

Aus dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie
Abteilung für Neuroimmunologie
Direktor: Prof. Dr. H. Wekerle

**Immunologische Kreuzreaktivität
zwischen dem
Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und Butyrophilin (BTN)
bei Multipler Sklerose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johannes Guggenmos
aus Erlangen

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Linington
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. J. Schendel
- Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Herms
Prof. Dr. C. Haass
Prof. Dr. Th. Brocker
- Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. U. Brehm
- Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter
- Tag der mündlichen Prüfung: 9. Januar 2003

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	6
1. EINLEITUNG.....	8
1.1 Multiple Sklerose.....	8
1.2 Epidemiologie und Ätiologie der Multiplen Sklerose.....	10
1.3 Das Immunsystem.....	12
1.4 Zentrale und periphere Toleranz.....	13
1.5 Orale Toleranz.....	15
1.6 Myelin im ZNS – ein mögliches Ziel einer Auto-Immunreaktion.....	16
1.7 Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) – ein mögliches, wichtiges Auto-Antigen.....	18
1.8 Molekulares Mimikry – Homologie zwischen MOG und BTN.....	20
1.9 Butyrophilin (BTN) – ein Modulator der Immunantwort gegen MOG durch molekulares Mimikry?....	24
1.10 Epidemiologische Assoziation zwischen MS und Milch-Verzehr.....	26
1.11 Gegenstand der vorliegenden Arbeit.....	27
2. MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Medien.....	28
2.1.1 Hitzeschocktransformation von Bakterienzellen.....	28
2.1.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	28
2.1.3 Gel-Elektrophoretische Methoden.....	29
2.1.4 Isolation MOG ^{Igd} -spezifischer Antikörper.....	30
2.1.5 Analyse von Seren und Liquor auf spezifische Antikörper - Western-Blot.....	31
2.1.6 Analyse von Seren und Liquor auf spezifische Antikörper - ELISA.....	32
2.1.7 Peptide.....	33
2.1.8 Antikörper.....	34
2.1.9 Menschliche Proben.....	35
2.1.10 Chemikalien.....	36
2.2 Hitzeschock-Transformation von Bakterienzellen.....	38
2.3 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	40

2.3.1	Übernachtskultur.....	40
2.3.2	Induktion.....	40
2.3.3	Zellaufschluss.....	41
2.3.4	Nickel-Chelat-Chromatographie.....	41
2.3.5	Dialyse.....	43
2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.....	43
2.4	Gel-Elektrophoretische Methoden.....	45
2.4.1	Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	45
2.4.2	Färbung von Proteingelen mit Coomassi-Blau.....	46
2.4.3	Analyse von DNA in Agarose-Gelen.....	47
2.5	Isolation MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper.....	47
2.6	Analyse von Serum und Liquor auf spezifische Antikörper.....	49
2.6.1	Western-Blot-Methode.....	50
2.6.2	“Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay” (ELISA).....	51
2.7	Statistik und Auswertungsmethoden.....	53
3.	ERGEBNISSE.....	55
3.1	Screening-Untersuchung auf spezifische Antikörper gegen MOG, BTN und BT3.3 in Seren von MS-Patienten und gesunden Spendern.....	55
3.2	Erfolgreiche Isolation von MOG ^{Igd} -spezifischen Antikörpern aus MS-Patienten und gesunden Spendern.....	59
3.3	Die Epitopspezifität der MOG ^{Igd} -spezifischen Antikörper ist heterogen bezüglich der MOG ^{Igd} -Peptide P1-P9.....	61
3.4	Der Verlust von Toleranz gegen MOG ist mit einer kreuzreaktiven Antikörper-Antwort gegen BTN assoziiert.....	64
3.5	BTN-spezifische Antikörper sind sowohl in MS-Patienten als auch in Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen im ZNS sequestriert....	68
3.6	Antikörper-Antworten gegen MOG ^{Igd} - und BTN ^{Igl} -Peptide co-segregieren im ZNS in MS-Pat. und in Pat. mit anderen neurologischen Erkrankungen.....	73
3.7	Butyrophilin (BTN) ist ein allgemein verbreitetes Umweltantigen.....	74
4.	DISKUSSION.....	76
4.1	Nachweis MOG ^{Igd} -spezifischer Antikörper.....	76
4.2	Aspekte der heterogenen Epitopspezifität der MOG ^{Igd} -spezifischen Antikörper..	76
4.3	Die Bedeutung der kreuzreaktiven Immunantwort gegen MOG und BTN.....	78

4.4 Überlegungen für die Zukunft.....	82
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	84
6. ANHANG.....	109
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	109
6.2 Dank.....	112
6.3 Curriculum Vitae.....	113

Zusammenfassung

Antikörper gegen die extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domäne (IgV-ähnliche Domäne, Igd) des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) vermitteln Demyelinisierung in einem Tiermodell für Multiple Sklerose (MS), der experimentellen Auto-Immun-Enzephalomyelitis (EAE). Diese Antikörper werden als Faktoren einer potentiellen Auto-Immunpathogenese der MS diskutiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten spezifische Antikörper gegen die extrazelluläre IgV-ähnliche Domäne von MOG (MOG^{Igd}) aus MS-Patienten und gesunden Spendern isoliert werden. Deren Epitopspezifität gegen einzelne lineare Peptide von MOG^{Igd} wurde ermittelt. Durch ELISA-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Epitopspezifität der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper in beiden Gruppen heterogen ist.

Durch den Nachweis einer humanen B-Zell-Antwort gegen lineare MOG^{Igd}-Peptide und der Heterogenität dieser Immunantwort wurde ein möglicher Einflussfaktor identifiziert, der von Bedeutung für funktionelle Aspekte von MOG-spezifischen Antikörpern in einer Auto-Immunpathogenese der MS sein könnte.

Als möglicher Modulator der Immunantwort gegen MOG durch molekulares Mimikry (molecular mimicry) wurde das Milch-Protein Butyrophilin (BTN) erkannt. Die IgV-ähnliche Domäne von BTN (BTN^{Igl}) zeigt zu 50% Homologie (Aminosäuresequenzidentität) zu der immunologisch bedeutenden extrazellulären IgV-ähnlichen Domäne von MOG (MOG^{Igd}).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass auch auf menschlicher Ebene Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN besteht. Dieser Zusammenhang war aus tierexperimentellen Studien bereits bekannt.

Mittels Western-Blot- und ELISA-Analyse wurde gezeigt, dass eine Immunantwort gegen BTN in MS-Patienten, in Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und in gesunden Spendern besteht. Serum- und Liquor-Antikörper-Antworten gegen MOG^{Igd}-Peptide und BTN^{Igl}-Peptide von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen wurden bezüglich ihrer Epitopspezifitätsmuster verglichen. Es konnte nachgewiesen werden, dass bezüglich der Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN diejenigen Epitope der beiden Proteine eine besondere Bedeutung haben, die innerhalb der Aminosäuresequenz 76-100 (Peptid P7) liegen. Es wurde gezeigt, dass Antikörper-Antworten gegen diese Region von BTN und dem homologen MOG selektiv im ZNS von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen sequestriert sind. Dadurch konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass eine funktionelle Bedeutung der molekularen Mimikry zwischen MOG und BTN besteht.

Als eine wahrscheinliche Konsequenz dieser Ergebnisse ist die Modulation einer potentiellen Auto-Immunantwort gegen MOG durch BTN zu sehen. In einem Szenario ist diese Modulation

harmlos oder sogar protektiv durch die Induktion von oraler Toleranz durch Epitope von BTN, die mit MOG kreuzreagieren. Alternativ könnten aber kreuzreaktive Antikörper und Th1-T-Zell-Antworten humorale und zelluläre Effektormechanismen in Gang bringen, die die weiße Substanz im ZNS angreifen. Die zu MOG^{Ig^d} kreuzreaktive Immunantwort gegen BTN^{Ig^I} könnte somit eine aktive Rolle in der Pathogenese der MS spielen.

Diese möglichen Zusammenhänge sind insbesondere von großem Interesse, da epidemiologische Studien eine Assoziation von MS mit Milch-Ernährung nachweisen konnten, über deren Ursache bisher Unklarheit herrscht.

Durch den Nachweis molekularer Mimikry zwischen MOG, einem möglichen wichtigen Auto-Antigen im Rahmen einer potentiellen Auto-Immunpathogenese der MS, und dem Milch-Protein BTN liegt mit dieser Arbeit der Versuch vor, die aus epidemiologischen Studien bekannte Assoziation der MS mit Ernährungsfaktoren, insbesondere von Milchprodukten, innerhalb des Konzeptes einer möglichen Auto-Immunpathogenese der MS ansatzweise zu erklären.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können sich weitere Erkenntnisse für eine potentielle Auto-Immunpathogenese der MS und deren Modulation ergeben.

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Dabei kommt es zu selektiver Demyelinisierung und axonalem Verlust in unterschiedlichem Ausmaß innerhalb multipler und entzündlicher Läsionen. Diese Läsionen können sich an unterschiedlichen Stellen innerhalb des gesamten ZNS ereignen.

Die Diagnose der MS wird zumeist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr gestellt. Die klinische Manifestation der Erkrankung variiert stark, da unterschiedliche Systeme des ZNS betroffen sein können. MS-Patienten haben somit sehr unterschiedliche Symptome. Hauptsymptome der Erkrankung sind Sehstörungen (Erstsymptom ist oft ein von den Patienten als drastisch empfundenen, allerdings oft reversibles Auftreten von Doppelbildern), Fatigue, psychische Veränderungen, Schwäche in den Extremitäten, Krämpfe, Parästhesien, Ataxie, Vertigo, Blasen- und Darmstörungen bis hin zu Paralyse und Verlust der Atemfunktion. Letzteres geschieht aber oft erst in sehr späten Stadien der Erkrankung. Diese Symptome sind direkte Folge von demyelinisierenden Entzündungsherden und assoziierter axonaler Zerstörung mit resultierendem Axonverlust (Silber and Sharief, 1999). Immer wieder gibt es während des Krankheitsverlaufs Phasen der Erholung, in denen eine Remyelinisierung der Läsionen stattfinden kann (Lassmann et al., 1997). Die Remyelinisierung ist oft ineffektiv, die Erregungsfortleitung über die Axonmembran bleibt trotz Remyelinisierungsvorgängen gestört. Häufig kommt es zur narbigen Defektheilung der Entzündungsherde, die mit einer irreversiblen Schädigung des neuronalen Netzwerks verbunden ist (Fergusen et al., 1997; Kornek et al., 2000). Ein längerer Verlauf der Erkrankung führt nicht selten zu chronischer Behinderung. Die Krankheitsdauer variiert stark, von wenigen Jahren in der akut-fulminanten Form, die vergleichsweise selten vorkommt (10% aller Erkrankten), bis hin zu mehreren Jahrzehnten. Leiden Patienten an der akut-fulminanten Form, sterben sie oft schon nach wenigen Jahren. (vgl. Weinshenker and Sibley, 1992; Noseworthy JH, 1999; Adams et al., 1997; Brandt et al., 1998; Hopf et al., 1999; Mumenthaler und Mattle, 2002)

Es sind verschiedene Verläufe der Erkrankung zu unterscheiden (Hohlfeld, 1997). Meist beginnt die MS mit einem schubförmig-remittierenden Verlauf (RR, „relapsing remitting“), der dann häufig nach einigen Jahren in einen sekundär-progressiven übergeht (CPII, „secondary chronic progressive“). Die Krankheit kann auch mit einem primär chronischen Verlauf einsetzen (CPI, „primary chronic progressive“). Dies ist oft der klinisch-pathologisch schlechtere Verlauf. Im sekundär chronisch-progressiven Verlauf findet die Verschlechterung des klinischen Krankheitszustandes vor dem Hintergrund einer nicht weiter festzustellenden Entzün-

dung des ZNS statt (Trapp et al., 1998). Es gibt auch Patienten, die nach der Diagnose einer schubförmig-remittierenden MS in dieser Form des Verlaufes verbleiben, und deren Erkrankung nicht in einen sekundär-progressiven Verlauf übergeht. Allerdings stellt dies eher eine Ausnahme dar. Diese Patienten sind klinisch oft nur wenig beeinträchtigt.

Die Pathologie der MS zeigt eine bedeutende Beteiligung des Immunsystems. Die Bezeichnung „Multiple Sklerose“ steht für die Beschreibung der vielfachen Narben, die im Rahmen von Immunreaktionen innerhalb des ZNS entstehen. In den Läsionsherden sind Zeichen aktiver Entzündung durch die Anwesenheit von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und anderen Zellen des Immunsystems festzustellen. Klinisch wird die Beteiligung des Immunsystems bei der Pathologie der MS an oligoklonalen Immunglobulinbanden im Liquor von MS-Patienten deutlich (Reiber, 1998). Die Feststellung dieser Banden ist ein wichtiges Diagnosekriterium für MS. Die positive Beeinflussung des Verlaufs der Erkrankung durch Therapien, die das Immunsystem beeinflussen, spricht ebenfalls für eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der MS (Ben-Nun et al., 1996; Zipp et al., 1998; Hohlfeld, 1999; Noseworthy et al., 1999; Neuhaus et al., 2000; Farina et al., 2001; Schubart und Linington, 2001).

Insgesamt zeigt die MS eine sehr heterogene Pathologie. Die Läsionen innerhalb des ZNS unterscheiden sich sehr von Patient zu Patient. Daraus ist zu schließen, dass wahrscheinlich verschiedenartige Effektormechanismen in der Pathogenese der MS beteiligt sind (Lucchinetti et al., 1996; Storch and Lassmann, 1997; Lucchinetti et al., 2000).

Was liegt dieser Immunreaktion zu Grunde?

Grundsätzlich wird von zwei Ansätzen ausgegangen, die sich zum Teil überlappen (Hohlfeld, 1999; Hunter and Hafler, 2000).

Die Immunreaktion könnten einerseits durch Infektion mit mikrobiellen Pathogenen verursacht werden (Cassetta and Granieri, 2000). Hauptsächlich werden in diesem Zusammenhang Viren diskutiert (Wekerle, 1998; Meinl, 1999; Soldan and Jacobson, 2001), oder es könnte sich andererseits um Auto-Immunphänomene handeln. Auch für diesen Ansatz gibt es wichtige Hinweise (Conlon et al., 1999).

Die Annahme, dass bei der MS-Pathogenese Infektionen des ZNS eine wichtige Rolle spielen, wird durch Tiermodelle unterstützt, in denen MS-ähnliche Erkrankungsverläufe durch virale Pathogene induziert werden können (Nijgena and Rodriguez, 1996; Smith-Norowitz et al., 2000). Ein wichtiges Tiermodell ist eine Erkrankung, die durch das Theiler's Murin-Enzephalomyelitis-Virus, TMEV, hervorgerufen wird (Tsunoda and Fujinami, 1996). Vielfache Studien konzentrierten sich darauf, mögliche Erreger für die Immunreaktion ausfindig zu machen (Riise, 1997). Doch es konnte trotz intensiver Bemühungen keine Infektion gefunden werden, die eindeutig mit der MS assoziiert ist.

Was spricht für eine Auto-Immunpathogenese der MS?

Die heterogenen pathologischen Befunde der MS können in Tiermodellen reproduziert werden, bei denen die Tiere mit Antigenen des ZNS immunisiert werden und daraufhin eine entzündliche und demyelinisierende Enzephalitis mit MS-ähnlichen Symptomen entwickeln (Bradl and Linington, 1996). Ein Beispiel für ein solches Tiermodell ist die experimentelle Autoimmun-Enzephalitis (EAE) (Ebers, 1999). In Mäusen ist die Entzündung in diesem Modell nur T-Zell vermittelt (Hjelmström et al., 1998, Dittel et al., 2000), in Ratten finden die entzündlichen Reaktionen und Demyelinisierung durch Vermittlung von T-Zellen und spezifischen Antikörpern statt. Dies spricht neben dem T-Zell-System auch für eine Beteiligung des B-Zell-Systems bei den pathologischen Vorgängen bei MS (Linington and Lassmann, 1987; Linington et al., 1992; Adelman et al., 1995; Storch et al., 1998; Lyons et al., 1999).

Von solchen Tiermodellen geht man aus, um die mögliche Auto-Immunpathogenese der MS zu untersuchen (Martin et al., 1992). Letztendlich zeigt das Tiermodell der EAE die größte Ähnlichkeit zu den beobachteten Immunphänomenen der MS.

Weitere wichtige Zeichen, die auf eine Auto-Immunpathogenese der MS hindeuten, sind die Expansion von spezifisch-reaktiven Zellen des Immunsystems und spezifischen Antikörpern gegen Antigene innerhalb des Myelins (Genain et al., 1999). In Studien zu Auto-Peptid-Liganden konnten auto-reaktive T-Zellen bei MS nachgewiesen werden (Bielekova et al., 2000).

Bei der MS handelt es sich also möglicherweise um eine Auto-Immunerkrankung gegen Antigene des ZNS, die für die Immunreaktion innerhalb des ZNS verantwortlich ist.

1.2 Epidemiologie und Ätiologie der Multiplen Sklerose

Es bestehen eindeutige, regionale und auch altersabhängige Besonderheiten im Zusammenhang der MS. Bezüglich des Auftretens der MS ist ein starkes Nord-Süd-Gefälle bekannt, und auch der Beginn der Erkrankung in meist jungen Lebensjahren ist auffallend. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer.

Die geographische Prävalenz der Erkrankung unterscheidet sich weltweit drastisch. Die Prävalenz der MS beträgt im mitteleuropäischen Raum (50-60° nördliche Breite) 60-100 Erkrankte auf 100.000 Einwohner, bei 30° nördlicher Breite verringert sie sich auf weniger als 10 auf 100.000. Am Äquator kommt die MS so gut wie nicht vor. Insgesamt werden in Europa und Nord-Amerika 20-100 Menschen auf 100.000 Einwohner von der Krankheit befallen, in Afrika und Asien sind dies nur 1-2 auf 100.000. Mit einer Prävalenz von 68 Erkrankten auf 100.000 Einwohner ist die MS eine der häufigsten neurologischen Krankheiten in Deutschland. (vgl. Adams et al., 1997; Hopf et al., 1999)

Die Ätiologie der MS ist nicht bekannt. Beteiligt zu sein scheinen genetische Faktoren und Umweltfaktoren (Cristen et al., 2000).

Genetisch besteht eindeutig eine Prädisposition für MS. Dies ging aus Zwillingsstudien hervor (Sadovnick et al., 1993; Sadovnick and Ebers, 1995; Oksenberg and Barcellos, 2000). Die Konkordanz in monozygotischen Zwillingen beträgt 25-30%. Dem stehen nur 4% bei dizygotischen Zwillingen oder Geschwistern gegenüber. Viele genetische Studien wurden zur Aufklärung der genetischen Komponente bezüglich Ätiologie der MS unternommen (Oksenberg et al., 1996, Zipp et al., 1995). Es wurden polygenetische, multiple Loci (mindestens sieben) ausfindig gemacht (Ebers, 1996; Cristen et al., 2000). Die Ergebnisse der genetischen Screening-Untersuchungen unterscheiden sich zwischen verschiedenen Populationen (Kira et al., 1996). Übereinstimmend konnte nur eine eindeutige Assoziation des HLA-DR2 Allels des MHC-Klasse-II-Moleküls mit der MS ermittelt werden (Pette et al., 1990; Madsen et al., 1999). Die Assoziation mit dem MHC-Komplex macht die Beteiligung von Immunmechanismen in der Pathogenese der MS wahrscheinlich (Davidson et al., 1988).

Die genetischen Studien implizieren insbesondere durch das Ergebnis einer Konkordanzrate von nur 25-30% bei monozygotischen Zwillingen, dass es eine Komponente von Umweltfaktoren in der Pathogenese der MS geben muss. Es ist also von einer Interaktion zwischen Gen- und Umweltfaktoren auszugehen (Sadovnick et al., 1993; Cristen et al., 2000).

Durch Migrationsstudien konnte aufgeklärt werden, dass Umweltfaktoren ihren Einfluss bis zum 15. Lebensjahr ausüben. Migration vor dem 15. Lebensjahr führt zum Erkrankungsrisiko der neuen Lebensregion (Gale and Martyn, 1995). Als Umweltfaktoren werden Infektionen diskutiert. Infektionen mit dem humanen Herpesvirus 6 (HHV-6, Challoner et al., 1995; Soldan et al., 1997), Masern (Burgoon et al., 1999), dem Epstein-Barr-Virus (Bray et al., 1983; Ascherio and Munch, 2000) oder mit Chlamydien (Sriram et al., 1998, Derfuss et al., 2001) sind als die wichtigsten, diskutierten Infektionen zu nennen. Allerdings konnte keine einzige Infektion eindeutig mit MS assoziiert werden.

Epidemiologische Studien zeigen ein Fülle von Umweltfaktoren, die mit der MS assoziiert sein könnten (Cendrowski et al., 1969; Lauer, 1994). Es fiel auf, dass auch ein Einfluss diätetischer Faktoren zu bestehen scheint, wobei insbesondere Milch und Milchprodukte von besonderer Bedeutung sind. Auf diesen Zusammenhang wird unter 1.10 ausführlicher eingegangen.

Es wird auch über den möglichen Einfluss des sozio-ökonomischen Lebensstandards und einer westlichen Lebensweise bezüglich der Ätiologie der MS diskutiert (Lauer, 1993; Lauer, 1994).

Offensichtlich handelt es sich bei der MS um eine Erkrankung, bei deren Pathogenese neben einer genetischen Suszeptibilität multiple Faktoren beteiligt zu sein scheinen (Giovannoni and Hartung, 1996). Die Heterogenität der Erkrankung ist ein Zeichen für eine Vielzahl von Ein-

flussfaktoren auf die Immunreaktionen, die sich im ZNS abspielen (Lucchinetti et al., 1996; Storch and Lassmann, 1997).

Als Arbeitshypothese für die vorliegende Arbeit galt die Annahme, dass die MS eine Erkrankung ist, welche in genetisch empfänglichen Individuen durch Umweltfaktoren ausgelöst wird, die zu einer Durchbrechung von Selbst-Toleranz gegen Antigene des Myelins führen.

1.3 Das Immunsystem

Da der MS eine Immunpathogenese zu Grunde liegt, kommt dem Immunsystem bezüglich der Ätiologie eine entscheidende Rolle zu. Möglicherweise ist die MS eine Auto-Immunerkrankung. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von immunologischer Toleranz und ihrer Durchbrechung durch das Immunsystem bei der Beschäftigung mit der Ätiologie der MS von großer Bedeutung.

Es ist wichtig, dass das Immunsystem zwischen „fremd“ und „eigen“ unterscheiden kann, um den Organismus zwar gegen eindringende Pathogene effektiv durch spezifische Mechanismen schützen zu können, nicht aber Antigene des eigenen Körpers zu bekämpfen. Falls eigene Antigene Ziel einer Immunantwort werden, entsteht eine Auto-Immunerkrankung.

Das Immunsystem hat also grundsätzlich die Aufgabe, den Organismus gegen eindringende Pathogene zu schützen. Dies geschieht durch eine spezifisch gegen ein Antigen gerichtete Immunantwort, die das als „fremd“ erkannte Antigen als solches erkennt und dann in der Regel zu dessen Elimination führt.

Das Immunsystem basiert auf zwei Säulen: das zelluläre Abwehrsystem, die sog. T-Zell-Antwort, und das humorale Abwehrsystem, das durch B-Zellen vermittelt wird. Das Immunsystem besteht aus angeborenen und erworbenen Anteilen. Die angeborene Immunität steht in vorderster Front der Abwehr. Sie erkennt Strukturen auf Krankheitserregern durch „toll-like“-Rezeptoren (Janeway and Medzhitov, 2002).

Erworbene Immunantworten sind hochspezifisch. Diese Spezifität wird zumeist während einer Reifungsphase in frühen Entwicklungsstadien ausgebildet.

Die Antigenspezifität wird sowohl bei T- als auch bei B-Zellen durch spezifische Rezeptoren vermittelt, die ihre hohe Spezifität dadurch erhalten, dass sich ihre Sequenz innerhalb einer kleinen Region der Immunglobulin-Domäne voneinander unterscheiden. Es handelt sich dabei um die IgV-Domäne. Dies wird durch einen Prozess während der Reifungsphase des Immun-

systems gewährleistet, der unterschiedliche Genfragmente miteinander verbindet, sog. „rearrangement“. Dabei werden zusätzliche Nukleotide in die Gene eingefügt und auch ausgeschlossen. So können die unterschiedlichsten Aminosäuresequenzen für die Rezeptoren entstehen, die für die Vielfalt der im Immunsystem vorkommenden Rezeptoren verantwortlich sind. Es können sogar Rezeptoren entstehen, die Antigene erkennen könnten, die in der Natur bisher noch nicht bekannt sind. Außerdem folgt daraus, dass jedes Individuum ein Immunsystem mit individueller Spezifität besitzt.

Sind die Sequenzen der T-Zell-Rezeptoren einmal entwickelt, erfahren sie keine weitere Veränderung mehr. Der Organismus hat dann sein individuelles Repertoire an spezifischen T-Zell-Rezeptoren.

Die Rezeptoren von B-Zellen können dagegen weitere Reifungsschritte während des ganzen Lebens durchlaufen. Erkennt ein B-Zell-Rezeptor ein Antigen, können somatische Mutationen stattfinden, die zu einer Spezifitätsanpassung des Rezeptors für das erkannte Antigen führen. Die Affinität des Rezeptors für das Antigen wird damit erhöht.

Insgesamt besteht das Immunsystem aus 10^8 - 10^{10} spezifischen Lymphozyten, die sich alle in ihrer Rezeptor-Spezifität unterscheiden und damit verschiedene Antigene spezifisch erkennen können (Janeway and Travers, 1997).

1.4 Zentrale und periphere Toleranz

Mögliche Immunantworten schließen auch dem Körper eigene Antigene ein. Es gibt also sog. auto-reaktive T- und B-Zellen. Man spricht von Toleranz, wenn diese Auto-Aggressionen nicht stattfinden, wobei zwischen zentraler und peripherer Toleranzentwicklung zu unterscheiden ist. Einige wichtige Prinzipien der Ausbildung von Toleranz gegen Auto-Antigene und der Elimination von auto-reaktiven Immunzellen sind bekannt.

Die für den Organismus sehr gefährlichen auto-reaktiven Immunzellen werden zum großen Teil in hoch spezialisierten Organen des Immunsystems (für T-Zellen: Thymus, für B-Zellen: Knochenmark) noch während der Reifungsphase eliminiert. Dabei handelt es sich um die Entwicklung zentraler Toleranz. Der lebenswichtige Prozess einer negativen Selektion von auto-reaktiven Immunzellen ist von der Anwesenheit potentieller Auto-Antigene in diesen Organen abhängig. Noch bevor mögliche auto-reaktive Zellen des Immunsystems in die Zirkulation geraten können, werden sie in den Immunorganen eliminiert (Janeway and Travers, 1997). Wird ein Antigen im Thymus exprimiert, findet eine weitgehende Elimination der zugehörigen Immunzellen statt. Ist die Konzentration von potentiellen Auto-Antigenen in den Immunorganen aber geringer oder findet eine Expression der Antigene nur spezifisch in anderen Organen statt, wodurch sie während der Reifungsphase für Immunzellen nur gering oder gar nicht zugänglich

sind, kann eine Elimination inkomplett ausfallen oder sogar ganz fehlen. Dann sind funktionsfähige und gefährliche Auto-Immunzellen entstanden, die zu großem Schaden innerhalb des Organismus durch Immunantworten gegen Auto-Antigene führen können.

Bereits entstandene Auto-Immunzellen können aber zu einem gewissen Ausmaß auch nach der Reifungsphase noch peripher eliminiert werden. Um bei Immunzellen eine Immunantwort auszulösen, ist eine Reihe von weiteren Co-Stimulationsfaktoren notwendig, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) ausgehen. Erkennung von Antigenen ohne Co-Stimulation kann demnach zu Anergie, einem Zustand der funktionellen Nichterkennung oder auch zu Apoptose der Immunzellen führen (Sloan-Lancaster et al., 1993; Schwartz, 1996).

Auto-Immunzellen des T-Systems können in der Peripherie aus dem Repertoire von Immunantworten eliminiert werden (Miller and Basten, 1996). Die peripheren Mechanismen der Immuntoleranz sind von der Konzentration der jeweiligen Antigene in der Peripherie abhängig. Hohe Konzentration führt eher zur Deletion, niedrige eher zu Anergie von spezifischen Immunzellen (Liblau et al., 1997). Daneben spielen auch T-Suppressor-Zellen in der Limitierung von Immunantworten in der Peripherie eine Rolle. T-Suppressor-Zellen, die wie reguläre, naive T-Zellen auch aus dem Thymus stammen, unterdrücken naive T-Zellen antigenunabhängig, nachdem sie selbst Antigen-abhängig aktiviert wurden (Janeway and Travers, 1997).

Periphere Toleranzentwicklung von B-Zellen läuft ähnlich ab wie im T-Zell-System. B-Zellen benötigen für deren Aktivierung co-stimulierende Faktoren, die von Antigen-spezifischen T-Helfer-Zellen (CD4) produziert werden. Antigenerkennung durch B-Zellen ohne co-stimulierende Faktoren kann zu Deletion der spezifischen B-Zellen führen (Russell et al., 1991). Proteine können in B-Zellen auch einen Zustand der Anergie induzieren. Der Zustand der Anergie von B-Zellen ist durch mehrere Merkmale charakterisiert. Auf der Oberfläche der B-Zellen exponiertes IgM wird reduziert, und die B-Zellen können nicht mehr proliferieren und weiter differenzieren. Anergie B-Zellen werden dann aus den Primärfollikeln der Lymphknoten und der Milz ausgeschlossen und gehen in Folge fehlender Stimulation durch T-Helfer-Zellen zu Grunde (Goodnow et al., 1989; Cyster et al., 1994; Cyster and Goodnow, 1995). Damit wird klar, dass in der Peripherie auch eine Toleranz innerhalb der humoralen Immunantwort induziert werden kann.

1.5 Orale Toleranz

Lebewesen müssen Nahrung zu sich nehmen. Das ist ein nicht zu unterschätzendes Problem, das darin liegt, dass mit der Nahrung dem Organismus Unmengen von möglichen Antigenen zugeführt werden, die körperfremd sind und als solche vom Immunsystem erkannt werden.

Es ist bekannt, dass Bestandteile der Nahrung zu einer bedeutenden Modulation von Immunantworten führen können, die das Immungeschehen bei Auto-Immunerkrankungen beeinflussen können (MacDonald, 1998). Für den Organismus ist ein funktionstüchtiges Immunsystem zur Abwehr von Pathogenen unerlässlich. Trotzdem muss auch Nahrung mit unzähligen Antigenen aufgenommen werden können. Wie wird dieses Problem gelöst?

Mechanismen, die zu peripherer Toleranz des Immunsystems im Bereich des Gastrointestinaltraktes führen können, werden unter dem Konzept der oralen Toleranz zusammengefasst (Weiner, 1994; Chen et al., 1994; Chen et al., 1996; Strobel et al., 1996; Weiner, 1997; Gutgemann et al., 1998; Strobel and Mowat, 1998).

Orale Toleranz wird durch eine Vielzahl von Mechanismen gewährleistet, darunter Induktion von Apoptose, Anergie von Immunzellen und Generation von Suppressor-Zellen (Brown et al., 1994; Weiner, 1997; Strobel and Mowat, 1998). Dabei spielt die Art des jeweiligen Antigens, das zur oralen Toleranz führt, eine nicht geringere Rolle als dessen Konzentration und Expositionsfrequenz.

