

1. Einleitung

1.1. Die multiple Sklerose

1.1.1. Einführung und epidemiologische Daten

Die multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata, ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems. Sie ist eine der häufigsten nicht traumatischen Ursachen für neurologische Defizite bei jungen Erwachsenen in unseren Breiten und damit von besonderer sozialer und ökonomischer Bedeutung. In Deutschland hat die MS eine Prävalenz von 150/100000 Einwohner. Die Anzahl der Neuerkrankungen beträgt 3/100000 pro Jahr (Hein und Hopfenmüller, 2000).

Die Prävalenz der multiplen Sklerose weist bemerkenswerte geographische Unterschiede auf. In äquatorialen Regionen leiden weniger als 1/100000 Einwohner an MS, in Südeuropa sind 6/100000 und in nördlichen Regionen Europas (z.B. Schottland) 155/100000 Einwohner betroffen. Migrationsstudien ergaben, dass Immigranten auch im Einwanderungsland das Erkrankungsrisiko ihres Herkunftslandes behielten, wenn der Zeitpunkt ihrer Auswanderung nach dem 15. Lebensjahr lag. Umgekehrt ist eine Übernahme des Erkrankungsrisikos des Einwanderungslandes zu beobachten, wenn die Emigration vor dem 15. Lebensjahr erfolgte. Diese Daten legen nahe, dass weniger die ethnische Zugehörigkeit, als ein pathogener Umweltfaktor für die spätere Entwicklung einer MS entscheidend sein könnte (Kurtzke, 1985; Kurtzke, 2000; Martin und McFarland, 1995) und lassen die Vermutung zu, dass eine im Kindesalter erworbene Infektion letztlich den späteren Ausbruch der Erkrankung mitbedingen könnte. Weitere Unterstützung erfährt diese Hypothese durch gelegentliches endemisches Auftreten der MS auf den Färöer Inseln, in Florida und der Schweiz.

1.1.2. Ätiologie der Multiplen Sklerose

Ursachen und Auslöser sowie die exakten pathogenetischen Mechanismen der Multiplen Sklerose sind trotz intensiver Forschung bislang ungeklärt. Erkenntnisse der letzten Jahre haben zur allgemeinen Akzeptanz der „Autoimmunhypothese“ geführt. So wird eine fehlgeleitete Reaktion des Immunsystems angenommen, die sich in genetisch suszeptiblen Individuen gegen Bestandteile der Myelinscheide richtet. Nicht sicher ist, welche Faktoren die Hauptrolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen. Unter anderem werden fehlregulierte T-Zellen, zirkulierende Immunglobuline, B-Zellen und Makrophagen, Faktoren der sogenannten „angeborenen Immunität“ wie Komplementfaktoren, Toll-ähnliche Rezeptoren (toll-like receptors) und Zelladhäsionsmoleküle verantwortlich gemacht. Einige Autoren sehen als

wahrscheinlichsten Pathomechanismus die Fehlregulation von körpereigenen, gegen bestimmte Bestandteile der Myelinscheiden gerichtete T- Zellen (Lenardo et al., 1999; Martin et al., 1992b). Bei MS-Patienten wurde ein vermehrtes Auftreten von zirkulierenden, autoreaktiven, gegen das basische Myelinprotein (MBP) oder Proteolipidprotein (PLP) gerichteten CD4+ T-Zellen festgestellt, welche sich zudem offenbar in einem aktivierten Zustand befanden (Olsson et al., 1990; Zhang et al., 1994). Allerdings lassen sich auch bei gesunden Individuen autoreaktive T-Zellen nachweisen, ohne dass es zur Entwicklung einer Multiplen Sklerose kommt. Ein Argument für die Autoimmunhypothese ist die Assoziation der Erkrankung mit dem HLA-DR15Dw2-Gen des MHC II Komplexes¹, der für die Antigenpräsentation gegenüber T-Helferzellen verantwortlich ist (Compston und Sadovnick, 1992; Haines et al., 1998). Ein zusätzlicher Hinweis für ein autoimmunes Geschehen ist der Nachweis der Produktion autochthoner Antikörper im Liquor von MS Patienten, ohne dass ein Erreger isoliert werden konnte.

Ein weiteres sehr wichtiges Argument für die Autoimmunhypothese ist das Ansprechen der Erkrankung auf immunmodulatorische Therapien (Martin et al., 1992a; Zipp et al., 1997). Da proinflammatorische T-Zellen in der MS-Pathologie wahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielen, sind aktuelle therapeutische Strategien in der Behandlung dieser Erkrankung darauf ausgerichtet, die Aktivierung, Proliferation, Zytokinproduktion und Migration der T-Zellen zu hemmen.

Dennoch ist der entscheidende Durchbruch bei der Erforschung der Ursachen, der einer kausal orientierten Therapiestrategie den Weg bereiten würde, noch nicht gelungen.

