

6. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS mit disseminiert auftretenden Entzündungsherden als Orte der Axonschädigung und Entmarkung. Ursachen und Auslöser sowie die exakten pathogenetischen Mechanismen der MS sind trotz intensiver Forschung bislang in großen Teilen ungeklärt. Die EAE ist ein anerkanntes tierexperimentelles Paradigma in der MS-Forschung. Es erlaubt klinische, in vitro und in vivo Untersuchungen in großem Umfang. Nach subkutaner Immunisierung mit einem Myelinantigen oder Transfer myelinspezifischer T-Zellen, entwickeln susceptible Spezies eine demyelinisierende Entzündung des ZNS mit klinisch gut graduierbaren neurologischen Defiziten. Die EAE ist kein homogenes Krankheitsbild, denn die Empfänglichkeit, Pathogenese und der Krankheitsverlauf variieren sehr stark zwischen den Spezies. Bei der Immunisierung von SJL-Mäusen mit PLP entwickeln diese einen chronisch-schubförmigen Krankheitsverlauf. Daher wurde dieses Modell für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Apoptose, oder programmierter Zelltod, hat einerseits eine wichtige physiologische Funktion bei der Regulation des Immunsystems, spielt aber auch eine wesentliche Rolle als Schadensmechanismus aktivierter Immunzellen. Diese zweiseitige Rolle der Apoptose trägt vermutlich durch einen fehlenden apoptotischen Zelltod von Effektorzellen (z.B. T-Zellen) im Sinne einer insuffizienten Immunregulation aber auch durch die Induktion von Apoptose in ZNS-Zellen durch autoreaktive T-Zellen, im Sinne eines Effektormechanismus zur Pathogenese der MS und EAE bei. Apoptose kann durch den Entzug überlebenswichtiger homöostatischer Zytokine oder durch Interaktion eines Apoptose-induzierenden Rezeptors mit seinem Liganden ausgelöst werden. Die wichtigsten Rezeptor/Liganden-Paare gehören zur TNF/NGF-Superfamilie. In der vorliegenden Arbeit wurden das TRAIL-System und das CD95-System untersucht. Um die Beteiligung dieser Systeme in der Pathogenese der EAE zu analysieren, wurde in verschiedenen EAE-Erkrankungsstadien und in unterschiedlichen Regionen des ZNS die Expressionsänderung apoptoseassoziiierter Faktoren mittels real-time RT-PCR analysiert und mit der Milz als peripherem Immunorgan verglichen. Die Expressionsänderungen wurden mit dem klinischen Verlauf und ausgewählten histologischen Parametern, namentlich Inflammation, axonaler Schaden, Demyelinisierung und neuronale Apoptose in Rückenmark, Hirnstamm, Temporallappen und Frontalhirn korreliert. Eine Beeinflussung durch Störfaktoren wie z.B. Immunisierungstechnik wurde durch den kontrollierten Versuchsaufbau weitgehend ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass die pathologischen Veränderungen vor allem im Rückenmark und Hirnstamm stattfinden. Der klinische Score spiegelt das pathologische

Geschehen nur unzureichend wider, denn auch im ZNS asymptomatischer Tiere konnten Inflammation, neuronale Apoptose und Axonverlust nachgewiesen werden. Wichtig ist die Beobachtung, dass in dem verwendeten Paradigma der axonale Schaden bereits vor der Demyelinisierung stattfindet, was wiederum darauf hinweist, dass das Axon ein primäres Angriffsziel sein könnte. Die Demyelinisierung setzt hingegen erst vergleichsweise spät im Krankheitsverlauf ein. Überraschend war, dass sogar der neuronale Untergang bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf stattfindet, zu dem zwar schon Entzündungsaktivität festzustellen ist, aber weder Krankheitssymptome noch eine Demyelinisierung nachzuweisen sind. Damit könnte auch die neuronale Apoptose als ein primärer Schadensmechanismus und nicht nur als langfristige Folge der axonalen Transektion interpretiert werden. Die erhobenen histologischen Daten zur Inflammation, zum neuronalen und axonalen Schaden zeigen, dass es trotz Rückläufigkeit der klinischen Symptome in der Remissionsphase zum Fortschreiten des Gewebeschadens kommt. Dies macht deutlich, wie wichtig eine andauernde antientzündliche Therapie auch in den Phasen klinischer Besserung ist. Eine solche Therapie dient somit nicht nur der Prävention erneuter Schübe, sondern könnte auch einen in diesen Phasen fortschreitenden irreversiblen Gewebescha den verhindern.