Antigene, sowohl diätetische als auch Antigene der symbiotischen Darmflora, die die Darmmucosa überwinden, werden im Darm-assoziierten-lymphatischen-Gewebe (GALT) prozessiert und führen zu einer nicht-entzündlichen T-Zell-Immunantwort. Dabei sind antigen-induzierte T-Suppressor-Zellen beteiligt. Die Suppression wird über die Sekretion von IL-10 und TGF- β vermittelt (Weiner, 1997; Strobel and Mowat, 1998). Somit führen Antigene aus der Nahrung normaler Weise zu einer ganz anderen Immunantwort, als sie durch infektiöse Antigene hervorgerufen wird. Infektionen mit Krankheitserregern induzieren zumeist eine T-Zell-Antwort, die zu einer Entzündungsreaktion führt, die zum Ziel hat, den pathogenen Auslöser zu eliminieren. Solche entzündlichen Reaktionen sind potentiell sehr gefährlich, da sie zu Zerstörung des umgebenden Gewebes führen und die normale physiologische Funktion stören können. Deshalb werden Immunantworten gegen Antigene aus der Nahrung im Bereich des Gastrointestinaltraktes durch das System der oralen Toleranz effektiv verhindert.

Auch im Bereich der humoralen Immunantwort kann orale Toleranz durch Mechanismen der peripheren Toleranzentwicklung induziert werden. Genetische Faktoren scheinen dabei auch eine Rolle zu spielen (Weiner, 1997; Strobel and Mowat, 1998).

Eine hohe Redundanz der unterschiedlichen Mechanismen führt zu großer Effektivität in der Ausprägung dieses lebenswichtigen Systems.

Es wird berichtet, dass orale Toleranz gegen diätetische Antigene auch experimentell induziert und damit beeinflusst werden kann (Weiner, 1997; Fattal et al., 2002).

Orale Toleranz kann aber auch unterbrochen werden. Dies geschieht insbesondere durch gastro-intestinale Infektionen. Die Durchbrechung der oralen Toleranz führt zu einer Expansion von Immunantworten gegen das aufgenommene Antigen. Am Beispiel des Cholera-toxins konnte dies nachgewiesen werden. Das Cholera-toxin hatte einen Einfluss auf die Immunantwort gegen ein bestimmtes, mit der Nahrung zugeführtes Antigen. Bei Fütterung mit dem Antigen wurde in Abhängigkeit zur Anwesenheit des Cholera-toxins eine Immunantwort beobachtet, die eigentlich durch orale Toleranz hätte unterdrückt werden müssen (Umesaki and Setoyama, 1992; Hornquist and Lycke, 1993). Bei Intoleranz oder Allergie gegen Milch-Proteine (CMPI/CMPA), wie sie bei Kindern und Erwachsenen vorkommt, besteht ebenfalls eine Immunantwort gegen Antigene aus der Nahrung (Host et al., 1995; Peltó et al., 1998; Peltó et al., 1999).

Auch das Lebensalter scheint einen Einfluss auf die Durchbrechung oraler Toleranz zu haben. Nagetiere, die nicht älter als 4-6 Tage waren, reagierten eher mit einer Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen, als orale Toleranz gegen den Nahrungsbestandteil zu entwickeln (Hall et al., 1988; Miller et al., 1994; Strobel 1996; Strobel and Mowat, 1997). Es kann also als wahrscheinlich gelten, dass Immunantworten gegen oral zugeführte Antigene insbesondere während der Stillperiode ausgebildet werden.

1.6 Myelin im ZNS – ein mögliches Ziel einer Auto-Immunreaktion

Die Immunpathologie der MS und tierexperimentelle Studien weisen darauf hin, dass – falls es sich bei der MS um eine Auto-Immunerkrankung handelt – das Ziel der Auto-Immunreaktion möglicherweise innerhalb des Myelins liegt. Die Myelinschicht, die im ZNS von Oligodendrozyten gebildet wird, umschließt die Axone von Neuronen und besteht zu 30% aus Proteinen und zu 70% aus Lipiden (Abb. 1). Innerhalb der Myelinscheide wurde nach möglichen Auto-Antigenen gesucht (de Rosbo and Ben-Nun, 1998).

Die Proteine des Myelins kommen als mögliche Auto-Antigene in Betracht (Poduslo JF, 1978). Hauptbestandteile des Proteinanteils innerhalb des Myelins sind das Myelin-basische-Protein (MBP) und das transmembrane Proteolipoprotein (PLP), die die Struktur des kompakten Myelins gewährleisten und etwa 80% des Proteingehaltes ausmachen. Hinzu kommen eine Reihe weiterer Proteine, deren Funktionen größtenteils nicht bekannt sind, darunter das Myelin-assoziierte-Glykoprotein (MAG), das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Oli-

godendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMG), das Myelin-assoziierte-Oligodendrozyten-basische-Protein (MOBP) und das Myelin-Oligodendrozyten-spezifische-Protein (MOSP) (de Rosbo et al., 1993; Holz et al., 2000; Kaye et al., 2000).

Viele dieser Proteine wurden in Tierexperimenten auf ihr Potential getestet, Auslöser für Auto-Immunphänomene zu sein. Grundsätzlich konnte durch alle dieser bekannten Myelin-Proteine Auto-Immunreaktionen in Versuchstieren ausgelöst werden (Martin et al., 1992).

Tatsächlich konnte auch in einer Mehrzahl von MS-Patienten Auto-Reaktivität gegen Myelin-Proteine beobachtet werden (Hohlfeld et al., 1995; Reindl et al., 1999; Jacobsen et al., 2002). Dies führte zu der Annahme, dass diese Proteine in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen. Dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) kommt eine herausragende Rolle zu, da es bisher das einzige potentielle Auto-Antigen ist, das von demyelinisierenden Antikörpern als Zielstruktur erkannt wird (Genain et al., 1999; Raine et al., 1999; Haase et al., 2001; Budingen et al., 2001).

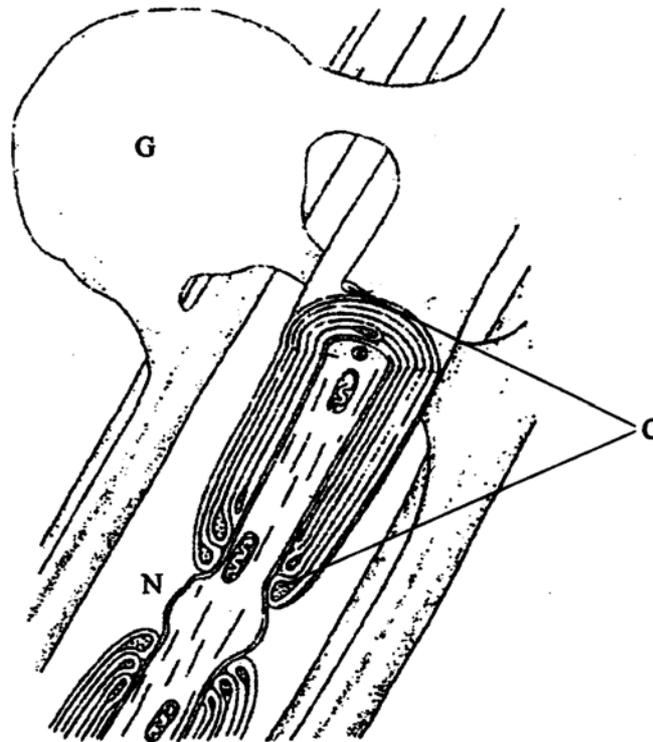


Abbildung 1

Schematische Darstellung von ZNS-Myelin (aus Baumann and Pham-Dinh, 2001)
G Oligodendrozyt N Ranvierscher Schnürring C Paranodale Schleife

ZNS-Myelin wird durch Oligodendrozytenfortsätze gebildet, die das Axon mit multiplen Lamellen ihrer Plasmamembran umschneiden. Das Zytoplasma der Oligodendrozyten ist zurückgedrängt, um mulilamelläres Myelin (10-100 Schichten) ausbilden zu können. Die Myelinumscheidung der Axone führt zu vielfacher Beschleunigung der Erregungsförderung über die Nervenzellmembran durch saltatorische Weiterleitung. An den paranodalen Schleifen bleibt Zytoplasma vorhanden, um einen Kanal aus Zytoplasma zu bilden, der die Myelinscheide mit dem Zellkörper des Oligodendrozyten verbindet. Im Gegensatz zu den Schwann' Zellen im peripheren Nervensystem umschneidet ein Oligodendrozyt eine Vielzahl von Axonen.

1.7 Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) – ein mögliches, wichtiges Auto-Antigen

Eines der wichtigsten, in Erwägung gezogenen Auto-Antigene stellt das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) dar (Roth et al., 1995; Bernard et al., 1997); dies gilt sowohl für MOG-spezifische T-Zell-Antworten (de Rosbo et al., 1993; de Rosbo et al., 1997; Wallström et al., 1998; Lindert et al., 1999) als auch für Antikörper-Antworten in MS-Patienten (Karni et al., 1999; Reindl et al., 1999; Lindert et al., 1999; Haase et al., 2001). Es wird fast ausschließlich im ZNS exprimiert (Linington et al., 1984; Gardinier et al., 1992, Iglesias et al., 2001).

In Tierexperimenten, die auf dem Tiermodell der EAE basieren, konnte gezeigt werden, dass Immunisierung von Ratten mit MOG eine auto-aggressive Immunantwort mit demyelinisierenden Läsionen im ZNS induzieren kann, wie sie auch bei MS vorkommen (Linington et al., 1993; Johns et al., 1995; Adelman et al., 1995; Storch et al., 1998; Stefferl et al., 1999; Bourquin et al., 2000). Demyelinisierung war von MOG-spezifischen Auto-Antikörpern abhängig (Linington and Lassmann, 1987). Das demyelinisierende Potential dieser spezifischen Antikörper konnte auch durch die intravenöse Injektion von monoklonalen MOG-spezifischen Antikörpern in Ratten mit EAE gezeigt werden (Linington et al., 1988; Schluesener et al., 1987, Brehm et al., 1999). Bei Abwesenheit von MOG-spezifischen Antikörpern war im ZNS nur Entzündung, nicht aber Demyelinisierung zu beobachten. Wurden MOG-spezifische Antikörper intravenös gegeben, konnte eine verstärkte Entzündungsreaktion im ZNS mit einer gesteigerten Demyelinisierung nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise dafür, dass MOG-spezifische Antikörper auch funktionelle Bedeutung bei Phagozytosevorgängen, bei zell-vermittelter Zytotoxizität, im Rahmen von lokaler Immunregulation und im Zusammenhang der Organisation der oligodendroglialen Membranen haben könnten (Ulvestad et al., 1994; Dyer and Matthieu, 1994).

Die B-Zell-Antwort wurde in Ratten vom MHC-Komplex bestimmt (Stefferl et al., 1999). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass MOG-spezifische Antikörper in einer möglichen Auto-Immunpathogenese der MS eine bedeutende Rolle spielen könnten.

MOG besteht aus 218 Aminosäuren und besitzt eine N-terminale, extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domäne (IgV-ähnliche Domäne, Igd), eine hydrophobe transmembrane Domäne sowie eine zytoplasmatische Domäne (Abb. 2; Kroepfl et al., 1996; Johns and Bernard, 1999; Della Gaspera et al., 1998; Hjelmström et al., 1998). MOG hat einen Anteil am Myelinprotein von unter 0,05%.

Das MOG-Gen liegt in der distalen Region des MHC-Komplexes und ist somit eng mit den Loci für die MHC-Klasse-I und -II-Moleküle verbunden (Pham-Dinh et al., 1993; Pham-Dinh et al., 1995; Lambracht et al., 1995). Die MHC-Klasse-I und -II-Moleküle sind bemerkenswerter Weise auch mit MS assoziiert (Brandt et al., 1998). Da MOG eine extrazelluläre Domäne

hat, die auf der Außenseite der Oligodendrozyten exponiert ist, wurde angenommen, dass diese Domäne als Rezeptor für Auto-Immunantworten agieren könnte.

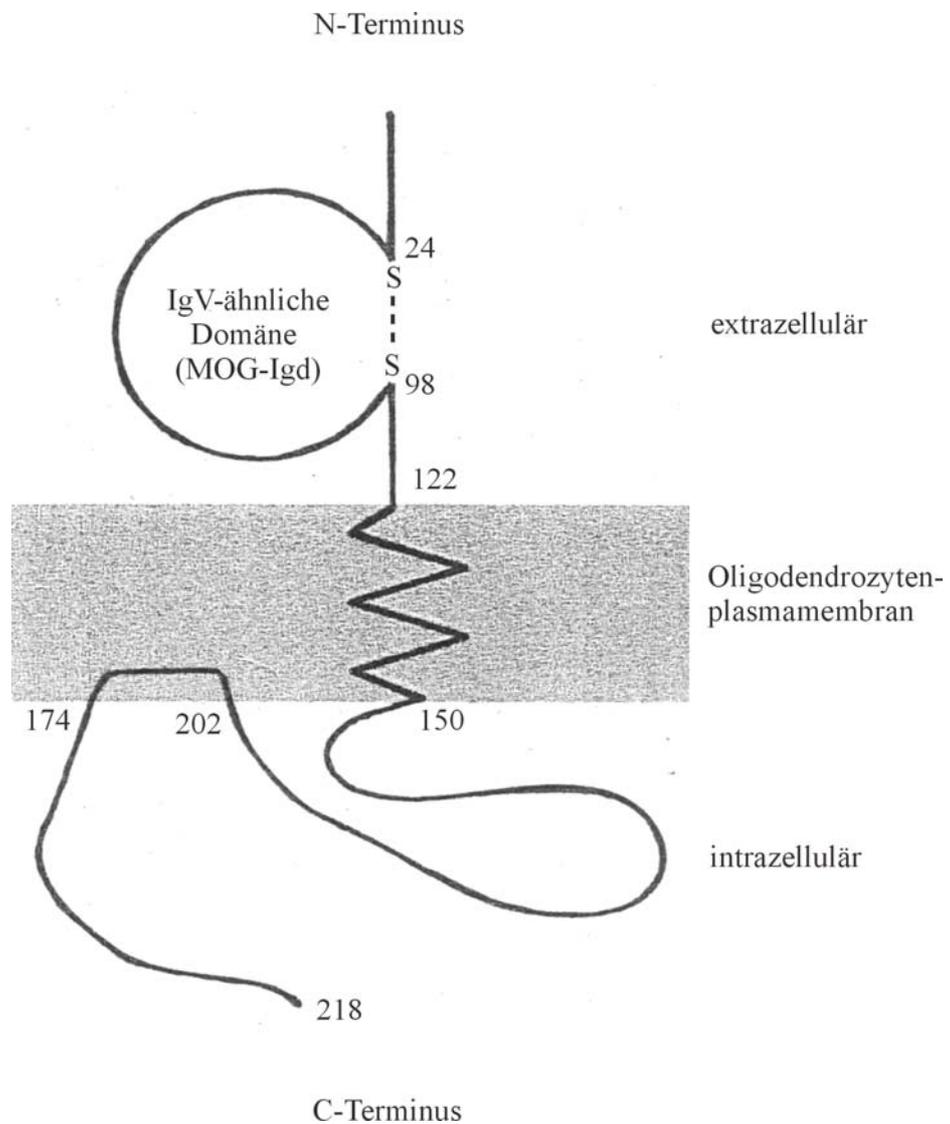


Abbildung 1

Schematische Darstellung von MOG, das in der Oligodendrozytenplasmamembran verankert ist.

Die N-terminale IgV-ähnliche Domäne (Igd) liegt auf der extrazellulären Seite, der C-Terminus liegt intrazellulär (nach Kröpfel et al., 1996). Die Zahlen repräsentieren Aminosäuren an den Membrangrenzen.

Das ZNS ist vom Immunsystem durch die Blut-Hirn-Schranke getrennt. Das Immunrepertoire kommt also im gesunden Zustand nicht mit Antigenen der Myelinscheide in Berührung. Zusätzlich gibt es im ZNS kein klassisches Lymphdrainagesystem. Dies vermindert weiter die Wahrscheinlichkeit, dass das Immunsystem mit Proteinen des ZNS in Kontakt kommt. Primär wird also keine Toleranz, wie oben beschrieben, gegen diese potentiellen Auto-Antigene entwickelt.

Auto-reaktive T- und B-Zellen gegen MOG oder andere Bestandteile des ZNS bleiben ein Teil des Immunrepertoires, da sie während der Reifungsphase des Immunsystems nicht eliminiert werden. Immunzellen können die Blut-Hirn-Schranke nicht ohne weiteres überwinden. Somit bleibt eine Immunantwort gegen diese Antigene in gesundem Zustand aus. Dies wird als „klonale Ignoranz“ bezeichnet (Miller et al., 1996).

Bei unterschiedlichen Formen der Verletzung des ZNS kann die Blut-Hirnschranke undicht werden, und das ZNS ist für das Immunsystem zugänglich. Daraufhin kann es zu Immunreaktionen gegen Antigene des ZNS kommen. Insbesondere durch Entzündungsvorgänge ist eine Einschränkung der Funktion der Blut-Hirnschranke möglich.

Bei MS ist das ZNS dem Immunsystem durch Entzündungsreaktionen zugänglich (Gay and Esiri, 1991). Auto-Immunreaktionen gegen Bestandteile des ZNS-Myelins wären möglich.

Tatsächlich sind in MS-Patienten verstärkte spezifische T-Zell-Antworten und spezifische Antikörper gegen MOG nachzuweisen (Sun et al., 1991; Hohlfeld et al., 1995; Lindert et al., 1999; Karni et al., 1999; Genain et al., 1999; Archelos et al., 2000; Göbels et al., 2000). Auto-Antikörper gegen MOG scheinen von Bedeutung bei der Vermittlung von Demyelinisierungsvorgängen zu sein (Raine et al., 1999; Wekerle, 1999).

Durch welche Mechanismen könnte eine Modulation der Immunantwort gegen MOG bewirkt werden?

1.8 Molekulares Mimikry – Homologie zwischen MOG und BTN

Eine Möglichkeit, Immunantworten effektiv zu beeinflussen, besteht durch molekulares Mimikry (molecular mimicry) (Hemmer und Martin, 1998).

Molekulares Mimikry bedeutet, dass aufgrund der Ähnlichkeit bzw. Identität antigener Determinanten von Infektionserregern und Zellen des Wirtsorganismus dieser mit der Bildung von Auto-Antikörpern bzw. auto-aggressiven T-Lymphozyten reagiert (Pschyrembel, 1997; Benoist and Mathis, 2001). Homologie (Aminosäuresequenzidentität) zwischen zwei Antigenen führt dabei zu einer Kreuzreaktivität von Immunantworten und damit zu deren Modulation (Fujinami and Oldstone, 1985; Janeway and Travers, 1997). Eine protektive Immunantwort, die durch ein

Pathogen hervorgerufen wurde, führt demnach durch molekulares Mimikry zur Erkennung von homologen Epitopen spezifischer Auto-Antigene in verschiedenen Geweben des Organismus. Daraus resultiert Auto-Aggression. Auto-Immunerkrankungen können also von Umweltfaktoren durch molekulares Mimikry ausgelöst bzw. getriggert werden. Dabei wird eine Durchbrechung von Selbsttoleranz induziert (Janeway and Travers, 1997; Adams, 1996; Levin et al., 2002).

Eine Grundlage für molekulares Mimikry ist die Degeneration von T-Zell-Rezeptoren (Gran et al., 1999). Eine Vielzahl von MHC-Peptid-Komplexen kann also durch einen einzigen T-Zell-Rezeptor trotz dessen Spezifität erkannt werden (Mason, 1998; Gran et al., 1999).

Es könnte zu MOG homologe Proteine geben, die eine Immunantwort gegen MOG beeinflussen. Datenbankrecherche identifizierte u.a. virale Antigene als kreuzreaktiv zu MBP (Gautam et al., 1998) und MOG. In der Maus wurde Kreuzreaktivität von MOG zu dem Semliki-Virus nachgewiesen (Mokhtarian F, 1999). Es besteht auch Homologie zwischen MOG und dem Rubella-Virus (Besson et al., 2001).

Als das interessanteste Protein wurde das Milch-Protein Butyrophilin (BTN) identifiziert, weil es die höchste Homologie zu MOG aufweist (Aminosäuresequenzidentität 50%).

Butyrophilin (BTN) ist ein Hauptbestandteil der Milch-Fett-Globulin-Membran (MFGM) und damit wichtiger Teil der Ernährung (Ogg et al., 1996).

BTN besteht aus 501 Aminosäuren. Das Protein enthält zwei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, eine IgV-ähnliche Domäne (IgI) und eine IgC-ähnliche Domäne, sowie eine transmembranäre und eine intrazelluläre Domäne (Abb. 3; Jack and Mather, 1990).

Wie auch MOG gehört BTN der Ig-Superfamilie der B7-Proteine an (Vernet et al., 1993; Linsley et al., 1994; Gruen et al., 1996; Henry et al., 1997; Henry et al., 1999; Sharp and Freeman, 2002). Die Butyrophilin-Gen-Familie, die aus fünf Sub-Familien besteht, enthält je bis zu drei Anteile (Stammers et al., 1999). Proteine dieser Gen-Familie sind in unterschiedlichen Geweben vertreten und weisen eine Vielzahl von molekularen Gemeinsamkeiten auf. Zum Teil liegen ihre Genloci wie auch der Genlocus für MOG im Bereich des MHC-Komplexes (Henry J et al., 1997; Tazi-Ahnini R, 1997; Rhodes et al., 2001).

Alle Proteine dieser Gruppe haben eine hohe Homologie (Aminosäuresequenzidentität) zu einander in ihren IgV-ähnlichen extrazellulären Domänen, die sich am N-terminalen Ende der Proteine befinden. Zwischen MOG und BTN beträgt die Identität der Aminosäuresequenzen dieser Domänen etwa 50% (Gardinier et al., 1992). Die Abbildung 3 zeigt die homologen Anteile identischer Aminosäuresequenzen zwischen MOG und BTN in Form von schematisch dargestellten Gesamtmolekülen. Bovines BTN (bBTN) und humanes BTN (hBTN) unterschei-

den sich nur geringfügig. In Abbildung 4 werden die Aminosäuresequenzen von humanem MOG (hMOG), bovinem BTN (bBTN) und humanem BTN (hBTN) verglichen.

Falls durch Homologie molekulares Mimikry zwischen BTN und MOG bewirkt wird, könnte durch BTN eine Modulation der Immunantwort gegen MOG generiert werden.

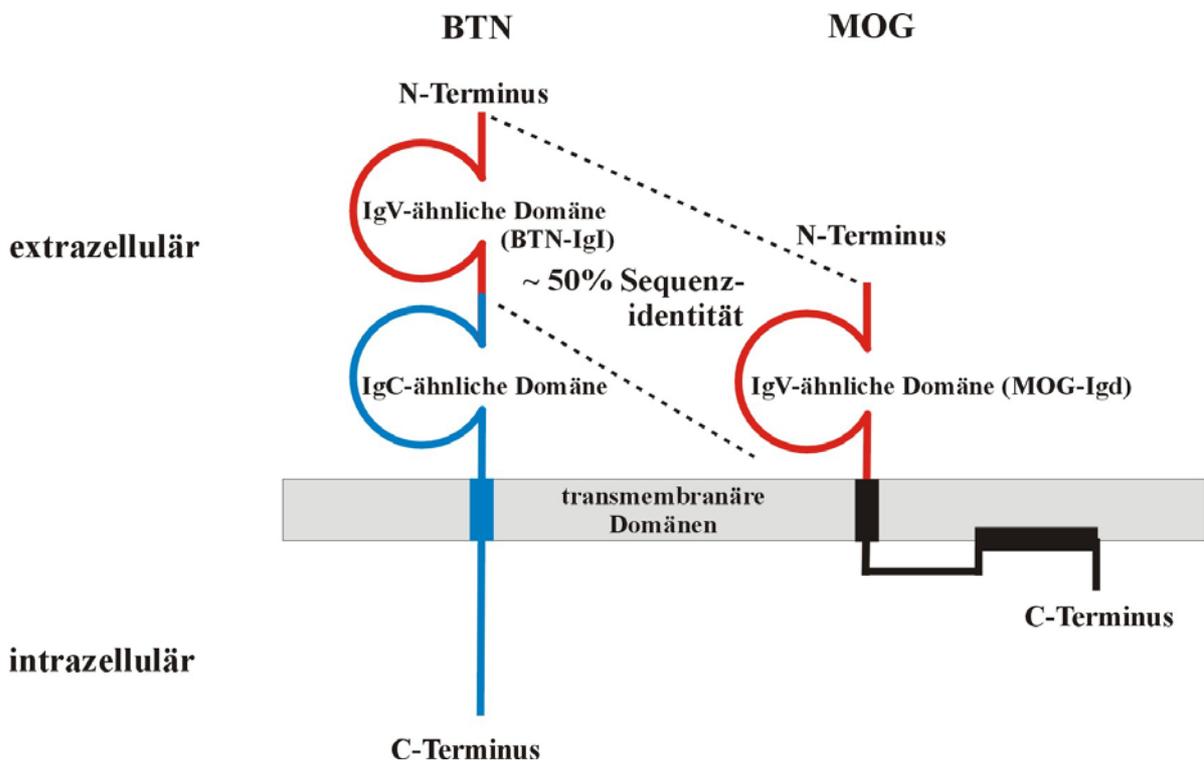


Abbildung 2

Struktureller Vergleich zwischen BTN und MOG

BTN enthält sowohl zwei N-terminale, extrazelluläre Ig-Domänen (IgV-ähnliche Domäne, IgI, und IgC-ähnliche Domäne) als auch eine transmembranäre und intrazelluläre Domäne (Jack and Mather, 1990).

MOG besteht aus einer einzelnen, N-terminalen, extrazellulären Ig-Domäne (IgV-ähnliche Domäne, IgD), einer hydrophoben transmembranären Domäne und einem zytoplasmatischen Schwanz, der eine zweite hydrophobe Region enthält (Kröpfel et al., 1996; Della Gaspera et al., 1998).

Nur die IgV-ähnliche Domäne von BTN (BTN^{IgI}) weist eine signifikante Homologie (Aminosäuresequenzidentität 50%) zu der IgV-ähnlichen Domäne von MOG (MOG^{Igd}) auf.

	AS	
hMOG 1-25	GQFRVIGPRHP IRALVGDEVELPCR	
bBTN 1-25	APFDVIGPQE PILAVVGEDAELPCR	
hBTN 1-25	-----P-----	
hMOG 26-50	I SPGKNATGME VGWYRPPFSRVVHL	
bBTN 26-50	L SPNVSAKGMELRWFREKVS PAV FV	
hBTN 26-50	----A--EHL-----K-----L-	
hMOG 51-75	Y RNGKDQDG DQAPEYRGR TELLKDA	
bBTN 51-75	S REGQEQEGE EMAEYRGR VSLVEDH	
hBTN 51-75	H-D-R---A-Q-P-----AT--Q-G	
hMOG 76-100	I GEGKVTLR IRNVRF SDEGGFT CFF	
bBTN 76-100	I AEGSVAVRI QEVKAS DDGEYR CFF	
hBTN 76-100	--K-R--L--RG-RV-----T---	
hMOG 101-125	R DHSYQEEA AMELKV EDPFY WVSPG	
bBTN 101-125	R QDENYEEA IVHLKV AALGSD PHIS	
hBTN 101-125	-E-GS-----L-----	

Abbildung 4

Vergleich der Aminosäuresequenzen der homologen N-terminalen IgV-ähnlichen-Domänen von humanem MOG (hMOG), bovinem BTN (bBTN) und humanem BTN (hBTN)

AS sind im Ein-Buchstaben-Kode angegeben. Identische AS von hMOG und bBTN sind fett gedruckt. In der Sequenz des hBTN sind identische AS zu bBTN als Striche, unterschiedliche AS zu bBTN als Buchstaben dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich bBTN und hBTN nur geringfügig von einander unterscheiden.

1.9 Butyrophilin (BTN) – ein Modulator der Immunantwort gegen MOG durch molekulares Mimikry?

Welche Mechanismen bestehen für eine potentielle Modulation der Immunantwort gegen MOG durch BTN infolge molekularer Mimikry?

Mikrobiologische Antigene sind als wichtige, mögliche Trigger von Auto-Aggression durch molekulares Mimikry anzusehen (Benoist and Mathis, 2001). Das Guillain-Barré-Syndrom gilt als Auto-Immunerkrankung, die durch virale oder bakterielle Antigene getriggert wird (Hahn, 1998). Potentiell kommen aber alle möglichen Antigene dafür in Frage, insoweit sie eine kreuzreaktive Immunantwort induzieren können. Dies schließt Antigene der Ernährung und somit das Milch-Protein BTN zur Auslösung von Auto-Immunerkrankungen ein.

Ein Beispiel für die mögliche Triggerung einer Auto-Immunerkrankung durch ein diätetische Antigene ist Diabetes mellitus Typ-I. Es konnte gezeigt werden, dass bovine Albumin-Peptide aus der Nahrung eine kreuzreaktive Immunantwort von Antikörpern zu einem Oberflächenprotein der β -Inselzellen des Pankreas induzierten (Karjalainen et al., 1992; Berdanier et al., 1995). Die Ausweitung des Konzeptes des molekularen Mimikry auf verbreitete Antigene aus der Ernährung führt zu einer Reihe von neuen Perspektiven, die im Kontext von akuten Infektionen irrelevant sind (4.3).

In den letzten Jahren wurde besser verstanden, dass Verstärkung von Immunantworten aber nicht die einzige Form der Modulation des Immunsystems durch molekulares Mimikry ist. Auch die Ausbildung von immunologischer Ignoranz und damit Toleranz gegen bestimmte Antigene ist durch molekulares Mimikry möglich. Wie kann molekulares Mimikry zu immunologischer Ignoranz führen? Wie könnte also Toleranz gegen MOG durch molekulares Mimikry zu BTN entstehen?

Da MOG zu Proteinen homolog ist, die auch in Organen des Immunsystems vorkommen, scheint eine Toleranz gegen MOG zum Teil dadurch wahrscheinlich, dass diejenigen T-Lymphozyten eliminiert werden, die während der Entwicklung des Immunrepertoires eigene MOG-homologe Proteine erkennen. Eine Immunantwort gegen MOG wäre dadurch verringert.

Für diese Hypothese spricht, dass MOG-Gen-defiziente Mäuse eine identische immunologische Antwort gegenüber MOG haben wie Wild-Typen mit dem MOG-Gen (Pham-Dinh et al., submitted). Eigentlich wäre in den MOG-Gen-defizienten Mäusen eine andere Immunantwort gegen MOG zu erwarten, da ihnen dieses Antigen eigentlich „fremd“ sein müsste.

Als weiterer Modulationsmechanismus einer Immunantwort gegen MOG kommt die Entwicklung von oraler Toleranz gegen BTN und damit die Ausbildung einer kreuzreaktiven immuno-

logischen Toleranz gegen MOG in Betracht. Da BTN in der Regel reichlich mit der Nahrung aufgenommen wird, könnte sich orale Toleranz gegen BTN kreuzreaktiv in einer ausbleibenden Immunantwort gegen MOG auswirken.

