

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Klaus V. Toyka

**Der Einfluß von
Virusinfektion und Impfung
auf autoreaktive T-Lymphozyten
bei der Multiplen Sklerose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Neville Fairdoon Moriabadi
aus Bad Kissingen

Würzburg, Dezember 2002

Referent: Prof. Dr. med Peter Rieckmann
Koreferent: Prof. Dr. med Volker ter Meulen
Dekan: Prof. Dr. med Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2003

Der Promovend ist Arzt

Dem Katerchen, der Toskana, meiner Frau, meinen Eltern und Brüdern gewidmet,
sowie den tapferen Patienten, die uns zur aufrechten und unermüdlichen Suche
nach Ursache und Behandlung ihrer Erkrankung verpflichten.

„evidence of absence is not absence of evidence!“

Inhaltsverzeichnis	i
Verzeichnis der Abkürzungen	vi
1 Einleitung	Seite
1.1 Multiple Sklerose	1
1.2 Multiple Sklerose und T-Zellimmunologie	2
1.3 Virusinfektionen und Multiple Sklerose	3
1.3.1 Hinweise für eine Infektassoziation	
1.3.1.1 Historische Vorbemerkungen	
1.3.1.2 Epidemiologie	4
1.3.1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	5
1.3.1.4 Demyelinisierende Virusinfektionen bei Tieren	
1.3.1.5 (Para-/Post-)Infektiöse Entmarkung beim Menschen	6
1.3.1.6 Klinisch-immunologische Untersuchungen	7
1.3.1.6.1 Erhöhte Antikörpertiter bei MS-Patienten	
1.3.1.6.2 MS-Schübe nach IFN γ -Behandlung	
1.3.1.6.3 MS-Schübe bei Infektionen der oberen Luftwege	
1.3.2 Mögliche Wirkmechanismen der Krankheitsentstehung	8
1.3.2.1 Direkte Schädigung durch Virusinfektion der Oligodendrozyten	
1.3.2.2 Immunvermittelte Schädigung infizierter Oligodendrozyten	
1.3.2.3 Indirekte Schädigung bei unspezifischer ZNS-Infektion	9
1.3.2.3.1 Erleichterte Zellmigration (Lymphocyte Homing)	
1.3.2.3.2 Kreuzreaktivität (Molecular Mimicry) und Epitope Spreading	
1.3.2.3.3 Lokale Begleitreaktion (Local Bystander Activation)	10
1.3.2.4 Aktivierung autoreaktiver Zellen bei systemischer Infektion	
1.3.2.4.1 Kreuzreaktivität (Molecular Mimicry)	
1.3.2.4.2 Unspezifische Begleitreaktivität (Systemic Bystander Effect)	
1.3.2.4.3 Mikrobielle Superantigene	12
1.3.2.5 Mehrfachinfektion / Pathogenwechselwirkungen	
1.4 Viren mit möglicher Relevanz	13
1.4.1 Humanes Herpesvirus 6	
1.4.1.1 Taxonomie	
1.4.1.2 Pathogenität	14

1.4.2	Influenzavirus	
1.4.2.1	Taxonomie	
1.4.2.2	Virusstruktur und Antigenität (Shift/Drift)	15
1.4.2.3	Pathogenität und Krankheitsbild	
1.5	Infektionsprophylaxe	16
1.5.1	Impfung	
1.5.2	Influenzaschutzimpfung und Multiple Sklerose	
1.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung	
2	Material und Methoden	
2.1	Material	18
2.1.1	Materialien für Biochemie	
2.1.1.1	Reagenzien und Chemikalien	
2.1.1.2	Ansatz der Lösungen und Puffer	
2.1.1.3	Proteine und Antikörper	20
2.1.1.4	Weitere Materialien, Glas- und Plastikware	
2.1.2	Material für Zellkultur	21
2.1.2.1	Puffer, Zellkulturmedien und Lösungen	
2.1.2.2	Zellkulturantigene und Reagenzien	22
2.1.2.3	Zelllinien, Virusisolate und Impfstoff	
2.1.2.4	Antikörper, Puffer und Reagenzien für ELISA	
2.1.2.5	Puffer und Antikörper- / Substratkits für ELISPOT	23
2.1.2.6	FACS-Puffer und Antikörper	24
2.1.2.7	Antikörper und Lösungen für Virus-Serologie	
2.1.2.8	Materialien für Blutentnahme und Zellkultur	25
2.1.3	Material für Molekularbiologie	
2.1.3.1	Chemikalien, Puffer und Reagenzien	
2.1.3.2	Zytokinstandards und Oligonukleotide	26
2.1.4	Allgemeine Materialien und Geräte	
2.1.5	Oligonukleotid- und Peptidsequenzen	29