1.1.3. Pathologie der Multiplen Sklerose

Das pathomorphologische Korrelat der MS sind disseminierte Entzündungsherde, sogenannte Plaques, die grundsätzlich überall in der weißen Substanz des ZNS vorkommen können. Es gibt jedoch einige Prädilektionsstellen, wie die periventrikuläre weiße Substanz, das Corpus callosum, den Sehnerv sowie die Sehbahn. Im Rückenmark sind vor allem die Hinterstränge und die lateralen Bereiche des Halsmarks betroffen (Lucchinetti et al., 1996). Die Plaques sind Orte der Axonschädigung und Entmarkung. In neueren Studien wurden allerdings auch Plaques in der grauen Substanz beschrieben (Kidd et al., 1999). Die bisher als führender Pathomechanismus beschriebene Demyelinisierung kann einerseits durch primäre Schädigung der Oligodendroglia mit sekundärer Entmarkung oder durch direkte Zerstörung der Myelinscheiden entstehen. Im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose werden verschiedene Mechanismen der

¹ Der Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klasse II wird von den Human Leucocyte Antigen-Genen HLA-DP,-DQ,-DR kodiert und wird v.a. von Immunzellen mit der Fähigkeit zur Antigenpräsentation exprimiert.

Demyelinisierung postuliert. Für eine Antikörper vermittelte Demyelinisierung sprechen Immunglobulin- und Komplementablagerungen in den Plaques. Diese Antikörper richten sich hauptsächlich gegen das Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein (MOG), welches sowohl auf den Oligodendrozyten als auch auf den Myelinscheiden selbst exprimiert wird (Storch und Lassmann, 1997). Auch zytotoxische T-Zellen können einen Untergang der Oligodendroglia auslösen. Als Zielantigene kommen bestimmte Stressproteine oder z.B. CD95 in Frage (Storch und Lassmann, 1997). Theoretisch könnte eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten auch direkt durch ein infektiöses Agens, z.B. durch Viren bedingt sein (Storch und Lassmann, 1997). Histopathologische Untersuchungen zeigen einen deutlichen interindividuellen Unterschied im Überleben der Oligodendrozyten nach einer entzündlichen Attacke (Lucchinetti et al., 1999). Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass möglicherweise verschiedene immunologische Effektormechanismen zum Verlust der Markscheiden führen und Markscheiden, Oligodendrozyten und Oligodendrozyten-vorläuferzellen differenziell betroffen sein können (Lucchinetti et al., 1996; Lassmann et al., 2001).

Nach neueren Erkenntnissen ist die Multiple Sklerose nicht nur durch Demyelinisierung gekennzeichnet, auch axonaler Schaden wurde in den Läsionen nachgewiesen (Ferguson et al., 1997). Eine Hypothese zur axonalen Destruktion macht die durch die Demyelinisierung des Axons und das entzündliche Milieu auftretende axonale Transportstörungen verantwortlich für axonale Transektionen und schließlich axonalen Verlust. Ein relativ neuer Aspekt ist die Entdeckung apoptotischer Oligodendrozyten in akuten MS-Plaques (Prineas und Barnes 2004) mit größtenteils intaktem Myelin. Diese Beobachtung macht axonalen Verlust als primären Schadensmechanismus und nicht nur als Folge des Myelinverlustes wahrscheinlich.

Neuere pathologische Studien zeigen eine Mitbeteiligung der grauen Substanz (Kortex und tiefe Hirnkerne). In diesen Läsionen der grauen Substanz könnten Entzündungsmediatoren und -zellen auch direkt auf Nervenzellen einwirken (Bo et al., 2003a; Bo et al., 2003b; Bruck et al., 2003) und machen somit auch Schaden an Neuronen als primären Mechanismus wahrscheinlich. Eine Reihe neuerer Untersuchungen unterstützt diese Hypothese (Diestel et al., 2003; Ferguson et al., 1997; Kornek et al., 2000; Meyer et al., 2001; Pan et al., 1997b; Trapp et al., 1998).

Neben entzündlich-entmarkenden und degenerativen Vorgängen laufen gleichzeitig reparative Prozesse im Gehirn von MS-Patienten ab. Vor allem tritt eine Neubildung von Markscheiden (Remyelinisierung) auf. Allerdings lassen sich interindividuell große Unterschiede bei der Effizienz der Remyelinisierung feststellen. Oft findet man am Rand der Läsion einen Saum von neugebildeten Markscheiden. Der Remyelinisierungsprozess scheint jedoch aus noch ungeklärten Gründen plötzlich zu stoppen und nicht weiter ins Zentrum der Läsion vorzudringen (Bruck et

al., 2003). Über die axonale und neuronale Regeneration bei der MS ist ebenfalls noch wenig bekannt. In tierexperimentellen, pathologischen und funktionellen MRT-Studien zeigt sich, dass regenerative Prozesse stattfinden (Reddy et al., 2002). Die zellbiologischen Phänomene, die dieser neuronalen Plastizität bei der MS zugrunde liegen, sind noch ungenügend erforscht. Außerdem häufen sich die Hinweise, dass Wechselwirkungen zwischen dem Nerven- und Immunsystem bestehen und Entzündungsvorgänge möglicherweise die neuronale Plastizität beeinflussen. Hier könnten von Entzündungszellen sezernierte Wachstumsfaktoren wie das Neurotrophin „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) eine wichtige Rolle spielen (Kerschensteiner et al., 1999; Stadelmann et al., 2002). Somit ist die histopathologische Einteilung der MS Läsionen in aktive und chronisch aktive Läsionen vielleicht auch Ausdruck eines physiologischen reparativen Geschehens. In chronisch-aktiven Läsionen sind die Infiltrate inflammatorischer Zellen im Sinne eines andauernden Entzündungsprozesses oder vielleicht auch Reparatonsprozesses auf die Randzone der Plaques beschränkt (Kornek und Lassmann, 2003). Allerdings reflektiert die Histologie der MS Plaques nur partiell eine entzündliche Pathogenese, vor allem akute Plaques zeigen initial eine Oligodendrozytendestruktion nicht entzündlicher Genese (Barnett und Prineas, 2004; Lucchinetti et al., 2000).