Ausgebildete orale Toleranz gegen diätetische Antigene kann aber auch durchbrochen werden, insbesondere durch gastro-intestinale Infektionen. Für das Choleratoxin wurde dieser Vorgang bereits unter 1.5 erläutert (Umesaki and Setoyama, 1992; Hornquist and Lycke, 1993). Ähnliche Ergebnisse bestehen auch für das hitze-labile Enterotoxin aus E.-Coli-Bakterien (Gaboriau-Routhiau and Moreau, 1996). Es kann es zu einer potentiell pathogenen Th1-T-Zell-Antwort gegen das aufgenommene Antigen kommen (Gaboriau-Routhiau and Moreau, 1996; Barbeau, 1997). Im Falle von BTN könnte dies zu einer transienten Expansion von kreuzreaktiven und enzephalitogenen Auto-Immunantworten gegen MOG führen. Orale Toleranz ist zudem während der Säugephase von Neonaten schlecht entwickelt (Miller et al., 1994; Strobel, 1996; Strobel and Mowat, 1998), so dass frühe Exposition gegen BTN bei entsprechendem genetischen Hintergrund auch zu einer kreuzreaktiven Immunantwort gegen MOG führen könnte.

BTN ist also in seinem Einfluss auf eine Immunantwort gegen MOG infolge möglicher molekularer Mimikry dichotom zu sehen.

Einerseits könnten durch BTN pathogene Auto-Immunreaktionen gegen MOG induziert werden, andererseits könnte BTN aber als oral zugeführtes Protein möglicher Weise auch zu einer Abschwächung von Auto-Immunantworten gegen MOG führen. Eine Durchbrechung der oralen Toleranz gegen BTN könnte wiederum eine Verstärkung der Immunantwort gegen BTN und MOG hervorrufen.

BTN ist folglich als ein Kandidat anzusehen, der für eine Modulation der Auto-Immunantwort gegen MOG verantwortlich sein könnte. Voraussetzung dafür ist aber molekulares Mimikry zwischen MOG und BTN.

Welche Hinweise gibt es für einen Einfluss von BTN auf Auto-Immunantworten gegen MOG?

Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass tatsächlich ein Einfluss von BTN auf die Immunantwort gegen MOG besteht (Steffler et al., 2000).

Nach Immunisierung von Ratten mit bovinem BTN oder aufgereinigtem Milch-Fett-Globulin-Membranen (MFGM) konnte eine subklinische Entzündungsreaktion im ZNS im Rahmen einer EAE festgestellt werden (Steffler et al., 2000). Die Tiere hatten damit eine Pathologie und einen Krankheitsverlauf, die der MS und somit einer potentiellen Auto-Immunreaktion gegen MOG sehr ähnlich sind.

Auch eine Modulation der Immunantwort gegen MOG durch BTN konnte in der gleichen Arbeit nachgewiesen werden. Die spezifische Antwort gegen MOG wurde durch Aktivimmunisie-

rung mit BTN in Adjuvans verstärkt. Transmukosale Applikation von BTN (intranasal) führte dagegen zu einer Unterdrückung der Immunantwort gegen MOG.

Bei diesen Versuchen konnte eine kreuzreaktive T-Zell-Antwort zwischen MOG und BTN auf tierexperimenteller Ebene nachgewiesen werden. Die BTN-Peptide 6 und 7 (vgl. Tab. 1) stellten sich als dominant in der kreuzreaktiven Immunantwort heraus. Bemerkenswerter Weise waren BTN-Peptide weniger pathogen als die dazu homologen Peptide des MOG-Proteins. Es ist unklar, was der Grund für diese Beobachtung ist. Es könnte zum Beispiel durch oben beschriebene Mechanismen orale Toleranz gegen BTN durch Aufnahme von BTN mit der Nahrung entwickelt werden. Die beiden unterschiedlichen Proteine aktivieren aber vielleicht auch verschiedene Immunzellpopulationen, die sich in ihrer Pathogenität und dem Muster von induzierten Co-Faktoren unterscheiden.

Die Ergebnisse im Tierversuch identifizierten einen Mechanismus, durch den eine pathogene Immunantwort gegen MOG durch die Aufnahme von Milchprodukten mit der Nahrung moduliert werden könnte.

Es stellt sich die Frage, ob auch auf menschlicher Ebene durch Exposition mit BTN die Zusammensetzung oder Funktion des MOG-reaktiven-Repertoires in MS-Patienten beeinflusst wird. Molekulare Mimikry zwischen MOG und BTN könnte auch auf menschlicher Ebene dafür verantwortlich sein. Es bleibt offen, ob es sich bei einer Modulation der Immunantwort gegen MOG durch BTN um eine Unterdrückung der Immunantwort und damit eine protektive-Wirkung handeln würde, oder ob durch eine Verstärkung der Auto-Immunreaktion gegen MOG ein negativer Einfluss durch BTN bestünde.

1.10 Epidemiologische Assoziation zwischen MS und Milch-Verzehr

Eine Vielzahl von epidemiologischen Daten lässt eine wichtige, vielleicht sogar prädominante Rolle von Umweltfaktoren vermuten, die in die Ätiologie der MS involviert sein könnten (Cendrowski et al., 1969; Butcher, 1976; Lauer, 1993; Lauer 1994; Cristen et al., 2000). Es wurden die verschiedensten Einflussfaktoren in Betracht gezogen. Fragen der Ernährung spielten eine große Rolle. Es fiel eine besondere Assoziation zwischen Milch und Milchprodukten mit MS auf. Schon seit längerem wird dieser mögliche Zusammenhang diskutiert (Agranoff and Goldberg, 1974; Butcher, 1976) und in entsprechenden epidemiologischen Studien wurden die Hinweise dafür bestätigt, dass ein Zusammenhang zwischen Milch und Milchprodukten mit MS besteht (Butcher, 1986; Malosse et al., 1992; Sepcic, 1993; Lauer, 1993; Lauer 1994; Lauer, 1997). Die Ursache dafür ist bisher nicht bekannt.

Der potentiellen Modulation einer Auto-Immunreaktion gegen MOG durch das homologe Milch-Protein BTN im Zusammenhang der MS (1.9) kommt vor diesem Hintergrund eine besondere Bedeutung zu. Es könnte sich dabei um eine mögliche Ursache für die Assoziation der MS mit Faktoren der Ernährung handeln, insbesondere mit Milch und Milchprodukten.

1.11 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

In den vorangegangenen Kapiteln wurden eine mögliche Auto-Immunpathogenese der Multiplen Sklerose (MS) und deren potentielle Modulationsmechanismen erläutert. Insbesondere auf die mögliche Modulation der Immunantwort gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) durch das homologe Milch-Protein Butyrophilin (BTN) wurde eingegangen.

Die Untersuchung der Immunantwort gegen MOG und die Aufklärung des immunologischen Zusammenhanges mit BTN ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Epitopspezifität der Antikörper-Antwort gegen MOG untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit ist die Frage zu klären, ob auf menschlicher Ebene molekulares Mimikry und immunologische Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN mit der möglichen Konsequenz einer Modulation der MOG-spezifischen Immunantwort durch BTN besteht. Im Tierexperiment konnte dieser Zusammenhang bereits nachgewiesen werden.

Aus der Beantwortung dieser Fragen sind weiter führende Erkenntnisse bezüglich der potentiellen Auto-Immunpathogenese der MS und deren Modulation durch das Umweltantigen BTN zu erwarten.

2. Material und Methoden

2.1 Medien

2.1.1 Hitzeschocktransformation von Bakterienzellen

LB-Medium	10g/l Pepton aus Casein 5g/l Hefeextrakt 5g/l NaCl Autoklavieren (120°C, 1atü) 100 mg/l Ampicillin 25 mg/l Kanamycin
DNA-Minipräp-Kit	Pharmacia, Freiburg

2.1.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

PBS-Puffer	150mM NaCl 2,7mM KCl 10,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Harnstoffpuffer	6M Harnstoff 0,1M KH ₂ PO ₄ 0,5M NaCl
Waschpuffer	Harnstoffpuffer 40mM Imidazol pH 6,0

Elutionspuffer	Harnstoffpuffer 0,5M Imidazol pH 3,0
Acetatpuffer	5mM Natriumacetat pH 3,0

2.1.3 Gel-Elektrophoretische Methoden

Lösung A	30% Acrylamid
Puffer B	1,5M Tris pH 8,8
Lösung C	10% Natriumdodecylsulfat (SDS) (nicht im Kühlschrank aufbewahren)
Puffer D	0,5M Tris pH 6,8
10% APS	100mg/ml Ammoniumperoxodisulfat (immer frisch ansetzen)
Laufpuffer	3g/l Tris 14,4g/l Glycin 1g/l SDS
Auftragspuffer	400mM Tris/HCl pH 7,5 0,45g/ml Glycerin 1mg/ml Bromphenolblau 0,15mg/ml SDS 1,5M β -Mercaptoethanol

Coomassi-Blau	
- Färbelösung	500ml/l Methanol 2g/l Coomassi Brilliant Blue R250 75,3 ml/l Eisessig
- Entfärbelösung	10% Essigsäure 40% Methanol
Ethidiumbromid-Lösung	5mg/ml Ethidiumbromid (vor Licht schützen)
TBE-Laufpuffer	90mM Tris/HCl pH 6,8 90mM Borsäure 2mM EDTA
DNA-Auftragspuffer	50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau

2.1.4 Isolation MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper

Koppelungspuffer	0,1M NaHCO ₃ 0,5M NaCl pH 8,3
Acetatpuffer	0,1M Natriumacetat 0,5M NaCl pH 4,0
Tris-Puffer (TBS)	0,05M Tris 0,15M NaCl

2.1.5 Analyse von Seren und Liquor auf spezifische Antikörper - Western-Blot

SDS-Laufpuffer	0,025M Tris 0,192M Glycin 0,1% SDS
Transfer-Puffer	12mM Tris 96mM Glycin 20% Methanol pH 8,3
Laufpuffer	3 g/l Tris 14,4g/l Glycin 1g/l SDS
Auftragspuffer	400mM Tris/HCl pH 7,5 0,45g/ml Glycerin 1mg/ml Bromphenolblau 0,15mg/ml SDS 1,5M β -Mercaptoethanol
TBS-T	0,05M Tris 0,15M NaCl 0,1% Tween-20
Substratpuffer	1M Tris 0,5M MgCl ₂ 5M NaCl pH 9,5 (HCl) auf 10ml Substratpuffer - 50ml NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) - 37,5ml X-Phosphat (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat)

2.1.6 Analyse von Seren und Liquor auf spezifische Antikörper - ELISA

Adsorbtionspuffer	PBS 0,02% NaN ₃
Waschpuffer	PBS 0,05% Tween-20 0,02% NaN ₃
Blockierungspuffer	PBS 1% BSA 0,1% NaN ₃
Substratpuffer (für Peroxidase, bei OD _{490nm} messen)	1M Diethanolamin 0,02% NaN ₃ 4mM MgCl ₂ x 6H ₂ O pH 9,8 (HCl) (bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren) frisch zugeben: 5mg p-Nitrophenyl-Phosphat/5ml Substratpuffer stoppen mit 3M HCl
Substratpuffer (für alkal.-Phosphatase, bei OD _{405nm} messen)	1M Tris 0,5M MgCl ₂ 5M NaCl pH 9,5 (HCl) OPD-Tablette in Substratpuffer vollständig auflösen (Konzentration entsprechend Herstellerangabe)

2.1.7 Peptide

Die in Tabelle 1 aufgeführten Peptide der N-terminalen IgV-ähnlichen Domänen von humanem MOG (MOG^{Igd}) und von bovinem BTN (BTN^{Igl}) wurden mit einem Reinheitsgrad von mehr als 98 % von Genosys (Cambridge, U.K.) hergestellt und in dieser Studie verwendet.

Aminosäuren (im Ein-Buchstaben-Kode angegeben)		
P1	MOG 1-26	GQFRVIGPRHP I RALVGDEVELPCR I
	BTN 1-26	APFDVIGPQEP I L AVVGEDAE L PCR L
P2	MOG 14-39	ALVGDEVELPCR I SPGKNATGMELGW
	BTN 14-39	<u>AVVGEDAE L PCR L</u> <u>SPNVSAKGMELRW</u>
P3	MOG 27-50	SPGKNATGMELGWYRPPFSRVVHL
	BTN 27-50	<u>SPNVSAKGMELRW</u> <u>RFREKVS</u> <u>PAVFV</u>
P4	MOG 38-60	GWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGD
	BTN 38-60	<u>RWFREKVS</u> <u>PAVFV</u> <u>SREGQEQE</u> <u>GE</u>
P5	MOG 50-74	L YRNGKDQDGD APEYRGRTELLKD
	BTN 50-74	<u>VSREGQEQE</u> <u>GEMAEYRGRV</u> <u>SLVED</u>
P6	MOG 63-87	PEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRN
	BTN 63-87	<u>AEYRGRV</u> <u>SLVED</u> <u>HIAEGSVAVRIQE</u>
P7	MOG 76-100	I GEGKVTLRIRNVRFSD EGGFT CFF
	BTN 76-100	<u>IAEGSVAVRIQE</u> <u>VKASDDGEYRCFF</u>
P8	MOG 89-113	RFSDEGGFT CFFRDHSYQEEAAMEL
	BTN 89-113	<u>KASDDGEYRCFF</u> <u>RQDENYEEAIVHL</u>
P9	MOG 101-125	RDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPG
	BTN 101-120	<u>RQDENYEEAIVHL</u> <u>KVAALGS</u>

Tabelle 1

Aminosäuresequenzen der synthetisch hergestellten, sich überlappenden Peptide der N-terminalen Domänen von humanem MOG (MOG^{Igd}, Accession-Number I56513) und von bovinem BTN (BTN^{Igl}, Accession-Number M35551), die in dieser Studie verwendet wurden (Genosys, Cambridge, U.K.). Gleiche Aminosäuren zwischen den beiden Proteinen sind unterstrichen.

2.1.8 Antikörper

- Maus.anti-MOG (8.18.C.5) 1 in 500 (von Prof. Dr. Linington überlassen)
- Kan.anti-BTN 1 in 500 (von Prof. Dr. Linington überlassen)
- Kan.anti-BT3.3 1 in 50 (von Dr. Malotkin überlassen)
- Kan.anti-S.100β 1 in 50 (Immunotech Marseilles, F)
- Alkal.-Phosphatase-konjugierter Ziege.anti-humanIgM, Fc5μ-Fragment spezifisch (minimal kreuzreaktiv zu Rinder-Serumproteinen)
1 in 5000 (Jackson Immuno Research, West-Grove Pen., U.S.A.)
- Alkal.-Phosphatase-konjugierter Ziege.anti-humanIgG (H&L), Fcγ-Fragment spezifisch (minimal kreuzreaktiv zu Rinder-, Pferde-, Maus-Serumproteinen)
1 in 5000 (Jackson Immuno Research, West-Grove Pen., U.S.A.;
Dianova, Hamburg)
- Alkal.-Phosphatase-konjugierter Ziege.anti-MausIgG1
1 in 1000 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham,
U.S.A.)
- Alkal.-Phosphatase-konjugierter Ziege.anti-KaninchenIgG (H&L)
1 in 5000 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham,
U.S.A.)
- Peroxidase-konjugierter Ziege.anti-humanIgG (H&L), Fcγ-Fragment spezifisch (minimal kreuzreaktiv zu Rinder-, Pferde-, Maus-Serumproteinen)
1 in 5000 (Jackson Immuno Research, West-Grove Pen., U.S.A.;
Dianova, Hamburg)

2.1.9 Menschliche Proben

Alle menschlichen Proben wurden mit der ausdrücklichen Zustimmung aller Spender verwendet (Karolinska Institute Ethical Committee, Stockholm, Schweden), die zur Zeit der Entnahme keine immunsuppressive / immunmodulatorische (für sechs Monate) oder corticosteroidhaltige Therapie (für acht Wochen) vor der jeweiligen Probenentnahme erhalten hatten.

Es handelte sich um folgende Materialien:

- Serum von MS-Patienten, gesunden Spendern (HD) und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND)
- Liquor (CSF) von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND)
- Plasmapherisat von MS-Patienten

2.1.10 Chemikalien

Acrylamid-bis	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Butanol	Riedl-deHaen, Seelze
β -Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassi Brilliant Blue R250	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNA-Minipräp-Kit	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedl-deHaen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Expressionsvektoren pQE12 und pQE30	Qiagen, Hilden
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Riedl-deHaen, Seelze
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedl-deHaen, Seelze
Isopropyl-b-D-Thiogalaktosid (IPTG)	bts, Leon-Rot
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Lowry-Protein-Assay-Kit	Sigma-Aldrich Diagnostics, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedl-deHaen, Seelze
Milchpulver	Frema Reform
Natriumazid	Merck, Darmstadt

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma, Deisenhofen
o-Phenyldiamin (OPD)	Sigma, Deisenhofen
Nitrophenylphosphat	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phenol	Appligene, Heidelberg
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween-20)	Sigma, Deisenhofen
Poinceau-S	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsendonuklease BGLII	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, (37%)	Riedl-deHaen, Seelze
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedl-deHaen, Seelze
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
X-Phosphat	Sigma, Deisenhofen

Verwendete Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Assistent (Sondheim), Falcon™ (Becton Dickinson, Plymouth, U.K.), Amersham (Braunschweig), Greiner (Flacht) und Schleicher & Schuell (Dassel) bezogen.

2.2 Hitzeschock-Transformation von Bakterienzellen

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden E.-Coli-Bakterien transformiert.

Für die Expansion zur Transformation kompetenter E.-Coli-Bakterienzellen (von Dr. Brehm überlassen) wurden 10ml LB-Medium (mit 25µg/ml Kanamycin) mit 7µl Glycerinkultur des kanamycinresistenten E.-Coli-Stammes M15 angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert (Vorkultur). Am nächsten Morgen wurden 48ml LB-Medium (mit Kanamycin) mit 3ml der Vorkultur angeimpft und für 45 Minuten bei 37°C und 150rpm inkubiert bis eine optische Dichte OD_{600nm} von 0,5 erreicht wurde. Die Messung erfolgte in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1cm, wobei eine Absorptionseinheit von 0,1 bei OD_{600nm} der trüben Suspension einer Zelldichte von etwa 10⁸ Zellen pro ml entsprach.

Daraufhin wurde die Zellsuspension für 10 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 25ml 0,1M CaCl₂ für 60 Minuten unter Eiskühlung aufgenommen, dann wiederum 10 Minuten bei 4°C mit 4000rpm zentrifugiert und das Pellet wieder für 30 Minuten auf Eiskühlung in 5ml 0,1M CaCl₂ resuspendiert.

Die Hitze-Schock-Transformation für das S.100β-Gen der Ratte wurde wie folgt durchgeführt.

Zu den kompetenten Bakterienzellen wurde die Lösung mit dem Expressionsvektor pQE12 (Qiagen, Hilden), der das Gen für S.100β enthielt, hinzugegeben (100µl kompetente Bakterien in CaCl₂ auf 10ng DNA = pQE12-Ligationslösung für S.100β). Diese Suspension wurde für 45 Minuten bei 0°C inkubiert, dann für 2 Minuten auf 37°C (oder alternativ für 90 Sekunden auf 42°C) erwärmt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Für eine Stunde folgte eine Inkubation bei 37°C unter Zugabe von 3ml LB-Medium ohne Antibiotikazugabe. Die Bakterien wurden dann für 10 Minuten bei 4000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 100µl der Überstandsflüssigkeit resuspendiert und auf Agar-Platten ausplattiert, die jeweils 1:1000 Ampicillin und Kanamycin enthielten, und dann über Nacht bei 37°C bebrütet. Dabei wurden 10% der Suspension auf einer Agar-Platte plattiert, 90% auf eine weitere, und zusätzlich wurde zur Kontrolle der nicht transformierte E.-Coli-Stamm M15 auch auf einer Platte ausgestrichen, da nur der das Plasmid enthaltende Stamm auch das Ampicillinresistenzgen enthielt und somit auf dem Ampicillinagar kein Wachstum bei nicht erfolgter Transformation des E.-Coli-Stammes zu erwarten war.

Alle Agar-Nährböden wurden zuvor durch Zusatz von 15g/l Agar zum Flüssigkeitsmedium hergestellt und die Antibiotika wurden nach Verfestigung der Nährböden im Nachhinein ausgestrichen. Alle Instrumente und Lösungen, die beim Umgang mit Bakterienkulturen verwendet wurden, waren durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 120°C entkeimt worden. Die Antibiotikallösungen wurden sterilfiltriert.

Gut proliferierende Bakterienklone des Agars, der mit 10% der transformierten Bakteriensuspension beschichtet worden war, wurden nach Übernachtbebrütung bei 37°C zur Beimpfung von je 3ml LB-Medium verwendet, die wiederum über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert wurden.

Ein Anteil dieser Bakterienklon-Suspensionen wurde zur Isolation des DNA-Plasmids aus den Bakterien verwendet, um eine Prüfung der erfolgreichen Transformation mit Hilfe einer Restriktionsendonukleasenanalyse und einer Sequenzierung (TopLab, Martinsried) durchführen zu können.

Durch einen Minipräp-Kit der Firma Pharmacia (Freiburg), dessen genaues Protokoll der DNA-Präparation in der Anleitung von Pharmacia nachgelesen werden kann, wurde die DNA des Plasmids gewonnen.

Dieser Präparation folgte eine Spaltung der DNA durch die Restriktionsendonuklease BGLII. Diese Restriktionsendonuklease hydrolisieren die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und spaltet das Plasmid in Fragmente definierter Größe.

In diesem Fall wurde das Plasmid pQE12 in zwei Fragmente gespalten, die einerseits 276 Basenpaare und andererseits 3425 Basenpaare enthielten. Auf einem Agarose-Gel wurde die Spaltung durch die Restriktionsendonuklease überprüft. Die DNA-Fragmente konnten nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel durch Fluoreszenz mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen und wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt:

- 2µl DNA und 10µl Enzymmix (1 zu 10 Volumen spezifischer 10fach-Reaktionspuffer)
- 10U Restriktionsendonuklease BGLII (Boehringer, Mannheim)/µl DNA ad 20µl H₂O_{dest.}

Die Hydrolyse wurde durch 1 zu 10 Volumen mit 10fach-Auftragspuffer für das Agarose-Gel gestoppt und dann auf das Agarose-Gel zur elektrophoretischen Auftrennung aufgetragen.

Nach dem gleichen Prinzip wurden E.-Coli-Bakterien des Expressionsstammes M15 mit dem Gen für die IgV-ähnliche Domäne (Igd) von humanem MOG transformiert. Dabei trug der Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) das entsprechende MOG-Gen.

2.3 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Zur Testung der menschlichen Serum- und Liquorproben auf deren Antikörpergehalt wurden die entsprechenden Antigene rekombinant (rek.) hergestellt.

Die IgV-ähnliche Domäne (Igd) von humanem MOG wurde aus dem E.-Coli-Expressionsstamm M15 mit dem Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) isoliert, in den das Gen des humanen MOGs (IgV-ähnliche Domäne, Igd) kloniert worden war. Dadurch gewonnenes rekombinantes humanes MOG (IgV-ähnliche Domäne, MOG^{Igd}) wurde auch zur Gewinnung MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper aus Serum/Plasma oder Plasmapherisat von MS-Patienten und gesunden Spendern (HD) verwendet (2.5).

Der Expressionsstamm M15 enthält das Plasmid pREP4 (Villarejo and Zabin, 1974). In pREP4 liegt das lac-Gen, welches für den lac-Promoter kodiert. Bei Zugabe von 2% Glucose in das Kulturmedium ist die Expression des Proteins durch den lac-Promoter unterdrückt. Durch ITPG (Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid) wird der lac-Promoter induziert.

Am Carboxy-Terminus des rekombinant hergestellten MOG^{Igd} befand sich zusätzlich ein Histidinschwanz (6 Histidinreste). Mit diesem konnte das Protein über eine Nickel-Chelat-Säule aufgereinigt werden.

2.3.1 Übernachtskultur

12l LB-Medium wurden mit den transformierten E.-Coli-Glycerinkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Das Medium wurde durch 1% Glucose ergänzt, um eine vorzeitige Induktion der Bakterienzellen zu unterdrücken.

2.3.2 Induktion

Um die Glukose zu entfernen wurde, die Kultur bei 4000rpm und 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 12l LB-Medium resuspendiert und daraufhin erfolgte eine Inkubation für etwa 3 Stunden bei 37°C, bis sich die Bakterien in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Dabei wurde die Bakteriendichte immer wieder photometrisch bei OD_{600nm} gemessen (Shimadzu UV-160A, Duisburg). Die Induktion der Bakterienzellen mit ITPG erfolgte bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0,5 bis 0,7.

Bei einer OD_{600nm} von etwa 1,1 (nach 3-4 Stunden weiterer Inkubation) wurden die Zellen bei 5000rpm und 4°C für 60 Minuten abzentrifugiert. Alternativ hätte auch bei 10000rpm für 20 Minuten abzentrifugiert werden können.

Die Pellets wurden in 200ml PBS aufgenommen und nochmal bei 10000rpm und 4°C abzentrifugiert. Aufbewahrt wurde das Pellet bei -20°C.

2.3.3 Zellaufschluss

Nach Resuspension des Pellets in insgesamt 70ml PBS wurde für 45 Minuten auf Eis mit Ultraschall beschallt, um die Zellwand der Bakterien aufzubrechen (Branson Sonifier 450, 50% output). Danach wurde für 30 Minuten bei 18000rpm und 4°C zentrifugiert, um die Zelleinschlusskörper, die das Protein enthielten, von wasserlöslichen Proteinen zu trennen. Das Protein befand sich somit zu diesem Zeitpunkt im Pellet, im Überstand zum Teil die aufgebrochenen Bakterienzellwände und sonstige wasserlösliche Bestandteile. Nun wurde das Pellet in 50ml Harnstoffpuffer resuspendiert und wieder auf Eis mit Ultraschall für 30 Minuten beschallt. Der Harnstoffpuffer und die weitere Beschallung dienten zum Aufbruch der Zelleinschlusskörper und damit zur Lösung des Proteins im Puffer. Um weitere Zellbestandteile zu entfernen, wurde der Harnstoffpuffer mit dem Protein in Lösung für 30 Minuten bei 18000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der den Großteil des Proteins enthaltende Überstand wurde für die Nickel-Chelat-Chromatographie verwendet, wie auch das Pellet, das eine weitere Stunde in Harnstoffpuffer beschallt und abzentrifugiert wurde und dessen Überstand ebenfalls auf die Nickel-Chelat-Säule aufgetragen wurde.

2.3.4 Nickel-Chelat-Chromatographie

Die Imidazolringe des Histidinrestes des Proteines bilden Chelat-Komplexe mit zwei freien Koordinationsstellen des Nickel²⁺. Das Nickel²⁺ ist über vier weitere Koordinationsstellen an der Gelmatrix gebunden.

Das MOG-Protein wird durch die Chelatverbindung an der Gelmatrix festgehalten. Durch Elution wird später der Chelatkomplex mit Hilfe von Imidazol aufgelöst und das MOG kann eluiert werden.

Die Säule wurde aus Säulenmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Freiburg) hergestellt, das mit fünf Säulenvolumina Wasser, drei Säulenvolumina 1% NiCl₂, drei Säulenvolumina Wasser und drei Säulenvolumina Harnstoffpuffer gewaschen wurde. Dadurch erfolgte ein Quellen des Säulenmaterials, eine Beladung der Säule mit Nickel²⁺ und ein Äquilibrieren der Säule an den pH-Wert und die Harnstoffkonzentration.

Die proteinhaltige Lösung wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule übertragen, wobei sich dabei die oben beschriebenen Chelatkomplexe bildeten und das MOG an die Säule gebunden wurde. Die Säule wurde daraufhin mit 300ml Waschpuffer gewaschen und durch 200ml Elutionspuffer mit einem linearen Gradient des Imidazolanteils eluiert. Bei der Elution wurde das Eluat zur späteren Analyse des Proteingehaltes in Fraktionen zu je 4ml gesammelt.

Zur Verfolgung des Auftrags des Proteins, des Waschschrtes und der Elution (Abb. 5) wurde eine UV-Detektion bei 280nm verwendet (Econo System, Bio-Rad, München, Fließgeschwindigkeit 0,5ml/Minute).

Die Analyse der Elutionsfraktionen (Abb. 6) erfolgte auf SDS-Gelen zur Proteinanalyse (2.4.1).

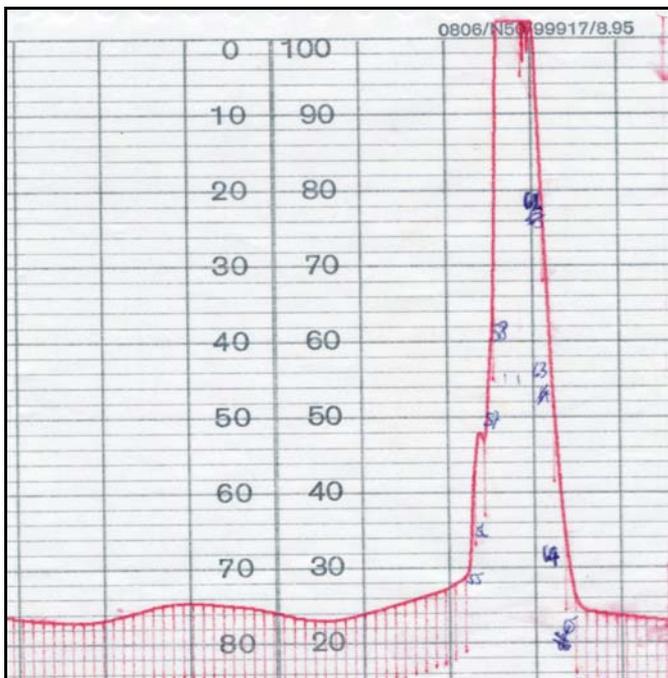


Abbildung 5

Typisches Elutionsdiagramm einer Nickel-Chelatsäule mit Elutionspeak der proteinhaltigen Fraktionen

Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5ml/min bei einem linearen Gradienten von 40mM Imidazol bis 500mM Imidazol. Die Fraktionsgröße betrug 4ml. Der Schreiber lief mit 2cm/h.

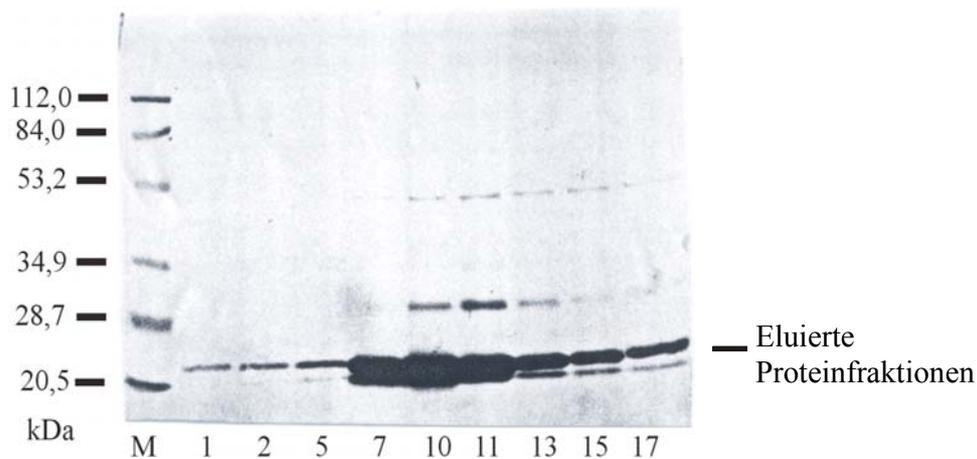


Abbildung 6

Typische Gel-Untersuchung (12% Tris-Glycin) von eluierten, proteinhaltigen Fraktionen aus der Nickel-Chelatsäule

M Proteinstandard („prestained standard low-range“, Bio-Rad, München)

Die Zahlen geben die Fraktionsnummern an.

