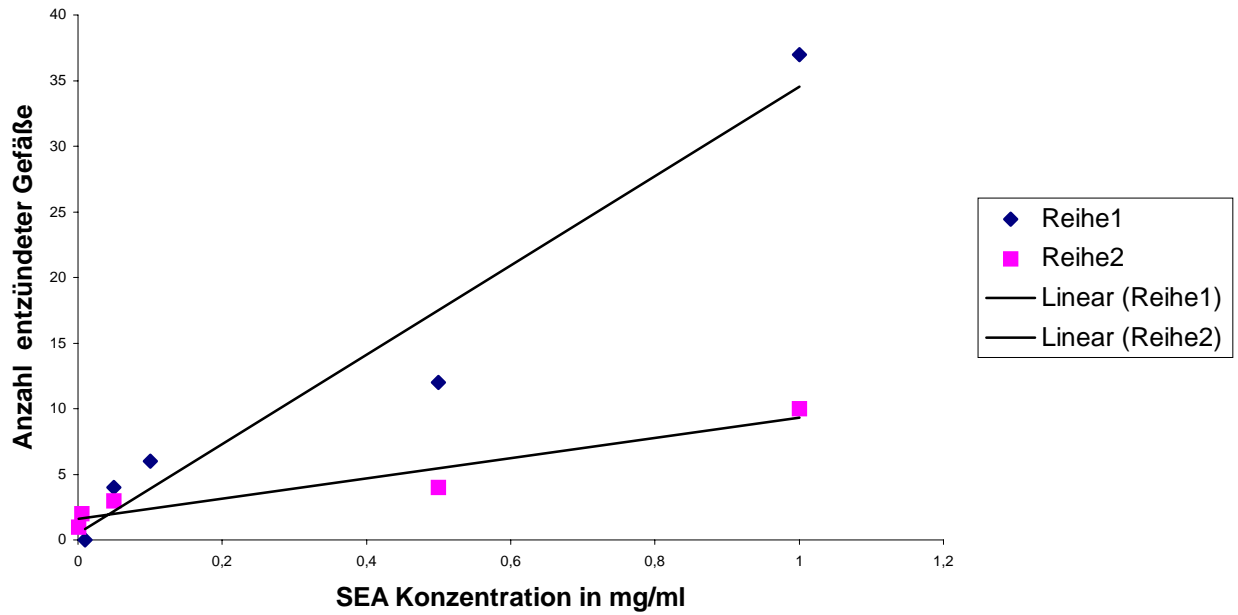


Abbildung 3.12: Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Superantigenkonzentration mit (Karas) und ohne (Quadrate) periphere Injektion von aktivierten T-Zellen.

3.4 Ergebnisse der Liquor und - Blutuntersuchungen

Sämtliche Blut- und Liquoruntersuchungen waren unauffällig, insbesondere waren keine oligoklonalen Banden im Liquor nachzuweisen.

4. Diskussion

Die derzeitigen Erklärungsansätze zur Pathogenese der Multiplen Sklerose basieren grundsätzlich auf zwei Modellen, zum einem auf der Autoimmunogenese und zum andern auf der viralen Entstehung (Martin, 1992). Beide können die epidemiologischen, klinischen und labortechnischen Befunde jedoch nur zum Teil erklären. Wie erklären sich z.B. die unterschiedlichen Verläufe der MS, oder warum können unspezifische Immunstimuli schubauslösend wirken. Aus welchem Grund sollte die Eigentoleranz der MBP spezifischen T-Zellen zusammenbrechen? In jüngster Zeit wurde den Superantigenen eine wichtige Rolle in der Entstehung einiger Autoimmunkrankheiten zugeschrieben, wie z.B. beim juvenilen Diabetes (Conrad et al., 1997). Neue Untersuchungen erwägen neben der Beteiligung mehrerer verschiedener Myelinautoantigene (Berger et al., 1997) auch bei der MS eine Superantigenbeteiligung (Rudge, 1991). Man nimmt dabei an, dass durch Viren kodierte Superantigene in der Lage sind, myelinspezifische T-Zellen in der Peripherie zu stimulieren. Diese sollen dann die Blut- Hirn- Schranke passieren und die myelinspezifische Entzündungsreaktion im Gehirn auslösen (Rudge, 1991; Scherer et al., 1993). In unserer Studie wurde ein fundamental anderer Ansatz gewählt: Ausgehend von einem neurotrophen Virus mit Expression eines Superantigens im ZNS als mögliche Ursache der MS wurde die Wirkung von Superantigenen im ZNS untersucht. Die gewonnenen Daten zeigen eine der MS ähnelnde Leukoenzephalitis und sprechen damit für eine zentralere Rolle der Superantigene in der Pathogenese der MS als bisher angenommen.

