

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Professor. Dr. med. Stephan Zierz)

**Immunhistochemische Untersuchungen der
Leukozytenantigene CD3, CD4 und CD8 bei der
Leukoenzephalitis der Lewis-Ratte nach intrazerebraler
Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kristina Gerlach

geboren am 09.09.1979 in Halle/Saale

Betreuer: PD Dr. med. M. E. Kornhuber

Gutachter: Prof. Dr. med. H. A. Lehr, Lausanne

Prof. Dr. med. G. Keyser, Halle/Saale

PD Dr. med. M.E. Kornhuber, Halle/Saale

Datum der Verteidigung: 29.03.2011

Meiner Familie

Referat

Superantigene sind polyklonale T-Zell-Aktivatoren, die von Bakterien und Viren produziert werden. Sie binden unprozessiert an MHC-Klasse-II-Moleküle Antigen-präsentierender Zellen und treten mit der V β -Kette des T-Zell-Rezeptors in Kontakt. Durch die superantigenvermittelte Aktivierung von T-Zellen kommt es über Freisetzung verschiedener Lymphokine zur Aktivierung des Immunsystems. Eine bedeutende Rolle von Superantigenen wird bei der Entstehung verschiedener autoimmunologischer Erkrankungen einschließlich der Multiplen Sklerose diskutiert. Es wird postuliert, dass Viren an der Pathogenese der MS-Erkrankung einen entscheidenden Anteil besitzen, wobei virale Superantigene eventuell zur Auslösung der zerebralen Entzündung beitragen. Tatsächlich verursachen im Gehirn exprimierte Superantigene eine zerebrale Entzündungsreaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde das Entzündungsinfiltrat bezüglich der Leukozytenantigene CD3, CD4 und CD8 näher charakterisiert. 300 g wiegende Lewis-Ratten wurden an den Tagen 3½, 6 und 8 nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA), bzw. ½, 3 und 5 Tage nach peripherer intravenöser Injektion ConA-aktivierter Milzzellen geopfert. Die T-Zell-Marker CD3, CD4 und CD8 wurden an zerebralen Gefrierschnitten immunhistochemisch untersucht. Nach intrazerebraler Injektion von SEA trat eine vorwiegend perivaskuläre Entzündungsreaktion auf (Superantigen-Enzephalitis). Diese war auf der Injektionsseite (rechts) signifikant stärker ausgeprägt als auf der Gegenseite, mit einem Maximum 12 h nach i.v. Injektion aktivierter Milzzellen. Das entzündliche Infiltrat wurde von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen dominiert. In der nicht injizierten Hemisphäre fand sich eine flüchtige Entzündungsaktivität drei Tage nach peripher-venöser Injektion von aktivierten Milzzellen. Die Anzahl von CD3⁺ T-Lymphozyten war deutlich geringer als die Summe aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dieses Phänomen geht vermutlich auf die Internalisierung von CD3 nach Superantigenkontakt der entsprechenden T-Lymphozyten zurück. Die vorliegende Untersuchung trägt zur Vertiefung des Verständnisses der Pathogenese der Superantigenenzephalitis bei. Darüber hinaus weisen die Beobachtungen eine Reihe von Übereinstimmungen zum Entzündungsbild bei Multipler Sklerose oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) auf.

Gerlach, Kristina: Immunhistochemische Untersuchungen der Leukoenzephalitis nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A bei der Lewis-Ratte. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 63 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Superantigene	1
1.2	Superantigenenzephalitis	3
1.3	Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose	4
1.4	Entzündung und Demyelinisierung	5
1.5	Experimentelle Allergische Enzephalitis (EAE)	6
1.6	Modelle der virusinduzierten Entmarkung	7
1.7	Superantigenenzephalitis als Tiermodell der MS	8
1.8	Zielsetzung der Studie	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Materialien	10
2.2	Versuchstiere	12
2.3	Gewinnung der Lymphozyten aus der Milz	12
2.4	Intrazerebrale Injektion des Superantigens (Tag 0)	13
2.5	Injektion der aktivierten Lymphozyten (Tag 3)	14
2.6	Gehirnentnahmen (Tag 3½, 6, 8)	14
2.7	Herstellen von Gefrierschnitten	15
2.8	Immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode	15
2.9	Die untersuchten Antigene	17
2.9.1	CD3-Antigen	17
2.9.2	CD4-Antigen	18
2.9.3	CD8-Antigen	18
2.10	Positivkontrolle	19
2.11	Negativkontrolle	20
2.12	Auswertung	20
2.13	Fehlerdiskussion	21

3.	Ergebnisse	22
3.1	Allgemeine Befunde	22
3.2	Anzahl reaktiver GefäÙe und Ausprägung des Entzündungsinfiltrates im zeitlichen Verlauf	22
3.3	Beurteilung der Anzahl von CD3+, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf	25
3.4	Vergleich der Methoden und Befunde der Superantigenenzephalitis von Ganz et al., 2003 und der vorliegenden Studie	31
4.	Diskussion	32
4.1	Pathophysiologie der Superantigenenzephalitis	33
4.2	Vergleich der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen mit Genexpressionsbefunden der SEA-Enzephalitis	40
4.3	Vergleich der Superantigenenzephalitis mit Befunden bei MS und MS-Tiermodellen	41
4	Zusammenfassung	46
5	Literaturverzeichnis	48
6	Thesen	59
	Tabellarischer Lebenslauf	61
	Selbstständigkeitserklärung	62
	Danksagung	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Komplex aus Superantigen, MHC-II-Molekül der antigen-präsentierenden Zelle und T-Zell-Rezeptor des T-Lymphozyten	3
Abb. 2	Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens	14
Abb. 3	Verwendete immunhistochemische Färbemethode (Avidin-Biotin-Methode)	17
Abb. 4	Der T-Zell-Rezeptorkomplex	19
Abb. 5	Anzahl der reaktiven Gefäße und Gesamtzahl aller Gefäße > 20 µm im Vergleich beider Hemisphären im Zeitverlauf, nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) und nachfolgender (nach 3 Tagen) intravenöser Injektion ConA-aktivierter Milzzellen	24
Abb. 6	Perivaskuläre Entzündungszellpopulationen nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) und nachfolgender (nach 3 Tagen) intravenöser Injektion ConA-aktivierter Milzzellen im Zeitverlauf	27
Abb. 7	Immunhistochemische Färbungen (CD3-Antigen)	28
Abb. 8	Immunhistochemische Färbungen (CD4-Antigen)	29
Abb. 9	Immunhistochemische Färbungen (CD8-Antigen)	30

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	Cluster of Differentiation
ConA	Concanavalin-A
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FCS	Fetales Kälberserum
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
MAG	Myelin-assoziiertes-Glykoprotein
MBP	Basisches Myelinprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sclerosis-associated Retrovirus
PLP	Proteolipidprotein
PML	Progressive Multifokale Leukenzephalitis
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
SEA	Staphylokokkenenterotoxin A
Tris-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan-gepufferte-Kochsalzlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Superantigene

Superantigene sind Mitogene bakteriellen oder viralen Ursprungs, die in der Lage sind, T-Lymphozyten in einer nichtantigenspezifischen Weise zu aktivieren. Sie werden z. B. von Retroviren oder grampositiven Kokken gebildet (Torres et al., 2001). Sowohl virale als auch bakterielle Superantigene können CD4⁺-, CD8⁺- und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten aktivieren (Müller-Alouf et al., 2001). Mittlerweile wurden auch B-Zell-Superantigene beschrieben, auf die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht eingegangen wird, so dass der Begriff „Superantigen“ mit T-Zell-Superantigenen gleichgesetzt wird.

Superantigene bestehen aus Proteinen, die ein Molekulargewicht zwischen 14,5 und 28,5 kDa aufweisen (Lavoie et al., 1999). Es werden endogene und exogene Superantigene unterschieden. Die endogenen Superantigene sind körpereigene Antigene mit gering stimulierender Wirkung auf Lymphozyten. Deshalb werden sie auch „minor lymphocyte stimulating antigens“ genannt (Acha-Orbea et al., 1992). Exogene Superantigene werden von Viren und Bakterien gebildet.

Superantigene werden nach Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Lymphozyten präsentiert. Darüber hinaus können Superantigene, insbesondere das in der vorliegenden Arbeit verwendete Staphylokokkenenterotoxin A (SEA), auch an MHC-Klasse-I-Moleküle binden (Wright und Chapes, 1999). SEA bindet spezifisch sowohl an MHC-Klasse-II-Moleküle Antigen-präsentierender-Zellen (APC), als auch an die V β -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (TCR). Über diesen Mechanismus können sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺-T-Lymphozyten aktiviert werden (Yagi et al., 1990). Superantigene binden, abhängig von ihrer eigenen molekularen Struktur im Bereich bestimmter Regionen der V β -Kette des TCR und können so eine oligoklonale oder gar polyklonale Aktivierung von CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen erzielen (Scherer et al.; 1993, Torres et al., 2001). Dadurch ist es möglich, dass ein Superantigen bis zu 20 % aller T-Lymphozyten aktivieren kann. „Normale“ Antigene stimulieren demgegenüber nur etwa 0,0001 - 0,001 % der T-Zellpopulation (Fleischer et al., 1991). Darüber hinaus sind Superantigene vom Typ der Staphylokokkenenterotoxine auch unabhängig des MHC-Klasse-II-Moleküls in der Lage, über Interaktion mit der V β -Untereinheit des TCR, direkt CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren (Fleischer et al., 1991; Hermann et al., 1991). Folge dieser T-Zell-Aktivierung ist u. a. eine massive Freisetzung von IL-2 und

IFN- γ , die die Immunantwort unterhalten und zur weiteren Rekrutierung von Immunzellen führt.

Superantigene und ihre Effekte werden als ursächlich oder auslösend für verschiedene Erkrankungen diskutiert. Dazu zählen chronische Erkrankungen wie der Diabetes mellitus Typ I, die Rheumatoid-Arthritis, die Psoriasis oder das Kawasaki-Syndrom (Johnson et al., 1994). Beispiele für akute Effekte von Superantigenen beim Menschen sind Lebensmittelvergiftungen, etwa durch Staphylokokkenenterotoxine oder durch das Toxische Schock Syndrom Toxin (TSST-1) (Altemeier et al., 1982; Bergdoll et al., 1981). TSST-1 führt nach Bindung an MHC-II-Moleküle zu einer massiven T-Zellaktivierung. Die Folge ist eine verstärkte Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 und TNF. Diese frühen Entzündungsmediatoren führen zu einer Aktivierung des Immunsystems und charakterisieren den Krankheitsverlauf durch unterschiedliche Symptome wie Fieber, Hypotonie, Schock u. a. Als Komplikationen können akutes Nierenversagen, Leberversagen oder eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) auftreten. Bei chronischen Erkrankungen wie der Rheumatoid-Arthritis wird vermutet, dass besonders V β 14⁺ T-Lymphozyten, die zytotoxisch auf synoviale Fibroblasten wirken, durch Superantigene aktiviert werden (Kraft et al., 1998). Mögliche Folgen dieser Aktivierung sind rezidivierende Gelenkentzündungen, die in Gelenkknorpeldestruktion, Pannusbildung und Gelenksteifigkeit münden.

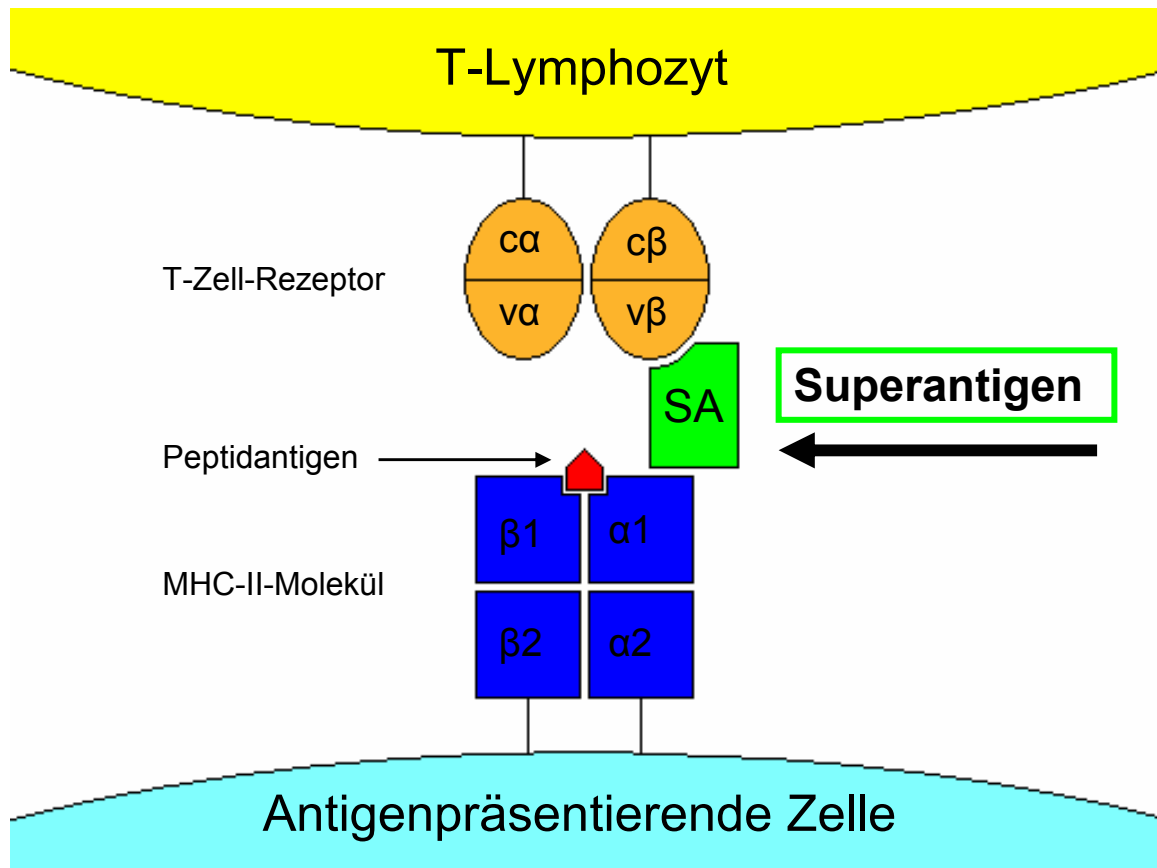


Abbildung 1: Komplex aus Superantigen, MHC-II-Molekül der Antigen-präsentierenden Zelle und T-Zell-Rezeptor des T-Lymphozyten.

1.2. Superantigenenzephalitis

Im Tiermodell der Superantigen-induzierten akuten Enzephalitis bei Lewis-Ratten führt die intrazerebrale Injektion von SEA in Kombination mit der peripheren intravenösen Injektion aktivierter T-Lymphozyten zu einer periventrikulär betonten fokalen Leukoenzephalitis (Kornhuber et al., 2002; Ganz, 2003). Es wird spekuliert, dass ein evtl. bisher nicht identifiziertes neurotropes Retrovirus intrazerebral für Superantigene kodiert und somit an der Entstehung der Immunphänomene bei der Multiplen Sklerose beteiligt sein könnte. Im Gegensatz zur Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) werden zur Verstärkung der Superantigenenzephalitis keine gegen ein bestimmtes Antigen immunisierten T-Lymphozyten verwendet. Letztere werden vielmehr durch das Superantigen aktiviert. Die peripher injizierte aktivierten T-Lymphozyten erkennen das

intrazerebral injizierte Superantigen und führen zu einer der MS bzw. EAE ähnlichen Entzündungsreaktion (Kornhuber et al., 2002; Ganz, 2003).

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose

Im Bereich der Neurologie wird Superantigenen vor allem eine pathogenetisch bedeutsame Rolle bei der Multiplen Sklerose zugeschrieben.

Die Multiple Sklerose ist die häufigste demyelinisierende Erkrankung im jungen Erwachsenenalter, deren Ätiologie und Pathogenese bisher noch nicht vollständig geklärt ist. Die Prävalenz in Deutschland beträgt ca. 1: 100 000. Neben genetischen- und Umweltfaktoren werden auch besondere immunologische Reaktionen als auslösende Faktoren diskutiert. Für einen Einfluss der Umwelt sprechen eine erhöhte Prävalenz und Inzidenz polwärts (Nord-Süd-Gefälle) (Ebers et al., 2000; Dymont et al., 1997) sowie Migrationsuntersuchungen, die zeigen, dass Personen, die nach dem 15. Lebensjahr aus Regionen hoher Prävalenz auswandern, das in der Ursprungsregion vorherrschende MS-Risiko mitnehmen, während bei einem Umzug vor dem 15. Lebensjahr das Erkrankungsrisiko des Zielgebietes angenommen wird (Dean und Kurtzke, 1971). Ferner weisen MS-Patienten der nordeuropäischen Bevölkerung eine Assoziation mit HLA-A3, HLA-B7 (MHC Klasse I) und mit HLA-DR2 (MHC Klasse II) auf (Compston und Sadovnick, 1992).

Es gibt grundsätzlich zwei unterschiedliche Modelle, die zur Deutung der Pathogenese der MS herangezogen werden und zwar die EAE und virale Demyelinisierung. Die EAE bietet eine gute Erklärung für die entzündlichen Phänomene der Erkrankung d. h. Schübe mit Symptomen und Kontrastmittelaufnahme aktiver Herde im MRT des ZNS. Demgegenüber bieten virale MS-Modelle eine gute Erklärung für die schleichende Degeneration bei der MS, die in Form der sekundären Krankheitsprogression in Erscheinung tritt oder auch als einziger Teil der Erkrankung in Form der primären Progression.