1.1.2. Klinische Präsentation und typische Verlaufsformen der MS

Da sich die MS prinzipiell in jedem Teil des ZNS manifestieren kann, sind die klinischen Symptome denkbar vielfältig. Ein häufiges Frühzeichen ist die Entzündung des Sehnerven, die in etwa 30% der Fälle weiteren Symptomen vorausgeht. Als Prädilektionsstellen für entzündliche Infiltrate gelten: das periventrikuläre Marklager, der Balken, der Sehnerv, der Hirnstamm und das (zervikale) Spinalmark. Typische Symptome sind Sensibilitätsstörungen, zentrale Paresen und Koordinationsstörungen, bei Herden im Hirnstamm Störungen der Hirnnerven, insbesondere der Okulomotorik. Oft lassen sich auch neuropsychologische und kognitive Defizite beobachten. Es gibt verschiedene Verlaufsformen der MS. Man unterscheidet einen schubförmigen von einem primär oder sekundär chronisch progredienten Verlauf. Schübe sind definiert als das Auftreten eines neuen oder das Wiederauftreten eines früher vorhanden gewesenen Krankheitssymptoms. Zusätzlich wird für die Schubdefinition ein Auftreten der Symptome über mindestens 24 Stunden gefordert, dies ist für die klinische Praxis von Bedeutung, und von diesem Standpunkt aus lässt sich eine willkürliche Trennlinie von 24-48 Stunden Dauer rechtfertigen, auch wenn sich eine solche pathophysiologisch nicht begründen lässt. Denn wichtig ist die Abgrenzung eines akuten Schubs von einer vorübergehenden Verschlechterung der Symptomatik im Rahmen äußerer Einflüsse und Begleiterkrankungen (sogenannter

Pseudoschub). Die Symptome eines Schubes dürfen nicht durch hohe Temperaturen, Begleiterkrankungen, Erschöpfung oder körperliche bzw. seelische Belastung ausgelöst sein, außerdem müssen seit dem letzten Schub mehr als vier Wochen vergangen sein.

Bei ca. 80% der Patienten verläuft die MS schubförmig-remittierend. Zwischen den unregelmäßig auftretenden Schüben kommt es zu einer teilweisen oder vollständigen Remission der Symptome. Der schubförmig-remittierende Verlauf der MS geht bei den meisten Patienten nach einigen Jahren in den sekundär chronisch-progredienten Verlauf über. So zeigen nach 10 Jahren ca. 50% der Patienten, deren Krankheit zu Beginn schubförmig verlief, einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf. Es können auch bei dieser Verlaufsform noch Schübe auftreten, jedoch ist v.a. ein chronisches Fortschreiten der Symptome zu beobachten. Bei ca. 10% der MS-Patienten verläuft die Erkrankung von Beginn an chronisch-progredient.

Neuere Untersuchungen deuten an, dass diesen verschiedenen Verlaufsformen unterschiedliche Krankheitsätiologien zugrunde liegen könnten (Lucchinetti et al., 2000).

1.2. Die EAE als Tiermodell der MS

Anfang des 20. Jahrhunderts trat gehäuft nach Tollwut-Impfungen ein der Multiplen Sklerose klinisch und histopathologisch ähnliches Krankheitsbild auf, das als akute disseminierte Enzephalomyelitis bezeichnet wurde. Untersuchungen ergaben als Ursache dieser plötzlich auftretenden Lähmungen eine Immunisierung gegen das noch im Impfstoff vorhandene Gehirngewebe, auf welchem die attenuierten Rabies-Viren angezüchtet worden waren (Stuart und Krikorian, 1928). Diese Beobachtung diente als Grundlage für die Entwicklung von Tiermodellen für die Multiple Sklerose. So immunisierte T. Rivers am Rockefeller-Institut Affen mit Gehirngewebe von Kaninchen, das er wiederholt intramuskulär injizierte (Rivers et al., 1933). Zur Erzeugung von Krankheitssymptomen waren teilweise bis zu 80 Injektionen nötig. Ein entscheidender Fortschritt war die Verwendung von CFA² und homogenisiertem Gehirngewebe. Diese Mischung führte schon bei einmaliger Injektion zu einem gut reproduzierbaren Krankheitsbild, das als aktive EAE bezeichnet wurde (Kabat et al., 1947; Morgan, 1946). EAE stand hierbei für Experimentelle *Allergische* Enzephalomyelitis, heute wird eher der Ausdruck Experimentelle *Autoimmune* Enzephalomyelitis verwendet. 1960 gelang es, durch Injektion von aktivierten Lymphozyten, die man aus den Lymphknoten von gegen Gehirngewebe immunisierten Tieren gewann, eine EAE in Empfängertieren zu induzieren

² CFA Complete Freund's adjuvant ist eine Wasser- in- Öl-Lösung mit abgetötetem Mycobacterium tuberculosis.