4.1 Wanderung von Immunzellen ins Gehirn

Sowohl bei intrazerebraler Superantigen- als auch bei Kochsalzinjektion konnte eine perivaskuläre Entzündungsreaktion in beiden Hemisphären für 2 bis 3 Tage ausgelöst werden. Daraus lässt sich folgern, dass hierfür nicht das Superantigen, sondern die Injektion an sich verantwortlich sein könnte. Durch perioperativen Stress aktivierte T-Zellen könnten dabei vermehrt die BHS überwinden und an natürlichen Prädilektionsstellen wie dem Corpus callosum und der periventriculären weissen Substanz für eine superantigen - unspezifische Entzündungsreaktion sorgen. Dafür spricht auch die bilaterale Entzündungsreaktion nach zusätzlicher i.v. Injektion der aktivierten T-Zellen, welche zwar unabhängig vom

Superantigenen auftrat, dafür um so mehr von der Anzahl der peripher injizierten Zellen abhing. Die Fähigkeit peripherer T-Zellen, im aktivierten Zustand die BHS zu überwinden, wurde schon mehrfach beschrieben (Hickey et al., 1991; Wekerle et al., 1986). Weiterführende Überlegungen könnten zu der Annahme führen, dass eben diese Erhöhung der peripheren aktivierten T- Zellen im Rahmen von Infektionskrankheiten mit einem vermehrten Übertritt der Zellen ins Gehirn einhergeht. Die entstandenen perivaskulären Infiltrate könnten somit eine Ursache für die Allgemeininfekte begleitende Abgeschlagenheit und psychomotorische Verlangsamung sein, oder sogar bei längerer Präsenz zur Komplikation der Enzephalopathie führen , wie z.B. bei Sepsis-Patienten.

Die bevorzugte Lokalisation der entzündlichen Plaques liegt auch bei der MS um die Ventrikel und im Corpus callosum. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass auch diese Verteilung dem natürlichen Muster der Immunzelleinwanderung ins Gehirn folgt. Mögliche Ursachen für diese typische Verteilung könnten unter anderem in der regional unterschiedlichen Expression von spezifischen Adhäsionsmolekülen oder in hämodynamischen oder mechanischen Besonderheiten zu finden sein.

4.2 Superantigenenzephalitis

Nach Abklingen der bilateralen Entzündungsreaktion war eine Persistenz der Rundzellen lediglich in der behandelten Hemisphäre zu beobachten. Wir nehmen an, dass aktivierte T-Zellen das auf MHC II Molekülen präsentierte Superantigen erkennen, über die V β Region des T-Zell Rezeptors binden und eine lokale Entzündungsreaktion auslösen. Weder nach SEB- noch nach Kochsalzinokulation konnte eine derartige persistierende Entzündungsreaktion beobachtet werden. Man kann daher hier von einer superantigenspezifischen Reaktion ausgehen. Das Ausbleiben der Entzündungsreaktion nach Inokulation von SEB entspricht der vorbeschriebenen fehlenden Stimulationsfähigkeit von T-Zellen durch SEB in vitro (Rott et al, 1992).

4.2.1 Verlauf der Leukoenzephalitis

Wie schon beschrieben waren nach 3 bis 4 Tagen nur noch auf der behandelten Seite Entzündungszellen zu beobachten. Das Maximum der Entzündungsreaktion auf der

behandelten Hemisphäre lag ohne T-Zellinjektion erst am 6. Tag, während es mit T-Zelltransfer schon am 4. Tag lag. Eventuell könnte das höhere Angebot an T-Zellen einen früheren Anstieg der entzündlichen Reaktion ausmachen.

In unseren Versuchen zeigte die Entzündung einen selbstlimitierenden Charakter innerhalb von 2 Wochen, unabhängig vom Transfer peripherer Lymphozyten. Vermutlich wird das Superantigen in diesem Zeitraum abgebaut und steht dann nicht mehr zur Präsentation auf MHC II positiven Zellen zur Verfügung. Dieser selbstlimitierende Verlauf ist vergleichbar mit dem spontanen Abklingen der Schübe bei der Multiplen Sklerose. Klinisch kann deren Schubdauer zwar wesentlich länger sein, jedoch zeigten Capra et al., 1992 mittels Gadolinium MRT, dass die eigentliche Entzündung im Gehirn einem Zeitraum von etwa zwei Wochen entspricht.