2.3.5 Dialyse

Die Fraktionen mit den höchsten Proteinanteilen wurden vereinigt und gegen 5l PBS (pH 7,4) über Nacht bei 4°C unter langsamem Rühren zur Entfernung des Harnstoffs dialysiert.

Zur Dialyse wurde ein semipermeabler Dialyseschlauch (Spektra/Por MWCO 3500, Spectrum, Rancho Dominguez, U.S.A.) gründlich mit Wasser gespült und für 15 Minuten gekocht, um Kontaminationen auszuschließen. Mit Dialyseklammern wurde der Schlauch verschlossen. Vor Einfüllen der Proteinlösung wurde die Dichtigkeit des Schlauches mit Wasser geprüft. Die Proteinlösung wurde dann in den Schlauch gegeben.

Die dialysierte Proteinlösung wurde mit Hilfe eines Micromembranen-Ionen-Austauscher-Filters (Microporous Membrane Ion Exchanger S15X, Sartorius, Göttingen) aufgereinigt. Auf die Aufreinigung des Proteins mit Hilfe von SDS-Gelen wurde verzichtet, um eine Denaturierung des Proteins durch SDS zu vermeiden.

2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Proteinkonzentrationen wurden mit Peterson's Modification der Mikro-Lowry-Methode bestimmt. Alle bei der Lowry-Methode verwendeten Materialien stammten von Sigma-Aldrich Diagnostics, München.

Dieser Methode liegt die Reaktion des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenzes (Phosphor-Wolfram/Molybdänsäure-Komplex) mit Tyrosinresten der Proteine zu Grunde. In Abhängigkeit

von der Proteinkonzentration kommt es zu einer Blaufärbung, die photometrisch bestimmt werden kann. Zur Eichung dienen die Extinktionen von Proteinlösungen mit bekannter Konzentration. Standardlösungen und die unbekannte Probe wurden in Duplikaten angesetzt. Von der Standardlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit 0, 50, 100, 200, 300, 400 µg/ml angesetzt. Die unbekannte Lösung wurde in verschiedenen Konzentrationen verdünnt. 0,5ml Lowry-Reagenz wurde mit 0,5ml Standardlösung und mit 0,5ml Probe gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 0,25ml des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenzes wurde zu den verschiedenen Ansätzen hinzugefügt und für 30 Minuten inkubiert. Die Extinktionen wurden bei OD_{750nm} gemessen (Shimadzu UV-160A). Aus den Werten der Standardproteinlösung konnte eine Eichkurve erstellt werden, aus der die Proteinkonzentration der Probe errechnet wurde (Abb.7). Als Standardlösung wurden zumeist Lösungen mit Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Unterschiedliche Mengen an Tyrosin in den verschiedenen Proteinen begründen eine gewisse Fehlerquelle dieser Methode.

Zur Herstellung von rekombinantem S.100β-Protein aus der Ratte wurde das gleiche Verfahren verwendet, wie es für die Produktion des MOG-Proteins erläutert ist. Dabei wurde der gleiche E.-Coli-Expressionsstamm M15 mit dem Expressionsvektor pQE12 (Qiagen, Hilden) für das S.100β-Gen verwendet. Das S.100β-Protein aus der Ratte diente in der vorliegenden Arbeit als Kontrollantigen, um unspezifische Antworten gegen E.-Coli-Bakterienbestandteile bei rekombinant hergestellten Antigenen auszuschließen.

Das in dieser Arbeit verwendete Antigen BT3.3 wurde nach dem gleichen Verfahren rekombinant hergestellt (von Dr. Malotkin überlassen).

Das rekombinant hergestellte humane BTN (IgV- und IgC-ähnliche Domäne, BTN^{exo}) wurde aus dem Baculovirus-System exprimiert (von Dr. Schubart überlassen).

Proteinlösungen wurden grundsätzlich aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

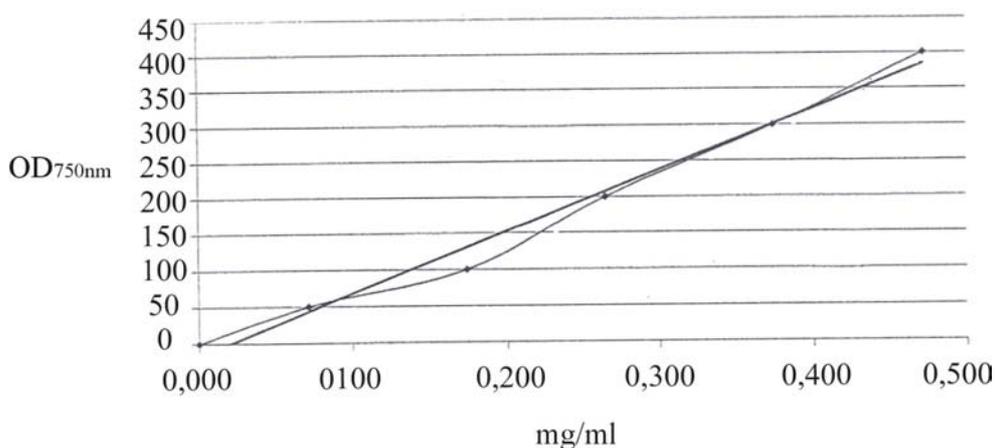


Abbildung 7

Typische Eichkurve zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen nach der Lowry-Methode

2.4 Gel-Elektrophoretische Methoden

2.4.1 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden Mini-Proteingele (Bio-Rad, München) und die entsprechenden Instrumente dieses Systems verwendet. Bei dieser Methode werden die Proteine zuerst in einer Sammelgelschicht auf eine extrem schmale Bande konzentriert und daraufhin im Trenngel aufgetrennt.

Diese Gele bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel unterschiedlicher Konzentration.

Die Lösungen für die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel		Sammelgel
Aqua bidest	12ml		6,8ml
Puffer B	12,5ml	Puffer D	3,1ml
10% SDS (Lsg. C)	0,5ml		250µl
30% Acrylamid-bis (Lösung A)	25ml		2,5ml
10% APS (frisch)	250µl		125µl
TEMED	125µl		12,5µl

Die Lösung für das Trenngel wurde in den Zwischenraum der zwei Glasplatten gegossen, so dass sich keine Luftblasen bildeten und noch ausreichend Platz für die Aufbringung des Sammelgels vorhanden war. Um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten, wurde nach Aufbringen der Lösung der obere Rand sofort mit H₂O gesättigtem Butanol beschichtet, das nach der Polymerisation des Gels abgeschüttelt wurde. Auf das Trenngel wurde nach erfolgter Polymerisation das Sammelgel unter Verwendung eines Taschenformerkammes aufgebracht.

Das Gel wurde mit den Proteinlösungen, die mit Auftragspuffer versetzt wurden, in den Taschen des Sammelgels beladen. Auch ein molekulargewichtsabhängiger Proteinstandard wurde zur Detektion der zu analysierenden Proteinbanden aufgetragen („prestained standard low-range“, Bio-Rad, München, 2µl/Tasche). Dieser Marker enthielt folgende Proteine:

- Hasenmuskel-Phosphorylase B 97,4 kDA
- Rinderserumalbumin (BSA) 66,2 kDA
- Hühnereiweiß-Ovalbumin 42,7 kDA
- Rinder-Carboanhydrase 31,0 kDA
- Sojabohnen-Trypsininhibitor 21,5 kDA
- Hühnereiweiß-Lysozym 14,4 kDA

Die Auftrennung der Proteine wurde bei 100V in Laufpuffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Negativ geladenes SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an, die dadurch gestreckt und somit denaturiert wurden. Damit wird ein weiter Abstand zwischen den negativen Ladungen der Proteine bewirkt.

Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Proteine wird relativ angeglichen, und damit erfolgt die Auftrennung der Proteine hauptsächlich größenabhängig.

Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die untere Front der Proteine das Ende des Gels erreicht hatte. Dies war an der Bromphenolblau-Bande des Substratpuffers zu erkennen.

Durch Färbung mit Coomassi-Blau wurden die Proteine sichtbar gemacht.

2.4.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassi-Blau

Die Gele wurden für einige Stunden in der Coomassi-Blau-G25-Färbelösung angefärbt. Danach wurden die Gele für einige Stunden in der Entfärbelösung entfärbt. Dabei wurde die Hintergrundfärbung verringert und die angefärbten Proteinbanden wurden gut sichtbar (Abb. 8).

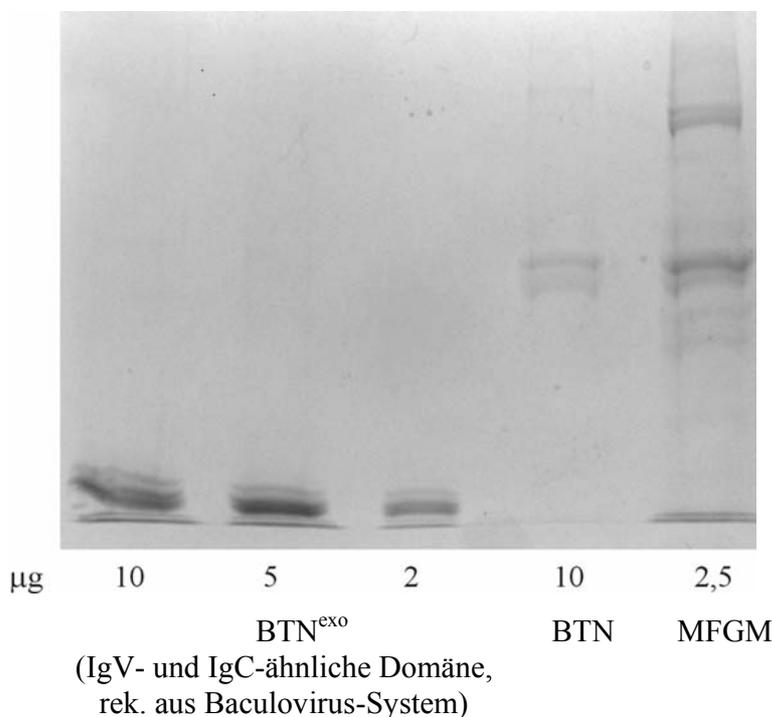


Abbildung 8

Typisches Gel (8% Tris-Glycin) nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen

Die getrennten Proteinbanden sind nach Coomassi-Blau-Färbung gut zu erkennen.

2.4.3 Analyse von DNA in Agarose-Gelen

Zur Herstellung von 1% Agarose-Gelen wurde 0,3g Agarose in 30ml TBE-Puffer aufgekocht, dann abgekühlt (60°C) und 15µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben (1mg/ml). Das Gel wurde in entsprechenden Vorrichtungen gegossen.

Die elektrophoretische Auftrennung der in Auftragspuffer aufgenommenen DNA-Fragmente aus der Spaltung der Plasmide durch die Restriktionsendonuklease (2.2) fand unter 100V und mit TBE-Laufpuffer statt. Die fragmentierte DNA wandert im elektrischen Feld im Agarose-Gel umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Als Eichstandard für lineare DNA-Fragmente wurden Lösungen mit Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht analysiert.

2.5 Isolation MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper

MOG^{Igd}-spezifische Antikörper wurden aus Seren (Verdünnung 1:1 in PBS) und Plasmapherisaten mit Hilfe von Immunaффinitätschromatographie (nach Pharmacia, Freiburg) isoliert (Abb. 9).

MOG^{Igd} wurde an CNBr-aktivierte Agarose (Sigma, Deisenhofen) kovalent gekoppelt. Bei Beladung der Immunaффinitätssäule mit Serum oder Plasmapherisat wurden dann MOG^{Igd}-spezifische Antikörper an das gekoppelte Antigen (MOG^{Igd}) gebunden, die dann später spezifisch eluiert werden konnten.

Das getrocknete Agarose-Material wurde mit eiskalter 1mM HCl-Lösung zur Schwellung gebracht. Dabei kam auf ein Gramm trockenes Agarose-Material 200ml HCl-Lösung bei einer Volumenzunahme um das 3,5fache. Das zu koppelnde Protein (in reinem Koppelungspuffer oder in PBS (pH 7,4) nach dem Dialyseschritt, 2.3.5, ausgefallen) konnte in Koppelungspuffer unter Zusatz von 4ml 10% SDS-Lösung im Ultraschallbad in Lösung gebracht werden. Pro ml Gel wurde 5-10mg Protein benötigt. Der pH-Wert sollte zur Optimierung der Koppelung zwischen 8 und 10 liegen. Die Proteinlösung wurde mit dem Gel über Nacht bei 4°C unter End-über-End-Bewegung zur Koppelung inkubiert. Am nächsten Morgen wurden noch aktive Gruppen mit 0,2M Glycerinlösung (pH 8,0) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde das Gel in eine Säule überführt und dann gründlich zunächst mit Koppelungspuffer, dann mit 0,1M Acetatpuffer (0,5M NaCl enthaltend, pH 4) und darauf wieder mit Koppelungspuffer gewaschen, um die blockierende Glycerinlösung zu entfernen.

Die Säule wurde nun mit Serum oder Pherisat (200ml, 1:1 in PBS) beladen. Dann wurde die Säule mit PBS gewaschen, bis der Durchlauf bei der Messung der optische Dichte OD_{280nm} (Econo System, Bio-Rad, München) wieder auf Baseline (OD_{280nm} des Durchlaufs bei Wasch-

schritt mit Koppelungspuffer) angelangt war, um alle ungebundenen Restbestände des Serums oder des Pherisates aus der Säule vor dem Elutionsschritt herauszuwaschen. Die gebundenen Antikörper wurden nun mit 0,1M Glycerinlösung (pH 2,5) eluiert (Abb 10). Dieser Vorgang konnte durch die peakartige-Zunahme der OD_{280nm} des Durchlaufs erkannt werden. Das Volumen der Glycerin-Lösung wurde dabei so gering wie möglich gehalten. Das Eluat wurde sofort durch Zugabe von 10fach-PBS (pH 7,4) neutralisiert. Die eluierten Antikörper wurden mit der Western-Blot- (2.6.1) und ELISA-Methode (2.6.2) analysiert.

Zur Regeneration der Säule wurde diese mit dem je 3-5fachen Volumen an 0,1 M Tris-Puffer (0,5M NaCl enthaltend, pH 8,5) und dann mit 0,1M NaAcetat Puffer (0,5M NaCl enthaltend, pH 4,5) gewaschen. Danach wurde die Säule wieder mit Koppelungspuffer äquilibriert. Die Säule stand damit wieder für weitere Elutionsvorgänge zur Verfügung und konnte bei 4°C aufbewahrt werden.

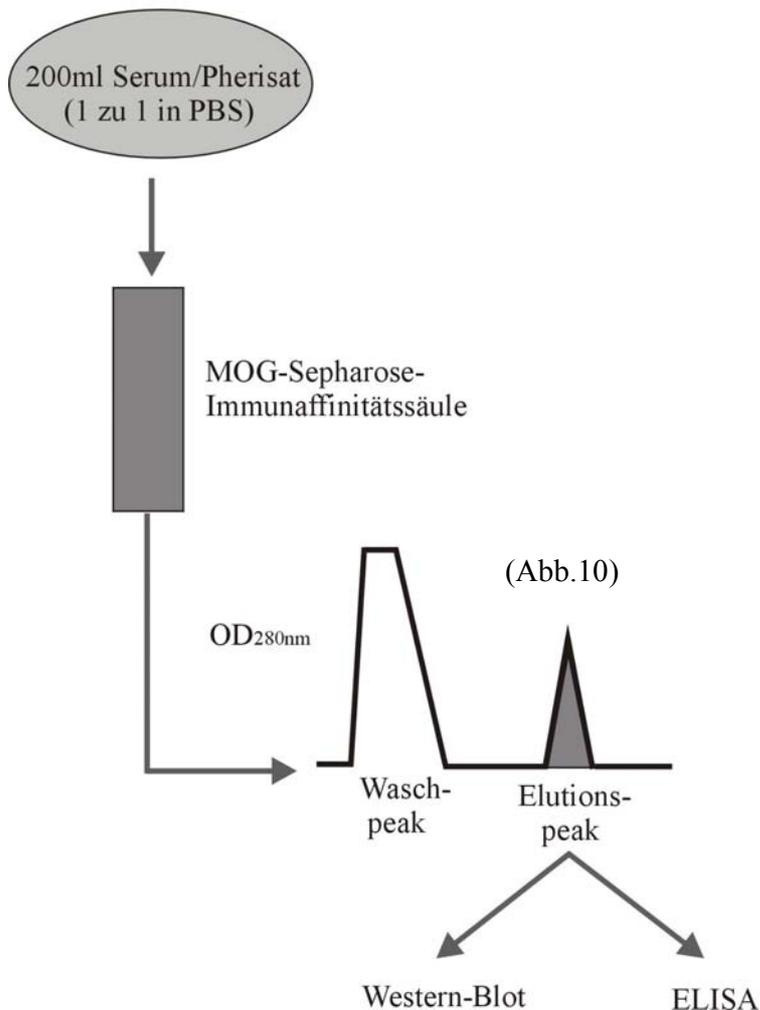


Abbildung 9

Isolation MOG^{Ig^d}-spezifischer Antikörper aus einer CNBr-aktivierten Agarose-Säule bei OD_{280nm}

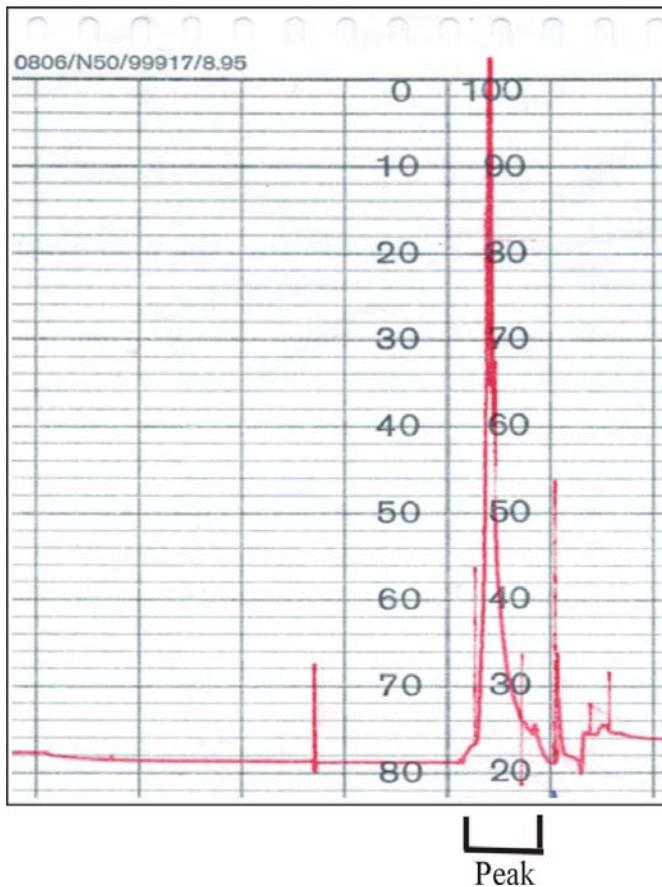


Abbildung 10

Elutionspeak MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper durch Elution mit 0,1M Glycin (pH 2,5)

2.6 Analyse von Serum und Liquor auf spezifische Antikörper

Menschliche Serum- und Liquorproben sowie die isolierten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper (2.5) wurden mittels Western-Blot- (2.6.1) und ELISA-Methode (2.6.2) auf Reaktion von spezifischen Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene analysiert.

Dabei dienten rekombinantes (rek.) MOG^{Igd}, rek. BT3.3 (von Dr. Malotkin überlassen), rek. S.100 β aus der Ratte, rek. humanes BTN^{exo} (aus dem Baculovirus-System, von Dr. Schubart überlassen) und bovines BTN (SDS-aufgereinigtes Gesamtprotein, von Prof. Dr. Linington überlassen) als Antigene. Bei der ELISA-Methode wurden auch synthetisch hergestellte Peptide der IgV-ähnlichen Domänen von humanem MOG (MOG^{Igd}) und bovinem BTN (BTN^{IgI}) als Antigene verwendet, die in Tabelle 1 aufgelistet sind (Genosys, Cambridge, U.K.).

2.6.1 Western-Blot-Methode

Auf die Trenngele (Novex, Frankfurt) wurden pro Bahn 1,5 µg der IgV-ähnlichen Domäne des rekombinant hergestellten (rek.) humanen MOG (MOG^{Igd}), des rek. S.100β aus der Ratte und von BT3.3 aufgetragen. Von dem SDS-aufgereinigten bovinen BTN wurden 6 µg auf die Trenngele aufgetragen.

Die Proteinlösungen wurden für etwa 45 Minuten mit dem Laufpuffer bei einer Spannung von 100V in den Gelen aufgetrennt, die in den Präparationskammern (Novex, Frankfurt) eingespannt wurden. Zusätzlich zu den Proteinlösungen wurde ein Molekulargewicht-Proteinstandard („prestained standard low-range“, Bio-Rad, München) in einer Gel-Tasche aufgetragen (2µl/Tasche).

Die Proteine wurden nach ihrer Auftrennung unter Kühlung und Rühren des Transferpuffers auf eine in passende Größe zugeschnittene Nitro-Cellulose-Membran (Amersham, Braunschweig) transferiert (45 Minuten bei 100V).

Nach diesem Schritt konnte die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitro-Cellulose-Membran mit Hilfe der Proteineinfärbung nach Poinceau (Poinceau-S, Sigma, Deisenhofen) überprüft werden (Salinovich and Montelano, 1986).

Die Nitro-Cellulose-Membran wurde in TBS-T neutralisiert und unspezifische Bindungsstellen mit 5% Magermilchpulver in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Danach erfolgte die Entfernung von überschüssiger Milch durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für je 10 Minuten bei Raumtemperatur (Waschschritt). Zur Testung der unterschiedlichen Patientenserum wurden dann die Membranen in einzelne Streifen geschnitten.

In entsprechenden Inkubationskammern (Amersham, Braunschweig) wurden die Streifen mit dem ersten Antikörper, in diesem Fall die Patientenserum, für eine Stunde unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde eine Verdünnung der Patientenserum von 1:500 in TBS-T mit 2% Magermilchpulver verwendet. Als Kontrollantikörper dienten Antikörper gegen MOG aus der Maus (8.18.C.5, von Prof. Dr. Linington überlassen) in einer Verdünnung 1:500, ebenso anti-BTN Antikörper aus dem Hasen (von Prof. Dr. Linington überlassen) in einer Verdünnung von 1:500, sowie anti-BT3.3 Antikörper aus dem Hasen (von Dr. Malotkin überlassen) in einer Verdünnung von 1:50 und anti-S.100β Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 (Immunotech, Marseilles, F). Nach Inkubation erfolgte ein weiterer dreimaliger gründlicher Waschschritt.

Zur Detektion wurde das alkalische Phosphatase System verwendet. Als Detektionsantikörper (Jackson Immuno Research, West-Grove Pen., U.S.A.; Dianova, Hamburg; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, U.S.A.) diente dabei ein mit alkalischer Phosphatase gelabelter zweiter Antikörper in TBS-T mit 2% Magermilchpulver, der jeweils humanes Immunglo-

bulin G (1:5000), das des Hasen (1:5000) oder der Maus (1:1000) bindet. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte ebenfalls über eine Stunde unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Streifen wieder gründlich gewaschen. Alle einstündigen Inkubationsschritte konnten auch über Nacht stattfinden, dann allerdings unter Kühlung bei 4°C.

Zur Entwicklung der Streifen erfolgte die Detektion mit Hilfe des Substratpuffers für alkalische Phosphatase. Dabei wird das unsichtbare Substrat durch die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase in einen sichtbaren Farbstoff umgewandelt. Die Detektionsreaktion wurde durch einen Waschschritt mit H₂O gestoppt. Das Signal war auf den Nitro-Cellulose-Streifen als Quermarkierung erkennbar (Abb. 11). Die Auswertung erfolgte durch Vergleich des Proben-signals mit dem Signal des Kontrollantikörpers.

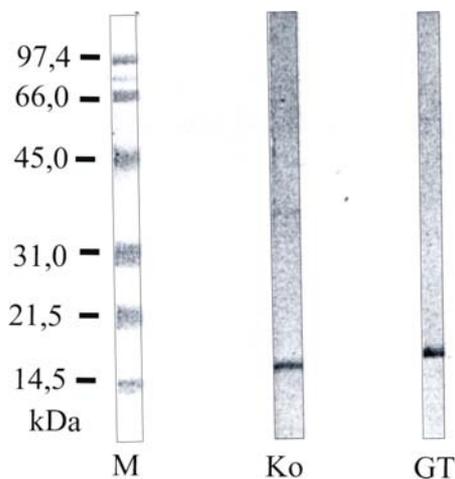


Abbildung 11

Typische Signale einer Western-Blot-Analyse zur Untersuchung von Seren auf den Gehalt an MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern
M Proteinstandard
Ko Kontrollantikörper
GT MS-Patient

2.6.2 "Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay" (ELISA)

Zur Testung von Serum- und Liquorproben auf Antikörpergehalt wurde auch die ELISA-Methode verwendet. Dabei hatte der ELISA-Versuch folgenden typischen Aufbau:

- Beschichten der Platte mit Antigen 37°C, 1 Stunde (alternativ über Nacht bei 4°C)
- Waschen
- Blockieren mit 1% BSA 37°C, 1 Stunde (alternativ über Nacht bei 4°C)
- Waschen
- 1. Antikörper 37°C, 1 Stunde (alternativ über Nacht bei 4°C)
- Waschen
- 2. Antikörper 37°C, 1 Stunde (alternativ über Nacht bei 4°C)
- Waschen
- Entwicklung mit p-Nitrophenyl-Phosphat (OD_{490nm}) bzw. o-Phenyldiamin (OD_{405nm})
- Messen im Spektrometer bei OD_{490nm} bzw. OD_{405nm}

Die ELISA-Platten aus Polystyren mit 96 Löchern (Costar, Cambridge, U.S.A.) wurden über Nacht mit 10 µg/ml Antigen in PBS-Puffer mit 0,02% NaN₃ beschichtet. Dabei bindet das Antigen im Adsorptionspuffer an die Vinyloberfläche der Mikrotiterplatte. Die Füllmenge pro Loch betrug 100 µl.

Die Platten wurden dann mit PBS-Puffer mindestens 5-fach gewaschen (Waschpuffer, Immunowash, Nunc Gibco Life Technologies, Paisley, U.K.) und dann mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS-Puffer für mindestens eine Stunde bei 37°C mit 200 µl pro Loch blockiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Das größere Volumen diente dazu, auch die Ränder zu blockieren.

Die Platten wurden dann wiederum mindestens 5-fach mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit Serum oder Antikörpern in PBS/Azid-Puffer (Serum 1in30, Liquor 1in5, aufgereinigte MOG^{Igd}-spezifische Antikörper 1in50) über Nacht bei 4°C oder alternativ für 4 Stunden bei 37°C inkubiert (100 µl pro Loch).

Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe von zweiten Antikörpern (Jackson Immuno Research, West-Grove Pen., U.S.A.; Dianova, Hamburg; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, U.S.A.) signalisiert, die mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase konjugiert waren und IgG erkannten. Der zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1in5000 in PBS/Azid-Puffer verwendet.

Alle Platten wurden mit Entwicklungspuffer zum Signal gebracht, der das Substrat für die Peroxidase oder alkalische Phosphatase-Reaktion enthielt. Die Platten wurden entweder mit p-Nitrophenyl-Phosphat für Peroxidase (Signal bei OD_{490nm} messen) oder o-Phenyldiamin (Signal bei OD_{405nm} zu messen) für alkalische Phosphatase durch Umwandlung des Substrates in einen Signalfarbstoff entwickelt. Die Farbstoffentwicklung wurde bei Peroxidase-Entwicklung durch Zugabe von 3M HCl unter Berücksichtigung von nicht zu hoher Entwicklung der Hintergrundfarbintensitäten gestoppt. Bei Entwicklung mit alkalischer Phosphatase erfolgte kein Stoppen der Entwicklung. Die optische Dichte wurde bei OD_{490nm} (Entwicklung mit Peroxidase) nach dem Stoppen der Entwicklung bzw. bei OD_{405nm} (Entwicklung mit alkalischer Phosphatase) nach 30 Minuten Entwicklungszeit für Serum und 1 Stunde 15 Minuten für Liquor im Spektrometer (Dynatech MR4000, Denkendorf) gemessen. Der Signalfarbstoff ist bei diesem Messverfahren proportional zur gebundenen Antikörpermenge.

Von den gemessenen Werten wurde ein gemittelter Hintergrundwert subtrahiert. Dieser ergab sich aus Werten für nicht spezifische Bindungen an BSA-beschichtete Platten. Die Intensität der Hintergrund-OD für Serum- und Liquorproben variierte sehr, was für ELISA-Versuche im menschlichen System im Gegensatz zum Tierversuch oft ein erhebliches Problem darstellt. Deswegen wurden nur solche Werte als signifikant positiv gewertet, die einen Schwellenwert überstiegen, der als gemittelter Hintergrundwert plus zweifache Standardabweichung definiert wurde (2.7).

2.7 Statistik und Auswertungsmethoden

Zur Klärung statistischer Fragestellungen wurde „Statistical Methods in Medical Research“ von P. Armitage and G. Berry (1994) verwendet.

OD-Werte in den ELISA-Untersuchungen wurden als Mittelwerte der einzelnen OD-Messwerte für die Auswertung verwendet.

Von den Messwerten wurden einzelne Werte, sogenannte „Ausreißer“, ausgeschlossen. Als Ausreißer wurden einzelne Messwerte definiert, die zu einer Standardabweichung der Messwerte geführt hätten, die bei Einschluss der sog. Ausreißer einen Wert von größer oder gleich 20% des Mittelwerts der Messwerte erreicht hätte:

$$\text{Standardabweichung [Messwerte]} \times 100 / \text{Mittelwert [Messwerte]} \geq 20\%$$

Bei den ELISA-Untersuchungen wurde ein signifikanter Unterschied der jeweiligen, gemittelten Messwerte zu den gemittelten Hintergrundwerten als gegeben definiert, wenn die gemittelten Messwerte über dem Mittelwert plus zweifache Standardabweichung der Hintergrundwerte lagen. In den Frequenzanalysen gingen diese Werte als „signifikant positiv“ in die Auswertung ein.

Die Hintergrundwerte ergaben sich aus Mittelung von Werten für nicht spezifische Bindungen an BSA-beschichtete Platten.

Gemittelte Messwerte, die sich vom Mittelwert der Hintergrundwerte nicht um mehr als die zweifache Standardabweichung der Hintergrundwerte unterschieden, wurden als negativ gewertet, da sie damit definitionsgemäß nicht signifikant höher als der Hintergrund waren.