Diese Emulsion erlaubt ein langsames Freisetzen der Antigene und eine Stimulation des Immunsystems über TLR.

(Paterson, 1960). Diese Form der EAE wird als passive oder adoptive (*transfer*) EAE bezeichnet. Im Laufe der Zeit wurde es möglich, EAE in verschiedenen Spezies zu induzieren. Dabei zeigt sich, dass die EAE kein homogenes Krankheitsbild ist, denn Empfänglichkeit, Pathogenese und Krankheitsverlauf variieren sehr stark zwischen den Spezies und werden auch von dem für die Immunisierung verwendeten Antigen und der Immunisierungstechnik beeinflusst. Am häufigsten werden heute verschiedene Maus- und Rattenstämme verwendet. Zur Induktion der aktiven EAE können verschiedene Antigene verwendet werden, diese sind zumeist Peptidfragmente von Myelinscheidenbestandteilen³ und ersetzen heute die anfänglich üblichen Homogenisate aus Gehirn- und Rückenmarksgewebe. EAE kann aktiv oder passiv induziert werden, es gibt keine nichttransgene, spontane Form von EAE. Bei der aktiven Induktion werden die Mäuse mit Myelinautoantigenen in CFA (siehe oben) immunisiert. Dazu wird Pertussistoxin an anderer Stelle (intraperitoneal oder intravenös) gegeben. CFA ist ein starkes Adjuvans und bewirkt eine Th1-Antwort gegen die darin emulgierten Antigene. Pertussistoxin (PTX) ist eine ADP-Ribosyltransferase, die inhibitorische G-Proteine inhibiert. Die Wirkungsweise von PTX in der EAE-Induktion ist nicht geklärt. Es wird angenommen, dass PTX die Extravasation in die Gewebe, insbesondere durch die Blut-Hirn-Schranke, erleichtert (Brabb et al., 1997). Zudem hat PTX in höheren Konzentrationen einen mitogenen Effekt auf T-Zellen und scheint die Anergisierung von T-Zellen zu inhibieren (Kamradt et al., 1991). Bei der Immunisierung von SJL-Mäusen mit PLP entwickeln diese einen chronisch schubförmigen Krankheitsverlauf. Die Krankheit beginnt mit frühzeitigem Gewichtsverlust (Pollak et al., 2000) und Tonusverlust des Schwanzes und kann dann fortschreiten bis hin zur Tetraplegie bzw. dem Tod der Tiere. An EAE erkrankte Mäuse zeigen nicht nur körperliche Defizite. Der Terminus EBS (EAE associated behavioral syndrom) beschreibt die während einer EAE auftretenden Verhaltensauffälligkeiten, wie vermindertes soziales Interesse, Anorexie, verminderter Konsum von dargebotener Succroselösung und Apathie (Pollak et al., 2003).

³ basisches Myelinprotein (MBP) (Goverman et al., 1993)

Proteolipidprotein (PLP) (Sobel et al., 1994)

Myelin Oligodendrozyten Protein (MOG) (Amor et al., 1994)

S100 β als Bestandteil der Astrozytenmembran



Abbildung 1: Diese Maus zeigt die für Hinterbeinplegie typische Beinstellung.

Ein anderes Tiermodell der MS ist die Theiler Virus Enzephalomyelitis (TMVE). Das Theiler Virus ist ein murines Picornavirus (Theiler M., 1934). Im Modell wird das Virus intrazerebral inokuliert. Die ersten klinischen Zeichen entwickeln sich nach etwa fünf Wochen. Die Tiere entwickeln zunächst eine Ataxie, schließlich kommen eine Paralyse der Hinterläufe und eine Harninkontinenz hinzu. Histologisch sind die ersten Zeichen nach drei bis vier Wochen zu erkennen. Je nach Mäuseart zeigen sich in unterschiedlicher Ausprägung Entzündungsreaktion, Demyelinisierung und Axondestruktion. Die intrazerebrale Inokulation führt zur Virämie mit nachfolgender persistierender Entzündung des ZNS. Auch die Remyelinisierung sowie die reaktive Fasergliose treten je nach Mäuseart unterschiedlich ausgeprägt auf.

Beide Tiermodelle weisen in Bezug auf den klinischen Verlauf und die Pathologie Ähnlichkeiten zur MS auf. Der Hauptunterschied liegt im auslösenden Agens, welches bei der EAE das jeweilige Myelinantigen (bzw. transferierte Lymphozyten) und bei der TMEV Infektion das Virus selbst darstellt. Eben dieses auslösende Agens ist aber bei der Multiplen Sklerose weiterhin unbekannt.

Sowohl bei der MS als auch bei der EAE können unter anderem als morphologische Korrelate eines akuten Schubs Entzündungsherde mit T-Zell-Infiltrationen histologisch festgestellt werden (Claudio et al., 1990). Die während eines akuten Schubs einer MS bzw. EAE ablaufende Entzündung und Gewebeschädigung wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Einer der in diesem Zusammenhang diskutierten Prozesse ist der fehlende apoptotische Zelltod der möglichen Effektorzellen (z.B. T-Zellen), im Sinne einer fehlerhaften Immunregulation, andererseits aber auch die Induktion von Apoptose in deren Zielstrukturen (Gehirngewebe) als Effektormechanismus in der Multiplen Sklerose.