4.2.2 Intensität der Leukoenzephalitis

Während nach Superantigeninokulation alleine im Durchschnitt $6,7 \pm 6,1$ und maximal 16 entzündete Gefäße beobachtet werden konnten (vgl. 3.1.3), waren nach T-Zellinjektion im Durchschnitt $18,5 \pm 11,4$ und maximal 37 entzündete Gefäße zu sehen (vgl. 3.2.3). Die Intensität der durchschnittlichen Entzündungsreaktion hängt damit signifikant vom Angebot der aktivierten T-Zellen im Gehirn ab ($p < 0,05$; zweiseitiger U-Test). Vergleicht man die Maximalreaktionen mit und ohne T-Zelltransfer in Abhängigkeit von der Superantigenkonzentration, so lässt sich auch hier die Abhängigkeit vom T-Zellangebot signifikant nachweisen ($n = 10$, $p < 0,005$; t-test für Regressionskoeffizienten) (vgl. 3.3).

Letztlich konnte auch bei konstantem Superantigenangebot ein linearer Bezug zwischen Entzündungsausmaß und angebotener T-Zellzahl dargestellt werden (vgl. 3.2.5).

Die Abhängigkeit der Entzündungsreaktion von der Superantigenkonzentration im Gehirn konnte zwar auch ohne Verstärkung mit aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden, jedoch war die Entzündungsintensität eher gering (vgl. 3.1.2 Abb. 3.3). Mit Verstärkung durch aktivierte T-Zellen konnte zumindest eine statistische Tendenz zur Abhängigkeit vom Superantigenangebot nachgewiesen werden (vgl. 3.2.4 Abb.3.9).

Die Superantigenpräsentation im Gehirn alleine ist also kaum imstande, eine spezifische Entzündungsreaktion auszulösen. Vielmehr werden aktivierte T-Zellen benötigt, welche in der Lage sind, an den Superantigen - MHC II - Komplex zu binden und nachfolgend eine lokale Entzündungsreaktion auszulösen. Das Ausmaß der entzündlichen Reaktion korreliert

demnach mit der Anzahl der vorhandenen aktivierten T-Zellen, seien diese nun von uns injiziert oder aber endogen z.B. durch Infektionen oder Stress stimuliert.

4.3 Rolle der myelinspezifischen T-Zellen

In früheren Konzepten der Pathogenese der MS, wie zum Beispiel der EAE, wurde angenommen, dass myelinspezifische T-Zellen verantwortlich für die Zerstörung der Myelinscheiden sind. In Bezug auf die Rolle der Superantigene ging man dabei lediglich von einer Anregung der autoreaktiven Immunantwort aus (Rudge, 1991).

Wie schon erwähnt, stimulieren Superantigene eine große Anzahl von T-Zellen mit bestimmter V β Region, aber ungeachtet ihrer Antigenspezifität (Scherer et al., 1993). SEA ist allerdings nicht in der Lage, die früher verdächtigten MBP - spezifischen T-Zellen zu aktivieren (Rott et al., 1992). Auch aus diesem Grund wurde in unserem Modell SEA inokuliert. Die T-Zellen wurden dagegen ganz unspezifisch mit Concanavalin A stimuliert. Sowohl das Überwinden der Bluthirnschranke als auch eine toxische Demyelinisierung durch die aktivierten T-Zellen geschieht völlig unabhängig von der antigenen Determinante (Wekerle et al., 1986 Wisniewski et al., 1975).

Demnach scheint eine Beteiligung von autoreaktiven MBP spezifischen T-Zellen in unserem Modell eher unwahrscheinlich. Auch ein möglicher Zusammenbruch der Immuntoleranz der T-Zellen spielt in unserem Modell eine untergeordnete Rolle. Natürlich kann eine zusätzliche Aktivierung myelinspezifischer Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden, allerdings erachten wir deren Wirkung als relativ gering.

Ein wichtiger Aspekt unserer Studie ist also, dass wir ohne vorherige Immunisierung der Tiere mit Myelinbestandteilen und ohne Durchbrechung der Immuntoleranz eine MS ähnliche Leukoenzephalitis auslösen konnten.