2.2	Methoden	31
2.2.1	Methoden der ViMS-Studie	
2.2.1.1	Patienten-/Probandenauswahl und Probengewinnung	
2.2.1.2	Impfstoff	32
2.2.1.3	Klinische und virologische Verlaufsbeobachtungen	
2.2.1.4	Allgemeines zum Umgang mit Zellkulturen	33
2.2.1.5	Blutentnahme und Lymphozytenisolierung	34
2.2.1.6	Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung	35
2.2.1.7	Quantifizierung antigenspezifischer T-Zellen mit ELISPOT	
2.2.1.8	Quantifizierung von Zytokin-mRNA mit RT-PCR	37
2.2.1.8.1	RNA-Isolation	
2.2.1.8.2	Reverse Transkription (RT)	38
2.2.1.8.3	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	
2.2.1.8.4	Standardisierung der cDNA-Konzentration	39
2.2.2	Methoden des virologisch-immunologischen Teils	
2.2.2.1	Humanes basisches Myelinprotein (hMBP)	
2.2.2.1.1	Präparation von humanem basischen Myelinprotein (hMBP)	
2.2.2.1.2	Quantitative Proteinbestimmung	41
2.2.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	42
2.2.2.1.4	Western-Immunoblot	
2.2.2.1.5	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	
2.2.2.1.6	Ansequenzierung des humanen basischen Myelinproteins (hMBP)	
2.2.2.2	Autoreaktive T-Zelllinien	43
2.2.2.2.1	Etablierung von autoreaktiven T-Zelllinien	
2.2.2.2.2	Proliferationsmessung und Stimulationsindex (SI)	45
2.2.2.2.3	Bestimmung der Peptidspezifität (Epitope Mapping)	
2.2.2.2.4	Phänotypisierung und FACS	46
2.2.2.2.5	Charakterisierung der Zytokinsekretion und ELISA	
2.2.2.2.6	Kryokonservierung und Rekultivierung	47
2.2.2.3	<i>In vitro</i> -Infektionsversuche	48
2.2.2.3.1	Virusisolation und -konzentrierung	
2.2.2.3.2	Virustiterbestimmung	
2.2.2.3.2.1	Hämagglutinationstest (HAT)	
2.2.2.3.2.2	Zytofluorometrie (FACS)	
2.2.2.3.3	Virusinfektion von PBMC	49

2.2.2.3.4	Koinkubationsmodelle	
2.2.2.3.5	Virusinfektion von antigenspezifischen T-Zelllinien	
2.2.2.3.6	Virusinfektion von APC für die spezifische T-Zellstimulation	
2.2.2.4	Untersuchungen zu HHV-6-Reaktivierung im Serum	50
2.2.2.4.1	Probenmaterial	
2.2.2.4.2	Virus-Serologie	
2.2.2.4.3	Virus-DNA-Isolation und semi-nested PCR	51
2.2.3	Auswertung und Statistik	
3	Ergebnisse	
3.1	Vakzinierung und Immunreaktion bei MS (ViMS-Studie)	52
3.1.1	Basisdemographische Daten	
3.1.2	Immunreaktion nach Impfung und Infektion	53
3.1.2.1	T-Zellquantifizierung und ELISPOT	
3.1.2.2	Quantifizierung von Zytokin-mRNA und RT-PCR	55
3.1.2.3	β -Aktin-cDNA-Konzentrationen	
3.1.2.4	Methodenvergleich zwischen RT-PCR und ELISPOT	
3.1.2.4.1	Antigenunabhängiger Vergleich im Rahmen der ViMS-Studie	
3.1.2.4.2	Methodenvergleich nach Influenzastimulation (ViMS-Studie)	56
3.1.2.4.3	Immunitätsäquivalenz zwischen Flu A/PR/8/34 und den Impfstämmen	
3.1.2.5	Methodenvergleich zwischen RT-PCR und ELISA	
3.1.3	T-Zellantworten nach Influenzaschutzimpfung	57
3.1.4	T-Zellantworten nach natürlicher Atemwegsinfektion	59
3.1.5	Virus-Serologie nach Impfung und Atemwegsinfektion	63
3.2	Virologisch-immunologische Untersuchungen	65
3.2.1	Humanes basisches Myelinprotein (hMBP)	65
3.2.2	MBP-spezifische T-Zelllinien	69
3.2.2.1	Vorexperimente und Kulturoptimierung	70
3.2.2.2	T-Zellspezifität und -klonalität	71
3.2.2.3	Phänotypisierung durch FACS	72
3.2.2.4	Charakterisierung der Zytokinsekretion und ELISA	73
3.2.3	<i>In vitro</i>-Infektion humaner T-Zellen	75
3.2.3.1	Proliferation von PBMC nach Virusinfektion	
3.2.3.1.1	<i>In vitro</i> -Infektion von PBMC mit Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	