1.4 Entzündung und Demyelinisierung

Kennzeichnend für die Erkrankung sind die vor allem periventrikulär, entlang des Corpus callosum und im Bereich der Sehnerven und der Sehbahn liegende Plaques. Makroskopisch stellen sie sich als grauweißliche, gut abgrenzbare Herde in der weißen Substanz dar. Aufgrund der gliösen Veränderungen erscheint die Konsistenz im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe etwas vermehrt (daher „Sklerose“). Die entzündlichen Infiltrate finden sich vor allem perivenös und unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung je nach Alter der Plaques. Frische Plaques sind durch nackte Axone, umgeben von Makrophagen und Lymphozyten sowie Plasmazellen gekennzeichnet (Raine, 1983). Perivaskulär und im Zentrum des Herdes dominieren CD8+ T-Lymphozyten; am Rand finden sich CD4+ T-Lymphozyten (Traugott et al., 1983). Es wird vermutet, dass MS-Läsionen Folge einer lokalen Entzündung mit nachfolgender axonaler Schädigung, Demyelinisierung und Gliose darstellen (Compston und Coles, 2002). Andere Autoren berichten über Befunde, die mit einer primär degenerativen Entstehung der Plaques vereinbar sind, so dass die entzündliche Komponente einem sekundären Phänomen entsprechen könnte (Filippi et al., 1998; Barnett und Prineas, 2004).

Die Verlaufsdynamik der Multiplen Sklerose ist individuell sehr unterschiedlich. Detaillierte Untersuchungen an einem relativ großen Kollektiv zerebraler Gewebeproben von MS-Patienten mit atypischer MS und mit Neuromyelitis optica haben gezeigt, dass eine ausgesprochene Heterogenität in den Mustern der Entmarkung vorliegt (Lucchinetti et al., 1996 und 2000). Diese Heterogenität wurde zwischen Läsionen unterschiedlicher Patienten gefunden, während sich die Läsionsmuster in Plaques des gleichen Patienten recht ähnlich waren (Lucchinetti et al., 2000). Weiterhin kann eine Unterscheidung in Plaques mit deutlicher Remyelinisierung und Plaques mit Zerstörung der Oligodendroglia ohne Zeichen von Remyelinisierung getroffen werden. Die Befunde sind nicht leicht zu interpretieren, denn die MS und die Neuromyelitis optica sind verschiedene Erkrankungen und Patienten mit typischer MS werden kaum je einer Biopsie unterzogen. Nach ihrer Aktivierung im systemischen Immunkompartiment sind Lymphozyten in der Lage die BHS zu durchdringen. Die erhöhte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle führt zur Leukozytenadhäsion und Transmigration. Dabei ist zu erwähnen, dass bei den meisten Läsionen der MS schon vor Auftreten klinischer Symptome eine fokale Schrankenstörung der BHS vorliegt (Hawkins et al., 1991; Barnett und Prineas, 2004).

Möglicherweise führen über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentierte Superantigene im ZNS zu einer Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, die dann aktiv die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Die Aktivierung peripherer T-Lymphozyten könnte Folge einer Imbalance des Immunsystems bei Stress, Infektionen oder anderen Ereignissen sein.

Neben der entzündlichen Komponente ist die MS durch einen Verlust von Axonen gekennzeichnet, deren Schädigung während eines akuten Schubes mit der Entzündungsaktivität zu korrelieren scheint (Bitsch et al., 2000). Für chronische Läsionen trifft diese Beobachtung aber nicht zu (Prineas et al., 2001). Insbesondere aktivierte Mikrogliazellen, Makrophagen und CD8⁺ zytotoxische-T-Lymphozyten bestimmen das Ausmaß axonaler Schädigung und neuronaler Degeneration (Medana et al., 2001). Die Demyelinisierung kann zum einen durch eine primäre Schädigung der Oligodendroglia und sekundäre Entmarkung oder durch direkte Schädigung der Myelinscheiden entstehen (Fox, 2004). Demyelinisierung kann z. B. durch direkte zytotoxische Schädigung von CD8⁺ T-Zellen vermittelt werden (Storch und Lassmann, 1997). Diskutiert werden auch infektiöse Agenzien, wie z. B. Viren, die zu einer direkten Schädigung der Oligodendroglia führen (Storch und Lassmann, 1997). Der genaue Mechanismus der Entmarkung ist noch nicht vollständig geklärt.

1.5 Experimentelle Allergische Enzephalitis (EAE)

Die EAE ist in der Regel eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Myelinantigen-spezifische Autoimmunreaktion und das am häufigsten verwendete MS-Tiermodell. Injiziert man Versuchstieren Myelinproteine wie myelin basic protein (MBP), Proteolipidprotein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) oder Myelin-assoziiertes-Glykoprotein (MAG), so lässt sich nach Durchbrechen der Immuntoleranz mit Freund-Adjuvans ein der MS ähnliches Krankheitsbild mit entzündlicher Reaktion und nachfolgender Demyelinisierung hervorrufen (Dal Canto et al., 1995). Dabei ist zwischen akuten und chronischen Verläufen zu unterscheiden. (Lublin, 1984; Tonra et al., 2001).

Akute Verläufe entstehen durch einmalige Immunisierung mit ZNS-Gewebe mit komplettem Freund-Adjuvans bei Lewis-Ratten. Die Erkrankung tritt 8 - 15 Tage nach der Sensibilisierung auf und ist bei Lewis-Ratten durch einen monophasischen Verlauf gekennzeichnet. Aktivierte Myelin-spezifische CD4⁺ T-Zellen überwinden die BHS und lösen antigenabhängig nach Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle eine vorwiegend

perivaskuläre lymphozytäre Entzündung aus. Eine Entmarkung findet erst nach 12-20 Tagen statt, ist auf perivaskuläre Areale beschränkt und regeneriert sich vollständig. Das Krankheitsbild der akuten EAE entspricht vor allem der postvakzinalen Leukenzephalitis des Menschen.

Das Bild der Entzündung im Modell der EAE weist Ähnlichkeiten zu dem der MS auf, erklärt aber degenerative Prozesse, die parallel zur Entzündung ablaufen oder dieser vorausgehen nur unzureichend (Kornhuber und Zierz, 2003; Kornhuber, 2006).

1.6 Modelle der virusinduzierten Entmarkung

Als Alternative zum Tiermodell der EAE wurden verschiedene Virusmodelle etabliert.

Es können drei Gruppen virusinduzierter Entmarkungsenzephalitiden unterschieden werden.

1. Direkte zytolytische Infektion der Oligodendroglia, die zur Zerstörung der myelinbildenden Zellen und damit zur Entmarkung führt (progressive multifokale Leukenzephalitis PML, neurotropes JC-Virus, (Sweet et al., 2002))
2. Permissive Infektion der Oligodendroglia mit Einbau von Virusantigenen in die Zellmembran und anschließender Immunreaktion gegen die Virusbestandteile, die dann zur Entmarkung führen (Rubellavirus; Chantler et al., 1995)
3. Passagere Infektion der Oligodendroglia mit folgender Immunreaktion, die gegen Virus- und eigene Antigene gerichtet ist und so zur Enzephalitis mit Entmarkung führt (Tsunoda und Fujinami, 2002).

Die Theiler-Virus-Enzephalomyelitis als Beispiel eines MS Tiermodells wird durch Picornaviren in Mäusen hervorgerufen (Lipton und Friedmann, 1980). Durch unterschiedliche Mutanten können akute, subakute und chronische Verläufe entstehen. In der akuten Phase dominiert die Infektion der Neurone, in der chronischen Phase bilden sich vor allem im Rückenmark Demyelinisierungen. Interessanterweise unterliegt der Entmarkungsprozess der Kontrolle von MHC-II-Antigenen (Friedmann et al., 1987). Andere virale Modelle wurden mit Herpesviren und Visnaviren etabliert (Dal Canto und Rabinowitz, 1982).

Seit kurzem werden auch Retroviren als mögliche Auslöser der MS diskutiert. MSR (multiple sclerosis-associated retrovirus) gehört zu den humanen endogenen Retroviren

(HERV). Solche Viruspartikel konnten in Zellkulturen von MS-Patienten nachgewiesen werden (Perron et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese Viruspartikel über die Vbeta16-Kette zu einer polyklonalen T-Zell-Aktivierung, ähnlich wie bei Superantigenen führen (Perron et al., 2001).

Bei der progressiven multifokalen Leukenzephalitis (PML), die in einer virusinduzierten Entmarkung mündet, scheint der Zusammenhang zwischen viraler Infektion und Demyelinisierung eindeutig zu sein, während bei anderen Modellen noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob eine spezifische Entzündungsreaktion gegen Virusbestandteile auftritt oder autoimmunologische Prozesse im Vordergrund stehen.

1.7 Superantigenenzephalitis als Tiermodell der MS

In dem 2002 von Kornhuber et al. beschriebenen Tiermodell führt die intrazerebrale Injektion von Staphylokokkenenterotoxin A und die periphere intravenöse Injektion aktivierter T-Lymphozyten zu einer periventrikulären und pericallösen fokalen Leukenzephalitis. Es wird davon ausgegangen, dass ein evtl. bisher nicht identifiziertes neurotropes Retrovirus intrazerebral Superantigene kodiert und somit indirekt für die Immunphänomene der Multiplen Sklerose verantwortlich ist.

Im Gegensatz zur EAE werden keine gegen ein bestimmtes Antigen immunisierten T-Lymphozyten verwendet. Die peripher injizierten aktivierten T-Lymphozyten erkennen das intrazerebral exprimierte Superantigen und führen zu einer der MS und EAE ähnlichen Entzündungsreaktion (Kornhuber et al., 2002; Emmer et al., 2008).

1.8 Zielsetzung der Studie

In vorherigen Untersuchungen (Kornhuber et al., 2002) zeigte sich nach intrazerebraler Injektion von SEA eine vorwiegend periventrikulär und im Corpus Callosum-Bereich liegende Entzündung. Das perivaskuläre Entzündungsinfiltrat bestand aus mehreren Lagen mononukleärer Rundzellen und wurde mit der HE-Färbung dargestellt. In der vorliegenden Studie sollen die von Kornhuber et al., 2002 erhobenen Befunde zunächst repliziert werden. Darüber hinaus soll das durch SEA hervorgerufene entzündliche Infiltrat immunhistochemisch auf das Vorhandensein von CD3+, CD4+ und CD8+ T-

Zellen im Gehirn von Lewis-Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A untersucht werden.

Die erhobenen histologischen Befunde der Superantigenenzephalitis werden mit den Ergebnissen der differentiellen Genexpression der in Lewis Ratten induzierten Superantigenenzephalitis, insbesondere von Genen, die für die untersuchten Antikörper CD3, CD4 und CD8 kodieren (Emmer et al., 2008) verglichen. Ein weiteres Ziel ist der Vergleich der bei der SEA-Enzephalitis bei Lewis-Ratten erhobenen Befunde mit Befunden bei MS-Patienten und mit Befunden von MS-Tiermodellen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Erythrozytenlysepuffer	Universitätsapotheke Halle
Tween 20	Pierce Chemicals, Rockford, USA
Concanavalin A	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Staphylokokkenenterotoxin A	Toxin Technology, Sarasota, USA
Nährmedium RPMI 1640	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
FCS	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Glutamin	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	8,3 g NH ₄ Cl ad 1 l Aqua dest.
PBS (phosphate buffered saline, 10 mM)	Ansatz für 5 l Stammlösung, 100mM: - 400 g NaCl - 72 g wasserfreies Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) - 10 g Kaliumchlorid (KCl) - 10 g Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) ad 5 l Aqua dest gelöst, pH-Werteinstellung auf 7,4
Tris-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan)	Ansatz für 1 l Stammlösung, 0,05 M - 6,1 g Tris Base in 50 ml Aqua dest. - 37 ml 1 N Salzsäure (HCl) ad 1 l Aqua dest., pH-Werteinstellung auf 7.6

CD3

Primärantikörper: Mouse anti rat, CD3 monoclonal IgG3 kappa
Sekundärantikörper: Biotinylated Rat Anti-Mouse IgG3 monoclonal
Isotypenkontrolle: Isotype control purified mouse IgG3
Jeweils von BD Biosciences Pharmingen.

CD4

Primärantikörper: Mouse Anti Rat CD4 monoclonal IgG2a, kappa
Sekundärantikörper: Biotinylated Rat Anti-Mouse IgG2a monoclonal
Isotypenkontrolle: Isotype control purified mouse IgG2a
Jeweils von BD Biosciences Pharmingen.

CD8

Primärantikörper: Mouse Anti Rat CD8a monoclonal IgG1, kappa
Sekundärantikörper: Biotinylated Rat Anti-Mouse IgG1 monoclonal
Isotypenkontrolle: Isotype control purified mouse IgG1
Jeweils von BD Biosciences Pharmingen.

Negativ Kontrolle

Isotype control purified mouse IgG2b DakoCytomation, Denmark

Weitere Materialien

BIOT-SP AP Ziege Anti Maus	Dianova, Deutschland
Mayers Hämalun	Merck KGaA, Germany
Superantigen Antibody Diluent	BD Bioscience Pharmingen
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	BD Biosciences Pharmingen
Aceton	Sigma Aldrich Chemical, Steinheim
Aqua dest.	Universitätsapotheke Halle
DAB-Substrat-KIT	BD Biosciences Pharmingen
Roti-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe
Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger	Menzel-Gläser, Deutschland

2.2 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 18 männliche 300 g Lewis-Inzuchtratten (Charles-River-Laboratories) verwendet. Diese sind im Vergleich zu Meerschweinchen oder Mäusen stärker suszeptibel für die EAE (Paterson et al., 1970). Dadurch ist ein Vergleich mit Befunden der EAE gut möglich. Eine Injektion der Immunzellen in die Schwanz- oder Penisvene ist problemlos möglich. Die Ratten wurden unter Standardbedingungen (klimatisierte Räume, 12 : 12-Hell-Dunkel-Rhythmus, Makrolonkäfige, pelletiertes Rattenalleinfutter, täglich Frischwasser) gehalten und durch qualifiziertes Personal betreut.

2.3 Gewinnung der Lymphozyten aus der Milz

Nach Tötung der Versuchstiere mittels CO₂-Inhalation wurde die Bauchdecke unter sterilen Bedingungen eröffnet, die Milz präpariert und entnommen. Das vorhandene Milzgewebe wurde mechanisch durch ein Sieb zerkleinert und anschließend in Pufferlösung (PBS) aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde nachfolgend zentrifugiert (1200 g, 10 Min.), der Überstand verworfen. Anschließend wurde dem Zell-PBS-Gemisch Ammoniumchloridlösung (Lysepuffer) zugegeben, um die vorhandenen Erythrozyten zu lysieren, und für 4 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Schonung der in der Suspension vorhandenen Lymphozyten erfolgte zuvor die Zugabe von 5 ml fetalem Kälberserum. Der Lysevorgang wurde durch Zugabe von 20 ml PBS gestoppt. Nun folgte 2-maliges Waschen der Zellsuspension (Zugabe von PBS und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 1200 g). Die Lymphozyten wurden in einer Zählkammer ausgezählt und auf die Gesamtmenge hochgerechnet. Somit konnte eine definierte Zellzahl ($1,5 \times 10^6$) pro Petrischale dem Nährmedium zugegeben werden.

Zur Anregung der Proliferation der Lymphozyten wurden jeder Petrischale 2,5 µg/ml Concavalin A hinzugefügt. Die Dosierung wurde anhand einer zuvor durchgeführten Verdünnungsreihe gewählt, wobei die Dosis gewählt wurde, unter der die höchste Lymphozytenproliferationsrate gemessen werden konnte (Kornhuber et al., 2002). Der Zeitpunkt der höchsten Proliferationsrate wurde nach 3 Tagen erreicht. Nach dreitägiger Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurden die aktivierten Lymphozyten geerntet und

nachfolgend 3x gewaschen, um eine Immunreaktion durch Antikörper des im Nährmedium enthaltenen fetalen Kälberserums zu vermeiden. Jedem Versuchstier konnten $1,5 \times 10^7$ Zellen injiziert werden. Die i.v.-Injektion erfolgte direkt im Anschluss an die Zellernte.

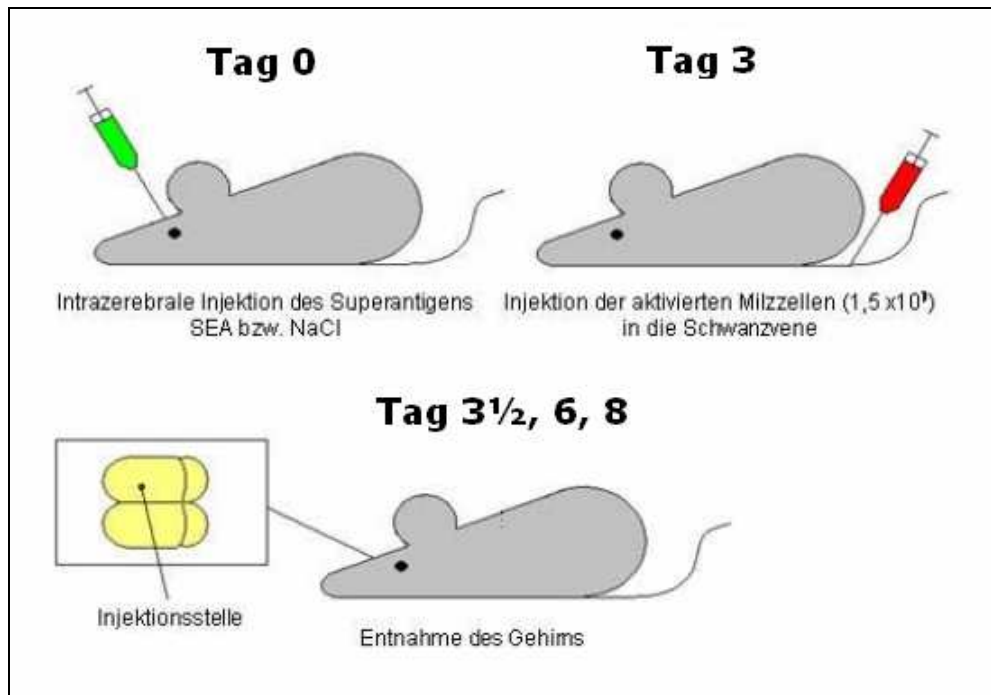


Abbildung 2: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens.

Der intrazerebralen Injektion von $50 \mu\text{l}$ Superantigen durch Trepanation der Schädelkalotte und Anlegen eines Bohrloches rechts paramedian folgte nach drei Tagen die peripher-venöse Injektion von $0,5 \text{ ml}$ PBS-Zell-Gemisch in die Schwanzvene. 3,5; 6 und 8 Tage nach Superantigeninjektion, bzw. 0,5; 3 und 5 Tage nach Injektion der ConA-aktivierten Milzzellen wurden die Tiere geopfert und die Gehirne zu weiteren immunhistochemischen Untersuchungen entnommen.