4.4 Modellvorstellung

Man könnte sich also ein Modell der Multiplen Sklerose vorstellen, indem durch neurotrophe Viren ins Gehirn gelangte Superantigene dort von MHC II - tragenden Zellen präsentiert werden. Unter normalen Umständen wäre die Anzahl der aktivierten T-Zellen im Gehirn zu gering, um eine Entzündungsreaktion auszulösen. Nach Aktivierung peripherer T-Zellen

durch infektiöse Stimuli könnten jedoch eine sehr viel größere Anzahl aktivierter T-Zellen die BHS überwinden, das gebundene Superantigen erkennen und somit eine zum Schub führende Entzündungsreaktion im Gehirn auslösen. Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass einem klinischen Schub ein erhöhter Titer an proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IFN}\gamma$ vorausgeht (Beck et al, 1988), was für eine Schubtriggerung durch eher unspezifische Immunstimuli sprechen würde. Dadurch könnten z.B. der schubweise Verlauf der Erkrankung sowie die eher unspezifischen Schubauslöser Infektion, Stress oder Schwangerschaft erklärt werden. Im Gegensatz zur EAE erfordert das Superantigen Modell keinen Zusammenbruch der Immuntoleranz oder Unterschiede der Immunregulation zwischen betroffenen und gesunden Individuen.

4.4.1 Einfluss von Retrovirus und Superantigen auf den Verlauf der MS

Die unterschiedlichen Eigenschaften von Retrovirus und dessen Superantigen könnten eine Erklärung für den klinischen Verlauf der MS bieten. Wie schon besprochen könnte die Expression des Superantigens im Gehirn zusammen mit der unspezifischen Aktivierung des Immunsystems für die Schubauslösung verantwortlich sein, dementsprechend der auch von uns beschriebene selbstlimitierende Verlauf der Entzündung für die Remissionen. Ursache des primär chronischen Verlaufs könnte dagegen eine Persistenz des infektiösen Agens, wie z.B. des Retrovirus sein. Durch fortschreitende Degeneration der Oligodendrozyten und damit Demyelinisierung könnte die schleichende Progredienz dieser Verlaufsform erklärt werden. Das Fehlen der Schübe könnte auf eine fehlende Expression des Superantigens, ungenügende Präsentation oder fehlende Erkennung durch T-Zellen zurückzuführen sein. Tatsächlich ist das Ansprechen auf Immunsuppressiva bei MS Patienten mit chronisch progredientem Verlauf unbefriedigend, noch zeigen sie ausgeprägte Entzündungsherde, wie sie beim schubförmigen Verlauf zu finden sind (Thompson et al., 1997). Der sekundär progressive Verlauf der MS schließlich könnte eine Kombination beider Faktoren sein, das heißt Schubauslösung durch Superantigenerkennung einerseits und chronische Demyelinisierung durch das Retrovirus andererseits.

4.4.2 Einfluss der Superantigene auf die labortechnischen Besonderheiten der MS

Nachdem Superantigene ausschließlich an einen bestimmten Teil von MHC II Molekülen binden (Herman et al., 1990), wäre das von uns postulierte Superantigen Modell vereinbar mit der Verbindung des schubförmigen Verlaufs mit gewissen Klasse II Allelen (Oksenberg et al., 1997). Da Superantigene T- Zellen ungeachtet ihrer Antigen-spezifität über deren V β Rezeptoren aktivieren, würde man eine polyklonale T-Zellpopulation erwarten (Scherer et al., 1993). Tatsächlich wurden eine entsprechende klonale Heterogenität in aktiven Plaques gefunden (Wucherpfennig et al., 1992). Darüber hinaus führen einige Superantigene zu einer selektiv klonalen Aktivierung von B-Zellen (Duan et al., 1992), was mit dem Auftreten der typischen oligoklonalen Banden in der isoelektrischen Fokussierung im Liquor vereinbar wäre. Nachdem oligoklonale Banden mit gewisser Verzögerung zur akuten Entzündung auftreten (Sandberg-Wohlheim et al., 1975), erscheint das Fehlen dieses Befunds in den von uns getesteten Liquorproben nicht ungewöhnlich. Auch im Tiermodell der akuten EAE waren keine oligoklonalen Banden aufgetreten (Metha et al., 1981).

Die Beschränkung der Entzündungsreaktion auf das ZNS unter Schonung der Peripherie könnte durch einen Neurotropismus des verantwortlichen Retrovirus verursacht sein.

4.5 Wissenschaftliche und therapeutische Perspektiven

Die genauen Bedingungen, unter denen zerebral exprimierte Superantigene einen toxischen Effekt auf die Myelin produzierenden Oligodendrozyten ausüben, müssen noch geklärt werden. Fest steht, dass Superantigene bereits erfolgreich zur Verhinderung der EAE eingesetzt wurden, indem sie eine Anergie von V β 8+ positiven T-Zellen auslösten (Rott et al., 1992). Nach Identifikation des verantwortlichen Superantigens könnte dieses entsprechend zur Prävention weiterer MS Schübe eingesetzt werden. In der Tat wurden Anfang des letzten Jahrhunderts Bakterien und damit eventuell auch Superantigen enthaltende Lösungen zur Therapie der MS eingesetzt (Wagner- Jauregg, 1922).