Damit wurde als Einschlusskriterium für gemittelte Messwerte ein Wert definiert, der größer als der Mittelwert der Hintergrundwerte plus zweifache Standardabweichung der Hintergrundwerte war:

Definition Einschlusskriterium für gemittelte Messwerte (signifikant positiv):

Gemittelter Messwert \geq

Mittelwert [Hintergrundwerte] + 2x Standardabweichung [Hintergrundwerte]

Entsprechend den jeweiligen Testvoraussetzungen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen bzw. Stichproben auf Signifikanz getestet anhand des Fisher-Exact-Testes (unabhängige Stichproben; 3.4), des McNemar-Testes (abhängige Stichproben; 3.5, 3.6) und des t-Testes (unabhängige Stichproben, zweiseitig; 3.7).

Alle Funktionen von Werten wurden sowohl mit Hilfe von „Excel“ als auch mit „Statistica“ ermittelt.

Bei der Western-Blot-Analyse galt die Testung dann als positiv, wenn ein Probensignal erschien, das vergleichbar zum Signal des Kontrollantikörpers war. Ein positives Testergebnis wurden deshalb so definiert, weil es sich bei der Western-Blot-Technik um ein qualitatives Messverfahren handelt, das nur bedingt quantitativ auszuwerten ist. Allerdings kann bei einem sehr starken Signal von einer hohen Konzentration des ersten Antikörpers in der Probe ausgegangen werden. Alle Signale der Western-Blot-Analyse wurden doppel-blind ausgewertet. Die Western-Blot-Methode eignete sich somit zur Screening-Untersuchung auf den Gehalt an Antikörpern in Serum/Plasmapherisat- und Liquorproben gegen bestimmte Antigene.

3. Ergebnisse

3.1 Screening-Untersuchung auf spezifische Antikörper gegen MOG, BTN und BT3.3 in Seren von MS-Patienten und gesunden Spendern

Um die Bedeutung von Proteinen als mögliche Ziele von Auto-Immunreaktionen zu erfassen, wurden in einer Screening-Untersuchung mittels Western-Blot-Analyse menschliche Seren von MS-Patienten und gesunden Spendern (HD) auf deren Antikörpergehalt gegen einzelne Antigene analysiert.

Es wurden humanes MOG (IgV-ähnliche Domäne, MOG^{Igd}, rek., Brehm et al., 1999), BTN (Gesamtmolekül, aus einem SDS-Reinigungsverfahren gewonnen, von Prof. Dr. Linington überlassen) und BT3.3 (IgV-ähnliche Domäne, rek., von Dr. Malotkin überlassen) als mögliche Antigene einer Immunreaktion untersucht.

Nach rekombinanter Herstellung der Proteine, die als Antigene dienen, ist eine Verunreinigung mit Proteinen aus E.-Coli-Bakterien nicht auszuschließen. Dadurch sind falsch-positive Signale möglich. S.100β der Ratte wurde zur Kontrolle falsch-positiver Signale, die durch die rekombinante Herstellung der Antigene begründet sein könnten, als rek. Kontrollantigen verwendet.

Aus der Screening-Untersuchung ging hervor, dass sowohl MOG als auch die beiden Proteine BTN und BT3.3 Ziele einer Immunreaktion sind, da in den Seren sowohl der MS-Patienten wie auch der gesunden Spender (HD) Antikörper gegen diese Proteine nachgewiesen werden konnten.

In den Seren der MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf (RR) zeigte sich zu einem Anteil von 53,6% (15/28) Reaktivität gegen MOG^{Igd} durch spezifische Antikörper.

Bei den MS-Patienten mit chronisch-progressivem Verlauf wurde in dieser Untersuchung zwischen sekundär-chronisch-progressiv (CPII) und primär-chronisch-progressiv (CPI) unterschieden. 63,2% (12/19) der MS-Patienten mit sekundär-chronisch-progressivem Verlauf hatten MOG^{Igd}-spezifische Antikörper. In den Seren von Patienten mit primär-progressivem Verlauf waren zu 85,7% (6/7) MOG^{Igd}-spezifische Antikörper nachweisbar. Von allen getesteten MS-Patienten mit chronisch progressivem Verlauf waren 69,2% (18/26) MOG^{Igd}-positiv. 61,1% (33/54) aller MS-Patienten hatten MOG^{Igd}-spezifische Antikörper.

Unter den gesunden Spendern war ein Anteil von 58,6% (17/29) mit MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern. Dies ist ein höherer Anteil als er gemäß anderer Publikationen zu erwarten wäre (Reindl et al., 1999; Lindert et al., 1999).

Der hohe Anteil von positiven Werten ist möglicherweise mit der hohen Sensitivität der Western-Blot Methode zu erklären, da es sich hier um einen qualitativen, nicht aber quantitativen

Nachweis von Antikörpern handelt. Ein positives Signal ist also nicht proportional zu der Menge vorhandener Antikörper. Zusätzlich konnte aufgrund der Methode nur eine subjektive Einschussgrenze verwendet werden, ab welcher Signalintensität eine Antwort als positiv zu werten war (2.7). Ein objektives Verfahren bezüglich der Einschussdefinition war auch wegen der insgesamt niedrigen Antikörperkonzentrationen in menschlichen Seren nicht möglich. Die geringe Antikörperkonzentration in den Seren wurde besonders deutlich bei Vergleich mit den Kontrollen. Als Kontrollen wurden aufgereinigte Antikörper aus Tieren verwendet, die mit dem jeweiligen Antigen immunisiert worden waren. Die Signale, die durch aufgereinigte Antikörper aus immunisierten Tieren erreicht wurden, waren aufgrund der spezifischen Immunreaktion innerhalb der Tiere gegen das jeweilige Antigen der Immunisierung erwartungsgemäß weit höher als die Signale, die sich durch Inkubation mit menschlichen Seren ergaben. Durch unabhängige Blindauswertung der Blot-Streifen wurde versucht, die Auswertung dennoch so weit wie möglich zu objektivieren. Abbildung 12 zeigt die unterschiedliche Signalintensität, die zwischen den einzelnen menschlichen Proben sehr variierte. Als Screening-Untersuchung auf das Vorkommen spezifischer Antikörper und damit einer Immunreaktion gegen bestimmte Antigene war die Western-Blot-Analyse der Seren aber dienlich. Durch Vergleich der Banden der Kontrollantikörper aus den immunisierten Tieren mit den Banden der menschlichen Seren wurde die Auswertung vorgenommen.

Es wurde gezeigt, dass ein Anteil von 27,8% (15/54) der MS-Patienten BTN-spezifische Antikörper in ihrem Serum hatten, dies waren 30% (9/30) der Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf und 25% (6/24) der Patienten mit chronisch-progressivem Verlauf, dabei 31,6% (6/19) sekundär chronisch-progressiv und 0% (0/5) primär chronisch-progressiv. 71,4% (5/7) von BTN-positiven MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf waren gleichzeitig auch MOG-positiv. Bei Patienten mit chronisch-progressivem Verlauf waren dies 60% (3/5). Gesunde Spender hatten zu 36,7% (11/30) BTN-spezifische Antikörper in ihrem Serum. 63,6% (7/11) von BTN-positiven, gesunden Spender waren gleichzeitig MOG-positiv. Diese Ergebnisse wurden als möglicher Hinweis auf Kreuzreaktivität der spezifischen Antikörper gewertet.

Abbildung 13 zeigt die prozentuale Verteilung der spezifischen Antikörper in den untersuchten Gruppen, die durch die Western-Blot-Analyse der Seren (Abb. 14) ermittelt wurde.

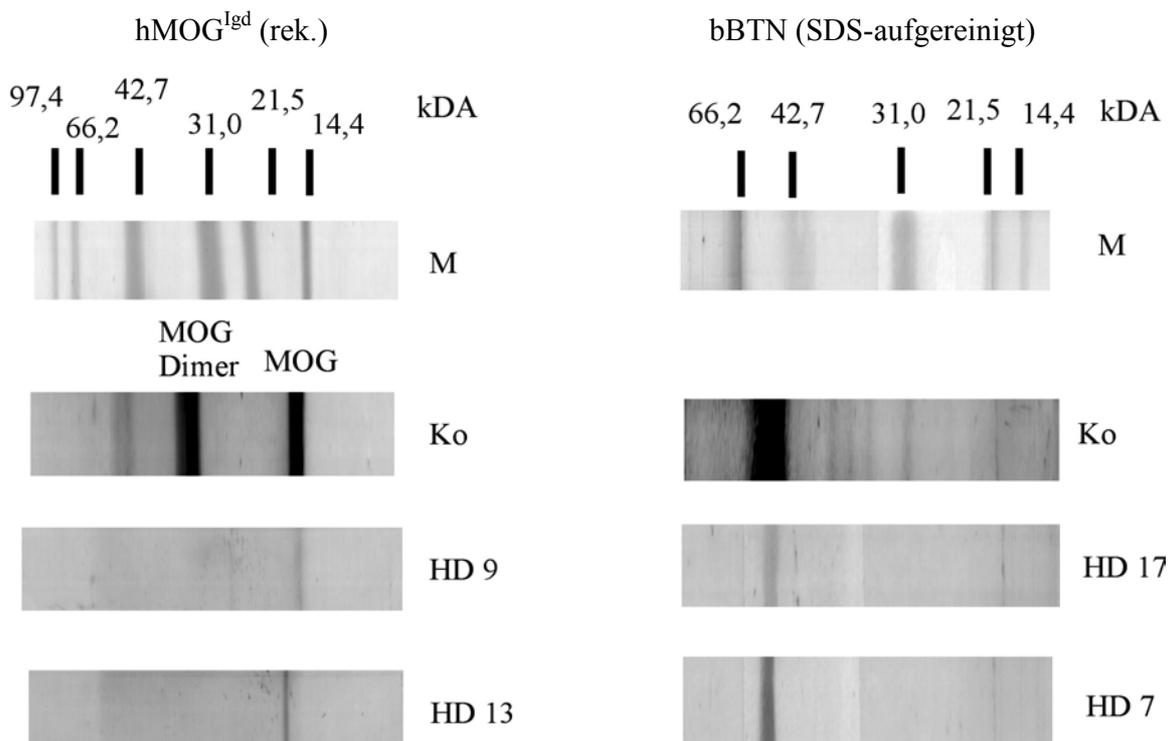


Abbildung 12

Screening-Untersuchung auf den Gehalt an Antikörpern gegen das entsprechende Antigen mittels Western-Blot-Analyse

M Proteinstandard Ko Kontrollantikörper

Zu erkennen ist die Schwierigkeit in der Auswertung der Signale, deren Intensität zwischen den einzelnen menschlichen Proben sehr variierte.

Ko ist ein aus immunisierten Tieren aufgereinigter Kontrollantikörper. Darunter sind die Blotstreifen einzelner menschlicher Proben (HD 7, HD 9, HD 13, HD 17) gegen humanes MOG^{Igd} und bovines BTN zu sehen, deren Signalintensitäten sich sehr von einander unterscheiden.

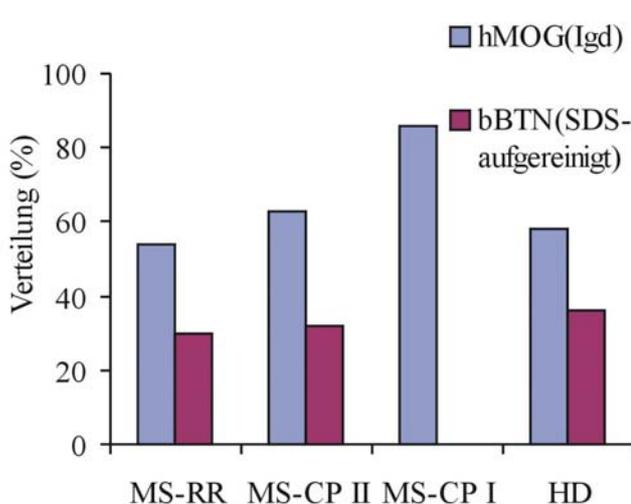


Abbildung 13

Screening-Untersuchung mittels Western-Blot-Analyse

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung positiver Signale durch spezifische Antikörper gegen humanes MOG^{Igd} und bovines BTN (SDS-aufgereinigt) in Seren von MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf (RR), sekundär-chronisch-progressivem (MS-CP II) und primär-chronisch-progressivem (MS-CP I) Verlauf und von gesunden Spendern (HD).

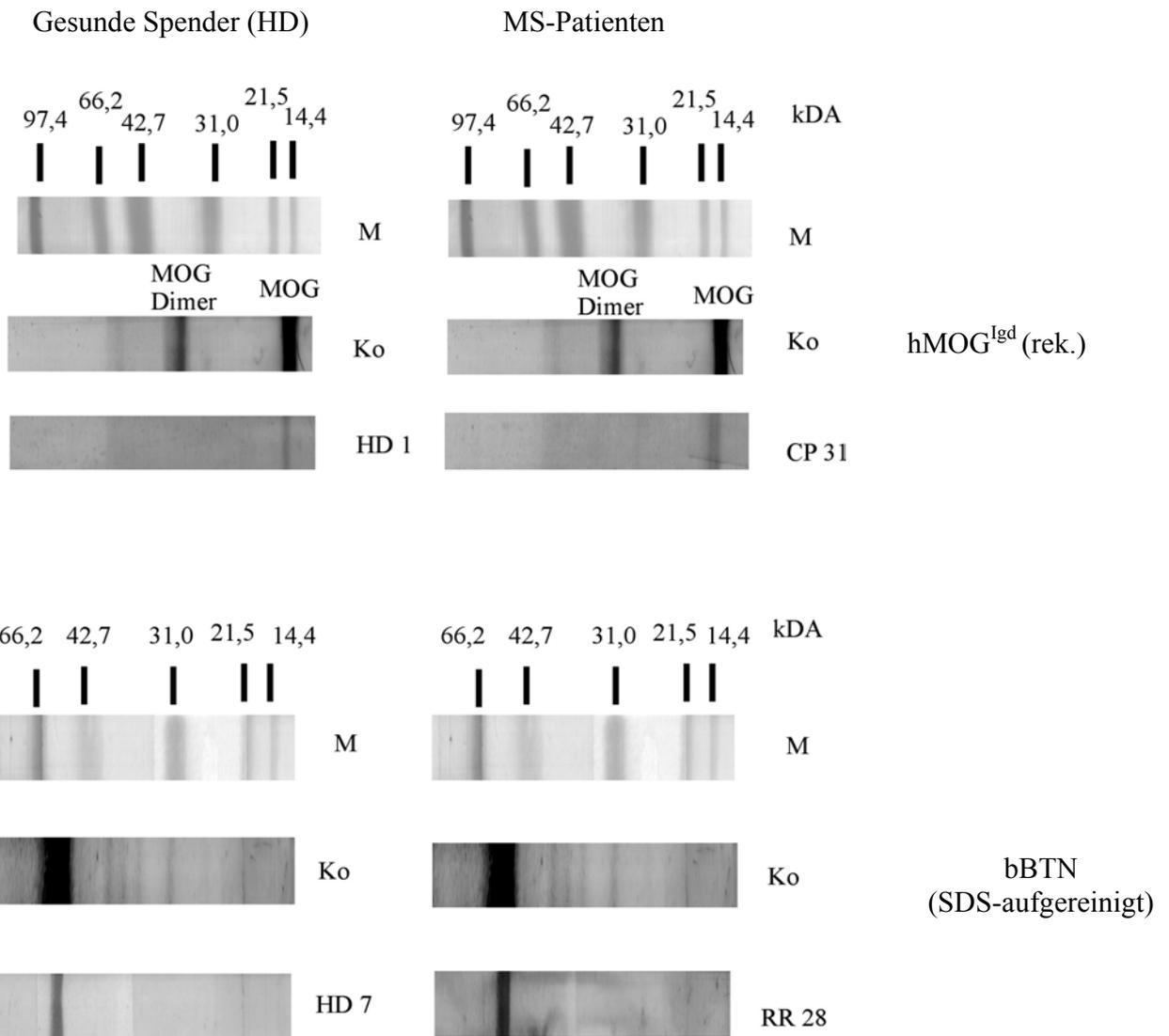


Abbildung 14

Exemplarische Darstellung positiver Signale durch Antikörper im Serum gegen humanes MOG^{Igd} und bovinen BTN in Seren von MS-Patienten (CP 31, RR 28) und gesunden Spendern (HD 1, HD 7) in der Western-Blot-Analyse
M Proteinstandard Ko Kontrollantikörper

Begleitend soll erwähnt werden, dass auch Antikörper gegen die IgV-ähnliche Domäne eines weiteren Proteins der B-7-Familie, BT3.3, in Seren von MS-Patienten (14/61; 22,9%) und gesunden Spendern (13/29; 44,8%) festgestellt wurden. Dies war eine ähnliche prozentuale Verteilung, wie bei der Antwort gegen BTN.

Durch den Nachweis spezifischer Antikörper gegen BTN wurde ein Antigen identifiziert, das auf Grund seiner Homologie zu MOG einen Einfluss auf Immunreaktionen in der MS-Pathogenese haben könnte.

Besonderes Interesse besteht an der ausgeprägten Immunantwort gegen BTN aus der Tatsache, dass BTN ein generell diätetisch umfangreich und regelmäßig zugeführtes Protein ist, und dass BTN und MOG zueinander ein hohes Maß an Homologie (50%) aufweisen. Es ist bekannt, dass MS neben einer genetischen Disposition auch von äußeren Triggerfaktoren abhängig ist. Das gleichzeitige Auftreten spezifischer Immunreaktionen sowohl gegen MOG als auch gegen BTN in einem großen Anteil der untersuchten Gruppen warf die Frage auf, ob es einen immunologischen Zusammenhang zwischen den Immunantworten gegen diese beiden Proteine gibt. Aufgrund der Homologie zwischen BTN und MOG könnte durch molekulares Mimikry eine funktionell wirksame Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN bestehen. Eine wechselseitige Modulation der spezifischen Immunantworten und Auswirkungen auf eine mögliche Autoimmunantwort gegen MOG wären möglich.

3.2 Erfolgreiche Isolation von MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern aus MS-Patienten und gesunden Spendern

Zur Untersuchung der Epitopspezifität von Antikörpern gegen MOG und BTN und deren möglicher Kreuzreaktivität konnten MOG^{Igd}-spezifische Antikörper erfolgreich durch Immunaффinitätschromatographie aus Serum bzw. Plasmapherisat isoliert werden. Der Erfolg der Isolation der spezifischen Antikörper wurde mittels Western-Blot und ELISA überprüft.

Mittels Western-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass nach Isolation der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper das Signal der eluierten Antikörper weit höher war, als das Signal, das nach Inkubation mit dem Serum vor der Isolation der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper erschien. In Abbildung 15 ist der Intensitätsunterschied der Signale in der Western-Blot-Analyse deutlich zu erkennen.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen am Beispiel des Patienten MT die Erfolgsanalyse der Isolation MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper durch ELISA. In Abbildung 16 ist in einer Verdünnungsreihe die Abnahme der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper im Serum des Patienten nach Absorption der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper mittels Immunaффinitätschromatographie zu erkennen. Das Eluat aus der Säule weist hingegen erwartungsgemäß den höchsten Antikörpergehalt auf. In Abbildung 17 ist die Reaktivität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper gegen humanes

MOG^{Igd} und gegen bovines BTN (SDS-aufgereinigt) zu sehen. S.100β wurde dabei als rek. Kontrollantigen mitgeführt.

Die absolute Menge von eluierten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern war sehr gering (etwa 1-10µg pro Elution). Ein Anhaltspunkt für die Proteinkonzentration im Eluat war durch die Höhe des Elutionspeaks (OD_{280nm}) gegeben.

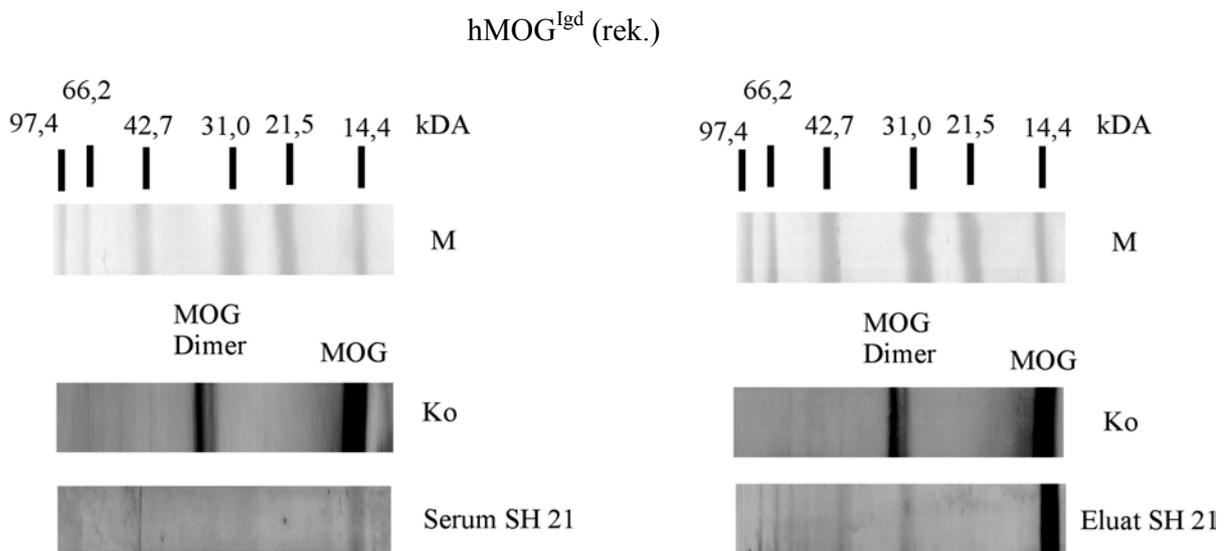


Abbildung 15

**Nachweis der erfolgreichen Isolation von MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot-Analyse
M Proteinstandard Ko Kontrollantikörper**

**Exemplarisch sind ein Eluatsignal und ein Serumsignal gegen humanes MOG^{Igd} dargestellt (Patient SH 21).
Das Eluatsignal zeigt eine deutlich höhere Intensität als das entsprechende Serumsignal des Patienten.**

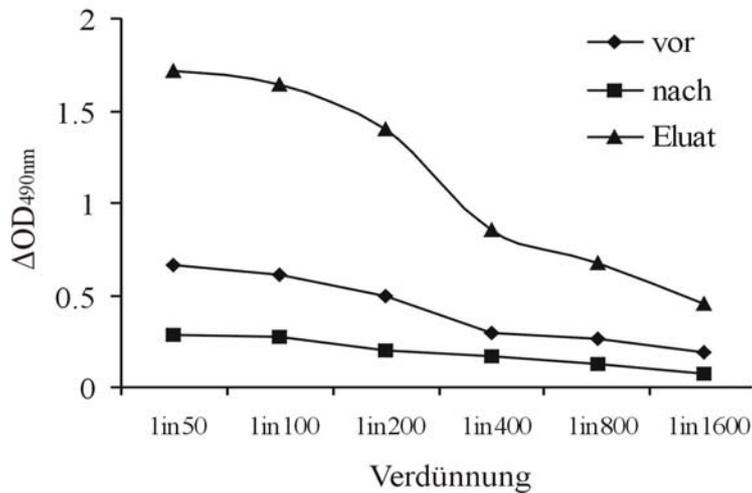


Abbildung 16

Verdünnungsreihe (ELISA) des Serums eines MS-Patienten (MT) vor Absorption (vor) und nach Absorption (nach) der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper mittels Immunaffinitätschromatographie

Der höchste Gehalt an MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern ist im Eluat zu erkennen.

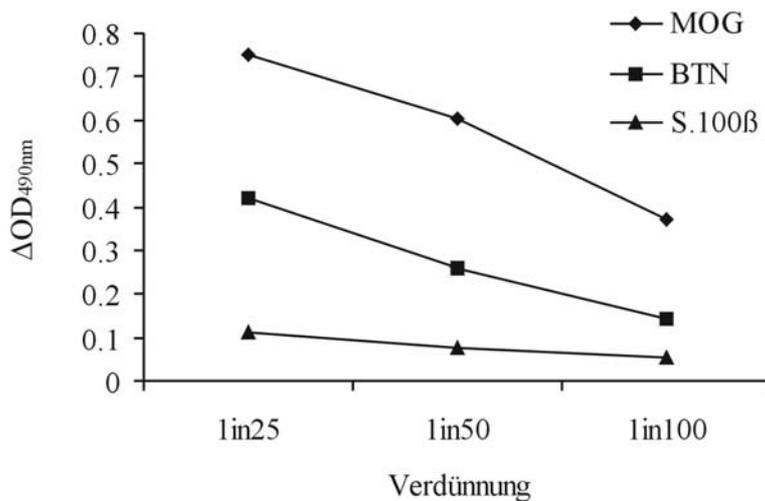


Abbildung 17

Reaktivität von aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern aus dem Serum eines Patienten (MT)

Dargestellt ist eine Verdünnungsreihe (ELISA) gegen humanes MOG^{Igd}, bovines BTN (SDS-aufgereinigt) und S.100β der Ratte (rek. Kontrollantigen).

3.3 Die Epitopspezifität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper ist heterogen bezüglich der MOG^{Igd}-Peptide P1-P9

Die Epitopspezifität der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper wurde anhand der synthetisch hergestellten, sich überlappenden MOG^{Igd}-Peptiden P1-P9 untersucht (Genosys, Cambridge, U.K., Tab. 1).

Es konnte gezeigt werden, dass die Epitopspezifität der Antikörper sehr heterogen war.

Mit Ausnahme von 2 Proben aufgereinigter MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper aus MS-Patienten (MM, #22) erkannten alle Proben der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper 2 oder mehr Peptide. Die aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper aus MS-Patienten erkann-

ten hauptsächlich das MOG^{Igd}-Peptid P1 (12/17; 70,5%) und das MOG^{Igd}-Peptid P6 (15/17; 88,2%). Die aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper aus den gesunden Spendern (HD) erkannten hauptsächlich das MOG^{Igd}-Peptid P2 (6/9; 66,7%) und das MOG^{Igd}-Peptid P6 (6/9; 66,7%).

Die aus der Immunglobulinpräparation von über 2000 gesunden Spendern (Sanglobulin[®]) aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper banden vornehmlich an die MOG^{Igd}-Peptide P1 und P2, in geringerem Ausmaß auch an die MOG^{Igd}-Peptide P5, P6 und P8.

Kein bestimmtes Peptid wurde also spezifisch von aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern aus MS-Patienten oder aus gesunden Spendern (HD, Sanglobulin[®]) erkannt.

Die Ergebnisse der Epitopspezifitäten der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

ΔOD_{490nm} MOG ^{Ig^d} -Peptid												
Patient	Sex	Alter	Verlauf	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
GT	F	28	CP I		++	++	+	++	+	+	+++	+++
MT	F	43	CP I	++	+				+	+++	++	
MM	F	24	CP I						+			
ST	F	27	RR	+		+	+			+		
#19	F	53	CP II	+++					+			
#20	F	28	RR	++		+		+	+++	+	++	+
#22	F	38	RR				+					
#23	F	58	RR	+		+	+		+++			+
#24	F	50	RR	++	+	+++	++	+	+			
#25	F	53	CP II				+	+++	+++		++	+++
#27	F	57	RR	+		+	+	++	+++	+++	+	+++
#28	M	45	RR	+++	+	+			++	+++	++	++
#29	M	54	RR	++	+			+++	+++	+	++	++
#30	M	44	CP II	+	+	+	+		++	+	++	+
#31	M	17	RR	+		+	+		+++	+	+	
#32	F	48	CP II	+	+	++	++	+	+++	++	+	
#33	F	21	RR	+++	+	+++	+	+	+++	++		+
CL	M	45	HD		+++			+				
ASt	M	27	HD		+++	+		++		+		
#01	F	27	HD	+					+++			+
#02	F	24	HD						+			++
#03	M	30	HD	+			+		+			
#04	F	30	HD		+		+					+
#05	M	33	HD	+	+	++	+	+	++			
#06	M	36	HD	+	+	+			+++	++	+++	++
#07	M	39	HD	+++	++	++		+	++	+	+	+
Ig	M/F	-	HD	+++	+++			+	+		+	

Tabelle 2

Epitopspezifitäten der isolierten MOG^{Ig^d}-spezifischen Antikörper (IgG) gegen die MOG^{Ig^d}-Peptide P1-P9 von MS-Patienten (RR schubförmig-remittierend, CP I primär chronisch-progressiv, CP II sekundär chronisch-progressiv), gesunden Spendern (HD), Immunglobulinpräparation (Ig, Sandglobulin[®])

Alle OD_{490nm}-Werte wurden in Duplikaten ermittelt.

+ OD > 0.2 ++ OD > 0.5 +++ OD > 1.0 über Hintergrund (OD nur des 2. Antikörpers)

3.4 Der Verlust von Toleranz gegen MOG ist mit einer kreuzreaktiven Antikörper-Antwort gegen BTN assoziiert.

Um nach den Beobachtungen bezüglich der Epitopspezifität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper zu untersuchen, ob auch auf menschlicher Ebene immunologische Kreuzreaktivität zwischen den N-terminalen IgV-ähnlichen Domänen von MOG und BTN besteht, wurden MOG^{Igd}-spezifische Antikörper von 14 MS-Patienten und 9 anti-MOG seropositiven, gesunden Spendern auf deren Kreuzreaktivität mit BTN getestet. Falls Kreuzreaktivität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper zwischen MOG und BTN nachgewiesen würde, ist von einer Modulation der Auto-Immunantwort gegen MOG durch BTN auszugehen.

Bei diesen Untersuchungen enthielt die Kontrollgruppe einige Labormitarbeiter, die routinemäßig gegen die MOG^{Igd}-Domäne im Labor exponiert waren. Mit der Western-Blot-Methode wurde die Spezifität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper, die aus der MOG^{Igd}-Matrix eluiert worden waren, kontrolliert. Dabei wurde S.100 β aus der Ratte als rekombinant hergestelltes Kontrollantigen verwendet, um eine mögliche Kontamination der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper mit anti-bakteriellen Antikörpern auszuschließen. Mittels ELISA-Methode wurde die Spezifität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper bestätigt und weiter analysiert.

Die aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Auto-Antikörper erkannten nicht nur MOG^{Igd}, gegen das sie ursprünglich gerichtet waren, sondern auch einige verschiedene BTN^{Igl}-Peptide (Tab. 3). Durch dieses Ergebnis konnte Kreuzreaktivität zwischen MOG^{Igd} und BTN^{Igl} direkt nachgewiesen werden. Die Epitopspezifität der kreuzreaktiven Antikörper-Antwort war heterogen und variierte zwischen den Patienten.

Die MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper, die aus MS-Patienten aufgereinigt wurden, zeigten bezüglich der Erkennung der BTN^{Igl}-Peptide P1-P9 klare Unterschiede zu den MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern, die aus gesunden Spendern aufgereinigt wurden.

Besonders auffällig war dabei, dass die Frequenz der Spender mit einer kreuzreaktiven Antikörper-Antwort gegen BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) in der Gruppe der MS-Patienten (6/14; 42,9%) höher war als in der Gruppe der gesunden Spender, in der nur ein positives Ergebnis gegen BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) (1/9; 11,1%) auftrat (Tab. 3). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Fisher-Exact-Test $p > 0,05$). Im Gegensatz dazu waren MOG^{Igd}-spezifische Antikörper, die BTN₁₋₂₆ (P1) und BTN₁₄₋₃₉ (P2) erkannten, in etwa der gleichen prozentualen Verteilung bei MS-Patienten (9/14; 64%) und gesunden Spendern (7/9; 78%) vorhanden (Tab. 3; Fisher-Exact-Test $p > 0,05$).