2.4 Intrazerebrale Injektion des Superantigens (Tag 0)

Präoperativ wurden die Tiere mittels Farbe am Schwanz markiert und gewogen und mit Ketanest i.p. (2 mg/kg KG) und Rompun i.p. ($1-2 \text{ mg/kg KG}$) narkotisiert. Die Ausschaltung der Schmerzempfindung wurde anhand intraphalangealer Schmerzstimuli

sichergestellt. Nach Hautdesinfektion erfolgte der Hautschnitt rechts paramedian entlang der Schädelkalotte, Verdrängung des Periostes nach beiden Seiten und Bohrlochtrepanation, zwei mm rechts der Mittellinie hinter dem Bregma. Durch dieses Bohrloch konnten 50 µl Superantigenlösung in 3 mm Tiefe injiziert werden. Wenn ein Teil der Injektionslösung retrograd das Bohrloch verließ, galt die Injektion als erfolgreich. Anschließend Wundverschluss und nochmalige Hautdesinfektion. Postoperativ wurden die Tiere noch einige Zeit beobachtet. Bedarfsmedikation bei Anzeichen von Schmerzen mit Metamizoltropfen. Insgesamt dauerte die Narkose ca. 20 Min, die Operation selbst ca. 10 Min. Nach einer kurzen Erholungszeit waren keine neurologischen Defizite auffällig. In der Kontrollgruppe erfolgte statt der Injektion von Superantigen die Injektion der gleichen Menge 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung unter identischen Versuchsbedingungen. Gleichzeitig erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Gewinnung der Lymphozyten aus der Milz sowie die Aktivierung der Lymphozyten in der Zellkultur.

2.5 Injektion der aktivierten Lymphozyten (Tag 3)

0,5 ml Zell-PBS-Gemisch mit aktivierten Lymphozyten wurden am 3. Tag nach intrazerebraler Injektion des Superantigens in Kurznarkose mit Ketanest i.p. (2 mg/kg KG) und Rompun i.p. (1-2 mg/kg KG) in die Penisvene injiziert. Die weitere Beobachtung der Tiere war unauffällig.

2.6 Gehirnentnahme (Tag 3½, 6, 8)

12 Stunden post injectionem von ConA-aktivierten Milzzellen wurden sechs Versuchstiere geopfert und die Gehirne entnommen. Sechs Tage nach Injektion des Superantigens bzw. drei Tage nach Injektion der aktivierten Milzzellen wurden fünf Tiere geopfert und die Gehirne entnommen, an Tag acht nach Injektion des Superantigens, bzw Tag fünf nach Injektion der aktivierten Milzzellen wurden sieben Tiere geopfert und die Gehirne entnommen.

In tiefer Narkose mit i.p. Ketanest (2 mg/kg KG) und Rompun (1 - 2 mg/kg KG) wurden Bauch- und Brusthöhle eröffnet, ein angeschnittener Butterfly-Schlauch über den

eröffneten linken Ventrikel des Herzens in die Aorta vorgeschoben und das gesamte Gefäßsystem mit 4 - 8 °C kalter Kochsalzlösung perfundiert. Der rechte Herzvorhof wurde erst unmittelbar vor der Perfusion eröffnet. Nach ca. 10 Min war die Leber komplett entfärbt. Nun wurde der Schädel eröffnet. Ausgehend vom Foramen magnum wurden mit einer Schere die okkzipitalen Schädelanteile nach lateral weggebrochen, dann erfolgte das Verschieben der Scherenenden von dorsal flach unter das Schädeldach, das von beiden Seiten weggedrängt wurde. Nach Abziehen der Dura mater mit einer chirurgischen Pinzette wurde mit Hilfe des flachen Endes des Skalpell das Gehirn von der Schädelbasis abgehoben und entfernt. Die entnommenen Gehirne wurden in Isopropanol auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei minus 80 °C gelagert.

2.7 Herstellen von Gefrierschnitten

Zuerst wurden die einzelnen Gehirne mit der Unterseite mit Hilfe von Tissue Tec auf einem Metallpräparatehalter aufgeblockt und in einem Rotationsmikrotom 2045C, Kryostat CM 3000® bei -14 °C 6 µm dick geschnitten. Erst nach visueller Identifizierung des Stichkanals und Darstellung des Vorder- und Hinterhorns beider Seitenventrikel, wurden die einzelnen hergestellten Präparate auf beschichtete Objektträger aufgebracht, in Aluminiumfolie verpackt und im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

2.8 Immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode

Zur Visualisierung der maximalen Entzündungsaktivität erfolgten an ausgewählten Schnittpräparaten HE-Färbungen. Weitere Präparate der gleichen Schicht wurden für die spezielle Immunhistochemie weiter verwendet. Diese Methode basiert auf der Eigenschaft des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden.

Nach dreimaligem kurzem Bad in Tris-Puffer erfolgte die Fixierung der Schnitte für 10 Min. in Aceton. Aceton wurde verwendet, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Die Substrat-Chromogenreaktion, die später benutzt wird, um die Peroxidase sichtbar zu machen, lässt nämlich keine Unterscheidung zu, ob es sich bei

dem sichtbar gemachten Enzym um das durch die Immunreaktion nachzuweisende spezifische zelluläre Antigen oder um schon vorhandene endogene enzymatische Aktivität handelt.

Anschließend wurden die Schnitte 10 Min mit Ziegen Serum (5 %) inkubiert und dann 3-mal in Tris-Puffer gewaschen. Das Ziegen Serum lagert sich an elektrisch geladenen Stellen an und verhindert so eine Adsorption des Primärantikörpers und verringert damit die unspezifische Hintergrundfärbung. Um diese so gering wie möglich zu halten, sollte die Proteinlösung aus der Tierspezies bestehen, aus welcher der Brückenantikörper stammt. So wird, bedingt durch die Bindung des Sekundärantikörpers an Komponenten der Proteinlösung eine Anfärbung verhindert. Nun erfolgte das Auftragen von 200 µl des 1:50 verdünnten Primärantikörpers. Alle Antikörper wurden mit dem Antibody Diluent (BD Biosciences) gemäß Vorschrift verdünnt. Dieser wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Tris-Puffer folgte das Auftragen und die Inkubation mit 200 µl des 1 : 50 verdünnten biotinylierten Sekundärantikörpers für 30 Min bei Raumtemperatur und anschließendes Waschen mit Tris-Puffer-Lösung. Nachfolgend Aufbringen und Inkubation von 200 µl Streptavidin-Horseradish-Peroxidase für 30 Min, ebenfalls bei Raumtemperatur. Die freien Stellen am Peroxidase-konjugierten Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wird dann mit einem geeigneten Chromogen, in diesem Falle mit DAB-Substratlösung (3´3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid), sichtbar gemacht. Nach Abspülen der Präparate mit Tris-Puffer konnte die DAB-Substratlösung aufgetragen werden. Unter Sicht wurde die Farbentwicklung beobachtet, bei entsprechendem Farbumschlag wurden die überschüssigen DAB-Reste entfernt, die Präparate in Leitungswasser gespült und für 1 Min. in 1 : 6 verdünntem Mayers Hämalaun gegengefärbt. Fixierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und Eindecken des einzelnen Präparates mit Roti-Histokitt.

Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode)

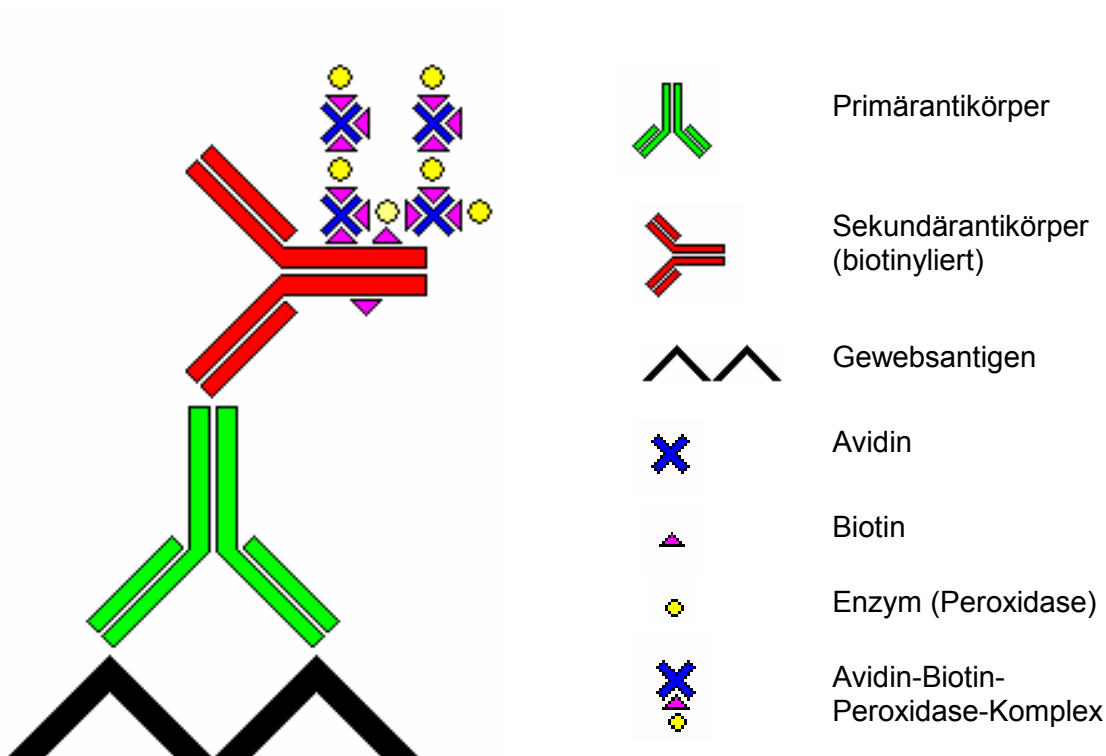


Abbildung 3: Verwendete immunhistochemische Färbemethode (Avidin-Biotin-Methode). Bei dieser Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Nachfolgend bindet der Sekundärantikörper (biotinylierter Antikörper), der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Die freien Stellen am Peroxidase-konjugierten Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen, z. B. DAB-Substratlösung (3'3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid), sichtbar gemacht.

2.9 Die untersuchten Antigene

2.9.1 CD3-Antigen

CD3 ist ein mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiertes Oberflächenantigen auf Thymozyten, peripheren T-Lymphozyten und dendritischen epidermalen T-Zellen. Die CD3-Molekülgruppe besteht aus einer Reihe von wichtigen membranständigen Molekülen, die eng mit dem TCR verknüpft sind (s. Abb.). Nur in Verbindung mit diesen Molekülen

kann eine Signaltransduktion nach Kontakt mit den MHC-Molekülen stattfinden, die dann zur eigentlichen T-Zell-Aktivierung führt (Naper et al., 1995; Aoe und Saito, 1995). Über MHC-Moleküle wird das Antigenpeptid nach Prozessierung der spezifischen T-Zelle präsentiert. Es kommt zur Bildung eines trimolekularen Komplexes zwischen TCR, Antigen und MHC-Molekül. Die eigentliche Signaltransduktion, die über die Aktivierung verschiedener Tyrosinkinase in einer Genaktivierung, (u.a. der Transkription von IL-2) mündet, findet über andere Proteinketten des CD3-Moleküls statt.

2.9.2 CD4-Antigen

CD4-Antigen wird u.a. auf Thymozyten, MHC-Klasse-II assoziierten T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten exprimiert. Das CD4-Molekül hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert (Bierer et al., 1989)

CD4 ist ein Antigen-Corezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, der mit den MHC-Klasse-II Molekülen antigenpräsentierender Zellen interagiert. In Abhängigkeit der Bindung an CD4 in Verbindung mit dem T-Zell-Rezeptorkomplex kommt es zur Signaltransduktion über p56lck Tyrosinkinase zur Aktivierung von T-Zellen.

2.9.3 CD8-Antigen

Die alpha- und beta-Kette des CD8-Antigens bilden ein Heterodimer auf der Oberfläche der meisten Thymozyten, auf MHC-Klasse-I restringierten T-Zellen, einschließlich T-Suppressor- und zytotoxischen T-Zellen.

Das CD8-Molekül besteht aus einer $\alpha\beta$ -, bzw. $\gamma\delta$ -Kette. Das Molekulargewicht einer einzelnen Kette beträgt 33 kD. Die Gene beider Ketten liegen auf Chromosom 2. Viele intestinale, intraepitheliale Lymphozyten, CD8-positive T-Zellen von Ratten ohne Thymus, aktivierte T-Zellen und natürliche Killerzellen exprimieren nur CD8a und nicht CD8b (Torres-Nagel et al., 1992).

CD8 ist ein Antigen-Corezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen, der mit dem MHC-Klasse I-Molekül Antigen-präsentierender Zellen interagiert. Diese Bindung führt in Verbindung mit dem T-Zell-Rezeptorkomplex zur Aktivierung der T-Zellen über Tyrosinkinase zur Aktivierung von T-Zellen.

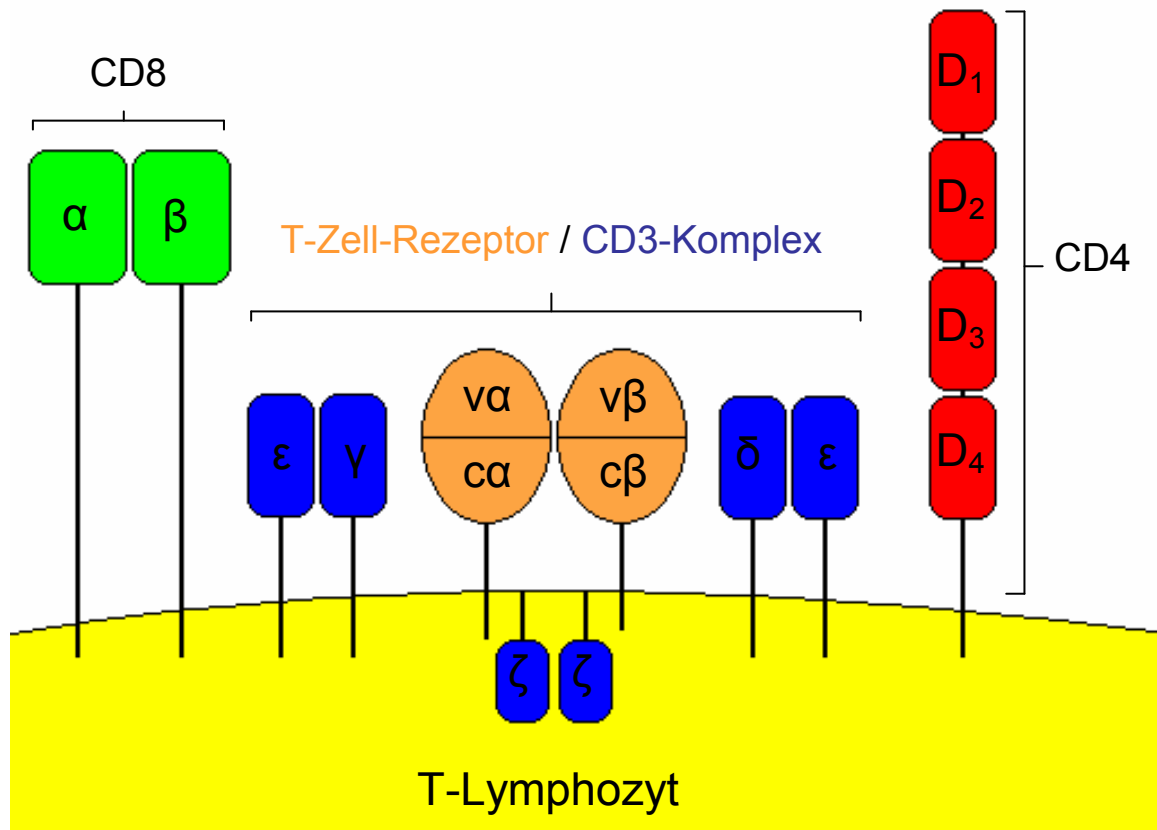


Abbildung 4: Der T-Zell-Rezeptorkomplex.

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und β -Kette, die jeweils eine konstante und variable Region besitzen. Die γ , δ und ϵ Kette werden je nach Differenzierungs- und Reifegrad exprimiert. Sie charakterisieren die T-Zelle näher. CD4 und CD8 sind Oberflächenmoleküle der T-Zell-Subpopulationen, wobei $CD4^+$ T-Lymphozyten T-Helferzellen und $CD8^+$ T-Lymphozyten T-Killerzellen charakterisieren

2.10 Positivkontrolle

Die immunhistochemische Färbung der Positivkontrolle für alle untersuchten Antikörper wurde an Milzgewebe der untersuchten Ratten für alle Primärantikörper einmalig in gleicher Weise durchgeführt und das Ergebnis lichtmikroskopisch beurteilt. Die Milz zählt zu den lymphatischen Organen und weist die verschiedenen Lymphozytenpopulationen in großer Zahl auf.

2.11 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle wurde mit den entsprechenden Kontrollantikörpern für den jeweiligen Primärantikörper an den Präparaten des entsprechenden Rattengehirns während jedes Färbedurchgangs in gleicher Weise durchgeführt und das Färbeergebnis im Vergleich lichtmikroskopisch beurteilt. Jede dabei auftretende Anfärbung ist eher Folge der unspezifischen Proteinbindung, endogener Peroxidaseaktivität oder unspezifischer Bindung durch andere Reagenzien.