5. Schlussfolgerung

Ziel unserer Untersuchung war die Einführung eines neuen Tiermodells in die MS Forschung. Es gelang uns, die immunologischen Hauptbefunde dieser Krankheit nachzuvollziehen oder mit Hilfe vorangegangener Studien herzuleiten. Das vorgestellte Superantigenmodell erscheint uns vereinbar mit einer infektiösen Ursache und könnte durch die T-Zellaktivierung eine Erklärung für die schubauslösende Wirkung unspezifischer Immunstimuli wie Infektionen und Stress bieten. Es liefert zudem einen Erklärungsansatz für die verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung. Entgegen den anderen Tiermodellen erfordert das Superantigenmodell keinen Zusammenbruch der Immuntoleranz gegen körpereigene Myelinbestandteile. Es ist weiterhin mit den meisten labortechnischen Besonderheiten der MS vereinbar.

Weitere eingehende Untersuchungen werden noch nötig sein, um die komplexen immunologischen Vorgänge in der Entstehung der MS wirklich vollständig zu klären. Noch ist nicht eindeutig bewiesen, ob Superantigene wirklich eine solch zentrale Rolle in der Pathogenese spielen. Unser Modell soll jedoch einen weiteren Ansatz zur Ursachenforschung auf dem Gebiet der Multiplen Sklerose bieten.

6. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine Erkrankung mit relativ hoher Prävalenz, die bereits im frühen Erwachsenenalter zu fortschreitender Behinderung führen kann. Daraus ergibt sich eine große medizinische, soziale und ökonomische Bedeutung dieser Krankheit. Unser bisheriges Wissen stützt sich vor allem auf klinische und therapeutische Beobachtungen am Patienten sowie auf die Erkenntnisse aus den bisherigen Tiermodellen. Keines dieser Modelle ist jedoch in der Lage, die Multiple Sklerose in ihren verschiedenen Verläufen zu imitieren.

Migrationsstudien weisen auf den Einfluss einer in der Kindheit erworbenen Infektion hin. Welcher Erreger jedoch tatsächlich verantwortlich sein könnte, ist bislang noch nicht erwiesen. In letzter Zeit wurde den viralen und bakteriellen Superantigenen vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt, da sie in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen auftreten. Es ist bekannt, dass Superantigene bis zu 20% der V beta positiven T- Lymphozyten unabhängig von ihrer Antigenpezifität stimulieren können.

Geht man nun davon aus, dass dieser unbekannte Erreger ein neurotropes Retrovirus sei, so könnte eine intrazerebrale Bildung und Präsentation von Superantigenen für die Autoimmunphänomene im Rahmen der Multiplen Sklerose verantwortlich sein, während das Virus selbst zur schleichenden Progression führt.

Von dieser Hypothese ausgehend wurde die Reaktion auf intrazerebral injizierte Staphylokokken-Enterotoxine bei Lewis-Ratten histologisch (HE-Schnitte) untersucht. Nach intrazerebraler Injektion von SEA, SEE und TSST1, nicht aber nach Injektion von SEB oder Lösungsmittel wurde eine variabel ausgeprägte perivaskuläre Entzündungsreaktion in Nachbarschaft zum Injektionskanal beobachtet. Diese Enzephalitis ließ sich deutlich verstärken durch i.v.-Injektion ConcanavalinA-aktivierter Milzzellen. In den ersten 3 Tagen nach Injektion wurden unspezifische Infiltrate in beiden Hirnhälften beobachtet. Die Herde lagen dabei hauptsächlich im Corpus callosum und periventrikulär, welche möglicherweise als natürliche Prädilektionsstellen für die Einwanderung aktivierter Lymphozyten angesehen werden könnten. Erst im weiteren Verlauf (Tag 4-6) zeichnete sich eine deutlich Entzündungsreaktion auf der Injektionsseite ab. Vermutlich war hierfür eine Erkennung des auf MHC II positiven Zellen präsentierten Superantigens durch aktivierte T-Zellen mit nachfolgender Entzündungsreaktion verantwortlich. Die Intensität dieser Entzündungsreaktion war abhängig von der Konzentration des inokulierten Superantigens sowie von der Anzahl der injizierten T-Zellen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Superantigene ohne Zusammenbruch der Immuntoleranz eine Entzündungsreaktion auslösen können. Das Ausmaß der Entzündungsreaktion hängt von der Anzahl zirkulierender aktivierter superantigen-spezifischer T-Zellen ab. Dieser Zusammenhang ähnelt der Schubauslösung bei der Multiplen Sklerose durch unspezifische Immunstimuli. Zudem wurde gezeigt, dass aktivierte aber antigenunspezifische T-Zellen nach einem bestimmten Verteilungsmuster ins ZNS einwandern.