3.2.3.1.2	<i>In vitro</i> -Infektion von PBMC mit HHV-6B (Z29)	
3.2.3.2	Koinkubationsmodell mit HHV-6B-infizierten MT-4 Zellen	77
3.2.3.3	Proliferation Ag-spezifischer T-Zelllinien nach Virusinfektion	78
3.2.3.3.1	<i>In vitro</i> -Infektion antigenspezifischer Zellen mit Flu A/PR/8/34 (H1N1)	
3.2.3.3.2	<i>In vitro</i> -Infektion antigenspezifischer Zellen mit HHV-6B (Z29)	80
3.2.4	Untersuchungen zu HHV-6-Reaktivierung im Serum	
3.2.4.1	HHV-6-Serologie	81
3.2.4.2	HHV-6-DNA-Nachweis mit semi-nested PCR	82
4	Diskussion	
4.1	Impfung und Infektion bei der MS (ViMS-Studie)	83
4.1.1	Frequenz und Reaktivität autoreaktiver T-Zellen im Blut	
4.1.2	ELISPOT, ELISA und quantitative RT-PCR	86
4.1.3	Zelluläre und humorale Impfantworten	87
4.1.4	MBP-spezifische T-Zellen während Atemwegsinfektion	
4.1.5	Autoimmunität nach Impfung oder Infektion	
4.2	Virologisch-Immunologische Untersuchungen	88
4.2.1	Humanes Zellkulturmodell für die Multiple Sklerose	89
4.2.2	<i>In vitro</i> -Infektionsversuche mit Influenzavirus A	
4.2.3	<i>In vitro</i> -Infektionsversuche mit HHV-6B	90
4.2.4	Klinische Untersuchung zur HHV-6-Reaktivierung	91
4.3	Zusammenfassung	
5	Literatur	93
6	Anhang	107
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Verzeichnis der Abkürzungen

A

Ab	Antikörper (antibody)
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung(en)
ABTS	2,2'- Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic acid)
α CD3	anti-CD3-Antikörper
ADEM	Akute Disseminierte Enzephalomyelitis
Ag	Antigen
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n) (antigen presenting cell(s))

B

BCIP	5- Brom-4-Chlor-3-Inositolphosphat
bdH ₂ O	zweifach (bi-) quarzdestilliertes Wasser (H ₂ O)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)

C

CD	Cluster of differentiation (Nomenklatur für Antigene auf Zelloberflächen)
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
Ci	Curie (Einheit der Strahlungsaktivität)
CPE	Zytopathischer Effekt (cytopathic effect)
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle (counts per minute)

D

DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
dNTP	Desoxynukleosintriphosphat

E

EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Endkonzentration (endconcentration)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme linked immunosorbent spot assay

FFACS Zytofluorometrie (**f**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**can)FAM 6-carboxy-**f**luoresceinFCS Fötale Rinderserum (**f**etal **c**alf **s**erum)

Flu Influenzavirus

Gg Fallbeschleunigung (**g**ravity) = 9,81 m·s⁻²**H**HAE **H**ämagglutinierende **E**inheit(en)HAT **H**ämagglutinationstestHHV-6 **h**umanes **H**erpesvirus 6HPLC Hochdruckflüssigkeitschromatographie
(**h**igh **p**ressure **l**iquid **c**hromatography)**I**IFN γ **I**nterferon **g**ammaIg **I**mmunglobulinIL **I**nterleukin (z. B. IL2, IL4)**K**kD **K**ilodalton**L**Lf **L**aufende **F**lockungseinheit (**l**imit of **f**locculation) für TT**M**M **M**olar (=mol/l)MBP basisches Myelinprotein (**m**yelein **b**asic **p**rotein)MHC Haupthistokompatibilitätskomplex
(**m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex)MOG **M**yelein-**O**ligodendrozyten-**G**lykoproteinMOI **m**ultiplicity of **i**nfectionmRNA Boten-Ribonukleinsäure (**m**essenger **r**ibonucleic **a**cid)MS **M**ultiple **S**klerose**N**NBT **N**itroblautetrazoliumsalzn d nicht bestimmt (**n**ot **d**etermined)**O**OD **o**ptische **D**ichte**P**PAGE **P**olyacrylamid-**G**elektrophoresePBMC Lymphozyten im Blut (**p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells)PBS Phosphatgepufferte Salzlösung (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)PCR **P**olymerasekettenreaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaction)

