
5. Diskussion

5.1. Ursachen der funktionellen Einschränkungen in der EAE

In neueren Untersuchungen zeigt sich, dass neben der Demyelinisierung auch andere Schadensmechanismen sehr früh, und nicht nur sekundär, eine wichtige Rolle in der MS Pathogenese spielen. Die Interpretation von histologischen Daten gestaltet sich schwierig, versucht man zu eruieren, was die Ursache der morphologischen Veränderungen und was Sekundäreffekte sind. Es gibt verschiedene Ansätze, die funktionellen Störungen, die bei der MS und EAE auftreten, zu erklären. Diskutierte Ursachen sind:

- Demyelinisierung
- Axonaler Schaden
- Untergang von Oligodendrozyten
- Untergang von Neuronen
- Inflammation
- Ödem

Sicher ist, dass der klinische Score das pathologische Geschehen nur unzureichend widerspiegelt, denn auch im ZNS symptomfreier Tiere können nach den Daten des vorliegenden Experiments Inflammation, neuronale Apoptose und Axonverlust stattfinden.

5.1.1. Inflammation

Bisher war bei der EAE vor allem die Inflammation im Rückenmark im Fokus der Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit zeigt aber, dass auch andere Regionen von entzündlichen Veränderungen betroffen sind. Im Hirnstamm der erkrankten Tiere, vor allem in der brainstem motor area war die Ausprägung der Inflammation ähnlich stark wie im Rückenmark. Im Frontalhirn konnte keine Inflammation festgestellt werden.

Im vorliegenden Experiment wurde während der Phase des Krankheitsbeginns und des ersten Schubs eine gut mit der Schwere der klinischen Erscheinungen korrelierende Inflammation gefunden. Mit dem Rückgang der Symptome in der Remissionsphase ging die Inflammation zurück, allerdings war auch in der Remissionsphase Entzündungsaktivität zu finden.

Im zweiten Schub war erneut eine Zunahme der Inflammation zu verzeichnen, diese erreichte nicht die Werte des ersten Schubes. Auch klinisch verschlechterte sich der Zustand der Mäuse erneut. Man kann also zusammenfassend feststellen, dass die entzündliche Aktivität gut mit der

Ausprägung der klinischen Symptome korreliert. Überraschenderweise findet man auch in der Remissionsphase andauernde leichte entzündliche Aktivität um bereits demyelinisierte Areale. Dieses Phänomen wurde auch in sogenannten chronisch-aktiven MS-Plaques beobachtet (Kornek und Lassmann 2003). Wichtig ist in diesem Zusammenhang die im vorliegenden Experiment gewonnene Erkenntnis, dass zu diesem Zeitpunkt die Demyelinisierung und akute axonale Destruktion massiv voranschreiten, auch wenn die klinischen Symptome rückläufig waren. Denkbar ist, dass eine leichte Inflammation Pathomechanismen wie neuronale Apoptose, axonalen Schaden und Demyelinisierung unterhält, welche den chronischen Gewebeschaden bedingen. Allerdings zeigte sich in v.a. MS-Plaques auch ohne direkte Nähe entzündlicher Zellen eine initiale Oligodendrozytendestruktion, vor allem in akuten Plaques (Barnett und Prineas, 2004; Luccinetti et al. 2003). Die zugrundeliegenden möglichen Mechanismen, z.B. lösliche apoptoseinduzierende Moleküle, sind derzeit noch unklar.

Wahrscheinlich ist, dass es erst nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle des Ausmaßes an Gewebeerstörung zu irreversiblen neurologischen Defiziten kommt. Der rasche Rückgang der akuten Symptome nach dem ersten Schub könnte durch ein Abklingen des akuten Entzündungsprozesses mit Rückgang des lokalen Ödems bedingt sein. Die vorliegenden Daten zeigen, wie wichtig es ist, neu auftretende Symptome im Rahmen eines klinischen Schubs möglichst schnell zu behandeln und den massiven Entzündungsprozess zu unterbinden. Zusätzlich ist es wahrscheinlich notwendig stattfindende chronisch entzündliche Aktivität zwischen den Schüben einzudämmen, sowie Strategien zur axonalen und neuronalen Protektion zu entwickeln. Denn trotz Rückläufigkeit der klinischen Symptome kommt es nach den vorliegenden Daten zum Fortschreiten des Gewebeschadens durch axonalen Schaden, Demyelinisierung und neuronale Apoptose.