2.12 Auswertung

Es wurden Schnittpräparate in die Auswertung einbezogen, die beide Seitenventrikel mit Vorder- und Hinterhorn sowie den Stichkanal zeigten. Die spezielle Immunhistochemie wurde an den Präparaten durchgeführt, bei denen in der HE-Färbung das Entzündungsinfiltrat maximal ausgeprägt war. Diese Gewebsschnitte wurden nachfolgend in die Auswertung einbezogen. Dafür wurde das Mikroskop Axioplan® (Zeiss), Okular Zeiss-Plan-NEOFLUAR® (5x, 10x) verwendet. Stets wurden, getrennt für die rechte, injizierte und die linke, nicht injizierte Hemisphäre die Gefäße, die im Durchmesser $> 20 \mu\text{m}$ waren, registriert. Anschließend wurden alle Gefäße ($> 20 \mu\text{m}$), die perivaskulär Entzündungszellen aufwiesen, gezählt und zu den nicht entzündeten Gefäßen ins Verhältnis gesetzt. Das perivaskuläre Entzündungsinfiltrat wies positiv markierte Zellen der zu untersuchenden T-Lymphozytensubpopulation (CD3, CD4 und CD8) auf. Die Anzahl der Reihen der perivaskulären Infiltrate wurde im Verlauf der Untersuchung erfasst. Darüber hinaus erfolgte die Auszählung aller perivaskulär liegenden Zellen der reaktiven Gefäße sowie die Zählung der entsprechenden CD3+, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten.

Die visuelle Darstellung erfolgte bei 10- und 40facher Vergrößerung mit Hilfe der Mikroskopkamera AxioCam HRc® sowie rechnergestützt am Bildschirm mit der Software Axiovision 3.1®.

Da bei dem Umfang der hier vorliegenden Stichprobengröße ($n < 30$) nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde zum Vergleich der Expression des entsprechenden Antikörpers (CD3, CD4 und CD8) zwischen rechter und linker

Hemisphäre ein nicht parametrisches Testverfahren (Wilcoxon-Test) zur Testung auf Signifikanz verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Weiterhin wurde die Expression des einzelnen Antikörpers (CD3, CD4 und CD8) im zeitlichen Verlauf, getrennt für beide Hemisphären mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz (Signifikanzniveau 5 %) untersucht. Der zeitliche Verlauf der Expression des einzelnen Antikörpers wurde mittels Balkendiagramm grafisch dargestellt. Die Berechnungen erfolgten mit SPSS Version 16, die Diagramme wurden mit Origin Pro Version 6.1 erstellt.

2.12 Fehlerdiskussion

Gefäße mit einem Lumen von $> 20 \mu\text{m}$ wurden in die Auswertung der perivaskulären Entzündungsreaktion einbezogen. Tatsächlich waren Gefäße mit kleineren Lumina nicht sicher vom umgebenden Parenchym abzugrenzen. Nennenswerte Ansammlungen von immunhistochemisch positiv markierten Zellen ohne Nachweis eines zentralen Gefäßlumens sind abgesehen vom Bereich um den Stichkanal nicht beobachtet worden. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die perivaskuläre Entzündungsreaktion im Rahmen der vorliegenden Untersuchung vollständig erfasst wurde.

Immunopositive Zellen können recht exakt gezählt werden, wohingegen die Bestimmung der Anzahl nicht immunopositiver Rundzellen mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Diese Unsicherheit spielt vor allem im Bereich der nicht injizierten linken Hemisphäre eine Rolle, weil hier die Zahl der perivaskulären Rundzellen relativ klein war.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Befunde

Die Analyse der HE-Schnitte ergab ein vorwiegend perivaskulär gelegenes Rundzellinfiltrat um den Stichkanal und im Bereich der rechten Hemisphäre. Die Entzündungsaktivität in der nicht injizierten linken Hemisphäre war im Vergleich zur rechten, injizierten Hirnhälfte signifikant geringer (s. u.). Die Entzündungsaktivität ist vorwiegend durch die Anzahl der perivaskulär liegenden Entzündungszellen charakterisiert (Abb. 7, 8, 9), wohingegen die Zahl der reaktiven Gefäße im Beobachtungszeitraum nur geringfügig zurückging (Abb. 6). Bei den mit SEA-injizierten Tieren war die Entzündungsreaktion um den Injektionskanal und im Bereich der injizierten Hemisphäre 12 h nach Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen am stärksten ausgeprägt und nahm nach drei bzw. fünf Tagen deutlich ab. Im Bereich der linken, nicht injizierten Hemisphäre war eine schwächer ausgeprägte, vorübergehende Entzündungsaktivität mit Maximum drei Tage nach peripher-venöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen fassbar. Bei den Kontrolltieren fanden sich um die NaCl-Injektionsstelle nahezu keine Entzündungszellen (nicht dargestellt). Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen der T-Zell-Antikörper CD3, CD4 und CD8 zeigte eine von CD8⁺ T-Zellen getragene Entzündung. Die Zahl CD8⁺ T-Lymphozyten war größer als die Zahl an CD3⁺- und CD4⁺ T-Lymphozyten. CD3⁺ T-Lymphozyten stellten fast ausschließlich die schwächste T-Zell-Subpopulation dar.

3.2 Anzahl reaktiver Gefäße und Ausprägung des Entzündungs-infiltrates im zeitlichen Verlauf

Die Gesamtzahl an Blutgefäßen mit einem Lumen > 20 µm lag zwischen 26 und 34. Lediglich im Bereich der linken, nicht injizierten Hemisphäre lag die Zahl am 5. Tag nach i.v.-Injektion der Milzzellen darunter. Die Zahl der reaktiven Blutgefäße, d. h. die Gefäße mit einem immunhistochemisch darstellbaren perivaskulären Rundzellinfiltrat lag zum ersten Beobachtungszeitpunkt (0,5 Tage nach der i.v.-Injektion) bei etwa der Hälfte der Gefäße, und zwar sowohl in der injizierten rechten Hemisphäre als auch in der nicht

injizierten linken Hemisphäre. – Der Anteil der reaktiven Blutgefäße nahm bis zum 5. Tag nach i.v.-Injektion geringfügig ab (Abb. 5).

Das Entzündungsinfiltrat zeigte im Bereich der rechten injizierten Hemisphäre an Tag ½ nach peripher-venöser Injektion von ConA-aktivierten T-Lymphozyten vier bis fünf Zell-Lagen und verschmälerte sich auf etwa eine Lage an Tag fünf. Linksseitig war das Entzündungsinfiltrat generell schwächer ausgeprägt (0 - 1 Lagen an Tag ½ und fünf mit maximaler Entzündungsaktivität an Tag drei (zwei Lagen).

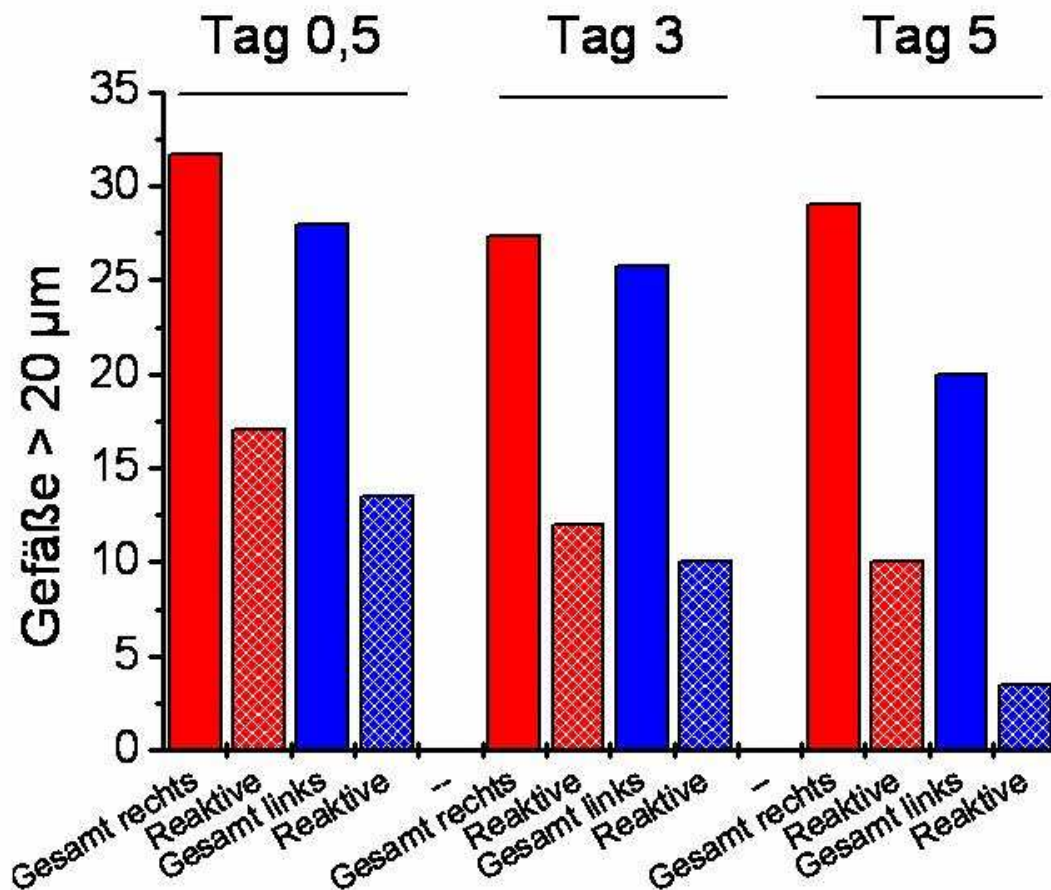


Abbildung 5: Anzahl der Reaktiven Gefäße und Gesamtzahl aller Gefäße > 20 µm im Vergleich beider Hemisphären im Zeitverlauf, nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) und nachfolgender (nach 3 Tagen) intravenöser Injektion ConA-aktivierter Milzzellen. Dargestellt ist die Gesamtzahl der Gefäße (Mittelwert aus den Absolutzahlen der einzelnen Gewebspräparate zum dargestellten Zeitpunkt) der rechten, injizierten Hemisphäre (roter Balken) und der linken, nicht injizierten Hemisphäre (blauer Balken). Die Anzahl der reaktiven Gefäße (Mittelwert aus den Absolutzahlen der reaktiven Gefäße aus allen Präparaten (CD3+, CD4+, CD8+)) ist als rot gemusterter Balken (rechte, injizierte Hemisphäre) und blau gemusterter Balken (linke, nichtinjizierte Hemisphäre) abgebildet.

3.3 Beurteilung der Anzahl von CD3+, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf

Das perivaskuläre Entzündungsinfiltrat wies CD3+, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in unterschiedlichen Anteilen auf. Die Zahl der Entzündungszellen im Bereich der rechten, injizierten Hemisphäre und um den Stichkanal war ½ Tage post injectionem ConA-aktivierter T-Lymphozyten am höchsten und fiel im weiteren Verlauf ab.

Rechte, injizierte Hirnhälfte:

CD3: An Tag ½ nach peripher venöser Injektion von aktivierten T-Lymphozyten waren ca. 18 % der Entzündungszellen an den entzündeten Gefäßen CD3+; die Zahl fiel auf jeweils ca. 10 % an Tag drei und fünf.

CD4: Der Anteil CD4+ T-Lymphozyten ½ Tage nach peripher-venöser Injektion ConA-aktivierter T-Lymphozyten lag unter 10 %. An Tag drei nach peripher-venöser Injektion ConA-aktivierter T-Lymphozyten stieg die Zahl CD4+ T-Lymphozyten auf knapp 20 % und fiel an Tag fünf unter 10 % ab. An Tag drei stieg der Anteil CD4+ T-Lymphozyten im Vergleich zu CD3+ und CD8+ T-Zellen an und lag über dem Anteil von CD3+ T-Lymphozyten.

CD8: Vergleicht man die T-Lymphozytensubpopulationen, zeigte sich eine von CD8+ T-Zellen dominierte Entzündung zu allen Untersuchungszeitpunkten. 65 % der Entzündungszellen waren an Tag 0,5 nach peripher venöser Injektion von ConA-aktivierten T-Lymphozyten CD8+ und fielen an Tag drei nach peripher venöser Injektion von ConA-aktivierten T-Lymphozyten auf ca. 25 % und stieg an Tag fünf auf 40 % an.

In der rechten Hemisphäre änderte sich im Verlauf der 3 Messzeitpunkte die Zahl der CD8+ T-Zellen signifikant ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Die Anzahl der CD3+ und CD4+ markierten T-Zellen änderte sich dem gegenüber nicht signifikant.

Linke, nicht injizierte Hirnhälfte:

Die Entzündungsaktivität im Bereich der linken, nicht injizierten Hemisphäre war zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test) geringer ausgeprägt als im Bereich der injizierten rechten Hemisphäre. Das Maximum der Entzündungsaktivität lag zeitlich versetzt an Tag drei nach peripher venöser Injektion von ConA-aktivierten T-Lymphozyten.

Jeweils 5 - 10 % der Entzündungszellen waren am ersten Untersuchungstag CD3+, CD4+ und CD8+. An Tag drei nach peripher venöser Injektion von ConA-aktivierten T-Lymphozyten zeigten sich unter 10 % CD3+ T-Lymphozyten, 35 % CD4+ T-Lymphozyten und 40 % CD8+ T-Lymphozyten. Ebenso wie im Bereich der rechten Hemisphäre lag zu diesem Zeitpunkt die Zahl der CD4+ T-Zellen über der Anzahl an CD3+ T-Lymphozyten.

An Tag fünf nach peripher venöser Injektion von ConA-aktivierten T-Lymphozyten, bzw. acht Tage nach intrazerebraler Superantigeninjektion, waren jeweils um bzw. unter 5 % T-Lymphozyten CD3+, CD4+ und CD8+. Während für die Anzahl an CD3+ und CD4+ T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte, unterschied sich die Zahl an CD8+ T-Lymphozyten signifikant an den drei Untersuchungszeitpunkten ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test).

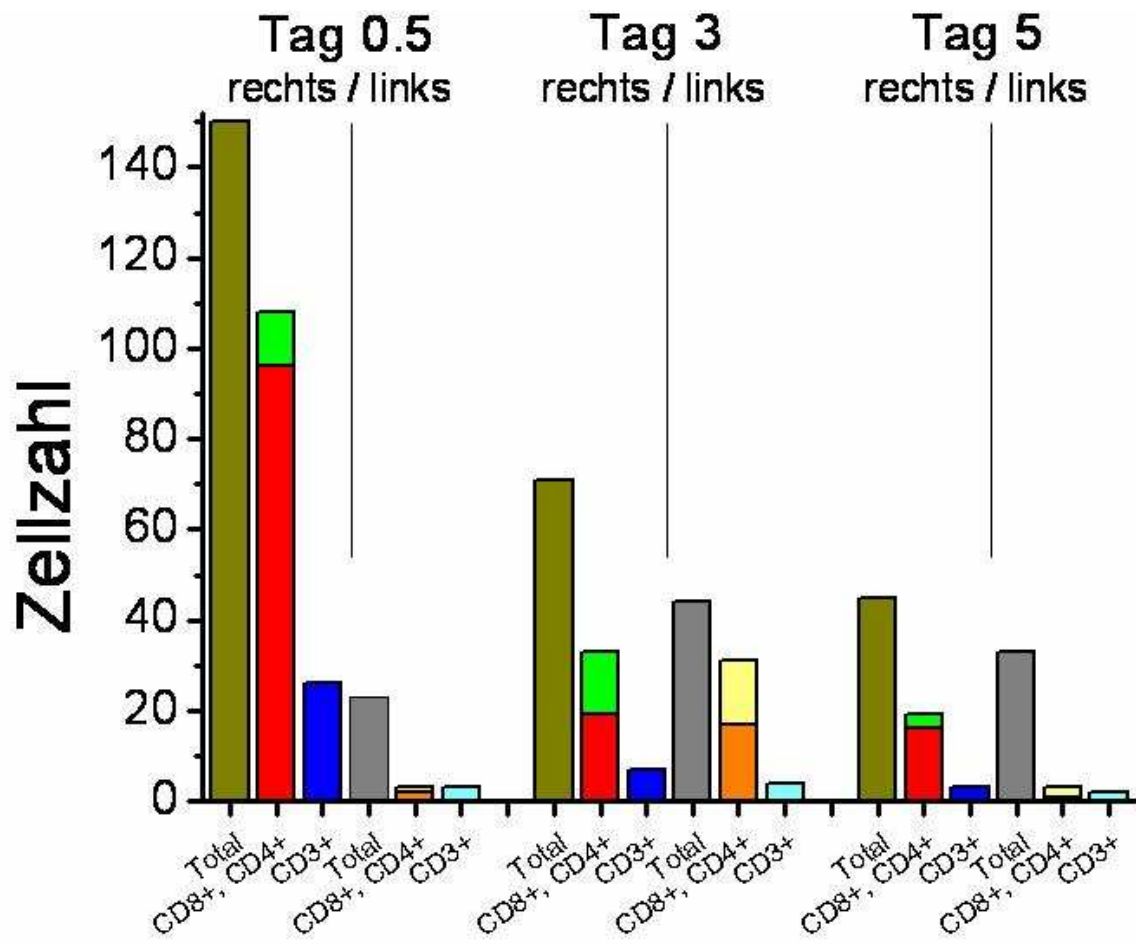


Abbildung 6: Perivaskuläre Entzündungszellpopulationen nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) und nachfolgender (nach 3 Tagen) intravenöser Injektion ConA-aktivierter Milzzellen im Zeitverlauf. Die Entnahme der Gehirne erfolgte am Tag ½, 3 und 5 nach intravenöser Injektion ConA-aktivierter Milzzellen bzw. 3½, 6 und 8 Tage nach intrazerebraler Injektion von SEA. Zellzahlen der perivaskulären Rundzellinfiltrate der rechten Hemisphäre („rechts“) olivgrün, die der linken Hemisphäre („links“) grau. Die Stapelsäulen beinhalten die Zellzahlen für CD8+ T-Zellen (unten, rechte Hemisphäre: rot, linke Hemisphäre: orange) und CD4+ T-Zellen (oben, rechte Hemisphäre: grün, linke Hemisphäre: hellgelb). Die Zellzahlen für CD3+ T-Zellen der rechten Hemisphäre werden in blau, die der linken Hemisphäre in hellblau dargestellt.