PFA	P araformaldehyd
PFU	Plaquebildende Einheiten (p laque f orming u nits)
pH	„ p ondus H ydrogenii“ Maß f. Wasserstoffionenkonzentration
PHA	P hyto h ämagglutinin
POD	P eroxidase
R	
R ₀	RPMI-Medium + Antibiotika/Glutamin ohne Serumzusatz
R ₅	R ₀ + 5 % Eigenserum
R _{ab}	R ₀ + 5 % AB-Serum
rpm	Umdrehungen (rounds) p ro M inute
RT	R aumtemperatur
RT-PCR	r everse T ranskriptase- P CR
S	
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium d odecyl sulphate)
SI	S timulationsindex
T	
Tab.	T abelle
TAMRA	6-carboxy- t etramethyl- r hodamine
TCID ₅₀	t issue c ulture i nfective d ose 50
TCL	T-Zell-Linie (T cell line)
Th	T - H elferzelle oder Subpopulation (Th1/Th2)
TNF α	T umornekrosefaktor a lpha
TRIS	T ris [hydroxymethyl] aminomethan
TT	T etanustoxoid
U	
U	internationale Einheit (u nit)
V	
Vac	trivalenter Influenza Spaltimpfstoff (Influvac [®])
ViMS	Impfung in MS (V accination in M ultiple S clerosis)-Studie
W	
wpI	Woche(n) nach Infektion (w eek(s) p ost i nfection)
wpV	Woche(n) nach Impfung (w eek(s) p ost v accination)

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose ist weltweit die häufigste entzündlich demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems und betrifft vor allem junge Erwachsene mit einem Altersgipfel zwischen 20-45 Jahren.¹ Die Prävalenz beträgt in Nordeuropa etwa 1:1000. Bei ca. 85% der Patienten beginnt die Erkrankung schubförmig, d. h. mit Episoden von neurologischen Funktionsausfällen, die für einige Wochen anhalten und sich danach komplett zurückbilden können.² Während des natürlichen Verlaufes kommt es mit zunehmenden Schüben häufig zu unvollständigen Rückbildungen der Symptome, so daß eine allmähliche, schubunabhängige Verschlechterung eintritt (sekundär progrediente Verlaufsform). Bei einem geringen Anteil (ca. 15%) nimmt die Erkrankung bereits von Beginn an einen schleichenden (primär progredienten) Verlauf. Diese Form betrifft häufig Personen, deren Erstsymptome nach dem 40. Lebensjahr auftreten.

Beim schubförmigen Verlauf ist das weibliche Geschlecht im Verhältnis von ca. 1,6:1 häufiger betroffen, wohingegen am primär progredienten Verlaufstyp etwas mehr Männer erkranken.

Histopathologisch ist die MS durch entzündliche und demyelinisierende Herde in der weißen Substanz des ZNS charakterisiert.³ Neuere immunhistologische Untersuchungen weisen auf eine deutliche Heterogenität der MS-Plaques hin. Während Entmarkungen in nahezu allen Läsionen nachweisbar sind, ist das Ausmaß von Oligodendrozytenverlust, Remyelinisierung und Axondegeneration sehr variabel. Einige Autoren unterteilen die MS anhand des immunpathologischen Musters in vier Gruppen, wobei für jede Gruppe ein unterschiedlicher Pathomechanismus angenommen wird.⁴ Diese Klassifikationsversuche unterstreichen die Komplexität des vorliegenden Krankheitsbildes und werfen die Frage auf, ob die klinisch häufig sehr unterschiedlichen Muster verschiedene Entitäten widerspiegeln. Ebenso ungewiß ist, inwiefern eine Verbindung zu der seltenen akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) besteht, für die eine postinfektiöse Ätiologie angenommen wird.⁵

1.2 Multiple Sklerose und T-Zell-Immunologie

Immunhistologisch lassen sich zelluläre Infiltrate nachweisen, die hauptsächlich aus eingewanderten T-Zellen und Makrophagen bestehen. Den vielfach in Blut und Liquor von MS-Patienten nachgewiesenen, gegen bestimmte Myelinbestandteile gerichteten T-Zellen fällt dabei eine wichtige immunpathogenetische Rolle zu.³ Es ist das basische Myelinprotein (MBP) eines der bestuntersuchten potentiellen Autoantigene bei der MS.^{6, 7} Wenngleich hinsichtlich der Vorläuferfrequenzen MBP-spezifischer T-Zellen zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollspendern keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden konnten⁷⁻¹⁰, geht man heute davon aus, daß nicht die alleinige Anwesenheit autoantigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Repertoire, sondern ihr Aktivitätsgrad¹¹⁻¹³ und Phänotyp¹⁴⁻¹⁶ pathogenetisch von Bedeutung sind.