1.3. Apoptose

1.3.1. Allgemeine Funktionen der Apoptose

Man unterscheidet zwei Formen von Zelltod, Nekrose und Apoptose. Bei der Nekrose kommt es zum zellulären Stoffwechselkollaps mit Erschöpfen des ATP-Niveaus, dadurch brechen Transmembranionengradienten zusammen, das ionische Gleichgewicht kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es kommt zum Zellhydrops mit Freisetzung von zytosolischen Strukturen, die eine Entzündungsreaktion auslösen. Die Apoptose⁴ wurde schon 1842 von C. Vogt bei der Beobachtung sterbender Zellen während der Metamorphose von Amphibien beschrieben. Kerr prägte schließlich den Begriff Apoptose aufgrund morphologischer Kriterien für die nicht nekrotische Form des Zelltodes (Kerr et al., 1972).

Apoptose unterscheidet sich sowohl morphologisch als auch funktionell fundamental von der Nekrose. Auf einen apoptotischen Stimulus reagiert die Zelle mit Schrumpfung und Kondensation des Chromatins, die DNA wird durch Endonukleasen in Fragmente von 200 Basenpaaren (bzw. einem Vielfachen davon) gespalten. Im weiteren Verlauf stülpt sich die Zellmembran aus, die dabei entstehenden Zellfragmente werden zu sogenannten Apoptosekörperchen verpackt und anschließend phagozytiert. Dadurch soll die Freisetzung von Substanzen aus dem Zellinneren vermieden werden, um das Zustandekommen einer Entzündungsreaktion zu verhindern. Beim Prozess der Apoptose läuft der Stoffwechsel der Zelle über einen langen Zeitraum normal weiter. Die intakte Apoptoseregulation jeder einzelnen Zelle ist für die Entwicklung und das Überleben von vielzelligen Organismen von grundlegender Bedeutung. Sie ist unter anderem verantwortlich für die Elimination von gealterten, virusinfizierten oder entarteten Zellen.

1.3.1. Die Rolle der Apoptose bei der Multiplen Sklerose und im Rahmen der EAE

1.3.1.1. Apoptose autoreaktiver Zellen

Im Rahmen der Immunregulation besitzt die Apoptose eine zentrale Funktion. Durch negative Selektion werden bei der Antigenprägung der T-Zellvorläufer im Thymus jene Zellen eliminiert, die eine hohe Affinität zu körpereigenen Epitopen aufweisen (Fowlkes et al., 1988)⁵. Fehler innerhalb dieser komplexen Selektionsprozesse führen unter Umständen zum Überleben

⁴ Apoptose leitet sich aus dem Griechischen ab und meint das Abfallen der Blätter eines Baums im Herbst. Dieser Begriff wurde 1972 von Kerr et. al geprägt.

⁵ Positive Selektion bezeichnet im Gegensatz dazu die Elimination von Zellen, die nicht in der Lage sind, körpereigene MHC Moleküle zu erkennen, d.h. körpereigene Zellen als solche zu identifizieren.

autoreaktiver T-Zellen. Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der Immunantwort ist der sogenannte „aktivierungsinduzierte Zelltod“ (AICD: activation induced cell death). Werden aktivierte T-Zellen weiter über ihren T-Zellrezeptor stimuliert, reagieren sie darauf mit Apoptose. Dadurch soll eine überschießende Immunantwort verhindert werden (Tabi et al., 1995). Es wird auch postuliert, dass die MS die Folge eines genetisch bedingten Fehlens des AICD bei autoreaktiven T-Zellen ist (Pender, 1998).

1.3.1.1. Apoptose als Effektormechanismus

Auf der anderen Seite ist die Induktion von Apoptose in Zielzellen ein wesentlicher Bestandteil der T-Zelleffektorfunktion. T-Zellen eliminieren virusinfizierte oder entartete Zellen durch Expression apoptosevermittelnder Liganden (Janeway, 1999). Im Rahmen der MS/EAE Pathogenese könnte dieser Mechanismus zur Zerstörung glialer und neuronaler Strukturen führen (Dowling et al., 1996). Verschiedene Untersuchungen haben aber auch gezeigt, dass autoreaktive T-Lymphozyten im ZNS nach Abflauen des Entzündungsprozesses eines apoptotischen Zelltodes sterben. Dreißig bis fünfzig Prozent der T-Zellen in einer Läsion von an EAE erkrankten Tieren sind in der Phase der Remission apoptotisch (Bauer et al., 1999). Die Apoptose bzw. ihr Fehlen spielen also wahrscheinlich eine ursächliche Rolle in der Pathogenese der MS. Ihre differenzierte Untersuchung könnte neue Therapieansätze offenbaren. So konnte bereits an Tiermodellen gezeigt werden, dass Induktion von T-Zell-Apoptose eine Option zur Therapie von Autoimmunerkrankungen darstellt (Critchfield et al., 1994).