Das Zusammenspiel Retrovirus mit intrazerebralen Superantigenen und Immunzellen aus der Peripherie kann somit zum besseren Verständnis der Immunreaktionen im ZNS führen und bietet darüber hinaus möglicherweise neue Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Verläufe der Multiplen Sklerose.

7. Literatur

Beck J., Rondot P., Falcoff E., Kirchner H., Wietzerbin J.: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbation? *Acta Neurol. Scand.* 1988; 78:318-323

Berger T., Weerth S., Kojima K., Linington C., Wekerle H., Lassmann H.: Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T-lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab. Invest.* 1997;76:355-364

Boylan KB., Takahashi N., Paty DW., Sadovnick AD., Diamond M., Hood LE., Prusiner SB.: DNA length polymorphism 5' to the myelin basic protein gene is associated with multiple sklerosis. *Ann. Neurol.* 1990; 27:291-297

Bradl M., Linington C.: Animal models of demyelination. *Brain Pathology* 1996; 6:303-311

Brocke S., Piercy C., Steinman L.: Superantigens in demyelinating disease. *Springer Semin Immunopathol* 1996; 18 51-56

Brosnan CF., Raine CS.: Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 1996; 6:243-257

Brown AM. and McFarlin DE.: Relapsing experimental encephalomyelitis in SJL mouse. *Lab. Invest.* 1981; 45:278-284

Capra R., Marciano N., Vignolo LA., Chiesa A., Gasparotti R.: Gadolinium-pentetic acid magnetic resonance imaging in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 1992; 49:687-689

Confafreux C., Vukusic S., Moreau T., Adeleine P. : Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:1430-1438

Conrad B., Weissmahr RN., Boni J., Arcari R., Schupbach J., Mach B.: A human endogeneous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997; 90:303-313

Dal Canto MC., Melvold RW., Kim BS., Miller SD.: Two models of multiple sclerosis: Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microsc. Res. Tech.* 1995 ; 32 :215-229

Dean G., Kurtzke JF.: On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br. Med. J.* 1971; ii:725-729

Dean G., McLoughlin H., Brady R., Adelstein AM., Tallett-Williams J: Multiple sclerosis among immgrants in Greater London. *BR. Med. J.* 1976; i:861-864

Duan X., Nerl C., Janssen O., Kabelitz D.: T-cell- dependent activation of leukaemic B-cells by staphylococcal enterotoxin 'Superantigens'. *Immunology* 1992; 75 420-426

Ebers G.C.: Genetic factors in multiple sclerosis. *Neurol. Clin.* 1983; 1: 645-54

Ebers GC., Buhman DE., Sadovnick AD., Paty DW., Warren S., Hader W., Murray TJ., Seland TP., Duquette P., Grey T., Nelson R., Nicolle M., Brunet D.: A population based study of multiple sklerosis in twins. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315:1638-1642

Ebers GC.: Cerebrospinal fluid electrophoresis in mutiple sclerosis. In: Poser CM et al., *The diagnosis of multiple sclerosis.* Thieme Stratton Inc, New York 1984; pp. 179-184

Edwards S., Zvartau M., Clarke H., Irving W., Blumhardt LD.: Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neursurg. Psychiatry* 1998; 64:736-741

Fields B., Malchiodi E., Hongmin L., Ysern X., Stauffacher C., Schlievert P., Karjalainen K., Mariuzza R.: Crystal structure of a T-cell receptor β -chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996; 384 188-192

Gorodezky C., Najeri R., Rangel BE., Castro LE., Flores J., Velazquez G., Granados J., Sotelo J.: Immunogenetic profile of multiple sklerosis in Mexicans. *Human Immunol.* 1986; 16:364-374

Herman A., Croteau G., Sekaly R-P., Kappler J., Marrack P.: HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells. *J Exp Med* 1990; 172 709-717

Hickey WF., Hsu GL., Kimura H.: T-Lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991; 28:254

Hofman FM., vonHanwehr RI., Dinarello CA.: Immunregulatory molecules and IL2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J. Immunol.* 1986; 136:3239-3245

Kesselring Jürg: Multiple Sklerose. 1993; 2. Auflage; Kohlhammer Verlag

Kidd D., Barkhof F., McConnell R., Algra P.R., Allen I.V., Revesz T.: Cortikal lesions in multiple sclerosis. *Brain* 1999; 122:17-26