5.1.2. Axonaler Schaden

Der axonale Schaden setzte bereits vor Krankheitsbeginn ein. Mit dem Krankheitshöhepunkt stieg er sehr schnell an und nahm sogar in den darauffolgenden Phasen noch zu. Bei der Auswertung des axonalen Schadens durch APP-Färbung muss man allerdings immer in Betracht ziehen, dass diese Methode als Momentaufnahme zu sehen ist und nur den akuten, gerade geschehenden Schaden widerspiegelt. Man kann mit dieser Methode keine Aussage über das gesamte Ausmaß zerstörter Axone treffen, dazu müsste die Axondichte in den verschiedenen Stadien der EAE gemessen werden. Aus den vorliegenden Daten kann man ersehen, dass der axonale Verlust schon sehr früh im Krankheitsverlauf, noch vor dem Einsetzen klinischer Symptome beginnt, aber besonders massiv nach dem ersten Schub, in der Remissionsphase und

während des zweiten Schubs auftritt. Interessant ist hierbei die Beobachtung, dass der frühe axonale Schaden bereits vor der Demyelinisierung entsteht, und somit das Axon als mögliches primäres Angriffsziel plausibel macht. Zudem ist der axonale Schaden nicht mit dem klinischen Verlauf synchronisiert. Er findet vor allem während des Rückgangs der Symptome, bei geringer entzündlicher Aktivität statt. Die axonale Schädigung wird in der Literatur eher für den chronischen Schaden und den Grad der irreversiblen Behinderung verantwortlich gemacht, als für die exazerbierenden klinischen Symptome während eines Schubes (Bjartmar und Trapp, 2001; De Stefano et al., 1998). Wujek et al. zeigten 2002, dass die axonale Dichte im ersten Schub nur zwischen 0-22% verringert ist und nicht mit der Ausprägung der Symptome korreliert (Wujek und Bjartmar, 2002). Nichtsdestotrotz ist der axonale Schaden auch als Folge der Entzündung zu sehen, denn je höher die entzündliche Aktivität, respektive die Schubfrequenz, desto größer ist auch der Gesamtaxonverlust (Bjartmar et al., 2000). Dieser Gesamtaxonverlust führt erst bei Überschreiten einer bestimmten Schwelle zu einem permanenten neurologischen Defizit. So zeigten Mäuse mit einem Axonverlust von bis zu 30% in chronischen Phasen der EAE keine klinischen Symptome, wohingegen Mäuse mit einem Axonverlust von mehr als 60% dauerhafte, irreversible Lähmungen der Hinterbeine zeigten (Wujek et al., 2003). Diese Daten sind mit denen vergleichbar, die postmortem bei MS-Patienten erhoben wurden (Ganter et al., 1999; Lovas et al., 2000). Es wurde die Minderung der axonalen Dichte gemessen, diese korrelierte gut mit den verfügbaren klinischen Daten der Patienten. Die intravitale Messung des axonalen Schadens gestaltet sich schwierig, denn postmortem wurde auch in Regionen, welche im MRT unauffällig gewesen waren, eine massive Reduktion der axonalen Dichte festgestellt (Evangelou et al., 2000). Auch histologisch ist chronischer Schaden mit Standardmethoden oft nicht feststellbar. In mit der LFB-Färbung normal erscheinenden Arealen konnte häufig eine starke Reduktion der axonalen Dichte festgestellt werden. Das LFB färbt dann oft die leeren Myelinscheiden.