1.4. Apoptoseassoziierte Faktoren

1.4.1. Das Tumor Nekrose Faktor (TNF) System

Apoptose kann u.a. durch Interaktion eines Apoptose-induzierenden Rezeptors mit seinem Liganden oder durch den Entzug überlebenswichtiger Zytokine ausgelöst werden. Die wichtigsten Rezeptor/ Liganden Paare gehören zur TNF⁶/NGF⁷-Superfamilie

- TNF-Rezeptor/ TNF α
- CD95/ CD95-Ligand (auch Fas (Apo-1)-Rezeptor/ Fas (APO-1)-Ligand)
- TRAIL⁸-Rezeptor/ TRAIL (auch APO-2/ APO-2 Ligand)

⁶ TNF Tumor Necrosis Factor

⁷ NGF :Nerv Growth Factor

⁸ TRAIL steht für TNF Related Apoptosis Inducing Ligand, also ein mit TNF verwandter apoptoseinduzierender Ligand.

1.4.2. Das CD95/CD95-Ligand System

CD95 ist ein Transmembranmolekül, das nach Bindung seines Liganden in der Lage ist, Apoptose in den Zellen zu vermitteln, auf deren Oberfläche es sich befindet (Yonehara et al., 1989). Der CD95-Ligand wurde 1993 von Suda et al. beschrieben, er kann in löslicher und membrangebundener Form vorliegen (Suda et al., 1993). Die komplexe Signaltransduktionskette, die letztlich zur Apoptose in den Zellen führt, wurde 2000 von Hueber et al. beschrieben und ist in Abbildung 2 in kurzer Form wiedergegeben (Hueber et al., 2000). CD95 besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne. Letztere ist bei der Übertragung des Todessignals essentiell und wird als “death domain” (DD) oder “death effector domain” (DED) bezeichnet (Itoh und Nagata, 1993; Nagata, 1997). An die DD von CD95 binden zytoplasmatische Proteine, die ebenfalls mit einem DD-Motiv ausgestattet sind, das sogenannte “Fas-associated protein with DD” (FADD) (Cleveland und Ihle, 1995) oder das “receptor interacting protein” (RIP) (Stanger et al., 1995). Nach der Bindung von FADD oder RIP an ein CD95-Trimer über die zytoplasmatisch gelegenen “death domains” folgt eine Auslösung der Apoptose über die Aktivierung von Interleukin 1 converting-Enzym (ICE)-ähnlichen Zystein-Proteasen, den Caspasen (Enari et al., 1995), durch proteolytische Spaltung (Chinnaiyan et al., 1996). Eine dieser Proteasen enthält eine Domäne, die zu FADD homolog ist, und daher “FADD-like ICE” (FLICE; Caspase-8) genannt wird (Muzio, 1996). Procaspase-8, bildet zusammen mit diesen Proteinen schließlich den “death inducing signaling complex” (DISC) (Kischkel et al., 1995). Im Anschluss hieran werden unter anderem das ICE (Caspase-1) selbst oder die Caspase-3 aktiviert (Nagata und Golstein, 1995).

CD95 und sein Ligand werden u. a. auf aktivierten T-Zellen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Elimination von potentiell für den Organismus schädlichen Zellen, wie z.B. virusinfizierten oder Tumorzellen. Andererseits zeigen aber auch Tumorzellen eine erhöhte CD95-Ligand (Hahne et al., 1996) oder CD95-Expression (Arscott et al., 1999) und können so gegen den Tumor gerichtete T-Zellen töten. Die Interaktion zwischen CD95 und seinem Ligand ist mitverantwortlich für den AICD (Ju et al., 1995). Auch nach Verletzungen und in der anschließenden Regenerationsphase scheint das CD95-System eine wichtige, z.T. wider-sprüchliche Rolle zu spielen. Nach experimentell herbeigeführter Nervenverletzung wurde bei Mäusen ein durch CD95-Aktivierung induziertes Axonwachstum beschrieben, das in schnellerer Axonregeneration und funktioneller Erholung resultierte (Desbarats et al., 2003). Ebenfalls nach experimentell herbeigeführter Rückenmarksverletzung konnte hingegen durch Antikörper-Blockade des CD95-Liganden ein vermehrtes Überleben von

Oligodendrozyten, vermehrtes Axonwachstum und verbesserte motorische Funktion beobachtet werden (Demjen et al., 2004).

1.4.2.1. Rolle des CD95-Systems in der EAE

Fehlfunktionen und Fehlen von Komponenten des CD95-Systems können die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen begünstigen. So kann eine Mutation im CD95-Gen bei Menschen das autoimmune lymphoproliferative Syndrom hervorrufen. Auch in der Maus führen Mutationen im CD95-Gen (*lpr*-Maus⁹) oder Liganden (*gld*-Maus¹⁰) zu ähnlichen Phänotypen mit autoimmunen Erkrankungen (Adachi et al., 1993; Takahashi et al., 1994). Diese Erscheinungen werden als Fehlen der hemmenden Wirkung auf proliferierende, gegen Autoantigene gerichtete Immun-zellen interpretiert.