Donor	Sex	Age	Course	MOG ^{Igd}	ΔOD_{490nm}								
					BTN ^{IgI} -Peptid								
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
GT	F	28	P	1.95	-	0.26	-	-	-	0.47	-	-	-
MT	F	43	P	2.35	-	-	0.52	-	-	-	0.51	-	2.41
#19	F	53	SCP	2.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#20	F	28	RR	2.66	0.14	-	-	-	1.03	0.14	1.01	-	-
#23	F	58	RR	2.88	-	-	-	-	0.42	-	-	-	-
#24	F	50	RR	2.43	0.32	0.76	0.27	-	-	-	0.27	-	-
#25	F	53	SCP	1.95	-	-	-	-	-	-	0.28	-	-
#27	F	57	RR	2.67	-	0.38	0.19	-	0.17	0.08	0.93	0.21	-
#28	M	45	RR	2.86	-	0.17	-	-	0.41	-	-	-	-
#29	M	54	RR	2.31	0.25	-	-	-	0.20	-	-	-	-
#30	M	44	SCP	2.50	0.10	0.11	-	-	-	0.05	0.06	-	-
#31	M	17	RR	2.69	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-
#32	F	48	SCP	2.83	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-
#33	F	21	RR	2.73	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-
CL*	M	46	HD	1.29	0.48	0.30	-	0.14	0.62	0.19	-	-	-
Ast*	M	29	HD	1.01	-	0.86	-	-	1.81	0.61	-	-	-
#01	F	27	HD	2.10	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-
#02	F	24	HD	0.97	0.12	-	-	-	0.08	-	-	-	-
#03	M	30	HD	1.34	-	0.23	-	-	-	-	-	-	-
#04	F	30	HD	0.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#05*	M	33	HD	2.32	-	0.39	-	-	0.12	-	-	-	-
#06*	M	36	HD	1.75	-	0.82	-	-	-	-	0.39	0.21	-
#07	M	39	HD	2.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3

Kreuzreaktivität von immungereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern mit BTN^{IgI}-Peptiden

MOG^{Igd}-spezifische Antikörper wurden aus Serum/Plasmapherisat von 14 MS-Patienten und 9 seropositiven, gesunden Spendern durch Immunaffinitätschromatographie isoliert und mittels ELISA analysiert. Durch * sind die gesunden Spender gekennzeichnet, die im Labor gegen MOG^{Igd} exponiert waren. Die angegebenen OD_{490nm}-Werte wurden aus Duplikaten ermittelt und sind für den Hintergrund (unspezifische Bindungen gegen BSA-beschichtete Platten) korrigiert (ΔOD_{490nm}).

Es stellte sich die Frage, ob durch die Exposition gegen MOG^{Igd} im Labor die prozentuale Verteilung von seropositiven, gesunden Spendern (Lindert et al., 1999) künstlich erhöht wurde und dies zu einem Bias in der Analyse des MOG/BTN kreuzreaktiven Repertoires innerhalb der Kontrollgruppe geführt hat.

Aus diesem Grund wurden zusätzlich MOG^{Igd}-spezifische Antikörper aus einer kommerziell hergestellten Immunglobulin-Präparation (Sandglobulin[®]) von mehreren Tausend gesunden Spendern aufgereinigt. Dadurch stand eine randomisierte Probe von MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern zur Verfügung. MOG^{Igd}-spezifische Antikörpern kommen nur zu einem geringen An-

teil in der Allgemeinbevölkerung vor (Haase et al., 2001). Der Vergleich der Peptide, die von aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern aus drei repräsentativ dargestellten Proben (MS-Patient, Spender 24, Abb. 18a; gesunder Labormitarbeiter, CL, Abb. 18b; Sandglobulin[®], Abb. 18c) erkannt wurden, zeigt, dass eine kreuzreaktive Antwort zwischen den MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern aus dem Immunglobulin-Pool der gesunden Spender (Sandglobulin[®]) und BTN-Peptiden nicht nachzuweisen war. Kreuzreaktivität der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper aus dem MS-Patienten (Spender 24) und dem gesunden Labormitarbeiter (CL) mit BTN-Peptiden war hingegen festzustellen. In allen drei Proben wurde ein ähnliches Reaktivitätsmuster gegen die MOG^{Igd}-Peptide P1-P9 beobachtet (Abb. 18).

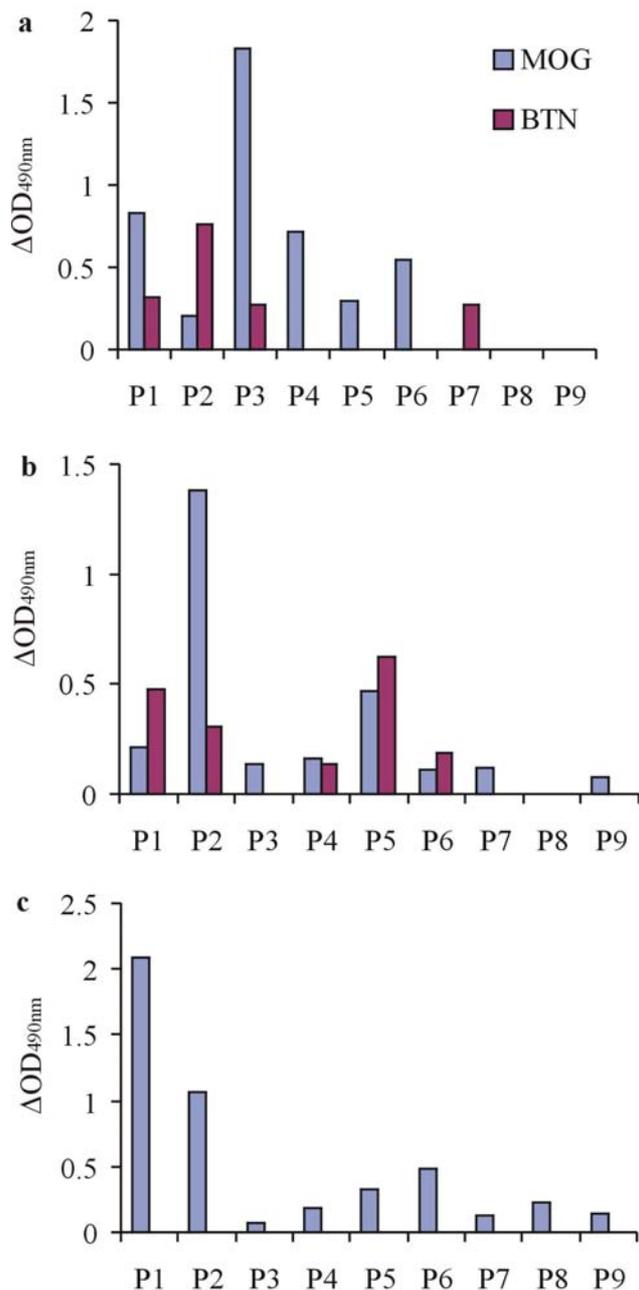


Abbildung 18

Erkennung von MOG und BTN-Peptiden durch aufgereinigte MOG^{Igd}-spezifische Antikörper

Repräsentativ dargestellt ist das Antwortmuster von aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern gegen MOG^{Igd}- und BTN^{Igl}-Peptide aus:

a) MS-Patient (Spender 24)

b) gesunder Spender, im Labor gegen MOG^{Igd}-exponiert (CL)

c) gepoolte, gesunde Spender (Sandglobulin[®])

Es fällt auf, dass die MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper, die aus der kommerziellen Immunglobulin-Präparation (Sandglobulin[®]) isoliert wurden, kein einziges der BTN^{Igl}-Peptide erkennen.

Die OD-Werte wurden in Duplikaten ermittelt und sind für den Hintergrund (unspezifische Bindungen gegen BSA-beschichtete Platten) korrigiert (ΔOD_{490nm}).

3.5 BTN-spezifische Antikörper sind sowohl in MS-Patienten als auch in Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen im ZNS sequestriert

Die Beobachtung, dass MS mit einer erhöhten Kreuzreaktivität zwischen MOG^{Igd} und dem BTN-Peptid P7 (AS 76-100) assoziiert ist, ließ vermuten, dass diese Antwort selektiv im Kompartiment des ZNS sequestriert ist. Darum wurden die Antikörper-Antworten gegen BTN^{Igl} und MOG^{Igd} in gepaarten Liquor-/Serumproben von 35 MS-Patienten (männlich, n=13, Durchschnittsalter 43,8 Jahre im Bereich von 25-60 Jahren; weiblich, n=22, Durchschnittsalter 40,6 Jahre im Bereich von 24-59 Jahren) und 20 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND; männlich, n=7, Durchschnittsalter 48,2 Jahre im Bereich von 28-71 Jahren; weiblich, n=13, Durchschnittsalter 38,3 Jahre im Bereich von 21-55 Jahren) untersucht.

Der Nachweis von Antikörpern gegen ein oder mehrere BTN^{Igl}-Peptide im Liquor diene als Definition für je eine Untergruppe von 15 MS-Patienten (Tab. 4a) und 8 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (Tab. 4b), von denen die meisten mehrere BTN-Peptide erkannten.

Erstaunlicherweise war das Muster der BTN-Peptide, die im Liquor erkannt wurden, völlig unterschiedlich zu dem in den gepaarten Seren (Abb. 19).

In den Serumproben der MS-Patienten war die häufigste Antwort gegen BTN₁₋₂₆ (P1) (15/35; 42,9%) gerichtet, während eine Antwort gegen dieses Peptid in nur 8,6% (3/35) der Liquorproben festzustellen war (Abb. 19a). Dieser Unterschied war signifikant (McNemar-Test $p=0,0033$). Im Gegensatz dazu traten Antworten gegen die anderen BTN^{Igl}-Peptide zu einem höheren Anteil im Liquor auf als im Serum (Abb. 19a). Dies war besonders deutlich für das Peptid BTN₇₆₋₁₀₀ (P7), welches von 80% (12/15) der Untergruppe der MS-Patienten mit konsistent hohen Werten erkannt wurde (OD_{405nm} von 0,20-2,16; Mittelwert=0,54, Tab. 4a). In den Serumproben wurde aber nur in einem dieser Patienten (1/15; 6,7%) eine Antwort gegen dieses Peptid festgestellt (Tab. 4a; Spender 37).

34,3% (12/35) aller MS-Patienten erkannten BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) im Liquor und nur zu 2,9% (1/35) im Serum (Abb. 19a). Dieser Unterschied war signifikant (McNemar-Test $p=0,0026$).

Die Antworten in den Serumproben der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND) zeigten eine ähnliche prozentuale Verteilung. Die häufigste Antwort im Serum war ebenfalls gegen BTN₁₋₂₆ (P1) (6/20; 30%) gerichtet, wohingegen die entsprechende Antwort gegen dieses Peptid im Liquor nur in 15% (3/20) der getesteten Proben festzustellen war (Abb. 19d). Dieser Unterschied war nicht signifikant (McNemar-Test $p>0,05$). Im Liquor wurden vornehmlich die Peptide BTN₆₃₋₈₇ (P6), BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) und BTN₈₉₋₁₁₃ (P8) erkannt. Wie auch bei den MS-Patienten war auch bei den OND-Patienten die Antwort gegen diesen Bereich des Proteins besonders deutlich. Dies bezog sich auch in der Gruppe der OND-Patienten insbeson-

dere auf das Peptid BTN_{76-100} (P7), das von 87,5% (7/8) der OND-Untergruppe erkannt wurde, wenn auch mit insgesamt niedrigeren Werten ($\text{OD}_{405\text{nm}}$ von 0,16-0,33; Mittelwert=0,25%; Tab. 4b) als in der Untergruppe der MS-Patienten (Tab. 4b). In den Serumproben war gegen dieses Peptid keine einzige Antwort nachzuweisen (0/8; 0%; Tab. 4b). 35% (7/20) aller OND-Patienten erkannten BTN_{76-100} (P7) im Liquor und zu 0% (0/20) im Serum (Abb. 19d). Damit ist auch bei den OND-Patienten von einem signifikanten Unterschied auszugehen.

Die offensichtliche Sequestration der Antikörper-Antwort gegen BTN_{76-100} (P7) sowohl bei MS-Patienten als auch bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen lässt vermuten, dass die Antikörpersynthese innerhalb des ZNS-Kompartimentes stattfindet. Diese Annahme wird auch von den jeweiligen Q_{alb} -Werten unterstützt (Tab. 4a, Tab. 4b).

Allerdings sollte diese Interpretation mit Zurückhaltung gesehen werden, da die Seren- und Liquorproben nicht in identischen Verdünnungen getestet wurden (Serum 1in30, Liquor 1in5).

$\Delta OD_{405nm} \text{BTN}^{\text{Igl}}\text{-Peptid}$											
Patient	$Q_{\text{alb}} \times 10^{-3}$		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
10	5.3	Liquor	-	-	-	-	-	-	0.39	-	0.16
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	6.7	Liquor	-	-	-	-	-	-	0.20	-	-
		Serum	-	-	0.21	-	-	-	-	-	-
17	6.1	Liquor	0.32	0.17	-	-	-	0.22	-	-	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	4.4	Liquor	-	-	-	-	0.25	0.15	0.32	0.26	-
		Serum	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-
20	8.0	Liquor	-	-	0.27	0.24	-	-	0.20	0.32	0.29
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	4.9	Liquor	-	0.16	0.10	0.12	0.23	0.29	0.25	0.12	0.33
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	6.5	Liquor	0.47	-	-	-	-	-	0.74	-	-
		Serum	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-
33	5.7	Liquor	-	0.19	0.10	0.17	0.13	0.05	0.26	0.05	0.17
		Serum	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-
34	7.4	Liquor	-	-	0.09	-	-	0.10	0.28	-	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	4.5	Liquor	-	-	-	-	-	-	2.16	-	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	0.89	-	-
40	2.9	Liquor	-	-	0.13	-	-	-	0.55	-	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	4.3	Liquor	-	0.08	0.18	0.08	-	0.09	0.20	0.15	-
		Serum	0.60	-	-	-	-	-	-	-	-
48	12.3	Liquor	-	0.16	0.11	0.36	-	0.21	0.94	0.28	0.10
		Serum	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-
75	4.9	Liquor	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20
		Serum	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
97	4.3	Liquor	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-
		Serum	0.57	-	-	-	-	0.09	-	-	-

Tabelle 4a Untergruppe der MS-Patienten

Antikörper-Antworten gegen BTN^{Igl} sind im Liquor sequestriert.

Die Analyse von 35 gepaarten Serum- und Liquorproben aus MS-Patienten identifizierte eine Untergruppe von Patienten (15/35) mit einer Antwort gegen ein oder mehrere BTN-Peptide im Liquor. Mit Ausnahme der Antwort gegen das Peptid BTN_{1-26} (P1) war die Mehrheit der spezifischen BTN^{Igl} -Peptid-Antworten in der Untergruppe der MS-Patienten auf das ZNS-Kompartiment beschränkt.

Die Serumproben wurden in einer Verdünnung von 1in30, die Liquorproben in einer Verdünnung von 1in5 untersucht.

Eine Antwort wurde als positiv bezüglich einer Immunantwort gewertet, wenn ihr mittlerer OD_{405nm} -Wert für das jeweilige Peptid den Mittelwert der OD_{405nm} -Werte des Hintergrundes (unspezifische Bindungen gegen BSA-beschichtete Platten) um mindestens die zweifache Standardabweichung des Hintergrundes überstieg (Einschlusskriterium, 2.7). Jeder angegebene OD_{405nm} -Wert wurde in Quadruplikaten ermittelt und ist für den Hintergrund korrigiert (ΔOD_{405nm}).

ΔOD_{405nm} BTN ^{IgI} -Peptid											
Patient	Q _{alb} x10 ⁻³		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
27	14,5	Liquor	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	9,9	Liquor	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	4,2	Liquor	-	-	-	-	-	0,19	0,25	0,12	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	4,1	Liquor	0,13	-	-	-	-	-	0,31	0,16	-
		Serum	1,75	-	-	-	-	-	-	-	-
38	6,7	Liquor	0,18	-	-	-	-	0,11	0,33	-	-
		Serum	1,72	-	-	-	0,49	-	-	-	-
43	4,9	Liquor	-	-	0,06	0,07	-	-	0,25	0,06	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	5,6	Liquor	-	-	-	-	-	0,42	0,16	0,15	-
		Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	4,7	Liquor	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-
		Serum	0,60	-	-	-	-	-	-	-	0,15

Tabelle 4b Untergruppe der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND)

Antikörper-Antworten gegen BTN^{IgI} sind im Liquor sequestriert.

Die Analyse von 20 gepaarten Serum- und Liquorproben aus Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND) identifizierte eine Untergruppe von Patienten (8/20) mit einer Antwort gegen ein oder mehrere BTN^{IgI}-Peptide im Liquor. Wie bei der Untergruppe der MS-Patienten sind die BTN-Peptid-spezifischen Antworten in der Untergruppe der OND-Patienten mit Ausnahme der Antwort gegen das Peptid BTN₁₋₂₆ (P1) fast ausschließlich auf das ZNS-Kompartiment beschränkt.

Die Serumproben wurden in einer Verdünnung von 1in30, die Liquorproben in einer Verdünnung von 1in5 untersucht.

Eine Antwort wurde als positiv bezüglich einer Immunantwort gewertet, wenn ihr mittlerer OD_{405nm}-Wert für das jeweilige Peptid den Mittelwert der OD_{405nm}-Werte des Hintergrundes (unspezifische Bindungen gegen BSA-beschichtete Platten) um mindestens die zweifache Standardabweichung des Hintergrundes überstieg (Einschlusskriterium, 2.7). Jeder angegebene OD_{405nm}-Wert wurde in Quadruplikaten ermittelt und ist für den Hintergrund korrigiert (ΔOD_{405nm}).

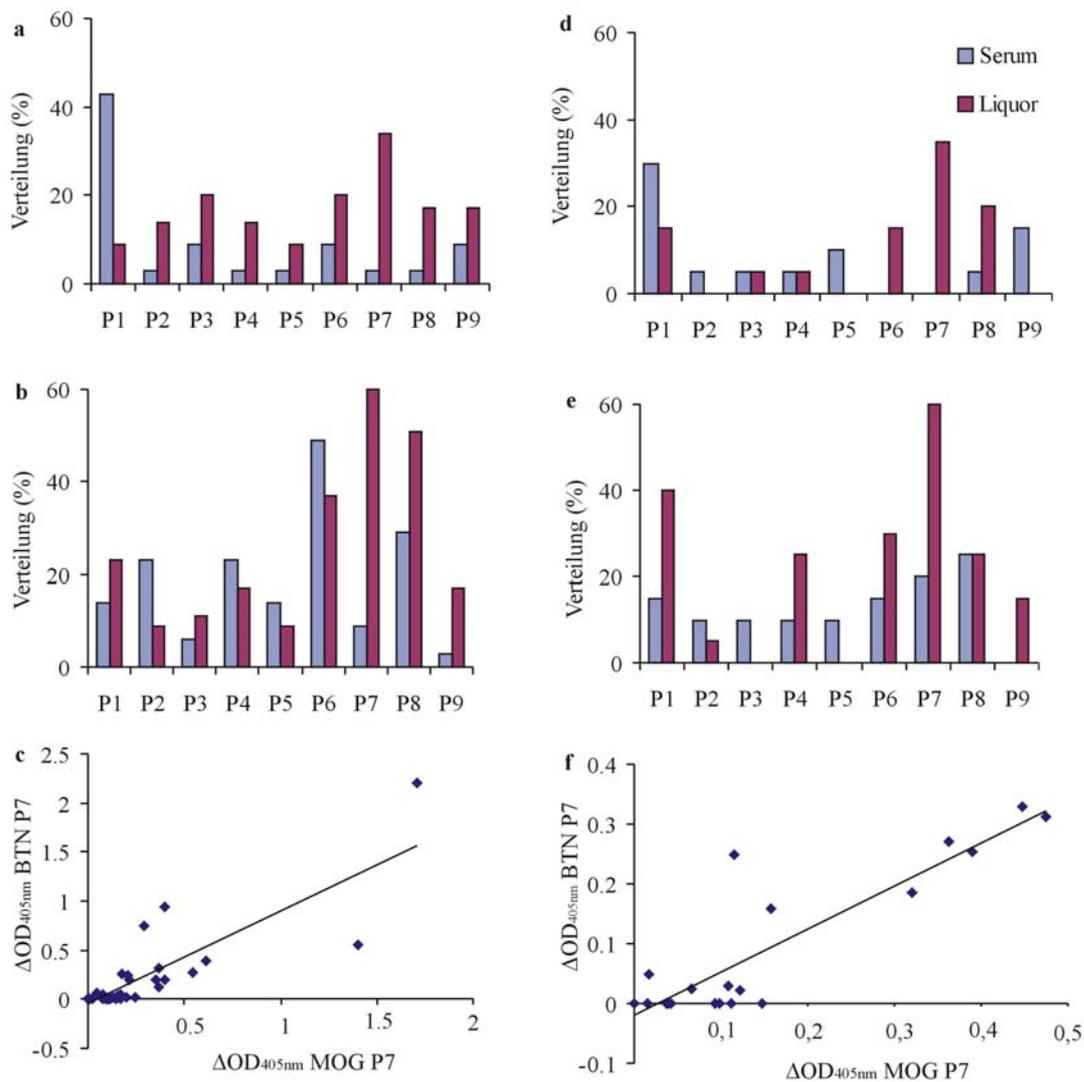


Abbildung 19 Epitopspezifität von Antikörper-Antworten gegen MOG^{Igd} und BTN^{Igl} in Seren und Liquor (gepaarte Proben)

Antikörper Antworten von:
MS-Patienten (n=35)

Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (n=20)

gegen

a) BTN^{Igl}-Peptide
b) MOG^{Igd}-Peptide

d) BTN^{Igl}-Peptide
e) MOG^{Igd}-Peptide

Die Histogramme repräsentieren die prozentuale Verteilung der Spender, die auf das jeweilige Peptid eine Antwort zeigten. Auffällig ist die hohe Verteilung von Antworten im Liquor gegen Peptide, welche die Aminosäuren 76-100 (P7) sowohl von BTN^{Igl} als auch von MOG^{Igd} enthalten, im Vergleich zu den entsprechenden Verteilungen der Antworten im Serum (Signifikanz der Unterschiede unter 3.5 und 3.6).

c) und f) zeigen den Vergleich der ΔOD_{405nm} -Werte der Antikörper-Antworten der 35 MS-Patienten (c) Regressionskoeffizient = 0,69) und der 20 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (f) Regressionskoeffizient = 0,78) gegen MOG₇₆₋₁₀₀ und BTN₇₆₋₁₀₀ im Liquor.

Eine Antwort wurde als positiv bezüglich einer Immunantwort gewertet, wenn ihr mittlerer OD_{405nm}-Wert für das jeweilige Peptid den Mittelwert der OD_{405nm}-Werte des Hintergrundes (unspezifische Bindungen gegen BSA-beschichtete Platten) um mindestens die zweifache Standardabweichung des Hintergrundes überstieg (Einschlusskriterium, 2.7). Jeder angegebene OD_{405nm}-Wert wurde in Quadruplikaten ermittelt und ist für den Hintergrund korrigiert (ΔOD_{405nm}).

3.6 Antikörper-Antworten gegen MOG^{Igd}- und BTN^{Igl}-Peptide co-segregieren im ZNS in MS-Patienten und in Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen

Die Beobachtung, dass eine Untergruppe von Patienten durch hohe Werte von potentiell kreuzreaktiven BTN₇₆₋₁₀₀-spezifischen Antikörpern in deren Liquor charakterisiert ist, ließ vermuten, dass dieses Phänomen in situ durch homologe MOG-Peptide angetrieben wird. Es war nicht möglich, diese Hypothese direkt zu überprüfen, da naturgemäß nicht genügend Liquor zur Verfügung steht, um Antikörper durch Immunaffinitätschromatographie aus Liquor aufzureinigen. Jedoch ist davon auszugehen, dass Antikörper-Antworten gegen BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) und MOG₇₆₋₁₀₀ (P7) innerhalb des ZNS co-segregieren, falls eine signifikante Kreuzreaktivität zwischen diesen beiden Peptiden besteht.

Der Vergleich von Antikörper-Antworten gegen MOG^{Igd}-Peptiden und den homologen BTN-Peptiden im Serum und Liquor zeigte, dass dies tatsächlich der Fall war (Abb. 19). Die Antikörper-Antwort gegen MOG^{Igd}-Peptide war in beiden Kompartimenten heterogen, wie dies bereits im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde (auch Haase et al., 2001), aber es war offensichtlich, dass Antworten im Liquor gegen diejenigen Peptide überrepräsentiert waren, die innerhalb der carboxy-terminalen-Domäne des Proteins (P7-P9) lagen (Abb. 19). Auch für die MOG^{Igd}-Peptide war dies am deutlichsten für die Antikörper-Antwort gegen die Peptide der Aminosäuresequenz 76-100 (P7). Dies war der Fall sowohl in der Gruppe der MS-Patienten (entsprechend 3.5) als auch in der Gruppe der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND, entsprechend 3.5).

Innerhalb der Gruppe der MS-Patienten wurden Antikörper gegen MOG₇₆₋₁₀₀ (P7) in 60% (21/35) der Liquorproben nachgewiesen, aber nur in 8,6% (3/35) der Serumproben (Abb. 19b). Dieser Unterschied war signifikant (McNemar-Test $p=0,0001$) und stellte das gleiche Verteilungsmuster dar, wie es bereits für das homologe BTN-Peptid (BTN₇₆₋₁₀₀, P7) gezeigt wurde (Abb. 19a). Die Konkordanz von Antikörper-Antworten gegen MOG₇₆₋₁₀₀ (P7) und BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) war dementsprechend hoch (Regressionskoeffizient = 0,69; Abb. 19c). Aufgrund dieser Ergebnisse ist bei MS-Patienten von einer selektiven Co-Stimulation bzw. Co-Segregation dieser Antikörper-Antworten im ZNS auszugehen.

Ähnlich verhielt sich auch die prozentuale Verteilung der Antworten gegen die MOG^{Igd}-Peptide in den Liquorproben der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen. In 60% (12/20) der Liquorproben wurden Antikörper gegen MOG₇₆₋₁₀₀ nachgewiesen, wohingegen dies nur in 20% (4/20) der Serumproben der Fall war (Abb. 19e). Dieser Unterschied war signifikant (McNemar-Test $p=0,0433$). Dies entsprach der hohen Antwortrate gegen das homologe BTN-Peptid (BTN₇₆₋₁₀₀, P7), wobei gegen dieses Peptid im Serum der OND-Patienten gar keine Antwort festzustellen war (Abb. 19d). Auch die hohe Konkordanz (Regressionskoeffizient = 0,78) von Antikörper-Antworten gegen MOG₇₆₋₁₀₀ (P7) und BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) innerhalb der Gruppe der OND-Patienten entsprach größenordnungsmäßig derjenigen, die für die Gruppe der MS-

Patienten ermittelt wurde. Diese Ergebnisse machen eine selektive Co-Stimulation oder Co-Segregation dieser Antikörper-Antworten im ZNS auch bei OND-Patienten wahrscheinlich (Abb. 19f).

3.7 Butyrophilin (BTN) ist ein allgemein verbreitetes Umweltantigen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Kreuzreaktivität zwischen MOG^{IgD}-spezifischen Antikörpern und BTN vermehrt bei Patienten mit MS im Vergleich zum MOG^{IgD}-reaktiven Antikörper-Repertoire der Allgemeinbevölkerung besteht (3.4). Jedoch blieb ungeklärt, ob diese kreuzreaktiven Antworten mit einem generalisierten Toleranzverlust gegen BTN assoziiert war, der sich nur auf MS-Patienten bezog.

Um diese Fragestellung zu klären, wurde die BTN-Antikörper-Antwort in den Seren der 35 MS-Patienten (männlich, n=13, Durchschnittsalter 43,8 Jahre im Bereich von 25-60 Jahren; weiblich, n=22, Durchschnittsalter 40,6 Jahre im Bereich von 24-59 Jahren) mit einer Kohorte von 25 gesunden Spendern (HD, männlich, n=9, Durchschnittsalter 35,3 Jahre im Bereich von 28-41 Jahren; weiblich, n=16, Durchschnittsalter 35 Jahre im Bereich von 24-56 Jahren) und einer weiteren Kohorte von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND, männlich, n=7, Durchschnittsalter 48,2 Jahre im Bereich von 28-71 Jahren; weiblich, n=13, Durchschnittsalter 38,3 Jahre im Bereich von 21-55 Jahren) verglichen. Dabei fanden die gesamte exoplasmatische Domäne von bovinem BTN (BTN^{exo}, AS 1-216) und die überlappenden Peptide von BTN^{IgI} als Antigene Verwendung.

Die Verteilung der anti-BTN^{exo} seropositiven Spender lag bei über 70% in allen drei Gruppen (MS: 31/35; 88,6%; HD: 22/25; 88%; OND: 15/20; 75%), und es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Mittelwert der Antikörper-Antworten (Abb. 20a; MS, Mittelwert OD_{405nm}=0,43; HD, Mittelwert OD_{405nm}=0,54; OND, Mittelwert OD_{405nm}=0,51; t-Test p>0,05).

Wie sich dies auch schon bei der Screening-Untersuchung (3.1) zeigte, bestätigte sich auch hier die Beobachtung, dass BTN ein allgemeines Umweltantigen darstellt, gegen das eine zirkulierende Antikörper-Antwort im Serum von sowohl MS-Patienten als auch von gesunden Spendern und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen gerichtet ist.

Die Gesamtverteilung der Antworten, die die einzelnen BTN^{IgI}-Peptide erkannten, war jedoch niedriger (Abb. 20b). Dies war wahrscheinlich der Fall, weil die verwendeten Peptide im Gegensatz zu BTN^{exo} nur die N-terminale Region (IgI-Region, AS 1-120) der exoplasmatischen Domäne von BTN beinhalten. 54,3% (19/35) der MS-Patienten, 76% (19/25) der gesunden Spender und 40% (8/20) der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen erkannten ein oder mehrere BTN^{IgI}-Peptide. Sowohl bei den MS-Patienten als auch bei den gesunden Spendern und den Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen war die immundominante

BTN^{IgI}-Antwort in den Serumproben gegen BTN₁₋₂₆ (P1) gerichtet. Jedoch zeigte das Muster der Antworten gegen den C-terminalen Bereich von BTN^{IgI} (P6-P9) eine unterschiedliche prozentuale Verteilung zwischen den MS-Patienten, den gesunden Spendern und den Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen.