Damit werden die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, die zeigt, dass Axone bereits sehr früh im Krankheitsverlauf direkt geschädigt werden, andererseits besonders in der Phase der chronischen Entzündung axonaler Schaden stattfindet. Somit ist einerseits eine frühe als auch eine dauerhafte Eindämmung der entzündlichen Aktivität wichtig. Zum anderen müssen Strategien zum frühen, direkten Schutz des Axons gefunden werden, da axonaler Schaden auch schon vor dem Verlust von Myelinscheiden auftritt.

5.1.4. Demyelinisierung

Defekte der Myelinscheiden konnten in der vorliegenden Arbeit erst während des Erkrankungshöhepunktes histologisch detektiert werden. Diese Defekte waren in der Remissionsphase nicht reversibel. Während des zweiten Schubes nahm die Demyelinisierung weiter zu. Die Demyelinisierung war in der weißen Substanz des Rückenmarks am stärksten ausgeprägt und in der des Hirnstamms nur geringfügig schwächer. Im Frontalhirn und in der grauen Substanz wurde keine Demyelinisierung gefunden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es wahrscheinlich nicht nur die Defekte in den Myelinscheiden sind, welche die ersten Symptome hervorrufen. Denn bereits bevor Demyelinisierung sichtbar ist, treten klinische Symptome auf. Andererseits zeigten die Mäuse in der Remissionsphase wesentlich stärkere Demyelinisierungserscheinungen als während des ersten Schubes, so dass man feststellen kann, dass die Stärke der Demyelinisierung nicht allein entscheidend für die klinischen Symptome war. Früher als die Demyelinisierung findet schon eine starke entzündliche Aktivität statt. Auch der axonale Schaden und die neuronale Apoptose beginnen bereits früher im Krankheitsverlauf. Die Demyelinisierung scheint nach den vorliegenden Daten eher ein Mechanismus für den chronischen Schaden zu sein.

5.1.5. Neuronale Apoptose

In neueren Studien der MS und ihrem Tiermodell der EAE zeigte sich, dass schon in einer frühen Phase der Erkrankung Inflammation, neuronaler Schaden und axonale Transektion eine entscheidende Rolle spielen (Bjartmar et al., 2001; Trapp et al., 1998). Auch die mögliche Apoptose von Neuronen rückte in aktuellen Untersuchungen in den Fokus des Interesses. Durch eine Reihe neuerer Untersuchungen (Diestel et al., 2003; Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000; Meyer et al., 2001; Pan et al., 1997; Trapp et al., 1998), ist die neuronale Apoptose zu einem anerkannten Schadensmechanismus im Rahmen der Neuroinflammation bei EAE und MS geworden. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar. Die Frage war, ob die neuronale Apoptose lediglich sekundär als Folge der Inflammation, Demyelinisierung und der axonalen Schädigung auftritt, oder ob sie als eigenständiger primärer Schadensmechanismus zu bewerten ist. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass neuronale Apoptose bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf stattfindet, an dem zwar schon Entzündungsaktivität festzustellen ist, aber noch keine Krankheitssymptome auftreten. Damit könnte die neuronale Apoptose als ein primärer Schadensmechanismus und nicht nur als langfristige Folge der axonalen Transektion gesehen werden. In der Literatur finden sich in neueren Untersuchungen Hinweise für frühe Apoptose von retinalen Ganglienzellen (Hobom et al., 2004) und