Das CD95-System hat möglicherweise auch eine Effektorfunktion bei der Entwicklung und Progression von Autoimmunerkrankungen (Dowling et al., 1996). So konnte z.B. im Liquor und Blut von MS-Patienten ein Anstieg des CD95-Spiegels nachgewiesen werden (Zipp et al., 1998).

lpr und *gld*-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). Die MBP-spezifischen T-Zellen CD95-defizienter *lpr*-Mäuse können, in Wildtyp-Mäuse und CD95-Ligand defiziente *gld*-Mäuse transferiert, mit hoher Inzidenz adoptive EAE induzieren. Die MBP-spezifischen T-Zellen von Wildtyp-Mäusen wiederum sind in der Lage, in *gld*-Mäusen mit hoher Inzidenz eine abgeschwächte EAE zu erzeugen, während *lpr*-Mäuse kaum erkranken (Sabelko-Downes et al., 1999). Diese Experimente zeigten, dass CD95-Expression im Gehirn die Suszeptibilität gegenüber EAE entscheidend beeinflusst. Oligodendrozyten wurden als die Hauptträger von CD95 identifiziert. Der CD95-Ligand wird unter anderem auf Mikroglia expri-miert (Bonetti und Raine, 1997). Dazu passt, dass CD95-Ligand defiziente *gld*-Mäuse bei einer durch adoptiven Transfer hervorgerufenen EAE in den meisten Fällen eine chronische Form mit verzögerten Remissionsphasen entwickelten (Sabelko-Downes et al., 1999). Als Ursache dafür könnte eine verminderte Fähigkeit, die aktivierten infiltrierenden

⁹ *lpr* steht für Lymphoproliferation, diese Mäuse sind homozygot für eine Mutation im Gen, das für CD95 kodiert und zeigen eine komplexe immunologische Funktionsstörung mit generalisierter Lymphadenopathie und ein dem humanen Lupus erythematoses ähnliches Krankheitsbild.

¹⁰ *gld* steht für generalized lymphoproliferative disease, diese Mäuse sind homozygot für eine Mutation im Gen, das für den CD95-Liganden kodiert und zeigen eine lymphoproliferative Erkrankung.

T-Zellen zu eliminieren und deren Proliferation einzudämmen, in Frage kommen. Ein Experiment, bei dem im Rahmen einer EAE in SJL-Mäusen neutralisierende Antikörpern gegen CD95-Ligand intrathekal appliziert wurden, zeigte eine schnelle und fast vollständigen Remission des ersten Schubs in der EAE. Allerdings zeigten die behandelten Tiere häufigere und schwerere Rückfälle im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Okuda et al., 2000).

1.4.3. TRAIL-Rezeptor/TRAIL¹¹

1995 identifizierten Wiley et al. ein apoptosevermittelndes Zytokin, das sie aufgrund seiner Sequenzhomologie zu andern Zytokinen der TNF/NGF-Superfamilie als „TNF related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL) bezeichneten (Wiley et al., 1995). Davon unabhängig beschrieben Pitti et al. 1996 das gleiche Zytokin und bezeichneten es als APO2 Ligand (Pitti et al., 1996). TRAIL kann als Typ II Membranprotein oder in löslicher Form vorliegen. Bisher konnten fünf verschiedene Rezeptoren identifiziert werden, welche mit humanem TRAIL interagieren. TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) sind membranständige Rezeptoren, die nach Trimerisierung Apoptose induzieren (Pan et al., 1997; Walczak et al., 1997). TRAIL-R3 und TRAIL-R4 wirken nicht apoptotisch, da ihre intrazelluläre Todesdomäne verkürzt oder nicht vorhanden ist (Degli-Esposti et al., 1997b; Degli-Esposti et al., 1997a; Schneider et al., 1997; Sheridan et al., 1997). Der fünfte Rezeptor Osteoprotegerin, liegt in löslicher Form vor, bindet neben TRAIL auch den Osteoklastendifferenzierungsfaktor und löst keine Apoptose aus (Simonet et al., 1997). So wurde zunächst angenommen, dass die Funktion von TRAIL in erster Linie über die Expression der verschiedenen Rezeptoren reguliert wird, und dass die nicht apoptotisch wirkenden Rezeptoren als Köder-Rezeptoren die proapoptotische Wirkung von TRAIL vermindern. Diese Vermutung konnte aber in vielen Experimenten nicht bestätigt werden. Die Empfindlichkeit für TRAIL wird offenbar eher durch intrazelluläre Faktoren wie z.B. FLIP als über die Rezeptorexpression kontrolliert (Leverkus et al., 2000; Zhang et al., 1999). Bei FLIP handelt es sich um ein sowohl zelluläres („c-FLIP, cellular FLICE inhibitory protein“), wie auch virales Protein („v-FLIP“), das Homologien mit Caspase 8 aufweist. Da FLIP an FADD assoziiert, kann es mit endogener Caspase 8 um die Bindungsstelle am Rezeptorkomplex konkurrieren und die katalytische Proteolyse von Caspase8 inhibieren.

¹¹ Die Rezeptoren von TRAIL werden bezugnehmend auf ihre wahrscheinlichen Funktionen auch als DR („death receptor“) für die Rezeptoren mit apoptosevermittelnder Funktion und DcR für jene ohne apoptosevermittelnde Funktion mit angenommener Köder „decoy“ Funktion bezeichnet.

Die genaue Funktion der verschiedenen Rezeptoren ist immer noch Gegenstand intensiver Untersuchung und noch nicht vollständig verstanden. Im Gegensatz zu der Vielfalt der Rezeptoren im humanen TRAIL-System wurde in der Maus bisher lediglich ein Rezeptor identifiziert der mit TRAIL interagiert und in der Lage ist, Apoptose zu vermitteln (Wu et al., 1999). Schneider et al. identifizierten 2003 auf mRNA Ebene zwei weitere murine Rezeptoren für TRAIL (Schneider et al., 2003). Beiden soll die zytoplasmatische Todesdomäne fehlen, weshalb man vorläufig davon ausgeht, dass sie als Köder-Rezeptoren fungieren. Die genauere funktionelle Charakterisierung steht noch aus.