Die über *in vitro*-Versuche und das Tiermodell der EAE (s.u.) hinausgehende Relevanz dieses Autoantigens für den Menschen, wird unterstützt durch Ergebnisse einer aktuellen Phase II-Studie mit dem immunogenen, zu therapeutischen Zwecken veränderten MBP-Peptid (83-99). Die Verabreichung einer Dosis von 50 mg s.c./Woche führte bei 3 von 8 Patienten zu einem Schub mit hoher Krankheitsaktivität und einer drastischen Zunahme neuer, großer kontrastmittelaufnehmender Herde in der Kernspintomographie, welche Ausdruck einer gestörten Bluthirnschranke sind. Parallel fand sich ein Anstieg der MBP-spezifischen T-Zellen in Blut und Liquor um das 1000-fache.¹⁷

Mit dem klassischen Tiermodell der aktiven (Rückenmarkshomogenat, MBP) bzw. später adoptiven Transfer-EAE (MBP-spezifische T-Zellen) konnte bereits 1933 die Bedeutung von Autoantigenen und somit die Autoimmunhypothese erarbeitet werden.¹⁸ Neuerdings können in entsprechenden Tierstämmen durch Verwendung verschiedener Myelin-Antigene oder deren immundominanter Peptide (vgl. Tab. 1) und Adjuvantien zum Teil inflammatorische, zum Teil überwiegend demyelinisierende Läsionen, entweder monophasische oder relapsierende Verläufe erzeugt werden, die den distinkten klinischen Entitäten der MS näherkommen.¹⁹

Tabelle 1: Zusammenfassung putativer Autoantigene bei der MS

Autoantigen	Abk.	Anteil am Gesamtmyelin	Funktion/Relevanz
Proteolipidprotein	PLP	50%	Myelinkompaktierung ^{20,21}
Basisches Myelinprotein	MBP	30%	Myelinkompaktierung ^{7-9, 14, 22}
Zyklonukleotid-phosphodiesterase	CNPase	3-4% Retina, PBMC	Hydrolyse cyclischer Nukleotide ²³
Myelin-assoziiertes Glykoprotein	MAG	1%	Myelin-Axon-Interaktion ^{24, 25}
Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	MOG	0,1%	unbekannt ²⁶
S-100 β	S-100 β	Astrozyten, Auge, Thymus, Lymphknoten	Kalziumbindendes Signalprotein ²⁷
α B-Crystallin	-	konstitutiv, Auge, EBV-induziert ²⁸	Hitzeschockprotein hsp27 ²⁹
Transaldolase	-	Mitochondrien	Enzym des Pentosephosphatzyklus ³⁰

Hierbei gewinnt neben MBP das unlängst beschriebene Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) zunehmend an Bedeutung. Während sich MBP und PLP in tiefer gelegenen Myelinschichten befinden, liegt das am Gesamtmyelin anteilmäßig geringere MOG an der Oberfläche und ist somit für immunologische Wechselwirkungen mit Lymphozyten leichter verfügbar. Auch wurden MOG-spezifische Antikörper bei MS-Patienten gefunden, was der mittlerweile pathogenetisch wieder mehr beachteten Rolle des humoralen Immunsystems Rechnung trägt.^{31 32} Über das sogenannte „Epitope Spreading“ kommt es während des Krankheitsverlaufes vermutlich zu einer Ausweitung unterschiedlicher Antigenspezifitäten.^{33, 34}

1.3 Virusinfektionen und Multiple Sklerose

1.3.1 Hinweise für eine Infektassoziation

1.3.1.1 Historische Vorbemerkungen

Im Jahre 1868 beschrieb Jean Martin Charcot die klinischen Merkmale der ersten menschlichen Entmarkungskrankheit und faßte diese zu einer Krankheitsentität zusammen, die er „Sclérose en Plaques“ nannte. In den folgenden zwei Jahrzehnten begründeten Koch und Pasteur eine neue Ära der Infektionskrankheiten und damit der Mikrobiologie.