Oligodendrozyten (Barnett und Prineas, 2004), welche die Hypothese der primären Schädigung unterstützen. Bei der neuronalen Apoptose scheinen Todesligandensysteme wie z.B. das TRAIL-System eine Schlüsselrolle zu spielen (Aktas et al., 2005). Ein häufig angeführtes Argument, dass die artifizielle Immunisierung bei der aktiven EAE, insbesondere die Verwendung von Pertussistoxin durch Schädigung der Blut-Hirn Schranke zu einer vermehrten neuronalen Apoptose führt (Fillmore et al., 2003), ließ sich durch die vorliegenden Daten nicht bestätigen, denn die Kontrollgruppe (scheinimmunisierte Tiere) erhielt bei ihrem Immunisierungsschema unter anderem auch Pertussistoxin. In der histologischen Kontrolle zeigte sich wie bei unbehandelten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Zunahme der neuronalen Apoptose. In der Untersuchungsgruppe trat schon vor Beginn der ersten Symptome sowohl im Rückenmark als auch im Hirnstamm vermehrt neuronale Apoptose auf. Das Rückenmark zeigte sich stärker betroffen. Die neuronale Apoptose erreichte ihren Höhepunkt gemeinsam mit dem klinischen Höhepunkt. Auch in der Remissionsphase und während des Rückfalls fand im Gegensatz zu gesunden Tieren vermehrt neuronale Apoptose statt. Fraglich ist nun, ob der neuronale Schaden für die akuten Symptome verantwortlich ist. Dagegen spricht das Abklingen der akuten schweren Symptome bei weitrhin stattfindender neuronaler Apoptose auf hohem Niveau. Plausibel wäre eher, dass es eine bestimmte Schwelle gibt, ab der neuronaler Schaden symptomatisch wird und zu manifester Beeinträchtigung führt (ähnlich wie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Parkinson oder ALS). Eine Studie mit MS Patienten in einer frühen Phase der Erkrankung zeigte eine signifikante Amplitudenminderung in VEP¹⁹-Untersuchungen, ohne dass klinisch eine Verschlechterung des Visus festzustellen war (Diem et al., 2003). Auch diese Daten stützen die Hypothese, dass bis zu einer bestimmten Schwelle neuronaler und axonaler Schaden klinisch kompensiert werden kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhisto-chemischen Untersuchungen mit aktivierter-Caspase 3-Färbung stellen nur eine Momentaufnahme des apoptotischen Geschehens dar, sie dienen nicht zur absoluten Quantifizierung des neuronalen Verlustes und können somit nur die relative Zunahme oder Abnahme neuronaler Apoptose darstellen, nicht aber den Gesamt-Neuronenverlust beziffern. Die immunhistochemischen Daten der vorliegenden Arbeit finden Unterstützung durch stereologische Untersuchungen, über den Untergang von Neuronen (retinale Ganglienzellen) mit einem Verlust von mehr als 70% der retinalen Ganglienzellen in einem Rattenmodell der EAE (Hobom et al., 2004), welcher in der Hauptsache vor dem Auftreten klinischer Symptome stattfand. Es ist noch nicht geklärt, in welchem Umfang und zu welchem Zeitpunkt neuronale Apoptose bei der MS auftritt. Auch in histopathologischen Untersuchungen des Gehirngewebes

¹⁹ VEP: visuell evozierte Potentiale

an MS erkrankter Patienten fanden sich apoptotische Neurone, vor allem in chronisch aktiven und inaktiven demyelinisierten Läsionen des cerebralen Kortex (Peterson et al., 2001). Daraufhin wurde die neuronale Apoptose hauptsächlich als Folge der Demyelinisierung und der axonalen Transektion gewertet. In der vorliegenden Untersuchung fand sich allerdings schon neuronale Apoptose zu einem Zeitpunkt, als noch keine Demyelinisierung festzustellen war. Es wird offenbar, wie wichtig es ist, die Mechanismen zu verstehen, die zu neuronalem Schaden in der MS und der EAE führen, um in Zukunft adäquate neuroprotektive Therapiestrategien für MS-Patienten zu entwickeln.