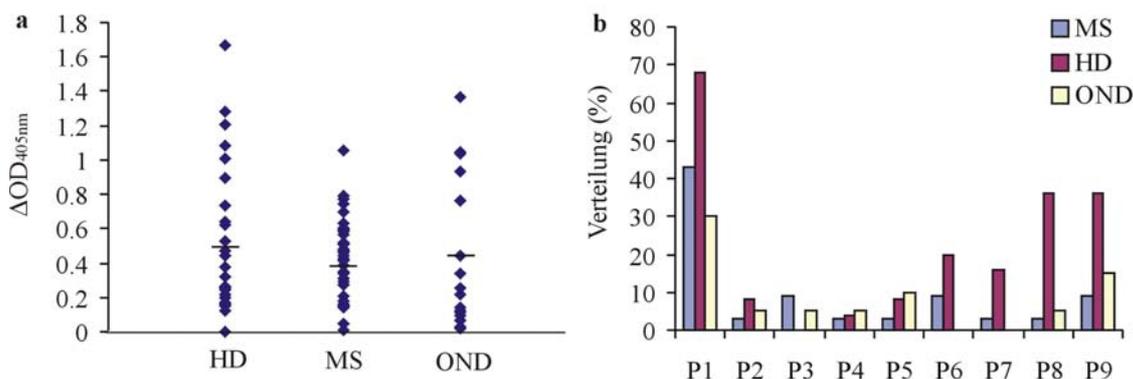


Abbildung 20

Antikörper-Antworten gegen BTN in Seren von:
 MS-Patienten
 HD gesunden Spendern
 OND Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen

a) Die Antikörper-Antworten gegen die gesamte exoplasmatische Domäne von BTN (BTN^{exo}, rek.) wurden in Seren von MS-Patienten (n=35), gesunden Spendern (n=25) und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (n=20) durch ELISA ermittelt. Die prozentuale Verteilung von seropositiven Spendern lag bei den gesunden Spendern bei 88% (22/25), in der Kohorte der MS-Patienten bei 88,6% (31/35) und in der Gruppe der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen bei 75% (15/20). Die Mittelwerte aller OD_{405nm}-Werte für die drei Gruppen werden durch horizontale Balken angezeigt und erreichten keinen statistisch signifikanten Unterschied (MS, 0,43; HD, 0,54; OND, 0,51; t-Test p>0,05). Die Antwort eines Spenders (HD) überstieg >2,5 OD_{405nm}-Einheiten, ist nicht in der Abbildung dargestellt und ging auch nicht in die Berechnung des Mittelwerts aller OD-Werte dieser Gruppe ein.

b) Die prozentuale Verteilung der Antikörper-Antworten gegen BTN^{IgI}-Peptide in Seren von MS-Patienten (n=35), gesunden Spendern (n=25) und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (n=20) wurde durch ELISA unter Verwendung der synthetisch hergestellten, sich überlappenden BTN^{IgI}-Peptide (Tab. 1) ermittelt.

Eine Antwort wurde als positiv bezüglich einer Immunantwort gewertet, wenn ihr mittlerer OD_{405nm}-Wert für das jeweilige Peptid den Mittelwert der OD_{405nm}-Werte des Hintergrundes (unspezifische Bindungen gegen BSA-beschichtete Platten) um mindestens die zweifache Standardabweichung des Hintergrundes überstieg (Einschlusskriterium, 2.7). Jeder angegebene OD_{405nm}-Wert wurde in Quadruplikaten ermittelt und ist für den Hintergrund korrigiert (ΔOD_{405nm}).

4. Diskussion

4.1 Nachweis MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper sind ein Hinweis auf eine Auto-Immunreaktion gegen das ZNS und sprechen für eine Auto-Immunpathogenese der MS. MOG konnte auch in experimentellen Studien an Tiermodellen für MS als ein wichtiges Zielantigen von Auto-Immunantworten identifiziert werden.

Frühere Studien mittels ELISA und Western-Blot identifizierten bereits spezifische Antikörper gegen die extrazelluläre IgV-ähnliche Domäne von MOG (MOG^{Igd}) in Seren von MS-Patienten wie auch in Seren von Patienten mit nicht-demyelinisierenden neurologischen Erkrankungen und von gesunden Spendern (Karni et al., 1999; Reindl et al., 1999; Lindert et al., 1999; Diaz-Villoslada et al., 1999). Es ist überraschend, dass MOG^{Igd}-spezifische Antikörper nicht erkrankungsspezifisch sind, da die anti-MOG-Antikörper-Antwort sowohl in Ratten als auch in nicht-humanen Primaten-Modellen der EAE hoch pathogen ist, und zwar durch die Induktion einer demyelinisierenden Immunpathologie, die der Pathologie der MS sehr ähnlich ist (Genain et al., 1995; Storch et al., 1998; Genain et al., 1999; Raine et al., 1999).

Die Epitopspezifität der humanen anti-MOG-Antikörper-Antwort wurde mittels isolierter MOG^{Igd}-spezifischer Antikörper analysiert, um möglicherweise durch Immunantworten gegen bestimmte Epitope von MOG^{Igd} eine Erkrankungsspezifität von MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern identifizieren zu können.

4.2 Aspekte der heterogenen Epitopspezifität der MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper

Die ELISA-Analyse unter Verwendung von synthetischen MOG^{Igd}-Peptiden (Tab. 1) zeigte, dass die Epitopspezifität der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper heterogen ist. Dies ist eine Beobachtung, die mit Ergebnissen aus Tierversuchen nach Immunisierung mit MOG einhergeht (Litzenburger et al., 1998).

In der vorliegenden Studie erkannte jeder Spender multiple Epitope der linearen MOG^{Igd}-Peptide, und es konnte keine Antwort gegen bestimmte MOG^{Igd}-Epitope identifiziert werden, die krankheitsspezifisch war. Es bleibt ungeklärt, ob eine Vergrößerung der Kohortenanzahlen oder alternativ auch kürzere Peptide eine MS-spezifische Antwort identifizieren würden. Dies wird aber als unwahrscheinlich angesehen, weil viele pathogene MOG-spezifische Antikörper aus der Maus Epitope nur konformationsabhängig erkannten, und deren Antworten durch ELISA mit synthetischen Peptiden nicht identifiziert werden konnten (Brehm et al., 1999). MOG₇₆₋₁₀₀

(P7) wurde aber dennoch von einigen demyelinisierenden MOG-spezifischen monoklonalen Antikörpern aus der Maus erkannt (Brehm et al., 1999).

Es kann gefolgert werden, dass möglicherweise demyelinisierende spezifische Antikörper gegen die IgV-ähnliche Domäne (Igd) von MOG (MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper) nur in einer Untergruppe von MS-Patienten vorhanden sind, die in dieser Studie nicht erfasst wurde. Die Sequestration von MOG-spezifischen Antikörpern im ZNS, wie sie in der EAE berichtet wird (Lington and Lassmann, 1987), könnte die Konzentration von Antikörpern bestimmter Spezifität im Serum stark reduzieren und damit deren Nachweis erheblich erschweren.

Antikörper, die lineare MOG^{Igd}-Epitope erkennen, könnten jedoch eine andere Rolle in der Immunpathogenese der MS spielen. Das Konzept, dass MOG^{Igd}-spezifische Antikörper, die lineare Peptide erkennen, nicht direkt an der Immunpathogenese der Demyelinisierung beteiligt sind, wird sowohl durch klinische als auch durch experimentelle Ergebnisse unterstützt. Klinisch beeinflusst eine Therapie mit hohen Dosen von intravenösen Immunglobulinen die MS positiv (Fazekas et al., 1997), obwohl in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass therapeutisch eingesetzte Immunglobulin-Präparationen auch MOG^{Igd}-Peptid-reaktive Antikörper enthalten. Gegen deren direkte Beteiligung an der Immunpathogenese der Demyelinisierung spricht, dass MOG-spezifische Antikörper aus der Maus, die Demyelinisierung in der EAE vermitteln, Epitope konformationsabhängig erkennen (Brehm et al., 1999).

MOG^{Igd}-spezifische Antikörper, die lineare MOG^{Igd}-Epitope erkennen, könnten gegen Epitope gerichtet sein, die während der Degradierung des Myelins bei Demyelinisierungsvorgängen dem Immunsystem zugänglich werden. Für eine solche Annahme spricht, dass MOG-Peptid-reaktive Antikörper mit Myelin-Debris in MS-Läsionen assoziiert wurden (Genain et al., 1999; Raine et al., 1999). Solche Antikörper könnten Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose von Myelin-Debris durch Makrophagen unterstützen (Prineas and Graham, 1981) und damit die Reparation von Läsionen durch eine Potenzierung der Abräumung von Myelin-Debris positiv beeinflussen (Karni et al., 1999).

Es ist aber davon auszugehen, dass die entsprechenden MOG^{Igd}-Peptid-spezifischen B-Zellen auch als sehr effiziente Antigen-präsentierende Zellen wirken, die möglicherweise in ihrer Funktion eine enzephalitogene und damit pathogene T-Zell-Antwort gegen MOG verstärken (Genain et al., 1999; Liang and Mamula, 2000).

4.3 Die Bedeutung der kreuzreaktiven Immunantwort gegen MOG und BTN

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Auto-Immunantwort gegen MOG – ein Kandidat für Antikörper und T-Zell vermittelte Auto-Aggression in MS – mit dem Milch-Protein BTN kreuzreagiert.

Die Ätiologie von einigen gewebsspezifischen, komplexen Vorgängen, denen eine Auto-Immunpathogenese zu Grunde liegt, schliesst die Modulation des Auto-Immunrepertoires durch Umweltantigene ein (Karjalainen et al., 1992; Conlon et al., 1999). Aber deren Identität und Wirkungsart ist nicht geklärt.

Immunologische Kreuzreaktivität (molekulares Mimikry, 1.8) gegen Auto-Antigene, die durch mikrobielle Peptide getriggert ist, wird als ein Mechanismus angesehen, der Selbst-Toleranz gegen ZNS-Myelin-Antigene durchbrechen kann und damit Auto-Aggression in MS auslöst (Conlon et al., 1999). Die Ausweitung dieses Konzeptes auf verbreitete Antigene aus der Ernährung führt zu einer Reihe von neuen Perspektiven, die im Kontext von akuten Infektionen irrelevant sind.

Durch den hohen Anteil von gesunden Spendern (HD), MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND), die eine Antikörper-Antwort gegen BTN entwickeln, wird deutlich, dass Milch eine feste Komponente der europäischen Diät ist, die zu einer Immunantwort führen kann. Dies geht mit der Beobachtung von Intoleranz oder Allergie gegen Milch-Proteine (CMPI/CMPIA) bei Kindern und Erwachsenen einher (Host et al., 1995; Pelto et al., 1998; Pelto et al., 1999). Der regelmäßige Verzehr von Milch und Milchprodukten stellt eine Quelle für Peptide dar, die aus BTN stammen können, und die die Darmmukosa passieren und dadurch zu einer Stimulation Antigen-spezifischer Antworten führen können. Dies kann sowohl lokal im Darm-assoziierten-lymphatischen-Gewebe (GALT) geschehen oder auch in peripheren Organen des Immunsystems (Gutgemann et al., 1998). Dabei handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, bei dem normaler Weise orale Toleranz induziert wird; es kommt zu einer systemischen Unterdrückung von pro-inflammatorischen T-Zell-Antworten gegen gelöste diätetische Antigene (Strobel and Mowat, 1998). Die Aufnahme von BTN mit der Nahrung könnte deshalb kreuzreaktive und potentiell enzephalitogene Th1-T-Zell-Antworten gegen MOG unterdrücken, worauf auch die Unterdrückung von MOG-EAE durch transmukosale Behandlung mit BTN-Peptiden hindeutete (Stefflerl et al., 2000).

Jedoch kann orale Toleranz insbesondere durch gastro-intestinale Infektionen aufgehoben werden. Dies führt dann zu einer transienten Expansion von potentiell pathogenen Th1-T-Zell-Antworten gegen diätetisch aufgenommene Antigene führen kann (Barbeau, 1997; Gaboriau-Routhiau and Morceau, 1996). Im Falle von BTN könnte dies zu einer transienten Expansion

von kreuzreaktiven und enzephalitogenen Antworten gegen MOG führen, die eine Exazerbation von Entzündungsvorgängen innerhalb des ZNS bewirken könnten. Zusätzlich ist orale Toleranz in gesäugten Neonaten schwach ausgeprägt (Miller et al., 1994; Strobel, 1996; Strobel and Mowat, 1998), so dass eine frühe Exposition gegen bovines BTN für eine kreuz-reaktive Immunantwort gegen MOG prädisponieren könnte, falls der entsprechende Genotyp dafür vorhanden ist.

Es sollte nicht übersehen werden, dass BTN nicht das einzige Milch-Protein ist, das zu einer Induktion einer Immunantwort gegen Myelin-Auto-Antigene durch molekulares Mimikry führen kann. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass MS mit einem generalisierten Regulationsdefekt der mukosalen Immunität assoziiert ist (Winer et al., 2001). Diese Hypothese wird durch Beobachtungen unterstützt, dass eine Konkordanz von inflammatorischen Darmerkrankungen mit MS (Kimura et al., 2000) besteht, und dass MS und inflammatorische Auto-Immunerkrankungen des Gastrointestinaltraktes bestimmte genetische Prädispositionsloci teilen (Kawahito et al., 1998).

Die Induktion von Antikörper-Antworten gegen diätetische Antigene ist kein seltenes Phänomen, und in der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen BTN in der Mehrheit von MS-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen nachgewiesen. Jedoch wurde eine Kreuzreaktivität zwischen MOG^{IgG}-spezifischen Antikörpern und BTN^{IgG}-Peptiden insbesondere in MS-Patienten oder Spendern beobachtet, die gegen MOG im Labor exponiert waren. Vor dem Hintergrund der fehlenden Kreuzreaktivität der MOG^{IgG}-spezifischen Antikörper aus dem Pool der gesunden Spender (Sandglobulin[®]) lässt dies vermuten, dass in der Allgemeinbevölkerung nur minimale Kreuzreaktivität zwischen dem anti-BTN- und dem intrinsischen anti-MOG-B-Zell-Repertoire besteht.

Selektion, Expansion und wahrscheinlich auch Immunaффinitätsreifung der kreuzreaktiven B-Zell-Klone scheint deshalb von Mechanismen abhängig zu sein, die MOG dem Immunsystem zugänglich machen. Im Falle der Labormitarbeiter könnte dies durch Inhalation von MOG-enthaltenden Aerosolen erfolgen, bei MS-Patienten geschieht dies möglicherweise als eine Folge von Demyelinisierung im ZNS.

Neben dem direkten Nachweis von Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN (3.4) kann aufgrund von Co-Segregation der Antikörper-Antworten gegen MOG- und BTN-Peptide im ZNS (3.6) von Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN ausgegangen werden.

Da die Antikörper gegen MOG- und BTN-Peptide nicht nur von MS-Patienten, sondern auch von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen im ZNS co-segregieren, ist anzunehmen, dass signifikante Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN wahrscheinlich nicht MS-spezifisch ist, sondern auch während des Verlaufes anderer inflammatorischer Erkrankungen im

ZNS mit dem assoziierten Verlust von B-Zell-Toleranz gegen MOG entwickelt wird. Dies wäre immer dann der Fall, wenn MOG dem Immunsystem auf irgendeine Weise zugänglich wird. Dies sollte auch im Zusammenhang gesehen werden, dass MOG-spezifische Antikörper nicht MS-spezifisch auftreten (Karni et al., 1999; Reindl et al., 1999; Lindert et al., 1999; Diaz-Villoslada et al., 1999).

Die funktionellen Konsequenzen der kreuzreaktiven Antikörper-Antwort gegen MOG und BTN ist unklar.

Die Peptid-Spezifität dieser Antwort ist heterogen und wird wahrscheinlich durch den HLA-Klasse-II-Haplotyp des Spenders beeinflusst. Allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, eine bestimmte Peptid-spezifische Antwort zu identifizieren, die mit dem DR-2 Allel assoziiert ist.

Die Analyse mit den aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern identifizierte eine Assoziation zwischen MS und Kreuzreaktivität insbesondere mit BTN₇₆₋₁₀₀ (P7). Vor dem Hintergrund, dass die pathogene demyelinisierende Antikörper-Antwort gegen MOG konformationsabhängig zu sein scheint (Brehm et al., 1999; Haase et al., 2001; von Büdingen et al., 2002), bleibt anzunehmen, dass kreuzreaktive BTN/MOG-Antikörper, die lineare Peptid-Epitope erkennen, eher zur Opsonierung von Myelin-Debris und deren Abräumung aus den Läsionen beschleunigt, als Demyelinisierung zu vermitteln.

Dennoch erkennen einige demyelinisierende MOG-spezifische monoklonale Antikörper aus der Maus MOG₇₆₋₁₀₀ (P7) (Brehm et al., 1999), so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass einige der BTN₇₆₋₁₀₀/MOG₇₆₋₁₀₀-reaktiven Antikörper auch pathogen sind.

Die Anwesenheit von kreuzreaktiven BTN/MOG-Antikörpern in MS-Patienten impliziert auch die Präsenz korrespondierenden B-Zell-Populationen. Darin könnte eine entscheidende Bedeutung für die Auto-Immunantwort gegen MOG liegen, da die spezifischen B-Zellen als effiziente Antigen-präsentierende-Zellen zu einer Erhöhung der Stimulation der MOG-spezifischen T-Zell-Antwort führen könnten (Genain et al., 1999; Liang and Mamula, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte in etwa einem Drittel der Liquorproben sowohl von MS-Patienten (12/35; 34,3%) als auch von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (7/20; 35%) Antikörper gegen BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) nachgewiesen werden, in den gepaarten Serumproben war dies aber nur in einer Probe der MS-Patienten (1/35; 2,9%) und in keiner der OND-Patienten (0/20; 0%) der Fall (signifikante Unterschiede, 3.5). Weiter wurde Co-Segregation von Antikörpern gegen MOG₇₆₋₁₀₀ (P7) und BTN₇₆₋₁₀₀ (P7) innerhalb des ZNS festgestellt (3.6). Diese Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass die Synthese der BTN₇₆₋₁₀₀-spezifischen Antikörper intrathekal stattfindet und durch das homologe MOG-Peptid-Epitop angetrieben wird.

Im Gegensatz dazu wurden keine Hinweise dafür gefunden, dass eine ZNS-Antikörper-Antwort gegen das N-terminale Peptid von BTN (BTN₁₋₂₆) auftritt, obwohl gezeigt werden konnte, dass MOG^{Igd}-spezifische Antikörper mit diesem Peptid kreuzreagieren können und in mehr als 40% der Seren von MS-Patienten und in 30% der Seren von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen vorhanden sind. Die dynamischen Vorgänge zwischen der Antikörper-Antwort gegen unterschiedliche BTN-Epitope unterscheidet sich also zwischen Serum und Liquor. Dies könnte an der schnellen Beseitigung von bestimmten Spezifitäten aufgrund von Bindungsvorgängen an MOG oder an andere Mitglieder der BTN-Protein-Familie innerhalb des ZNS liegen, oder alternativ durch eine schnelle Degradation von kreuzreaktiven MOG-Determinanten, die für die Antreibung intrathekaler Antikörpersynthese notwendigerweise vorhanden sein müssen.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass, obwohl MOG^{Igd}-spezifische Antikörper sowohl in MS-Patienten als auch in gesunden Spendern vorhanden sind, diese Antikörper nicht mit einer bestimmten Peptid-Spezifität für MS-Patienten vorkommen. Das Antwortmuster der aufgereinigten MOG^{Igd}-spezifischen Antikörper war in beiden Gruppen heterogen. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Isolation von MOG^{Igd}-spezifischen Antikörpern aus Serum bzw. Plasmapherisat möglich ist. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit weiterführender Studien bezüglich der humoralen Komponente einer MOG-spezifischen Auto-Immunreaktion auf menschlicher Ebene. Im Rahmen der Screening-Untersuchung wurde gezeigt, dass das Milch-Protein BTN als ein Umweltantigen anzusehen ist, gegen das eine zirkulierende Antikörper-Antwort sowohl im Serum von gesunden Spendern als auch im Serum von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen gerichtet ist. Diese Beobachtung steht vor dem Hintergrund, dass Immunantworten gegen andere Milch-Proteine (CMPI/CMPA) bei Kindern und Erwachsenen bekannt sind (Host et al., 1995; Pelto et al., 1998; Pelto et al., 1999).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass neben der Immunantwort im Serum auch in einer Reihe von Liquorproben aus MS-Patienten und aus Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen eine Antikörper-Antwort gegen BTN besteht. Es wurde nachgewiesen, dass zwischen BTN und MOG molekulares Mimikry besteht, die sich in Form ausgeprägter immunologischer Kreuzreaktivität zwischen diesen beiden Proteinen insbesondere in einer Untergruppe von MS-Patienten äußern könnte. Auch in einer Untergruppe von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen wurden entsprechende Zusammenhänge herausgefunden. Da Milch und Milchprodukte ein fester Bestandteil der westlichen Diät ist, sollte BTN als ein ubiquitär vorhandener Faktor gesehen werden, der die Auto-Immunantwort gegen MOG beeinflussen kann, das als ein wichtiges Auto-Antigen innerhalb des Myelins gilt. Interessanterweise haben auch epidemiologische Studien die Prävalenz von MS mit dem Konsum von Milch und Milchprodukten assoziiert (Butcher, 1986; Malosse et al., 1992; Lauer, 1997). Dies kann aber wohl

nur zum Teil mit dem in der vorliegenden Arbeit erbrachten Nachweis von molekularer Mimikry zwischen MOG und BTN in Verbindung gebracht werden. Die pathophysiologischen Konsequenzen der molekularen Mimikry bezüglich BTN sind nur schwer vorauszusagen, da diese durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden können, die insbesondere den Genotyp und den Gesundheitsstatus des Gastrointestinaltraktes einschließen. Dabei handelt es sich um einen Balanceakt, in dem bestimmt wird, ob sich das molekulare Mimikry zwischen MOG und BTN letztendlich für den einzelnen Patienten nachteilig auswirkt oder nicht.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können sich weitere Erkenntnisse für eine potentielle Auto-Immunpathogenese der MS und deren Modulation ergeben.

4.4 Überlegungen für die Zukunft

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass BTN als ein Umweltantigen anzusehen ist, gegen das eine zirkulierende Antikörper-Antwort sowohl bei MS-Patienten als auch bei gesunden Spendern und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen gerichtet ist, wie das bereits für MOG bekannt ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN besteht, wobei aber Hinweise dafür vorhanden sind, dass diese Kreuzreaktivität nicht spezifisch für MS ist. Aus dem Gesagten ergeben sich einige Überlegungen für die Zukunft.

Die Feinspezifität der MOG- bzw. BTN-spezifischen Antikörper-Antwort wäre weiter zu untersuchen, um möglicherweise mit einer höheren Anzahl innerhalb der Kohorten eine Untergruppe von MS-Patienten definieren zu können, für die ein bestimmtes Antwortmuster spezifisch ist. Dies könnte dann unter Umständen auch mit dem entsprechenden genetischen Hintergrund des HLA-Komplexes der Patienten korreliert werden. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um den ersten Versuch der Etablierung von Kreuzreaktivitätsvorgängen zwischen BTN und MOG auf menschlicher Ebene handelt, konnten diese Fragestellungen bisher nicht ausreichend beantwortet werden.

Falls sich weitergehende Erkenntnisse in diese Richtung ergeben, wäre an eine Studie zu denken, die eine Kohorte von MS-Patienten mit Kuh-Milch-Protein-Allergie/Intoleranz (CMPA/CMPI) oder Laktose-Intoleranz auf deren immunologisches Reaktivitätsmuster gegen BTN und MOG untersucht, da davon auszugehen ist, dass solche Patienten in geringerem Maße als gewöhnlich Milchprodukte und damit BTN mit der Nahrung aufnehmen und oft schon in den ersten Lebensstagen von Milchernährung auf künstliche, milchfreie Ernährung umgestellt werden. Daraus könnten sich Erkenntnisse über die Bedeutung der Modulation der Immunantwort gegen MOG durch BTN bei MS ergeben. Es dürfte schwierig sein, die Aufnahme von

BTN mit der Nahrung anderweitig bemessen zu können, da es sich bei BTN als Bestandteil der Milch um ein sehr verbreitetes Antigen in der Nahrung handelt.

Die funktionellen Konsequenzen von Antikörpern, die zwischen MOG und BTN kreuzreaktiv sind, liegen im Unklaren. Es stellt sich die Frage nach der Pathogenität der Antikörper-Antwort gegen MOG und BTN und damit ihrer funktionellen Bedeutung. Ein Projekt, das die Kreuzreaktivität zwischen MOG und BTN auf tierexperimenteller Ebene sowohl im humoralen als auch im zellulären Bereich des Immunsystems untersucht, könnte Aufschlüsse über die funktionellen Aspekte des immunologischen Zusammenhanges zwischen MOG und BTN ergeben und zu Erkenntnissen darüber führen, welcher Einfluss auf die Immunpathogenese der EAE besteht. In diesem Zusammenhang könnte von besonderer Bedeutung sein, dass orale Toleranz experimentell induziert werden kann (Weiner, 1997; Fattal et al., 2002) und somit eine Induktion von oraler Toleranz gegen BTN möglicherweise einen protektiven, kreuzreaktiven Einfluss auf die Immunantwort gegen MOG hat.

Wie oben erwähnt, ist davon auszugehen, dass pathogen wirkende Antikörper gegen MOG ihr Antigen konformationsabhängig erkennen (Brehm et al., 1999). Da in der vorliegenden Arbeit lineare Peptide und rekombinant hergestellte oder SDS-aufgereinigte Proteine als Antigene verwendet wurden, konnte der Aspekt der Konformationsabhängigkeit der Immunantwort nicht geklärt werden.

Es könnte versucht werden, durch Aufreinigung von Antikörpern mittels Immunaффinitätschromatographie, die BTN bzw. MOG konformationsabhängig erkennen, deren pathologisches Potential auch auf menschlicher Ebene zu untersuchen. Die Verwendung von MOG-transfizierten Zellen, die das Protein in natürlicher Konformation auf ihrer Oberfläche tragen (Brehm et al., 1999), könnten dabei von Bedeutung sein.

Von besonderem Interesse wäre auch die Aufreinigung von Antikörpern, die das Peptid P7 sowohl von MOG als auch von BTN spezifisch erkennen, da sich in der vorliegenden Arbeit Hinweise dafür ergaben, dass dieses Epitop bezüglich einer kreuzreaktiven Immunantwort zwischen MOG und BTN eine herausragende Rolle einzunehmen scheint.

Durch den Nachweis einer zirkulierenden Antikörper-Antwort gegen BTN und MOG sowohl im Serum als auch im Liquor ist die Präsenz der entsprechenden B-Zell-Populationen zu erwarten. Damit besteht über deren Funktion u.a. als Antigen-präsentierende Zellen eine Verbindung zum T-Zell-System. Die Untersuchung der zellulären Komponente der Immunantwort gegen BTN wäre eine weitere Aufgabe. Dabei könnte die Epitopspezifität von T-Zellen untersucht werden, wobei auch hier nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im humoralen Teil des Immunsystems das Peptid P7 von besonderem Interesse sein könnte. Es stellt sich insbesondere die Frage, ob Kreuzreaktivität zwischen BTN und MOG auch auf zellulärer Ebene des Immunsystems besteht.

5. Literaturverzeichnis

Adams D (1996)

How the immunesystem works and why it causes autoimmune diseases.

Immunology today, 1996; 17(7): 300-302

Adams RD, Victor M, Ropper AH (1997)

Principles of Neurology.

Mc-Graw-Hill New York

Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassman H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C (1995)

The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat.

J Neuroimm, 1995; 63: 17-27

Agranoff BW and Goldberg D (1974)

Diet and the geographical distribution of MS.

The Lancet, 1974; 2(7888): 1061-1066

Armitage P and Berry G (1994)

Statistical methods in medical research.

Blackwell-Science-Verlag

Archelos J, Storch M, Hartung HP (2000)

The role of B cells and autoantibodies in MS.

Ann Neurol, 2000; 47(6): 694-706

Ascherio A and Munch M (2000)

Epstein-Barr virus and multiple sclerosis.

Epidemiology, 2000; 11: 220-224

Barbeau WE (1997)

Interactions between dietary proteins and the human system: implications for oral tolerance and food-related diseases.

Advances in Experimental Medicine and Biology, 1997; 415: 183-193

Baumann N and Pham-Dinh D (2001)

Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system.

Physiol Rev, 2001; 81: 871-927

Ben-Nun A, Mendel I, Bakimer R, Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, de Rosbo NK (1996)

The autoimmune reactivity to MOG in MS is potentially pathogenic: effect of copolymer 1 on MOG-induced disease.

J Neurology, 1996; 23(sup 1): 14-22

Benoist C and Mathis D (2001)

Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?

Nat Immunol, 2001; 2(9): 797-801

Berdanier CD (1995)

Diet, autoimmunity, and insulin-dependent diabetes mellitus: a controversy.

Proc Soc Exp Biol Med, 1995; 209: 223-230

Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J (1997)

Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis.

J Mol Med, 1997; 75: 77-88

Besson Duvanel C, Honegger P, Matthieu JM (2001)

Antibodies directed against rubella virus induce demyelination in aggregating rat brain cell cultures.

J Neurosci Res, 2001; 65(5): 446-454

Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF, Martin R (2000)

Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand.

Nat Med, 2000; 6(10): 1167-1175

Bourquin C, Iglesias A, Berger T, Wekerle H, Linington C (2000)

Myelin oligodendrocyte glycoprotein-DNA vaccination induces antibody-mediated autoaggression in experimental autoimmune encephalomyelitis.

Eur J Immunol, 2000; 30: 3663-3671

Bradl and Linington (1996)

Animal models of demyelination.

Brain Pathol, 1996; 6(3): 303-311

Brandt T, Dichgans J, Diener HC (1998)

Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen.

Kohlhammer-Verlag Stuttgart

Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD (1983)

Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with MS.

Arch Neurol, 1983; 40: 406-408

Brehm U, Piddlesden J, Gardinier V, Linington C (1999)

Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human MOG.

J Neuroimmunol, 1999; 97(1-2): 9-15.

Brown W, Le M, Lee E (1994)

Induction of systemic immunologic hyporesponsiveness to ovalbumin in neonatal rats by the enteric administration of peptic fragments of ovalbumin.

Immunol Invest, 1994; 23: 73-83

Budingen HC, Tanuma N, Villoslada P, Ouallet JC, Hauser SL, Genain CP (2001)
Immune response against MOG in EAE demyelination.
J Clin Immunology, 2001; 21(3): 155-170

Butcher PJ (1976)
The distribution of MS in relation to the dairy industry and milk consumption.
N Z Med J, 1976; 83(566): 427-430

Butcher PJ (1986)
Milk consumption and multiple sclerosis: an etiological hypothesis.
Med Hypotheses, 1986; 19(2): 169-178.

Burgoon MP, Owens GP, Smith-Jensen T, Walker D, Gilden DH (1999)
Cloning the antibody response in humans with inflammatory central nervous system disease: analysis of the expressed IgG repertoire in subacute sclerosing panencephalitis brain reveals disease-relevant antibodies that recognise specific measles virus antigens.
J Immunol, 1999; 163: 3496-3502

Cassetta I and Granieri E (2000)
Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytic epidemiology.
J Neurovitol, 2000; 2(sup 6): 147-151

Cendrowski W, Wender M, Dominik Flejsierowicz Z, Owsianowski M, Popiel M (1969)
Epidemiological study of MS in Western Poland.
Europ Neurol, 1969; 2: 90-108

Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schulz ER, Bennet JL, Garber RL, Chang M (1995)
Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis.
PNAS, 1995; 92: 7440-7444

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J-I, Hafler D, Weiner HL (1994)
Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.
Science, 1994; 265: 1237-1240

Chen Y, Inobe J-I, Kuchroo VK, Baron JL, Janeway CA, Weiner HL (1996)

Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: Suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells.

PNAS, 1996; 93: 388-391

Conlon P, Oksenberg JR, Zhang J, Steinman L (1999)

The immunobiology of multiple sclerosis: an autoimmune disease of the central nervous system.

Neurobiology of Disease, 1999; 6(3): 149-166

Cristen J, Willer G, Ebers C (2000)

Susceptibility to MS: Interplay between genes and environment.

Curr Opin Neurol, 2000; 13: 241-247

Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC (1994)

Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire.