logie. Es war also ein Zeichen der Zeit, daß 1884 Pierre Marie, einer der Schüler Charcots und dessen Nachfolger auf dem Lehrstuhl des damals wohl bedeutendsten Instituts für Neurologie in Paris, eine infektiologische Ursache der MS vermutete.³⁵ In einer ausführlichen Abhandlung betont Pierre Marie den zeitlichen Zusammenhang zwischen Erstmanifestation der MS und vorangegangenen akuten Infektionskrankheiten (les maladies aiguës), wie dem epidemischen Fleckfieber (Rickettsiose, fièvre typhoïde).³⁶ Auch traten später in Folge der Tollwutimpfungen mit Pasteur's „virus fixe“ jedoch aufgrund der präparationsbedingt enthaltenen Myelinbestandteile vermehrt Enzephalomyelitiden im Sinne einer ADEM auf.

1.3.1.2 Epidemiologie

Deutliche Hinweise für einen Zusammenhang zwischen MS und Infektionskrankheiten lassen sich aus epidemiologischen Studien ableiten. So fanden Kurtzke und Mitarbeiter weltweit drei geographische Regionen mit hoher ($> 30/100000$), mittlerer ($5-30/100000$) und niedriger Prävalenz ($< 5/100000$) mit Abnahme der Prävalenz zum Äquator.³⁷

Weiterhin folgerte man aus zahlreichen Migrationsstudien, daß ein Umweltfaktor das Krankheitsrisiko vor der Pubertät beeinflussen muß, da Erwachsene über 14 Jahren, die von hohen in niedrigere Prävalenzregionen auswanderten, das Erkrankungsrisiko ihres Geburtslandes beibehielten. Immigranten von niedrigen in hohe Prävalenzgebiete nahmen hingegen sogar ein über das der einheimischen Bevölkerung des Einwanderungslandes hinausgehendes Risiko an, wenn sie den Wohnort zwischen 11 und 45 Jahren änderten.³⁸

Da zudem lediglich 20-30% monozygote Zwillinge krankheitskonkordant sind und nur in etwa weiteren 10% der Fälle klinisch gesunde Zwillinge kernspintomographische Auffälligkeiten zeigen, können oben erwähnte Zusammenhänge nicht rein genetisch erklärt werden.³⁹⁻⁴¹ Interessanterweise ergab eine Konkordanzstudie bei Poliomyelitis vergleichbare Zahlen (monozygote Zwillinge 36%, dizygote Zwillinge 6%).⁴² Dieser Vergleich könnte vermuten lassen, daß auch bei der MS in genetisch prädisponierten Individuen ein möglicherweise ubiquitär vorkommendes Virus für die Krankheitsentstehung von Bedeutung sein kann. Berichte über lokal begrenzte Krankheitsausbrüche, v. a. auf den Faröer-Inseln⁴³, aber auch in Island³⁷ und Key West⁴⁴ bieten durchaus Ver-

gleichsmöglichkeiten mit typischen Infektionsepidemien, werden jedoch aufgrund ihrer statistisch grenzwertigen Befunde vielfach angezweifelt.⁴⁵⁻⁴⁸

1.3.1.3 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Ein diesbezüglich bemerkenswerter Ansatz wurde durch Joan Goverman verfolgt, die bei transgenen B10.PL-Mäusen mit spezifischen T-Zellrezeptoren (TCR) für das immundominante MBP-Epitop im Gegensatz zu den gängigen induzierten EAE-Formen eine spontane Variante fand. Dabei erkrankten ausschließlich Tiere, die Kontakt zu mikrobiellen Keimen hatten, nicht solche, die unter keimfreien Bedingungen gehalten wurden.⁴⁹ Diese Beobachtung bestätigt die Rolle von mikrobiellen Einflüssen, ohne die es - trotz genetischer Prädisposition - nicht zur Krankheitsentstehung kam.

1.3.1.4 Demyelinisierende Virusinfektionen bei Tieren

Obschon keine der im Folgenden zusammengefaßten Entmarkungskrankheiten bei Tieren (Tab. 2) und Menschen (Tab. 3, s. Kap. 1.3.1.4) dem klinischen Verlauf mit Schüben und Remissionen oder den neuropathologischen Eigenschaften bei der MS unmittelbar entsprechen, werden diese dennoch als Modelle zur Untersuchung direkter und indirekter Mechanismen der virus-vermittelten Entmarkung verwendet. Für Einzelheiten wird auf Übersichtsarbeiten hingewiesen.^{35, 50, 51}

Tabelle 2: Virusinduzierte Demyelinisierung bei Tieren

Virusfamilie	Virus	Wirt	Referenz
Papovaviridae	SV ₄₀	Meerkatzen	52
Paramyxoviridae	CDV	Hunde	53
Coronaviridae	JHM-MHV	Mäuse / Ratten	54-56
Picornaviridae	TMEV	Mäuse	57, 58
Togaviridae	SFV	Mäuse	59
Rhabdoviridae	Chandipura	Mäuse	60
Lentiviridae	Visnavirus	Schafe	61

Abk.: SV₄₀: Simian-Virus 40, CDV: Canines Distemper Virus (Hundestaupe), JHM-MHV: JHM-Stamm des Maus-Hepatitis-Virus, TMEV: Theiler Murines Enzephalomyelitis Virus, SFV: Semliki Forest Virus, modifiziert nach Johnson³⁵

1.3.1.5 (Para-/Post-)Infektiöse Entmarkungskrankheiten beim Menschen

Analog zu Kap. 1.2.1.4 sind in Tabelle 3 die wesentlichen Erkrankungen mit virusinduzierter Demyelinisierung und bisweilen langen Inkubationszeiten beim Menschen subsumiert. Auch hier bestehen große Unterschiede zu den typischen MS-Verläufen und -Pathologien. Allenfalls läßt sich die Akute Disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) klinisch zunächst kaum von einer schweren MS unterscheiden.

Tabelle 3: Virusinduzierte Demyelinisierung beim Menschen

Erkrankung	Abk.	Pathogen	Referenz
Akute disseminierte Enzephalomyelitis	ADEM	Masernvirus, VZV, Flu, RTI, Impfungen, etc.	18, 62
Subakute Sklerosierende Panenzephalitis	SSPE	Masernvirus (Morbilliviridae)	63
Progressive Röteln Panenzephalitis	PRP	Rötelnvirus (Rubeolaviridae)	64
Progressive Multifokale Leukenzephalopathie	PML	JC-Virus (Papovaviridae)	65
HHV-6-Leukenzephalitis	-	HHV-6 (Herpesviridae)	66
HIV-Enzephalopathie	-	HIV (Lentiviridae)	67, 68
HTLV-I assoziierte Myelopathie / Tropische spastische Paraparese	HAM / TSP	HTLV I (Retroviridae)	69, 70

Abk: VZV: Varicella-Zoster-Virus, Flu: Influenzavirus, RTI: Respirationstrakt-Infektionen (unspezifisch, meist viral), HHV-6: Humanes Herpesvirus 6, HIV: Humanes Immundefizienz-Virus, HTLV I: Humanes T-Zell-Leukämie-Virus

1.3.1.6 Klinisch-immunologische Untersuchungen

1.3.1.6.1 Erhöhte Antikörpertiter bei MS-Patienten

In Seren und Liquores von MS-Patienten wurden in mehreren Studien konsistent im Vergleich zu Kontrollpersonen ebenfalls höhere Antikörpertiter gegen Masern-Virus (Adams, Imigawa, 1962) und andere virale Antigene (Mumps, Parainfluenza 1, Influenza C, Herpes Simplex, Varicella Zoster, Röteln, Vaccinia, Epstein-Barr, Paramyxovirus SV₅⁷¹, etc.) gefunden, wenngleich dies von anderen auf eine erhöhte aber unspezifische Immunoreaktivität im Rahmen allgemeiner Infektionen zurückgeführt wurde (Zusammenfassung bei Norrby 1978)⁷². Der Begriff MRZ (Masern, Röteln, Zoster)-Reaktion beschreibt eine bei der MS häufige Konstellation der polyspezifischen Antikörperantwort durch möglicherweise eingewanderte B-Lymphozyten.⁷³

1.3.1.6.2 MS-Schübe nach IFN γ -Behandlung

Im Rahmen einer Phase-II-Studie mit Interferon γ ergaben sich bei intravenöser Applikation von 1, 30 oder 1000 μg deutlich mehr Schübe als unter Placebo, was dosisunabhängig war und unter anderem auf den beobachteten Anstieg der MHC Klasse II-positiven Monozyten zurückgeführt wurde.⁷⁴ Da große Mengen IFN γ vor allem nach viralen Infektionen sezerniert werden, wurde dies als eine mögliche Erklärung für die Schubauslösung nach viralen Infektionskrankheiten gedeutet.⁷⁵