5.2. Expression von Todesliganden und Rezeptoren in ZNS und Milz in der EAE

5.2.1. Bedingt die festgestellte Änderung der CD95-Expression im ZNS die Suszeptibilität gegenüber EAE?

Die Grundexpression von CD95 im ZNS war, verglichen mit der Grundexpression von TRAIL auf dem gleichen Niveau. Im gesamten ZNS fand vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome noch keine Änderung der CD95-Expression statt. Erst mit Krankheitsbeginn wurde die Expression von CD95 besonders im Rückenmark stark hochreguliert und erreichte ihren Höhepunkt mit dem Krankheitsgipfel. Es waren große Unterschiede in der Expression zwischen Rückenmark und Hirnstamm festzustellen, welche sich allerdings überraschenderweise nicht in anderen Parametern wie Inflammation, neuronaler Apoptose oder axonalem Schaden widerspiegelten. Mit dem zweiten Schub erhöhte sich nur die CD95-Expression im Rückenmark erneut, blieb aber mit dem Vierfachen des Ausgangswertes deutlich unter den Werten des Krankheitshöhepunktes. Es lässt sich ableiten, dass die CD95-Expressionsdaten nicht mit der Stärke der Inflammation korrelieren, da diese schon in der präklinischen Phase beginnt und auch während des zweiten Schubs stark (im Gegensatz zur CD95-Expression) erhöht ist. Auch mit der neuronalen Apoptose korreliert die CD95 Expression nicht vollständig, da diese schon vor der Hochregulation der CD95-Expression im ZNS vermehrt eintritt. Die Grundexpression von CD95 in der Milz ist zehnfach höher als die von CD95 im ZNS. Verglichen mit der TRAIL- und der TRAIL-Rezeptor (DR5)-Grundexpression in der Milz ist sie ebenfalls zehnfach erhöht. In der Untersuchungsgruppe war die CD95-Expression in der Milz auf konstantem Niveau, lediglich während des Erkrankungsgipfels zeigte sich eine Erhöhung des Expressionsniveaus auf das Vierfache des Ausgangswertes. CD95-defiziente Mäuse zeigen sich unempfindlich für die Induktion einer aktiven EAE, obwohl inflammatorische

Zellen im ZNS gefunden werden konnten und auch bei diesen Mäusen MBP-spezifische T-Zellen nachzuweisen waren (Malipiero et al., 1997; Sabelko et al., 1997). Werden diese MBP-spezifischen T Zellen in andere Stämme (ohne CD95-Defizienz) transferiert, können sie mit hoher Inzidenz adoptive EAE verursachen. Also scheint CD95 nicht essentiell für die Effektorfunktion der MBP-spezifischen T-Zellen und die Initiierung einer EAE zu sein. CD95-defiziente Mäuse erkrankten auch nur selten, wenn ihnen MBP-spezifische T-Zellen von Wildtypmäusen transferiert wurden. Experimente haben zusammenfassend gezeigt, dass ein Mangel an CD95 im Rahmen der EAE eine geringere Empfänglichkeit für diese Erkrankung bedeutet, CD95 aber nicht wesentlich für die Effektorfunktion der T-Zellen ist. Diese Experimente könnten ein Hinweis dafür sein, dass CD95-Expression im Gehirn die Suszeptibilität gegenüber EAE entscheidend beeinflusst. Oligodendrozyten wurden als die Hauptträger von CD95 identifiziert. Damit sind sie möglicherweise ein Ziel von durch CD95-Ligand ausgelöster Apoptose. Die Frage ist ob die Hochregulation möglicherweise durch das entzündliche Milieu getriggert wird und damit den Gewebeschaden im ZNS forciert. Die Daten des vorliegenden Experimentes würden diese Hypothese insofern stützen, als dass ein Anstieg der CD95-Expression im ZNS nach Einsetzen der Inflammation festzustellen ist.

5.2.2. Welche Rolle spielt der CD95-Ligand für die Remission?

Der CD95-Ligand wird im ZNS auf fünfzehnfach niedrigerem Grundniveau exprimiert als CD95. Erst mit Beginn der klinischen Symptome änderte sich die Expression im ZNS und erreichte ihren Höhepunkt mit dem Erkrankungshöhepunkt. Bei der CD95-Ligand-Expression war im Gegensatz zur CD95-Expression kein gravierender Unterschied zwischen Hirnstamm und Rückenmark festzustellen. In der Remissionsphase ging die CD95-Ligand-Expression nur leicht zurück und stieg mit Beginn des zweiten Schubs erneut fast auf das Niveau des Krankheitshöhepunktes an. Die CD95-Ligand-Expression korrelierte damit besser mit der Inflammation, als die CD95-Expression. Die CD95-Ligand-Expression korrelierte nicht vollständig mit der neuronalen Apoptose, da diese während des zweiten Schubs nicht wieder anstieg. Die CD95-Ligand-Grundexpression in der Milz ist zehnfach höher als die im ZNS, jedoch zehnfach geringer als die von CD95 in der Milz. In der Untersuchungsgruppe trat nur während des Erkrankungshöhepunktes eine Änderung der Expression auf das Dreifache des Ausgangswertes auf. Der CD95-Ligand wird unter anderem auf Microglia exprimiert (Bonetti und Raine, 1997). Die MBP-spezifischen T-Zellen von Wildtypmäusen und CD95-defizienten Mäusen können, in CD95-Ligand-defizienten Mäuse transferiert, mit hoher Inzidenz adoptive EAE erzeugen, die sich meist als chronische Form mit verzögerten Remissionsphasen entwickelt (Sabelko-Downes

et al., 1999). Als Ursache dafür könnte eine verminderte Fähigkeit, die aktivierten infiltrierenden T-Zellen zu eliminieren und deren Proliferation einzudämmen, in Frage kommen. Dieses Kenntnis ist wichtig, denn ist das Ziel einer Therapie, die zytotoxische Wirkung von CD95 auf ZNS Zellen zu blockieren, wird damit eventuell auch die Elimination der autoreaktiven T-Zellen im Gehirn gehemmt. Unter der Vorstellung, dass CD95-Ligand wesentlich für die Effektorfunktion der T-Zellen sei, wurden neutralisierende Antikörper gegen CD95-Ligand intrathekal appliziert. Dabei stellte sich ein erstaunlicher Erfolg mit einer schnelleren und fast vollständigen Remission des ersten Schubs ein, so dass die Hypothese gestützt wurde, der CD95-Ligand sei notwendig für die Effektorfunktion der T-Zellen. Allerdings litten die behandelten Tiere unter häufigeren und schwereren Rückfällen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Okuda et al., 2000), so dass die Frage nach einer protektiven Funktion des CD95-Ligand gestellt werden muss. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Daten des vorliegenden Experimentes, nach denen der CD95-Ligand auch in der Remissionsphase bei Abklingen der Inflammation weiter auf hohem Niveau exprimiert wird.

5.2.3. Duale Rolle von TRAIL in der EAE Pathogenese

Im vorliegenden Experiment wurde am Beispiel unbehandelter Kontrollen gezeigt, dass TRAIL im Gehirn gesunder Mäuse auf konstantem Level exprimiert wird. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum humanen ZNS, in welchem zwar die Rezeptoren, nicht aber TRAIL exprimiert wird (Dörr et al., 2002a). Bei der Untersuchung der verschiedenen ZNS-Regionen während des Krankheitsverlaufes ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen ZNS-Regionen feststellen. Im Frontalhirn der an EAE erkrankten Tiere konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Änderungen der TRAIL-Expression festgestellt werden. Starke Veränderungen hingegen gab es im Rückenmark und Hirnstamm. In beiden Regionen verliefen die Änderungen der Expression in den einzelnen Phasen fast synchron. Die Hochregulation von TRAIL erfolgte in den untersuchten Hirnregionen erst mit dem Krankheitsbeginn, also nach dem Einsetzen der Inflammation und der neuronalen Apoptose. Der Höhepunkt der TRAIL-Expression erfolgte gemeinsam mit dem Höhepunkt der Inflammation und der neuronalen Apoptose. Während im zweiten Schub erneut eine starke Inflammation im Rückenmark und Hirnstamm auftrat, fand sich nur im Rückenmark eine erneute Hochregulation der TRAIL-Expression. In den Milzen gesunder Mäuse wird TRAIL auf einem konstanten Niveau exprimiert das auf dem gleichen Level wie die Expression im ZNS gesunder Tiere liegt. Die Expressionsänderungen in der Milz bei den an EAE erkrankten Tieren waren sowohl von ihrem Verlauf, als auch von der Stärke der Änderung synchron mit denen des Hirnstamm und

Rückenmarks. TRAIL-Expression wurde auf vielen Immunzellen nachgewiesen. In Untersuchungen verschiedener Tiermodelle für Autoimmunerkrankungen (u.a. auch EAE) zeigte sich, dass die periphere TRAIL-Blockade (außerhalb des ZNS) zu einer Exazerbation der Erkrankung führt (Hilliard et al., 2001; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Song et al., 2000). So wurde TRAIL als potentieller Schutz vor autoimmunen Erkrankungen angesehen. Zudem wurde TRAIL lange Zeit als selektiver Tumorzell-Killer angesehen (Ashkenazi et al., 1999; Cretney et al., 2002; Smyth et al., 2001; Walczak et al., 1999). Es stellte sich allerdings heraus, dass TRAIL auch in der Lage ist, in nicht transformierten Zellen wie humanen Gehirnzellen und Hepatozyten Apoptose auszulösen (Jo et al., 2000; Matysiak et al., 2002; Nitsch et al., 2000). Diese Daten belegen, dass TRAIL z.B. durch eine periphere Hochregulation auf Zellen des Immunsystems, eine Rolle bei der Schädigung der ZNS-Zellen durch infiltrierende Immunzellen spielen könnte. Dafür spricht, dass T-Zellen auf Antigen-spezifische Stimulation mit der Hochregulation von TRAIL reagieren (Wendling et al., 2000). Aktivierte T-Zellen sezernieren lösliches TRAIL (Martinez-Lorenzo et al., 1999), und TRAIL spielt eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität (Dörr et al., 2002b). Vor kurzem wurde festgestellt, dass auch aktivierte Makrophagen lösliches TRAIL sezernieren (Ehrlich et al., 2003). Es ist also wahrscheinlich, dass aktivierte TRAIL-exprimierende T-Zellen in das Gehirn einwandern, und TRAIL als Effektormolekül dort Schaden verursacht. In histologischen Untersuchungen wurden TRAIL-positive T-Zellen direkt neben Caspase-positiven, apoptotischen Neuronen gefunden. (Aktas et al; 2005). Ein weiteres Argument für diese Hypothese ist, dass die spezifische intrazerebrale TRAIL-Blockade den Schweregrad der EAE signifikant verringert. (Aktas et al; 2005). Zudem zeigen T-Zellen von TRAIL-knockout-Mäusen eine signifikante Reduktion ihres zytotoxischen Potentials (Aktas et al; 2005). In einem Tiermodell für HIV induzierte Enzephalopathie spielt, wie erst kürzlich gefunden wurde, das TRAIL System eine wichtige Rolle im Makrophagen-vermittelten Zelltod von Neuronen (Miura et al., 2003). Die Daten des vorliegenden Experimentes zeigen interessanterweise, dass TRAIL im peripheren Immunsystem (Milz) stärker und früher hochreguliert wird, als die anderen untersuchten Faktoren. Allerdings ist auch im ZNS eine deutliche Hochregulation festzustellen, über deren Ursache und Wirkung zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden kann. Denkbar wäre eine durch das entzündliche Milieu getriggerte Hochregulation, welche infiltrierende Entzündungszellen als Angriffsziel sieht.

5.2.4. Ist die Expressionsänderung von DR5 der Schlüssel für die Suszeptibilität gegenüber TRAIL?

Im vorliegenden Experiment ließ sich bei gesunden Kontrolltieren eine konstante Expression von DR5 im ZNS feststellen, welche zehnfach niedriger als die TRAIL-Expression im ZNS gesunder Tiere war. Von den untersuchten apoptoseassoziierten Faktoren wurde nur DR5 im ZNS bereits vor dem auftreten klinischer Symptome hochreguliert. Die Expression stieg dann bis zum Höhepunkt weiter an und blieb in der Remissionsphase und während des Rückfalls auf diesem hohen Niveau.