Nature, 1994; 371: 389-395

Cyster JG and Goodnow CC (1995)

Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate.

Immunity, 1995; 3(6): 691-701

Davidson AN, Watson CM, Owen SJ, Calder VL (1988)

Nervous and immune system disorders in MS.

Brain, 1988; 2(4): 335-340

Della Gaspera B, Pham-Dinh D, Roussel G, Nussbaum J-L, Dautigny A (1998)

Membrane topology of the myelinoligodendrocyte glycoprotein.

Eur J Biochem, 1998; 258: 478-484

Derfuss T, Gürkov R, Then Bergh FT, Goebels N, Hartmann M, Barz C, Wilkse B, Autenrieth I, Wick M, Hohlfeld R, Meinl E (2001)

Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific response.

Brain, 2001; 124: 1325-1335

de Rosbo NK, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A (1993)

Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis: Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein.

J Clin Investigation, 1993; 92: 2602-2608

de Rosbo NK, Hoffmann M, Mendel I, Yust I, Kaye J, Bakimer R, Flechter S, Abramsky O, MiloR, Karni A, Ben-Nun A (1997)

Predominance of autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domains of MOG is directed against three main regions.

Eur J Immunol, 1997; 27(11): 3059-3069

de Rosbo NK and Ben-Nun A (1998)

T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein.

J of Autoimmunity, 1998; 11(4): 287-299

Diaz-Villoslada P, Shih A, Shao L, Genain CP, Hauser SL (1999)

Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen.

J Neuroimmunol, 1999; 99(1): 36-43

Dittel BN, Urbania TH, Janeway CA Jr (2000)

Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice.

J Autoimmun, 2000; 14(4): 311-8

Dyer CA and Matthieu J-M (1994)

Antibodies to myelin/oligodendrocyte-specific protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein signal distinct changes in the organisation of cultured oligodendroglial membrane sheets.

J Neurochem, 1994; 62: 777-787

Ebers GC (1996)

Genetic epidemiology of MS.

Curr Opin Neurol, 1996; 9: 155-158

Ebers G(1999)

Modelling multiple sclerosis.

Nat Gen, 1999; 23(3): 258-9

Farina C, Then Bergh F, Albrecht H, Meinel E, Yassouridis A, Neuhaus O, Hohlfeld R (2001)

Treatment of multiple sclerosis with copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon- response in blood cells.

Brain, 2001; 123: 705-719

Fattal E, Couvreur P, Pecquet S (2002)

Oral tolerance induced by poly (lactide-co-glycolide) containing B lactoglobulin.

Ann Pharm Fr, 2002; 60(1): 44-49

Fazekas F, Deisenhammer F, Strasser-Fuchs S, Nahler G, Mamoli B (1997)

Treatment effects of monthly intravenous immunoglobulin on patients with relapsing remitting multiple sclerosis: further analyses of the Austrian Immunoglobulin in MS study.

Mult Scler, 1997; 3(2): 137-41

Fujinami RS and Oldstone MB (1985)

Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity.

Science, 1985; 230: 1043-1045

Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997)

Axonal damage in acute multiple sclerosis.

Brain, 1997; 120: 393-399

Gaboriau-Routhiau V, Moreau MC (1996)

Gut flora allows recovery of oral tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin.

Pediatric Research 1996; 39(4 Pt 1): 625-9

Gale CR and Martyn CN (1995)

Migrant studies in multiple sclerosis.

Prog Neurobiol, 1995; 47: 425-448

Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu J-M (1992)

Myelinoligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily.

J Neurosci Res, 1992; 33: 177-187

Gautam AM, Liblau RS, Chelvanayagam G, Steinman L, Boston T (1998)

A viral peptide with limited homology to a self peptide can induce clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis.

J Immunol, 1998; 161: 60-64

Gay D and Esiri M (1991)

Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study.

Brain, 1991; 114: 557-572

Genain CP, Nguyen M-H, Letvin N, Pearl R, Davis RL, Adelman M, Lees MB, Linington C, Hauser SL (1995)

Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate.

J Clin Invest, 1995; 96: 2966-2974

Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999)

Identification of autoantibodies associated with myelin damage in MS.

Nat Med, 1999; 5(2): 170-175

Giovannoni G and Hartung HP (1996)

The immuno pathogenesis of MS and Guillain-Barré syndrome.

Curr Opin Neurol, 1996; 9: 165-177

Göbels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfeld R (2000)

Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence.

Brain, 2000; 123: 508-18

Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A (1989)
Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes.
Nature, 1989; 342: 385-391

Gran B, Hemmer B, Vergelli M, McFarland HF, Martin R (1999)
Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity.
Ann Neurol, 1999; 45: 559-567

Gruen JR, Nalabolu SR, Chu TW, Bowlus C, Fan WF, Goei VL, Wei H, Sivakamasundari R, Liu Y, Xu HX, Parimoo S, Nallur G, Ajioka R, Shukla H, Bray-Ward P, Pan J, Weissman SM (1996)
A transcription map of the major histocompatibility complex (MHC) class I region.
Genomics, 1996; 36: 70-85

Gutgemann I, Fahrner AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH (1998)
Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen.
Immunity, 1998; 8: 667-673

Haase CG, Guggenmos J, Brehm U, Andersson M, Olsson T, Reindl M, Schneidewind JM, Zettl UK, Heidenreich F, Berger T, Wekerle H, Hohlfeld R, Linington C (2001)
The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls.
J Neuroimmunol, 2001; 114: 220-225

Hahn AF (1998)
Guillain-Barré syndrome.
Lancet, 1998; 352: 635-641

Hall RJ, Lee E and Brown WR (1988)
Immunologic outcome of enteric administration of ovalbumin to neonatal rats is anatomic-site specific.
J Pediatr Surg, 1988; 23: 577-582

Hemmer B und Martin R (1998)

Neuroimmunology und Multiple Sklerose.

Aktuelle Neurologie, 1998; 25: 83-95

Henry J, Ribouchon MT, Depetris D, Mattei MG, Offer C, Tazi-Ahnini R, Ponarotti P (1997)

Cloning structural analysis and mapping of the B30 and B multigenic families to MHC.

Immunogenetics, 1997; 46: 383-395

Henry J, Miller MM, Pontarotti P (1999)

Structure and evolution of the extended B7 family.

Immunol Today 1999; 20: 285-288

Hjelmström P, Juedes AE, Fjell J, Ruddle NH (1998)

Cutting edge: B cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitisation.

J Immunol, 1998; 161: 4480-4483

Hjelmström P, Penzotti JE, Henne RM, Lybrand TP (1998)

A molecular model of MOG.

J of Neurochemistry, 1998; 71: 1742-1749

Hohlfeld R, Meinel E, Weber F, Zipp F, Schmidt S, Sotgiu S, Göbels N, Voltz R, Spuler S, Iglesias A, Wekerle H (1995)

The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of MS.

Neurology, 1995; 45(sup 6): 33-38

Hohlfeld R (1997)

Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis: Principles, problems and perspectives.

Brain, 1997; 120: 865-916

Hohlfeld R (1999)

Therapeutic strategies in MS, Immunotherapy.

The Royal Society, 1999; 354: 1697-1710

Holz A, Bielekova B, Martin R, Oldstone MB (2000)

Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of encephalitogenic epitope and association with MS.

J Immunol, 2000; 164(2): 1103-1109

Hopf HC, Deuschl G, Diener HC (1999)

Neurologie in Praxis und Klinik in 2 Bänden.

Georg-Thieme-Verlag Stuttgart New York

Hornquist E and Lycke N (1993)

Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells.

Eur J Immunol, 1993; 23: 2136-2143

Host A, Jacobsen HP, Halken S, Holmenlund D (1995)

The natural history of cow's milk allergy/intolerance.

Eur J Clin Nutr, 1995; 49(sup 1): 13-18

Hunter S and Hafler DA (2000)

Ubiquitous pathogen. Links between infection and autoimmunity in MS.

Neurology, 2000; 55: 164-165

Iglesias A, Bauer J, Litznerburger T, Schubart A, Linington C (2001)

T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis.

Glia, 2001; 36(2): 220-234

Jack LJ and Mather IH (1990)

Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation.

J Biol Chem, 1990; 265(24): 14481-14486

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B (2002)

Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from MS patients.

Brain, 2002; 125: 538-550

Janeway CA Jr and Medzhitov R (2002)
Innate immune recognition.
Annu Rev Immunol, 2002; 20: 197-216

Janeway CA and Travers P (1997)
Immunologie.
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg

Johns TG, de Rosbo NK, Menon KK, Abo S, Gonzales MF, Bernard CC (1995)
Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis.
J Immunol, 1995; 154: 5536-5541

Johns TG and Bernard CC (1999)
The structure and function of MOG.
J Neurochemistry, 1999; 72: 1-9

Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E, Akerblom HK, Dosch HM (1992)
A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus.
N Engl J Med, 1992; 327: 302-307

Karni A, Bakimer-Kleiner R, Abramsky O, Ben-Nun A (1999)
Elevated levels of antibody to MOG is not specific for patients with multiple sclerosis.
Arch Neurol, 1999; 56: 311-315

Kawahito Y, Cannon GW, Gulko PS, Remmers EF, Longman RE, Reese VR, Wang J, Griffiths MM, Wilder RL (1998)
Localization of quantitative trait loci regulating adjuvant-induced arthritis in rats: evidence for genetic factors common to multiple autoimmune diseases.
J of Immunology 1998; 161(8): 4411-4419

Kaye JF, de Rosbo NK, Mendel I, Flechter S, Hoffmann M, Yust I, Ben-Nun A. (2000)
The central nervous system-specific myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is encephalitogenic and a potential target antigen in MS.
J Neuroimmunology, 2000; 102(2): 189-198

Kimura K, Hunter SF, Thollander MS, Loftus EV Jr, Melton LJ 3rd, O'Brien PC, Rodriguez M, Phillips SF (2000)

Concurrence of inflammatory bowel disease and multiple sclerosis.

Mayo Clinic Proceedings, 2000; 75(8): 802-806

Kira JI Kanai T, Nishimura Y, Yamasaki K, Matsushita S, Kawano Y, Hasuo K, Tobimatsu S, Kobayashi T (1996)

Western versus asian types of MS immunogenetically and clinically distinct orders.

Ann Neurol, 1996; 40: 569-574

Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem R, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassman H (2000)

Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis - A comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive and remyelinated lesions.

Am J Pathol, 2000; 157: 267-276

Kroepfl JF, Viise LR, Charron AJ, Linigton , Gadinier M (1996)

Investigation of MOG membrane topology.

J of Neurochemistry, 1996; 67: 2219-2222

Lambracht D, Prokop C, Hedrich HJ, Lindahl KF, Wonigeit K (1995)

Mapping of H2-M homolog and MOG genes in the rat MHC.

Immunogenetics, 1995; 42: 418-421

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, Rodriguez M (1997)

Remyelination in multiple sclerosis.

Multiple Sclerosis, 1997; 3: 113-136

Lauer K (1993)

The risk of MS in the USA in relation to the sociogeographic features: a factor-analytic study.

J Clin Epidemiol, 1993; 1: 43-48

Lauer K (1994)

The impact of clinical and life-style variables on the course of multiple sclerosis : a prospective study.

EFNS Meeting, Poznan, Poland, Nov. 1994

Lauer K (1997)

Diet and multiple sclerosis.

Neurology, 1994; 49(sup 2): 55-61

Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC Jr, Hasty KA, Callaway JC, Zunt J, Desiderio D, Stuart JM (2002)

Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease.

Nat Med, 2002; 8(5): 509-513

Liang B and Mamula MJ (2000)

Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens.

Cell Mol Life Sci, 2000; 57(4): 561-568

Liblau R, Tisch R, Bercovici N, McDevitt H (1997)

Systemic antigen in the treatment of T-cell-mediated autoimmune diseases.

Immunol today, 1997; 18: 599-604

Lindert RB, Haase CG, Brehm U, Wekerle H, Linington C, Hohlfeld R (1999)

Multiple sclerosis: B and T cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG).

Brain, 1999; 122: 2089-2099.

Linington C, Webb M, Woodhams CL (1984)

A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody.

J Neuroimmunol, 1984; 6: 387-396

Linington C and Lassmann H (1987)

Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: Correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG).

J Neuroimmunol, 1987; 17: 61-70

Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1988)

Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein.

Am J Pathol, 1998; 130: 443-454

Linington C, Engelhardt B, Kapocs G, Lassmann H (1992)

Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody.

J Neuroimmunol, 1992; 40(2-3): 219-224

Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu HC, Lassmann H, Wekerle H (1993)

T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system.

Eur J Immunol, 1993; 23: 1364-1372

Linsley PS, Peach R, Gladstone P, Pajortah J (1994)

Extending the B7 (CD80) gene family.

Protein Sci, 1994; 3:1341-1343

Litzenburger T, Fassler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A (1998)

B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice.

J Exp Med, 1998; 188(1): 169-80

Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H (1996)

Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis.

Brain Pathol, 1996; 6: 259-274

Lucchinetti CF, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000)

Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.

Ann Neurol, 2000; 47: 707-717

Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH (1999)

B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide.

Eur J Immunol, 1999; 11: 3432-3439

MacDonald TT (1998)

T cell immunity to oral allergens.

Curr Opin Immunol, 1998, 10(6): 620-627

Madsen LD, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R, Wucherpfennig KW, Fugger L (1999)

A humanized model for MS using HLA-DR2 and a human T-cell receptor.

Nat Genet, 1999; 23(3): 343-347

Malosse D, Perron H, Sasco A, Seigneurin JM (1992)

Correlation between milk and dairy product consumption and multiple sclerosis prevalence: a worldwide study.

Neuroepidemiology, 1992; 11: 304-312

Martin R, McFarland HF, McFarlin DE (1992)

Immunological aspects of demyelinating diseases.

Annu Rev Immunol, 1992; 10: 153-187

Mason D(1998)

A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor.

Immunol Today, 1998; 19(9): 395-404

Meinl E (1999)

Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis.

Curr Opin Neurol, 1999; 12(3): 303-307

Miller A, Lider O, Abransky O, Weiner HL (1994)

Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals.

Eur J Immunol, 1994; 24: 1026-32

Miller JF and Basten A (1996)

Mechanisms of tolerance to self.

Curr Opin Immunol, 1996; 8(6): 815-821

Mokhtarian F, Zhang Z, Shi Y, Gonzales E, Sobel RA (1999)

Molecular mimicry between a viral peptide and a myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces autoimmune demyelinating disease in mice.

J Neuroimmunol, 1999; 95(1-2): 43-54

Mumenthaler M und Mattle H (2002)

Neurologie.

Georg-Thieme-Verlag Stuttgart New York

Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then Bergh F, Dose T, Wekerle H, Hohlfeld R (2000)

MS: comparison of copolymer -1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells.

Proc Natl Acad Sci USA, 2000; 97(13): 7452-7457

Njenga KM and Rodriguez M (1996)

Animal models of demyelination.

Curr Opin Neurol, 1996; 9: 159-164

Noseworthy JH (1999)

Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis.

Nature, 1999; 399(sup 6738): A40-7

Noseworthy JH, Gold R, Hartung H-P (1999)

Treatment of multiple sclerosis: recent trials and future perspectives.

Curr Opin Neurol, 1999; 1: 279-293

Ogg SL, Komaragiri MV, Mather IH (1996)

Structural organisation and mammary-specific expression of the butyrophilin gene.

Mamm Genome, 1996; 7: 900-905

Oksenberg JR, Seboun E, Hauser SL (1996)

Genetics of demyelinating diseases.

Brain pathology, 1996; 6: 289-302

Oksenberg JR and Barcellos LF (2000)

The complex genetic aetiology of multiple sclerosis.

J Neurovirol, 2000; 6(sup 2): 10-14

Pelto L, Salminen S, Lilius EM, Nuutila J, Isolauri E (1998)

Milk hypersensitivity – key to poorly defined gastrointestinal symptoms in adults.

Allergy, 1998; 53(3): 307-110

Pelto L, Impivaara O, Salminen S, Poussa T, Seppanen R, Lilius EM (1999)

Milk hypersensitivity in young adults.

Eur J Clin Nutr, 1999; 53(8): 620-624

Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Kappos L, Wekerle H (1990)

Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors.

PNAS, 1990; 87: 7968-7972

Pham-Dinh D, Mattei M-G, Nussbaum J-L, Roussel G, Pontarotti P, Roedel N, Mather IH, Artzt K, Fischer Lindahl K, Dautigny A (1993)

Myelin oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin family encoded within the major histocompatibility complex.

PNAS, 1993; 90: 7990-7994

Pham-Dinh D, Jones EP, Pitiot G, Della Gaspera B, Daubas P, Mallet J, Le Paslier D, Lindahl KF and Dautigny A (1995)

Physical mapping of the human and mouse MOG gene at the distal end of the MHC class Ib region.

Immunogenetics, 1995; 42: 386-391

Poduslo JF (1978)

The molecular architecture of myelin: identification of the external surface membrane components.

Adv Exp Med Biol, 1978; 100: 189-205

Prineas JW and Graham JS (1981)

Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown.

Ann Neurol, 1981; 10: 149-158

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch (1997)

De Gruyter-Verlag Berlin

Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP (1999)

Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesion: a case for antigen-specific antibody mediation.

Ann Neurol, 199; 46: 144-160

Reiber H (1998)

Cerebrospinal fluid - physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases.

Multiple Sclerosis , 1998; 4: 99-107

Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, Poewe W, Berger T (1999)

Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study.

Brain, 1999; 122: 2047-2056

Rhodes DA, Stammers M, Malcherek, G, Beck S, Trowsdale J (2001)

The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex.

Genomics, 2001; 71: 351-362

Riise T (1997)

Cluster studies in MS.

Neurology, 1997; 49(sup 2): 27-32

Roth MP, Malfroy L, Offer C, Sevin J, Enault G, Borot N, Pontarotti P, Coppin H (1995)

The human MOG gene: complete nucleotide sequence and structural characterization.

Genomics, 1995; 28:241-250

Russel DM, Dembic Z, Morahan G, Miller JF, Burki K, Nemazee D (1991)

Peripheral deletion of self-reactive B cells.

Nature, 1991; 354: 308-311

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hayhimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ (1993)

A population-based study of multiple sclerosis in twins: update.
Ann Neurol, 1993; 33: 281-285

Sadovnick AD and Ebers GC (1995)

Genetics of multiple sclerosis.
Neurol Clin, 1995; 13: 99-118

Salinovich O and Montelaro RC (1986)

Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal Biochem, 1986; 156(2): 341-347

Schluesener HJ, Sobel RA, Linington C, Weiner HL (1987)

A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease.
J Immunol, 1987; 39(12): 4016-4021

Schubart A und Linington C (2001)

Aktuelle tierexperimentelle Aspekte der Multiple-Sklerose-Therapie: Antigen-spezifische Immuntherapien bei Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein- (MOG)-induzierter experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis.

In: Zetl UK and Mix E (Hrsg): Multiple Sklerose: Kausalorientierte, symptomatische und rehabilitative Therapie.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Schwartz RH (1996)

Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism.
J Exp Med, 1996; 184: 1-8

Sepic J, Mesaros E, Materljan E, Sepic-Grahovac D (1993)

Nutritional factors and MS in Gorski Kotar, Croatia.
Neuroepidemiology, 1993; 12: 234-240

Sharp AH and Freeman GJ (2002)

The B7-CD28 superfamily.

Nature Rev Immunol, 2002; 2(2): 116-126

Silber E and Sharief M (1999)

Axonal degeneration in the pathogenesis of MS.

J of the Neurological Sciences, 1999; 170: 11-18

Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM (1993)

Induction of T cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells.

Nature, 1993; 363: 156-159 (comment: 117-8)

Smith-Norowitz TA, Sobel RA, Mokhtarian F (2000)

B cell and antibodies in the pathogenesis of myelin injury in semliki forest virus encephalitis.

J Cell Immun, 2000; 200(1): 27-35

Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, Patnaik M, Jacobson S (1997)

Association of human herpes virus 6 (HHV6) with MS: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA.

Nature Med, 1997; 3: 1394-1399

Soldan SS and Jacobson D (2001)

Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis.

Adv Virus Res, 2001; 56: 517-555

Sriram S, Mitchell W, Stratton C (1998)

Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS.

Neurology, 1998; 50: 571-572

Stammers M, Rowen L, Rhodes D, Trowsdale J, Beck S (1999)

BTLII: a polymorphic locus with homology to the butyrophilin gene family, located at the border of the major histocompatibility complex class II and class III regions in human and mouse.

Immunogenetics, 1999; 51: 373-382

Stefflerl A, Brehm U, Storch MK, Lambracht-Washington D, Wonigeit K, Lassmann H, Linington C (1999)

Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the “resistant” Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B-cell response.

J Immunol, 1999; 163(1): 40-49

Stefflerl A, Schubart A, Storch MK, Amini A, Mather I, Lassmann H, Linington C (2000)

Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis.

J Immunol, 2000; 165: 2859-2865

Storch MK and Lassmann H (1997)

Pathology and pathogenesis of demyelinating disease.

Curr Opin Neurol, 1997; 10: 186-192

Storch MK, Stefflerl A, Brehm U, Weissert R, Wallström, E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998)

Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology.

Brain Pathol, 1998; 8: 681-694

Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998)

Multiple Sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination.

Ann Neurol, 1998; 43: 465-471

Strobel S (1996)

Neonatal oral tolerance.

Ann Ny Acad Sci, 1996; 778: 88-102

Strobel S and Mowat AM (1998)

Immune responses to dietary antigens: oral tolerance.

Immunol Today, 1998; 19(4): 173-181

Sun J, Link H, Ollson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, Linington C, Diena P (1991)
T and B cell responsis to MOG in multiple sclerosis.
J Immunol, 1991; 146: 1490-95

Tazi-Ahnini R, Henfy J, Offer C, Bouissou-Bouchouata C, Mather IH, PontarottiP (1997)
Cloning, localization and structure of new members of BTN genefamily in juxta-telomeric re-
gion of MHC.
Immunogenetics, 1997; 47: 55-63

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998)
Axonal transection in the lesions of multiple scerosis.
N Engl J Med, 1998; 338: 278-285

Tsunoda I and Fujinami RS (1996)
Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's mur-
ine encephalomyelitis virus.
J Neuropathol Wxp Neurol, 1996; 55(6): 673-686

Ulvestad E, Williams K, Vedeler C, Antel J, Nyland H, Mork S, Matre R (1994)
Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for
the Fc part of IgG.
J Neurol Sci, 1994; 122: 1261-1270

Umesaki Y and Setoyama H (1992)
Immune responses of mice to orally administered asialo GM1-specific rabbit IgG in the pres-
ence or absence of cholera toxin.
Immunology, 1992; 75: 386-388

Von Büdingen H-C, Hauser SL, FuhrmannA, Nabavi CB, Lee JI, Genain CP (2002)
Molecular characteristation of antibody specificities against myelin/oligodendrocyte glycopro-
tein in autoimmune demyelination.
Proc Nat Acd Sci, 2002; 99: 8207- 8212

Vernet C, Boretto J, Mattéi M-G, Takahashi M, Jack LJW, Mather ICH, Rouquier S, Pontarotti P (1993)
Evolutionary study of multigenic families mapping close to the human MHC class I region.
J Mol Evol, 1993; 37: 600-612

Villarejo MR and Zabin I (1974)
Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains.
J Bacteriol, 1974; 120(1): 466-474

Wallstrom E, Khademi M, Andersson M, Weissert R, Linington C, Olsson T (1998)
Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis.
Eur J Immunol, 1998; 28(10): 3329-3335

Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L (1994)
Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens.
Annu Rev Immunol, 1994; 12: 809-837

Weiner HL (1997)
Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases.
Immunology today, 1997; 18: 335-343

Weinshenker BG and Sibley WA (1992)
Natural history and treatment of multiple sclerosis.
Curr Opin Neurol Neurosurg, 1992; 5(2): 203-211

Wekerle H (1998)
The viral triggering of autoimmune disease.
Nat Med, 1998; 4(7): 770-771

Wekerle H (1999)
Remembering MOG: autoantibody mediated demyelination in multiple sclerosis?
Nat Med, 1999; 5(2): 153-154

Winer S, Astsaturov I, Cheung RK, Schrade K, Gunaratnam L, Wood DD, Moscarello MA, O'Connor P, McKerlie C, Becker DJ, Dosch HM (2001)

T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice.

J Immunol, 2001; 166(7): 4751-4756

Zipp F, Weber F, Huber S, Sotgiu S, Czlonkowska A, Holler E, Ekkehard A, Weiss E, Wekerle H, Hohlfeld R (1995)

Genetic control of MS: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor- α by HLA-DR2+ T cells.

Ann Neurol, 1995; 38: 723-730

Zipp F, Kerschensteiner M, Dornmair K, Malotka J, Schmidt S, Bender A, Giegerich G, de Waal Malefyt R, Wekerle H, Hohlfeld R (1998)

Diversity of the anti-T-cell receptor immune response and its implications for t-cell vaccination therapy of MS.

Brain, 1998; 121: 1395-1407

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

8.18.C.5	anti-MOG-Antikörper aus der Maus
alkal.	alkalisch
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BTN	Butyrophilin
BTN ^{exo}	exoplasmatische Domäne von BTN (IgV- und IgC-ähnliche Domäne)
BTN ^{IgI}	Immunglobulin(IgV)-ähnliche extrazelluläre Domäne (IgI) von BTN
bBTN	bovines Butyrophilin
hBTN	humanes Butyrophilin
CMPI/CMPA	Kuh-Milch-Protein-Intoleranz/Allergie (cow's milk protein intolerance/allergy)
CP (I, II)	MS-Patienten mit chronisch-progressivem Verlauf der Erkrankung (I primär, II sekundär)
CSF	Liquor (cerebrospinal fluid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle-Auto-Immun-Encephalomyelitis
E.-Coli	Escherichia-Coli-Bakterien
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-Linked-Immunsorbant-Assay“
EtBr	Ethidiumbromid
GALT	Darm-assoziiertes-lymphatisches-Gewebe (gut associated lymphatic tissue)
HD	gesunde Spender (healthy donors)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (human leucocyte antigen)
IgC	konstante Domäne eines Immunglobulins
IgD	Immunglobulin(IgV)-ähnliche extrazelluläre Domäne (MOG)
IgG/M	Immunglobulin G/M
IgV	variable Domäne eines Immunglobulins
IgI	Immunglobulin(IgV)-ähnliche extrazelluläre Domäne (BTN)

IL-10	Interleukin 10
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
Kan.	aus dem Kaninchen
kDA	Kilodalton
Ko	Kontrollantikörper
M	Proteinstandard
MAG	Myelin-assoziiertes-Glykoprotein
Maus.	aus der Maus
MBP	Myelin-basisches-Protein
MFGM	Milch-Fett-Globulin-Membran (milk fat globule membrane)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MOBP	Myelin-assoziiertes-Oligodendrozyten-basisches-Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOG ^{Igd}	Immunglobulin(IgV)-ähnliche extrazelluläre Domäne (Igd) von MOG
bMOG	bovines Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
hMOG	humanes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOSP	Myelin-Oligodendrozyten-spezifisches-Protein
MS	Multiple Sklerose
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD _{x-nm}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x-nm
OMG	Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein
OND	Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen als MS (other neurological diseases)
OPD	o-Phenyldiamin
o-	ortho-
Pat.	Patient
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipoprotein
p-	para-
Q _{alb}	Quotient der Albuminkonzentration im Liquor und Serum
rek.	rekombinant hergestellt
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RR	MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf der Erkrankung (relapsing remitting)

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
spez.	spezifisch
TBE	Tris-Borat/EDTA
TBS	Tris-Puffer (tris-buffered saline)
TBS-T	TBS+TEMED
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF- β	„transforming growth factor β “
Th1	T-Helferzellen der Klasse 1
TMEV	Theiler's Murin-Enzephalomyelitis-Virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
UV	Ultraviolett
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Ziege.	aus der Ziege
ZNS	Zentralnervensystem

6.2 Dank

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, ohne deren Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herr Prof. Dr. C. Linington hat mich während der gesamten Zeit der Durchführung dieser Arbeit in hervorragender Weise betreut. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank.

Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe wie auch der gesamten Abteilung für Neuroimmunologie erwiesen sich als gute Kolleginnen und Kollegen und standen mir mit Rat und Tat bei der Durchführung des Projektes zur Seite.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Wekerle für die Aufnahme in die Abteilung für Neuroimmunologie des Max-Planck-Institutes für Neurobiologie.

Ich danke meinen Eltern, Geschwistern, Freundinnen und Freunden für ihre Unterstützung, ihre Hilfe und den verständnisvollen Rückhalt, nicht nur im Rahmen dieses Projektes, sondern auch während meiner gesamten Ausbildung.

6.3 Curriculum Vitae

26. Juni 1975	Geboren in Erlangen als drittes von fünf Kindern von Antje und Ralf Guggenmos
1985 - 1989	Humanistisch-neusprachliches Dom-Gymnasium Freising
1989 - 1994	Mathematisch-naturwissenschaftliches Bodensee-Gymnasium Lindau
Juni 1994	Abitur
1994 - 1995	Zivildienst in der offenen Behindertenarbeit des Bayerischen Roten Kreuzes
1995 - 1997	Vorklinisches Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
September 1997	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
1997 - 1998	Erster Abschnitt des klinischen Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Januar 1998	Eintritt in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Linington als medizinischer Doktorand der Abteilung für Neuroimmunologie (Prof. Wekerle) des Max-Planck-Institutes für Neurobiologie
September 1998	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1998 - 2000	Zweiter Abschnitt des klinischen Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
April 1999	Famulatur in Innerer Medizin am akademischen Lehrkrankenhaus Barmherzige Brüder München der LMU
August 1999	Bed-Side-Teaching-Kurs in Psychiatrie am Sanatorium Kilchberg Zürich, Schweiz (Prof. Greil, LMU)

September 1999	Famulatur in Neurologie am akademischen Lehrkrankenhaus Moabit der Humboldt-Universität Berlin
Oktober 1999	Famulatur in Innerer Medizin am akademischen Lehrkrankenhaus Albertinen der Universität Hamburg
März 2000	Bed-Side-Teaching Kurs in Neurologie am akademischen Lehrkrankenhaus Harlaching der LMU (Dr. Krainc, Harvard-Medical-School Boston, U.S.A.)
April 2000	Bed-Side-Teaching Kurs in Innerer Medizin am akademischen Lehrkrankenhaus Landshut der LMU (Dr. Chang, Yale-University New Haven, U.S.A.)
September 2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2000	Bed-Side-Teaching Kurs in Pädiatrie am akademischen Lehrkrankenhaus Landshut der LMU (Prof. Truman, Columbia-University New York, U.S.A.)
Dezember 2000	Stipendium des Deutschen - Akademischen - Austausch - Dienstes (DAAD) für das Praktische Jahr (Dritter Abschnitt des klinischen Studiums der Medizin)
Feb. 2001 - Mai 2001	Erstes Tertial des Praktischen Jahres in Innerer Medizin am Tulane-University-Medical-Center New Orleans, U.S.A.
Juni 2001 - Sept. 2001	Zweites Tertial des Praktischen Jahres in allgemeiner, plastischer und Unfall- / Wiederherstellungschirurgie am Hadassah-Medical-Center der Hebräischen Universität Jerusalem, Israel
Okt. 2001 - Jan. 2002	Drittes Tertial des Praktischen Jahres in Neurologie am National Hospital for Neurology and Neurosurgery Queen Square University College London, U.K.
April 2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung