
**Charakterisierung der humoralen Immunantwort
bei der Multiplen Sklerose**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sabine Cepok

aus Wielowies

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als

Dissertation am 27.02.2004 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. B. Hemmer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2004

Aus der Klinik für Neurologie
Arbeitsgruppe klinische Neuroimmunologie
der Philipps-Universität Marburg

für Arnd

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	4
2 EINLEITUNG.....	7
2.1 Das Immunsystem	7
2.1.1 Kompartimente des Immunsystems.....	7
2.1.2 Die humorale Immunantwort.....	11
2.2 Die Multiple Sklerose	16
2.2.1 Die Aetiologie der Multiplen Sklerose	16
2.2.2 Die Rolle des Immunsystems bei der MS.....	17
2.2.3 Mögliche Zielantigene bei MS.....	18
3 AUFGABENSTELLUNG	21
4 MATERIAL UND METHODEN	22
4.1 MS-Patienten und Kontrollpersonen	22
4.2 Flusszytometrische Methoden	22
4.2.1 Antikörper	22
4.2.2 Färbung von peripherem Blut	23
4.2.3 Färbung von Liquor	23
4.3 Messung der intrathekalen Antikörper-Synthese.....	23
4.4 Protein-Array	24
4.5 Identifikation von Immunreaktivitäten auf Protein-Array.....	24
4.6 Anzucht von Bakterien	25
4.7 Plasmidisolation.....	26
4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
4.9 Agarose-Gelelektrophorese	26
4.10 DNA-Sequenzierung.....	26
4.11 Identifikation des Proteins	27
4.12 Proteinexpression.....	27

4.13 Aufreinigung von Proteinen	27
4.13.1 Aufreinigung von HIS-Fusionsproteinen.....	28
4.13.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	28
4.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
4.15 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran (western-blot)	28
4.16 Immunologischer Nachweis von Protein (Immuno-Western-Blotting)	28
4.17 Enzyme-linked-immunoabsorbent assay (ELISA).....	29
4.18 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	30
4.19 Peptidscan- und Aminosäurensstitutionsanalysen	31
4.20 Peptide und Proteine	31
4.21 Herstellung von rekombinanten Proteinen	31
4.21.1 DNA Isolation und Amplifikation des Virus-Gens	31
4.21.2 Klonierung und Transformation	32
4.22 Nachweis von Virus RNA	32
4.23 Statistik	33
5 ERGEBNISSE.....	34
5.1 Immunphänotypisierung von Blut und Liquor von MS-Patienten und Kontrollen.....	34
5.2 Heterogenität der Liquorpathologie bei MS-Patienten.....	36
5.3 Stabilität der heterogenen Liquorpathologien	38
5.4 Liquorpathologien korrelieren mit der Krankheitsprogression	40
5.5 Charakterisierung von B-Zell Subpopulationen in Liquor und Blut	41
5.6 Identifikation von potentiellen Kandidatenantigenen auf Protein-Array	48
5.7 Immunreaktivitäten gegen aufgereinigte Kandidatenantigene	52
5.8 Immunreaktivitäten gegen Kandidatenantigene bei MS-Patienten und Kontrollen.....	53
5.9 Bindung der Kandidatenantigene an OKBs im Liquor.....	55
5.10 Identifikation der Antikörper-bindenden Epitope	57
5.11 Immunreaktivitäten gegen BRRF-2 und EBNA-1 Peptide	65
5.12 Immunreaktivitäten gegen BRRF-2 und EBNA-1 Proteine	66
5.13 Intrathekale BRRF-2-spezifische IgG-Synthese und Bindung der OKBs.....	70
5.14 Nachweis von EBV-spezifischen RNA-Transkripten	73

6 DISKUSSION	74
6.1 Heterogenität der Liquorpathologie bei MS-Patienten.....	74
6.2 Zielantigene der humoralen Immunantwort bei der MS.....	81
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	91
8 LITERATURVERZEICHNIS	93
9 ERKLÄRUNG	104
10 DANKSAGUNG	105
11 LEBENSLAUF	106

1 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung der immunologischen Veränderungen bei der Multiplen Sklerose (MS). Die MS ist eine chronisch-entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Pathomechanismus bislang unbekannt ist. Man findet typischerweise eine Infiltration des ZNS durch Immunzellen, wobei ein heterogenes Bild bezüglich der Qualität der Immunreaktion und der histopathologischen Veränderungen im ZNS von MS-Patienten zu beobachten ist. Obwohl körpereigene Immunzellen wahrscheinlich die Mediatoren der Erkrankung sind, ist bislang nicht geklärt, welche Immunzellen pathogenetisch relevant sind und welche Rolle sie beim Krankheitsprozess spielen.

Da Hirngewebe gewöhnlich nicht zugänglich ist und der Liquor cerebrospinalis (Liquor) höchstwahrscheinlich die inflammatorischen Vorgänge im ZNS widerspiegelt, wurde in dieser Arbeit der Liquor auf charakteristische Veränderungen bei der MS analysiert. Dazu wurden Liquor- und Blutzellen von MS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen phänotypisiert. Die Analysen zeigten keine wesentlichen Unterschiede im Blut, hingegen war der Liquor von MS-Patienten durch eine Aktivierung der humoralen, B-Zell vermittelten Immunantwort in Form eines erhöhten Anteils an B-Zellen, Plasmazellen und einer Erhöhung der intrathekalen Immunglobulin-G (IgG)-Synthese gekennzeichnet. Je nach Ausprägung der humoralen Immunantwort konnten drei unterschiedliche -im Krankheitsverlauf stabile- Liquorpathologien ausgearbeitet werden: 1. Eine B-Zell dominante Pathologie mit einem hohen Anteil an B-Zellen, wenig Monozyten und einer erhöhten IgG-Synthese, 2. eine Monozyten-dominante Pathologie mit wenig B-Zellen, zahlreichen Monozyten und wenig IgG-Synthese und 3. eine intermediäre Pathologie mit B-Zellen und Monozyten in etwa gleichem Verhältnis und einer moderaten IgG-Synthese. Die Korrelation der unterschiedlichen Liquorpathologien mit klinischen Parametern ergab, dass MS-Patienten mit einer B-Zell dominanten Liquorpathologie eine raschere Krankheitsprogression hatten als Patienten mit umgekehrtem Phänotyp.

Die Ergebnisse der Arbeit weisen auf eine Heterogenität in der Liquorpathologie hin und unterstützten die Hypothese, dass die MS eine heterogene Erkrankung mit unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathomechanismen ist. Die unterschiedlichen Liquorpathologien geben erstmals die Möglichkeit, die MS-Patienten anhand der

Liquortypisierung in Subgruppen zu stratifizieren und möglicherweise eine Aussage über die zu erwartende Krankheitsprogression zu treffen. Die im Krankheitsverlauf stabile Akkumulation von B-Zellen und Plasmazellen und die konstante IgG-Synthese bei einzelnen MS-Patienten deutet auf eine zielgerichtete und kontinuierliche Aktivierung der humoralen Immunantwort hin und wirft deshalb die Frage nach der Antigenspezifität der humoralen Immunantwort auf.

Der nach wie vor wichtigste Befund für die Diagnose einer MS ist das Auftreten von sogenannten oligoklonalen IgG-Banden (OKBs). OKBs werden im Liquor von mehr als 95% der MS-Patienten beobachtet, während sie nur sehr selten (<1%) bei gesunden Kontrollen zu finden sind. Außerdem sind diese OKBs auch bei anderen chronischen Erkrankungen des ZNS, die durch einen definierten Erreger verursacht sind, zu beobachten. Bei diesen Erkrankungen ist ein Teil der OKBs gegen das krankheitsverursachende Antigen gerichtet.

Trotz intensiver Forschung konnten die Zielantigene der Immunantwort bei MS bisher nicht definiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, - unter Berücksichtigung der Befunde bei infektiösen Erkrankungen - mit einem neuen Ansatz die Zielstrukturen der OKBs bei der MS zu identifizieren. Mit Hilfe eines Protein-Arrays, basierend auf einer cDNA-Bibliothek des menschlichen Gehirns, wurden die Immunreaktivitäten von Liquor-Antikörpern ausgewählter MS-Patienten gegen etwa 37000 verschiedene Proteine bestimmt und mit den Reaktivitäten von Kontroll-Liquores verglichen. Mit Hilfe von anschließenden ELISA-Experimenten mit großen MS- und Kontroll-Kollektiven wurden 10 Proteine identifiziert, die bei MS-Patienten höhere Reaktivitäten zeigten als bei Kontrollen. Interessanterweise wurden in den Immunreaktivitäten gegen diese Kandidatenantigene Überlappungen beobachtet, die letztendlich zu zwei Proteingruppen führten. Mit beiden Proteingruppen, die aus 5 bzw. 3 Kandidatenproteinen bestanden, wurde eine ausgedehnte Epitop-Suche durchgeführt. Die Analysen führten schließlich zu zwei Proteinen des Epstein-Barr-Virus (EBV). Es handelte sich dabei um das EBNA-1 und BRRF-2 Protein. Die RNA Transkripte beider Proteine konnten wir in latent mit EBV infizierten Zellen nachweisen. Für die anschließende Bestimmung der Frequenz und Ausprägung der Immunreaktivitäten gegen beide EBV-Proteine bei MS-Patienten verglichen mit Kontrollen wurde das BRRF-2, da es kommerziell nicht zu erwerben war, über eine Klonierungsstrategie in *E. coli* rekombinant exprimiert. Die weiterführenden Experimente zeigten, dass die

Immunreaktivitäten gegen diese EBV-Proteine im Serum und Liquor von MS-Patienten höher waren als bei Patienten mit nicht-entzündlichen bzw. mit anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS. Des Weiteren konnte die intrathekale Synthese der EBV-spezifischen Antikörper gezeigt werden. Von besonderer Bedeutung war der Befund, dass die OKBs im Liquor von MS-Patienten spezifisch gegen diese EBV-Proteine gerichtet waren und Teil des gesamten OKB-Musters darstellten. Diese Ergebnisse unterstützen nachdrücklich die Rolle von EBV in der Pathogenese der MS.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Immunsystem

Die grundlegende Funktion des Immunsystems ist die Befreiung des Organismus von eingedrungenen Pathogenen und entarteten körpereigenen Zellen. Dabei muss das Immunsystem zwischen körpereigenen Strukturen, die toleriert und, fremden Antigenen, die beseitigt werden müssen, unterscheiden. Grundsätzlich wird zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem unterschieden. Die phylogenetisch ältere, angeborene Immunantwort ist eine unspezifische Immunantwort, die bei einer Infektion als erste zum Tragen kommt. Jedoch wird dabei kein Gedächtnis gebildet, so dass bei einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Pathogen keine verbesserte Immunantwort ausgelöst wird. Die erworbene Immunantwort dagegen ist eine spezifische Immunreaktion auf ein Pathogen, die mit leichter Verzögerung nach Eindringen des Erregers einsetzt und die Ausbildung eines Erreger-spezifischen Gedächtnisses zur Folge hat. Dieses befähigt das Immunsystem, nach erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger schneller und effizienter zu reagieren. Allerdings ist die Interaktion beider Komponenten für die erfolgreiche Immunabwehr eine Voraussetzung und Kennzeichen des Immunsystems höherer Vertebraten. Je nach Erregertyp (Viren, Bakterien, Pilze, Würmer und Protozoen) setzen unterschiedliche Mechanismen der Immunabwehr ein. Dabei kommt jedem Zelltyp eine zugewiesene Rolle in der Immunreaktion zu. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick gegeben über die Kompartimente des Immunsystems mit Beschreibung der Immunzellen, die im Hinblick auf die im ersten Teil der Arbeit vorgestellten Analysen von Bedeutung waren (Abb. 1).

2.1.1 Kompartimente des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems entstehen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, die während der Embryonalentwicklung in der fötalen Leber gebildet und später ständig aus dem Knochenmark nachgeliefert werden. Aus diesen Stammzellen bilden sich zum einen die myeloischen und zum anderen die lymphatischen Vorläuferzellen, aus denen sich später die Lymphozyten entwickeln. Aus der myeloischen Vorläuferzelle entstehen die polymorphkernigen Granulozyten, welche die eosinophilen, neutrophilen und basophilen Zellen umfassen. Die Monozyten entstehen ebenfalls aus der

myeloischen Vorläuferzelle. Sie zirkulieren im Blut und differenzieren zu unterschiedlichen Gewebsmakrophagen aus, wie z. B. den Kupffer-Sternzellen in der Leber und den Alveolarmakrophagen in der Lunge. Monozyten, Makrophagen und Neutrophile gehören zu den phagozytierenden Zellen, die entweder direkt über ihre Rezeptoren an konservierte Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen binden oder aber über gebundenes Komplement bzw. Antigen-spezifische Antikörper das Pathogen phagozytieren und intrazellulär durch toxische Produkte abtöten. Eine weitere Gruppe des angeborenen Immunsystems stellen die Natürlichen Killer (NK)-Zellen dar, die aus der lymphoiden Linie generiert werden und auch als große granuläre Lymphozyten bezeichnet werden. Über Antikörper-bindende Rezeptoren sind sie in der Lage, Zielzellen, die von Antikörpern opsoniert wurden, abzutöten. NK-Zellen spielen eine Rolle bei der Eliminierung von Tumorzellen und bei viralen Infektionen. Außerdem findet man NK-artige T-Zellen. Es handelt sich hierbei um T-Zellen, die typische NK-Marker exprimieren und ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Virusabwehr einnehmen.

Neben den zellulären Bestandteilen besteht das unspezifische Immunsystem aus löslichen Bestandteilen, wobei dem Komplementsystem die bedeutendste Rolle zukommt. Es umfasst ca. 20 Serumproteine, die sich nach Anlagerung an einen Mikroorganismus kaskadenartig aktivieren, was letztlich zur Bildung eines Membran-Angriffs-Komplexes und schließlich zur Lyse des Pathogens führt. Man unterscheidet den alternativen und den klassischen Weg der Komplementkaskade. Während beim alternativen Weg die Kaskade durch spontane Anlagerung des Komplementfaktors C3b an das Pathogen induziert wird, erfolgt die Kaskade des klassischen Weges über die Bindung von Antikörpern, die ein Pathogen spezifisch gebunden haben. Durch die Bindung von Komplement an den konstanten Teil der Antikörper werden die Pathogene opsoniert und die Phagozytose erleichtert. Diese Immunreaktion stellt einen wichtigen Knotenpunkt zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort dar.

Wenn ein Erreger nicht sofort durch die angeborene Immunantwort eliminiert werden kann, setzt die adaptive Immunantwort ein, die sich durch Spezifität und Ausbildung eines Gedächtnisses auszeichnet. T- und B-Lymphozyten sind die hauptsächlichen Mediatoren des adaptiven Immunsystems. Bei einer Immunreaktion gegen einen Erreger kommt es zur Expansion von Erreger-spezifischen Effektor-Zellen und gleichzeitiger Differenzierung einiger Zellen in sogenannte Gedächtniszellen. Diese können zum einen bei einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Erreger schneller aktiviert werden, zum anderen

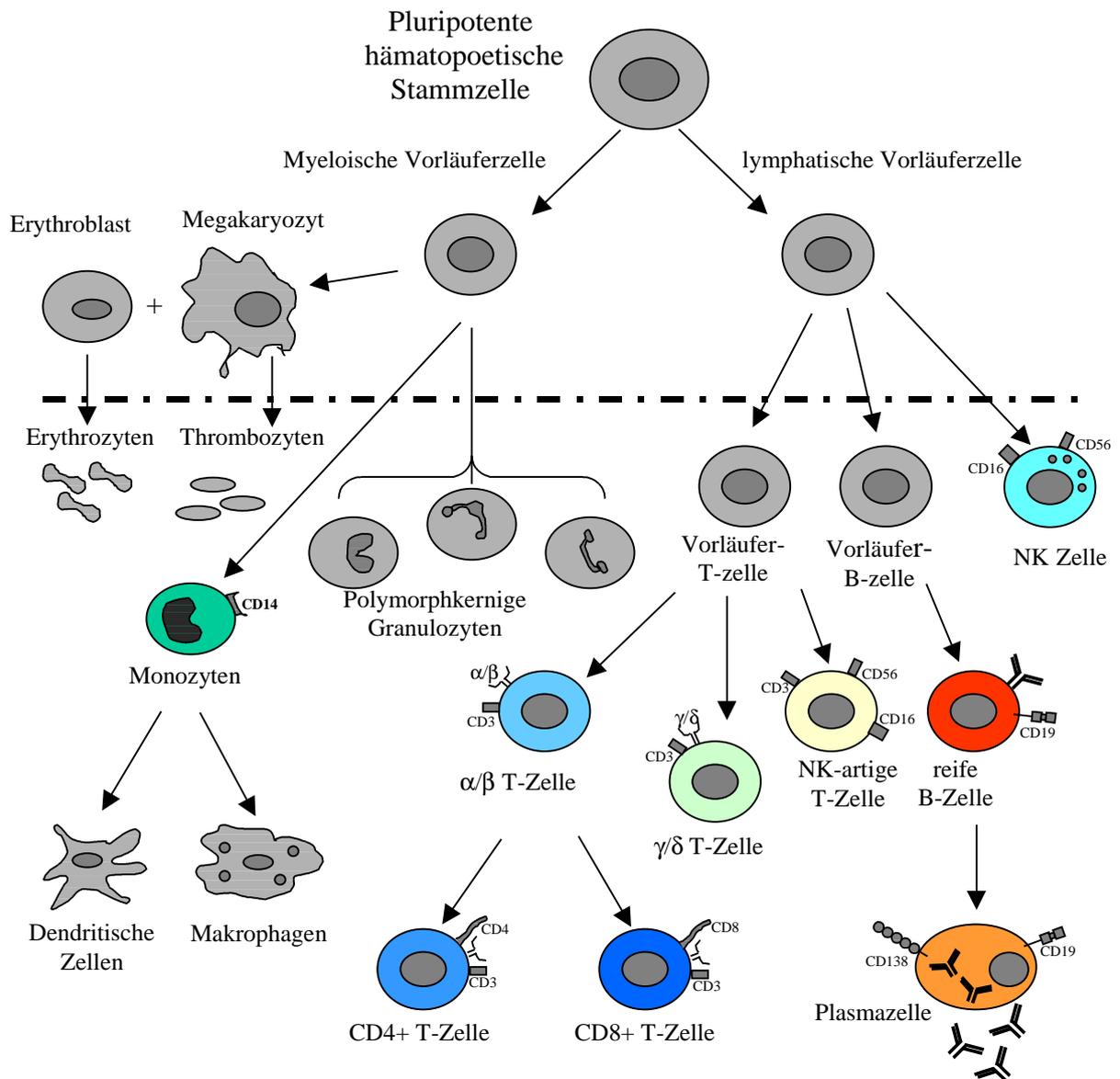


Abb. 1: Differenzierung von Immunzellen aus hämatopoetischen Stammzellen.

Aus pluripotenten Stammzellen leiten sich die myeloische Vorläuferzelle, aus der sich die polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten entstehen, und die lymphatische Vorläuferzelle ab, aus der die B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen und weitere Subpopulationen entstehen. B-Zellen reifen bereits im Knochenmark heran, während T-Zellen im Thymus ausdifferenzieren. Die unterschiedlichen Subpopulationen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind farblich hervorgehoben und mit dem jeweiligen zellspezifischen CD-Molekül versehen. CD: CD- (cluster of differentiation)-Antigene. (verändert nach Immunobiology, 2001).

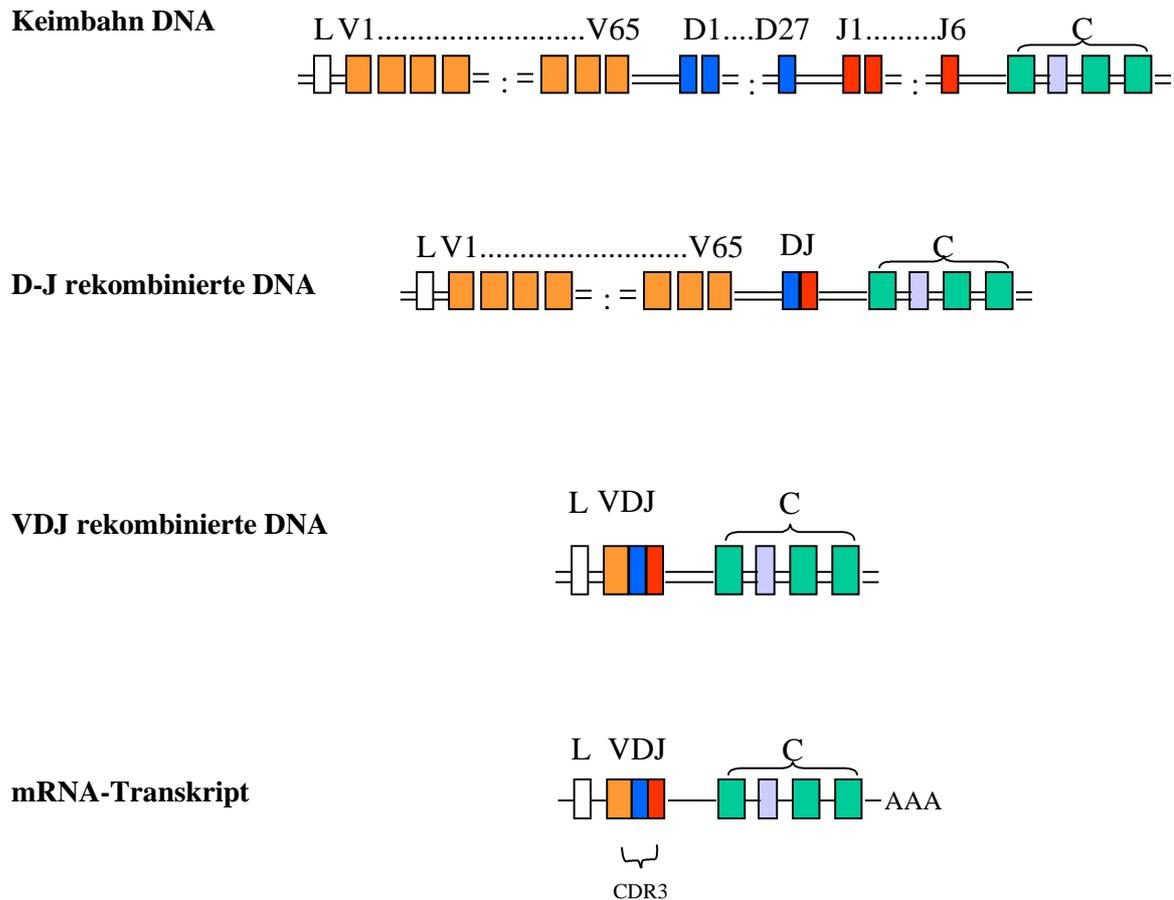
sind sie dann bereits in einer höheren Frequenz vorhanden, so dass die Sekundärantwort insgesamt effizienter ablaufen kann. Jede dieser Zellen trägt Rezeptoren mit nur einer einzigen Spezifität, die bereits vor dem ersten Antigenkontakt festgelegt ist. Theoretisch kann für jedes Antigen ein passender Rezeptor gebildet werden. Da dabei auch potentiell autoreaktive Zellen entstehen können, erfolgen noch am Ort der Zellreifung im Thymus (T-Zellen) bzw. Knochenmark (B-Zellen) Depletionen von autoreaktiven Zellen. Diese extrem hohe Diversität der Rezeptoren wird durch den Prozess der somatischen Rekombination von Rezeptorgenen während der Reifung von Lymphozyten ermöglicht. Die Rekombination erfolgt bei T-Zellen und B-Zellen in sehr ähnlicher Weise und wird im nächsten Abschnitt für B-Zellen näher beschrieben.

Hingegen erfolgt die Erkennung des Antigens auf unterschiedlichen Wegen. Während B-Zellen zellulär gebundene oder lösliche Proteinantigene in nativer Form binden, erkennen T-Zellen ihr Antigen nur in prozessierter Form als Peptidantigene. Dabei nehmen Antigen präsentierende Zellen (APCs), z.B. Monozyten, das Antigen auf, spalten es intrazellulär in kurze Peptidfragmente und präsentieren diese geladen auf einem MHC-Molekül den T-Zellen. Der T-Zell-Rezeptor (TCR), bestehend aus einem Heterodimer von α/β bzw. γ/δ Ketten, erkennt nur Antigene im Kontext von solchen körpereigenen MHC-Molekülen. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen. MHC Klasse I -Moleküle sind auf den meisten Körperzellen vorhanden und binden meist Peptide, die von im Zytosol abgebauten Proteinen stammen (z.B. virale Proteine). Die Erkennung des Antigen-MHC Klasse I Komplexes erfolgt über $CD8^+$ T-Zellen und führt zur Zytolyse der Antigen präsentierenden Zelle. $CD4^+$ T-Zellen binden dagegen Peptide, die auf MHC Klasse II-Molekülen (fast ausschließlich auf APCs wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert) präsentiert werden. Die Antigene stammen hierbei ursprünglich aus dem Extrazellulärraum und wurden endosomal in Vesikeln abgebaut. $CD4^+$ T-Zellen sind nach Antigen-spezifischer Aktivierung einerseits zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen und zytotoxischen Molekülen befähigt (T_H1CD4^+), andererseits sind sie bei der Aktivierung von B-Zellen von Bedeutung und werden daher auch als T-Helferzellen (insbesondere T_H2CD4^+) bezeichnet. Während T-Zellen für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich sind, erreichen B-Zellen ihre Effektorfunktion über die Sezernierung von löslichen Antikörpern und vermitteln auf diese Weise die sogenannte humorale Immunantwort.

2.1.2 Die humorale Immunantwort

Als humorale Immunantwort wird die durch Antikörper vermittelte Immunabwehr bezeichnet. Antikörper gehören zur Proteingruppe der Immunglobuline (Ig). B-Zellen sind die Zellen, die zur Antikörpersynthese befähigt sind. Sie tragen einen spezifischen, einzigartigen B-Zell Rezeptor auf der Zelloberfläche, mit dem sie Antigene, vorrangig native Antigene (Proteine, Polysaccharide, Lipide) erkennen [1]. Der B-Zell Rezeptor zeigt dabei dieselbe Spezifität wie der von der B-Zelle sezernierte Antikörper. Der Antikörper besitzt eine Y-Form, dessen Arme zwei identische Antigen-bindende Bereiche tragen, die jeweils aus einer schweren und einer leichten Kette zusammengesetzt sind (Abb. 2B). Während die leichte Kette aus einem variablen und einem konstanten Bereich besteht, besitzt die schwere Kette einen variablen Bereich, aber mehrere konstante Bereiche, welche den Stamm des Antikörpers bilden. Diese konstante Region, die den Isotyp des Antikörpers bestimmt, kann den fünf Hauptklassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) und den IgG-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 angehören und legt letztendlich die funktionellen Eigenschaften des Antikörpers fest. Der Isotyp richtet sich dabei nach der Stoffklasse des Antigens und dem Ort der Immunreaktion, und kann während einer Immunantwort einen Klassenwechsel erfahren, der nur in aktivierten B-Zellen erfolgen kann. Während der konstante Teil des Antikörpers die Effektorfunktion induziert, indem er z.B. an Rezeptoren von phagozytierenden Zellen oder Komplementfaktoren bindet, ist die variable Region des Antikörpers für die Spezifität zuständig. Die Spezifität wird während der Reifung einer B-Zelle im Knochenmark festgelegt. Dies erfolgt durch somatische Rekombination verschiedener Gen-Segmente im Immunglobulingen-Locus. Dabei spielen sog. Rekombinase Proteine eine wichtige Rolle. Die Gene für die Antigen-bindende, variable Region des Antikörpers setzen sich aus sogenannten V (variable)-, D (diversity)- und J (joining)-Segmenten zusammen. In der Keimbahn-DNA existieren von jedem Segment mehrere Kopien. Für die schwere Kette z. B. sind es 65 V-, 27 D- und 6 J-Segmente, die auf Chromosom 14 lokalisiert sind. Durch zufällige Rekombination einzelner Segmente wird die hohe Antikörperdiversität erreicht [2]. Abbildung 2 skizziert den Vorgang bei der Rekombination am Beispiel der schweren Immunglobulinkette des Antikörpers.

A



B

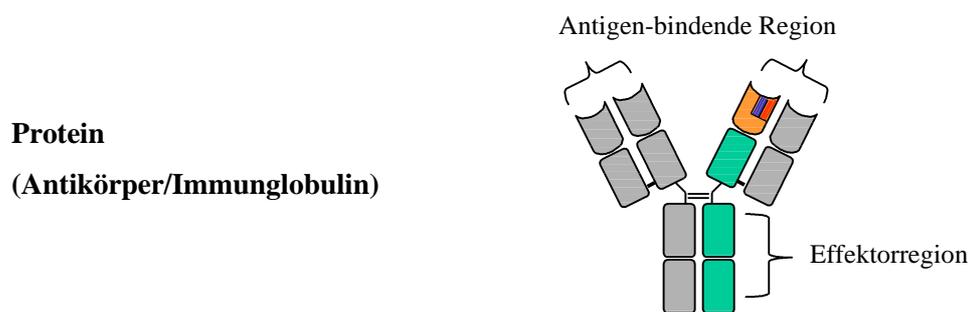


Abb. 2: Vorgang bei der somatischen Rekombination und Aufbau von Immunglobulin.

A Gezeigt ist die Rekombination der schweren Kette des B-Zell Rezeptors. Die Immunglobulinsegmente werden nach dem Zufallsprinzip miteinander verknüpft, wobei zunächst ein D- und ein J-Segment fusioniert, und anschließend das DJ-Segment mit einem V-Segment verknüpft wird. Die zwischen diesen Elementen liegenden Introns und nicht-kodierenden Bereiche werden entfernt. Beim Zusammenfügen der Elemente kommt es zu Ungenauigkeiten in der hypervariablen Region (CDR3), dies führt weiterhin zur erhöhten Diversität der Antigen-bindenden Region. Die VDJ-Sequenz wird nach der Transkription durch Spleißen mit einer Sequenz für die konstante Domäne verknüpft. B Struktur eines Immunglobulins. Nach der Rekombination der schweren Kette wird die leichte Kette rearrangiert und beide Ketten verknüpft und schließlich zu einem funktionellen Immunglobulin translatiert. Um eine Monospezifität der B-Zelle zu garantieren, wird nur ein Allel der schweren und leichten Kette produktiv rearrangiert (allele Exklusion).

Zunächst wird ein D-Segment mit einem J-Segment verknüpft. Danach folgt die Kopplung des V-Segmentes mit dem bereits verknüpften DJ-Segment. Es entsteht ein zusammenhängendes DNA-Stück, das die gesamte variable Domäne der schweren Kette kodiert. Beim Zusammenfügen der variablen Segmente kommt es zu gewissen Ungenauigkeiten durch zusätzlichen Einbau oder Deletion von Nukleotiden. Dieser Prozess führt zur weiteren Erhöhung der Antikörper-Vielfalt. Die Variabilität ist deshalb in den Verbindungsregionen zwischen den V-, D- und J-Segmenten am größten, diese Region wird als CDR3-Region bezeichnet. Die vollständig rearrangierte DNA-Sequenz wird nach der Transkription durch RNA-Spleißen mit einer Sequenz für die konstante Domäne kombiniert. Die leichten Ketten entstehen auf gleiche Weise, allerdings fehlen hier die D-Segmente. Die leichte Kette kann in zwei Formen vorkommen, der häufigeren Kappa-Kette, deren Gensegmente auf Chromosom 2 lokalisiert sind, und der seltener vorkommenden Lambda-Kette, deren Gensegmente sich auf Chromosom 22 befinden. Die schwere und die leichte Kette werden schließlich zu einem funktionsfähigen Molekül verbunden (Abbildung 2B). Die Assoziation der variablen Strukturen von schwerer und leichter Kette führt schließlich zur Antigen-bindenden Stelle des Antikörpers.

Theoretisch kann für jede Antigenstruktur ein passender B-Zell Rezeptor generiert werden. Dabei können potentiell autoreaktive B-Zellen, die körpereigenes Gewebe erkennen, entstehen. Noch im Knochenmark findet eine negative Selektion von autoreaktiven und nicht funktionsfähigen B-Zellen statt, die mit einer Depletion dieser einhergeht. Nur etwa 5-10% der B-Zellen -noch als unreife B-Zellen- verlassen das Knochenmark und reifen in den lymphatischen Organen zu reifen B-Zellen an, die zunächst die B-Zell Rezeptoren als IgD und IgM auf der Oberfläche tragen. Einer aktuellen Studie zufolge sind trotz Mechanismen der Depletion etwa 20% aller Antikörper, die von reifen B-Zellen produziert wurden, autoreaktiv [3]. Die Aktivierung von B-Zellen und Differenzierung zu Plasmazellen, die Antigen-spezifische Antikörper in großen Mengen produzieren können, findet in der Mikroumgebung der Keimzentren, einer spezialisierten Struktur in den lymphatischen Organen, statt [4]. Bei den Aktivierungsmechanismen unterscheidet man je nach Antigen zwischen thymusunabhängiger und thymusabhängiger Aktivierung. Bei der erst genannten erfolgt die Aktivierung direkt über unspezifische sogenannte thymusunabhängige Antigene, meist hochrepetitive Antigene wie z. B. Lipopolysaccharide oder Polypeptide. Die repetitiven Antigene induzieren eine Kreuzvernetzung der B-Zell Rezeptoren und damit eine Aktivierung der B-Zellen. Diese Immunantwort tritt sehr

schnell ein, es entsteht aber gewöhnlich keine Ausbildung eines Antigen-spezifischen Gedächtnisses. Diese Art der Aktivierung erfolgt ohne die Hilfe der T-Zellen und induziert normalerweise nur eine IgM-Antikörpersynthese ohne Ig-Isotyp-Klassenwechsel. Im Gegensatz dazu wird bei der thymusabhängigen Aktivierung die Hilfe der T-Zellen benötigt. Zu den thymusabhängigen Antigenen gehören z. B. Viren. Sie werden über den B-Zell Rezeptor spezifisch gebunden und über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen. Das Antigen wird dann intrazellulär in kurze Peptide abgebaut und über das MHC Klasse II-Molekül auf der Zelloberfläche den Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert. Zur Aktivierung der B-Zellen müssen die Antigen-spezifischen T-Helferzellen einerseits den Antigen-MHC-Komplex erkennen, andererseits muss der CD40 Ligand (T-Zellen) an den CD40 Rezeptor (B-Zelle) binden. Durch diese Interaktion kommt es zur Sekretion von Zytokinen, wodurch die B-Zellen zur klonalen Expansion stimuliert werden. Dadurch entstehen B-Zellen einer einzigen Spezifität mit identischer hypervariablen CDR3-Region. Dieses Ereignis findet in den Keimzentren der lymphatischen Organe statt (z.B. Milz oder den Lymphknoten).

Anders als T-Zellen sind B-Zellen, nachdem sie ihre Gene rearrangiert haben, fähig, die Struktur der variablen Regionen weiter zu verändern. Dieser Mechanismus wird als somatische Hypermutation bezeichnet. Dabei treten während der klonalen Expansion von zuvor aktivierten B-Zellen mit einer stark erhöhten Häufigkeit Punktmutationen in der rearrangierten variablen Region des B-Zell-Rezeptors auf [5]. Die konstanten Immunglobulingene sind dagegen nicht betroffen. Durch diesen Prozess, der in den Keimzentren mit Hilfe von folliculären dendritischen Zellen abläuft, entstehen Rezeptoren mit einer bis zu 1000-fach höheren Affinität zum Antigen. Dieses Phänomen wird als Affinitätsreifung bezeichnet und führt zur Selektion von B-Zellen mit hochaffinen Antikörpern. Im Verlauf einer humoralen Immunantwort wächst deshalb die Affinität der Antikörper zum Antigen. Bei einer Sekundärantwort gegen das gleiche Antigen ist die Affinität wesentlich höher als bei der Primärantwort. Gehäufte somatische Hypermutationen sind also Kennzeichen für eine Re-Exposition mit dem gleichen Antigen.

Bei der Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen durchlaufen die B-Zellen weiteren Immunglobulingen-Umordnungen, die zu einem Klassenwechsel der konstanten Regionen führen. Je nach Antigenklasse (Proteine, Polysaccharide, Allergene) wird ein spezieller Isotyp generiert. Das Wissen über den dominierenden Isotyp kann Hinweis auf Status der Immunantwort und auf das Pathogen liefern. Während bei einer akuten Infektion zunächst IgM-Antikörper gebildet werden, sind IgG-Antikörper Hinweis auf eine fortgeschrittene bzw. zurückliegende Infektion. Gedächtnis-B-Zellen sind durch IgG-Antikörper gekennzeichnet. Eine Dominanz der Isotypsubklassen IgG1 und IgG3 deuten auf Proteine (z.B. virale Antigene), während IgG2 und IgG4 auf Polysaccharide (z.B. bakterielle Antigene) bzw. Allergene hinweisen. Bei Erkrankungen mit unbekanntem Antigen kann diese Tatsache hilfreich zur Definition der zugrunde liegenden Antigenklasse sein.

2.2 Die Multiple Sklerose

2.2.1 Die Aetiologie der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems ZNS. Die Erkrankung beginnt typischerweise zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und ist die häufigste Ursache für neurologische Defizite im jungen Erwachsenenalter [6]. Durchschnittlich erkranken 0,05-0,15% der kaukasischen Bevölkerung an MS, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer [7]. Als neurologische Defizite können Seh-, Sensibilitäts-, Blasen- und Gangstörungen auftreten [8;9]. In 80-90% der Fälle beginnt die MS schubförmig, wobei sich klinische Verschlechterung in Form von plötzlich auftretenden neurologischen Symptomen und Rückgang der Beschwerden mit anschließender stabiler Phase abwechseln (relapsing-remitting, RR-MS). In 10-20 % kommt es von Beginn an zu einer stetigen klinischen Verschlechterung ohne Auftreten von akuten Schüben und Phasen der Erholung (primär chronisch progrediente MS, PP-MS). In der Spätphase der Erkrankung wechseln etwa 40 % der Patienten mit einer schubförmigen in eine progrediente Phase über (sekundär chronisch progrediente MS, SP-MS) [8-10]. Unbehandelt treten bei einem Drittel der Patienten im Verlauf der Erkrankung schwere Behinderungen (Rollstuhlpflichtigkeit oder Bettlägrigkeit) und bei einem weiteren Drittel deutliche Behinderungen (Einschränkung der Gehfähigkeit) auf. Bei dem Rest der Patienten sind nur leichte Einschränkungen auch nach Jahren der Erkrankung zu beobachten [11;12]. Diese Heterogenität der klinischen Verlaufsformen ist typisch für die MS. Trotz intensiver Studien hat man bislang noch keinen zuverlässigen prognostischen Faktor für den Verlauf der Erkrankung gefunden [11]. Ein weiterer wichtiger diagnostischer Befund sind Läsionen in der weißen Substanz des Gehirns und Rückenmarks, die durch kernspintomographische Bildgebungsverfahren (Magnetische Resonanz Tomographie, MRT) dargestellt werden können [13]. Auch hierbei konnte eine Heterogenität im Hinblick auf unterschiedliche Läsions-Profile bei den MS-Patienten beobachtet werden [14;15]. Die Läsionen entstehen durch Demyelinisierung der Neurone, als Folge derer eine verlangsamte Nervenleitung in den Ableitungen von evozierten Potentialen zu beobachten ist. Je nach Ort der Schädigung kann es zu entsprechenden neurologischen Ausfällen beim Patienten kommen. Die Beteiligung der weißen Substanz deutet auf eine Fokussierung der Erkrankung auf die Myelinhaltigen

Regionen hin. Der selektive Abbau der Myelin-Schichten lässt sich eindeutig an histopathologischen Untersuchungen des Hirngewebes von MS-Patienten demonstrieren. Akut demyelinisierende Läsionen sind durch Infiltration von Immunkomponenten, Demyelinisierung mit Zeichen der Remyelinisierung, Gliose und Axonverlust charakterisiert [16]. Das Ausmaß und die Qualität der Immunreaktion, der De- und Remyelinisierung variiert stark zwischen unterschiedlichen Patienten [17;18]. Damit spiegeln auch die histopathologischen Veränderungen die klinisch und kernspintomografisch nachweisbare Heterogenität der Erkrankung wider.

Ein wichtiger labordiagnostischer Zusatzbefund ist eine entzündliche Veränderungen im Liquor, gekennzeichnet durch eine leichte Pleozytose (Zellzahl > 4/µl) und eine intrathekale, d.h. im ZNS stattfindende IgG-Synthese.

Die Therapie der MS ist immer noch als problematisch einzustufen. Obwohl erste Medikamente einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf gezeigt haben (Beta-Interferone, Glatirameracetat, Mitoxantron), kann durch die Gabe dieser Substanzen allenfalls eine leichte Verzögerung der Krankheitsprogression erreicht werden [19;20].

2.2.2 Die Rolle des Immunsystems bei der MS

Seit Beginn des vorletzten Jahrhunderts wird die Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese der MS diskutiert. Histopathologisch findet sich typischerweise eine Infiltration des ZNS durch Immunzellen, insbesondere T-Zellen und Monozyten/Makrophagen, aber auch B-Zellen und Plasmazellen und eine Aktivierung der Makrophagen und Mikroglia. Diese pathologischen Veränderungen sind in der Form nicht im gesunden ZNS zu beobachten [21]. Ferner findet man in unterschiedlichem Maße Antikörperablagerungen und Komplementaktivierung in den akuten Hirnläsionen [22]. Das Ansprechen auf Steroide bei Patienten mit akutem Schub spricht ebenfalls für die Beteiligung von entzündlichen Komponenten bei der MS. Seit Mitte des letzten Jahrhunderts ist sicher, dass MS-Patienten intrathekal IgG synthetisieren und im Liquor sogenannte oligoklonale Immunglobulin- G-Banden (OKB) auftreten [23]. Diese OKBs, die eine Ansammlung von Antikörpern gegen einige wenige Antigene darstellen, werden im Serum dieser Patienten nicht gefunden. Das Muster bleibt über einen langen Zeitraum stabil [24]. Solche OKBs findet man gewöhnlich nicht im Liquor von gesunden Menschen, jedoch auch bei Patienten mit anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS, z. B. der Neuroborreliose, der Herpes-Enzephalitis und nach Maserninfektionen des ZNS

(subacute sclerosing panencephalitis, SSPE). Interessanterweise sind die OKBs bei diesen Erkrankungen gegen das krankheitsverursachende Pathogen gerichtet (zusammengefasst in [25]. Dies sind z.B. Borrelien-Antigene bei der Neuroborreliose [26], Masern-Viren bei der SSPE [27] und Herpes-virale Antigene bei der Herpes-Enzephalitis. Aufgrund dieses Erkenntnis und der Tatsache, dass 95% der MS-Patienten solche OKBs aufweisen, war die Analyse der Spezifität der OKBs lange Zeit Gegenstand der Forschung. Da sie aber erfolglos blieb, verfiel sie zeitweise in den Hintergrund und hat auf Grund der Entwicklung neuer Methoden aktuell wieder an Interesse gewonnen [28].

Der Befund der OKBs wird durch aktuelle molekularbiologische Untersuchungen des B-Zell Rezeptors reflektiert. Diese Studien konnten anhand der molekularen Analyse der variablen Regionen der schweren Kette des B-Zell Rezeptors klonale bzw. oligoklonale Expansionen von B-Zellen in Hirnläsionen [29;30] und im Liquor [31-33] nachweisen, die in der Form nicht im peripheren Blut beobachtet wurden [30]. Hingegen scheint das B-Zell Repertoire im Liquor von akuten infektiösen ZNS-Erkrankungen wie der viralen Meningitis polyklonal zu sein [32]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der B-Zell Rezeptor der im ZNS expandierten B-Zellen in der hypervariablen Region somatischen Hypermutationen unterliegt [31;32]. Dieses Phänomen der Antigenreifung durch Einbringen von Mutationen in der variablen Region wird nur bei wiederholter Exposition mit dem gleichem Antigen erreicht. Gleiches beobachtet man bei der SSPE, bei der somatische Hypermutationen in den ins ZNS infiltrierenden B-Zellen auf eine Antigen-induzierte Immunantwort gegen das bekannte Masern-Antigen hinweisen [34]. Diese Befunde sprechen für eine stark fokussierte und für eine gegen einige wenige im ZNS residente Antigene gerichtete Immunantwort bei der MS. Untermauert wird diese Hypothese durch molekulare Untersuchungen von T-Zellen, die eine klonale bzw. oligoklonale Anreicherung von CD8+ T-Zellen sowohl im Liquor [35] als auch in akuten Hirnläsionen [36], aber nicht im peripherem Blut aufzeigten. Trotz großer Anstrengungen in der Forschung sind die Zielantigene der MS bisher noch unbekannt.

2.2.3 Mögliche Zielantigene bei MS

Bisher ist ungeklärt, welcher Pathomechanismus bei der MS zugrunde liegt. Die Kenntnis über den Pathomechanismus würde aber Hinweise auf die Zielstrukturen der Immunantwort liefern. Grundsätzlich werden drei Modelle vertreten: 1. das infektiöse Modell, 2. das Autoimmunitätsmodell und 3. das Modell des Molekularen Mimikry. Vor

dem Hintergrund der Heterogenität der Erkrankung könnten durchaus unterschiedliche Pathomechanismen wirken. Dabei spielt der genetische Kontext wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Tatsächlich ist das Risiko für Familienmitglieder von MS-Patienten erhöht. So ist das Risiko um das 10-fache erhöht für Kinder von MS-Patienten und sogar um das 250-fache bei eineiigen Zwillingen [37].

Erstaunlicherweise liegt die Konkordanzrate von 30% bei eineiigen Zwillingen aber relativ niedrig, so dass man diesen Befund als Hinweis für die Bedeutung von Umweltfaktoren, z. B. infektiösen und übertragbaren Faktoren in der Pathogenese der MS gewertet hat (infektiöses Modell). In der Tat haben epidemiologische Studien und Migrationsstudien die Beteiligung von Umweltfaktoren am Erkrankungsprozess belegt. Das Risiko ist am höchsten in Ländern mit moderatem Klima [38]. Migration von Gebieten mit hohem MS-Risiko in Länder mit niedrigem Risiko vor der Pubertät reduziert das Risiko, an MS zu erkranken. Hingegen steigt das Risiko im umgekehrten Fall [39]. Sogenannte MS-Epidemien belegen zusätzlich die Bedeutung eines möglicherweise infektiösen Faktors. Auf den Faroer Inseln beispielsweise war die MS unbekannt bis zu dem Zeitpunkt, als britische Soldaten 1940 landeten [40]. Mittlerweile tritt die MS in gleicher Häufigkeit wie in anderen europäischen Ländern auf. Nicht weniger als 20 verschiedene Viren und Bakterien sind in der Pathogenese der MS diskutiert worden, jedoch konnte bisher kein Pathogen sicher mit der MS assoziiert werden.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen am Tiermodell der MS, der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE), kam die Theorie des autoimmunen Prozesses bei der MS auf (Autoimmunitätsmodell). Das Modell wurde aus der Beobachtung entwickelt, als eine Rabies-Immunisierung von Patienten mit einem mit Myelin-kontaminierten Impfstoff akute Demyelinisierungen im ZNS auslöste. Es wurde folgend die Hypothese aufgestellt, dass Myelinantigene eine Autoimmunreaktion im Hirn auslösen könnten. Diese These wurde für das Tiermodell bestätigt. Immunisierung mit Myelin-Antigen und Freund's Adjuvanz in ausgewählten Mausstämmen kann eine entzündliche und demyelinisierende EAE auslösen [41]. Neben T-Zellen spielen Myelin-spezifische Antikörper eine pathogenetische, krankheitsmodulierende Rolle bei der EAE [42;43]. Da es bei der MS insbesondere zur Destruktion der Axon-umhüllenden Myelinscheiden kommt, wird bis heute ein Autoimmunprozess, das heißt eine fehlgeleitete Reaktion des menschlichen Immunsystems gegen hirneigene Zielstrukturen, favorisiert [44]. Myelin-Antigene, wie das Myelin basische Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten

Glykoprotein (MOG) bzw. das Proteolipid-Protein (PLP), werden auch bei der MS als Zielstrukturen angenommen. Myelin-spezifische Antikörper werden zwar im Serum und Liquor von MS-Patienten gefunden [45], man findet sie aber auch bei gesunden Kontrollen oder bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen [46;47]. Des Weiteren konnten Myelin-spezifische T-Zellen auch bei gesunden Patienten gefunden werden, was die Annahme zulässt, dass autoreaktive T-Zellen und Autoantikörper Teil des normalen Repertoires sind [44]. Bisläng ist der Beweis nicht erbracht, dass tatsächlich Myelin-Antigene eine Rolle in der Pathogenese der MS spielen.

Ein weiterer Mechanismus, der als Molekulares Mimikry bezeichnet wird, stellt einen recht überzeugenden Ansatz dar. Dabei könnte ein infektiöses Agens Immunzellen aktivieren, die zwar primär gegen den Erreger gerichtet sind, aber gleichzeitig mit Antigenen im ZNS kreuzreagieren und so versehentlich eine Entzündungsreaktion im ZNS verursachen [48;49].

Trotz intensiver Studien ist das krankheits-assoziierte Antigen bei der MS immer noch unbekannt. Die Erkenntnis über die Zielstruktur der Immunantwort wäre allerdings ein bedeutender Schritt zur Klärung der Pathogenese und Ursache der MS sowie eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von MS-spezifischen Therapien. Im Hinblick auf die Heterogenität der MS ist die Beteiligung von unterschiedlichen Pathomechanismen und damit unterschiedlichen Zielstrukturen durchaus vorstellbar.

3 AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Immunzellen aus dem Liquor von MS-Patienten flusszytometrisch untersucht und mit Kontrollpersonen verglichen werden. Ziel war es, charakteristische Veränderungen bei MS-Patienten im Liquor auszuarbeiten. Die Analyse eines großen MS-Kollektivs sollte klären, ob sich die bekannte Heterogenität der MS auch in der Liquorpathologie widerspiegelt. Es sollte ein stabiler Parameter identifiziert werden, der eine Stratifizierung der MS-Patienten in unterschiedliche Subgruppen anhand der Liquorpathologie erlaubt. Weiterhin war zu klären, ob die unterschiedlichen pathologischen Liquorveränderungen Hinweise auf die zu erwartende Krankheitsprogression liefern können und ob somit ein prognostischer Liquor-Marker definiert werden kann.

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der Antigen-spezifität der OKBs im Liquor von MS-Patienten. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Proteinexpressions-Array, basierend auf einer cDNA-Bibliothek des menschlichen Gehirns, eingesetzt und die Immunreaktivität von Antikörpern aus dem Liquor gegen diese Proteine bestimmt. Die Immunreaktivitäten gegen die potentiell MS-spezifischen Kandidatenantigene sollten in MS- und Kontroll-Kollektiven mittels ELISA analysiert und die Epitope der Kandidatenantigene bestimmt werden. Mit Hilfe der identifizierten Epitope sollte eine Suche nach den korrespondierenden in der Natur vorkommenden Proteinen durchgeführt werden, und die Immunreaktivitäten gegen diese Proteine in Serum und Liquor von MS-Patienten mit Kontrollen verglichen werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob die Antigen-spezifischen Antikörper intrathekal synthetisiert werden und ob sie Teil der OKBs im Liquor von MS-Patienten sind.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MS-Patienten und Kontrollpersonen

Patienten mit definitiver MS und Kontrollpatienten wurden in der Klinik für Neurologie in Marburg rekrutiert. Als Kontrollpersonen dienten Patienten mit nicht-entzündlichen Erkrankungen (NIND) und Patienten mit anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS (OIND) ohne MS-ähnliche Symptome. Alle Patienten wurden von erfahrenen Neurologen der Klinik auf ihre neurologischen Symptome untersucht und klinische Parameter wie die Krankheitsdauer, der Krankheitsverlauf (RR-MS, SP-MS, PP-MS) und der EDSS (expanded disability status scale) ermittelt. Der EDSS beurteilt die momentane Schwere der Erkrankung. Das Ethik-Komitee der Philipps-Universität Marburg hat die Untersuchungen bewilligt.

4.2 Flusszytometrische Methoden

Die 4-Farben Flusszytometrie ermöglichte unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle die Untersuchung von verschiedenen Immunzellen aus dem peripheren Blut und Liquor von MS-Patienten und Kontrollen.

4.2.1 Antikörper

Die monoklonalen Antikörper waren FITC (Fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin chlorophyll- α Protein) bzw. APC (Allophycocyanin) gekoppelt, wodurch durch Kombination selektiver Antikörper die Analyse von unterschiedlichen Leukozytenpopulationen möglich war. Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

anti-CD4-APC (clone RPA-T4), anti-CD19-APC (clone HIB19), anti-CD45-APC (HI 30), alle von Pharmingen (New Jersey, USA); anti-CD138-PE (clone B-B4), anti CD14-FITC (clone RMO52), anti-T Zell Rezeptor (TCR) α/β - PE (clone BMA 031), anti-TCR γ/δ -FITC (clone Immu 510), anti-CD3-FITC (clone UCHT-1), alle von Immunotech (New Jersey, USA); anti-CD8-PerCP (clone SK1), anti-CD16-PE (clone B 73.1), anti-CD56-PE (clone NKAM 16.2), anti-CD3-PerCP (clone SK 7), alle von Becton Dickinson (BD, NJ, USA). Die Antikörper wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: 1. CD3-FITC, CD56/16-PE, CD8-PerCP, CD4-APC; 2. CD14-FITC, CD138-PE, CD3-PerCP, CD19-

APC; 3. TCR γ/δ -FITC, TCR α/β -PE, CD3-PerCP, CD45-APC; 4. IgG-FITC, IgG-PE, IgG-PerCP, IgG-APC (Isotyp Kontroll Färbung zur Überprüfung der unspezifischen Färbung). Der Anteil der positiv markierten Zelltypen wurde auf den Anteil CD45 positiver Zellen bezogen. Für die Phänotypisierung von B-Zell Subpopulationen wurden anti LFA-1-FITC (clone M17/4), anti-CD21-FITC (clone B-ly-4), anti-CD22-FITC (clone HIB22), anti- CD80-FITC (clone MAB104), anti-VLA-4-FITC (clone HP2/1), anti-CD40-PE (clone HM40-3), anti-HLADR-FITC (clone B8.12.2) (alle von Immunotech) und anti-CD27-FITC (clone 9F4), anti-CD86-PE (clone HA5.2B7) (alle von BD) eingesetzt.

4.2.2 Färbung von peripherem Blut

Das Blut wurde 1:1 mit PBS (Gibco, Eggenstein) verdünnt und 200 μ l dieser Mischung in eine 96-Mikrotiterplatte so pipettiert, dass um jeden befüllten Napf ein Napf freigelassen wurde. Die Platte wurde zentrifugiert (300g, 4 min) und der Überstand gut abgeworfen. Das Zellepelett wurde mit 5 μ l der jeweiligen Antikörpermischung sorgfältig resuspendiert und die Platten 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten durch zweimaliges Inkubieren (10 min, RT, im Dunkeln) mit 1x Ammoniumchloridlösung (BD) lysiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS+2%FCS und Zentrifugieren wurden die Zellen in 150 μ l Cellwash (BD) aufgenommen, in Falcon-Röhrchen (BD) überführt und am Flusszytometer (FACScalibur, BD) analysiert.

4.2.3 Färbung von Liquor

Für jede Färbung wurden mindestens 6000 Liquorzellen eingesetzt, die in 30 μ l PBS+5%FCS aufgenommen wurden. Die Färbung von Liquorzellen wurde wie im Blut durchgeführt (siehe Kap.4.2.2). Da im Liquor gewöhnlich keine Erythrozyten enthalten sind, war hierbei keine Lyse nötig. Mindestens 1000 Zellen wurden pro Messung aquiriert.

4.3 Messung der intrathekalen Antikörper-Synthese

Der Albumin- und Proteingehalt sowie die Menge an IgG im Liquor und Serum wurde nephelometrisch mit einem BN II-Nephelometer (Behring, Marburg) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die intrathekale IgG-Synthese wurde nach der Reiber-Formel [50] bestimmt, die die Schrankenfunktion mit Hilfe des Quotienten von Albumin im Serum versus Liquor einbezieht. Zur Messung der Antigen-spezifischen intrathekalen Synthese wurde Serum und Liquor auf gleiche Konzentration von IgG eingestellt und der Quotient

aus der Reaktivität (gemessen in OD, optical density) im Liquor und Serum berechnet. Ein Quotient $> 1,2$ wurde dabei als Hinweis für eine intrathekale IgG-Synthese gewertet.

4.4 Protein-Array

In dieser Studie wurden sogenannte Protein-Arrays verwendet, die von der Arbeitsgruppe Prof. Lehrach, Max-Planck Institut für Molekulare Genetik in Berlin, entwickelt und in Kooperation mit dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung in Berlin (RZPD) bezogen wurden. Die Protein-Arrays enthielten 37000 Proteine aus cDNA Expressions-Klonen einer ZNS-Bibliothek des foetalen Gehirns [51]. Der Array wurde mittels Oligo-fingerprinting weitgehend im Hinblick auf nicht-redundanter Expression optimiert. Die Proteine wurden mit einem N-terminalen HIS-Tag in *E. coli* exprimiert und in Duplikaten in einem bestimmten Muster auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Jeder Expressionsklon konnte einzeln über das RZPD bezogen werden.

4.5 Identifikation von Immunreaktivitäten auf Protein-Array

Der Protein-Array wurde zunächst mit 70% Ethanol vernetzt, zwischen zwei Filtermatten abgetrocknet und 2 x 10 min in TBS-T (TBS+0,05% Tween-20) und 1 x 10 min in TBS (20mM Tris-HCl, pH 7.5; 150mM NaCl) gewaschen. Anschließend wurde der Protein-Array in Blockpuffer (3% Magermilchpulver in TBS) für 2 h unter leichter Bewegung auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Der Array wurde nach dem Blocken 14 h mit Liquor bzw. Serum von MS-Patienten bzw. Kontrollpersonen inkubiert. Dabei wurde die Antikörperkonzentration der jeweiligen Probe auf 10mg/l IgG in Blockpuffer verdünnt. Es folgte gründliches Waschen der Array-Membran (3 x 10 min in TBS-T und 1 x 10 min in TBS). Anschließend wurde die Membran in Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-humanen IgG-Antikörper (DAKO, Hamburg) (1:2000 verdünnt in Blockpuffer) für 1 h inkubiert und 3 x 10 min in TBS-T und 1 x in TBS gründlich gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Einlegen der Membran in stabilisiertes TMB-Substrat (Promega, Madison, USA) für ca. 5 min. Die Reaktion wurde durch kurzes Einlegen in deionisiertes Wasser gestoppt. Nach Trocknung auf Filtermatten wurde die Membran eingescannt und die Reaktivitäten ausgewertet. Zur Klärung einer möglichen unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers, wurde zu Beginn der Versuchsreihe eine Membran ohne Patienten-Antikörper (primärer Antikörper) und nur mit dem sekundären Antikörper behandelt. Des Weiteren wurden in jedem Versuch je eine

Membran mit einer Probe von einem MS-Patienten und parallel eine Membran mit einer Probe eines Kontrollpatienten prozessiert.

Folgende Bedingungen mussten erfüllt sein, damit eine Reaktivität als positiv gewertet wurde: 1. die „spots“ aus einem Quadranten mussten in einem möglichen Muster doppelt erscheinen, da die Bakterienklone in einem spezifischen Muster in Dupletten angeordnet waren; 2. die Reaktivitäten mussten sich deutlich von der Hintergrund-Reaktivität abheben; 3. Reaktivitäten, die ausschließlich bei MS-Patienten auftraten und nicht bei Kontrollpersonen wurden als potentiell interessante Kandidatenantigene gewertet und für die weiteren Analysen ausgewählt. Die den Reaktivitäten zugrunde liegenden Bakterienklone wurden über ein Gridsystem identifiziert und beim Ressourcenzentrum als Bakterienstock angefordert.

4.6 Anzucht von Bakterien

Für das mikrobiologische Arbeiten wurde ausschließlich mit sterilen Materialien gearbeitet. Agar und Kulturmedien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Substanzen wurden mittels Sterilfilter einer Porengröße von 0,22 µm (Millipore, Eschborn) steril filtriert. Zur selektiven Anzucht von plasmidtragenden Klonen wurde dem Medium das Antibiotikum Ampicillin (100µg/ml, Sigma, Deisenhofen), für welches das Plasmid Resistenzgene enthielt, zugegeben.

Eine Anzucht auf Festmedium erfolgte z.B. nach einer Transformation, um Einzelzellkolonien zu erhalten. Dazu wurde ein Aliquot von ca. 50 µl der Bakterienzellsuspension mit einer Pipette auf dem Festagar (32g/l LB Agar, Invitrogen) verteilt. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Für das Anlegen einer Vorkultur wurden 5-8 ml LB-Kulturmedium (20g/l LB Broth Base Agar, Invitrogen) mit je einem Klon von der Agarplatte angeimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Aus der Vorkultur wurde entweder eine Plasmidaufreinigung durchgeführt oder eine Hauptkultur für die Proteinexpression angelegt.

4.7 Plasmidisolierung

Die Plasmid-DNA wurde aus den Bakterienklonen, die positive Immunreaktivitäten auf den Protein-Array zeigten, isoliert. Die anschließende Sequenzierung des Plasmid-Inserts erlaubte die Identifikation der zugrunde liegenden cDNA und damit des Proteins. Die Plasmidisolierung wurde mit 3 ml einer Übernacht-Bakterienkultur mit dem QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anweisung des Herstellers durchgeführt.

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation der cDNA-Inserts wurde der folgende forward-Primer: 5' TGAGCGGATAACAATTTTCACACAG-3' und der folgende reverse-Primer: 5' GGCAACCGAGCGTTCTGAAC-3' verwendet. Das Primerpaar war spezifisch für Sequenzen im pQE30 Plasmid und umspannte so die inserierte cDNA. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Peltier Cycler PTC200, Biozym, Hess. Oldendorf) oder für Temperaturgradienten-PCR im Gradienten-Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg). Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 22,5 µl PlatinumMix Reaktionspuffer (Invitrogen, Karlsruhe); je 1 µl forward und reverse Primer, 1,25 µl DMSO und 3 µl Plasmid-DNA. Folgendes PCR-Protokoll wurde angewandt: initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min; 33 Zyklen mit zyklischer Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 59°C für 30 sec und DNA-Synthese bei 72°C 150 sec mit anschließender terminaler Elongation bei 72°C für 15 min. Alle Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und in einer Konzentration von 5 pmol/µl eingesetzt.

4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Amplifikate wurde ein 2% Agarosegel hergestellt. Die Agarose (Biozym) wurde mit 1xTE-Puffer (Invitrogen) versetzt, in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlung mit einem DNA-färbenden Farbstoff (SYBR-Gold, Molecular Probes, Leiden, NL) gemischt. Als Längenstandard wurde eine 100 bp bzw 1 kbp-Leiter (Invitrogen) verwendet.

4.10 DNA-Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden zunächst mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 5 µl des PCR-Produktes mit

6 µl Big Dye (Applied Biosystems), 8 µl HPLC-Wasser und 1 µl forward-Primer versetzt und die Reaktion bei 55°C mit 25 Zyklen durchgeführt. Nach Aufreinigung mittels CentriSep Spin Columns (Princeton Separations, NJ, USA) wurde das Produkt mit einem DNA-Sequenzierer (ABI Prism 310, Applied Biosystems) sequenziert.

4.11 Identifikation des Proteins

Nach der Sequenzierung des cDNA-Inserts erfolgte die Identifikation des Proteins. Der forward-Primer erlaubte die Ansequenzierung vom 5'-Ende. Hierdurch konnte die inserierte cDNA über Blast-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) identifiziert werden. Über die 6xHIS-Sequenz auf dem Vektor konnte das Leseraster der inserierten cDNA leicht ermittelt werden. Hierbei wurde die Basensequenz des inserts zunächst mit Hilfe des Programms ExpASy (<http://www.expasy.org>) in die Aminosäure (AS)-Sequenz übersetzt. Diejenige AS-Sequenz, die sich im Leseraster mit der N-terminalen 6xHIS Sequenz befand, wurde als das tatsächlich in vivo exprimierte Protein ermittelt. Mit dieser AS-Sequenz wurde eine Blast-Suche nach Sequenzhomologien zur Identifikation des korrespondierenden Proteins durchgeführt.

4.12 Proteinexpression

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid (IPTG; Sigma) induziert. Dazu wurden zunächst 500 ml LB-Medium mit 5 ml der Bakterien-Vorkultur versetzt. Die Bakterienzeldichte in der Flüssigkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei 600 nm (OD_{600}) gegen LB-Medium ermittelt. Bei einer Bakteriendichte von OD_{600} 1,0 wurde die Kultur mit 0,4 mM IPTG versetzt und je nach Expressionslevel der Klone 2-8 h im Schüttelinkubator bei 22-37°C inkubiert.

4.13 Aufreinigung von Proteinen

Nach der Expressionsinduktion wurden die Bakterien durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 5000 rpm sedimentiert und das Pellet bei -80°C bis zur Proteinaufreinigung eingefroren. Anschließend wurden die Bakterien mittels Lysepuffer aufgeschlossen und das Protein aufgereinigt.

4.13.1 Aufreinigung von HIS-Fusionsproteinen

6xHIS fusionierte Proteine wurden auf Ni²⁺-Chelator-beschichteten Säulen (Ni-NTA Spin Kit, Qiagen) immobilisiert und unter denaturierenden Bedingungen nach Protokoll vom Hersteller aufgereinigt.

4.13.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das B-PER GST Spin purification Kit (Pierce, Illinois, USA) wurde zur Aufreinigung von GST-fusionierten Proteinen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer XCell-Mini-Cell Elektrophorese-Kammer (Invitrogen) durchgeführt. 15 µl der verdünnten Proteinlösung wurden mit 2 µl 4xProbenpuffer (Invitrogen) gemischt, 5 min bei 90°C erhitzt und anschließend über ein 4-12% Gradientengel (Invitrogen) für 30 min bei 200 V aufgetrennt. Parallel wurde ein Protein-Standard Marker (Multi-colored Standard, Invitrogen) eingesetzt. Das prozessierte Gel wurde 1 h in Coomassieblue-Lösung (Biorad, München) gefärbt und anschließend für zwei Stunden in deionisiertem Wasser entfärbt.

4.15 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran (western-blot)

Zum immunologischen Nachweis wurden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach einem Semidry-Verfahren über ein zwischen zwei Platten angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,45µm; Invitrogen) transferiert. Der Proteintransfer wurde bei 30V für 1h durchgeführt. Ein erfolgreicher Transfer wurde durch 20-minütige Inkubation der Membran in einer die Proteine darstellenden Ponceau-Färbelösung (Sigma) überprüft.

4.16 Immunologischer Nachweis von Protein (Immuno-Western-Blotting)

Nach dem Blotten der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer (3% Magermilchpulver in TBS) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 1 h in einer Lösung des primären Antikörpers (in einer bestimmten Verdünnung in Blockpuffer) inkubiert. Hierbei wurde je nach Fragestellung der anti-HIS-Antikörper (Qiagen), anti-GST-Antikörper (Pierce) oder Liquor bzw. Serum-Antikörper von Patienten verwendet. Nach 3 x 5 min Waschen mit TBS-T wurde die Membran in einer 1:2000 verdünnten Lösung des sekundären Antikörpers in Blockpuffer 1 h inkubiert. Die Membran wurde anschließend gründlich in 3 x 5 min in TBS-T und 1 x 5 min in TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Einlegen in stabilisiertem TMB-Substrat (Promega). Um schwache Immunreaktivitäten detektieren zu können, wurde das sensitivere ECL-System (Amersham, Freiburg) gewählt und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die lumineszierende Bande wurde in der Dunkelkammer auf einem ECL-Röntgen-Film (Amersham) abgelichtet. Die Belichtungsdauer war sehr variabel und abhängig von der Proteinkonzentration und Reaktivität, gewöhnlich wurde zwischen 15 und 150 sec belichtet.

4.17 Enzyme-linked-immunoabsorbent assay (ELISA)

Eine definierte Anzahl von Näpfen einer Polysteren ELISA-Platte (Dynex, Chantilly, USA) wurde mit 100 µl der Protein- bzw. Peptidlösung in einer Konzentration von 0,1-10 µg/ml in 0,05 M Bikarbonat-Puffer beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Für jedes Kandidatenantigen wurde die optimale Konzentration ermittelt. Die Näpfe wurden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette mit 250 µl Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween-20) 2 x gewaschen und nach dem letzten Waschschrift auf Tüchern abgeklopft. Jeder Napf wurde mit 250 µl mit Blocklösung (3% Milchpulver in PBS) befüllt und 2 h bei RT inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit Waschpuffer und Abklopfen der restlichen Flüssigkeit wurden die Patientenproben in einem Volumen von 100 µl in die entsprechenden Näpfe aufgetragen. Die Patientenproben waren vorher bereits in Cluster-Tubes verdünnt, so dass eine schnelle Auftragung mit einer Multikanal-Pipette möglich war. Dabei wurde (wenn im Text nicht anders angegeben) der Liquor 1:5 und das Serum 1:100 verdünnt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei RT wurden die Näpfe 3 x mit Waschpuffer gewaschen und die Platten gut abgeklopft. Anschließend wurden 100 µl einer 1:2000 Verdünnung des anti-humanen IgG-Antikörper (DAKO) in 3% Milchpulver in PBS in jeden Napf pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden 4 x mit Waschpuffer gewaschen und gründlich abgeklopft. TMB-Substrat und Wasserstoffperoxid wurden nach Herstellerangaben 1:1 gemischt und 100 µl dieser Lösung (KPL, Maryland, USA) in jeden

Napf pipettiert. Positive Immunreaktivitäten wurden durch eine zunehmend blaue Färbung gekennzeichnet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt und durch Messung der OD bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Messgerät gemessen.

4.18 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur isoelektrischen Fokussierung der Proteine im Liquor von Patienten wurden Titan-Gele der Firma Helena (Titan Gel, Rolf Greiner Biochemica) verwendet und die Fokussierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Auf einem Gel konnten gleichzeitig 10 verschiedene Proben (je 6 µl) fokussiert werden. Für die Analyse der Antigen-spezifischen Bindung der OKBs an die Kandidatenantigene wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet [52]. Dazu wurde eine Nitrozellulosemembran entsprechend der Taschengröße des Titan-Gels zurecht geschnitten und 2 h mit dem zu analysierenden Protein (50 µg/ml) in 0,1 M Carbonatpuffer bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 1 x 5 min mit Waschpuffer (PBS-0,1% Tween-20) gewaschen, in 10% Magermilchpulver in PBS für 2 h oder über Nacht geblockt, wiederum 1 x 5 min gewaschen und 30 min bei RT getrocknet. Nach der IEF wurden die Protein-beschichteten Membranen so auf das Gel aufgebracht, dass die Membranen die IEF-Laufspur der Proben abdeckten. Anschließend wurde durch das Auflegen eines 2 kg-Gewichtes der Transfer der OKBs ermöglicht. Aufgrund des Blockens mit 10% Magermilchpulver wurden nur die für das Protein spezifischen Antikörper auf die Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen und in anti-humanem IgG-Antikörper (1:2000 in 3% Magermilchpulver in PBS) für 1 h inkubiert. Nach gründlichem Waschen (3 x 5 min in Waschpuffer und 1 x 5 min in PBS) wurde die Reaktivität zunächst mittels ECL-System und anschließend nach kurzem Waschen in PBS mit stabilisiertem TMB detektiert. Eine unspezifische Bindung der OKBs an die Nitrozellulose-Membran konnte durch den nicht vorhandenen Transfer der OKBs auf eine Membran, die nur in 10% Milchpulver inkubiert wurde, ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Qualität des Antigen-spezifischen Transfers wurde ein solches Experiment zeitgleich in jedem Versuch durchgeführt.

4.19 Peptidscan- und Aminosäuresubstitutionsanalysen

Zur weiteren Charakterisierung der Epitope wurden Membranen mit 13mer Peptiden, die die gesamte AS-Sequenz der Kandidatenantigene umspannten, und 11 AS überlappten, mit Liquor bzw. Serum von ausgewählten MS-Patienten und Kontrollpersonen inkubiert und wie ein Western-Immunoblot prozessiert. Anschließend wurde eine AS-Substitutions-Analyse mit dem Peptid, das die Antikörper zuvor im Peptidscan am stärksten gebunden hatten, durchgeführt. Dabei wurde AS an den Positionen 3-10 der Originalsequenz durch die 20 natürlich vorkommenden AS bei Peptid 1 substituiert. Für die Substitutionen der Aminosäuren von Peptid 2 erfolgte eine Auswahl von AS nach bestimmten Eigenschaften: Alanin (A; klein, aliphatisch), Serin (S; klein polar), Arginin (R; groß, basisch), Leucin (L; aliphatisch), Phenylalanin (F; groß, aromatisch), Glutamat (E; sauer), Prolin (P; aliphatisch) und Glycin (G; klein, polar) wurden eingesetzt. Die optimalen AS an den jeweiligen Positionen wurden durch Inkubation mit Patienten-Liquor identifiziert.

4.20 Peptide und Proteine

Die Peptide wurden von der Firma Jerini (Berlin) synthetisiert.

Die membrangebundenen Peptide für die Peptidscan- und Substitutionsanalysen wurden von der Firma Jerini (Berlin) und der Firma Multisynthec (Witten) synthetisiert. Das EBNA-1 Protein wurde über die Firma WAK-Chemie bezogen und bestand aus den letzten 340 Aminosäuren (AS₃₀₂-AS₆₄₁, inklusive Teil der Glycin-Alanin reichen Region) von EBNA-1.

4.21 Herstellung von rekombinanten Proteinen

Für die Herstellung des rekombinanten BRRF-2 Proteins des EBV wurde das BRRF-2 Gen in einen Expressionvektor einkloniert und dieser in *E. coli* transformiert. Unter induzierten Bedingungen war eine Proteinexpression und Isolierung des Proteins aus *E. coli* möglich.

4.21.1 DNA Isolation und Amplifikation des Virus-Gens

DNA wurde aus EBV-infizierten B95-Zelllinien extrahiert. Hierzu wurde das Nucleon BACC3 DNA Extraktions Kit verwendet (Amersham Bioscience). Für die Amplifikation des kompletten BRRF-2 Gens wurde der forward primer 5'-CACCATGAGTGGGCAGCAGAGAGG-3' und der reverse primer

5'-TTAGACGACGCTCAGTGAATACAGGGA-3' eingesetzt. Des Weiteren wurde ein Teilstück des BRRF-2 Gens amplifiziert. Für die Amplifikation des partiellen BRRF-2 Gens wurde der forward-Primer 5'-CACCATGGGATCCTTGCACTTAGCC-3' mit identischem reverse-Primer (s.o.) verwendet. Für die gewählte Klonierungsstrategie wurde der forward-Primer mit einer CACC-Sequenz am 5'-Ende modifiziert. Der reverse-Primer wurde durch Einbringen von TTA am 5'-Ende verlängert, um bei der Proteinexpression an dieser Stelle ein Stopp-Codon zu generieren und damit das Ende der Translation zu induzieren. Modifikationen sind unterstrichen dargestellt. Folgendes PCR-Protokoll wurde angewandt: initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min; 33 Zyklen mit zyklischer Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 61°C für 30 sec und DNA-Synthese bei 72°C 60 sec für das partielle Gen (und 150 sec für das voll-Länge Gen) mit anschließender terminaler Elongation bei 72°C für 5 min.

4.21.2 Klonierung und Transformation

Die Klonierung des Amplifikats in den pENTR Plasmidvektor (pENTR TOPO Vektor, Invitrogen) erfolgte mit dem Directional TOPO cloning Kit (Invitrogen). Der rekombinante Vektor wurde in chemisch kompetente TOP10 E. coli Bakterien (Invitrogen) transformiert. Anschließend wurde der Vektor mit dem Expressionsvektor pGEX-GST (von Dr. Martin Ruthardt freundlicherweise zur Verfügung gestellt) mittels LR-Clonase (Invitrogen)-Reaktion kombiniert. Nach der Transformation in BL21star Bakterien (Invitrogen) wurden die Expressionsklone auf Ampicillin enthaltenden Agarplatten selektioniert und das BRRF-2 Protein über das im Expressionsvektor enthaltene GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Die Experimente wurden jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.22 Nachweis von Virus RNA

Der Nachweis der Expression von BRRF-2 und EBNA-1 Protein in EBV-transformierten B-Zellen, die latent infiziert sind, und in lytisch infizierten B95-Zellen wurde durch die Identifikation von RNA erbracht. Hierzu wurde RNA aus beiden Zelltypen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und ein Verdau mit DNase durchgeführt. Anschließend wurde ein Teil der RNA in cDNA mittels SuperScript II RT (Invitrogen) nach Protokoll des Herstellers umgeschrieben (reverse Transkription, rT). Mit dem anderen Ansatz wurde keine reverse Transkription durchgeführt (krT). Mit EBNA-1 und BRRF-2-spezifischen

Primern zur Amplifikation eines kurzen Produktes der Gene wurde mit beiden Proben (rT und krT) eine PCR durchgeführt. Dafür wurde für BRRF-2 der forward-Primer 5'-GAATTTGAGGCCTGGCTGAG-3' und der reverse-Primer 5'-TCGCAGCCCGGAAAACCTC-3' und für EBNA-1 der forward-Primer 5'-AAGCCCGCTCCTACCTGCAA-3' und der reverse-Primer 5'-GCGGCAGCCCCTTCCA-3' verwendet. Außerdem wurde über den Nachweis der RNA-Transkripte die Expression des partiellen und volle-Länge-BRRF-2-Proteins in B95-Zellen untersucht. Hierzu wurden Primer verwendet, die in Kap. 4.21.1 erwähnt sind. Eine Kontamination der RNA-Probe mit DNA konnte ausgeschlossen werden, da keine BRRF-2 bzw. EBNA-1-spezifischen Amplifikate mit RNA-Produkten ohne der reversen Transkription (krT) erhalten wurden.

4.23 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit SigmaStat durchgeführt. Der paired T-Test wurde für den Vergleich der Expression jeder Zellpopulationen zwischen Blut und Liquor von jedem Patienten verwendet. Der Mann-Whitney-Test wurde für den Vergleich der Median-Werte jeder Subpopulation zwischen MS-Patienten und Kontrollen angewandt. Für den Vergleich der Immunreaktivitäten im ELISA wurden die Mediane der OD-Werte von MS-Patienten und Kontrollen mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der T-Test wurde für den Vergleich von Mittelwerten zwischen beiden Kollektiven verwendet. Der Fisher's exact Test wurde genutzt, um die Frequenz von positiven Immunreaktivitäten bei MS-Patienten mit der von Kontrollen zu vergleichen. Der Spearman's Rank Test wurde für die Korrelationen zwischen unterschiedlichen Liquormarkern und klinischen Parametern verwendet. Hierbei wurde für multiples Testen mit 43 Hypothesen nach Bonferroni korrigiert und für diese Analysen ein P-Wert von $0.05/43=0.0012$ als signifikant angenommen. Für alle anderen statistischen Analysen wurde ein P-Wert von <0.05 als signifikant festgelegt.

5 ERGEBNISSE

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die zelluläre und humorale Zusammensetzung des Liquors von MS-Patienten und Kontrollen im Hinblick auf charakteristische Veränderungen bei der MS analysiert. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit sich die bekannte Heterogenität der MS auch in der Liquorpathologie widerspiegelt.

5.1 Immunphänotypisierung von Blut und Liquor von MS-Patienten und Kontrollen

Hierzu wurden Blut- und Liquorzellen von 60 Patienten mit klinisch gesicherter MS und 21 Kontrollen (NIND-Patienten) flusszytometrisch phänotypisiert. Parallel dazu wurde der Gehalt an Protein, Albumin, IgG, IgA und IgM im Serum und Liquor nephelometrisch bestimmt. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen zellspezifische Marker konnte der Anteil an NK-Zellen, NK-artigen T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, Plasmazellen, T-Zellen und den T-Zell Subpopulationen CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, α/β - und γ/δ T-Zellen in beiden Kompartimenten ermittelt werden. Die genannten Subpopulationen (siehe auch Abb. 1) bilden zusammen einen großen Teil der zellulären Hauptbestandteile des Immunsystems. Da im Liquor dieser Patienten gewöhnlich keine Granulozyten vorhanden sind, wurde eine Untersuchung dieser Population hier nicht durchgeführt. Abbildung 3 zeigt die Auswertung der flusszytometrischen Analyse von Blut und Liquor am Beispiel der Verteilung von B-Zellen und Monozyten eines MS-Patienten verglichen mit einem Kontrollpatienten. Für beide Kompartimente wurden zunächst anhand der Größe und Granularität die Bereiche definiert, in denen die jeweiligen Subpopulationen analysiert wurden, wobei einzelne Populationen im Bereich R1 und andere im Bereich R2 untersucht wurden (Abbildung 3A). Wie in der Abbildung 3B zu erkennen ist, unterschied sich der MS-Patient nicht von dem Kontrollpatienten hinsichtlich der Verteilung beider Zellpopulationen im Blut (linke Graphen). Sowohl B-Zellen als auch Monozyten waren bei beiden Personen zahlreich vertreten. Hingegen war die Verteilung im Liquor beider Populationen sehr stark voneinander abweichend (rechte Graphen). Während die Kontrollperson fast keine B-Zellen im Liquor aufwies, waren beim MS-Patienten 8% der analysierten Leukozyten B-Zellen. Ein ähnlich differentielles Bild zeigte sich bezüglich der Verteilung von Monozyten. Bei der Kontrollperson entsprach der Anteil mit 20% etwa dem des Blutes, hingegen hatte der MS-Patient mit 5% deutlich weniger Monozyten im Liquor als im Blut und damit deutlich weniger als die Kontrollperson.

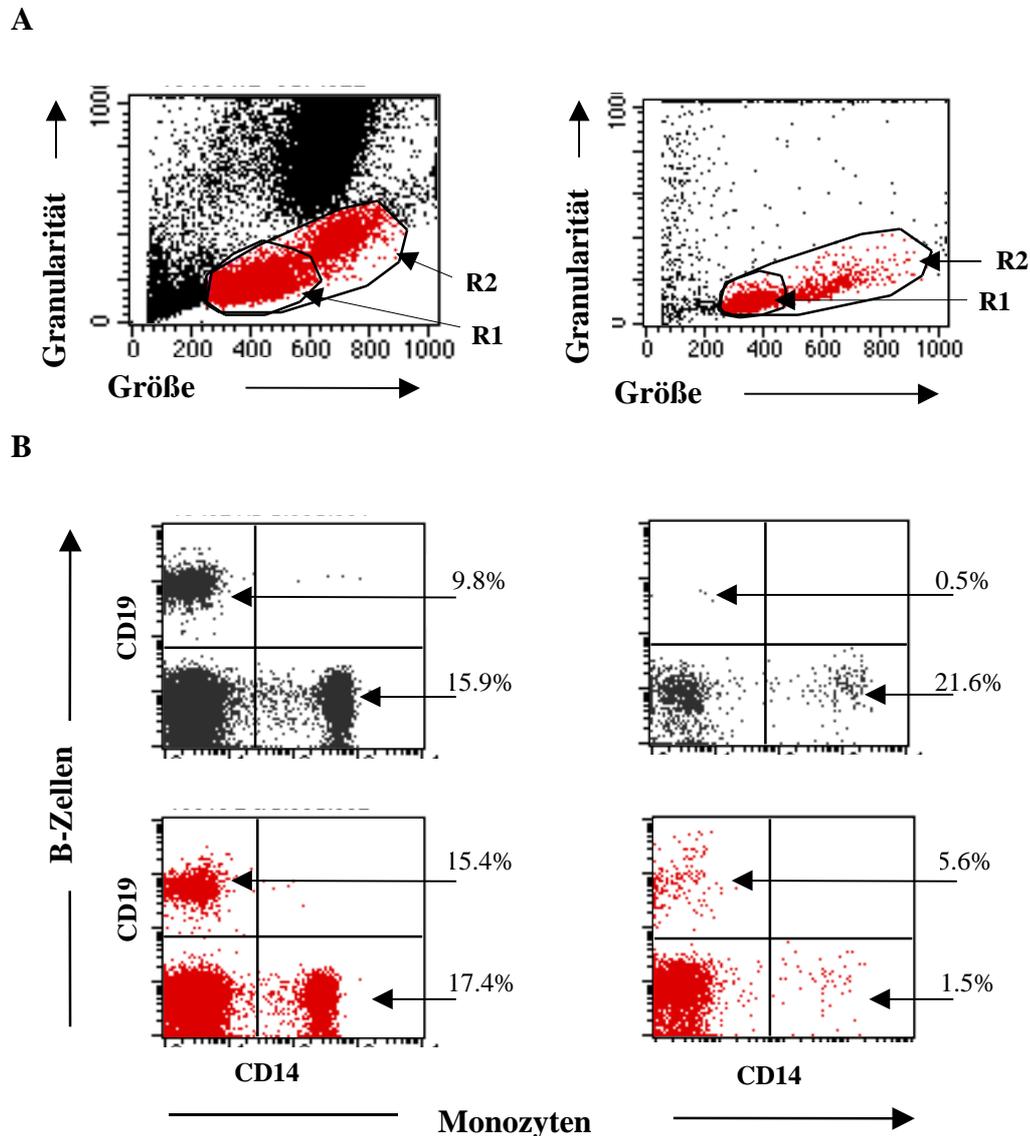


Abb. 3 Flusszytometrische Analyse von Blut- und Liquorleukozyten.

A Definition der Bereiche zur Analyse der Leukozyten im Blut (links) und Liquor (rechts). Im Bereich R1 wurden T-Zellen (alle), NK-Zellen, NK-artige T-Zellen, α/β^+ T-Zellen, γ/δ^+ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und im Bereich R2 wurden T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und Monozyten analysiert. **B** Gezeigt ist die Analyse von Blut (linke Graphen) und Liquor (rechte Graphen) eines Kontrollpatienten (obere Graphen) und eines MS-Patienten (untere Graphen) am Beispiel der Verteilung von B-Zellen (CD19) und Monozyten (CD14).

Diese vergleichende Untersuchung wurde für alle Leukozyten-Subpopulationen durchgeführt und in Tabelle 1 zusammengefasst. Obwohl interindividuelle Unterschiede zu beobachten waren, konnten keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Populationen zwischen MS-Patienten und Kontrollen im peripheren Blut festgestellt werden. Hingegen wurden hoch signifikante Unterschiede im Liquor für einzelne Leukozyten-Subpopulationen zwischen MS-Patienten und Kontrollen gefunden. Während B-Zellen und Plasmazellen bei MS-Patienten im Liquor erhöht waren, waren der Anteil an

Monozyten, NK-Zellen und NK-artigen T-Zellen bei MS-Patienten gegenüber Kontrollen erniedrigt (Tabelle 1).

			Blut			Liquor		
<i>CD Marker</i>	<i>Zellpopulation</i>	<i>R</i>	<i>MS</i>	<i>NIND</i>	<i>p</i>	<i>MS</i>	<i>NIND</i>	<i>p</i>
CD3	T Zellen	R1	65.9 ± 12.1	68.2 ± 8.5	0.222	91.5 ± 5.8	90.1 ± 5.4	0.177
CD3 CD4	CD4 T Zellen	R1	48.5 ± 8.1	46.3 ± 7.4	0.227	70.7 ± 8.1	66.9 ± 8.6	0.061
CD3 CD8	CD8 T Zellen	R1	19.8 ± 6.2	21.3 ± 6.2	0.135	20.0 ± 6.2	22.6 ± 6.4	0.139
TCR α/β	alpha/beta T Zellen	R1	69.9 ± 7.9	69.0 ± 7.9	0.653	90.2 ± 8.7	91.5 ± 4.0	0.979
TCR γδ	gamma/delta T Zellen	R1	2.8 ± 2.7	3.8 ± 3.4	0.115	1.4 ± 0.7	1.3 ± 0.9	0.444
CD56 CD16	NK Zellen	R2	12.8 ± 6.9	12.4 ± 5.1	0.816	2.6 ± 1.5	4.2 ± 2.6	0.006
CD56CD16CD3	NK-artige T Zellen	R1	5.5 ± 3.6	5.0 ± 3.8	0.317	1.6 ± 1.5	3.0 ± 1.6	<0.001 [*]
CD3	T Zellen	R2	57.2 ± 9.9	58.7 ± 8.4	0.172	86.2 ± 7.3	78.9 ± 9.4	<0.001 [*]
CD14	Monozyten	R2	14.1 ± 6.6	12.6 ± 3.5	0.616	3.9 ± 4.4	16.5 ± 9.0	<0.001 [*]
CD19	B Zellen	R2	11.1 ± 5.0	11.0 ± 3.8	0.954	4.6 ± 4.1	0.7 ± 0.8	<0.001 [*]
CD138	Plasmazellen	R2	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.553	1.3 ± 1.6	0.1 ± 0.2	<0.001 [*]

Tabelle 1: Verteilung von Leukozyten-Subpopulationen im Liquor und Blut von MS-Patienten und Kontrollen mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen (NIND).

Statistischer Test: Mann-Whitney-Test; Signifikanz-Niveau: P=0,0012. R1: Populationen wurden im R1 Bereich analysiert; R2: Zellpopulationen wurden im Bereich R2 analysiert.

Beim Vergleich der zellulären Zusammensetzung in Blut und Liquor von MS-Patienten, konnte keine Korrelation zwischen beiden Kompartimenten beobachtet werden, so dass anzunehmen ist, dass die zelluläre Verteilung im Liquor unabhängig ist von der Zusammensetzung im Blut. Des Weiteren war der IgG-Gehalt im Liquor und die Zellzahl, die im Liquor enthalten war, bei MS-Patienten signifikant erhöht gegenüber Kontrollpersonen (p<0,001; p=0,001).

5.2 Heterogenität der Liquorpathologie bei MS-Patienten

Anschließend wurde die zelluläre Verteilung und der IgG-Gehalt im Liquor und Blut der MS-Patienten untereinander verglichen, um mögliche Unterschiede zwischen den Patienten auszuarbeiten. Die Analysen zeigten, dass T-Zellen bei allen MS-Patienten die prozentual dominanteste Zellpopulation im Liquor mit wenig Varianz zwischen einzelnen MS-Patienten darstellte (Abb. 4B). Hingegen waren die prozentualen Anteile von B-Zellen (alle CD19+ Zellen), Monozyten, Plasmazellen (CD19+CD138+ Zellen), NK-artigen T-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen bei unterschiedlichen Patienten sehr variabel. Die

Patienten unterschieden sich auch im Gehalt an IgG. Die deutlichsten Unterschiede wurden für B-Zellen und Monozyten sowie beim IgG-Gehalt beobachtet. Bei einem systematischen Vergleich der Liquorpathologien zwischen einzelnen MS-Patienten konnten drei verschiedene Liquorpathologien ausgearbeitet werden, nach denen die Patienten in unterschiedliche Typen eingeordnet wurden. In Abbildung 4 sind exemplarisch an drei verschiedenen MS-Patienten die unterschiedlichen Liquorpathologien dargestellt.

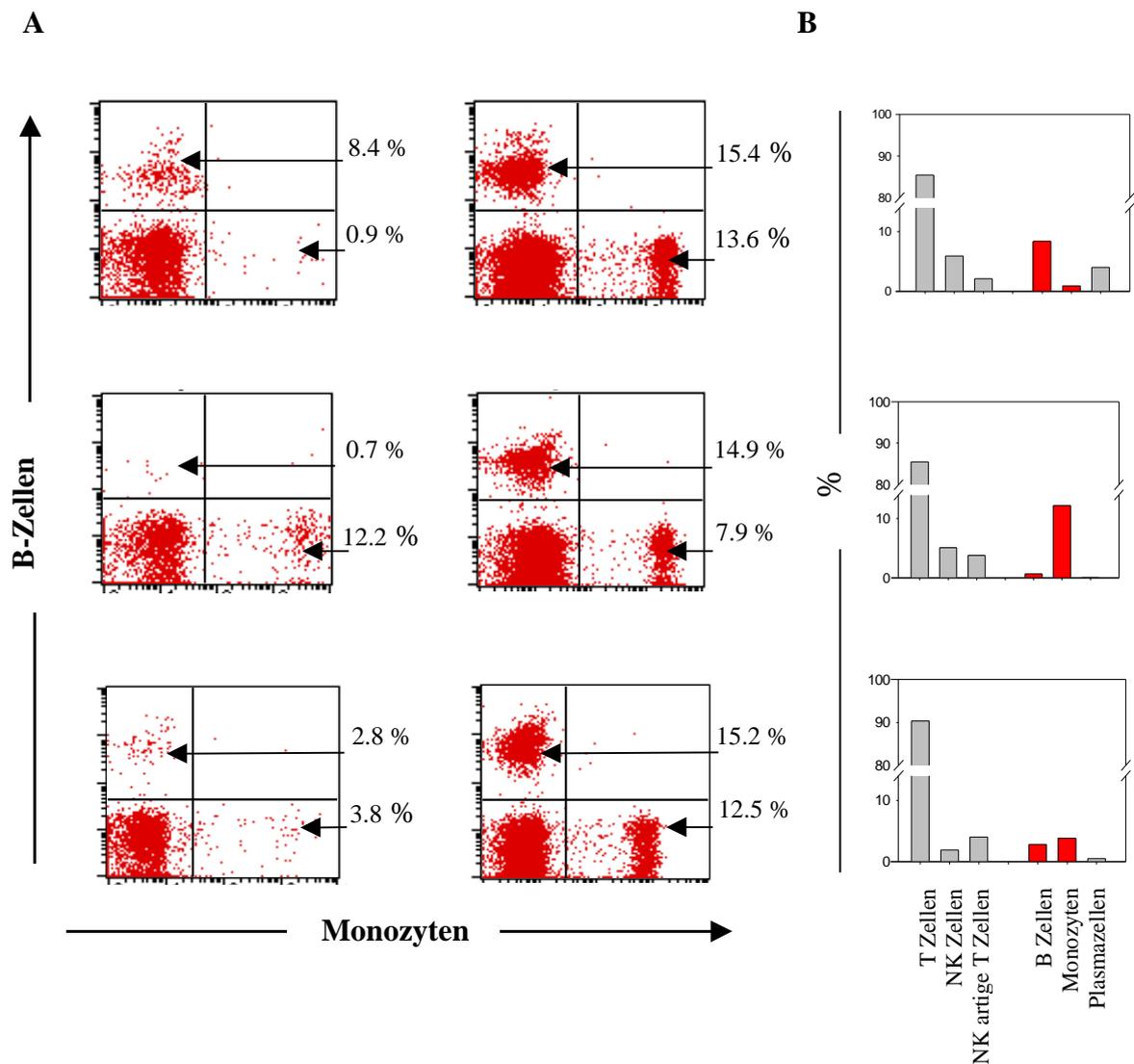


Abb. 4: Unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung des Liquors bei MS-Patienten.

A Gezeigt sind die Analysen für die Expression von B-Zellen und Monozyten exemplarisch an drei verschiedenen MS-Patienten (obere, mittlere und untere Graphen) im Blut (rechts) und Liquor (links). Die drei Patienten zeigten deutliche Unterschiede in der Verteilung von B-Zellen und Monozyten im Liquor, während die Anteile dieser Populationen im Blut bei den Patienten ähnlich waren. **B** Die Graphen zeigen die Verteilung der anderen Leukozyten-Populationen im Liquor von den in **A** dargestellten MS-Patienten. Populationen, die im Bereich R1 analysiert wurden, sind links dargestellt, die im Bereich R2 analysierten Populationen sind im rechten Teil gezeigt (siehe dazu Abb. 3A und Material und Methoden).

Der sogenannte B-Zell-Typ zeigte einen hohen Anteil an B-Zellen im Liquor, eine ausgeprägte intrathekale IgG-Synthese, einen geringen Anteil monozytärer Zellen und geringe Anteile NK-artiger T-Zellen (Abb. 4A, obere Graphen). Demgegenüber fanden sich beim sogenannten Monozyten-Typ höhere Anteile an Monozyten, NK-artigen T-Zellen, ein niedriger Anteil an B-Zellen und keine intrathekale IgG-Synthese (Abb. 4A, mittlere Graphen). Zwischen diesen beiden Extremvarianten lag der sogenannte intermediäre Typ, bei dem B-Zellen und Monozyten in etwa gleicher Häufigkeit vorkamen (Abb. 4A, untere Graphen). Der Monozytentyp ähnelte dabei dem Phänotyp von Kontrollen, die wenig B-Zellen, hohe Monozytenzahlen und keine erhöhte IgG-Synthese aufwiesen. Diese unterschiedlichen Muster im Liquor spiegelten nicht die Verteilung der Immunzellen im Blut dieser MS-Patienten wider, wie aus der Abbildung 4A hervorgeht. Eine positive Korrelation wurde zwischen den Monozyten und den NK-artigen T-Zellen sowie zwischen B-Zellen und intrathekaler IgG-Synthese ($p=0,002$; $p=0,008$) gefunden. Die unterschiedlichen Muster in den Liquorpathologien wurden am besten durch den CD19/CD14-Quotienten (alle B-Zellen/Monozyten) reflektiert und für weitere Analysen zur Beschreibung der MS-Liquorpathologien verwendet.

5.3 Stabilität der heterogenen Liquorpathologien

Die Frage stellte sich, wie stabil die individuellen Liquorpathologien im Krankheitsverlauf sind? Reflektiert die Liquorpathologie unterschiedliche Pathomechanismen bei individuellen MS Patienten oder ist sie Ausdruck von klinisch aktiven bzw. inaktiven Phasen? Zur Klärung dieser Fragen wurde der Liquor von ausgewählten MS-Patienten seriell während und außerhalb eines Schubes analysiert. Obwohl die Gesamtleukozytenzahl im Liquor zwischen beiden Untersuchungen variierte, war die Verteilung der Subpopulationen sehr stabil. Dies traf insbesondere für die B-Zellen und Monozyten und den daraus resultierenden und die Liquorpathologien beschreibenden B-Zell/Monozyten-Quotienten zu. Abbildung 5 zeigt die Stabilität der unterschiedlichen Liquorpathologien. Wie zu erkennen ist, ändert sich das individuelle Muster der zellulären Zusammensetzung auch nach Jahren nicht. Bei Patient A sind die B-Zellen auch außerhalb des Schubes weiterhin die dominante Zellpopulation, während Patient C Jahre nach der ersten Liquorphänotypisierung kaum B-Zellen, aber einen hohen Anteil an Monozyten im Liquor aufwies. Auch der intermediäre Typ zeigte ein konstantes B-Zell/Monozyten-Verhältnis im Krankheitsverlauf.

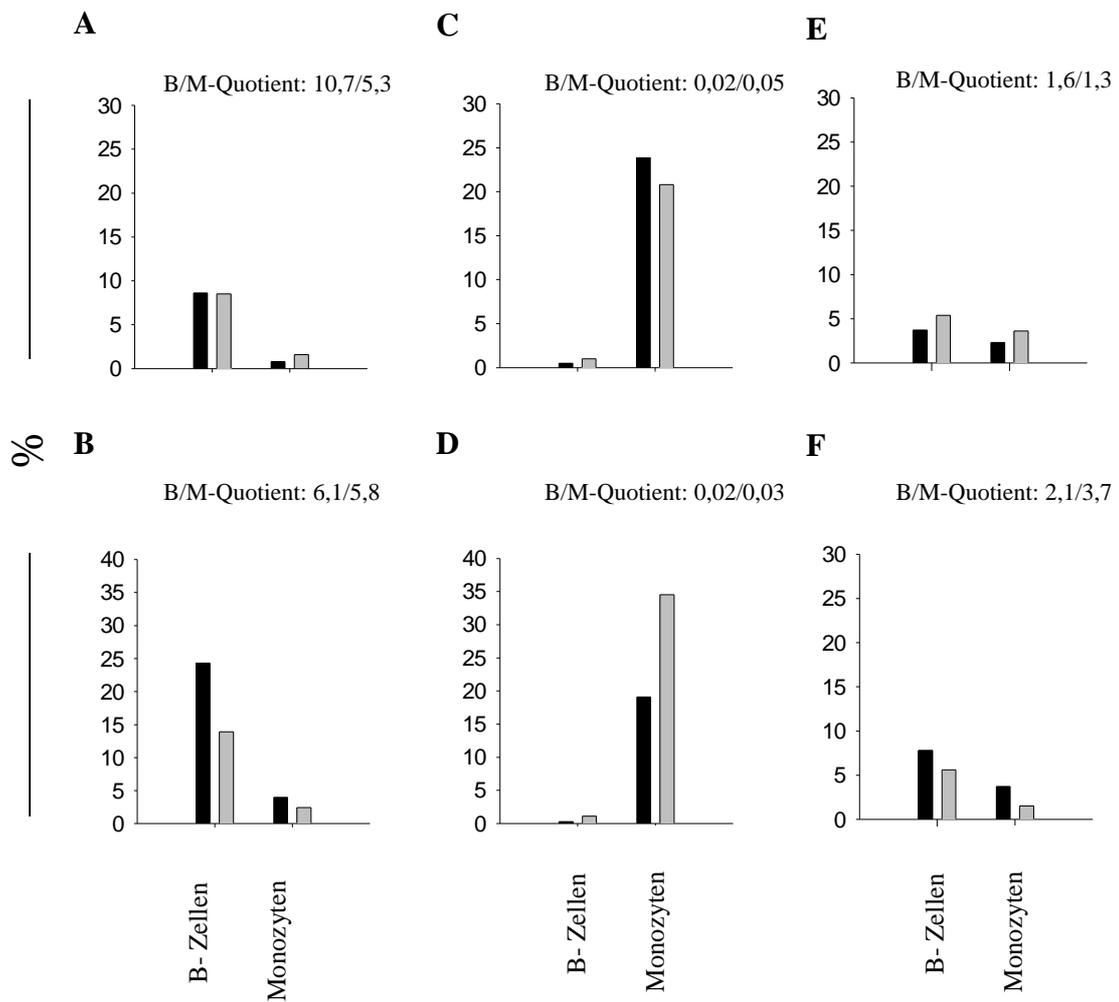


Abb. 5: Stabilität der drei unterschiedlichen Liquorpathologien.

Jeweils zwei MS-Patienten eines Typs demonstrieren die Stabilität der B-Zell-dominanten Pathologie (A, B), der Monozyten-dominanten Pathologie (C, D) und der intermediären Pathologie (E, F). Dargestellt sind jeweils die Anteile der B-Zellen und Monozyten an der Gesamt-Leukozytenpopulation im Liquor zum ersten Zeitpunkt (schwarze Balken) und zum zweiten Zeitpunkt (graue Balken) der Analyse. Das zeitliche Intervall zwischen der initialen und der seriellen Untersuchung lag bei 2 (A), 1 (B), 22 (C), 23 (D), 6 (E) und 2 (F) Monaten. Patienten A, B, C und E hatten zum ersten Zeitpunkt einen Schub, Patient D zum zweiten Zeitpunkt. Patient F war zu beiden Zeitpunkten klinisch unauffällig. Die B/M (B-Zell/Monozyten)-Quotienten von beiden Zeitpunkten sind in den Graphen angegeben. Die Stabilität wurde insgesamt an 23 MS-Patienten mit unterschiedlichen Liquorpathologien bestätigt, hier ist nur eine Auswahl von 6 Patienten gezeigt.

5.4 Liquorpathologien korrelieren mit der Krankheitsprogression

Im folgenden Teil wurde untersucht, ob die klinischen Parameter der MS-Patienten mit den unterschiedlichen Liquorpathologien in Zusammenhang stehen. Für die Korrelationen wurde der B-Zell/Monozyten-Quotient (B/M-Quotient), der die unterschiedlichen Pathologien am besten beschrieb, verwendet. Zunächst wurden die MS-Patienten entsprechend ihrem klinischen Verlaufstyp in schubförmige MS (RR-MS), primär progrediente MS (PP-MS) und sekundär progrediente MS (SP-MS) eingeteilt. Die Analysen legten keinen Zusammenhang zwischen den drei Gruppen und dem B/M-Quotient nahe (Abb. 6A). Anschließend wurde der B/M-Quotient mit Krankheitsdauer, Schwere der Erkrankung (EDSS) und der individuellen Krankheitsprogression (delta EDSS) der MS-Patienten korreliert.

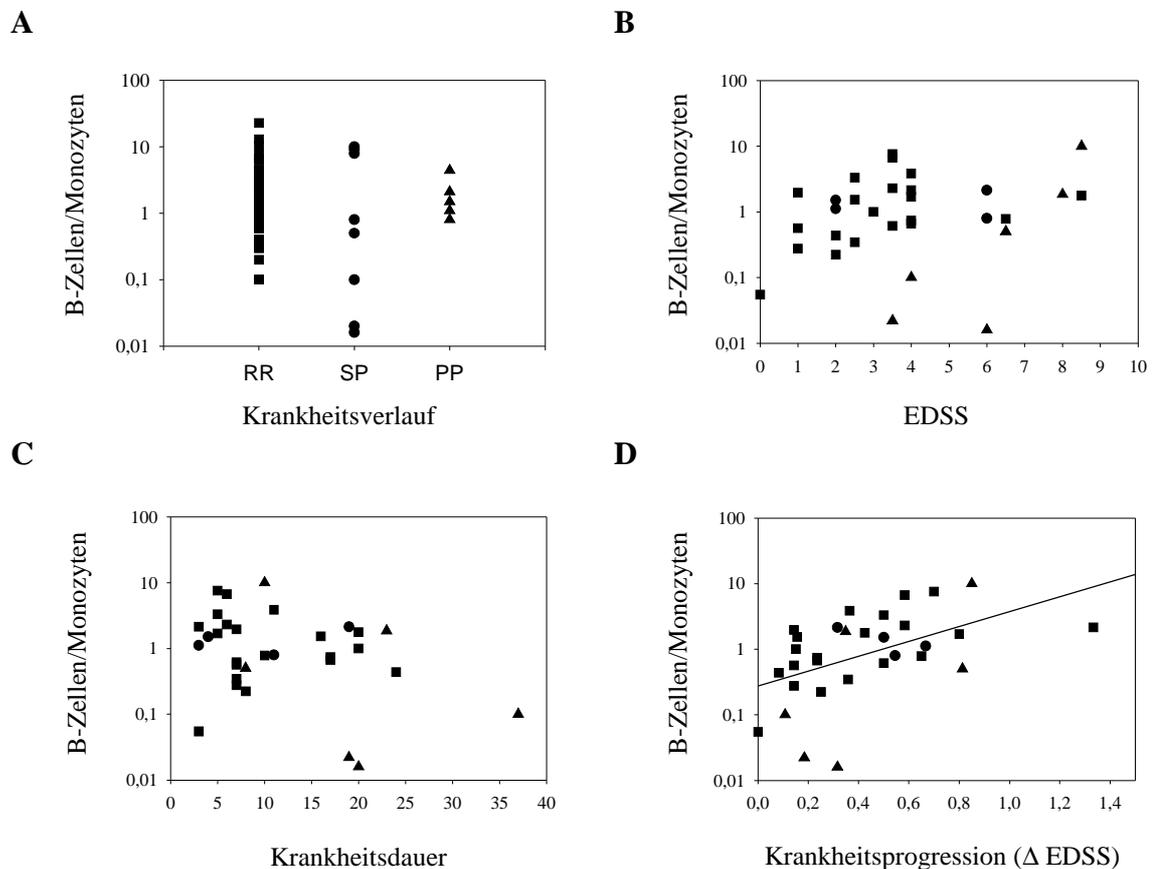


Abb. 6: Korrelation der Liquorpathologien mit klinischen Parametern.

Die B/M-Quotienten der MS-Patienten wurden mit den unterschiedlichen Krankheitsverläufen der MS-Patienten (RR, schubförmig, ■; PP, primär progredient, ▲; SP, sekundär progredient, ●) (A), dem aktuellen EDSS zum Zeitpunkt der Analysen (B), der Krankheitsdauer (C) und der individuellen Krankheitsprogression (D) in Beziehung gesetzt. Für die Korrelationen in B-D wurden nur Patienten mit einer Krankheitsdauer von mindestens 2 Jahren analysiert. Eine signifikante Korrelation zwischen dem B/M-Quotienten und der individuellen Krankheitsprogression wurde beobachtet, nicht aber mit den anderen klinischen Parametern. B/M-Quotienten: B-Zell/Monozyten-Quotient.

Es wurde keine Korrelation zwischen dem Quotienten und der Krankheitsdauer bzw. dem EDSS gefunden. Die Analysen zeigten, dass der B/M-Quotient kein Ausdruck für die Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Liquoruntersuchung ist und auch nicht die Krankheitsdauer widerspiegelt (Abb. 6B,C). Allerdings wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem B/M-Quotienten und der individuellen Krankheitsprogression der MS-Patienten beobachtet ($p=0,0009$; $r=0,57$; Abb. 6D). Die Krankheitsprogression delta EDSS wurde retrospektiv ermittelt, indem der EDSS zum Zeitpunkt der Liquorphänotypisierung durch die Krankheitsdauer bis zur Liquor-Analyse dividiert wurde. Dieser Parameter beschreibt die klinische Verschlechterung pro Jahr. Für diese Untersuchungen wurden nur Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als zwei Jahren eingeschlossen. Die Beziehung zwischen dem B/M-Quotienten und der Progression war noch deutlicher innerhalb des Patientenkollektivs von schubförmigen Patienten ($r=0,63$). Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass MS-Patienten mit hohen B-Zell-, aber niedrigen Monozyten-Anteilen im Liquor eine schnellere Progression haben als MS-Patienten mit umgekehrtem Phänotyp.

5.5 Charakterisierung von B-Zell Subpopulationen in Liquor und Blut

Aufgrund der bedeutsamen Befunde zur Krankheitsprogression wurden die B-Zellen in Liquor und Blut von MS-Patienten weiter charakterisiert. Durch Kombination geeigneter zellspezifischer Marker wurden die Anteile von unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen in beiden Kompartimenten flusszytometrisch bestimmt. Die Analysen zeigten extreme Abweichungen zwischen beiden Kompartimenten. Plasmazellen sind bekanntlich eine seltene Zellpopulationen im Blut, wie auch bei diesem Patient. Nur 0,8% der B-zellulären Zellen (alle CD19+ Zellen) entsprachen einem Plasmazelltyp (CD19+CD138+), wogegen im Liquor Plasmazellen mit 35 % der gesamten B-Zellen eine dominante Zellpopulation darstellten (Abb. 7A). Des Weiteren wurde eine Färbung etabliert, die es erlaubte, naive, Gedächtnis- und Plasmazellen zu differenzieren und deren Anteil in beiden Kompartimenten zu bestimmen (Abb. 7B). Die Differenzierung wurde durch die unterschiedliche Expression von CD27 auf CD19+ Zellen ermöglicht. Reife, naive B-Zellen exprimierten CD19 aber kein CD27, während Zellen, die bereits mit Antigen in Kontakt gekommen waren (Gedächtnis B-Zellen, Plasmazellen), CD27 auf der Oberfläche exprimierten. Plasmazellen waren durch eine deutlich erhöhte CD27-Expression von den

Gedächtniszellen abgrenzbar (CD27⁺⁺). Plasmazellen exprimierten zusätzlich den typischen Plasmazellmarker CD138.

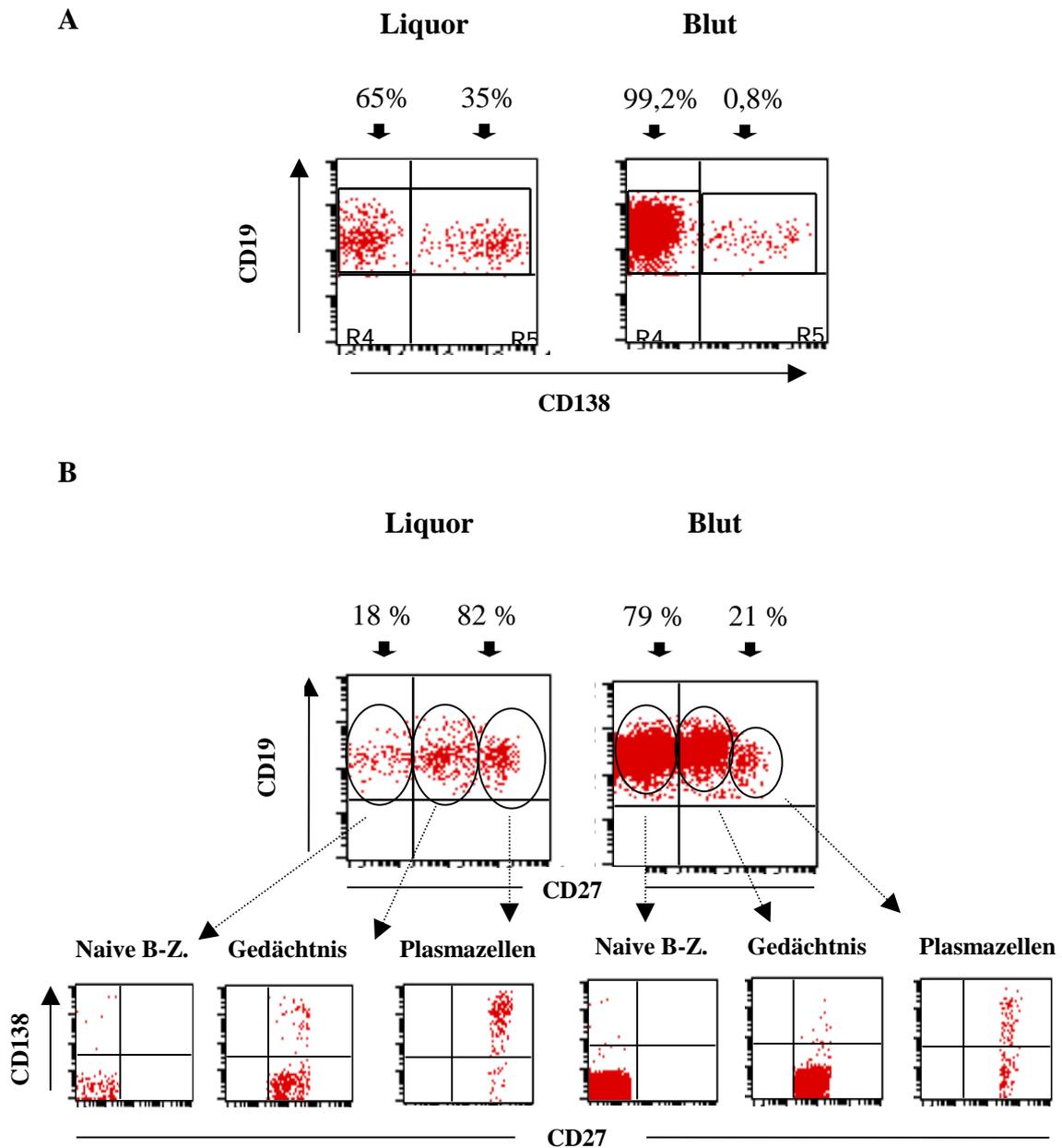


Abb. 7: Charakterisierung von B-Zell Subpopulationen in Blut und Liquor. Gezeigt sind die flusszytometrischen Analysen exemplarisch für einen MS-Patienten. Liquor- und Blutzellen wurden zunächst entsprechend der Expression von CD19 eingegrenzt und als B-zelluläre Population definiert. Die CD19⁺ Population wurde weiterhin auf die Expression von CD138 (Plasmazellmarker) und CD27 (Marker für Gedächtnis/Plasmazellen) analysiert. **A** Anteil von Plasmazellen (CD19⁺CD138⁺) an der gesamten B-zellulären Population (CD19⁺) im Liquor (links) und Blut (rechts). **B** Die unterschiedlich hohe Expression von CD27 auf den CD19⁺ Zellen ermöglichte die Auftrennung der B-Zell Subpopulationen in naive, Gedächtnis- und Plasmazellen. Während im Blut nur 21% aller B-Zellen CD27⁺ waren, wurden im Liquor 82% CD27⁺ B-Zellen gefunden. Die eingegrenzten Subpopulationen wurden auf die Expression von CD138 untersucht. Der Anteil von naiven (CD19⁺CD27⁻CD138⁻), Gedächtnis- (CD19⁺CD27⁺CD138⁻) und Plasmazellen (CD19⁺CD27⁺CD138⁺) am gesamten B-Zell Pool (CD19⁺) wurde für Liquor (links) und Blut (rechts) bestimmt. Auffällig sind die stark unterschiedlichen Anteile in Blut und Liquor. Um eine ausreichende Plasmazellzahl analysieren zu können, wurden zur Analyse des Blutes 100000 Leukozyten akquiriert. B-Z: B-Zellen.

Insgesamt gehörten 82% der B-Zellen einem Gedächtnis- bzw. Plasmazelltyp an (CD19+CD27+), d.h., sie waren bereits in der Vergangenheit mit Antigen aktiviert worden. In der Peripherie dagegen dominierten mit 79% naive B-Zellen (CD19+CD27-), die noch nicht mit Antigen in Kontakt gekommen waren (Abb. 7B, oben). Die Charakterisierung der B-zellulären Subpopulationen in Blut und Liquor des Patienten ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Ähnliche Befunde wurden für weitere MS-Patienten erhoben.

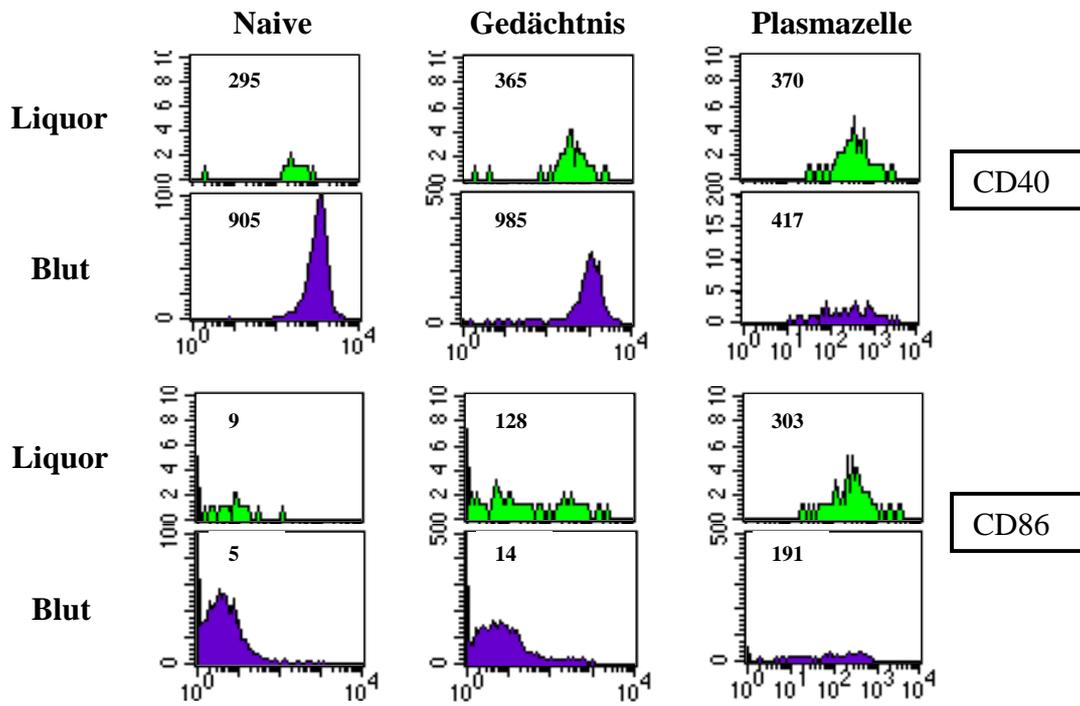
Zellmarker	B-Zell Subpopulation	Liquor	Blut
CD19+	alle B-zellulären Populationen	5,6%	14,6%
CD19+CD138-	B-Zellen (naiv/Gedächtnis)	65%	99,2%
CD19+CD138+	Plasmazellen	35%	0,8%
CD19+CD27-	naive B-Zellen	18%	79,2%
CD19+CD27+	zuvor aktivierte B-Zellen	82%	20,8%
CD19+CD27+CD138-	Gedächtnis B-Zellen	47%	20%
CD19+CD27++CD138+	Plasmazellen	35%	0,8

Tabelle 2: Zusammenfassung der Analyse von B-Zell Subpopulationen in Blut und Liquor eines MS-Patienten.

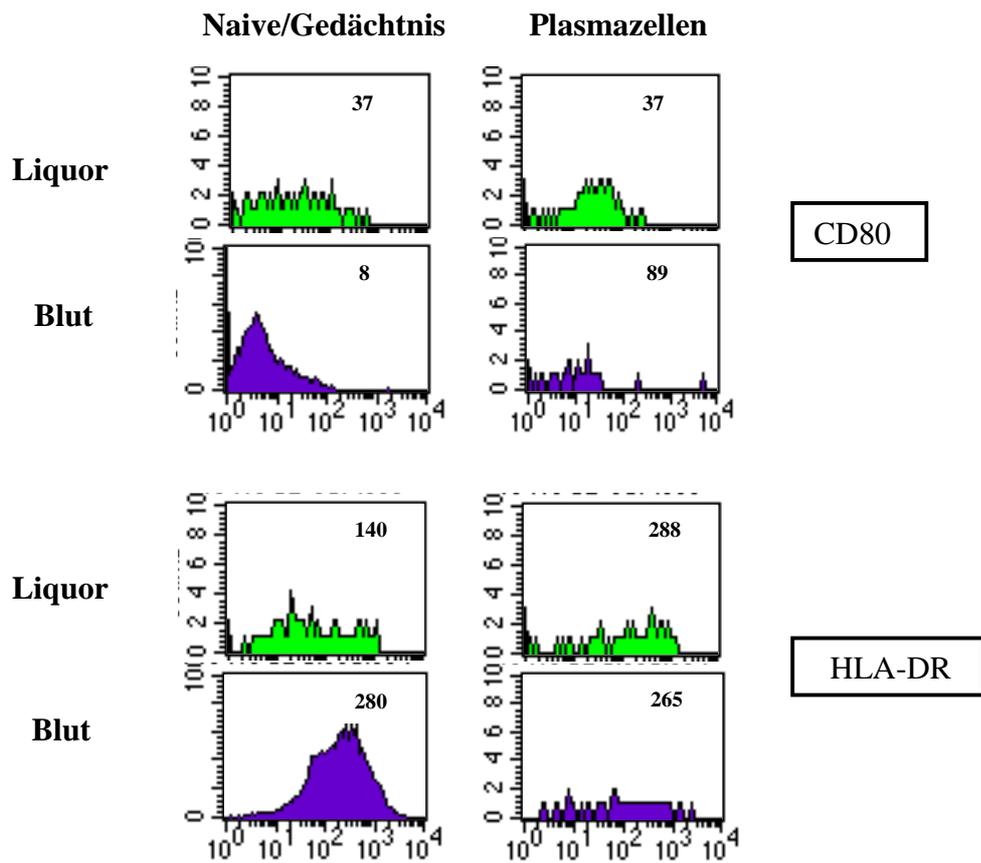
Die Anteile von naiven, Gedächtnis- und Plasmazellen sind zwischen beiden Kompartimenten stark unterschiedlich. Während im Liquor B-Zell Subpopulationen vorzufinden sind, die bereits mit Antigen in Kontakt gekommen sind (Gedächtnis- und Plasmazellen), dominieren im Blut naive B-Zellen.

In den anschließenden Analysen wurden die B-Zell Subpopulationen weiter phänotypisiert, um charakteristische Unterschiede zwischen den Subpopulationen auszuarbeiten (Abb. 8). Hierzu wurde die Expression von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen (Aktivierungs- und Adhäsionsmoleküle) entweder auf allen B-Zell Subpopulationen (naive, Gedächtnis, Plasmazellen; Abb. 8A) oder nur auf Plasmazellen und B-Zellen (naive, Gedächtnis, Abb. 8B) analysiert. Monoklonale Antikörper gegen die Moleküle CD21, CD22, CD40, HLA-DR, CD80, CD86, LFA-1 und VLA-4 wurden mit den B-Zell-spezifischen Antikörpern kombiniert und die Fluoreszenzintensität auf den jeweiligen B-Zell Subpopulationen ermittelt. Die Analysen zeigten im Vergleich zum Blut eine Herunterregulierung von CD21, CD22 und CD40 auf den Liquor B-Zellen, ähnlich der Expression auf Plasmazellen aus Liquor und Blut. Eine Heraufregulierung von CD80, CD86, LFA-1 und VLA-4 wurde auf den Liquor B-Zellen (ohne Plasmazellen) im Vergleich zu B-Zellen aus dem Blut beobachtet. Einzig die Expression von CD86 und LFA-1 auf Liquor Plasmazellen war erhöht gegenüber Plasmazellen aus dem Blut, für alle anderen Marker wurde kein Unterschied zwischen beiden Kompartimenten beobachtet.

A



B



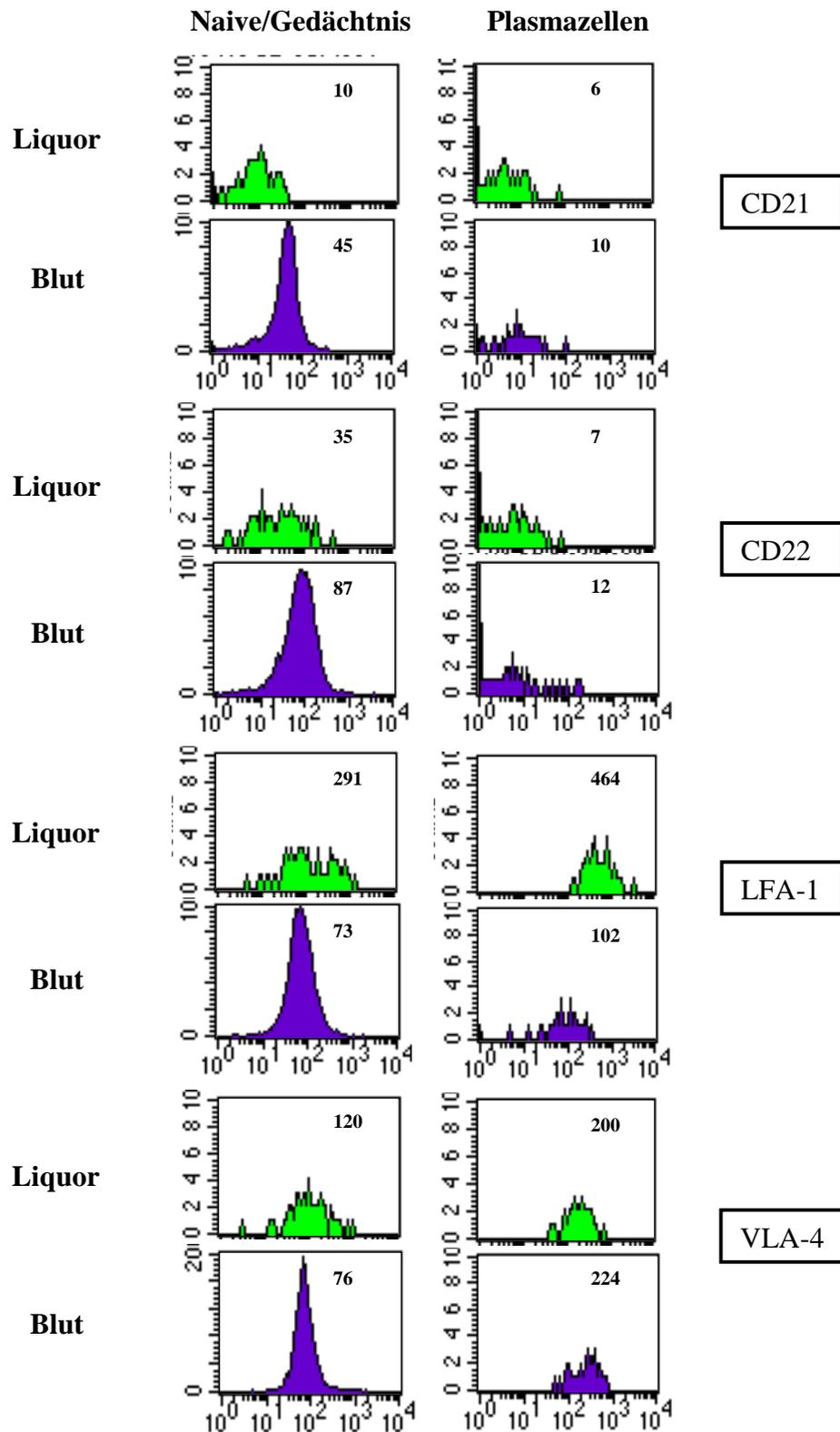


Abb. 8: Phänotypisierung von B-Zell Subpopulationen in Blut und Liquor eines MS-Patienten.

Die Expression von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen wurde durch die Kombination des für das jeweilige Molekül spezifischen monoklonalen Antikörpers mit Antikörpern gegen CD19 und CD138 (A) bzw. CD19 und CD27 (B) im Liquor (grün) und Blut (blau) analysiert. A Die Expression von CD40 und CD86 wurde durch entsprechendes Gaten (siehe dazu Abb. 7) auf den naiven, Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen bestimmt. B Die Expression von CD80, HLA-DR, LFA-1, VLA-4, CD21 und CD22 wurde auf Plasmazellen und den restlichen B-Zellen (naiv und Gedächtniszellen) analysiert. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenz der Expression von jedem Oberflächenmolekül auf den analysierten B-Zell Populationen.

Eine derartige Anreicherung von Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen im Liquor war ein interessanter und noch nicht beschriebener Befund. Um zu überprüfen, ob diese Veränderung typischerweise bei der MS auftrat, oder ob sie ein unspezifisches Phänomen eines entzündlichen Prozesses beschrieb, wurden B-Zellen aus dem Liquor von MS-Patienten und Patienten mit Neuroborreliose (NB) typisiert und seriell über einen Zeitraum von mehreren Jahren verfolgt. Der Liquor von NB-Patienten ist ebenfalls durch eine Pleozytose, intrathekale IgG-Synthese und Auftreten von OKBs gekennzeichnet. Die Abbildung 9 stellt die seriellen, vergleichenden Analysen dar.

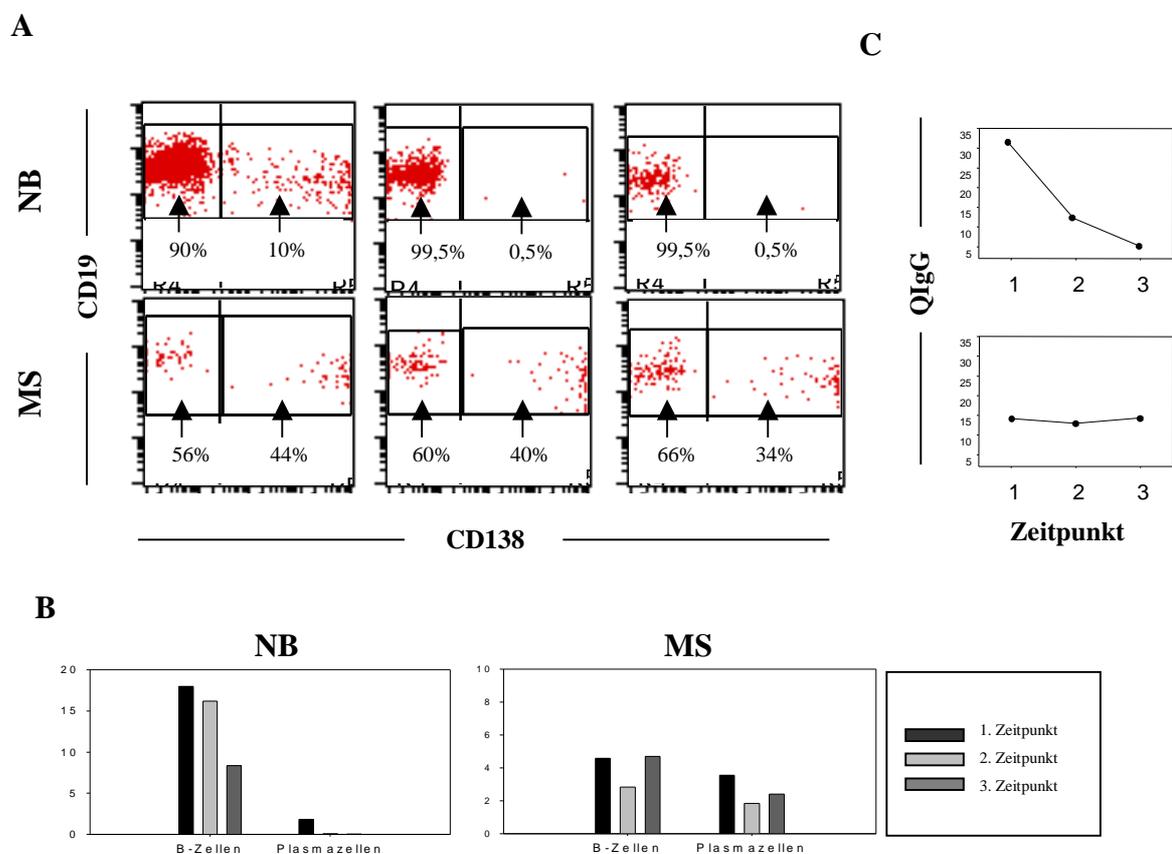


Abb. 9: Serielle Liquor-Analyse eines MS-Patienten und NB-Patienten.

Gezeigt ist in **A** der Anteil von Plasmazellen (CD19+CD138+) an der gesamten B-Zell Population (alle CD19+) und in **B** der Anteil an Plasmazellen und B-Zellen an der Gesamt-Leukozytenpopulation im Liquor eines MS-Patienten (unten) im Vergleich zu einem Patienten mit akuter Neuroborreliose (NB) (oben) zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 2,5 Jahre). Während beim NB-Patienten der Anteil an Plasmazellen zunächst erhöht war und nach Behandlung typischerweise innerhalb von zwei Wochen auf Normalniveau abfiel, ist bei dem MS-Patienten auch nach Jahren ein stabil hoher Anteil an Plasmazellen im Liquor zu beobachten. **C** Angegeben ist für alle drei Zeitpunkte der IgG-Quotient des MS-Patienten (unten) und NB-Patienten (oben). Parallel zum Absinken der Plasmazellzahl ging die IgG-Synthese im Liquor zurück, hingegen ist beim MS-Patienten im Zeitverlauf eine konstante IgG-Synthese zu beobachten gewesen. Zeitverlauf: 1. Zeitpunkt: akute Symptomatik; 2. Zeitpunkt bei NB nach 2 Wochen, 3. Zeitpunkt bei NB nach 1 Jahr; 2. Zeitpunkt bei MS nach 2 Jahren, 3. Zeitpunkt bei MS nach 2,5 Jahren. Ein ähnlicher Befund wurde bei anderen Patienten erhoben. NB: Neuroborreliose; QIgG: Quotient aus IgG Konzentration im Liquor/Konzentration im Serum x 1000 ist ein Maß für die Ausprägung der intrathekalen Synthese.

Die seriellen Analysen legten einen interessanten Befund nahe. Zum 1. Zeitpunkt der Liquor-Analyse hatte der Patient mit Neuroborreliose einen ausgeprägten entzündlichen Liquor mit erhöhter B-Zell-Zahl von 18% und etwa 2% Plasmazellen gemessen an der gesamten Leukozytenpopulation im Liquor (Abb. 9B) und eine ausgeprägte intrathekale IgG-Synthese (Abb. 9C). 10% aller B-Zellen waren Plasmazellen (Abb. 9A, oben). Nach zwei Wochen antibiotischer Behandlung gingen die Plasmazellen rapide zurück und waren dann kaum nachweisbar, während B-Zellen noch bei 16% verblieben. Parallel dazu ging die IgG-Synthese zurück. Nach mehr als einem Jahr deutete sich auch ein Rückgang der B-Zellen beim NB-Patienten an. Dieses Phänomen wurde bei Patienten mit MS nicht beobachtet. Im Gegenteil, B-Zellen und Plasmazellen blieben auf einem erhöhten Niveau über einen Beobachtungszeitraum von über 2,5 Jahren stabil. Der in Abbildung 9 vorgestellte Patient hatte bei der ersten Analyse 4,5% B-Zellen und 3,5% Plasmazellen, nach 2 Jahren 2,8% B-Zellen und 1,8% Plasmazellen und nach 2,5 Jahren 4,7% B-Zellen und 2,4% Plasmazellen (Abb. 9B). Auch der Anteil der Plasmazellen an der gesamten B-zellulären Population im Liquor blieb über Jahre erstaunlich stabil bei etwa 40% (Abb. 9A, unten). Diese enorm stabile Expression von B-Zellen und Plasmazellen wird durch die stabilen QIgG-Werte reflektiert (Abb.9C, unten). Dieser Befund legt eine permanente Aktivierung der humoralen und B-zellulären Immunantwort bei der MS nahe. Eine solche kontinuierliche Aktivierung von B-Zellen deutet auf eine gezielte Antigen-spezifische humorale Immunreaktion gegen ZNS residente Strukturen hin. Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit auf die Identifizierung der Antigen-spezifität der chronifizierten humoralen Immunantwort bei der MS fokussiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht, die Antigen-spezifität der lokalen B-Zell vermittelten Immunantwort bei der MS zu charakterisieren, um damit mögliche Hinweise auf pathogenetisch relevante Antigene zu erhalten. Bislang sind die Zielantigene bei der MS unbekannt, wobei sowohl hirneigene Proteine als auch Fremdproteine, die durch Infektion in das ZNS eingebracht wurden, mögliche Ziele darstellen. Zur Klärung dieser Frage wurde in dieser Studie ein neuer Ansatz gewählt, mit dem eine gleichzeitige Analyse von vielen verschiedenen Proteinspezifitäten möglich war. Hierzu wurde ein Protein-Array mit 37000 verschiedenen Protein-Expressionsklonen, die auf einer cDNA-Bibliothek des foetalen menschlichen Gehirns basierten, eingesetzt. Der Array bestand aus zwei Membranen und hatte je eine Größe von 24cm x 24cm.

5.6 Identifikation von potentiellen Kandidatenantigenen auf Protein-Array

Mit Hilfe des Protein-Arrays konnten gleichzeitig Immunantworten gegen ca. 37000 verschiedene rekombinante Proteine analysiert werden. Da der Liquor wahrscheinlich das entzündliche Milieu im ZNS reflektiert [53], wurden Liquorantikörper von MS-Patienten auf mögliche Immunreaktivitäten gegen Proteine, die sich auf dem Array befanden, untersucht. Die Anwendung des Arrays erlaubte mit einer Menge von etwa 1 ml Liquor die Suche von Immunreaktivitäten eines individuellen Patienten, ein Poolen von mehreren verschiedenen Liquorproben war deshalb nicht nötig. Zur Identifikation von MS-spezifischen Antigenen wurde die Antikörperreaktivität der Liquorprobe jeweils eines MS-Patienten gegenüber der einer Kontrolle ermittelt. Auf diese Weise wurden Liquor-Proben von 12 verschiedenen MS-Patienten und insgesamt 5 verschiedenen Kontrollpersonen untersucht. Expressionsklone, die mit der Liquorprobe eines MS-Patienten positive Immunreaktivitäten zeigten, aber nicht mit Liquor der parallel prozessierten Kontrollprobe, wurden als potentielle Kandidatenantigene gewertet. Diese Kandidatenantigene wurden auf negative Reaktivitäten bei allen weiteren Kontrollproben überprüft und auf mögliche Überlappungen mit Liquorproben anderer MS-Patienten untersucht. Bei 6 MS-Patienten konnten deutliche Immunreaktivitäten gegen mindestens zwei Expressionsklone detektiert werden. Bei den anderen 6 MS-Patienten wurden zwar Reaktivitäten beobachtet, die aber entweder zu schwach waren, oder bei mindestens einem Kontroll-Liquor eine zumindest schwache Reaktivität zeigten. Bei der Suche nach MS-spezifischen Antigenen wurden nur solche Expressionsklone ausgewählt, die eine ausgeprägte Immunreaktion mit Liquor von MS-Patienten zeigten. Abbildung 10 demonstriert die Identifikation eines MS-spezifischen

Kandidatenantigens, hier B3 (A), das bei der Applikation von Kontroll-Liquor keine Reaktivität an dieser Stelle zeigte (B). Die Intensität der Immunreaktion ist repräsentativ für alle identifizierten Kandidatenantigene.

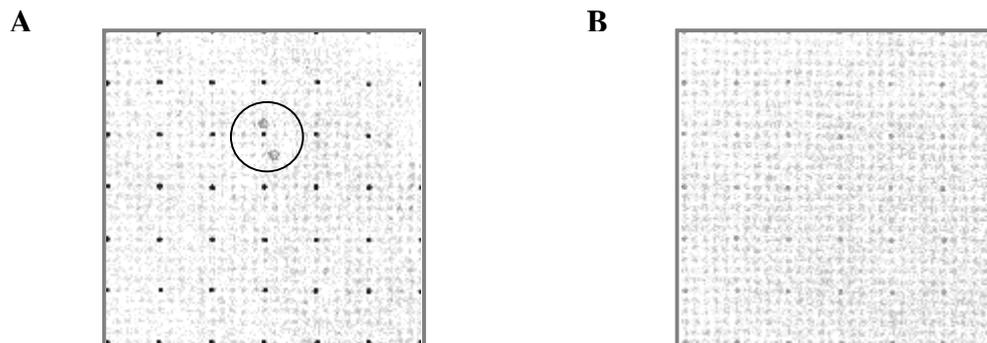


Abb. 10: Identifizierung von MS-spezifischen Antikörper-Reaktivitäten mit Hilfe eines Protein-Arrays.

37000 verschiedene E. coli Expressionsklone basierend auf einer cDNA-Bibliothek des fötalen menschlichen Gehirns waren auf einer PVDF-Membranen (24cmx24cm) aufgetragen. Die Auftragung der Klone in Dupletten nach einem bestimmten Muster diente zum Ausschluß von unspezifischer Bindung. Zur Identifizierung von Antikörperreaktivitäten wurde die Membran zunächst mit Liquor (IgG-Konzentration auf 10mg/l eingestellt) und anschließend mit HRP-gekoppelten anti-humanen IgG-Antikörpern inkubiert und die Bindung der humanen Antikörper an Proteine des Protein-Arrays mit TMB-Substrat dargestellt. Deutlich gefärbte Stellen signalisierten eine spezifische Antikörperbindung. In **A** ist die Immunreaktion bei einem MS-Patienten und in **B** die negative Immunreaktion bei einer Kontrollperson an dieser Stelle gezeigt. Der Kreis markiert die Identifizierung des Kandidatenantigens B3. Gezeigt ist ein 3cm x 3 cm großer Ausschnitt der Membran.

Drei der MS-Patienten zeigten Übereinstimmungen in mindestens einer Reaktivität. Untersuchungen von zwei MS-Patienten, bei denen zweimal Liquor entnommen wurde, zeigten jeweils identische Immunreaktivitäten zu beiden Zeitpunkten, was einen Hinweis auf die Qualität und Zuverlässigkeit des Protein-Arrays gab. Bei den Patienten, die im Liquor deutliche Immunreaktivitäten zeigten, wurden weitere Untersuchungen mit Serum durchgeführt, wobei auch hier zum besseren Vergleich zwei Protein-Arrays parallel mit Liquor und Serum des gleichen Patienten prozessiert wurden. Generell wurden mit Serum deutlich mehr Reaktivitäten, aber meist schwächere, beobachtet als mit Liquor. Im Serum, das auf die gleiche IgG-Konzentration eingestellt wurde wie der Liquor, waren die Immunreaktivitäten gegen die potentiellen Kandidatenantigene, die mit Liquor identifiziert wurden, in abgeschwächter Intensität detektierbar. Zusammenfassend wurden in den initialen Experimenten zur Suche nach potentiellen Antigenen mit Hilfe der Protein-Arrays 54 verschiedene Expressionsklone als potentielle Kandidatenantigene identifiziert.

Die relevanten *E. coli*-Expressionsklone wurden beim RZPD in Berlin bezogen. Da die Klone des Protein-Arrays zum größten Teil noch nicht charakterisiert waren, wurden die Plasmide der selektierten Expressionsklone amplifiziert, ansequenziert und die inserierte cDNA mit Hilfe von Blast-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) identifiziert. Anschließend wurde die Basensequenz in die AS-Sequenz übersetzt. Das Leseraster der AS-Sequenz beginnend mit der N-terminalen 6xHIS-Sequenz wurde für die Datenbank-Suche in Swiss-Prot verwendet und die exprimierte Proteinsequenz identifiziert. Von den 54 Expressionsklonen waren 12 mit identischer Expressionssequenz inkloniert, so dass 42 unterschiedliche Reaktivitäten mit unterschiedlicher Sequenz identifiziert wurden. Bei zwei dieser Reaktivitäten wurde zwar dasselbe Protein identifiziert, die Proteine unterschieden sich jedoch in der Länge des inserierten cDNA, d.h. hier wurden zwei unterschiedlich lange Proteinfragmente eines identischen Proteins gefunden.

Aufgrund der nachfolgenden, aufwendigen Experimente zur Klärung der Relevanz dieser potentiellen Kandidatenantigene bei der MS wurden die ersten 21 Expressionsklone ausgewählt (zusammengefasst in Tabelle 2). Zehn der 21 Expressionsklone exprimierten ein Protein im richtigen Leseraster (in frame). Elf der cDNA-inserts waren nicht im korrekten Leseraster inkloniert (out of frame), so dass Proteine mit unbekannter Spezifität exprimiert wurden. Diese Proteine wurden dennoch für die folgenden Analysen verwendet. Als Kontrollprotein diente das ubiquitär vorkommende Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das sich ebenfalls auf dem Protein-Array befand, das aber nicht über eine Immunreaktion identifiziert wurde.

code	Proteinidentität	NCBI-Nummer	Inserterter Bereich des Proteins in AS-Position (Anfang und Ende)
A5	Hemoglobin alpha-3 chain	P01935	AS 2-AS 141
A7	mitochondrial ribosomal protein S11	NP_073750	AS 2-AS 194
B7	RED protein	AAH13005	AS 443-AS 557
D3	ASPI protein	NP_076988	AS 1-AS 553
E1	chaperonin containing TCP1, CCT5	NP_036205	AS 320-AS 541
F4	MAZI	P56270	AS 125-AS 477
G4	MAZI	P56270	AS 121-AS 477
H5	MAZI	P56270	AS 244-AS 477
H1	TCOF1/ treacle protein	NP_000347	AS 2-AS 1411
G5	RNA binding motif protein 5	NP_005769	AS 469-AS 815
*A1	Human kinesin 2 (KNS2)	NM_005552	15 AS langes Protein
*B1	Human mRNA for KIAA1185 protein	AB033011	68 AS langes Protein
*B3	Human poliovirus receptor-related 2,	BC003091	49 AS langes Protein
*F3	Human hypothetical CL683 protein	XM_001817	41AS langes Protein
*C5	Human stathmin-like-protein RB3	NM_030795	83 AS langes Protein
*C6	DKFZp434A1010 cosmid F25965	AC002398	92 AS langes Protein
*D6	Mus musculus 1500001J14Rik cDNA	NM_025891	>123AS langes Protein
*D1	Human MAPK11	XM_010068	106 AS langes Protein
*D5	Human fragment of activated c-raf-1	X06409	112 AS langes Protein
*G2	Human CREB binding protein	NM_004380	357 AS langes Protein
*H3	Human tubulin, beta, 5 (TUBB5)	XM_009015	100 AS langes Protein
K	GAPDH	P04406	

Tabelle 3: Proteinsequenz-Analyse der identifizierten Kandidatenproteine.

Angegeben ist zusätzlich die NCBI-Nummer und der Bereich des Proteins, der als cDNA im Expressionsklon inkloniert war. Bei Proteinen mit unbekannter Identität ist die Länge der AS-Sequenz des Proteins angegeben. AS: Aminosäure; * Proteine waren 'out of frame' exprimiert.

5.7 Immunreaktivitäten gegen aufgereinigte Kandidatenantigene

Zur Verifizierung der spezifischen Bindung von Liquor bzw. Serum-IgG-Antikörper an die Kandidatenantigene wurde ein Immuno-Westernblot mit den aus den Bakterien-Expressionsklonen aufgereinigten Proteinen durchgeführt. Zur Gewinnung der rekombinanten Proteine wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von IPTG in die Bakterienkulturen induziert und die Proteine mit Hilfe von Nickel-Säulen aufgereinigt.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Aufreinigung von 3 verschiedenen Proteinen. Nach der Aufreinigung der Proteine aus den entsprechenden Bakterienklonen wurde eine SDS-Gelelektrophorese und ein Western-Blot durchgeführt. Mittels Ponceaufärbung wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine überprüft (Abb. 11A). Im Immunoblot ist die spezifische Bindung der Liquorantikörper an die aufgereinigten Kandidatenantigene gezeigt (Abb. 11B). Die Antikörper banden dabei nicht das Kontrollprotein GAPDH.

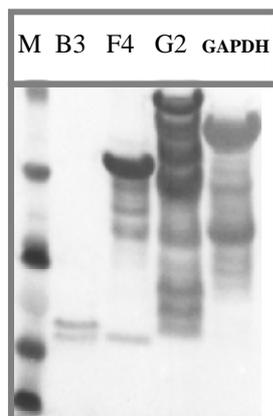
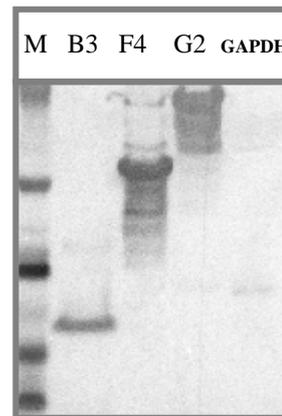
A**B**

Abb. 11: Nachweis der Immunreaktivität gegen aufgereinigte Kandidatenantigene.

A Auftrennung von vier aufgereinigten Proteinen im SDS-Gel und Western-Blot mit anschließender Ponceau-Färbung. **B** Western-Immunoblot mit Liquorantikörpern eines Index-Patienten mit dessen Liquor die drei Kandidatenantigene B3, F4 und G2 auf dem Protein-Array identifiziert wurden. Die Antikörper banden nicht das Kontrollprotein GAPDH. M: Marker; B3, F4, G2: Kandidatenantigene mittels Protein-Array-Analysen identifiziert; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

5.8 Immunreaktivitäten gegen Kandidatenantigene bei MS-Patienten und Kontrollen

Um die Ausprägung und Frequenz der erhöhten Immunreaktivitäten gegen die 21 potentiellen Kandidatenantigene bei MS-Patienten zu ermitteln und mit Kontrollen zu vergleichen, wurden zunächst für alle Kandidatenantigene ELISAs etabliert, die eine zuverlässige Messung der Immunreaktivitäten erlaubten. Zunächst wurden Liquores von 46 MS-Patienten und 28 Liquores von NIND-Patienten auf Reaktivität analysiert. Dabei wurde der Liquor in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt und die OD-Werte beider Kollektive miteinander verglichen. Sofern die Immunreaktivitäten bei MS-Patienten erhöht waren, wurden weitere Kollektive untersucht. In Abbildung 12 sind am Beispiel des Proteins B3 die ELISA-Ergebnisse dargestellt. Von 132 MS-Patienten zeigten 18 erhöhte Immunreaktivitäten, hingegen wiesen keine der 125 NIND-Patienten erhöhte Werte auf (Fisher's exact Test; $p < 0,001$). Als eine Erhöhung wurden OD-Werte von größer als 0,3 gewertet. Um eine systemisch erhöhte und unspezifische Reaktivität gegen jegliche Proteine bei MS-Patienten auszuschließen, wurde die Immunreaktivität gegen GAPDH untersucht. Keiner der MS-Patienten und NIND-Patienten zeigte eine Reaktivität gegen das Kontrollprotein.

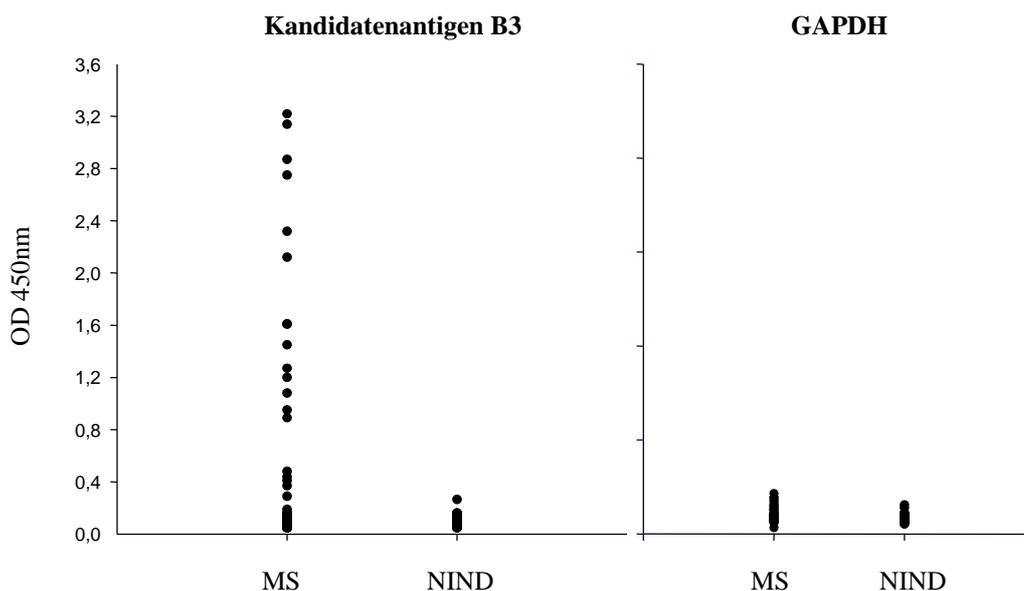


Abb. 12: Bestimmung der Immunreaktivitäten gegen Kandidatenantigen B3 im Liquor von MS-Patienten und NIND-Patienten mittels ELISA. Liquores von 132 MS-Patienten und 125 Kontrollen wurden 1:5 verdünnt. MS-Patienten hatten häufiger erhöhte Immunreaktivitäten gegen Protein B3 als NIND-Patienten (Fisher's exact Test; $p < 0,001$). Cut-off: $OD > 0,3$. NIND: non-inflammatory neurological disease.

In Tabelle 4 sind die ELISA-Analysen der 21 aufgereinigten Kandidatenantigene zusammengefasst. Proteine, die bei mehr als 8% der MS-Patienten, aber bei deutlich weniger Kontrollen erhöhte Immunreaktivitäten (OD>0,3) aufwiesen, wurden als besonders interessant und potentiell krankheitsassoziiert gewertet. Zehn Proteine wurden identifiziert, für die häufiger erhöhte Immunreaktivitäten bei MS gefunden wurden (in Tab. 4 farblich hervorgehoben). Für diese initialen ELISA-Analysen wurden Liquor-Proben von 46 MS-Patienten und 28 Kontroll-Patienten analysiert. Die Ergebnisse für die aussichtsreichsten Kandidaten wurden mit zwei weiteren Kollektiven bestätigt, so dass für die aussichtsreichsten Kandidaten Proben von 132 MS-Patienten und 125 Kontrollen untersucht wurden. Bei der Analyse der Immunreaktivitäten aller MS-Patienten ergaben sich bestimmte Muster. Fünf Proteine zeigten überlappende Immunreaktivitäten und wurden in der Proteingruppe 1 zusammengefasst, und drei Proteine in der Proteingruppe 2. Zwei weitere Proteine zeigten keine Überlappungen. In Tabelle 4 sind die Proteine einer

Protein	erhöhte IR	
	% MS	% Kontrollen
A5	2,2	0
A7	6,5	0
B7	2,2	0
D3	9,3	3,6
E1	0	0
F4	15,6	3,6
G4	23,9	3,6
H5	17,1	3,6
H1	6,5	0
G5	1,3	0
*A1	2,2	0
*B1	1,9	0
*B3	10,9	0
*F3	10,9	0
*C5	8,7	0
*C6	13	0
*D6	15,2	0
*D1	4,3	0
*D5	6,5	0
*G2	19,6	0
*H3	4,3	3,6
GAPDH	0	0

Tab. 4: Zusammenfassung der Immunreaktivitäten gegen 21 Kandidatenantigene mittels ELISA. Antigene, die bei MS-Patienten häufiger erhöhte OD-Werte zeigten als Kontrollen, sind farblich hervorgehoben. Cut-off war OD > 0,3. Antigene jeweils einer Farbe gehörten zu einer gemeinsamen Proteingruppe, die jeweils bei denselben Patienten erhöhte Immunreaktivitäten aufwiesen. Keine erhöhten Reaktivitäten wurden für GAPDH gemessen. IR: Immunreaktivität.

* Proteine waren 'out of frame' exprimiert.

Gruppe bzw. die einzelnen Proteine in jeweils derselben Farbe dargestellt. Interessanterweise waren alle 5 Proteine der Proteingruppe 1 'out of frame' exprimiert. Demnach erkennen die Antikörper möglicherweise eine Protein-Sequenz, die nicht im humanen Proteom enthalten ist. Die Kreuzreaktion der Liquorantikörper gegen verschiedene Proteine könnte darauf hinweisen, dass die Proteine möglicherweise identische oder ähnliche Epitope besitzen, die die Antikörper spezifisch binden.

5.9 Bindung der Kandidatenantigene an OKBs im Liquor

Nach der Selektion von 10 potentiell krankheitsrelevanten Proteinen wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht, ob die OKBs im Liquor von MS-Patienten gegen diese Antigene gerichtet sind. Hierzu wurde ein IEF-Immunoblot angewandt, der von einigen Arbeitsgruppen bereits bei der Neuroborreliose eingesetzt wurde [52]. Die Liquor-Ig (Liquor-Antikörper) wurden im IEF-Gel nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und aus dem Gel auf eine zuvor mit dem Kandidatenantigen beschichtete Nitrozellulose-Membran geblottet. Eine spezifische Bindung an die Kandidatenantigene wurde mit anti-humanen IgG-Antikörpern und TMB-Substrat detektiert. In Abbildung 13 ist die spezifische Bindung von OKBs gegen drei Kandidatenantigene gezeigt. Ferner konnte durch die Applikation von Liquor-Serum-Paaren dieser drei Patienten eine unterschiedlich starke Bindung von Liquor und Serum IgG für die drei Proteine beobachtet werden. Die Bindung ist im Liquor für alle Proteine am deutlichsten und weist auf die intrathekale Produktion spezifischer Antikörper hin.

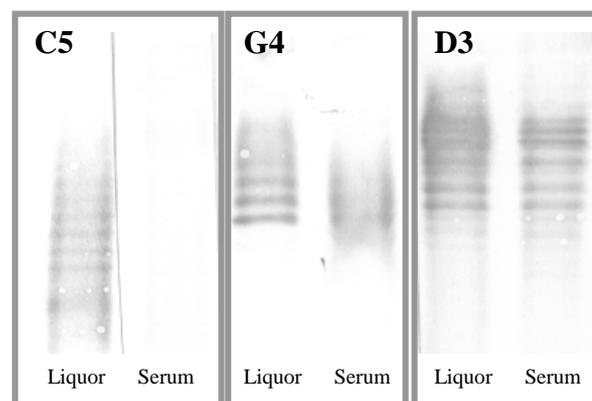


Abb. 13: IEF-Immunoblot zum Nachweis der Antigen-spezifischen Bindung der OKBs im Liquor.

Serum und Liquor von 3 MS-Patienten wurde auf eine Konzentration von 10 mg/l IgG eingestellt und die Bindung an verschiedene Kandidatenantigene zwischen Serum und Liquor verglichen. Deutliche Bandenmuster signalisierten die Bindung von OKBs an die Kandidatenantigene. Stärkere Banden im Liquor signalisierten eine intrathekale IgG-Synthese und wurden für alle Antigene beobachtet. Während keine Antikörper im Serum das Protein C5 banden, sind polyklonale Antikörperreaktivitäten gegen G4 und oligoklonale gegen D3 im Serum zu beobachten.

Nach dem Nachweis der Antigen-spezifischen Bindung der OKBs wurde untersucht, ob alle Kandidatenantigene, die jeweils einer Gruppe angehörten, ein identisches Bindungsmuster der OKBs aufwiesen, und ob die zwei verschiedenen Proteingruppen tatsächlich unterschiedliche Bereiche des gesamten OKB-Musters eines Patienten erkennen. Abbildung 14 zeigt das OKB-Bindungsmuster einzelner Proteine aus den Gruppen 1 und 2 eines einzigen Patienten, der zuvor im ELISA für die Proteine B3, C5 und C6 (Gruppe 1) sowie für die Proteine F4 und G4 (Gruppe 2) hohe Immunreaktivitäten aufwies. Es zeigte sich, dass die drei Proteine der Proteingruppe 1 (grün umrahmt) ein identisches Bindungsmuster der OKBs des Patienten hatten. Die zwei Proteine der Gruppe 2 (rot eingerahmt) hatten ebenfalls ein identisches Muster. Der Vergleich der Bindungsmuster zwischen beiden Proteingruppen zeigte, dass die Proteingruppen unterschiedliche Bereiche des gesamten OKB-Musters des MS-Patienten banden. Dieser Befund deutet auf die Anwesenheit eines identischen oder ähnlichen Epitops, das alle Proteine einer Proteingruppe gemeinsam haben, hin.

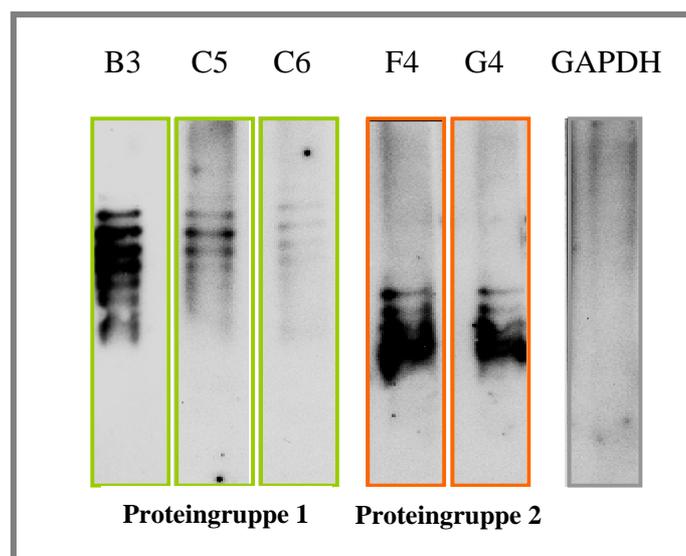


Abb. 14: Kreuzreaktivität der OKBs gegen unterschiedliche Kandidatenantigene.

IEF-Immunoblot mit Liquor eines MS-Patienten, der erhöhte Immunreaktivitäten gegen die Antigene B3, C5, C6, F4 und G4 im ELISA zeigte. Die Antigen-spezifischen OKB-Bindungsmuster waren unter allen Antigenen aus der Proteingruppe 1 identisch und unterschieden sich vom Muster, das spezifisch für Antigene aus der Proteingruppe 2 war. Nitrozellulose-Streifen wurden mit 50µg/ml des jeweiligen Antigens beschichtet und mit IEF-aufgetrennten Liquor-Antikörper geblottet. Die Antigen-spezifischen OKBs wurden immunchemisch mit anti-humanem IgG und ECL-Detektion identifiziert. Proteine der Gruppe 1 (B3, C5, C6) sind grün eingerahmt; der Gruppe 2 (F4, G4) sind orange eingerahmt. Ein unspezifischer Transfer der OKBs wurde durch die Abwesenheit einer Bindung gegen GAPDH ausgeschlossen.

5.10 Identifikation der Antikörper-bindenden Epitope

Da Antikörper nicht ausschließlich dreidimensionale Proteinstrukturen erkennen, sondern auch zu einem Teil lineare Peptidsequenzen binden, bestand die Möglichkeit, dass in allen Proteinen einer Gruppe homologe lineare AS-Sequenzen enthalten waren, die auf ein gemeinsames Epitop schließen könnten. Daher wurde ein Vergleich der AS-Sequenz der Proteine, die zu einer Gruppe gehörten, durchgeführt, um mögliche Hinweise auf die Epitope zu erhalten. Eine solche Analyse konnte für die einzelnen Proteine nicht durchgeführt werden, so dass im Folgenden nur auf die Proteine der Gruppen 1 und 2 fokussiert wurde. Die Proteine der Gruppe 1 waren alle 'out of frame' exprimiert, wodurch in der Translation wahrscheinlich ein frühes Stopp-Kodon erreicht würde und dies die Suche nach einem gemeinsamen Epitop erleichtern könnte. Tatsächlich handelte es sich um kurze Proteine mit einer AS-Länge zwischen 47 und mindestens 123 AS bzw. einer Masse von 11-30 kDa. Die Abbildung 15 zeigt die AS-Sequenzen der Proteine aus der Gruppe 1 beginnend mit der N-terminalen 6xHIS-Sequenz inklusive einer Vektor-spezifischen Sequenz und der nachgeschalteten AS-Sequenz des exprimierten Proteins.

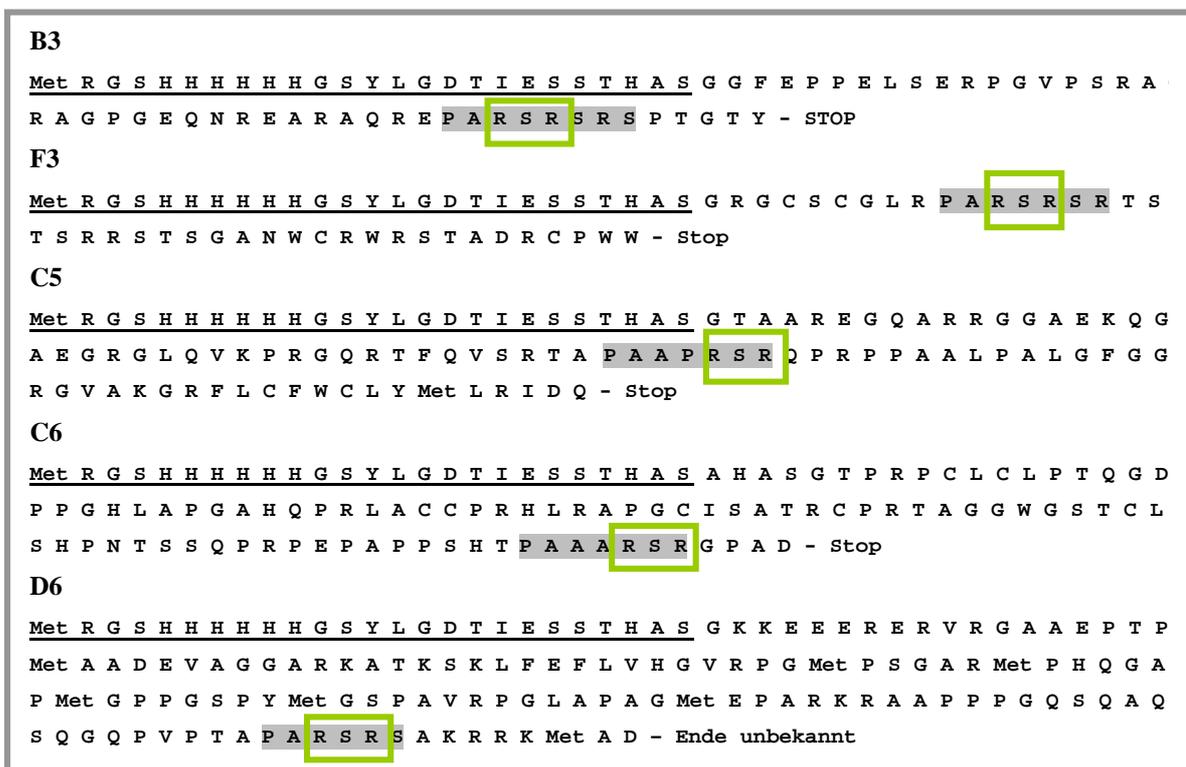


Abb. 15: AS-Sequenzen der Proteine aus Gruppe 1.

Die Suche nach einem gemeinsamen Epitop wurde durch einen AS-Sequenz Vergleich der exprimierten Proteine durchgeführt. Die N-terminale 6xHis-Sequenz mit der Vektorsequenz, die jeweils mit den Kandidatenantigenen fusioniert war, ist unterstrichen. Grau markiert sind Sequenzähnlichkeiten zwischen den Proteinen. Die minimale Epitopsequenz RSR, die alle 5 Proteine aus der Gruppe 1 teilten, ist grün eingerahmt.

Beim Vergleich der AS-Sequenzen wurde die 3 AS-umspannende Sequenz RSR als das minimalste Epitop aller Proteine der Gruppe 1 identifiziert. Ferner wurden Bereiche mit großer Homologie unter den Proteinen beobachtet (grau markiert). Diese homologen Sequenzen könnten möglicherweise das gemeinsame Epitop aller 5 Proteine darstellen.

Bei allen drei Proteinen der Gruppe 2 handelte es sich um das MYC-assoziierte ZINK-Finger Protein. Die Proteine unterschieden sich lediglich in der Größe. In Abbildung 16 ist die Aminosäuresequenz von H5 gezeigt. Über Protein H5 aus der Gruppe 2, das kleiner war als F4 und G4, wurde eine Einschränkung der AS-Sequenz, in der sich das 2. Epitop befand, ermöglicht (grau markiert).

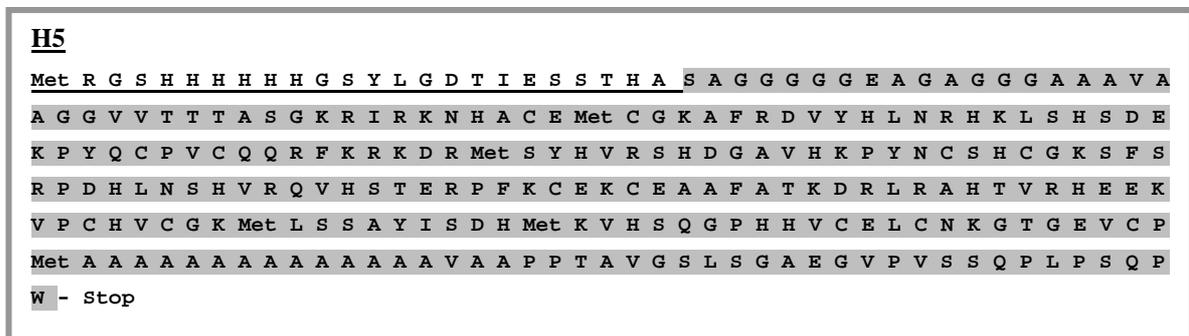


Abb. 16: Gemeinsame Aminosäuresequenz von Proteinen aus Gruppe 2.

Alle Proteine der Gruppe 2 wurden als das MYC-assoziierte Zink-Finger Protein identifiziert. Gezeigt ist die AS-Sequenz des kürzesten MYC-Protein-Fragmentes H5, wodurch eine Einschränkung des Epitops ermöglicht wurde. Unterstrichen ist die N-terminale 6xHis-Sequenz plus Vektorsequenz, mit der die Kandidatenantigene fusioniert waren. Grau unterlegt ist der Bereich, den alle Proteine der Gruppe 2 gemeinsam hatten.

Zur weiteren Analyse des Peptid-Epitops wurde ein sogenannter Peptidscan mit 13mer langen Peptiden, die jeweils 11 AS überlappten, und die die gesamte Peptidsequenz eines Proteins umspannten, durchgeführt. Die Peptide waren auf einer Zellulose-Membran als Spots nebeneinander in der Reihenfolge der AS-Sequenz des Proteins aufgebracht. Zur Analyse der Epitope wurden diese Membranen mit Liquor von MS-Patienten (im ELISA positiv gegen Proteine aus Gruppe 1 oder 2) inkubiert, um die Peptidsequenzen, die für Bindung der Liquor-Antikörper verantwortlich waren, zu identifizieren. Der Peptidscan wurde mit B3-Protein aus der Gruppe 1 (siehe Abb. 15) und mit H5-Protein aus der Gruppe 2 (siehe Abb. 16) durchgeführt.

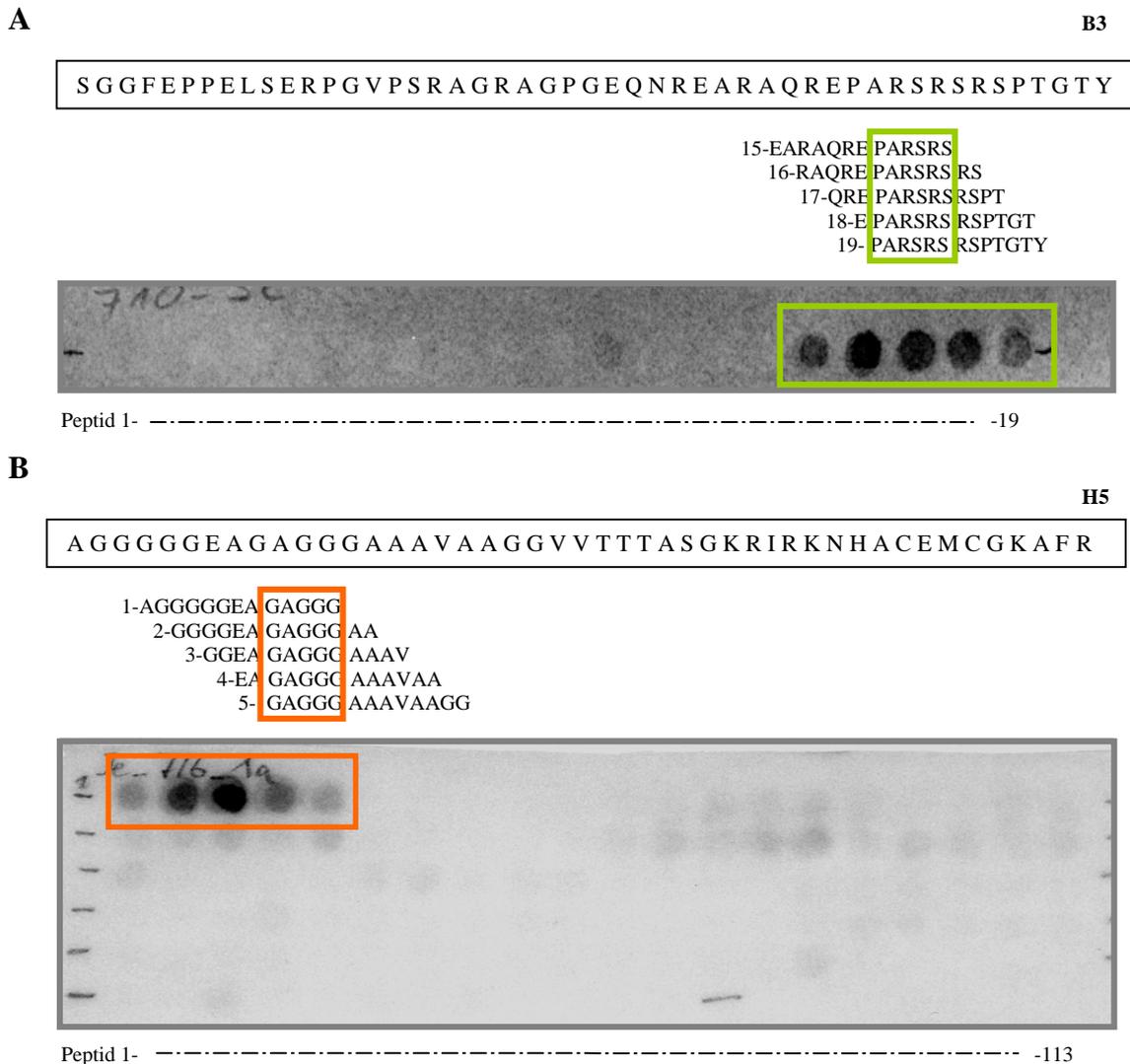


Abb. 17: Peptidscananalysen zur Identifizierung der Epitope.

Membranen mit 11 AS überlappenden 13mer Peptiden, die die gesamte Protein-Sequenz von B3 Protein aus der Gruppe 1 mit 19 Peptiden (**A**) und H5 aus der Gruppe 2 mit 113 Peptiden (**B**) umspannten, wurden mit MS-Liquor inkubiert und die Peptide, die die Antikörper am deutlichsten gebunden haben, identifiziert. Die bestbindenden Peptide sind für beide Proteine in der kompletten Peptid-Sequenz aufgeführt und das gemeinsame minimalste Epitop der Peptide für B3 (grün) und für H5 (orange) farblich eingerahmt.

Mit Hilfe der Peptidscan-Analysen konnte die Linearität des Epitops gezeigt und die Peptid-Sequenz PARSRS als das minimale Epitop von Gruppe 1 (Protein B3) und die Sequenz GAGGG von Gruppe 2 (Protein H5) identifiziert werden. Des Weiteren wurde ein Peptidscan mit dem Protein D3 durchgeführt, um das Epitop dieses einzelnen, zu keiner Gruppe gehörenden Proteins zu ermitteln. Die Analyse über lineare Peptide blieb erfolglos, so dass die Liquor-Antikörper im Falle von D3 wahrscheinlich ein diskontinuierliches Epitop erkennen.

Anschließend wurde mit 13-mer Peptiden aus der Originalsequenz QREPARSRSRPT und GGEAGAGGGAAAV der Proteine eine AS-Substitutionsanalyse durchgeführt, um das Epitop noch weiter zu charakterisieren und Schlüssel-AS an jeder Position zu definieren. Für diesen Ansatz wurden AS in den Positionen 3-10 der ursprünglichen Peptidsequenz von B3 durch die 20 und von H5 durch 8 nach Eigenschaften ausgewählte AS (siehe Kap. 4.19) ersetzt und mit Liquor des gleichen MS-Patienten wie zuvor im Peptidscan inkubiert. Abbildung 18 zeigt die Substitutionsanalysen von Peptid 1 und 2.

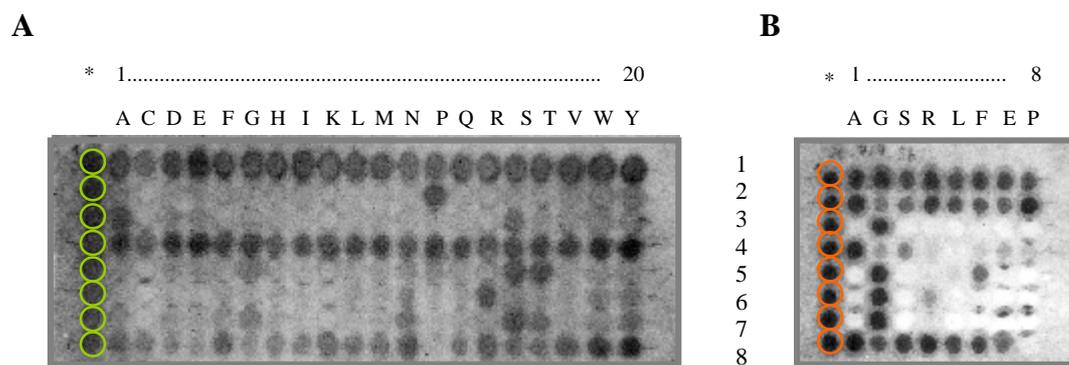


Abb. 18: AS-Substitutionsanalyse von bestbindenden Peptiden aus Protein B3 und H5.

A Für das 13-mer Peptid von Epitop 1 wurden die AS in den Positionen 3-10 durch die 20 natürlich vorkommenden AS substituiert und mit Liquor (1:200 verdünnt) des Index MS-Patienten inkubiert. Nach Inkubation mit sekundärem Antikörper und ECL-Detektion wurde das Motiv 1 ermittelt. **B** Für das 13-mer Peptid von Epitop 2 wurden die AS-Positionen 3-10 durch die AS Alanin (A), Glycin (G), Serin (S), Arginin (R), Leucin (L), Phenylalanin (F), Glutamat (E) und Prolin (P) substituiert. Die Detektion der an der jeweiligen Position wichtigen AS wurde wie in A durchgeführt und das Motiv 2 ermittelt. Grün markiert ist die Originalsequenz von Epitop 1 aus Protein B3 (QREPARSRSRPT); rot markiert ist die Originalsequenz von Epitop 2 aus Protein H5 (GGEAGAGGGAAAV). * Originalsequenz der Peptide. Senkrecht sind die AS Positionen 1-8 aufgetragen, waagerecht sind die substituierten AS 1-20 (B3) bzw. 1-8 (H5) an den jeweiligen Positionen gezeigt.

Die Substitutionsanalysen wurden mit Liquorproben von insgesamt 5 MS-Patienten durchgeführt. Diese Analysen führten schließlich zu den bestbindenden AS an jeder Position der beiden Epitope, so dass dadurch Motive abgeleitet werden konnten, mit denen nach den korrespondierenden Proteinen in der Datenbank gesucht wurde. Für die Motiv-Suche wurden für jede Position die bestbindenden AS, mit denen bei allen drei Liquores (je Motiv 3 verschiedene MS-Patienten) die deutlichste Bindung beobachtet wurde. In der Abbildung 19 sind die Resultate der Substitutionsanalysen für alle Patienten mit Abstufungen in der Bindungskapazität dargestellt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	AS-Pos
Q	R	E	P	A	R	S	R	S	R	S	P	T	B3
Q	R	QRSTVF	P	AS	X	S	R	S	RKF	S	P	T	MS1
			A			T		N	A				
						G		G					
		CHNW			CGHW			T					
Q	R	X	P	A	X	S	R	SN	RKF	S	P	T	MS2
			A			T			A				
					CHWP								
Q	R	X	P	A	EQPRQ	S	R	S	RK	S	P	T	MS3
		R		S	GM	T		N					
		C			CHW								
X	X	ausser CHW	P	A	ausser CHW	ST	R	SN	RK	X	X	X	Motiv 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	AS-Pos
G	G	E	A	G	A	G	G	G	A	A	A	V	H5
		GRF	ARP	G	A	G	G	G	ARF				MS1
									GSLEP				
		GRFLI	ARLFP	G	A	G	G	G	ARSFE				MS4
		EA	GSE		S		R						
									GP				
		G	APR	G	A	G	G	G	ASRFL				MS5
		SL	GSEP	ASRFEL P	GSRFELP	ASRFEL P	ASRFEL P	ASRFELP					
X	X	ausser SL	APR	G	A	G	G	G	ARF	X	X	X	Motiv 2

Abb. 19: Definition der Erkennungsmotive 1 und 2.

Substitutionsanalysen für jedes Motiv wurden nacheinander mit Liquor (1:200 verdünnt) von jeweils drei verschiedenen MS-Patienten durchgeführt und die bestbindenden AS an den substituierten Positionen (aus den 13-mer Peptiden wurden jeweils AS-Position 3-10 substituiert) ermittelt. Für die Identifizierung der Motive wurden die AS, die bei allen Patienten eine bessere Bindung der Liquorantikörper zur Folge hatten, ausgewählt und diejenigen ausgeschlossen, die eine Bindung hemmten. Insgesamt wurden die Analysen mit 5 verschiedenen MS-Patienten durchgeführt, wobei MS-Patient 1 der Index-Patient war, der für beide Proteingruppen erhöhte Immunreaktivitäten aufwies. Bindungsintensitäten sind durch Abstufungen in Grau-Tönen dargestellt. Bestbindende sind dunkelgrau unterlegt, hemmende AS sind durchgestrichen. Die Original-Peptid-Sequenz von B3 und H5 ist aufgeführt. Die abgeleiteten AS an den jeweiligen Positionen eines 13-mer-Peptides sind für das Motiv 1 in grün und für das Motiv 2 in orange dargestellt.

Die Erkennungsmotive aus den Substitutionsanalysen (Abb. 19) wurden für die Swiss-Prot Datenbank-Suche eingesetzt, um nach den korrespondierenden Proteinen im gesamten Proteom zu suchen. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Suche nach den Proteinen, die die Erkennungsmotive 1 und 2 beinhalteten, dargestellt.

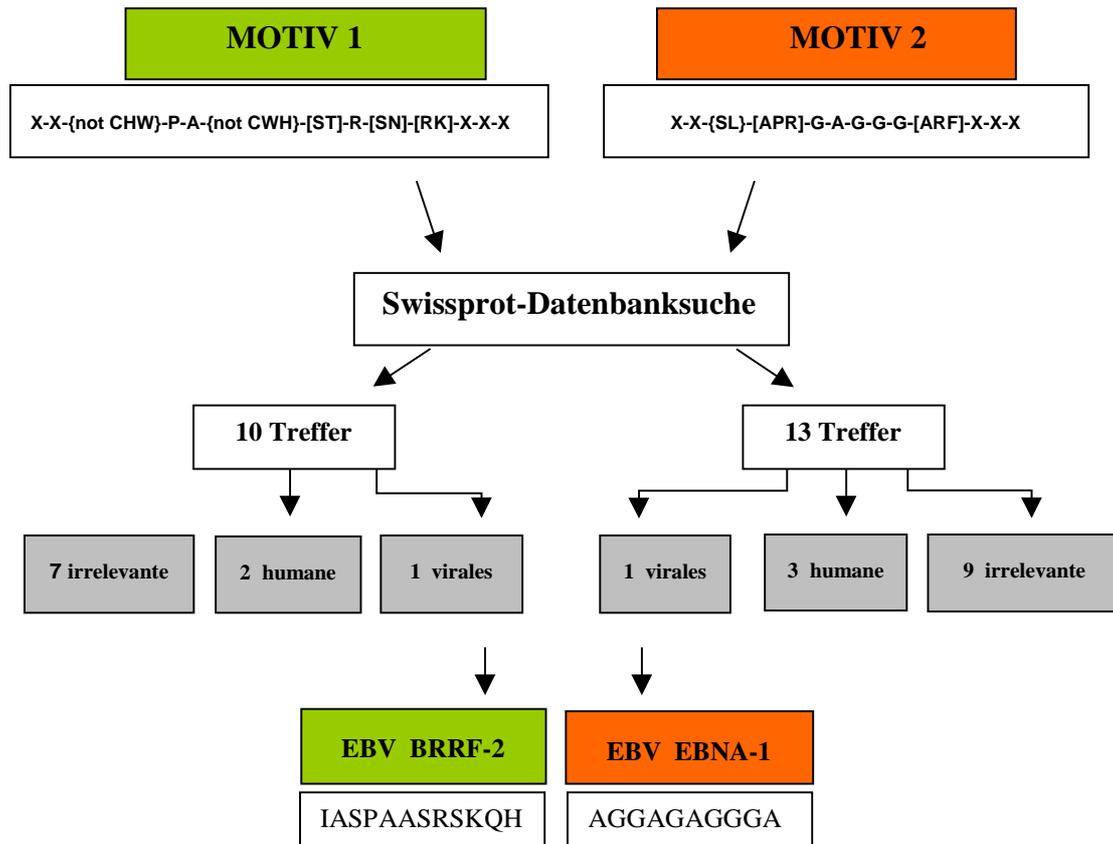


Abb. 20: Swissprot-Datenbank-Suche mit Motiven 1 und 2.

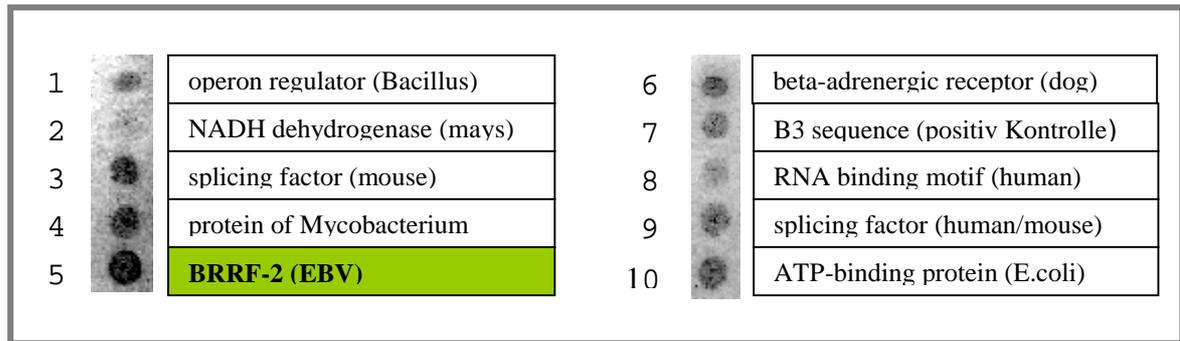
Mit Hilfe der Substitutionsanalyse wurden Bindungsmotive identifiziert, mit denen nach dem natürlich vorkommenden Proteinen in der Protein-Datenbank gesucht wurde. AS-Positionen 3-10 des 13-mer Peptides von B3 und H5 wurden substituiert und jede substituierte AS mit bestbindenden AS definiert bzw. AS ausgeschlossen, die laut Substitutionsanalyse eine Bindung der Antikörper vermieden. Mit beiden Motiven wurde die gesamte Protein-Datenbank durchsucht. Mit Motiv 1 wurden 10 Proteine, darunter 2 humane Proteine, und mit Motiv 2 wurden 13 Proteine, darunter 3 humane Proteine gefunden. Je 1 virales Protein wurde für beide Motive gefunden, die beide aus ein und demselben Erreger stammten: dem Epstein-Barr-Virus. Beide Virus-Gene, BRRF-2 und EBNA-1, sind benachbarte Gene, die sich im gleichen Leseraster befinden. X: willkürliche AS an den nicht-substituierten AS-Positionen eines 13-mer Peptides.

Da für die vorherigen Analysen jeweils 13-mer Peptide eingesetzt wurden, erfolgte die Datenbank-Suche ebenfalls mit 13 AS langen Sequenzen. Diese setzten sich aus den 8 substituierten AS-Positionen (Position 3-10) und 5 willkürlichen AS, die diese Motiv-Sequenz umspannten, zusammen. Die Datenbank-Suche mit 13-mer Peptiden identifizierte 10 Proteine für das Motiv 1 und 13 Proteine für das Motiv 2. Bei den Proteinen mit Motiv 1 handelte es sich um 2 humane und um 8 Proteine aus anderen Organismen. Mit Motiv 2 wurden 3 humane und 10 Proteine aus anderen Organismen gefunden.

Interessanterweise wurde mit beiden Motiven je ein Protein gefunden, das im Genom des Epstein-Barr-Virus enthalten ist. Es handelte sich dabei um EBNA-1 (Motiv 2) und ein bisher wenig charakterisiertes Protein, das BRRF-2 (Motiv 1).

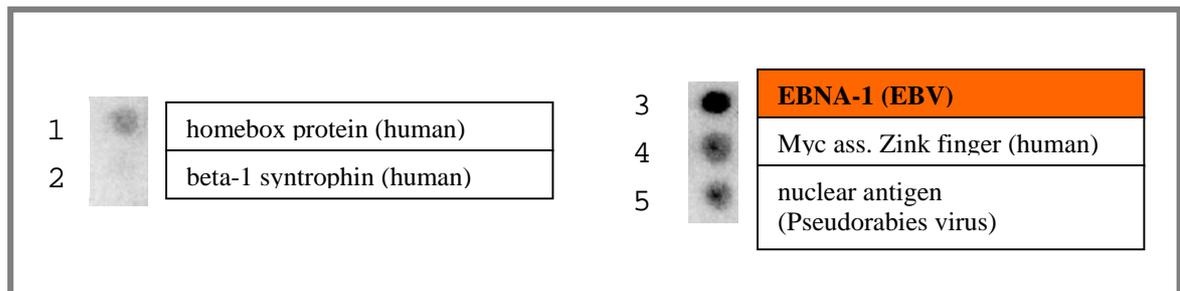
Anschließend wurde untersucht, gegen welche Peptide aus den Proteinen, die über die Datenbank-Suche gefunden wurden, die Liquor-Antikörper die deutlichste Immunreaktion zeigten. Hierbei wurden die 13-mer Peptide, die die jeweilige Motiv-Sequenz aus den Proteinen enthielten, auf eine Membran aufgebracht. Die Membran wurde mit MS-Liquor inkubiert und die Intensität der Immunreaktion gegen die unterschiedlichen Peptide verglichen. Ein derartiger qualitativer Vergleich war möglich, da die Peptide in gleicher Menge (100µg) auf der Membran synthetisiert waren. Für diese Analysen wurde eine Auswahl an Peptiden getroffen: alle humane Peptide, beide EBV-Peptide und einige irrelevante Peptide. In Abbildung 21 sind die Analysen gezeigt. Wie zu erkennen ist, wurden unterschiedlich starke Immunreaktivitäten detektiert. Die deutlichste Bindung der Liquor-Antikörper wurde gegen beide EBV-Peptide beobachtet. Dagegen waren die Reaktivitäten gegen humane Peptide deutlich schwächer, darunter auch gegen das MYC-Peptid.

A



1	HMKPAISRNRVGM	6	ESPPAASRSRSPG
2	PKIPANTRNKIGS	7	AQREPARSRSRSP
3	PNVPAESRSRSKS	8	NPPASSRNRSPS
4	GQNPASSRSRRNR	9	RHTPARSRSKEDS
5	IASPAASRSKQHC	10	ENIPAMSRRLYT

B



1	TCCAGAGGGRRGGG	3	AGGAGAGGGAGAG
2	AGPAGAGGGRAQR	4	GGEAGAGGGAAAV
		5	EGPRGAGGGAGES

Abb. 21: Qualitative Bestimmung der Immunreaktivitäten gegen Peptide aus der Motiv-Suche.

Ausgewählte 13-mer Peptide aus Proteinen, die nach der Datenbanksuche Motive 1 (A) und 2 (B) enthielten, wurden auf Bindungsfähigkeit der Liquor-Antikörper eines MS-Patienten untersucht. Beide EBV-Peptide zeigten die deutlichste Antikörperbindung, während humane im Vergleich schwächere Bindung aufzeigten. Unter den Peptiden des 2. Motivs ist das ursprünglich im Protein-Array identifizierte Peptid aus dem MYC-assoziierte Zink-Finger Protein, das aber verglichen mit EBNA-1 eine deutlich schwächere Bindung aufwies. Liquor wurde für diesen Versuch 1:500 verdünnt und die Bindung mittels ECL-Detektion ermittelt. In den Boxen sind die Peptidsequenzen der untersuchten Peptide aufgeführt.

5.11 Immunreaktivitäten gegen BRRF-2 und EBNA-1 Peptide

Es stellte sich nun die Frage, ob MS-Patienten Immunreaktivitäten gegen die Peptide von EBV aufweisen. Zur Klärung dieser Frage wurde ein ELISA mit den EBV-Peptiden von BRRF-2 und EBNA-1 etabliert. Hierbei wurden Liquor- und Serum-Proben von insgesamt 130 MS-Patienten und 115 NIND-Patienten untersucht. Um die OD-Werte direkt miteinander vergleichen zu können, wurden alle Liquorproben (1:5 verdünnt) bzw. alle Serumproben (1:100 verdünnt) jeweils in einem Versuch analysiert. Abbildung 22A zeigt die Analysen für das BRRF-2 Peptid mit Liquor (Abb. 22A, links) und Serum (Abb. 22A, rechts). Dieselben Proben wurden auf Reaktivitäten gegen das Peptid von EBNA-1 untersucht (Abbildung 22B, links und rechts).

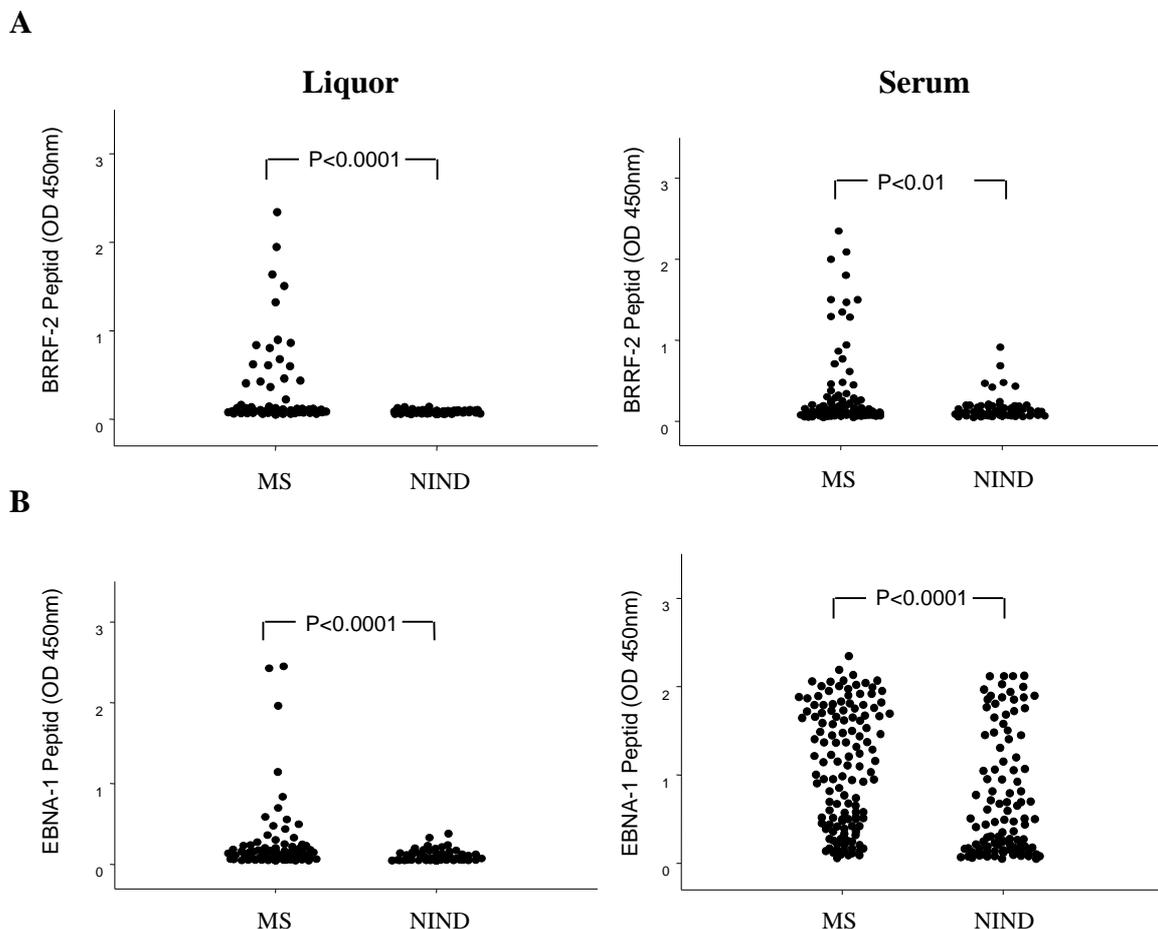


Abb. 22: Immunreaktivitäten gegen EBV-Peptide.

Die Immunreaktivitäten gegen Peptide von BRRF-2 (**A**) und EBNA-1 (**B**) wurden im Liquor (linke Graphen) und Serum (rechte Graphen) von MS-Patienten und von NIND-Patienten analysiert. Die Ausprägung der Reaktivitäten wurde im ELISA über die OD ermittelt. NIND: non-inflammatory neurological diseases. Mann-Whitney-Test wurde angewandt.

Dargestellt sind die OD-Werte von jeder Probe, stratifiziert nach MS-Patienten und NIND-Patienten. Die Immunreaktivitäten gegen das BRRF-2 Peptid waren bei MS-Patienten sowohl im Liquor als auch im Serum signifikant höher als bei NIND-Patienten ($p < 0,0001$; $P < 0,01$). Im Liquor wiesen insgesamt 18 Patienten von 130 MS-Patienten deutlich erhöhte Immunreaktivitäten (cut-off: $OD > 0,3$) auf, während keine der NIND-Patienten positive Immunreaktivitäten gegen das BRRF-2 im Liquor zeigten (Fisher's exact Test; $p < 0,0001$). Im Serum war der Unterschied in der Frequenz von erhöhten Werten ebenfalls signifikant. 22 Patienten von 130 MS-Patienten hatten BRRF-2-positive Reaktivitäten im Serum, dagegen nur 6 Patienten von 112 Patienten des NIND-Kollektivs (Fisher's exact Test; $p = 0,005$). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Analysen mit dem Peptid von EBNA-1. MS-Patienten wiesen in beiden Kompartimenten signifikant höhere Reaktivitäten als NIND-Patienten auf ($p < 0,00001$).

5.12 Immunreaktivitäten gegen BRRF-2 und EBNA-1 Proteine

Aufgrund der signifikant erhöhten Immunreaktivitäten gegen die 13-mer Peptide von BRRF-2 und EBNA-1 bei MS-Patienten wurden in den folgenden Experimenten die Immunreaktivitäten gegen die BRRF-2 und EBNA-1 Proteine untersucht. Dabei wurde das rekombinant hergestellte EBNA-1 Proteinfragment eingesetzt, das einen Teil des Glycin-Alanin reichen Bereiches (AS₃₀₂-AS₆₄₁ von EBNA-1; 34.6 kDa; WAK Chemie) enthielt. Da das BRRF-2 Protein kommerziell nicht erhältlich war, wurde es mit einem GST-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels GST-Affinitätsäulen aufgereinigt. Es wurde ein partielles und ein volle-Länge BRRF-2 Protein hergestellt, wofür entsprechende BRRF-2-Gensequenzen aus B95-Zellen amplifiziert wurden. In Abbildung 23 ist die Amplifikation des partiellen und volle-Länge BRRF-2 Gens (Abb. 23A) und die Konstruktion des Vektors mit Angabe der Lage des GST- und BRRF-2-Gens gezeigt. Die Lage des identifizierten BRRF-2-Epitops ist grün dargestellt.

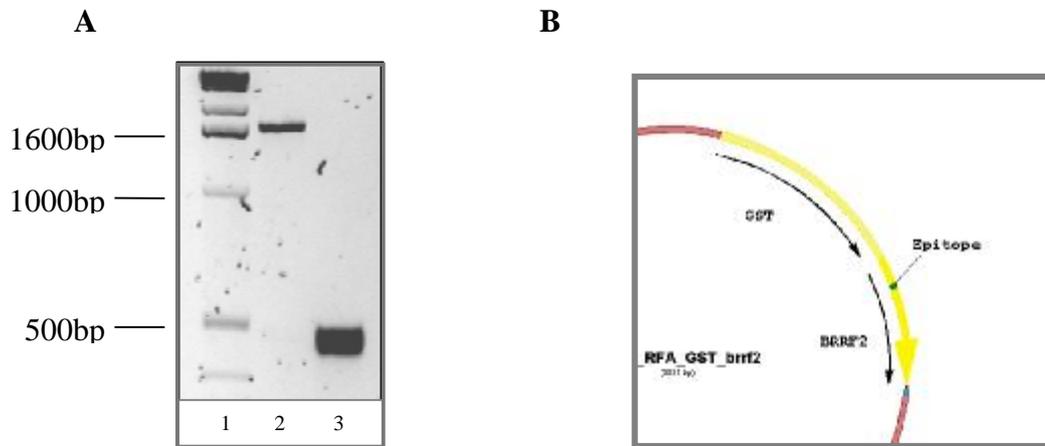


Abb. 23: Rekombinante Expression des BRRF-2 Proteins.

A Das BRRF-2-Gen, volle-Länge und partielles, wurde aus DNA von B95-Zellen amplifiziert und **B** in pGEX-GST-Vektor c-terminal unter Erhalt des Leserahmens an ein GST-Fusionsprotein inkloniert. Es wurde sowohl DNA des gesamten BRRF-2 Gens als auch ein Teilstück des BRRF-2 Gens inkloniert. In der Graphik ist das partielle Gen mit grün markierten Epitop dargestellt. 1: 1kbp-Leiter; 2: volle-Länge BRRF-2-Gen; 3: partielles BRRF-2-Gen.

Abbildung 24A zeigt die Aufreinigung des rekombinant hergestellten BRRF-2 Proteins, sowohl in voller Länge (AS_1-AS_{537} ; 58.5kDa) als auch als partielles Protein ($AS_{385}-AS_{537}$; 16kDa). Da die Proteine mit einer GST-Sequenz fusioniert waren und als solches Fusionsprotein aufgereinigt wurden, stellten sich die Proteine im Gel um 30 kDa größer dar. Das in dieser Studie ermittelte Epitop umfasste die Aminosäuren $AS_{409}-AS_{414}$ und war in beiden Proteinen exprimiert. Die spezifische Bindung der Serum-Antikörper eines MS-Patienten an die BRRF-2 Proteine ist in Abbildung 24C gezeigt, während Kontrollpatienten-Serum an dieser Stelle keine Bindung zeigte (Abb. 24B).

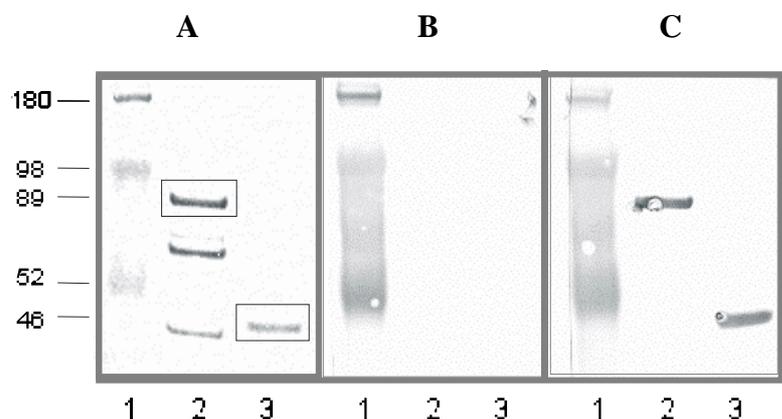


Abb.24: Expressionsanalyse des rekombinanten GST-BRRF-2 Fusionsproteins.

A Aufgereinigte Proteineluate des 89 kDa großen Gesamtproteins und des 46 kDa großen Proteinfragmentes wurden in der SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie blue angefärbt. **B+C** Parallel wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Serum einer Kontrollperson (**B**) und eines MS-Patienten (**C**) inkubiert und die spezifische Bindung mit sekundärem Antikörper und TMB-Substrat nachgewiesen. 1: Molekulargewichtsmarker; 2: Eluat von GST-BRRF-2 (89 kDa; AS_1-AS_{537}); 3: Eluat vom partiellen GST-BRRF-2 (46 kDa; $AS_{385}-AS_{537}$).

Da sich das partielle Protein effizienter und reiner aus den Bakterien isolieren ließ, wurde dieses für die anschließenden Analysen verwendet. In den folgenden Experimenten wurde die Immunreaktivität gegen das BRRF-2 Protein in den 130 MS-Patienten ermittelt, deren Reaktivität zuvor gegen das BRRF-2 Peptid bestimmt wurde. Als Kontrollen fungierten die bekannten 115 NIND-Patienten und zusätzlich 85 Patienten mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen (other inflammatory neurological diseases, OIND) wie bakterielle und virale Meningitis. Um fehlerhaft erhöhte Detektion von Immunreaktivitäten bedingt durch Kontamination des Proteineluates mit Restbeständen von bakteriellen Proteinen ausschließen zu können, wurde ein Kontrollprotein (Valpha-Kette des T-Zell Rezeptors) rekombinant exprimiert und in die Analysen einbezogen. Das bedeutete im Detail, dass jede Probe parallel gegen das BRRF-2 und die Valpha-Kette analysiert wurde. Die OD-Werte gegen die Valpha-Kette wurden von den OD-Werten gegen BRRF-2 subtrahiert. In Abbildung 25 sind die Immunreaktivitäten gegen das BRRF-2 Protein für Liquor (Abb. 25A) und Serum (Abb. 25B) für alle MS-Patienten, Patienten mit NIND und OIND nach Subtraktion der Reaktivitäten gegen das Valpha-Kontrollprotein dargestellt.

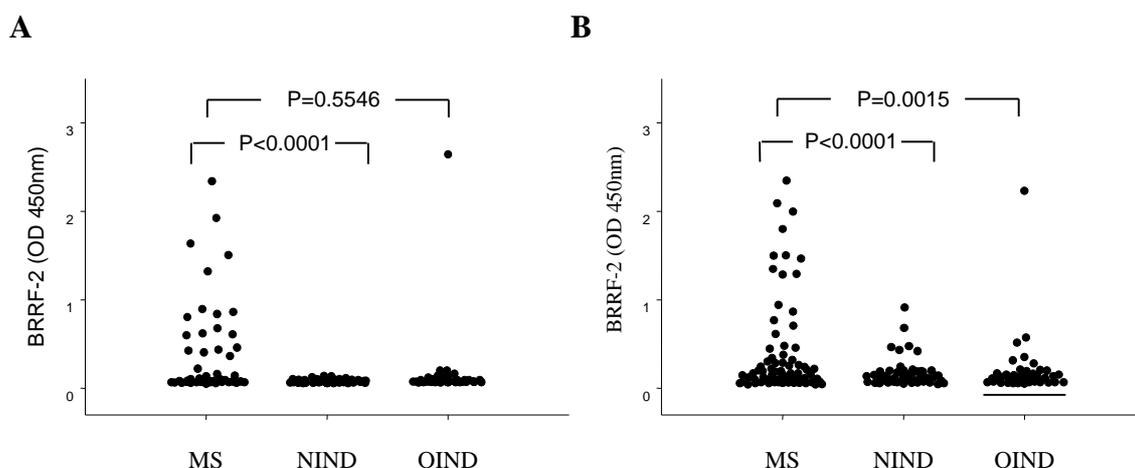


Abb. 25: Bestimmung der Immunreaktivitäten gegen rekombinantes BRRF-2 protein mittels ELISA.

A Gezeigt sind die Immunreaktivitäten gegen BRRF-2 Protein im Liquor von MS-, NIND- und OIND-Patienten. **B** Gezeigt sind Reaktivitäten gegen BRRF-2 Protein im Serum derselben Patienten wie in A. Die Höhe der Antikörperreaktivität gegen das Protein wurde als OD ausgedrückt. Zur Bestimmung der Reaktivität gegen BRRF-2 wurden parallel die OD-Werte gegen BRRF-2 und die OD-Werte gegen das Kontrollprotein Valpha-Kette jeder Probe bestimmt und von BRRF-2 Werten subtrahiert. Jeder Punkt entspricht der OD einer singulären Probe. Der Mann-Whitney-Test wurde für die statistischen Analysen verwendet.

Die Analysen zeigten, dass MS-Patienten sowohl im Liquor als auch im Serum signifikant höhere Immunreaktivitäten gegen BRRF-2 Protein aufwiesen als NIND-Patienten. Auch der Anteil der BRRF-2 positiven MS-Patienten war verglichen mit NIND-Patienten signifikant (Fisher's exact Test; $p < 0,0001$).

Beim Vergleich der OD-Werte von MS-Patienten versus Patienten mit OIND wurde in der Höhe der Immunreaktivität kein statistisch signifikanter Unterschied im Liquor ($p=0,5546$) beobachtet. Obwohl tendenziell MS-Patienten häufiger Reaktivitäten im Liquor (17 von 130) zeigten als OIND-Patienten (6 von 85) erreichte der Unterschied keine Signifikanz (Fisher's exact Test; $p=0,1831$). Jedoch war der Unterschied in der Höhe der Immunreaktion im Serum wiederum signifikant zwischen MS-Patienten und OIND-Patienten ($p=0,0015$) und NIND-Patienten ($p<0,0001$). Die im Mittel höhere Reaktivität im Liquor bei OIND-Patienten ist folgendermaßen zu erklären: Diese Patienten hatten virale oder bakterielle ZNS-Infektionen, die ein derartiges entzündliches Milieu im ZNS bewirken, dass die normalerweise für Antikörper sehr dichte Blut-Hirn-Schranke durchlässig wird und IgG aus dem Serum ungehindert ins ZNS übergeht. Dies wird durch die stark erhöhte Gesamt-IgG-Konzentration im Liquor reflektiert. Haben die Patienten anti-BRRF-2 Antikörper im Serum, sind diese dann im Liquor nachweisbar. Die MS-spezifische Antikörperreaktion gegen BRRF-2 deutete sich aber in der Signifikanz im Serum an. Des Weiteren wurden die Immunreaktivitäten gegen das weitere EBV-Protein EBNA-1 (Abb. 26) ermittelt. Hierbei wurden dieselben Proben analysiert. Obwohl Kontrollpersonen nun häufiger Antikörper gegen EBNA-1 aufwiesen als gegen das BRRF-2 Protein, war der Unterschied in der Ausprägung der Immunreaktivität zwischen MS-Patienten und beiden Kontroll-Kollektiven im Liquor (Abb. 26A) und Serum (Abb. 26B) dennoch hoch signifikant. MS-Patienten zeigten deutlich höhere Immunreaktivitäten als

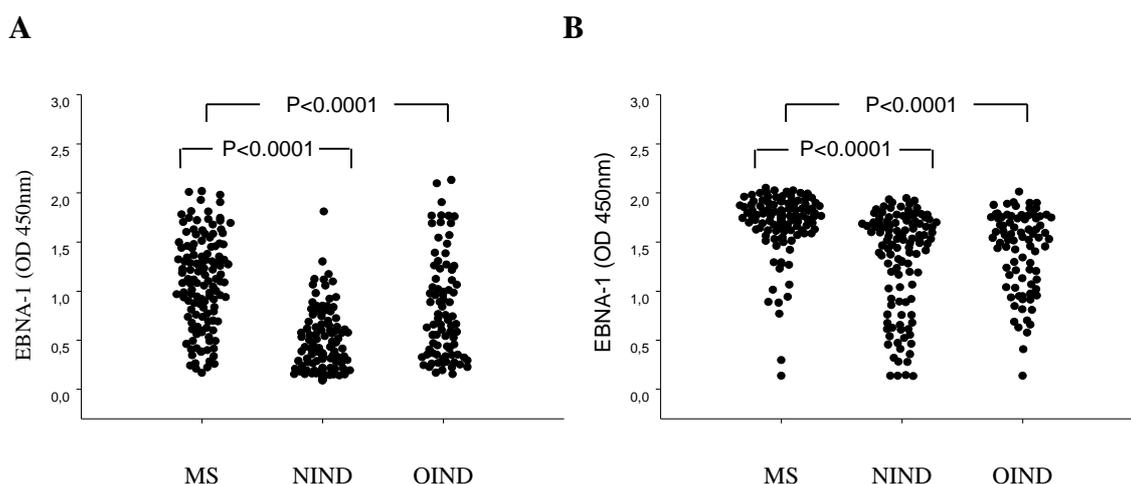


Abb. 26: Bestimmung der Immunreaktivitäten gegen rekombinantes EBNA-1 Protein mittels ELISA.

A Immunreaktivitäten im Liquor von denselben MS-, NIND- und OIND-Patienten wie in Abb. 23. **B** Reaktivitäten im Serum derselben Patienten. Jeder Punkt entspricht der OD einer singulären Probe. Mann-Whitney-Test wurde für die statistischen Analysen verwendet.

Patienten mit NIND und OIND. Die Frequenz von EBNA-1 Serum-positiven Patienten war unter den MS-Patienten ebenfalls höher, wobei der Unterschied erst bei erhöhten Immunreaktivitäten (cut-off OD=1,0) signifikant wurde.

5.13 Intrathekale BRRF-2-spezifische IgG-Synthese und Bindung der OKBs

Ein Kennzeichen der MS ist bekanntlich die intrathekale IgG-Synthese. Zur Analyse der intrathekalen Synthese von BRRF-2-spezifischen Antikörpern, wurden Liquor und Serum desselben Patienten auf die gleiche IgG-Konzentration von 10mg/l eingestellt und die Reaktivität gegen das BRRF-2 Protein parallel im ELISA ermittelt. Der Quotient aus OD Liquor/OD Serum beschrieb, in welchem Kompartiment die spezifische Synthese dominierte. Diese Analysen wurden für alle Patienten durchgeführt, die in den vorherigen ELISA-Experimenten eine OD > 0,2 aufwiesen. Auf diese Weise wurden 22 MS-Patienten, 2 Patienten mit NIND und 13 Patienten mit OIND untersucht, wobei NIND- und OIND-Patienten als Kontrollen zusammengefasst wurden. Die Analysen sind in Abbildung 27 dargestellt. Sie zeigten, dass etwa 60% der untersuchten MS-Patienten intrathekal BRRF-2 spezifische Antikörper produzierten, dagegen zeigten nur 6,7% der Kontrollen eine intrathekale Synthese (p=0.0016; Fisher's exact Test). Der einzige Kontrollpatient, der eine intrathekale Synthese aufwies, war der OIND-Patient, der zuvor immer die höchsten

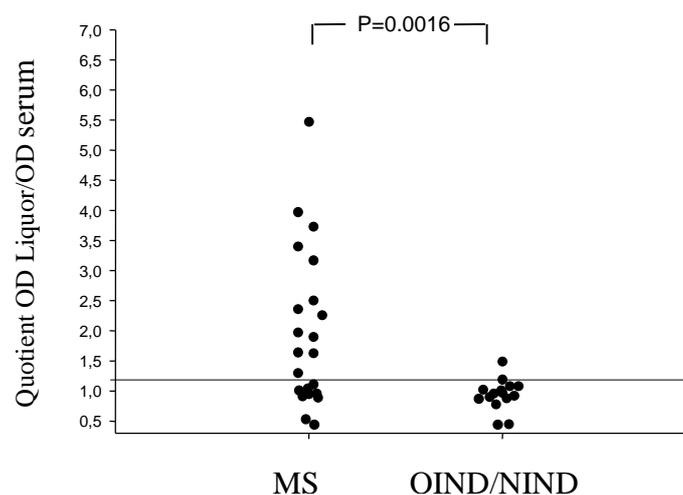


Abb. 27: Intrathekale Synthese von BRRF-2 spezifischen Antikörpern bei MS und Kontrollen.

Liquor und Serum von Patienten, die im Liquor BRRF-2 positive (hierbei OD >0,2) Immunreaktivitäten zeigten, wurden auf eine IgG-Konzentration von 10mg/l eingestellt und die Reaktivität gegen BRRF-2 im ELISA parallel bestimmt. Die Quotienten aus ODLiquor/ODSerum wurden gebildet. Quotienten größer als 1,2 wurden als Ausdruck einer intrathekalen Synthese definiert. Graph zeigt die Quotienten aller analysierten Patienten aufgetrennt nach MS-Patienten und Kontrollen (NIND/OIND zusammengefasst). Fisher's exact Test wurde verwendet.

Reaktivitäten im Liquor hatte, nun aber eine nur moderate intrathekale Synthese aufwies (Abb. 27). Bei dem Vergleich der Immunreaktivitäten mit allen Liquorproben, die auf die gleiche IgG-Konzentration eingestellt wurden, konnte nun ein signifikanter Unterschied zwischen den MS-Patienten und Kontrollen (NIND und OIND) beobachtet werden ($p=0,0082$). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die erhöhten Immunreaktivitäten im Liquor in Abbildung 25 tatsächlich durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke bedingt waren.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob BRRF-2-spezifische Antikörper oligoklonalen Ursprungs sind. Wie bereits in Kapitel 5.9 für die Kandidatenantigene beschrieben, wurde dazu ein IEF-Immunoblot durchgeführt, wobei die Membranen hierbei mit BRRF-2 Protein beschichtet wurden. Abbildung 28 zeigt am Beispiel von 4 verschiedenen MS-Patienten die BRRF-2-spezifische Bindung von OKBs im Liquor.

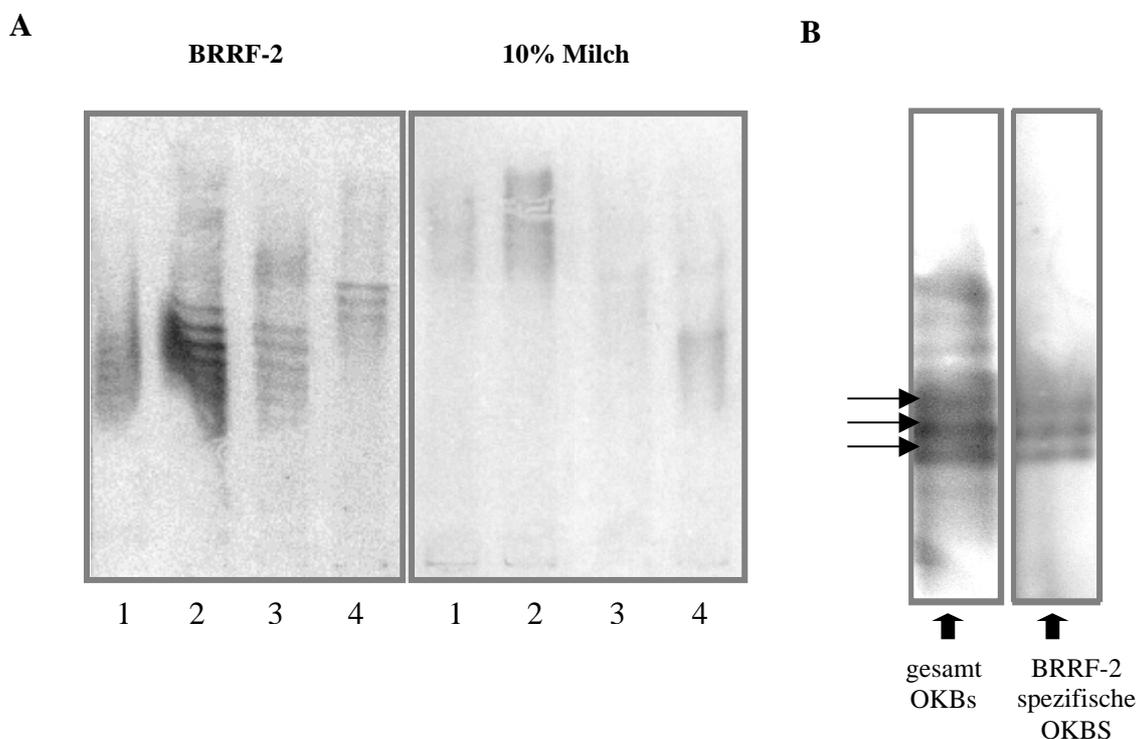


Abb. 28: Spezifische Reaktivitäten der OKBs im Liquor gegen BRRF-2 Protein.

A Affinitäts Analyse der OKBs von 4 verschiedenen MS-Patienten nach IEF der Liquor-Antikörper und Affinitäts-Blotten gegen BRRF-2-beschichtete (links) oder Milchpulver-inkubierte Nitrozellulosemembranen (rechts). Alle MS-Patienten (1-4) zeigten positive Reaktivitäten im ELISA gegen BRRF-2. Die Patienten zeigten individuelle Bindungsmuster der OKBs spezifisch gegen BRRF-2 (links). Bei keinem der Patienten wurde ein unspezifisches Blotten der OKBs beobachtet (rechts). **B** BRRF-2 spezifische OKBs sind Teil der gesamten OKBs im Liquor. Nach der IEF wurden die Antikörper auf eine unbeschichtete Membran (linke Membran) und parallel auf eine BRRF-2 beschichtete Membran (rechte Membran) transferiert und das OKB-Muster in beiden Applikationen verglichen. Pfeile markieren BRRF-2 spezifische OKBs.

Außerdem wurde bestätigt, dass BRRF-2 spezifische OKBs Teil des gesamten OKB-Musters darstellen (Abb. 28B). Als nächstes wurde untersucht, ob beide EBV Proteine, BRRF-2 und EBNA-1, unterschiedliche Breiche des OKB-Musters des Liquors von einem MS-Patienten binden. In Abbildung 29 sind die Reaktivitäten im IEF-Immunoblot zweier MS-Patienten (Abb. 29 A und B) gegen BRRF-2 (jeweils 1. Spur) und EBNA-1 (jeweils 2. Spur) dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass beide Proteine unterschiedliche Bereiche der OKBs eines Patienten banden.

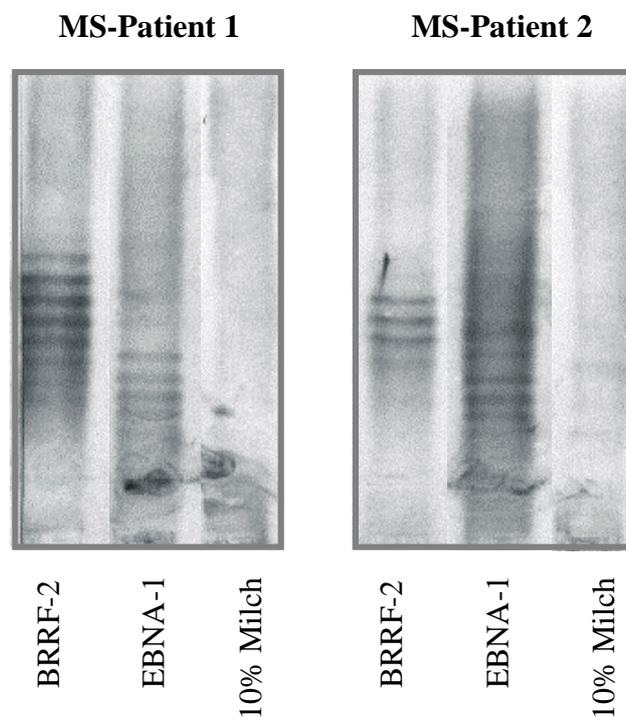


Abb. 29: Spezifische Reaktivitäten von OKBs im Liquor gegen BRRF-2 und EBNA-1.

Affinitäts Immunoblot der OKBs von 2 verschiedenen MS-Patienten nach IEF der Liquor-Antikörper und Affinitäts-Blotten gegen BRRF-2-beschichtete und EBNA-1 beschichtete Membranen. Die Proteine banden bei beiden MS-Patienten unterschiedliche Bereiche der OKBs. Die Milchpulver-inkubierten Nitrozellulosemembranen weisen auf keine unspezifische Bindung der OKBs hin. Siehe auch Abb. 28.

5.14 Nachweis von EBV-spezifischen RNA-Transkripten

Zum Nachweis der spezifischen Expression von BRRF-2 wurde die RNA aus B95-Zellen isoliert, die DNA verdaut und die RNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde das BRRF-2-Gen von der cDNA amplifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass RNA-Transkripte spezifisch für BRRF-2 in B95-Zellen existieren, und es deshalb nahe liegt, dass das BRRF-2 Protein in den Zellen tatsächlich exprimiert wird. Sowohl das partielle als auch das volle-Länge-Gen wurden erfolgreich amplifiziert. Um eine Kontamination mit genomischer EBV-DNA auszuschließen, wurde eine Kontroll-Amplifikation mit einer RNA-Probe, die nicht in cDNA umgeschrieben wurde, durchgeführt (Abb. 30A).

Außerdem sollte mit der gleichen Methode untersucht werden, ob auch BRRF-2 wie EBNA-1 ein latentes Protein darstellt. Hierzu wurden das EBNA-1 und das BRRF-2-Gen auf cDNA-Ebene sowohl aus B95-Zellen (lytische Infektion) als auch aus EBV-transformierten B-Zellen (latente Infektion) amplifiziert. Für diese Untersuchungen wurden kurze Fragmente amplifiziert: das BRRF-2-spezifische Amplifikat umfasste 61 Basenpaare (bp) und das EBNA-1-spezifische Produkt umfasste 107 bp. Die Ergebnisse deuten aufgrund der Amplifikation von BRRF-2-Produkten in den latent infizierten B-Zellen darauf hin, dass es sich wie bei EBNA-1 um ein latentes Protein handelt, d.h., dass das BRRF-2 Protein auch während einer latenten Infektionsphase von EBV in den infizierten Zellen exprimiert wird (Abb. 30B).

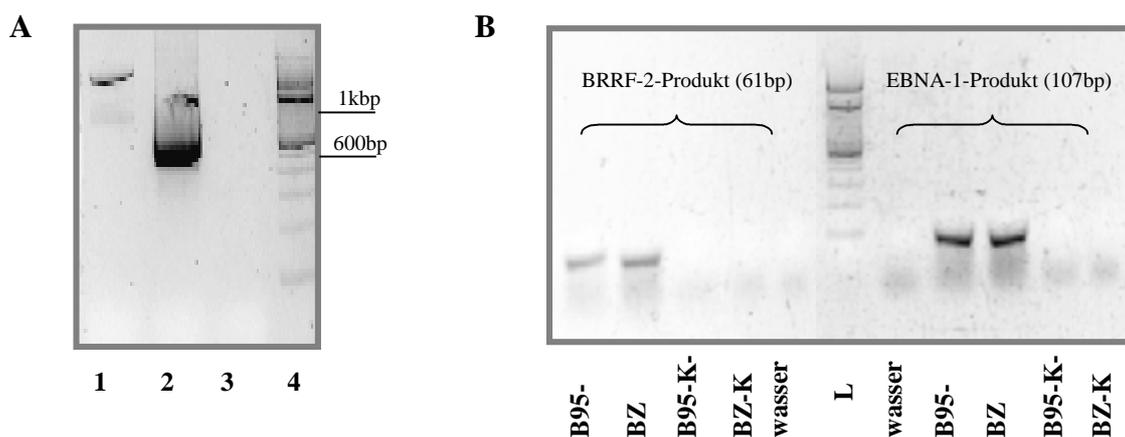


Abb. 30: Nachweis von EBV-spezifischen RNA-Transkripten

A Gezeigt ist die Amplifikation von volle-Länge BRRF-2 (1) und partiellem BRRF-2 (2) Gen aus RNA von B95-Zellen, inklusive keine-rT-Kontrolle (3) und 1kbp-Leiter (4). **B** Gezeigt ist die Amplifikation von BRRF-2- und EBNA-1 Produkten aus RNA von B95-Zellen (B95) und EBV-transformierten B-Zellen (BZ). L: 100bp-Leiter; K: signalisiert, dass die RNA-Probe nicht revers zu cDNA transkribiert wurde (krT), Fehlen von Amplifikaten mit EBV-spezifischen Primern in diesen Proben schließt eine Kontamination mit DNA aus; Wasser: Wasser-Kontrolle ohne Produkt.

6 DISKUSSION

6.1 Heterogenität der Liquorpathologie bei MS-Patienten

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Identifizierung von charakteristischen Veränderungen im Liquor von MS-Patienten. Dazu wurde Blut und Liquor von MS-Patienten auf den Anteil der unterschiedlichen Immunzell-Subpopulationen flusszytometrisch untersucht und mit dem Phänotyp von Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen verglichen. Die Untersuchungen zeigten ähnliche Verteilungen der Zellpopulationen im Blut bei MS-Patienten und Kontrollen. Allerdings wurden signifikante Unterschiede für einzelne Immunzellpopulationen im Liquor gefunden. Diese betrafen insbesondere B-Zellen und Plasmazellen, deren Anteile bei MS-Patienten im Liquor signifikant erhöht waren. Hingegen waren Monozyten, T-Zellen und NK-artige T-Zellen bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt. Die Anreicherung von B-Zellen und Plasmazellen ist in Einklang mit der zu beobachteten Erhöhung von IgG und dem typischen Auftreten von OKBs im Liquor. Beide Befunde spielen nach wie vor eine wichtige Rolle in der Diagnose der MS [54]. Die Präsenz von B-Zellen und Antikörper-produzierenden Plasmazellen sowohl im Gehirn als auch im Liquor von MS-Patienten wurde bereits beschrieben [55-57]. Dagegen findet man im Liquor von gesunden Personen gewöhnlich keine B-Zellen und Plasmazellen, obwohl T-Zellen und Monozyten im Liquor vorhanden sind. Dieser Befund ist nach neuesten Erkenntnissen mit einer Immunüberwachung des gesunden ZNS zu begründen, dabei findet man einen kontinuierlichen Ein- und- Ausstrom von T-Zellen und Monozyten im ZNS [58]. Wenn ein fremdes Antigen (z.B. Virus) in das Hirn eindringt, akkumulieren Antigen-spezifische T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen an den Ort der Infektion und üben dort ihre Effektorfunktion aus, um das Pathogen zu eliminieren.

Eine solche zielgerichtete Einwanderung von B-Zellen und Plasmazellen legen die hier erstmals durchgeführten phänotypischen Charakterisierungen von Liquor B-Zellen für die MS nahe. Die differenzielle Expression zwischen B-Zellen im Liquor und Blut deutet auf eine gezielte Einwanderung und Akkumulation von Gedächtnis B-Zellen und ausdifferenzierten Antikörper-produzierenden Plasmazellen hin, die bereits mit Antigenen in Kontakt gekommen sind. Molekulare Analysen des B-Zell Rezeptors zeigen Akkumulationen klonaler B-Zellen im Liquor und unterstützen unseren Befund [33;59].

Während im Blut naive B-Zellen dominieren und nur etwa 0,1% der Blutzellen Antikörper-produzierenden plasmazytären B-Zellen entsprechen, ist im Liquor eine hohe Zahl Antigen-erfahrene B-Zellen mit bis zu 8% Plasmazellen vorzufinden. Beide Zellpopulationen verbleiben im Liquor der MS-Patienten über Jahre auf etwa gleich hohem Niveau. Auch der Anteil der Plasmazellen (von etwa 40 % an der gesamten B-Zellpopulation) und die IgG-Synthese bleiben über mehrere Jahre weitgehend stabil. Bei akuten Infektionen des ZNS dagegen, z. B. der Neuroborreliose, die in der akuten Phase durch eine hohe Plasmazellzahl und durch eine intrathekale IgM- und IgG-Synthese charakterisiert ist, beobachteten wir nach zwei Wochen einen deutlichen Rückgang der Plasmazellen und der intrathekalen IgG-Synthese, nachdem der Erreger (Spirocheten) durch erfolgreiche Therapie eliminiert wurde.

Die unterschiedlichen Befunde bei der MS und Neuroborreliose lassen die Annahme zu, dass das Antigen im ZNS persistiert und es zu einer kontinuierlichen Aktivierung von B-Zellen und zur Differenzierung zu Plasmazellen kommt. Diese Annahme wird unterstützt durch molekulare Untersuchungen der B-Zell Rezeptoren, die zeigen konnten, dass klonal expandierte B-Zellen im Liquor von MS-Patienten gehäuft somatischen Hypermutationen unterliegen [31]. Dieser Befund deutet auf eine kontinuierliche bzw. wiederholte Aktivierung mit dem gleichen Antigen hin. Ob eine kontinuierliche Aktivierung der Antigen-spezifischen B-Zellen und Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zentral im ZNS oder peripher in den lymphatischen Organen erfolgt, ist bislang unklar.

Nach der Lehrmeinung erfolgt die Aktivierung von B-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen, wo sich spezialisierte Strukturen befinden. Bei einer Primär-Infektion werden Antigene über die Lymphe aus den infizierten Organen in die Lymphknoten eingebracht und angereichert. Dort treffen zirkulierende, Antigen-spezifische naive B-Zellen auf dieses Antigen. Sofern sie eine spezifische T-Zell Hilfe oder einen ähnlichen Stimulus erhalten, verbleiben sie im lymphatischen Organ und bauen dort Keimzentren auf. Es kommt zu klonaler Expansion dieser B-Zellen und zur Antigenreifung der Rezeptoren. Es folgt anschließend die Selektion der B-Zellen mit dem zum Antigen affinsten Rezeptor. Diese B-Zellen verlassen das Keimzentrum, um Gedächtnis B-Zellen zu werden oder zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu

differenzieren. Plasmazellen verbleiben zum Teil in den Marksträngen der lymphatischen Organe, wandern aber hauptsächlich ins Knochenmark und sezernieren von dort große Mengen IgG-Antikörper. Im Blut sind Plasmazellen nur in geringer Anzahl nachzuweisen. Nach erfolgreicher Eliminierung des Antigens sterben die meisten Plasmazellen ab, und der Antikörper-Spiegel sinkt wieder. Ein Teil der Antigen-spezifischen B-Zellen bleibt als Gedächtnis B-Zellen erhalten, und damit die Fähigkeit bei einer erneuten Infektion schnell eine Sekundär-Immunantwort aufzubauen. Wahrscheinlich werden einige wenige Antigene auf follikulären dendritischen Zellen in den Lymphfollikeln zurückgehalten, um das Überleben von spezifischen Gedächtnis B-Zellen zu unterstützen. Im Knochenmark können die Plasmazellen als langlebige Plasmazellen für eine lange Zeit verweilen. Nach wiederholter Infektion mit demselben Antigen kommt es zur Re-Aktivierung der Gedächtnis B-Zellen in den Keimzentren. Ein wiederholter Kontakt führt zu einer weiteren Affinitätsreifung und der Selektion der bestbindenden Rezeptoren. Die Affinitätsreifung bei wiederholter Aktivierung mit dem gleichen Antigen erfolgt ebenfalls in den Keimzentren der peripheren lymphatischen Organe.

Bei der MS muss bei der Primärantwort gegen das krankheitsassoziierte Antigen von einer Aktivierung zunächst in den peripheren lymphatischen Organen ausgegangen werden. Ob die Sekundärantwort und jede weitere Immunantwort gegen dieses Antigen ebenfalls in der Peripherie erfolgt, ist noch unklar. Bei anderen chronischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, die durch chronische Entzündung der Synovial-Membran charakterisiert ist, werden lokal im Synovial-Gewebe ebenso entzündliche Infiltrate gefunden, die zu einem großen Teil aus Plasmazellen und B-Zellen bestehen [60]. In dem entzündlichen Synovial-Gewebe konnten Keimzentren-ähnliche Strukturen gefunden werden, die eine lokale Aktivierung von B-Zellen fördern, wie sie normalerweise nur in den lymphatischen Organen zu beobachten ist [61]. Obwohl die Existenz von lymphatischen Organen im ZNS eine schlüssige Begründung für eine kontinuierliche Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen darstellen würde, konnten bisher keine ähnlichen Strukturen gefunden werden (Lassmann, persönliche Mitteilung).

Dennoch könnte das ZNS ein Milieu darstellen, das Gedächtnis B-Zellen und langlebigen Plasmazellen ermöglicht, über einen langen Zeitraum zu überleben. Man nimmt an, dass Gedächtniszellen und langlebige Plasmazellen über Präsentation einer niedrigen Menge

des Antigens durch folliculäre dendritische Zellen am Leben erhalten werden. Wenn man annimmt, dass das ZNS die krankheitsassoziierten Antigene, sei es Autoantigene oder Fremdartigene, permanent exprimiert, wäre ein solcher Mechanismus denkbar. Die Befunde bei der Neuroborreliose, bei der nach Verschwinden des pathogenen Antigens die Plasmazellzahl rapide abnimmt, untermauern eine solche Hypothese.

Diese Hypothese erklärt aber nicht wie die Affinitätsreifung erfolgt, die nach Lehrmeinung strikt Keimzentren-ähnliche Strukturen verlangt. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die Antigen-spezifischen Gedächtnis B-Zellen permanent in den peripheren Lymphorganen aktiviert werden, und dort die Antigenreifung und die Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen erfolgt [62]. Die ausdifferenzieren und aktivierten Gedächtnis- und Plasmazellen infiltrieren dann kontinuierlich ins ZNS, wo sie auf ihr Zielantigen treffen und akkumulieren. Alternativ könnten B-Zellen zwar in den peripheren Lymphknoten aktiviert werden und die Affinitätsreifung durchlaufen, aber erst lokal im ZNS zu Plasmazellen vollständig ausdifferenzieren und Antikörper sezernieren. Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass Aktivierung, Antigenreifung und Differenzierung, wie bei der RA, im ZNS in bisher nicht identifizierten Pseudofollikeln erfolgt.

Wenn man eine kontinuierliche Aktivierung des humoralen Immunsystems für die MS annimmt, drängt sich die Frage auf, ob MS-Patienten mit aktiverem Krankheitsverlauf eine ausgeprägtere humorale Immunantwort aufweisen als Patienten mit einem milden Verlauf? Beim Vergleich der zellulären Zusammensetzung des Liquors der MS-Patienten ergaben sich interindividuelle Unterschiede insbesondere hinsichtlich der Anteile von B-Zellen, Plasmazellen und Monozyten. Dabei konnten drei unterschiedliche Muster der Liquorpathologien ausgearbeitet werden: Ein sogenannter B-Zell-dominanter Typ wies hohe Anteile an B-Zellen und Plasmazellen auf, hatte dagegen kaum Monozyten und NK-artige T-Zellen im Liquor. Außerdem war ein erhöhter IgG-Gehalt im Liquor dieser Patienten charakteristisch. Ein solcher Phänotyp ähnelte dem Liquor-Phänotyp von Patienten mit akuten inflammatorischen ZNS-Infektionen [63]. Hingegen hatten Patienten mit einem Monozyten-dominanten Phänotyp wenig B-Zellen und Plasmazellen, wenig IgG, aber einen hohen Anteil an Monozyten und NK-artigen T-Zellen. Ein solcher Phänotyp entsprach in extremer Ausprägung dem von Kontrollpersonen. Ferner wurden

Patienten gefunden, die B-Zellen und Monozyten zu ähnlichen Anteilen mit moderaten IgG-Gehalten zeigten und als intermediäre Typen bezeichnet wurden. Die variablen Liquorpathologien konnten am besten durch den B-Zell zu Monozyten-Quotienten (B/M-Quotient) ausgedrückt werden. Serielle Untersuchungen des Liquors zu Zeitpunkten während und außerhalb eines Schubes zeigten die Stabilität der unterschiedlichen Muster, so dass es sich wahrscheinlich um einen individuellen Parameter der Patienten handelt, anhand dessen die MS-Patienten in unterschiedliche Subtypen stratifiziert werden können. Eine derartige Heterogenität der Liquorpathologie wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ausgearbeitet.

Diese Ergebnisse werden durch histopathologische Untersuchungen von MS-Hirngewebe unterstützt. Die Arbeitsgruppe um Herrn Lassmann konnte 4 unterschiedliche histopathologische Typen in den Läsionen von MS-Patienten finden, die durch die Qualität der Immunreaktion, das Ausmaß der Demyelinisierung, Remyelinisierung und Oligodendrozytenschädigung definiert wurden [22]. Dabei zeigten Typ 1 und 2 eine ausgeprägte Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in den demyelinisierenden Läsionen, während bei den Typen 3 und 4 kaum Immunreaktionen zu beobachten waren. Bei den Typen 1 und 2 wurden Remyelinisierung und Überleben von Oligodendrozyten beobachtet. Typ 2 war durch zusätzliche Antikörperablagerungen und Komplementaktivierung in den Läsionen gekennzeichnet. Beides sind Befunde, die auf eine B-Zell-Aktivierung bei Typ 2 hindeuten. Obwohl recht naheliegend, bleibt zunächst zu spekulieren, ob die unterschiedlichen Liquorpathologien tatsächlich die verschiedenen histopathologischen Typen reflektieren. Dabei könnten Typ 3 und 4 der Histologie der Monozyten-dominanten, wenig entzündlichen Liquorpathologie und Typ 2 der B-Zell-dominanten Pathologie entsprechen. Wichtiger Zusatzbefund der pathologischen Untersuchungen war die Beobachtung, dass alle Läsionen eines MS-Patienten jeweils einem einzigen histopathologischen Typ entsprachen, was die Hypothese unterstützt, dass unterschiedliche Subtypen der MS anhand der Pathologie stratifiziert werden können. Die Stabilität der Liquorbefunde im Zeitverlauf legt nahe, dass auch die Liquorpathologien möglicherweise Hinweise auf unterschiedliche Pathomechanismen bei der MS hindeuten und die MS-Patienten in unterschiedlichen Subtypen stratifiziert werden können. Eine Konversion von einem Typ zum anderen wurde bei den bisher 23 (6 serielle Analysen wurden hier exemplarisch gezeigt) durchgeführten seriellen Analysen nicht beobachtet.

Während in den histopathologischen Studien aufgrund der limitierten Anzahl von Biopsie- bzw. Autopsie-Befunden keine Korrelation zur klinischen Aktivität entsprechend der Zugehörigkeit zum jeweiligen histologischen Typ durchgeführt werden konnten, ist es mir in dieser Studie gelungen, möglicherweise einen prognostischen Marker zu definieren. So scheint eine Dominanz der B-Zellen im Liquor mit einer rascheren Krankheitsprogression vergesellschaftet zu sein, wenn diese Studie auch nur retrospektiv durchgeführt wurde. Das bedeutet, dass Patienten mit hohen Anteilen an B-Zellen, aber wenig Monozyten einen schlechteren Verlauf hatten als Patienten mit umgekehrtem Phänotyp, die nach Jahren der Erkrankung noch einen benignen Verlauf aufwiesen.

Interessanterweise haben MS-Patienten, die keine Aktivierung der humoralen Immunantwort in Form von typischen OKBs im Liquor aufweisen, wenig aktive Läsionen und mit höherer Wahrscheinlichkeit einen milden Verlauf [64]. Des Weiteren bestätigen jüngste Studien, dass Patienten mit einer ausgeprägten humoralen IgG-Immunantwort einen krankheitsaktiveren Verlauf haben [65]. Außerdem wurde gezeigt, dass MS-Patienten mit einer intrathekalen IgM-Synthese wahrscheinlicher eine schnellere Progression haben [66]. Eine von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte kleine prospektive Studie bestätigte, dass MS-Patienten mit einer dominanten humoralen Antwort in Form einer erhöhten IgG-Synthese im Liquor und Erhöhung der B-zellulären Anteile eine höhere Wahrscheinlichkeit hatten, eine MS zu entwickeln. Des Weiteren zeigte sich, dass bei MS-Patienten die Zahl der Plasmazellen im Liquor mit der akuten Entzündung im ZNS (definiert durch akute Läsionen in MRT-Bildgebungsanalysen) korrelierte [53].

Wie kann man sich nun vorstellen, dass eine Aktivierung der humoralen Immunantwort den Krankheitsverlauf beeinflussen kann? Die krankheitsmodifizierende Rolle von Antikörpern wurde am EAE-Tiermodell untersucht. Die durch Myelin-spezifische CD4+ T-Zellen vermittelte Erkrankung bei unterschiedlichen Nagetieren führt klassischerweise zu MS-ähnlichen Demyelinisierungen und wurde daher als das Modell zur Erforschung der Pathomechanismen bei der MS genutzt. An diesem Autoimmunitäts-Tiermodell wurde die Rolle von Antikörpern untersucht. Die Gabe Myelin-spezifischer Antikörper, aber auch die Produktion von solchen Antikörpern im Tier selbst nach Initiierung der EAE führte zur Verschlechterung der EAE bei Ratten und Marmoset-Affen [43;67-69]. Ebenso führte die Induktion einer Myelin-spezifischen B-Zell favorisierenden T_H2 Immunantwort bei

einzelnen MS-Patienten zu vermehrten Schüben [70;71]. Diese Beobachtungen sind Hinweise darauf, dass neben der T-Zell Immunantwort die humorale Immunantwort sowohl bei der EAE als auch bei der MS eine wichtige Rolle spielt.

Antikörper können je nach Antigen unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben. Eine der möglichen Effektorfunktion erreichen Antikörper, indem sie spezifisch ihr membrangebundenes Zielantigen (z. B. Myelinprotein) binden. Makrophagen erkennen den Fc-Teil des Antikörpers und leiten die Rezeptor-vermittelte Phagozytose des Antigen-Antikörper-Komplexes ein. Ein solcher Pathomechanismus als Ursache für die Zerstörung des Myelins wurde von einigen Forschergruppen angenommen [72;73] bzw. durch in-vitro Experimente nachgewiesen [74]. Die gleichzeitige Ablagerung von Komplement und Antikörpern in akuten MS-Läsionen [75-77] kann einen weiteren pathogenetischen Mechanismus von Antikörpern andeuten. Antikörper können über spezifische Bindung des membrangebundenen Zielantigens die Zielstrukturen mit Hilfe von Komplement durch Ausbildung eines Membran-Angriffs-Komplexes zerstören [78]. Außerdem sind Antikörper – anders als T-Zellen - auch in der Lage, lösliche, nicht Membran-gebundene Proteine, z.B. virale Proteine, zu binden und auf diese Weise zu neutralisieren.

In Modellen zu Virus-induzierten Demyelinisierungen des ZNS konnte gezeigt werden, dass neutralisierende anti-virale Antikörper wichtig für die Kontrolle und Überwachung der Virusreplikation sind [79]. Auch bei der MS ist eine virale Infektion des ZNS als Ursache für die Demyelinisierung denkbar. Eine permanente humorale Aktivierung, wie sie hier gezeigt wurde und durch die stabile Anwesenheit von B-Zellen, Plasmazellen und IgG im Liquor charakterisiert ist, könnte einen solchen Mechanismus widerspiegeln. Allerdings ist auch bei den Infektionsmodellen eindeutig belegt, dass die Immunantwort insbesondere in der chronischen Phase neben protektiven auch schädliche Auswirkungen hat (zusammengefasst in [80;81]). So trägt die Immunantwort bei viralen Infektionen zum Teil erheblich zu Demyelinisierungen und axonaler Schädigung bei. Im Extremfall, wie beispielsweise bei der Borna-Virus-Infektion, verläuft die Infektion wesentlich milder ohne als mit einem intakten Immunsystem [82]. Damit stellt sich auch bei einer primär gegen ein infektiöses Agens gerichteten Immunantwort immer die Frage, in wie weit diese Immunantwort auch direkt zur Pathogenese beiträgt.

6.2 Zielantigene der humoralen Immunantwort bei der MS

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die humorale Immunantwort näher charakterisiert, um die potentiellen Zielstrukturen zu identifizieren. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Immunantwort im ZNS von MS-Patienten sehr fokussiert und wahrscheinlich gegen einige wenige im ZNS residente Antigene gerichtet ist. Liquor-Antikörper lassen sich nach der isoelektrischen Fokussierung als OKBs darstellen, die bei 95% der MS Patienten auftreten und nicht im Serum bzw. im Liquor von gesunden Kontrollpersonen vorzufinden sind. Die OKBs bleiben über Jahre stabil und sind Zeichen einer fokussierten Immunantwort. Dieser Befund ist nach wie vor der zuverlässigste Laborparameter für die Diagnose einer MS. Daher können die OKBs, wie bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen, spezifisch für Antigene sein, die eine Rolle in der Pathogenese der MS spielen.

Ziel war es, die Zielstrukturen der Liquor-Antikörper, insbesondere der OKBs, zu identifizieren. Hierzu wurde ein Proteinexpressions-Array, basierend auf einer cDNA-Bibliothek des menschlichen Gehirns, eingesetzt. Mit Hilfe dieser neuen Technologie konnte die Reaktivität der Liquor-Antikörper gleichzeitig gegen mehr als 37000 Protein- und Proteinfragmente aus dem menschlichen ZNS untersucht werden. Die Technologie ermöglichte ausserdem die Suche nach Motiven, die nicht im ZNS vorkommen, aber Sequenzähnlichkeiten mit Proteinen aus anderen Organismen aufwiesen. Mit Hilfe des Protein-Arrays wurden 10 Proteine detektiert, die deutlich höhere Immunreaktivitäten bei MS-Patienten als bei Kontrollen zeigten und deshalb als potentielle Kandidatenantigene ausgewählt wurden. In den Immunreaktivitäten gegen diese Antigene wurden Überlappungen gefunden, die letztendlich zu zwei Proteingruppen führten. Mit beiden Protein-Gruppen wurde eine ausgedehnte Epitop-Suche durchgeführt, die schließlich zu den potentiellen Zielantigenen der Liquor-Antikörper führten. Interessanterweise konnten wir mit beiden Epitopen zwei Proteine des Epstein-Barr-Virus (EBV) identifizieren. Es handelte sich um das BRRF-2 und EBNA-1 Protein. Vor dem Hintergrund, dass sich tausende von verschiedenen Proteinen auf einem solchen Protein-Array befanden und gerade zwei Proteine aus ein und dem selben Pathogen als potentielle Zielantigene der Liquor-Antikörper identifiziert werden konnten, wurde dieser Befund als bedeutsam eingestuft. Weiterführende Analysen zeigten, dass MS-Patienten höhere Immunreaktivitäten im Liquor und Serum gegen die EBV-Proteine aufwiesen als

Kontrollen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die OKBs im Liquor von ausgewählten MS-Patienten spezifisch gegen EBNA-1 und BRRF-2 gerichtet sind. Die Rolle von EBV in der MS-Pathogenese wird nachfolgend diskutiert.

EBV gehört zur Familie der Herpesviren und zählt zu den am häufigsten beim Menschen auftretenden Viren. Weltweit sind über 90% der Bevölkerung mit EBV infiziert [83]. Eine Infektion mit EBV im Kindesalter verläuft gewöhnlich komplikationslos, während eine Erst-Infektion im Jugend- und Erwachsenenalter in 50% der Fälle eine infektiöse Mononukleose (bekannter als Pfeiffer'sches Drüsenfieber) auslösen kann. Wie andere Mitglieder der Herpesviren hat EBV eine lytische und eine latente Lebensphase. Die lytische Phase dient der Produktion und Freisetzung der Viren sowie deren Ausbreitung. Durch die latente Phase wird ein latenter Ruhezustand etabliert, in der sich das Virus der immunologischen Kontrolle weitgehend entzieht. Auf diese Weise wird ein Virusrepertoire hergestellt, das nach Reaktivierung wieder zur Produktion und Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln befähigt ist. Beim Menschen persistiert das Virus latent in Gedächtnis B-Zellen [84]. Initial infiziert das EBV Epithelzellen und B-Zellen im Oropharyngealtrakt. Gedächtnis B-Zellen werden über die Interaktion des viralen Glykoproteins gp350/220 mit dem auf reifen B-Zellen exprimierten Komplementrezeptor CD21, dem eigentlichen Rezeptor für die Komplementkomponente C3d, infiziert [85]. Etwa 1-50 pro 10^6 B-Zellen sind im Blut latent mit EBV infiziert, wobei die Zahl infizierter Zellen über Jahre konstant bleibt [84]. Um der Immunantwort zu entkommen, werden während der latenten Infektion von den fast 100 viralen Genen nur 10 Gene exprimiert, die eine vom Immunsystem weitgehend unerkannte Resistenz ermöglichen. Es handelt sich dabei um sechs Kernproteine (EBNA-1 bis 6), zu denen das hier identifizierte EBNA-1 gehört, außerdem um zwei Membranproteine (LMP-1 und LMP-2) und zwei nicht-translatierte RNA-Transkripte EBER-1 und EBER-2, deren Funktion bislang unbekannt ist [86]. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem zweiten hier identifizierten EBV Protein, dem noch wenig charakterisierten BRRF-2 Protein, ebenso um ein latentes Protein. Die Annahme stützt sich auf den Nachweis der RNA-Transkripte von EBNA-1 und BRRF-2 in latent EBV-transformierten B-Zellen und wird durch eine Studie zur viralen Genexpression untermauert [87]. Das Virus-Genom liegt im Virion als lineare doppelsträngige DNA (Länge ca. 172 kbp) und im Kernplasma der infizierten Zelle als extrachromosomales Episom vor [88], das an die Tochterzellen weitergegeben wird. Eine Integration der viralen

DNA in das Wirtsgenom konnte in einigen Fällen beobachtet werden [89]. Beide Stränge des EBV Genoms codieren für insgesamt etwa 100 Genprodukte, die teilweise unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster von miteinander überlappenden RNA-Segmenten exprimiert werden. Interessanterweise sind das BRRF-2 und EBNA-1 Gen benachbarte Gene, die die gleiche Orientierung des Leserahmens (nach rechts) haben und wahrscheinlich gleichzeitig exprimiert werden. Die Funktion von EBNA-1 ist die Erhaltung der viralen DNA als episomaler Ring in infizierten B-Zellen [90]. Die Funktion von BRRF-2 ist dagegen bisher unbekannt.

Durch Reaktivierung kann das Virus immer wieder in den lytischen Zyklus übergehen und erneut B-Zellen und andere Zelltypen infizieren, die sich aber auf Gewebe beschränken, die dem Immunsystem nicht zugänglich sind [91;92]. EBV hat außerdem die Eigenschaft, latent infizierte Zellen zur Proliferation anzuregen und diese zu immortalisieren. Bei unzureichender Immunkompetenz können dabei Tumore auftreten (zusammengefasst in [93]), unter denen das Burkitt Lymphom und das HIV-assoziierte B-Zell Lymphom des ZNS als gesichert EBV-assoziiert angesehen werden.

Die Hypothese, dass EBV mit der MS assoziiert sein könnte, wurde bereits vor mehr als 20 Jahren aufgestellt [94]. Die Annahme stützte sich auf epidemiologische Daten, die eine ähnliche Verteilung von infektiöser Mononukleose und MS aufdeckten. Die These lautete: Eine Infektion mit EBV im jungen Erwachsenenalter könnte bei einem genetisch suszeptiblen Hintergrund die Ursache für die Entstehung der MS sein. Ein erhöhtes MS-Risiko wurde bei Menschen beobachtet, die bereits an einer infektiösen Mononukleose erkrankt waren [95;96]. Analysen von Antikörper-Titern gegen EBV zeigten, dass 100 % der MS Patienten seropositiv gegen EBV waren, demgegenüber hatten 85-95% der normalen Bevölkerung Antikörper gegen EBV-Antigene [97]. Die Tatsache, dass Serum IgG und nicht IgM-Antikörper gegen EBV-EBNA bzw. EBV-VCA gefunden wurden, spricht nicht für eine akute, sondern für eine zurückliegende Infektion mit EBV, und waren häufiger bei MS-Patienten als bei Kontrollen zu finden [98;99]. Erhöhte IgG-Antikörper-Titer gegen EBNA-1 konnten auch im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden [100]. Dies galt insbesondere für p62, einem 20 Aminosäuren langen Peptid bestehend aus nur Alanin und Glycin, das äquivalent zur Alanin-Glycin-reichen Sequenz von EBNA-1 ist [101]. Die genannten Arbeiten unterstützen die Daten aus der vorliegenden Arbeit. Diese

Glycin-Alanin reiche Sequenz wurde auch hier als Epitop von EBNA-1 identifiziert. In beiden Kompartimenten, Serum und Liquor, wurden von uns signifikant höhere Werte bei MS-Patienten gegen das EBNA-1 Antigen von EBV gemessen als bei Kontrollen. Obwohl Patienten mit anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS (OIND) höhere Werte als Patienten mit nicht-entzündlichen Erkrankungen (NIND) im Liquor zeigten, lagen die Antikörper-Reaktivitäten der MS-Patienten noch deutlich höher. Dieser signifikante Unterschied zu OIND-Patienten ist bemerkenswert, weil dieser Befund nicht nur als Zeichen einer Entzündung im ZNS angesehen werden kann.

Neben der Bestätigung von signifikant erhöhten Antikörper-Reaktivitäten gegen das EBNA-1 Protein bei MS-Patienten in Liquor und Serum konnte hier ein weiteres EBV-Protein, das BRRF-2-Protein, identifiziert werden, und zum ersten Mal in Zusammenhang mit der MS gebracht werden. Im Gegensatz zu EBNA-1 hatten zwar nur 13% der MS-Patienten Antikörper im Liquor gegen BRRF-2. Verglichen mit NIND-Kontrollen aber war der Unterschied signifikant. Der Unterschied zwischen MS-Patienten und OIND-Kontrollen war statistisch nicht signifikant, jedoch waren die Immunreaktivitäten bei MS-Patienten höher, erreichten im Mittel aber auch keine statistische Signifikanz, da 7% der OIND-Kontrollen eine leicht erhöhte Reaktivität zeigten. Die erhöhte Immunreaktivität im Liquor der OIND-Patienten ist mit einer ausgeprägten Störung der Blut-Hirn-Schranke bei diesen hoch entzündlichen ZNS-Erkrankungen zu erklären. Bei Angleichung der Antikörper-Konzentration auf dieselbe IgG-Konzentration im Liquor ergab sich ein signifikanter Unterschied. OIND-Patienten, die zuvor positiv waren, zeigten keine erhöhten Reaktivitäten mehr im Liquor, hingegen wies die Mehrzahl der MS-Patienten immer noch deutliche Immunreaktivitäten auf. Signifikante Unterschiede wurden auch im Serum beobachtet. Dabei zeigten MS-Patienten deutlich höhere Immunreaktivitäten als NIND-Kontrollen und OIND-Kontrollen.

Des Weiteren konnte eine BRRF-2 spezifische intrathekale Antikörper Synthese bei 60% der BRRF-2 positiven MS-Patienten beobachtet werden, während nur 6% der Kontrollen, die im Liquor positiv waren, eine moderate intrathekale Synthese zeigten. Es handelte sich dabei um einen OIND-Patienten, der an einer viralen Infektion mit unbekanntem Erreger erkrankt war und in den Analysen immer die höchste Reaktivität in dem Kontroll-Kollektiv aufwies.

Obwohl der Nachweis einer intrathekalen Antikörper-Synthese gegen ein bestimmtes Protein eine Assoziation mit der MS unterstützt, ist sie nicht zwingend ein Beweis für die ursächliche Beteiligung des Antigens an der Erkrankung. Aktuell wurde die Hypothese einer Assoziation zwischen MS und *Chlamydia pneumoniae* aufgrund von erhöhten Antikörper-Titern bei MS-Patienten, verglichen mit gesunden Kontrollen, aufgestellt [102], wobei 24% der MS-Patienten, aber nur 5% der Kontroll-Patienten eine Chlamydien-spezifische intrathekale IgG-Synthese aufwiesen [52]. Sollte eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* ursächlich an der Entstehung von MS beteiligt sein, wäre in Analogie zu anderen Erreger-bedingten Infektionen des ZNS auch bei der MS zu erwarten, dass die OKBs den auslösenden Erreger erkennen. Ein Affinitäts-Immunoblot zeigte allerdings, dass die OKBs im Liquor von MS-Patienten die Chlamydien-Antigene nicht erkennen [52]. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass die intrathekale Synthese Teil einer polyspezifischen Immunantwort ist. *Chlamydia pneumoniae* scheint deshalb nicht kausal mit der MS in Verbindung gebracht zu werden [103]. Die erhöhte intrathekale Antikörperreaktivität gegen Chlamydien und anderen dieses Phänomen zeigende Erreger ist auf eine so genannte Bystander-Reaktion zurückzuführen. Dabei werden durch das entzündliche Milieu B-Zellen angezogen, die Antikörper verschiedener Spezifitäten produzieren. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit die Antigen-spezifische Bindung der OKBs für beide EBV-Proteine, EBNA-1 und BRRF-2, nachgewiesen werden, die Teile des gesamten OKB-Musters darstellten. Dieser Befund unterstützt nachdrücklich - zumindest bei einem Teil der MS-Patienten - die Bedeutung dieser Antigene.

Bei der SSPE, die durch Masern-Infektion des ZNS charakterisiert ist, sind die OKBs ebenso spezifisch gegen die krankheitsverursachenden Masern gerichtet [104]. Des Weiteren zeigen die intrathekal produzierten Masern-spezifischen Antikörper eine hohe Affinität zum ursächlichem Antigen. Obwohl die Antikörper gegen EBNA-1 und BRRF-2 in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch auf die Affinität untersucht wurden, erwiesen sich Versuche, die Liquorantikörper, die BRRF-2-Peptide auf Membranen gebunden haben, zu entfernen, als sehr schwierig. Die Antikörper konnten zum Teil nur mit 1M HCL entfernt werden, was als ein indirekter Nachweis gewertet wurde, dass es sich bei BRRF-2-spezifischen Antikörpern um hochaffine Antikörper handelte.

Hochaffine Antikörper sind mit einer Antigenreifung gegen dasselbe Antigen vereinbar. Eine wiederholte Immunreaktion gegen dasselbe Antigen ist daher wahrscheinlich. Auch können die erhöhten Titer gegen EBV-Proteine als wiederholte Reaktivierung von EBV-

spezifischen Gedächtnis B-Zellen und Produktion von EBV-spezifischen Antikörpern interpretiert werden. Da die MS zumindest im frühen Stadium schubförmig verläuft, stellen Herpesviren, die ebenfalls durch wiederholte lytische Freisetzung der Viren, gekennzeichnet sind, potentielle Kandidaten als krankheitsassoziierte Erreger dar. Eine Assoziation zwischen EBV-Reaktivierung und Krankheitsaktivität bei der MS wurde kürzlich beschrieben, ein Zusammenhang mit anderen Herpesviren wurde dabei nicht gefunden [105]. Ein Zusammenhang zwischen Infektionen der Atemwege und Schubauslösung konnte ebenfalls beobachtet werden [106;107]. Infektionen führten zwar zu erhöhten EBV-Antikörper-Titern, aber nicht zu erhöhten Titern gegen andere Viren wie Herpes-Simplex-Virus (HSV), Varicella-Zoster-Virus (VZV) und das Cytomegalo-Virus (CMV), so dass eine unspezifische Reaktivierung von anderen Viren ausgeschlossen wurde [108].

Lange war die Frage offen, ob die EBV-Infektion bzw. erhöhte Titer einfach nur eine Folge der MS sein könnten. Um den zeitlichen Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und Entwicklung einer MS zu evaluieren, wurden in den USA groß angelegte prospektive Studien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte EBV-Antikörper Titer im Serum bereits 4 Jahre vor Beginn der MS-Erkrankung zu finden sind und diese Titer-Erhöhung eine Manifestation der MS andeuten könnte [109;110]. Antikörper gegen CMV waren dagegen nicht mit dem MS-Risiko assoziiert.

Diese Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen EBV und MS hin, aber ist die Pathogenese der MS durch die Beteiligung eines Virus zu erklären? Dass ein Virus ursächlich an der Entstehung der MS beteiligt sein könnte, resultierte aus Beschreibungen von anderen ZNS-Erkrankungen, die nachweislich durch ein Virus bedingt und gleichzeitig durch Entzündung im ZNS und Demyelinisierung gekennzeichnet waren. Die durch Masern induzierte SSPE oder die HTLV-assoziierte Myelopathy sind Beispiele für viral bedingte Demyelinisierungen des ZNS beim Menschen [80]. Das Masern-Virus im Falle der SSPE persistiert dabei latent in Neuronen und Oligodendroglia [111]. Bekannte Viren, die in Mäusen eine akute oder chronische ZNS Demyelinisierung hervorrufen können, sind das Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) und das mouse hepatitis virus (MHV) [80;81].

Ob EBV Demyelinisierungen im ZNS verursachen kann, ist nicht geklärt. Es gibt aber weitere wichtige Befunde, die eine Beteiligung von EBV unterstützen. Etwa 1-5% der Patienten mit akuter primärer EBV-Infektion entwickeln neurologische Komplikationen [112]. Bray et al beobachteten, dass von fünf Patienten mit neurologischen Komplikationen nach einer Primären Infektion mit EBV sich bei 4 Patienten innerhalb von 4 bis 12 Jahren eine klassische MS entwickelte und bei einem eine disseminierte Enzephalomyelitis mit permanenter Demyelinisierungen im ZNS auftrat [113].

Mehrere Szenarien, die eine Beteiligung von EBV erklären, sind vorstellbar:

1. Eine direkte Infektion des ZNS mit EBV
 - a) wiederholte Freisetzung von EBV im ZNS
 - b) persistierende ZNS-Infektion
2. Infektion mit EBV führt zur Kreuzreaktion mit Autoantigenen des ZNS
3. Ein Epiphänomen

Eine EBV-Infektion des ZNS von MS-Patienten könnte über EBV-infizierte B-Zellen erfolgen. Dabei könnten die EBV-infizierten B-Zellen in das ZNS migrieren, dort in den lytischen Zyklus eintreten und durch den engen Kontakt mit Zellen des ZNS (z. B. Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten) diese infizieren. Das Virus kann dann einerseits latent in den infizierten ZNS-Zellen persistieren. Es ist aber andererseits auch vorstellbar, dass das Virus zunächst vom Immunsystem eliminiert wird, aber durch erneute Infiltration von infizierten B-Zellen ins ZNS und der lytischen Freisetzung von Viren das ZNS wiederholt infiziert wird. Für dieses Konzept -einer Infektion des ZNS- spricht die Beobachtung, dass gliale Zellen unter bestimmten Bedingungen und Astrozyten-Zelllinien mit EBV infiziert werden können [114].

Für eine persistierende EBV-Infektion sprechen die Befunde einer kontinuierlichen Aktivierung der humoralen Immunantwort im ZNS, die sich in der permanenten Präsenz von B-Zellen, Plasmazellen und der stabile lokalen IgG-Synthese widerspiegelt. Würde das

Virus eliminiert werden, müsste man ähnlich wie bei der Neuroborreliose ein Abklingen der humoralen Immunantwort, nachdem der Erreger beseitigt wurde, erwarten.

Obwohl eine persistierende virale Infektion des ZNS mit EBV denkbar ist, konnte eine Infektion und Persistenz von EBV im ZNS von MS-Patienten bisher nicht nachgewiesen werden [115;116] oder signifikant mit der MS assoziiert werden [118]. Hierbei muss aber der Frage nachgegangen werden, ob die bisher angewandten molekularbiologischen Methoden geringste Mengen viraler RNA bzw. DNA detektieren konnten. Die Möglichkeit besteht außerdem, dass das Virus in anderen Zielzellen – andere als B-Zellen - ein differenziertes Expressionsmuster aufzeigt, so dass der Nachweis über EBER-RNA, wie üblicherweise durchgeführt wird, in den Läsionen nicht erbracht werden kann [115]. Je nach EBV-assoziiertes Erkrankung wurden unterschiedliche Expressionmuster latenter Proteine bereits beobachtet [86].

Alternativ könnten die Befunde die zweite Hypothese unterstützen, dass EBV-infizierte B-Zellen nur rezidiv das ZNS infizieren und EBV die ZNS-Zellen nur kurzweilig infiziert. Diese Annahme wäre vereinbar mit den Befunden bei infizierten glialen Zelllinien, bei denen meist eine abortive Infektion gefunden [114]. Diese Hypothese könnte den fehlenden Nachweis von EBV im ZNS von MS-Patienten erklären. Des Weiteren ist die rezidive Infektion mit EBV ein möglicher Mechanismus, mit dem der schubförmige Verlauf der MS zu erklären wäre.

EBV könnte aber auch über einen völlig anderen Mechanismus in die Pathogenese der MS involviert sein. Molekulares Mimikry ist eine der wichtigsten Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunität [49;118]. Sie ist auch eine mögliche Erklärung, warum es nach einer EBV-Infektion zu Demyelinisierung kommen könnte. Dabei können Antikörper, T- und B-Zellen, die ursächlich gegen EBV Proteine gerichtet sind, durch Kreuzreaktion Autoantigene wie Myelin-Antigene erkennen und fälschlicherweise die Zerstörung des Myelins induzieren. Die kontinuierliche Exposition des Immunsystems in der Peripherie durch EBV-infizierte B-Zellen würde die Autoimmunreaktion langfristig unterhalten. Denkbar wäre auch, dass periphere Reaktivierungen zu einer Triggerung der Schübe

führen könnte. So könnte auch die Korrelation der humoralen Immunantwort mit der Krankheitsprogression erklärt werden.

Unterstützt wird diese Hypothese durch mehrere Befunde: Zwei Pentapeptide aus der Sequenz von EBNA-1 sind identisch mit Peptid-Sequenzen von MBP [119]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EBV-spezifische T-Zell-Klone mit MBP-Peptiden kreuzreagierten [120]. Dieser Befund konnte durch TCR Bindungsstudien verifiziert werden. Vaughn et al. konnten nachweisen, dass p62 Raktivitäten mit Autoantigenen, wie einem 80-82 kDa und 60 kDa Protein, die in humanen Neuroglia-Zellen exprimiert sind, kreuzreagierten [101].

Die Tatsache, dass ich in meiner Arbeit mit einem humanen cDNA Protein-Array des menschlichen Gehirns primär EBV-Proteine identifiziert habe, würde das Konzept unterstützen, dass die primäre Immunantwort gegen EBV hoch affin ist, und möglicherweise auf einer geringeren Affinitätsebene mit Autoantigenen kreuzreagiert.

Neben den beiden Mechanismen, bei denen EBV direkt involviert wäre, könnte die Erhöhung von antiviralen Antikörperreaktivitäten als unspezifisches Epiphänomen im Rahmen der Grunderkrankung begründet werden. Dabei wäre EBV nicht die Ursache - und die erhöhten Reaktivitäten- nur eine Folge der MS. Die prospektiven Studien zeigten, dass anti-EBV Titer bereits 4 Jahre vor Ausbrechen der MS erhöht sind gegenüber Kontrollen [109;110]. Die klaren Befunde meiner Arbeit, die eine signifikant erhöhte Immunreaktivität im Serum und Liquor von MS-Patienten gegenüber OINDs (also anderen hochentzündlichen ZNS-Erkrankungen) zeigten, und weiterhin die spezifische Bindung der OKBs an die EBV-Antigene nachwiesen, sprechen allerdings für eine spezifische Immunreaktion und gegen ein unspezifisches Epiphänomen.

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass die neue Protein-Array-Technologie zur gleichzeitigen Analyse von etwa 37000 verschiedenen Proteinspezifitäten die Suche nach Zielantigenen der fokussierten, intrathekalen Immunantwort bei der MS ermöglichte. Zwei Proteine des Epstein-Barr-Virus wurden hier als Zielantigene der humoralen Immunantwort bei der MS identifiziert. Die Identifizierung eines neuen EBV-Proteins, dem BRRF-2 Protein, unterstützt nachdrücklich die Beteiligung von EBV in der Pathogenese der Erkrankung, zumindest bei einem Teil der MS-Patienten.

In Zukunft soll überprüft werden, ob EBV in der Lage ist, Zellen des ZNS zu infizieren und in diesen zu persistieren. Da die Kreuzreaktivität mit Autoantigenen denkbar ist, soll auch dieser Frage gezielt nachgegangen werden.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen präsentierende Zellen
B	Bone marrow
B/M	B-Zell/Monozyten
Bp	Basenpaar
CD	cluster of differentiation
CDR	complementary Determing Region
D	Diversity
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked-immunoabsorbent assay
E. coli	Escherichia coli
EDSS	Expanded disability status scale
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
J	joining
Kda	Kilo Dalton
KrT	keine reverse Transkription
MBP	Myelin basisches Protein
MHC	Major Histokompatibilitäts Complex
Min	Minuten
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NIND	non-inflammatory neurological disease
NK	Natürliche Killer
OD	optical density
OIND	other inflammatory neurological disease

OKBs	Oligoklonale IgG BandenF
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll- α Protein
PLP	Proteolipidprotein
PP-MS	Primär chronisch progrediente MS
RNA	Ribonukleinsäure
RR-MS	Relapsing-remitting-MS, schubförmige MS
RT	Raumtemperatur
SSPE	subacute sclerosing panencephalitis
T	Thymus
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
T _H	T-Helfer
TCR	T-Zellrezeptor
V	variable
ZNS	zentrales Nervensystem

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Rajewsky K: Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751-758.
2. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
3. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC: Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003;301:1374-1377.
4. Camacho SA, Kosco-Vilbois MH, Berek C: The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today* 1998;19:511-514.
5. Berek C, Berger A, Apel M: Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991;67:1121-1129.
6. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG: Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:938-952.
7. Kremenchutzky M, Cottrell D, Rice G, Hader W, Baskerville J, Koopman W, Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain* 1999;122:1941-1950.
8. McFarlin DE, McFarland HF: Multiple sclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1982;307:1183-1188.
9. McFarlin DE, McFarland HF: Multiple sclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 1982;307:1246-1251.
10. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P: Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003;126:770-782.
11. Runmarker B, Andersen O: Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up. *Brain* 1993;116 (Pt 1):117-134.
12. Weinshenker BG: The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol* 1998;18:301-307.
13. Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF: The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:3-24.

14. Lee MA, Smith S, Palace J, Narayanan S, Silver N, Minicucci L, Filippi M, Miller DH, Arnold DL, Matthews PM: Spatial mapping of T2 and gadolinium-enhancing T1 lesion volumes in multiple sclerosis: evidence for distinct mechanisms of lesion genesis? *Brain* 1999;122 (Pt 7):1261-1270.
15. Fazekas F, Barkhof F, Filippi M, Grossman RI, Li DK, McDonald WI, McFarland HF, Paty DW, Simon JH, Wolinsky JS, Miller DH: The contribution of magnetic resonance imaging to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53:448-456.
16. Lassmann H: The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:1635-1640.
17. Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW: Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 1998;86:213-217.
18. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD: Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001;50:389-400.
19. Rudick RA, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP, Ransohoff RM: Management of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1997;337:1604-1611.
20. Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N: [New approaches in research of therapy of multiple sclerosis]. *Med Klin* 2001;96 Suppl 1:23-8.:23-28.
21. Brosnan CF, Raine CS: Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 1996;6:243-257.
22. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717.
23. Kabat EA, Moore DH, Landow H: An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* 1942;21:571-577.
24. Walsh MJ, Tourtellotte WW: Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med* 1986;163:41-53.
25. Gilden DH: A search for virus in multiple sclerosis. *Hybrid Hybridomics* 2002;21:93-97.

26. Cruz M, Hansen K, Ernerudh J, Steere AC, Link H: Lyme arthritis: oligoclonal anti-Borrelia burgdorferi IgG antibodies occur in joint fluid and serum. *Scand J Immunol* 1991;33:61-71.
27. Vandvik B, Norrby E, Nordal HJ, Degre M: Oligoclonal measles virus-specific IgG antibodies isolated from cerebrospinal fluids, brain extracts, and sera from patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 1976;5:979-992.
28. Cross AH: MS: the return of the B cell. *Neurology* 2000;54:1214-1215.
29. Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, Murray RS, Bernard CC, Oksenberg JR: B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol* 1999;163:5133-5144.
30. Owens GP, Burgoon MP, Anthony J, Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH: The immunoglobulin G heavy chain repertoire in multiple sclerosis plaques is distinct from the heavy chain repertoire in peripheral blood lymphocytes. *Clin Immunol* 2001;98:258-263.
31. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J: Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998;102:1045-1050.
32. Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gilden DH: Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol* 2003;171:2725-2733.
33. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Olek M, Da RR, Richardson J, Antel JP, Talbot P, Cashman NR, Tourtellotte WW, Wekerle H, Van Den NS: Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Lab Invest* 2003;83:1081-1088.
34. Smith-Jensen T, Burgoon MP, Anthony J, Kraus H, Gilden DH, Owens GP: Comparison of immunoglobulin G heavy-chain sequences in MS and SSPE brains reveals an antigen-driven response. *Neurology* 2000;54:1227-1232.
35. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B: Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125:538-550.

36. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K: Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192:393-404.
37. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ: A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 1995;377:150-151.
38. Lauer K: The risk of multiple sclerosis in the U.S.A. in relation to sociogeographic features: a factor-analytic study. *J Clin Epidemiol* 1994;47:43-48.
39. Gale CR, Martyn CN: Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 1995;47:425-448.
40. Kurtzke JF: Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? *Lectio Doctoralis. Neurol Sci* 2000;21:383-403.
41. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C: Animal models. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl:S47-53.:S47-S53.
42. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS: Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999;5:170-175.
43. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K: Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 1988;130:443-454.
44. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153-87.:153-187.
45. Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, Poewe W, Berger T: 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.
46. Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP: The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;47:694-706.
47. Cross AH, Trotter JL, Lyons J: B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 2001;112:1-14.
48. Hemmer B, Gran B, Zhao Y, Marques A, Pascal J, Tzou A, Kondo T, Cortese I, Bielekova B, Straus SE, McFarland HF, Houghten R, Simon R, Pinilla C, Martin R:

- Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* 1999;5:1375-1382.
49. Wucherpfennig KW: Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 2001;108:1097-1104.
50. Reiber H: External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995;41:256-263.
51. Bussow K, Nordhoff E, Lubbert C, Lehrach H, Walter G: A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 2000;65:1-8.
52. Derfuss T, Gurkov R, Then BF, Goebels N, Hartmann M, Barz C, Wilske B, Autenrieth I, Wick M, Hohlfeld R, Meinl E: Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* 2001;124:1325-1335.
53. Rosche, B., Cepok, S., Sayn, J., Grummel, V., Shiratori, J., Bien, S., Oertel, W. H., Sommer, N., and Hemmer, B. CSF changes relate to MRI activity in multiple sclerosis patients. eingereicht . 2003.
54. Reiber H: Cerebrospinal fluid--physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998;4:99-107.
55. Esiri MM: Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet* 1977;2:478.
56. Prineas JW, Wright RG: Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 1978;38:409-421.
57. Link H, Baig S, Jiang YP, Olsson O, Hojeborg B, Kostulas V, Olsson T: B cells and antibodies in MS. *Res Immunol* 1989;140:219-226.
58. Hickey WF: Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 2001;36:118-124.
59. Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gilden DH: Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol* 2003;171:2725-2733.
60. Magalhaes R, Stiehl P, Morawietz L, Berek C, Krenn V: Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* 2002;441:415-427.

61. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C: Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* 1999;162:3053-3062.
62. de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van d, V, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA, Laman JD: Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2002;169:5415-5423.
63. Cepok S, Zhou D, Vogel F, Rosche B, Grummel V, Sommer N, Hemmer B: The Immune Response at Onset and During Recovery From *Borrelia burgdorferi* Meningoradiculitis. *Arch Neurol* 2003;60:849-855.
64. Farrell MA, Kaufmann JC, Gilbert JJ, Noseworthy JH, Armstrong HA, Ebers GC: Oligoclonal bands in multiple sclerosis: clinical-pathologic correlation. *Neurology* 1985;35:212-218.
65. Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM, Ruiz-Pena JL, Paramo MD: Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002;105:158-163.
66. Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Plaza J, Sadaba MC, Roldan E, Bootello A, Alvarez-Cermeno JC: Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003;53:222-226.
67. Linington C, Engelhardt B, Kapocs G, Lassman H: Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J Neuroimmunol* 1992;40:219-224.
68. Genain CP, Abel K, Belmar N, Villinger F, Rosenberg DP, Linington C, Raine CS, Hauser SL: Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. *Science* 1996;274:2054-2057.
69. Litzemberger T, Fassler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A: B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 1998;188:169-180.
70. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF, Martin R: 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;6:1167-1175.

71. Hohlfeld R, Wiendl H: The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol* 2001;49:281-284.
72. Prineas JW, Graham JS: Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Ann Neurol* 1981;10:149-158.
73. Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP: Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 1999;46:144-160.
74. Van der GA, Kortekaas M, Hoekstra K, Dijkstra CD, Amor S: The role of anti-myelin (auto)-antibodies in the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol* 1999;101:61-67.
75. Compston DA, Morgan BP, Campbell AK, Wilkins P, Cole G, Thomas ND, Jasani B: Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989;15:307-316.
76. Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Linington C: The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 1993;143:555-564.
77. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H: Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 1998;43:465-471.
78. Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP: The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 2002;168:458-465.
79. Ramakrishna C, Stohlman SA, Atkinson RD, Shlomchik MJ, Bergmann CC: Mechanisms of Central Nervous System Viral Persistence: the Critical Role of Antibody and B Cells. *J Immunol* 2002;168:1204-1211.
80. Stohlman SA, Hinton DR: Viral induced demyelination. *Brain Pathol* 2001;11:92-106.
81. Fazakerley JK, Walker R: Virus demyelination. *J Neurovirol* 2003;9:148-164.
82. Carbone KM, Rubin SA, Nishino Y, Pletnikov MV: Borna disease: virus-induced neurobehavioral disease pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:467-475.
83. Henle W, Henle G, Ho HC, Burtin P, Cachin Y, Clifford P, de Schryver A, de The G, Diehl V, Klein G: Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma,

- other head and neck neoplasms, and control groups. *J Natl Cancer Inst* 1970;44:225-231.
84. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA: EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998;9:395-404.
85. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT: Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4510-4514.
86. Hiraki A, Fujii N, Masuda K, Ikeda K, Tanimoto M: Genetics of Epstein-Barr virus infection. *Biomed Pharmacother* 2001;55:369-372.
87. Karlin S, Blaisdell BE, Schachtel GA: Contrasts in codon usage of latent versus productive genes of Epstein-Barr virus: data and hypotheses. *J Virol* 1990;64:4264-4273.
88. Lindahl T, Adams A, Bjursell G, Bornkamm GW, Kaschka-Dierich C, Jehn U: Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* 1976;102:511-530.
89. Delecluse HJ, Bartnizke S, Hammerschmidt W, Bullerdiek J, Bornkamm GW: Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* 1993;67:1292-1299.
90. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B: A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3806-3810.
91. Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, Freese UK: Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 1985;313:1564-1571.
92. Sixbey JW, Lemon SM, Pagano JS: A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. *Lancet* 1986;2:1122-1124.
93. Crawford DH: Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:461-473.
94. Warner HB, Carp RI: Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Lancet* 1981;2:1290.
95. Haahr S, Sommerlund M, Moller-Larsen A, Mogensen S, Andersen HM: Is multiple sclerosis caused by a dual infection with retrovirus and Epstein-Barr virus? *Neuroepidemiology* 1992;11:299-303.

96. Martyn CN, Cruddas M, Compston DA: Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:167-168.
97. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD: Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983;40:406-408.
98. Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW: Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1980;37:94-96.
99. Larsen PD, Bloomer LC, Bray PF: Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 1985;35:435-438.
100. Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW, Ench Y: Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1985;17:371-377.
101. Vaughan JH, Riise T, Rhodes GH, Nguyen MD, Barrett-Connor E, Nyland H: An Epstein Barr virus-related cross reactive autoimmune response in multiple sclerosis in Norway. *J Neuroimmunol* 1996;69:95-102.
102. Sriram S, Mitchell W, Stratton C: Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* 1998;50:571-572.
103. Krametter D, Niederwieser G, Berghold A, Birnbaum G, Strasser-Fuchs S, Hartung HP, Archelos JJ: Chlamydia pneumoniae-specific humoral immune responses and clinical disease parameters in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;49:135.
104. Norrby E, Vandvik B: Relationship between measles virus-specific antibody activities and oligoclonal IgG in the central nervous system of patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1975;162:63-72.
105. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, Wessel K, Kirchner H, Hennig H: Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000;55:178-184.
106. Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD: Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:736-741.

107. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, Der Meche FG, van Doorn PA, Hintzen RQ: Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002;125:952-960.
108. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrnes H, Vedeler C, Gronning M, Kalvenes MB, Nyland H: Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:539-542.
109. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ: Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001;286:3083-3088.
110. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, Ascherio A: Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA* 2003;289:1533-1536.
111. Tellez-Negal I, Harter DH: Subacute sclerosing leukoencephalitis: ultrastructure of intranuclear and intracytoplasmic inclusions. *Science* 1966;154:899-901.
112. Hausler M, Ramaekers VT, Doenges M, Schweizer K, Ritter K, Schaade L: Neurological complications of acute and persistent Epstein-Barr virus infection in paediatric patients. *J Med Virol* 2002;68:253-263.
113. Bray PF, Culp KW, McFarlin DE, Panitch HS, Torkelson RD, Schlicht JP: Demyelinating disease after neurologically complicated primary Epstein-Barr virus infection. *Neurology* 1992;42:278-282.
114. Menet A, Speth C, Larcher C, Prodinger WM, Schwendinger MG, Chan P, Jager M, Schwarzmann F, Recheis H, Fontaine M, Dierich MP: Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol* 1999;73:7722-7733.
115. Hilton DA, Love S, Fletcher A, Pringle JH: Absence of Epstein-Barr virus RNA in multiple sclerosis as assessed by in situ hybridisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:975-976.
116. Morre SA, van Beek J, De Groot CJ, Killestein J, Meijer CJ, Polman CH, van der V, Middeldorp JM, van Den Brule AJ: Is Epstein-Barr virus present in the CNS of patients with MS? *Neurology* 2001;56:692.
117. Sanders VJ, Felisan S, Waddell A, Tourtellotte WW: Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol* 1996;2:249-258.

118. Vogel A, Manns MP, Strassburg CP: Autoimmunity and viruses. *Clin Liver Dis* 2002;6:451-465.
119. Bray PF, Luka J, Bray PF, Culp KW, Schlight JP: Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* 1992;42:1798-1804.
120. Wucherpfennig KW, Strominger JL: Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.

9 ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation *Charakterisierung der humoralen Immunantwort bei der Multiplen Sklerose* selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

10 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit und gute Betreuung bei meinem Betreuer Prof. Dr. Bernhard Hemmer bedanken, der zusammen mit Prof. Dr. Norbert Sommer die Arbeitsgruppe für Neuroimmunologie in Marburg geleitet hat und Anfang des Jahres nach Düsseldorf an die Neurologie der Heinrich-Heine-Universität gewechselt ist. Insbesondere möchte ich mich für seine kompetente Betreuung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Laufbahn bedanken. Hiermit möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich auch bei Prof. Oertel und Prof. Sommer für die Unterstützung zu bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Bölker aus dem Fachbereich der Biologie möchte ich für die freundliche Betreuung und Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie danken.

Ein Dank gilt ebenso Dr. Konrad Büssow vom RZPD in Berlin, der mir im Rahmen einer Kooperation die Protein-Arrays zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dempt möchte ich für die Bereitstellung des Gästezimmers und der allgemeinen freundliche Hilfe danken.

Da hinter einer erfolgreichen Arbeit immer ein gut funktionierendes Team steht, möchte ich mich namentlich bei Verena Grummel, Susanne Stei und Michael Happel nicht nur für die technische Unterstützung bedanken, nein, ebenfalls für das nette und motivierende Klima in der Arbeitsgruppe. Ebenfalls danke ich Annette Hehenkamp für die Hilfe bei den Liquoraufbereitungen („Eine Zelle? Nehme ich!“). Danken möchte ich außerdem Dun Zhou für die hilfreiche Unterstützung bei Fragen, und der Arbeitsgruppe seiner Frau für die freundliche Bereitstellung des pGEX-GST-Vektors. Bei Manuela Windholz möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bei den Foto-Arbeiten und bei Ralf Horstmann für die hilfreichen Korrekturen bedanken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen anderen Mitarbeitern der Klinik bedanken, die mir eine schöne Zeit bereitet haben. Mein Dank gilt Berit, Verena, Friedericke, Heike, Michael, Ida, Kerstin, Steve, Sabine, Stefan, Joachim, Torben, Johanna, Frank, Simone, Carsten und Marc.

Die wichtigste Person während dieser Zeit war Arnd. Ihm möchte ich ganz besonders für die liebevolle Unterstützung danken und ihm diese Arbeit widmen.

11 LEBENS LAUF

- Name: Sabine Cepok
- Geburtsdatum: 25. Februar 1973
- Schulbildung: 1980-1983 Grundschule Baunatal
1983-1989 Gesamtschule Baunatal
1989-1992 Oberstufengymnasium Oberzwehren in Kassel
Abschluß: Abitur
- Studium: Sommersemester 1993 Studium der Romanistik an der Universität Göttingen
1993-1999 Studium der Biologie an der Universität Göttingen
Abschluß: Diplom im Oktober 1999
- Diplomarbeit: „Elektrophysiologische Untersuchungen an Interneuronen des Terminalganglions der Grille, *Gryllus bimaculatus*“.
- Promotion: November 1999 bis Februar 2004 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Bernhard Hemmer an der Philipps-Universität Marburg
- Auslandsaufenthalte: August bis Dezember 1992 sozialer Dienst im Kibbutz in Israel
August 1995-September 1995 Forschungspraktikum an Lemuren in Madagaskar
August 1997-September 1997 Praktikum am Department of Neurology an der University of California, San Francisco
- Preise/Stipendium: Auszeichnung auf dem ACTRIMS-ECTRIMS Kongress 2002 für die Präsentation des papers: "Longitudinal analysis of CSF expanded CD8+ T cell clonotypes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients"
Wissenschaftlicher Förderpreis 2002 für die Arbeit „Patterns of cerebrospinal fluid correlate with disease progression“ verliehen vom Verein zur Förderung der Neurologischen Wissenschaften Frankfurt am Main e.V.
Stipendium der Langheinrich-Stiftung zur Förderung der Multiple-Sklerose-Forschung; Forschungsschwerpunkt: Antigen-spezifität der humoralen Immunantwort bei der Multiplen Sklerose (2002).