Kotzin BL.: Superantigens and their potential role in human disease. *Adv Immunol* 1993; 54:99

Kotzin BL.: Superantigens and their role in disease. *Hosp Prac (Off Ed)* 1994; 29:59

Kurdi A., Ayesh I., Addallat A., Maayta U., McDonald WI., Compston DAS., Batchelor JR.: Different B-lymphocyte antigens associated with multiple sklerosis in Arabs and Northern Europeans. *Lancet* 1977; i:1123-1125

Kurtzke JF., Hyllestad K.: Multiple sclerosis in the Faroe Islands. Clinical and epidemiological features. *Ann. Neurol.* 1979; 5:6-21

Lassmann H., Zimprich F., Rössler K., Vass K.: Inflammation in the nervous system. Basic mechanisms and immunological concepts. *Rev. Neurol.* 1991; 147:763-781

Lassmann H.: Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1983

Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H.: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47 (6):707-17

Lucchinetti C.F., Brück W., Rodriguez M., Lassmann H.: Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathology* 1996; 6:259-274

Ludwin SK.: Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. An analysis of contributing factors. *Lab. Invest.* 1980; 43:382-387

Marrosu HG., Muntoni F., Murru MR., Spinicci G., Pischelda MP., Goddi F., Cossu P., Piatsu M.: Sardinian multiple sclerosis is associated with HLA-DR4: a serological and molecular analysis. *Neurology* 1988; 38:1749-1753

Martin R., McFarland HF., McFarlin DE.: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol* 1992; 10:153-187

McCombe PA., Clark P., Frith JA., Hammond SR., Stewart GJ., Pollard JD., McLeod JG.: Alpha-1 antitrypsin phenotypes in demyelinating diseases: an association between demyelinating disease and the allele PiM3. *Ann. Neurol.* 1985; 18:514-516

Mehta P.D., Lassmann H., Wisniewski H.M.: Immunologic studies of chronic relapsing EAE in guinea pigs: similarities to multiple sclerosis. *J. Immunol.* 1981; 127:334-338

Meinl Edgar: Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 1999; 12:303-307

Naito S., Kuroiwa Y., Itoyama T., Tsubaki T., Horiwaka A., Sasazuki T., Noguchi S., Ohtsuki S., Tokumi H., Miyatake T., Takahata N. Kawanami S., McMichael AJ.: HLA and Japanese MS. *Tissue Antigens* 1978; 12:19-24

Neshat MN, Goodglick L., Lim K., Braun J.: Mapping the B cell superantigen binding site for HIV-1 gp120 on a V(H)3 Ig. *Int Immunol* 2000; 12(3):305-12

Oksenberg JR. and Hauser SL.: New insights into the immunogenetics of multiple sklerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 1997; 10:181-185

Pandey JP., Goust JM., Salier JP., Fundenberg HH.: Immunoglobulin heavy chain (Gm) allotypes in multiple sklerosis. *J. Clin. Invest.* 1981; 67:1797-1800

Panitch HS., Haley AS., Hirsch RL., Johnson KP.: Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987; I:893

Paterson P., Drobish D., Hanson M., Jacobs A.: Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Int Arch Allergy* 1970; 37 26-40

Pender MP., McCombe A, Yoong G., Nguyen KB.: Apoptosis of alpha/beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and required tolerance. *J. Autoimmun.* 1992; 5:401-410

Perron H., Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos BG., Komurian PF, et al.: Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Reseach Group in Multiple Sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:7583-7588

Prineas JW.: The neuropathology of multiple sclerosis. In Koetsier JC (ed): *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, New York 1986; Vol 3 47:213-157

Racke MK., Dhib-Jalbut S., Canella B., Albert PS., Raine CS., McFarlin DE.: Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor beta 1. *J. Immunol.* 1991; 146:3012-3017

Racke MK., Quigley L., Canella B., Raine CS., McFarlin DE., Scott DE. : Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1994; 152:2051

Raine CS., Moktharian F., McFarlin DE.: Adoptively transferred chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Neuropathological analysis. *Lab. Invest.* 1984; 51:534-546

Raine CS.: Multiple sclerosis and chronic relapsing EAE: comparative ultrastructural neuropathology. In *Multiple Sclerosis*, ed. JF. Hallpike, CWM. Adams, WW Tourtelotte, 1983 pp.413-478. Baltimore: Williams & Wilkins

Reiber H.: *Liquordiagnostik. Diagnose und Labor* (Marburg). 1987

Rott O., Wekerle H., Fleischer B.: Protection from experimental allergic encephalomyelitis by application of a bacterial superantigen. *Int Immunol* 1992; 4:347-353