TRAIL wird auf Zellen des Immunsystems wie stimulierten Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen und viral infizierten Zellen exprimiert (Mariani und Krammer, 1998). Schon kurz nach seiner Entdeckung wurde TRAIL als potentiell Mittel zur spezifischen Abtötung von Tumorzellen gesehen, denn in mehreren Experimenten hatte es spezifisch nur maligne transformierte Zellen getötet, ohne toxische Wirkung auf nicht transformierte Zellen zu zeigen (Bonavida et al., 1999; Walczak et al., 1999). Nitsch et al. konnten 2000 allerdings zeigen, dass TRAIL eine proapoptotische Wirkung auf humane, nicht transformierte Nervenzellen hat (Nitsch et al., 2000). Auch bei humanen Hepatozyten wurde nach TRAIL-Exposition eine massive Induktion von Apoptose beschrieben (Jo et al., 2000). Diese Erkenntnisse zeigen, dass bezüglich des schnellen klinischen Einsatzes von TRAIL Zurückhaltung angebracht ist.

1.4.3.1. Rolle des TRAIL-Systems in der EAE

In histologischen Untersuchungen der Gehirne von an EAE erkrankten Tieren wurden TRAIL positive T-Zellen direkt neben Caspase-positiven, apoptotischen Neuronen gefunden. (Aktas et al., 2005). Dies illustriert einen möglichen TRAIL-vermittelten Zellschaden im Rahmen der EAE. Es ist bekannt, dass aktivierte T-Zellen lösliches TRAIL sezernieren (Martinez-Lorenzo et al., 1999) und TRAIL eine entscheidende Rolle bei der T-Zell vermittelten Zytotoxizität spielt (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 im ZNS als Effektormolekül Schaden verursacht. Zudem zeigen T-Zellen von TRAIL-knockout-Mäusen eine signifikante Reduktion ihres zytotoxischen Potentials (Aktas et al., 2005).

Neben seinen apoptoseinduzierenden Eigenschaften hat TRAIL auch immunregulatorisches, antiinflammatorisches Potential, u.a. in Bezug auf die T-Zellfunktion. Einige Autoren sehen TRAIL als Inhibitor autoimmuner Inflammation, da TRAIL die Inhibition autoreaktiver T-Lymphozyten zugeschrieben wird (Lunemann et al., 2002; Song et al., 2000). Die Rolle von

TRAIL bei der negativen Selektion von T-Zellen im Thymus wird kontrovers diskutiert. Cretney et al. stellten 2003 eine normale Funktion dieses Prozesses in TRAIL-defizienten Mäusen fest (Cretney et al., 2003). Diese Daten stehen im Gegensatz zu denen von Lamhamedi-Cherradi die bei TRAIL-defizienten Mäusen eine schwere Störung dieses Prozesses und resultierend daraus eine verminderte Toleranz von Autoantigenen mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen feststellten (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003)¹². Suter stellte 2003 fest, dass die proliferative Kapazität von T-Zellen im ZNS von im ZNS befindlichen dendritischen Zellen gehemmt wird. Dabei scheint TRAIL eine essentielle Rolle zu spielen, denn seine Blockade reduziert diese inhibitorische Wirkung der dendritischen Zellen (Suter et al., 2003). Hilliard et al. untersuchten 2001 den Einfluss der peripheren Blockade von TRAIL auf den Krankheitsverlauf der EAE. Hierbei wurde löslicher TRAIL-Rezeptor intraperitoneal injiziert. Dabei konnte eine Exazerbation des Verlaufes festgestellt werden, wenn TRAIL-Rezeptor nach Beginn der Krankheitssymptome gegeben wurde. Dies äußerte sich in einer Zunahme der Inflammation und des Behinderungsgrades der Mäuse. Ein wichtiger Punkt schien das Einsetzen der Behandlung mit TRAIL zu sein, denn wurde TRAIL schon vor Einsetzen von Krankheitssymptomen geblockt, zeigte sich im Vergleich zu Kontrollen kein Unterschied im Krankheitsverlauf. Die Apoptose von inflammatorischen Zellen im ZNS war unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren (Hilliard et al., 2001). Inwieweit die TRAIL-Wirkung auch im ZNS blockiert wurde, ließ sich mit diesem Experimentdesign nicht feststellen.

Bei einer Untersuchung der Wirkung einer spezifischen intrazerebralen TRAIL-Blockade im ZNS zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hilliard eine signifikante Verringerung des Schweregrads der EAE (Aktas et al., 2005). Bei der wiederholten intrazisternalen Injektion von TRAIL bei gesunden Mäusen konnte keine vermehrte Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten festgestellt werden, 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). Es lässt sich also feststellen, dass die genaue Rolle die TRAIL in der Pathogenese der EAE spielt bislang offen bleibt, d.h. ob sich seine Anwesenheit eher negativ oder positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt, oder ob TRAIL im ZNS eine völlig andere Rolle spielt als bei Immunprozessen, welche vorwiegend außerhalb des ZNS ablaufen.

¹² Beide Gruppen verwendeten den identischen Mausstamm