In der Milz gesunder Mäuse wurde DR5 auf konstantem Niveau exprimiert. Die Ausgangsexpression lag jedoch um ein zehnfaches höher als die von DR5 im ZNS. Dies ist als wichtiger Unterschied zu TRAIL zu sehen, dessen Grund-Expressionsniveau sich in Milz und ZNS nicht unterschied. Die DR5-Expression in der Milz der Untersuchungsgruppe war zu keinem Zeitpunkt höher als in der Kontrollgruppe, sank sogar zeitweilig unter das Niveau gesunder Kontrollen. In der EAE scheint also die TRAIL-Expression sowohl im ZNS als auch im peripheren Immunsystem hochreguliert zu werden, wohingegen die Expression des Rezeptors nur im ZNS ansteigt, peripher hingegen sogar zeitweise sinkt. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte die DR5-Expression im Gehirn vor allem auf Neuronen und Oligodendrozyten festgestellt werden (Dörr et al., 2002a). Bei der wiederholten intrazisternalen Injektion von TRAIL bei gesunden Mäusen konnte keine vermehrte Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten festgestellt werden, und auch klinisch unterschieden sich diese Tiere nicht von gesunden Tieren. Im Unterschied dazu verschlimmerte die intrazisternale Injektion von TRAIL sowohl vor, als auch nach Beginn der Symptome bei an EAE erkrankten Tieren den Krankheitsverlauf deutlich (Aktas et al; 2005). Eine ähnliche Beobachtung wurde erst kürzlich bei verschiedenen Tiermodellen der Hepatitis gemacht. Dabei wurde festgestellt, dass TRAIL in gesunden Hepatozyten keinen Schaden verursacht, jedoch bei einer entzündlichen Konstellation im Rahmen einer Hepatitis einen zytotoxischen Effekt auf Hepatozyten hat (Zheng et al., 2004). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass unter normalen Bedingungen die Rezeptorenlevel von z.B. DR5 im ZNS so gering sind, dass selbst artifiziell erhöhte TRAIL-Spiegel (durch intrazisternale Injektion) nicht in der Lage sind, zytotoxische Effekte auszulösen. Im inflammatorisch veränderten Gewebe scheint die Empfindlichkeit für TRAIL-induzierten Zellschaden gesteigert zu sein (Zheng et al., 2004). Im vorliegenden Experiment konnten diese Beobachtungen durch Expressionsanalysen des TRAIL-Rezeptors untermauert werden, der im gesunden ZNS in sehr geringen Konzentrationen vorliegt und dessen Expression im Rahmen der EAE hochreguliert wird. Ein weiteres Argument ist der wesentlich mildere Krankheitsverlauf der

EAE unter intrazisternaler TRAIL-Blockade. Diese TRAIL-Blockade beeinflusste offensichtlich spezifische Effekte, denn die Stärke der Inflammation konnte durch sie nicht beeinflusst werden (Aktas et al., 2005).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, dass TRAIL neben seinen anerkannten peripheren immunmodulatorischen Wirkungen bei autoimmunen Erkrankungen (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Song et al., 2000) auch zytotoxische Effekte in entzündlich veränderten Geweben hat (Zheng et al., 2004). Diese Effekte lassen sich im Falle des Tiermodells der MS selektiv inhibieren und führen zu einer klinischen Besserung, ohne dass dadurch die peripheren Zytokinprofile oder T- Zell Proliferation beeinflusst wurden (Aktas et al., 2005). Die Daten in der Literatur und die des vorliegenden Experimentes deuten somit auf eine spezifische Rolle von TRAIL im Rahmen der EAE und möglicherweise auch MS Pathogenese hin. Die vorliegenden Daten machen nun deutlich, dass die in der Literatur beobachtete erhöhte Suszeptibilität für TRAIL-induzierten Zellschaden sehr wahrscheinlich durch Expressionsänderungen des im gesunden Gewebe nur auf sehr niedrigem Niveau exprimierten Rezeptors DR5 bedingt wird. Die beobachtete Expression von DR5 u.a. auf Neuronen (Dörr et al., 2002b) lässt vermuten, dass über diesen Mechanismus die im vorliegenden Experiment beobachtete schön frühzeitig einsetzende Apoptose stattfinden könnte. Aus einem detaillierteren Verständnis des DR5/TRAIL-Systems in der MS könnte sich also perspektivisch in Zukunft ein spezifischer neuroprotektiver Therapieansatz ergeben.