CD 3

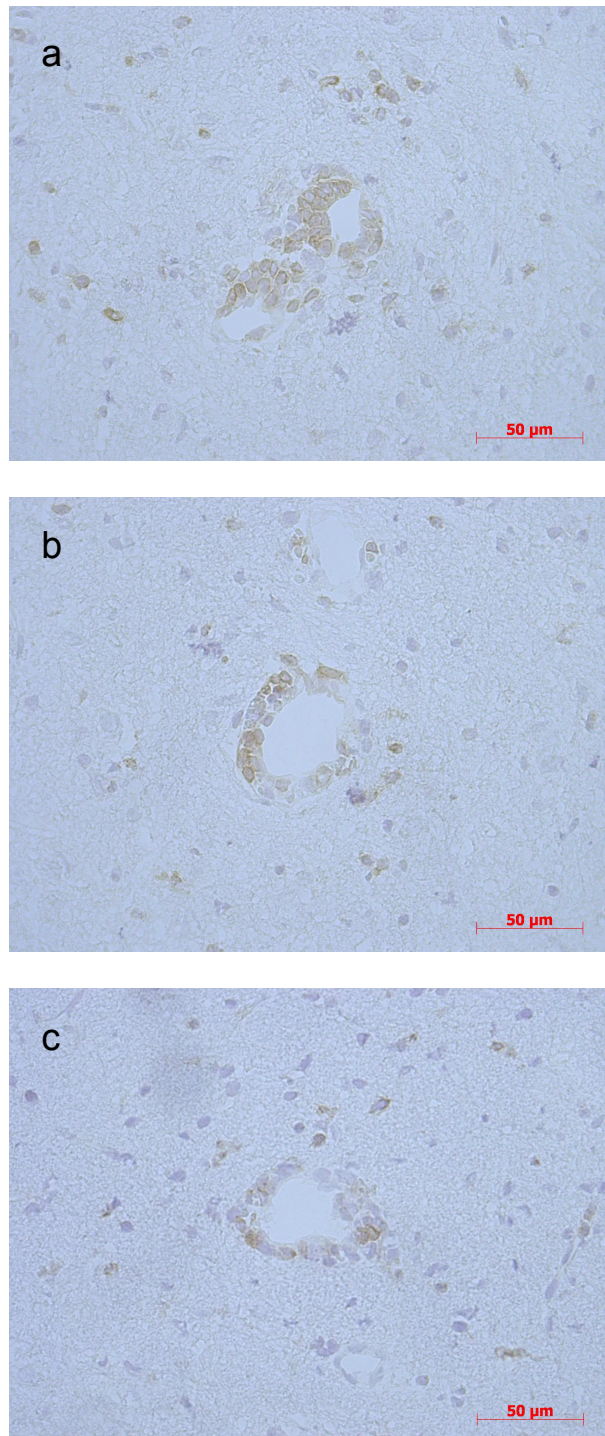


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD3-Antigen (braune Anfärbung der Immunzellen). Dargestellt ist der Zeitverlauf, a) Tag $\frac{1}{2}$ b) Tag drei und c) Tag fünf nach intravenöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen.

CD 4

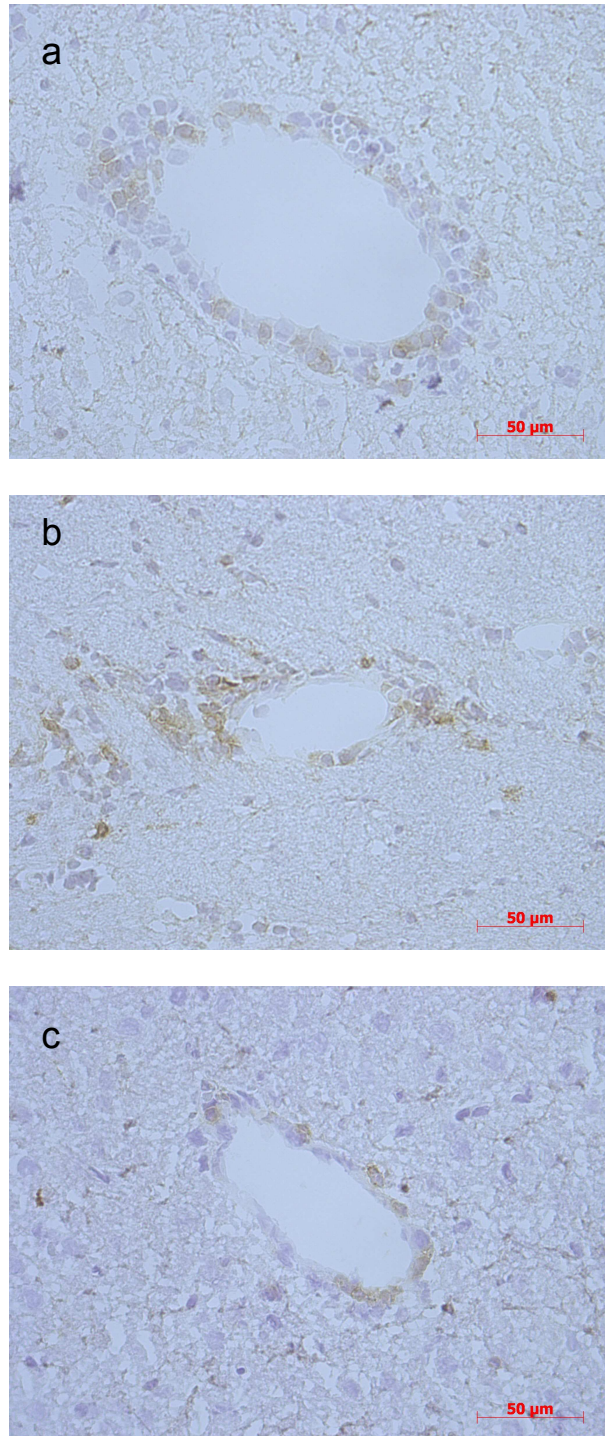


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD4-Antigen (braune Anfärbung der Immunzellen). Dargestellt ist der Zeitverlauf, a) Tag $\frac{1}{2}$, b) Tag drei und c) Tag fünf nach intravenöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen.

CD 8

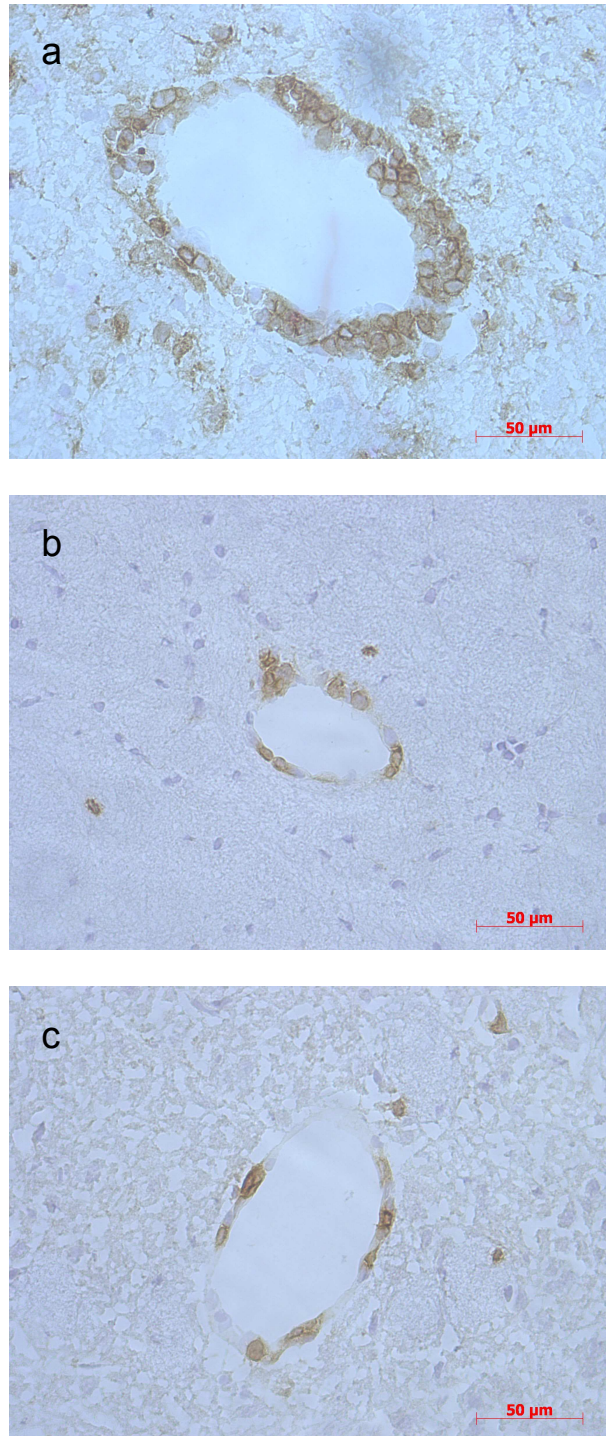


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen. Verwendet wurde der Antikörper gegen das CD8-Antigen (braune Anfärbung der Immunzellen). Dargestellt ist der Zeitverlauf, a) Tag $\frac{1}{2}$ b) Tag drei und c) Tag fünf nach intravenöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen.

3.4 Vergleich der Methoden und Befunde der Superantigenenzephalitis von Ganz et al., 2003 und der vorliegenden Studie

Tabelle 1: Vergleich der Befunde der Superantigenenzephalitis von Ganz et al., 2003 und der vorliegenden Untersuchungsergebnisse

	Superantigenenzephalitis (Ganz, 2003)	Superantigenenzephalitis (vorliegende Untersuchung)
<i>Konzentration des Superantigens SEA</i>	Maximale Entzündung bei 50 µl (1 mg/ml)	50 µl (1 mg/ml)
<i>Anzahl i.v. injizierter ConA-aktivierter Milzzellen</i>	5 x 10 ⁶ aktivierte Milzzellen, ConA 2,5 µg/ml	1,5 x 10 ⁶ aktivierte Milzzellen ConA 2,5 µg/ml
<i>Ort der Superantigeninjektion</i>	1 mm hinter dem Bregma, 1,5 - 2 mm rechts lateral der Mittellinie, Injektion des SEA in 3,5 mm Tiefe	1 mm hinter dem Bregma, 1,5 - 2 mm rechts lateral der Mittellinie, Injektion des SEA in 3,5 mm Tiefe
<i>Zeitpunkt der Entnahme der Gehirne</i>	Tag 1 - 4, 7, 8, 14, 18 nach peripher-venöser Injektion der Milzzellen (ConA aktiviert)	Tag ½, 3, 5 nach peripher-venöser Injektion der Milzzellen (ConA aktiviert)
<i>Färbetechniken</i>	HE-Übersicht	HE-Übersicht, CD3, CD4, CD8 nach der Avidin-Biotin-Methode
<i>Lokalisation des Entzündungsinfiltrates</i>	Periventriculär in der weißen Substanz und im Corpus callosum, mehrere Lagen mononukleärer Rundzellinfiltrate im Bereich der rechten Hemisphäre und des Stichkanals, linke Hemisphäre nur an den Tagen 1 - 3 in unbedeutender Weise betroffen	Perivaskulär rechts-hemisphäriell und im Bereich des Stichkanalbereich, linke Hemisphäre geringer betroffen
<i>Zeitpunkt der maximalen Entzündung (+ ConA)</i>	Tag 3-4 nach Injektion der ConA-aktivierten Milzzellen	Tag ½ nach Injektion der ConA-aktivierten Milzzellen rechts hemisphäriell, links an Tag drei
<i>Zeitpunkt Ende der selbstlimitierenden Entzündung</i>	14 Tage nach SEA Injektion, bzw. 11 Tage nach peripherer i.v. Injektion der Milzzellen	

4. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich nach intrazerebraler Injektion des Superantigens SEA in das Gehirn der Lewis-Ratte eine perivaskuläre Entzündungsreaktion, die auf der Injektionsseite deutlich und signifikant stärker ausgeprägt war als in der kontralateralen Hemisphäre. Diese Entzündungsreaktion wies in der rechten Hemisphäre zum ersten Untersuchungszeitpunkt, d. h. $\frac{1}{2}$ Tage nach i.v.-Injektion der ConA-aktivierten Milzzellen ein Maximum auf und nahm über die folgenden Tage drei und fünf signifikant ab. In der kontralateralen Hemisphäre zeigte sich lediglich eine schwache Entzündungsreaktion mit Maximum am dritten Tag. Die Ergebnisse bestätigen zuvor mitgeteilte Beobachtungen (Kornhuber et al., 2002; Ganz 2003), die allerdings lediglich mit HE-Färbungen errungen wurden. In der vorliegenden Untersuchung war die zerebrale Entzündung wie von Ganz (2003) beschrieben durch i. v. Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen verstärkt worden.

Es stellt sich die Frage, welche Immunzellen am Entzündungsinfiltrat nach zerebraler Superantigenexpression beteiligt sind. Tatsächlich zeigten die in der vorliegenden Arbeit unternommenen immunhistochemischen Untersuchungen, dass die Mehrzahl der an der Entzündung beteiligten Immunzellen T-Lymphozyten sind, und zwar überwiegend CD8+ T-Lymphozyten. Die Zahl der CD4+ T-Lymphozyten macht zu Beginn, also am Tag $\frac{1}{2}$ nach i.v.-Injektion der Milzzellen lediglich einen geringen Anteil am Entzündungsinfiltrat aus (Abb. 6, Abb. 8).

Wie führt die lokale Expression des Superantigens SEA zur beobachteten Entzündung mit Vorherrschen von CD8+ T-Lymphozyten?

4.1 Pathophysiologie der Superantigenenzephalitis

Das intrazerebral injizierte Superantigen SEA wird vermutlich unmittelbar, ohne vorherige Prozessierung, an MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II) gebunden (Torres et al., 2001). MHC-II wird intrazerebral konstitutiv auf perivaskulären Zellen, Mikroglia und dendritischen Zellen exprimiert (Bergsteinsdottir et al., 1998; Stoll et al., 2002; Sedgwick et al., 1998). Prinzipiell wäre es möglich, dass SEA zusätzlich an MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I) gebunden wird (Chapes et al., 1998, Wright and Chapes, 1999, Sedgwick et al., 1991). Allerdings wird MHC-I nicht konstitutiv im zentralen Nervensystem exprimiert, (Sedgwick et al., 1993, Redwine et al., 2001), sodass eine Bindung von SEA an MHC-I zu Beginn der Enzephalitis kaum eine Rolle spielen dürfte.

Aktivierete T-Lymphozyten sind in der Lage, aktiv die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden (Wekerle et al., 1986, Hickey, 1991). Die drei Tage nach SEA-Injektion peripher-venös injizierten ConA-aktivierten Milzzellen können demzufolge die BHS aktiv überwinden. Es liegt nahe, dass die ConA-aktivierten Milzzellen nach ihrer aktiven Migration durch die Blut-Hirn-Schranke das an MHC-Klasse-II-Moleküle gebundene SEA erkennen und über die Immunsynapsenbildung weitere kostimulatorische Signale erhalten, die eine intrazerebrale Immunreaktion initiieren.

Die Bindung von SEA an MHC-II auf Monozyten kann per se Effekte verursachen wie etwa die vermehrte Expression von Toll-like-Rezeptoren (Hopkins et al., 2005). Allerdings sind solche Effekte auf antigenpräsentierenden Zellen und insbesondere Mikrogliazellen unzureichend untersucht. Es ist immerhin denkbar, dass solche direkten Effekte des injizierten Superantigens auf antigenpräsentierende Zellen die Immunzellmigration erleichtert oder die nachfolgende Entzündungsreaktion fördert. Einen halben Tag nach i.v. Beladung der Blutbahn mit aktivierten Milzzellen wurden signifikant mehr Immunzellen auf der Seite der intrazerebralen Injektion beobachtet als in der nicht injizierten Hemisphäre. Da im Vergleich zur Kontrollgruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten die perivaskuläre Entzündung sowohl im Stichkanal als auch im Bereich der rechten Hemisphäre deutlich stärker war, lassen sich die Beobachtungen an Tag $\frac{1}{2}$ nicht ausschließlich mit einer unspezifischen Entzündungsreaktion auf das Gewebetrauma durch die Injektion von Superantigen erklären. Schon am Tag $\frac{1}{2}$ nach

peripher-venöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen findet sich ein von T-Lymphozyten geprägtes Entzündungsinfiltrat. Dass die Gewebetraumatisierung an sich einen so großen Effekt auf die T-Zellinfiltration hat, ist nicht anzunehmen. In Übereinstimmung mit dieser Einschätzung wurde in einer zurückliegenden Studie lediglich eine ganz geringe und im Vergleich zur Superantigeninjektion viel kürzere Immunzellreaktion nach intrazerebraler Injektion des Lösungsmittels beobachtet (Kornhuber et al., 2002, Ganz, 2003). Ebenfalls zeigte sich in der vorliegenden Studie bei den Kontrollgehirnen (intrazerebrale Injektion von physiologischer Kochsalzlösung und nach 3 Tagen i.v.-Injektion aktivierter Milzzellen) ebenfalls eine sehr geringe und kurzzeitige Immunzellreaktion.

Das intrazerebral injizierte SEA tritt in Kontakt mit MHC-Klasse-II tragenden Zellen des ZNS (s. o.) und kann so den aktiv eingewanderten Immunzellen präsentiert werden. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass initial vorwiegend eine CD8⁺ T-Zell-Subpopulation im ZNS vorliegt. Die Frage ist nun, ob (1) lediglich CD8⁺ T-Zellen aktiv die Blut-Hirnschranke überwinden, (2) ob unter den ConA-stimulierten Milzzellen CD8⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺ T-Zellen überwiegen oder ob (3) CD8⁺ T-Zellen bevorzugt über SEA in Kombination mit MHC-Klasse-II stimuliert werden. Für eine bevorzugte Migration von CD8⁺ T-Zellen in das Gehirn gibt es keine Hinweise (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991). Daten, die eine bevorzugte Migration von CD8⁺ T-Lymphozyten ins ZNS beschreiben, sind rar und beziehen sich nur auf gesundes Rückenmark, wobei sich CD8⁺ T-Zellen vorwiegend in der grauen Substanz ansammeln (Bradl et al., 2005). Somit ist die beobachtete Dominanz von CD8⁺ T-Zellen eher als spezifische Immunantwort auf SEA zu sehen und nicht als Besonderheit der aktiven Migration von Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke.

Obwohl einzelne Arbeiten eine bevorzugte Stimulation bestimmter V β -Rezeptor-tragender CD8⁺ T-Zellen durch ConA beschreiben (Jason and Inge, 1996; Kato et al., 2007), scheint ConA doch insgesamt eine nicht selektive T-Zell-Stimulation zu bewirken. Allerdings spielen neben der Aktivierung der T-Zellen durch ConA auch andere verschiedene Zytokine eine Rolle, die die Proliferation der T-Zell-Subpopulationen beeinflussen. In Proliferation befindliche T-Lymphozyten exprimieren den IL-2-Rezeptor, durch Zugabe von IL-2 ändert sich das Proliferationsverhalten zugunsten der CD8⁺ T-Zellen (Kato et al., 2007). Da in den vorliegenden Untersuchungen nur ConA

zur Milzzellstimulation verwendet wurde, scheint eine bevorzugte Proliferation von CD8⁺ T-Zellen eher unwahrscheinlich zu sein. Somit kann vermutet werden, dass initial CD8⁺ T-Zellen bevorzugt über SEA im ZNS stimuliert werden und dass deren Anteil aus diesem Grund überwiegt. Für diese Annahme spricht ein weiterer Befund (das Vorkommen von CD8⁺/CD3⁻ T-Zellen), der unten ausgeführt wird. Offensichtlich erkennen CD8⁺ T-Zellen das auf MHC-II gebundene SEA. Die Bildung des trimolekularen Komplexes aus T-Zell-Rezeptor (TCR), SEA und MHC-II führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α , über die u.a. T-Zellen zur Proliferation angeregt werden (Torres et al. 2001; Chang et al., 2005). Dabei ist die Zusammensetzung des trimolekularen Komplexes für die Intensität und Quantität der Immunantwort entscheidend (Fleischer et al., 1991). Die Aktivierung der T-Zelle durch Kopplung über den TCR Komplex an das an dem MHC-Molekül gebundene Superantigen löst eine Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen aus. Dabei nimmt die Produktion von IL-2 und die Expression des IL-2-Rezeptors auf der Oberfläche (Smith, 2004) eine Schlüsselstellung der stimulatorischen Elemente ein.

Die Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor führt initial zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumionen-Konzentration, die eine rezeptorassoziierte Proteinkinase anregt, über die wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren angeregt werden (Jain et al., 1995; Minami et al., 1993). Darüber wird auch der bedeutende Transkriptionsfaktor Protoonkogen c-myc aktiviert, der für den Übergang der G1- in die S-Phase notwendig ist und verstärkt exprimiert wird (Reed et al., 1985). Die Folge ist eine erhöhte Proliferation von T-Lymphozyten.

Die SEA-vermittelte Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen führt vermutlich zu einer massiven Freisetzung von TNF- α , IL-2, IL-6 und IFN- γ im Gehirn und somit zur Entzündungsaktivität (Cameron et al., 2001).

IFN- γ ist ebenso wie IL-2 ein wichtiges T-Zell-Produkt mit starken proinflammatorischen Wirkungen (Stout and Bottomly, 1993). IFN- γ steigert in den meisten Zellen die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und induziert die Bildung von MHC-Klasse-II-Molekülen. Das bedeutet, dass über die Freisetzung von IFN- γ die Expression neuer MHC-II-Moleküle auf den entsprechenden APC induziert wird, wodurch auch eine weitere Stimulation von T-Lymphozyten möglich ist.

TNF- α ist ein Polypeptid, das vorwiegend von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten gebildet wird. Es bewirkt eine gesteigerte Phagozytoseaktivität und ist wesentlicher Bestandteil der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität gegen Mikroorganismen, Parasiten und Tumorzellen. Es stellt zusammen mit IL-1 das Auslösesignal der Interferon-induzierten Makrophagenaktivierung dar, wirkt mit IL-1 auf Endothelzellen, Granulozyten und Lymphozyten und führt so zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch eine Anlagerung von Granulozyten an die Gefäßwand möglich ist. Folge ist eine erhöhte Gefäßpermeabilität, die die Migration von Entzündungszellen in das geschädigte Gewebe ermöglicht. (Carlsen und Prydz, 1988).

Die Freisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine bestimmen Ablauf und Ausprägung der Superantigenenzephalitis. Schließlich führt die SEA-Präsentation über MHC-II zu einer erneuten Stimulierung der aktiv immigrierten Milzzellen. In der Folge unterhalten die so aktivierten Zellen die intrazerebrale Entzündungsreaktion. Möglicherweise führt die Präsentation des SEA über MHC-Klasse-II-Moleküle auf CD8+ T-Zellen noch zu einer Expression weiterer Aktivierungsmoleküle, wie schon bei SEC (Staphylokokkenenterotoxin C) beschrieben (Ferens et al., 1998). ACT3 (Activation molecule 3), das auf CD4+ - und CD8+ T-Zellen nach Stimulierung mit SEC verstärkt exprimiert wird, führt z. B. zu einer stärkeren CD8+ T-Zell-Antwort, während die Zahl positiver CD4+ T-Zellen sinkt (Ferens et al., 1998).

Die Analyse der T-Lymphozytensubpopulationen (CD3+/-, CD4+/- und CD8+ T-Lymphozyten) in der vorliegenden Untersuchung ergab, dass die Mehrzahl der ins Gehirn immigrierten Zellen CD8+ war. Wie bereits diskutiert, ist die CD8+ T-Zell-Aktivierung am ehesten spezifische Folge einer Stimulierung durch antigenpräsentierende Zellen im ZNS, da ConA, das zur Aktivierung der in die Blutbahn injizierten Milzzellen verwendet wurde eher ein nicht selektiver T-Zell-Aktivator ist und auch die Migration und Passage peripher aktivierter T-Zellen unspezifisch ist. Man könnte also davon ausgehen, dass besonders CD8+ Zellen mit dem über MHC-II gebundenen SEA in Kontakt treten. Es gibt in der Literatur Hinweise, dass auch eine Interaktion zwischen CD8-Molekülen, MHC-II und Superantigen möglich ist (Müller-Alouf et al., 2001). Eine Aktivierung, insbesondere von CD8+ T-Zellen ist durchaus vorstellbar, da das unprozessierte Superantigen, in diesem Fall SEA, zwar über MHC-II-Moleküle

präsentiert wird, die Immunantwort aber nicht MHC-II gebunden ist (Janeway und Matz, 1985). Weiterhin ist vorstellbar, dass an MHC-Klasse-II gebundenes SEA neben CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen auch CD8+ $\gamma\delta$ Zellen aktiviert (Stinissen et al., 1995). Auch eine direkte Aktivierung der CD8+ T-Zellen durch Superantigene, also ohne Bindung von SEA an MHC-Klasse-II wird für möglich gehalten (Herrmann et al., 1990). Diese direkte CD8+ T-Zell-SEA-Interaktion wäre aufgrund der mutmaßlichen Abwesenheit von freiem SEA zum Zeitpunkt der Injektion ConA-aktivierter Milzzellen drei Tage nach intrazerebraler Injektion von Superantigenen aber eher unwahrscheinlich. In den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine von CD8+ T-Zellen dominierte Entzündung zu allen Untersuchungszeitpunkten bei im Verlauf regredierender Entzündungsaktivität. Dazu passend werden Gene, die für CD8 kodieren, bei der Superantigenenzephalitis vermehrt exprimiert (Emmer et al., 2008).

Die Ergebnisse des Einflusses von SEA auf die Verteilung der Immunzellen im Gehirn der Lewis Ratte decken sich auch mit der erhöhten Expression von MHC-Klasse-II regulatorischen Genen (Emmer et al., 2008).

Die Anzahl von CD3+ T-Zellen lag nur an Tag ½ über der Expression von CD4. Zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten war die Anzahl CD3+ T-Lymphozyten geringer als die Anzahl CD4+- und CD8+ T-Lymphozyten. Dieses, auf den ersten Blick erstaunliche Phänomen ist möglicherweise Folge einer SEA-spezifischen Wirkung. Normalerweise findet sich auf allen reifen T-Lymphozyten CD3. Der einzelne T-Lymphozyt wird u. a. durch die Expression von CD4 und CD8 weiter charakterisiert. Der CD3-Komplex ist ein wesentlicher Bestandteil des TCR, über dessen als Heterodimer vorliegende $\alpha\beta$ -Kette letztendlich die Antigenerkennung abläuft, während der Komplex der anderen vier Proteinketten des CD3-Komplexes für die Expression der Antigenbindungsketten und die weitere Signaltransduktion verantwortlich ist (Gobel und Bolliger, 2000; Malisen et al., 1999). In der Literatur wurde beschrieben, dass Superantigene in der Lage sind, die Expression von CD3 herunter zu regulieren (Damle et al., 1993), während die Expression von CD4 und CD8 unverändert bleibt (Makida et al., 1996; Alcover et al. 2000). Dieses Phänomen scheint allerdings konzentrationsabhängig zu sein, da in der Literatur auch beschrieben wurde, dass eine hohe Konzentration an Superantigenen zur Herunterregulation des TCR, CD4 und CD8 oder zur Anergie der T-Zelle führen (Alcover et al., 2000, Miethke et al. 1994 Miethke et al., 1995). Möglicherweise liegt die Konzentration an verwendetem SEA in der hier vorliegenden Untersuchung in einem Bereich, die die

Expression an CD4 und CD8 nicht verändert, während die Expression von CD3 herunterreguliert wird. Interessant ist, dass die Herunterregulation des TCR durch eine direkte Interaktion des TCR und SEB stattzufinden scheint (Niedergang et al., 1995). Auch hier scheint dieser Prozess zum einen von der Konzentration des Superantigens abhängig zu sein, zum anderen ist dieser Effekt auch ohne Anwesenheit von MHC-Molekülen zu beobachten. Es wird postuliert, dass die Bindung zwischen TCR und SEB zwar so stabil ist, dass es zu einer Herunterregulation der TCR kommt, eine Endozytose des SEB-TCR-Komplexes durch dessen schnelle Dissoziation hingegen nicht möglich ist. Wieder freigesetztes SEB wäre also erneut in der Lage an einem anderen TCR zu binden, so dass eine Vielzahl von T-Lymphozyten durch Superantigenbindung aktiviert werden kann (Niedergang et al., 1995). Eventuell sind die Bindungskräfte zwischen TCR und SEA so instabil, dass es in der vorliegenden Untersuchung zu einer Herunterregulation von CD3 kommt und dieser SEA-TCR-Komplex auch endozytiert wird. Dafür würde eine, im Vergleich zu den Untersuchungen von (Ganz et al., 2003) an Tag fünf gering ausgeprägte Entzündungsaktivität sprechen. Ein weiterer Effekt der TCR-Superantigen-Bindung könnte auch eine posttranslationalen Modifikation der CD3-Ketten sein, die zu einer Veränderung der Immunantwort im Sinne einer Änderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine oder Induktion einer Apoptose führt (Niedergang et al., 1995). Die getrennte Interaktion zwischen Superantigen und TCR und Superantigen und MHC-Molekül könnte eine gewisse Unabhängigkeit der einzelnen Rezeptoren wahren, so dass immer nur ein Teil der Immunantwort verändert wird. Weiterhin ist es vorstellbar, dass die Bindung zwischen Superantigen und TCR neben einer Herunterregulation des TCR auch zu einer Veränderung der Recycling- und Abbauewege des intrazellulär in Lysosomen befindlichen TCR führt (van Essen et al., 2004) und so die Exozytose neu gebildeten TCR beeinflusst.

Eine Herunterregulation des TCR erfolgt auch konsekutiv (van Essen et al., 2004). Die Rate an internalisiertem bzw. abgebautem TCR bei stimulierten T-Lymphozyten kann sich aber unter bestimmten Bedingungen erhöhen. Interessanterweise werden alle Proteinketten des TCR in gleicher Weise internalisiert und durch Endozytose in die Lysosomen aufgenommen und abgebaut. Dieser Aspekt allerdings scheint nur gering zu sein und erklärt die im Vergleich zu CD4 und CD8 geringe Expression von CD3 nicht. Da allerdings die Genexpression für CD3 (Emmer et al., 2008) eine im Vergleich zu CD8 exprimierten Genen geringere Erhöhung aufwies, scheint der Effekt einer verminderten

CD3 Expression auf T-Zellen doch nicht ausschließlich mit einer spezifischen SEA-Wirkung erklärbar zu sein.

Möglicherweise führt die gewählte Konzentration von SEA zu einer Herunterregulation des TCR, so dass der hier verwendete CD3-Antikörper keinen Bindungspartner zur Verfügung hatte. Auch eine Internalisierung als möglicher kompensatorischer Adaptionsmechanismus ist vorstellbar, um die Immunreaktion begrenzt zu halten. Ferner ist vorstellbar, dass die Bindungsstelle des CD3 Antikörpers durch SEA an Tag ½ partiell durch gebundenes Superantigen besetzt ist. Das erscheint aber unwahrscheinlich, da die Bindung SAg-TCR zwar, wie oben beschrieben zu einer Internalisierung des TCR führt, dabei aber nur Bestandteile des TCR und nicht des Superantigens intrazellulär nachgewiesen werden konnten und die Bindung zwischen Superantigen und TCR nicht so stabil ist bzw. das Superantigen schnell wieder vom TCR dissoziiert (Niedergang et al., 1995). Möglicherweise führt auch ein Missverhältnis zwischen Exo- und Endozytose des TCR, bzw. CD3 im zeitlichen Verlauf primär zu einem Überwiegen der Endozytose von CD3 zu einer geringen Anfärbung von CD3, mit zunehmendem Abbau des SEA, bzw. einer verminderten Bindungskapazität des SEA an den TCR wird CD3 vermehrt exozytiert. Dies erscheint aber eher unwahrscheinlich, da CD3+ T-Lymphozyten im Laufe der Untersuchung eher abfallen.

Die Anzahl CD4+ markierter T-Lymphozyten liegt zu allen Untersuchungszeitpunkten unterhalb der Zahl der CD8+ T-Zellen. Die Anzahl dieser CD4+ T-Zellen steigt zum Untersuchungszeitpunkt an Tag drei leicht an, um dann wieder abzufallen. Ein Grund dafür könnte die Eigenschaft von Superantigenen (einschließlich SEA) sein, Apoptose in T-Zellen zu induzieren, unabhängig von der Präsenz MHC-II positiver Antigen-präsentierender Zellen (Kabelitz und Wesselborg, 1992; Damle et al., 1993). Möglicherweise geschieht dies über eine Interaktion über CD11a und CD18 (Damle et al., 1993). Die Migration der einzelnen Lymphozytensubpopulationen ist von der Expression verschiedener vaskulärer und zellulärer Adhäsionsmoleküle und Zytokine abhängig. Nach Phagozytose oder anderweitiger Elimination des intrazerebral injizierten Superantigens SEA fehlt der Stimulus für die T-Zellen, weiter zu proliferieren bzw. im ZNS zu verweilen. Fehlt den T-Lymphozyten der spezifische Reiz, weitere Entzündungszellen zu rekrutieren, besteht die Möglichkeit, über die BHS in die Blutbahn zu migrieren und das ZNS zu verlassen, im ZNS zu verbleiben oder in Apoptose zu gehen.

Nach erfolgreicher Immunantwort werden verschiedene antiinflammatorische Zytokine, wie Coeruloplasmin, alpha-2 Makroglobulin u. a. von Makrophagen und Mikrogliazellen sezerniert (Stoll, 2004). Somit wird eine weitere T-Zell-Proliferation gestoppt. Dementsprechend sind Gene für diese Peptide oder Proteine acht Tage nach SEA-Injektion, bzw. fünf Tage nach peripher venöser Injektion von Milzzellen vermehrt exprimiert gefunden worden (Emmer et al., 2008).

4.3 Vergleich der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen mit Genexpressionsbefunden der SEA-Enzephalitis

Während in der vorliegenden Arbeit die Aktivität und Expression von CD3, CD4 und CD8 im zeitlichen Verlauf der SEA-Enzephalitis untersucht wurde, beschränkt sich die Studie zur differenziellen zerebralen Genexpression nach Injektion von SEA im Vergleich zu Kochsalzlösung auf den Zeitpunkt fünf Tage nach peripher-venöser Injektion von ConA aktivierten Milzzellen, bzw. acht Tage nach intrazerebraler Injektion von SEA, bei im übrigen identischen Versuchsbedingungen (Emmer et al., 2008). Sowohl in den Untersuchungen von Emmer als auch in der vorliegenden Arbeit wurden mit NaCl behandelte Ratten mit der gleichen Methode untersucht um den tatsächlichen Effekt nachweisen zu können. Diese Daten wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Über die differenzielle Genexpression der frühen proinflammatorischen Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α u.a.) an Tag ½ und drei, den Tagen der höchsten Entzündungsaktivität der vorliegenden Ergebnisse, kann keine Aussage gemacht werden, da zum einen zu diesem Zeitpunkt keine Genanalyse durchgeführt wurde, zum anderen dies entsprechenden Gene an Tag fünf nach peripherer Injektion der Milzzellen Gene für IL-2, TNF- α und IFN- γ nicht verstärkt exprimiert waren. Die akute Phase der Entzündung scheint an Tag fünf schon vorbei zu sein. Das zeigt sich auch in den hier vorgenommenen immunhistochemischen Untersuchungen, die zu diesem Zeitpunkt nur noch eine vergleichsweise geringe Entzündungsaktivität belegen.

Die Analyse der T-Lymphozytensubpopulationen mittels Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 ergab, dass die Mehrzahl der ins Gehirn immigrierten Zellen CD8⁺ war. Dieser Befund deckt sich mit der erhöhten Expression von Genen, die für CD8 kodieren (Emmer et al., 2008). Gene für CD4 waren gegenüber NaCl-Injektion nicht signifikant vermehrt exprimiert nachweisbar. Dies liegt evtl. an der geringeren Zahl von CD4⁺ T-Zellen, die immunhistochemisch im Rahmen der SEA-Enzephalitis nachweisbar waren. Sowohl die immunhistochemischen Untersuchungen als auch die differenzielle Genexpressionsanalyse zeigten übereinstimmend eine von CD8⁺ T-Zellen dominierte Entzündung. Ebenso zeigt sich eine Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse für CD3. In der vorliegenden Arbeit wurde CD3 im Vergleich zu CD4 und CD8 relativ weniger stark exprimiert. Emmer et al. (2008) wiesen eine im Vergleich zur Expression von CD8-kodierenden Genen geringere Expression CD3-kodierender Gene nach. Gene, die für MHC-Klasse-II Moleküle kodieren, waren differenziell vermehrt nachweisbar (Emmer et al., 2008). Diese Tatsache war immunhistochemisch nicht untersucht worden, stützt jedoch den Befund einer Entzündungsreaktion.

4.4 Vergleich der Superantigenenzephalitis mit Befunden bei MS und MS-Tiermodellen

Es konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, dass intrazerebral injiziertes Superantigen in der Lage ist, peripher aktivierte T-Zellen die die BHS aktiv, d.h. unabhängig von einem zentralen Stimulus überwunden haben, zum Verbleib und Migration aus den perivaskulären Räumen ins zerebrale Parenchym zu bringen.

Vergleicht man die hier dargestellten Ergebnisse mit Befunden bei MS oder bei Tiermodellen, die zur Erklärung der Pathogenese der MS herangezogen werden, finden sich einige Übereinstimmungen. Hirnbiopsien verstorbener MS-Patienten weisen ein von T-Lymphozyten dominiertes, vorwiegend perivaskulär gelegenes Entzündungsinfiltrat auf (Traugott et al., 1983). Es scheint unbestritten, dass die T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Entmarkungsherde spielen (Wekerle et al. 1986; Lassmann et al., 1991). Dabei wurden im Zentrum dieser perivaskulären Infiltrate vorwiegend CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen (Traugott et al., 1983; Boss et al.; 1983; Weiner et al., 1984). Mit fortschreitender Entzündung kommt es zur Demyelinisierung, bei der

zytotoxische CD8+ T-Zellen eine Rolle spielen (Bitsch et al., 2000) und einen direkt zytotoxischen Effekt auf Oligodendrozyten zeigen können (Jurewicz et al., 1998).

Auch in den vorliegenden Untersuchungsergebnissen findet sich eine vorwiegend perivaskuläre und periventrikuläre von CD8+ T-Zellen dominierte Entzündung. Der Verlauf der Superantigenenzephalitis ist anders als bei der MS monophasisch und relativ kurz dauernd. Tatsächlich geht die Kürze des Entzündungsintervalls nach Superantigenexpression mit Wahrscheinlichkeit auf die einmalige Injektion zurück. Man kann sich alternativ vorstellen, Superantigen über einen längeren Zeitraum z. B. aus intrazerebral applizierten Mikrosphären freisetzen zu lassen oder etwa über Vektoren dauerhaft im ZNS zu exprimieren. Es könnte sein, dass dann im zeitlichen Verlauf je nach Aktivierung der T-Zellen in der Peripherie Entzündungsphasen im ZNS mit nicht-entzündlichen Intervallen abwechseln. Tatsächlich würde dieser Ablauf dem klinischen Verlauf der Multiplen Sklerose mit Schüben und nachfolgender Remission besser entsprechen als z. B. das gegenwärtig etablierte einphasige Entzündungsmodell der EAE bei Lewis-Ratten.

Auch im Tiermodell der EAE konnte nach vorheriger Immunisierung mit verschiedenen enzephalitogenen Antigenen eine akute monophasische Enzephalomyelitis nachgewiesen werden. Dabei überwinden aktivierte CD4+ T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke und führen in der akuten Phase der Entzündung zu einem perivenösen, entzündlichen Infiltrat mit monozytären Zellen, aktivierter Mikroglia, T- und B-Zellen (Dal Canto et al., 1995).

Weitere Untersuchungen konnten bei der EAE auch oligoklonale CD4+ und CD8+ T-Zellen in Entzündungsinfiltraten nachweisen (Oksenberg et al., 1990; Hauser et al., 1986). Sowohl in aktiven als auch in passiven Transfer-Modellen der EAE, bei denen Antikörper gegen Myelinbestandteile und enzephalitogene T-Zellen direkt verabreicht werden, finden sich allerdings auch CD8+ T-Zellen (Linnington et al., 1992).

Während bis vor kurzem stets von einer tragenden Rolle der CD4+ T-Lymphozyten als Mediator der MS ausgegangen wurde, wird zunehmend über eine wesentliche Rolle von CD8+ T-Zellen bei der Pathogenese der MS diskutiert (Zang et al., 2004). Auch nach Verwendung von Superantigenen zur Verstärkung der myelin-spezifischen Entzündungsreaktion im Tiermodell der EAE konnte ein Anstieg von CD8+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Das et al., 1996; Stinissen et al., 1995). Abhängig

vom genetischen Hintergrund scheinen Superantigene dabei über eine Aktivierung bestimmter V β -TCR tragender T-Lymphozyten den Verlauf der Erkrankung zu beeinflussen und zu modifizieren (Soos et al., 1995). Allerdings wurde im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit vor Injektion des Superantigens eine Immunisierung der T-Lymphozyten mit bestimmten Myelin-Autoantigenen vorgenommen.

Ein anderes Modell, das zur Erklärung der Pathogenese herangezogen wird, ist das Modell der TMEV (Theilers murine Virus-Enzephalomyelitis). Das entzündliche Infiltrat bei einer viral induzierten Enzephalitis führt zu einer histopathologisch der MS ähnlichen Erkrankung mit Nachweis CD8⁺ Zellen (Dal Canto et al., 1995). Im Tiermodell der TMEV spielen CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle als Mediator der Entzündung und Demyelinisierung (Tsunoda et al., 2005). Wiederum wird diesem Befund eine Bedeutung mit Hinsicht auf die Pathogenese der MS beigemessen. Bisher ist nicht berichtet worden, ob TMEV ein Superantigen kodiert.

Neuerdings wird spekuliert, ob Superantigen-produzierende Retroviren zur Auslösung der MS beitragen. Das MSRV (Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus) führt zu einer polyklonalen V β -16 Expansion und abnormer Immunantwort, die den Charakter einer Immunantwort auf Superantigene hat (Perron et al., 2001). Das Superantigen wird über MHC-Klasse-II Moleküle den T-Zellen präsentiert, bindet spezifisch im Bereich der variablen V β -Region des TCR und löst damit in vitro eine Entzündung über Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine aus (Perron et al., 2001). Die mitgeteilten Daten fügen sich gut in die in der vorliegenden Arbeit angestellten Überlegungen zur Superantigenenzephalitis ein.

Versucht man, das Modell der Superantigenenzephalitis zur Erklärung der Pathogenese der MS heranzuziehen, ist als erstes zu erwähnen, dass die Komplexität der entzündlichen und degenerativen Veränderungen, die die MS charakterisieren, nicht annähernd mit dem hier vorgestellten Modell erfasst werden können. Bezogen auf das SEA-Modell wird eine Infektion mit Superantigen-produzierenden Viren angenommen. Die Antwort des Immunsystems auf die viralen Superantigene in der entzündlichen Phase könnte ähnlich der hier dargestellten Untersuchungsergebnisse ablaufen. Die Lyse der virusinfizierten Zellen, die vermutlich wesentlich zum Axon- und Neuronenuntergang bzw. zum

Oligodendrozytenuntergang also zum degenerativen Teil der Erkrankung führt, lässt sich in dem vorliegenden Modell nicht erfassen.

Eine im frühen Kindesalter ablaufende Infektion mit neurotrophen Viren geringer Virulenz und langer Persistenz mit möglicher Präferenz bestimmter ZNS-Strukturen, wie z.B. den Oligodendrozyten (ähnlich der lebenslangen Persistenz von Herpesviren in den Spinalganglien), führt eventuell zu einer nicht zytolytischen Virusvermehrung unter Kontrolle des Immunsystems, etwa ortsständigen dendritischen Zellen oder Mikrogliazellen. Eventuell führen eine bestimmte genetische Konstellation, der „Umweltfaktor“ Virus und eine temporäre Immunschwäche bzw. Infekte zu einer verstärkten Vermehrung des Virus im ZNS. Diese Virusvermehrung kann im ZNS nicht suffizient kontrolliert werden. Die Reaktion des Immunsystems könnte eventuell zu einer zytotoxischen Lyse Virus-befallener Zellen und damit z. B. zur Zerstörung von Oligodendrozyten führen. Das klinische Korrelat der skizzierten möglichen pathogenetischen wäre ein akuter Schub der Erkrankung mit den entsprechenden Symptomen. Es ist bekannt, dass bestimmte, das Immunsystem schwächende Ereignisse, wie akute andere Infektionen, Stress u. a. Belastungssituationen zu einem MS-Schub führen. Mit dem Wiedererlangen der Immunkompetenz kann die Virusvermehrung wieder kontrolliert und auf ein Minimum reduziert werden. Klinisch zeigt sich dieser Effekt in einem Rückgang der akuten Verschlechterung, im besten Falle auf das Ausgangsstadium. Es ist anzunehmen, dass die lokale Entzündungsreaktion im ZNS ursächlich für die neurologischen Auffälligkeiten ist und nicht z. B. die CD8+ T-Zell vermittelte Lyse virusbefallener Zellen.

Eine Besonderheit der SEA- Enzephalitis ist, dass ohne vorherige Immunisierung der T-Lymphozyten mit speziellen Myelin-Autoantigenen ein periventrikulär und perivaskulär gelegenes Entzündungsinfiltrat nachgewiesen werden konnte. Damit muss die Frage einer autoimmunologischen Reaktion erneut kritisch diskutiert werden. Auch wenn eine Beteiligung Myelin-spezifischer T-Zellen an der Superantigen-Enzephalitis nicht ausgeschlossen werden kann, so erscheint es doch denkbar zu sein, dass die durch Superantigene vermittelte Entzündung ganz ohne Myelin-spezifischen Entzündungszeichen auskäme.

Die im Tiermodell durch SEA induzierte Enzephalitis kann allenfalls einen Teil der komplexen immunologischen Vorgänge bei der MS widerspiegeln. Es finden sich

histologische Ähnlichkeiten im entzündlichen Infiltrat der MS-Plaques und zu Untersuchungsergebnissen bei anderen Tiermodellen. Letztendlich deuten die Gemeinsamkeiten zwischen histologischen Befunden in der akut entzündlich veränderten Plaque bei MS sowie bei der EAE und der SEA-Enzephalitis am ehesten auf eine gemeinsame Endstrecke der Entzündung hin. Die eigentliche Ursache der MS bleibt derzeit weiter ungeklärt.

Weitere Untersuchungen zur Beziehung des Superantigens zum T-Zell-Rezeptor lassen Rückschlüsse auf die Besonderheit einer durch Superantigene ausgelösten Immunreaktion zu, die weitere pathologische Besonderheiten der MS als eine durch Beteiligung von Superantigenen ausgelöste Erkrankung näher erklären. Möglicherweise führen bestimmte Umweltfaktoren/Infektionen in der Kindheit, eine bestimmte MHC-Ausprägung HLA-Typ und eine bestimmte V β -Sequenz des TCR des Individuums zu einer Immunantwort, deren Folgen eine Entzündung mit MS-typischen Merkmalen darstellen. Eine genotypische Untersuchung des TCR/CD3, des MHC-Komplexes und der Nachweis bestimmter Superantigensequenzen im Genom der Oligodendroglia betroffener Patienten, könnten darüber Auskunft geben.

5. Zusammenfassung

Ziel unserer Untersuchung war eine immunhistochemische Differenzierung des Entzündungsinfiltrates einer in Lewis Ratten durch Staphylokokkentertoxin A (SEA) induzierten Enzephalitis. Diese Superantigen-Enzephalitis kann eventuell als ein neues Modell für die Erklärung zerebraler Erkrankungen mit autoimmunologischem Hintergrund, wie der MS verwendet werden. Das Auftreten einer fokalen Leukenzephalitis nach intrazerebraler Injektion von SEA und peripherer Injektion ConA-stimulierter Milzzellen wurde erstmals von Kornhuber et al. (2002) beschrieben. Über die einzelnen Vorgänge dieser Superantigen-Enzephalitis ist bisher wenig bekannt. 18 Lewis-Ratten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag ½; drei und fünf) nach intrazerebraler Injektion von Staphylokokkenenterotoxin A und vorheriger peripher-venöser Injektion von ConA-stimulierten Milzzellen geopfert. An Gefrierschnitten wurden immunhistochemisch nach der Avidin-Biotin-Methode die T-Zell-Marker CD3, CD4 und CD8 untersucht. Es wurde eine Enzephalitis in beiden Hirnhemisphären beobachtet; allerdings war die Entzündung im Bereich der rechten, injizierten Hirnhälfte stärker ausgeprägt ($p < 0,05$). Die Entzündungsaktivität wurde durch die Anzahl der entzündeten Gefäße und die Anzahl der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie die Entzündungszell-Lagen beurteilt. Die Entzündungsaktivität im Bereich der rechten (injizierten) Hemisphäre war zum Zeitpunkt 0,5 Tage nach peripher-venöser Injektion von Con A- Milzzellen, bzw. 3 Tage nach intrazerebraler Injektion von Staphylokokkenenterotoxin A am stärksten ausgeprägt. Im Bereich der linken (nicht injizierten) Hemisphäre fand sich, zeitlich versetzt an Tag 3 nach peripher venöser Injektion von Con A aktivierten Milzzellen die maximale Entzündungsaktivität.

Das Infiltrat der vorwiegend perivaskulär angeordneten Rundzellen war unabhängig von der Injektionsseite von CD8+ T-Zellen bestimmt. Rechts hemisphäriell fanden sich Entzündungszellen perivaskulär, aber auch subependymal und im Marklager.

Diese Ergebnisse korrelieren mit der Untersuchung der zerebralen Genexpression an Lewis-Ratten acht Tage nach intrazerebraler Superantigeninjektion und fünf Tage nach peripherer intravenöser Injektion von Con A-aktivierten Lymphozyten (Emmer et al., 2008). Die differenziell nach SEA-Injektion exprimierten Gene zeigen eine von CD8+ T-Lymphozyten getragene intrazerebrale Immunreaktion (Emmer et al., 2008). Der Effekt einer Herunterregulation und Internalisierung des TCR und damit von CD3 könnte auch bedingt durch das injizierte Superantigen sein. Die im Vergleich zu CD4 und CD8

verminderte Expression von CD3 auf T-Lymphozyten ist eventuell geeignet, um vorausgehenden Superantigen-Kontakt nachzuweisen. Dies ist bisher bei der MS nicht untersucht worden. Die in Hirnbiopsien verstorbener MS-Patienten untersuchten entzündlich veränderten Herde weisen ebenfalls einen hohen Anteil an CD8⁺ T-Zellen auf. Neuere Untersuchungen am gängigsten Tiermodell der MS, der EAE, verstärken die Annahme einer besonderen Rolle von CD8⁺ T-Zellen bei der Pathogenese der MS. Auch in viralen Tiermodellen konnten CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse tragen zu einer besseren Beurteilung und Verständnis der Pathogenese der Superantigenenzephalitis bei.

6 Literaturverzeichnis

Acha-Orbea H, Waanders GA, Shakhov AN, Held W: Infectious minor lymphocyte stimulating (MIs) antigens. *Semin Immunol* 4 (1992) 297-303

Alcover A, Alarcón B: Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 20 (2000) 325-346

Altemeier WA, Lewis SA, Schievert PM, Bergdoll MS, Bjornson HJ, Taneck L, Crass BA: Staphylokokkus aureus associated with toxic shock syndrome. Phage typing and toxin capability tested. *Ann Intern Med* 96 (1982) 978-982

Aoe T, Saito T. Towards immune modulation through the molecular mechanism of lymphocyte activation. *Nippon Rinsho* 53 (1995) 2331-2339

Barnett MH, Prineas JW: Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55 (2004) 458-468

Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP: A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome Staphylococcus aureus isolates. *Lancet* 9 (1981) 1017-1021.

Bette M, Geisler T, Fairless R, Romeo H, Schäfer MK, Weihe E: Plasticity of IL-2 and IL-2 receptor chains in rat lymphoid tissues in situ after stimulation with staphylococcal enterotoxin A. *Cytokine* 22 (2003) 157-167

Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Burakoff SJ: The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 7 (1989) 579-599

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S KuhlmannT, Brück W: Axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123 (2000) 1174-1183

Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DJ: Immune histological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *Neurol Sci* 62 (1983) 219-232

Bradl M, Bauer J, Flügel A, Wekerle H, Lassmann H: Complementary contribution of CD4 and CD8 T-lymphocytes to T-cell infiltration of the intact and the degenerative spinal cord. *Am J Pathol* 166 (2005) 1441-1450

Cameron SB, Nawijn MC, Kum WW, Savelkoul HF, Chow AW: Regulation of helper T-cell responses to staphylococcal superantigens. *Eur Cytokine Netw* 12 (2001) 210-222

Carlsen E und Prydz H: Activation of monocytes-more than one process. Differential effect of cytokines on monocytes. *J Scand Immunol* 27 (1988) 401-404

Chang BS, Bohach GA, Lee SU, Dawis WC, Fox LK, Ferres WA, Seo KA, Koo HC, Kwon NH, Park YH: Immunosuppression by T regulatory cells in cows infected with staphylococcal superantigen. *J Vet Sci* 6 (2005) 247-250

Chapes SK, Herpich AR: Complex high affinity interactions occur between MHC I and superantigens. *J Leukoc Biol* 64 (1998) 587-594

Compston A, Coles A: Multiple sclerosis. *Lancet* 359 (2002) 1221-1231

Compston A und Sadovnik AD: Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5 (1992) 175-181

Chantler JK, Smyrnis L, Tai G: Selective infection of astrocytes in human glial cell cultures by rubella virus. *Lab Invest* 72 1995 334-340

Dal Canto MC, Melvold RW, Kim BS, Miller SD: Two models for multiple sclerosis: Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microsc Res Tech* 32 (1995) 215-229

Dal Canto MC: Uncoupled relationship between demyelination and primary infection of myelinating cells in Theiler's virus encephalomyelitis. *Infect Immun* 35 (1982) 1133-1138

Dal Canto MC, Rabinowitz SG: Experimental models of virus induced demyelination of the central nervous system. *Ann Neurol* 11 (1982) 109-127

Damle NK, Leytze G, Klussman K, Leadbetter JA: Activation with superantigens induces programmed death in antigen-primed CD4+ class II major histocompatibility complex T-lymphocytes via a CD11a/CD18-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 23 (1993) 1513-1522

Das MR, Cohen A, Zamvil S, Efner H, Kuchroo VK: Prior exposure to superantigen can inhibit or exacerbate autoimmune encephalomyelitis: T-cell repertoire engaged by the autoantigen determines clinical outcome. *J Neuroimmunol* 71 (1996) 3-10

Dean G, Kurtzke JF: On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3 (1971) 725-729

Dyment DA, Sodovnik AD, Ebers GC: Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 6 (1997) 1693-1698

Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 21 (2000) 815-817

Emmer A, Gerlach K, Staeger MS, Kornhuber ME: Cerebral gene expression of superantigen encephalitis in the lewis rat induced by staphylococcal enterotoxin A. *Scand J Immunol* 67 (2008) 464-472

Ferens WA, Golff WL, Davis WC, Fox LK, Deobald C, Hamilton MJ, Bohach GA: Induction of type 2 cytokines by a staphylococcal enterotoxin superantigen. *J Nat Toxins* 7 (1998) 193-213

Filippi M, Rocca MA, Martino G, Horsfield MA, Comi G: Magnetization transfer changes in the normal appearing white matter precede the appearance of enhancing lesions in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 43 (1998) 809-814

Fleischer B: Stimulation of the immune system by microbial “superantigens”. *Immun Infect* 19 (1991) 8-11

Fox EJ: Immune pathology of multiple sclerosis. *Neurology* 63 (2004) 3-7

Gehrmann J, Banati RB, Kreutzberg GW J: Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *Neuroimmunol* 48 (1993) 189-198

Gobel TW, Bolliger A: Evolution of the T cell receptor signaling transduction units. *Curr Top Microbiol Immunol* 248 (2000) 303-320

Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL: Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 19 (1986) 578-587

Hawkins CP, Mackenzie F, Tofts P, du Boulay EP, McDonald WI: Patterns of blood-brain barrier breakdown in inflammatory demyelination. *Brain* 114 (1991) 801-810

Herrman A, Croteua G, Sekaly RP, Kappler J, Marrack P: Effect of isotypes and allelic polymorphism on the binding of staphylococcal exotoxins to MHC class II molecules. *J Exp Med* 172 (1990) 709-717

Hickey WF: Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 2 1991 97-105

Hopkins PA, Sriskandan S: Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 140 (2005) 395-407

Jain J, Loh C, Rao A: Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7 (1995) 333-342

Janeway CJ, Matz ME: The immunobiology of the T cell response to Mls-locus-disparate stimulator cells. An unidirectionally, new strain combinations, and the role of Ia antigens. *J Immunol* 134 (1985) 2057-2063

Jason J, Inge KL: The effects of mitogens, IL-2, and anti-CD3 antibody on the T-cell receptor V beta repertoire. *Scand J Immunol* 43 (1996) 652-661

Johnson HM, Torres BA, Soos JM: Superantigen in human disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 212 (1994) 99-109

Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP: MHC-Class-I restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 160 (1998) 3056-3059

Kabelitz D, Wesselborg S: Life and death of a superantigen-reactive human CD4+ T cell clone: staphylococcal enterotoxins induce death by apoptosis but simultaneously trigger a proliferative response in the presence of HLA-DR+ antigen-presenting cells. *Int Immunol* 4 (1992) 1381-1388

Kato M, Watarai S, Nishikawa S, Iwasaki T, Kodama H: A novel culture method of canine peripheral blood lymphocytes with concanavalin A recombinant human interleukin-2 for adoptive immunotherapy. *J Vet Med Sci* 69 (2007) 481-486

Kornhuber ME, Ganz C, Lang R, Brill T, Schmahl W: Focal encephalitis in the Lewis rat induced by intracerebral enterotoxin superantigen and amplified by activated intravenous splenocytes. *Neurosci Lett* 324 (2002) 93-96

Kornhuber ME, Zierz S: Possibilities and limits of immunotherapy in multiple sclerosis. Inflammatory and degenerative aspects of the disease require a new pathogenetic concept. *Nervenarzt* 74 (2003) 537-538

Kornhuber ME: Nichtentzündliche Pathogenese von Herden bei Multipler Sklerose
Nervenarzt 77 (2006) 989-992

Kraft M, Filsinger F, Kramer KL, Kabelitz D, Hansch GM, Schoels M: Synovial fibroblast as target cell for staphylococcal enterotoxin-induced T cell cytotoxicity.
Immunol 93 (1998) 20-25

Lassmann H: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: its value as an experimental model for multiple sclerosis. J Neurol 229 (1983) 207-220

Lassmann H, Rössler K, Zimprich F, Vass K: Expression of adhesion molecules and histocompatibility antigens at the blood brain barrier. Brain Pathol 1 (1991) 115-123

Lavoie PM, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP: Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. Immunol Rev 168 (1999) 257-269

Linington C, Engelhardt B, Kappos G, Lassmann H: Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. J Neuroimmunol 40 (1992) 219-224

Lipton HL, Friedmann A: Purification of Theiler's murine encephalomyelitis virus and analysis of the structural virion polypeptides: correlation of the polypeptide profile with virulence. J Virol 33 (1980) 1165-1172

Lublin FD: Immunomodulation of relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Neurology 12 (1984) 1615-1617

Lucchinetti C, Brück W, Paris J, Schleithauer M, Rodriguez M, Lassmann H: Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 47 (2000) 707-717

Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H: Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. Brain Pathol 6 (1996) 259-274

Makida R, Hofer MF, Takase K, Cambier JC, Leung DY: Bacterial superantigens induce V beta-specific T cell receptor internalization. *Mol Immunol* 33 (1996) 891-900

Malisen B, Ardoin L, Lin SY, Gillet A, Malissen M: Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during the T cell development. *Adv Immunol* 72 (1999) 103-148

Martin R, Mc Farland HF, Mc Farlin DE: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Ann Rev Immunol* 10 (1992) 153-187

Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H: Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159 (2001) 809-815

Miethke T, Wahl C, Gaus H, Heeg K, Wagner H: Exogenous superantigens acutely trigger distinct levels of peripheral T cell tolerance/immunosuppression: dose-response relationship. *Eur J Immunol* 24 (1994) 1893-1902

Miethke T, Wahl C, Heeg K, Wagner H: Superantigens: the paradox of T-cell activation versus inactivation. *Int Arch Allergy Immunol* 106 (1995) 3-7

Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T: The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11 (1993) 245-267

Müller-Alouf H, Carnoy C, Simonet M, Alouf JE: Superantigen bacterial toxins, state of the art. *Toxicon* 39 (2001) 1691-1701

Naper C, Vaage JT, Lambracht D: Alloreactive natural killer cells in the rat: complex genetics of major histocompatibility complex control. *Eur J Immunol* 5 (1995) 1249-1256

Niedergang F, Hémar A, Hewitt CR, Owen MJ, Dautry-Varsat A, Alcover A .The *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem* 270 (1995) 12839-12845

Oksenberg JR, Stuart S, Begowich AB, Bell RB, Ehrlich H, Steinmann L, Bernard CCA: Limited heterogeneity of arranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains in multiple sclerosis patients. *Nature* 345 (1990) 344-346

Paterson P, Drobish D, Hanson M, Jakobs A: Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Int Arch Allerg Appl Immunol* 37 (1970) 26-40

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M: Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287 (2001) 321-32

Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Olszak EL, Hoffmann B, Morgan BP: Immune pathology and secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50 (2001) 646-657

Raine CS: Multiple Sclerosis and chronic relapsing EAE: comparative ultrastructural neuropathology. In *Multiple Sclerosis*. Hallpike JF, Adams CWM, Tourtelotte WW (Hrsg.) Williams and Wilkins, Baltimore 1983 Ss. 413-478

Redwine JM, Buchmeier MJ, Evans CF: In vivo expression of major histocompatibility complex molecules and neurons during viral infection. *Am J Pathol* 159 (2001) 1219-1224

Reed JC, Sabath DE, Hoover RG, Prystowsky MB: Recombinant interleukin 2 regulates levels of c-myc mRNA in a cloned murine T lymphocyte *Mol Cell Biol* 5 (1985) 3361-3368

Scherer MT, Ignatowicz L, Winslow GM: Superantigens: Bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. *Annu Rev Cell Biol* (1993) 101-128

Sedgwick JD, Ford AL, Foulcher E, Airriess R: Central nervous system microglial cell activation proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating blasts. *J Immunol* 160 (1998) 5320-5330

Sedgwick JD, Schwender S, Immrich H, Dörries R, Butcher GW, ter Meulen V: Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 7438-7442

Sedgwick JD, Schwender S, Grgersen R, Dörries R, ter Meulen V: Resident macrophages (ramified microglia) of the adult brown Norway rat central nervous system are constitutively major histocompatibility complex class II positive. *J Exp Med* 177 (1993) 1145-1152

Soos JM, Hobeika AC, Butfilowski E, Schiffenbauer J, Johnson HM: Accelerated induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J mice by a non V β 8-specific superantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 6082-6086

Stinissen P, Vandevyver C, Raus J, Zhang J: Superantigen reactivity of gamma delta T cell clones isolated from patients with multiple sclerosis and controls. *Cell Immunol* 166 (1995) 227-235

Stoll G: Inflammatory cytokines in the nervous system. Multifunctional mediators in autoimmunity and cerebral ischemia. *Rev Neurol (Paris)* 158 (2002) 887-891

Storch M, Lassmann H: Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr Opin Neurol* 10 (1997) 186-192

Stout S, Bottomly K: Antigen-specific activation of effector macrophages by interferon-gamma-producing (TH1) T-cell clones: failure of IL4 producing (TH2)T-cell to activate effector functions in macrophages. *J Immunol* 142 (1989) 760-765

Sweet TM, Del Valle L, Khalili K: Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *J Cell Physiol.* 191 (2002) 249-256

Tonra JR, Reiseter BS, Kolbeck R, Nagashima K, Robertson R, Keyt B, Lindsay RM: Comparison of the timing of acute blood-brain barrier to rabbit immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* 430 (2001) 131-144

Torres BA, Kominsk S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM: Superantigens: The Good, the Bad, and the Ugly. *Exp Biol Med* 226 (2001) 164-176

Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, Hünig T: Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* 22 (1992) 2841-2848

Traugott U, Reinherz EL, Raine CS: Multiple sclerosis: Distribution of T-cell subsets within active chronic lesions. *Science* 219 (1983) 308-310

Tsunoda I, Fujinami RS: Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin Immunopathol* 2 (2002) 105-125

Tsunoda I, Kuang LQ, Kobayashi-Warren M, Fujinami RS: Central nervous system pathology caused by autoreactive CD8⁺ T-cell clones following virus infection. *J Virol* 23 (2005) 14640-14646

Von Essen M, Menné Bonfeld C, Siersma V, Bødker Rasmussen A, Lauritsen JPH., Nielsen BL, Geisler C: Constitutive and Ligand-Induced TCR Degradation. *J Immunol* 173 (2004) 384-393

Weiner HL, Hafler DA, Fallis J, Johnson D, Ault KA, Hauser SL: Altered blood T-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 6 (1984) 115-121

Wright AD, Chapes SK: Cross-linking of staphylococcal enterotoxin A bound to major histocompatibility complex class I required for TNF-alpha secretion. *Cell Immunol* 197 (1999) 129-135

Yagi J, Baron J, Buxser S, Janeway CA jr: Bacterial proteins that mediate the association of a defined subset of T cell receptor: CD4 complexes with class II MHC. *J Immunol* 3 (1990) 892-901

Zang YC, Li S, Riera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ: Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 172 (2004) 5120-5127

7 Thesen

1. Die Multiple Sklerose ist die häufigste demyelinisierende Erkrankung im jungen Erwachsenenalter unter der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung. Die Ursache der MS ist noch unbekannt.
2. Es existieren bislang zwei Tiermodelle der MS: Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) versucht, die ablaufenden Entzündungsvorgänge nach vorheriger Immunisierung von T-Lymphozyten mit spezifischen Myelin-Antigenen zu beschreiben und zu erklären. Ein weiteres Modell ist die TMEV (Theiler's murine Virus Encephalomyelitis). Bei diesem Modell treten neben einer Entzündung vor allem degenerative Veränderungen auf.
3. Als neues Modell der Entzündungsvorgänge bei der MS wurde jüngst eine Superantigen-induzierte Enzephalitis etabliert. Superantigene werden von bestimmten Viren und Bakterien gebildet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Staphylokokkenenterotoxin A intrazerebral im Bereich der rechten Hemisphäre injiziert. Den Kontrolltieren wurde bei sonst identischen Versuchsbedingungen NaCl 0,9% intrazerebral injiziert. Um die Entzündung zu verstärken, erfolgte drei Tage danach die peripher-venöse Injektion von $1,5 \times 10^6$ Con A aktivierten syngenen Milzzellen. Die genauen Abläufe dieser Superantigenenzephalitis sind bisher kaum untersucht.
4. Die zerebrale Entzündungsreaktion wurde $\frac{1}{2}$, drei und fünf Tage nach Injektion der Con A aktivierten Milzzellen, bzw. $3 \frac{1}{2}$ Tage sechs und acht Tage nach intrazerebraler Injektion des Superantigens untersucht. 12 h nach Injektion der Con A aktivierten Milzzellen wurden sechs Tiere geopfert und die Gehirne zur weiteren immunhistochemischen Bearbeitung herangezogen. Drei Tage nach peripher-venöser Injektion wurden fünf Tiere, fünf Tage nach peripher-venöser Injektion wurden sieben Tiere untersucht.
5. Dazu wurden die T-Zell Marker CD3, CD4 und CD8 getrennt für die rechte, injizierte und die linke, nicht injizierte Hemisphäre untersucht.
6. Die maximale Entzündungsaktivität war im Bereich der rechten (injizierten) Hemisphäre lokalisiert und zwar zum Zeitpunkt $\frac{1}{2}$ Tage nach peripher-venöser Injektion von ConA- Milzzellen, bzw. $3 \frac{1}{2}$ Tage nach intrazerebraler Injektion von Staphylokokkenenterotoxin A. Das vorwiegend perivaskuläre, mehrreihige Entzündungszellinfiltrat war von CD8+ T-Lymphozyten dominiert. Im Bereich

der linken (nicht injizierten) Hemisphäre fand sich, zeitlich versetzt an Tag drei nach peripher venöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen, die maximale Entzündungsaktivität. Allerdings war die Entzündung im Bereich der nicht injizierten, linken Hemisphäre schwächer ausgeprägt. Das Entzündungsinfiltrat links war ebenfalls von CD8⁺ T-Zellen bestimmt und ebenso vorwiegend perivaskulär gelegen.

7. Den Hauptteil der perivaskulär liegenden Entzündungszellen bildeten CD8⁺ T-Lymphozyten. Interessanterweise lag die Anzahl an CD3⁺ T-Lymphozyten zu allen Untersuchungszeitpunkten unter der Anzahl an CD8⁺ T-Lymphozyten.
8. Unsere Ergebnisse zeigen Übereinstimmungen u. a. mit der Hochregulierung der Expression von CD8-kodierenden Genen und inflammatorischen Zytokinen, die zu einer Aktivierung und Proliferation, insbesondere von CD8⁺ T-Lymphozyten führen (Genexpressionsanalyse von Emmer et al., 2008).
9. Die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Ergebnisse können zum Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der durch Superantigen induzierten Enzephalitis genommen werden: Eine genauere Charakterisierung der Wirkung von Superantigenen auf den TCR und insbesondere die Veränderung der Expression von CD3 ist notwendig, um die Ursache und möglichen Auswirkungen auf die Immunantwort im Modell der SEA-Superantigenenzephalitis bei der Lewis-Ratte näher zu erklären. Weiterhin können an diesem Modell Fragen zur Wechselwirkung zwischen TCR, MHC-II-Molekül und CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht werden. Ebenso wichtig wäre eine Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Superantigenenzephalitis, um auftretende Residualzustände, wie z. B. eine Demyelinisierung oder Fibrose erfassen zu können. Diese Ergebnisse sollten Ausgangspunkt für einen Vergleich zwischen der durch Superantigen induzierten Enzephalitis in der Lewis-Ratte und Befunden von MS-Patienten sein. In nächster Zeit könnte die Frage einer differenziellen Expression von CD3 im Verhältnis zu CD4 und CD8 auf T-Lymphozyten bei MS-Patienten durch entsprechende Untersuchungen geklärt werden.

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Gerlach
Vorname	Kristina
Geburtsdatum	09.09.1979
Geburtsort	Halle (Saale)
Wohnort	Halle (Saale)

Ausbildung

1986 - 1991	Polytechnische Oberschule Brunnen in Halle (Saale)
1991 - 1998	Thomas-Münzer-Gymnasium in Halle (Saale)
1998 - 2004	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
24.11.2004	Approbation als Arzt
01.01.2005 - 30.06.2005	Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Kinderchirurgie an der Universität Leipzig
01.07.2005 - 30.04.2008	Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Kinderchirurgie im Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle/Saale
seit 01.05.2008	Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Kinderchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Es fanden keine früheren Promotionsversuche statt. Die Arbeit ist bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Halle an der Saale,

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. M. E. Kornhuber, leitender Oberarzt der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg der mir in allen Phasen der Arbeit mit Rat, konstruktiver Kritik und Ansporn zur Seite stand sowie für die Bereitstellung des Themas.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Zierz für die Möglichkeit zur Durchführung dieses Forschungsprojektes.

Mein Dank gilt besonders meiner Mitstreiterin Cathleen Huth, die sich in ihrer Dissertation der Mikrogliaaktivierung bei SAg-Enzephalitis widmet.

Weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Bahn (Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für seine Unterstützung bei der Planung und Durchführung des methodischen Teils der Arbeit.

Danken möchte ich Frau Zietz, medizinisch technische Assistentin im Muskellabor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität für ihre große Unterstützung und Geduld bei der Einarbeitung in die Benutzung des Kryocut-Gerätes und die Einführung in die grundlegenden Techniken der Immunhistochemie.

Weiter Dank gilt den Mitarbeitern des Muskellabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie, den Tierpflegerinnen Frau Kunz sowie Fr. Dr. Rosenfeld, Tierschutzbeauftragte der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Unterstützung bei der Beantragung des Tierversuchsvorhabens.

Nicht vergessen meine Familie, die Ansporn und Motor für das Zustandekommen dieser Arbeit waren. Ihr möchte ich meinen Dank und Freude für die geleistete Hilfe und Geduld aussprechen.