Bei der Auswertung der Expressionsdaten der Apoptose-Systeme wurde festgestellt, dass die Expressionsänderungen vor allem im Rückenmark und Hirnstamm stattfinden und andere ZNS-Regionen so gut wie nicht betroffen waren. Die Scheinimmunisierung (insbesondere Pertussistoxin) hatte keinen Einfluß auf die Expression der untersuchten Faktoren. Es konnten eindrucksvolle relevante Änderungen der peripheren und zentralen Expression von Apoptoseliganden und ihren Rezeptoren im Krankheitsverlauf der EAE festgestellt werden.

Die Interpretation der Daten wirft neue Fragen auf und zeigt, dass die Untersuchung der Todesligandensysteme in der MS und ihrem Tiermodell in den verschiedenen Krankheitsphasen möglicherweise neue Aufschlüsse über zugrundeliegende Pathomechanismen geben kann. Die Experimente sind ein Hinweis dafür, dass die CD95-Expression im Gehirn die Suszeptibilität gegenüber EAE beeinflussen könnte. Oligodendrozyten wurden in der Literatur als die Hauptträger von CD95 identifiziert. Damit sind sie möglicherweise auch das Hauptziel von durch CD95-Ligand ausgelöster Apoptose. Die entscheidende Frage ist nun von welchen Zellen CD95 während der EAE im ZNS hochreguliert wird, und ob diese Hochregulation möglicherweise durch das entzündliche Milieu getriggert wird und damit den Gewebescha den im ZNS forciert. Neben dem in der Literatur viel beachteten CD95-System zeigen die vorliegenden Untersuchungen auch eine relevante Beteiligung des TRAIL-Systems. Die TRAIL-Expression im ZNS und im peripheren Immunsystem wurde hochreguliert, wohingegen die Expression des

TRAIL-Rezeptors DR5 nur im ZNS anstieg, peripher hingegen sogar sank. Eine sehr wichtige neue Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass DR5 im gesunden ZNS nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird, welches ca. zehnfach niedriger ist als das der TRAIL-Expression im ZNS und der DR5-Expression in den Milzen gesunder Mäuse. Diese Diskrepanz zwischen Höhe der Grundexpression von DR5 im ZNS und der Milz besteht für TRAIL nicht. Die Expression von DR5 steigt bereits vor Symptombeginn und eher als die aller anderen untersuchten Faktoren auf ein Vielfaches an. Bekannt ist, dass DR5 im ZNS vor allem auf Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert wird. Durch die frühe Hochregulation von DR5 ist der Weg für TRAIL-induzierten Gewebeschaden gebahnt. Im inflammatorisch veränderten Gewebe scheint also die Empfindlichkeit für TRAIL induzierten Zellschaden gesteigert zu sein.

Experimente unserer Arbeitsgruppe bestätigten diese Theorie, denn bei der wiederholten intrazisternalen Injektion von TRAIL bei gesunden Mäusen findet keine vermehrte Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten statt und auch klinisch unterscheiden sich diese Tiere nicht von gesunden Tieren. Im Unterschied dazu verschlimmerte die intrazisternale Injektion von TRAIL sowohl vor, als auch nach Beginn der Symptome den Krankheitsverlauf an EAE-erkrankter Tiere deutlich.

In Zusammenschau mit den vorliegenden Daten legt dies 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. Ein weiteres Argument ist der wesentlich mildere Krankheitsverlauf der EAE unter intrazisternaler TRAIL-Blockade. Diese TRAIL-Blockade beeinflusste offensichtlich spezifische Effekte von TRAIL, denn die Stärke der Inflammation konnte durch sie ebenso wie die periphere Zytokinprofile oder T- Zell Proliferation nicht beeinflusst werden.

Aus einem detaillierteren Verständnis des DR5/TRAIL-Systems in der MS könnte sich also perspektivisch ein möglicher spezifischer neuroprotektiver Therapieansatz ergeben. In künftigen Schritten sollten die Expressionsuntersuchungen spezifisch für die verschiedenen Zellpopulationen des ZNS und des Immunsystems erfolgen. Untersuchungen der neuronalen und axonalen Dichte in den verschiedenen ZNS-Regionen zu den unterschiedlichen Krankheitsphasen sind für eine optimale Quantifizierung des Schadens nötig. Ein weiterer Schritt wäre die Übertragung dergewonnenen Erkenntnisse auf andere Spezies Das Ziel sollte sein, daraus wichtige Impulse zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien zu gewinnen, die möglichst spezifisch den langfristig für die andauernde Behinderungen verantwortlichen axonalen und neuronalen Schaden bei der multiplen Sklerose zu verhindern.