Rudge Peter: Does a retrovirally encoded superantigen cause multiple sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1991; 54:853-855

Sadovnick, A.D., Baird P.A., Ward R.H. : Multiple sclerosis : updated risks for relatives. *Am. J. Med. Genet.*1988; 29:533-41

Sandberg-Wohlheim M.: Optic neuritis: studies on the cerebrospinal fluid in relation to clinical course in 61 patients. *Acta Neurol. Scandinav.* 1975; 25:167-178

Sanders ME., Koski CL., Robbins D.: Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillan-Barré syndrome and multiple sclerosis. *J. Immunol.* 1986; 136:4456-4459

Scherer M.T., Ignatowicz L., Winslow G.M.:Superantigens: Bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. *Annu. Rev. Cell Biology* 1993; 9:101-28

Selmaj K., Brosnan CF., Raine C.: Colocalization of lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T-cell receptor and hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:6452-6456

Selmaj Krzysztof: Pathophysiology of the blood-brain barrier. *Springer Semin Immunopathol* 1996; 18 57-73

Staugaitis SM., Shapshak P., Tourtellotte WW., Lee MM., Reiber HO.: Isoelectric focusing of unconcentrated cerebrospinal fluid: application to ultrasensitive analysis of oligoclonal immunoglobulin G. *Electrophoresis* 1985; 6 287-291

Storch M., Lassmann H.: Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 1997; 10:186-192

Sun D., Quin Y., Chluba J., Epplen JT., Weckerle H.: Suppression of experimental induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 1988; 332:843-845

Theiler, M.: Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. *J. Exp. Med.* 1937; 65:705-719

Thompson AJ., Brazil J., Feighery C., Whelan A., Kellet J., Martin EA., Hutchinson M.: CSF myelin basic protein in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 1985; 72:577-583

Thompson AJ., Polman C.H., Miller D.H., McDonald W.I., Brochet B., Filippi M., Montalban X., De Sá J.: Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120: 1085-1096

Tiwari JL., Terasaki PI.: In *HLA and disease associations*. New York Springer Verlag 1985; 152-167

Tourtellotte WW., Walsh MJ.: Cerebrospinal fluid profile in multiple sclerosis. In: Poser CM et al., *The diagnosis of multiple sclerosis*. Thieme Stratton Inc, New York 1984; pp. 165-178

Traugott U., Reinherz EL., Raine CS.: Multiple sclerosis: distribution of T-cell subsets within active chronic lesions. *Science* 1983; 219:308-310

Wagner-Jauregg J.: Vakzitherapie bei Nervenkrankheiten. *Wien. Med. Wochr.* 1922; 72:25-28

Waksman B.H., Reynolds W.E.: Minireview: multiple sclerosis as a disease of immune regulation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1984 ; 175:282-94

Wekerle H., Linington C., Lassmann H., Meyermann R., Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 1986; 9:271-277

Wekerle Hartmut: Lymphocyte traffic to the brain. *The blood-brain barrier*, edited by William M. Pardridge, Raven Press, Ltd., New York, 1993; 67-85

Weller RO.: Lymphocyte targeting of the CNS. *Brain Pathology.* 1996; 6:284

Willer C.J and Ebers G.C.: Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. *Curr. Opin. Neurol.* 2000;13:241-247

Wisniewski H.M.,om B.R. : Primary demyelination as a nonspecific consequence of a cell mediated immune reaction. *J. Exp. Med.* 1975;141(2):346-59

Wucherpfennig K.W., Newcombe J., Li H., Keddy C., Cuzner M.L., Hafler D.A.: T cell receptor $V\alpha$ - $V\beta$ repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 1992; 175:993-1002

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Kornhuber, Herrn Prof. Dr. Dr. med. Franke sowie Herrn Prof. Dr. med. Bischoff, die diese Arbeit betreuten und mir jederzeit bei Problemen und Fragen beratend zur Seite standen und somit einen maßgeblichen Anteil am Erfolg meiner Dissertation haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei:

- Frau Herfeld, medizinisch technische Assistentin der experimentellen Chirurgie der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, die einen großen Anteil der histologischen Verarbeitung der Gehirnschnitte für uns geleistet hat.
- Prof. Wagner und dem gesamten Team des mikrobiologischen Labors des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, welche mich gerade im Bereich der Bearbeitung der Lymphozyten unterstützt haben und mir geduldig zur Seite standen.
- Frau Dipl.-Math. R. Busch, Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, für Ihre Mithilfe und Anleitung bei der statistischen Auswertung der Daten.