1.3.1.6.3 MS-Schübe bei Infektionen der oberen Luftwege

Sibley und Mitarbeiter untersuchten über einen Zeitraum von 8 Jahren prospektiv 170 Patienten mit MS und 134 gesunde Probanden. Dabei fanden sie, daß bei den MS-Patienten Schübe in der Zeit um einen Infekt („at risk“ = 2 Wochen vor und 5 Wochen nach Infektionsbeginn) etwa 3 mal häufiger auftraten, als außerhalb des sogenannten Risikozeitraums („not at risk“). Zusätzlich standen 8,6% der überwiegend viralen, respiratorischen bzw. gastrointestinalen Infektionen in einem zeitlichen Zusammenhang zu Schüben, während 27% der Schübe zeitlich Infektionen zugeordnet werden konnten.⁷⁶ Ähnliche Ergebnisse erzielten auch andere Gruppen, ohne daß ein einzelnes spezifisches Virus identifiziert wurde.^{75, 77, 78} Während einer Influenza-Epidemie in Holland hatten von 180 untersuchten Patienten mit schubförmigen Verlauf 36 eine Influenza-

Infektion, die bei 12 (33%) innerhalb von 6 Wochen von einem Schub gefolgt wurde. Dahingegen hatten von 80 Patienten nach Influenza-Schutzimpfung nur 4 (5%) einen Schub.⁷⁹

1.3.2 Mögliche Wirkmechanismen der Krankheitsentstehung

Als Hypothesen einer virus-assoziierten Pathogenese der MS kommen verschiedene Mechanismen in Betracht, die ihre Grundlagen aus experimentellen Ergebnissen beziehen. Prinzipiell können direkte, primär virale (bei akuter / lytischer Infektion von Oligodendrozyten) oder immunvermittelte (bei persistierender Infektion von Oligodendrozyten) Mechanismen (Kap. 1.3.2.1-2), und indirekte, autoimmune Mechanismen (Reaktion auf Infektionen innerhalb und außerhalb des ZNS, Kap. 1.3.2.3-4) unterschieden werden.⁸⁰

1.3.2.1 Direkte Schädigung durch Virusinfektion der Oligodendrozyten

Viren mit zytopathischem Effekt auf die myelinbildenden Oligodendrozyten sind z. B. beim Menschen das JC-Virus (Progressive Multifokale Leukenzephalopathie), sowie bei anderen Spezies in geringerem Ausmaß das JHM-Maus-Hepatitis-Virus (JHM-MHV) und Theiler-Maus-Enzephalomyelitis-Virus (TMEV).

1.3.2.2 Immunvermittelte Schädigung virusinfizierter Oligodendrozyten

Durch die virus-spezifische Immunantwort kann es zu einer sekundären Demyelinisierung kommen. Beispielfhaft seien TMEV und Semliki Forest Virus (SFV) genannt, bei denen infizierte Oligodendrozyten entweder direkt durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), indirekt über eine DTH-Reaktion (delayed type hypersensitivity), wenn virale Peptide auf der Oligodendrozytenoberfläche präsentiert werden, oder über lösliche Faktoren in der Umgebung dieser Entzündungsreaktion (Komplement, Proteinasen, $\text{TNF}\alpha$, Stickstoffmonoxid (NO), etc.) geschädigt werden.⁸¹

Hierbei kann es zur Wechselwirkung viraler und autoimmuner Prozesse im ZNS kommen, so daß eine scharfe Trennung nicht sicher möglich ist.⁸² So begünstigen die zytokinvermittelt hochregulierten MHC-Klasse I/II- und kostimulierenden Moleküle die Präsentationsfähigkeit von freigesetzten kryptischen (verborgenen) Epitopen, die entweder direkt nach virusbedingter Zell-Lyse oder indirekt über zytokinvermittelte Akti-

vierung von Proteasen entstehen. Dies kann zur Aktivierung ruhender autoreaktiver Lymphozyten führen.⁸³ Angedacht wurde sogar die Integration von Selbstantigenen (Glykolipide / MHC-Moleküle) in die Virushülle im Zuge des „virus budding“.^{84, 85}

1.3.2.3 Indirekte Schädigung bei unspezifischer ZNS-Infektion

Bei einer persistierenden viralen Infektion im ZNS können über autoimmune Mechanismen auch nicht-infizierte Zellen geschädigt werden. Hierbei kommen generell ähnliche Prozesse in Frage, wie sie in Kap. 1.3.2.2 behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Schädigung müssen Viren nicht notwendigerweise nachweisbar sein.

1.3.2.3.1 Erleichterte Zellmigration (Lymphocyte Homing)

Da im Gehirn als immunprivilegiertem Organ, geschützt durch die Immunbarriere der Bluthirnschranke, normalerweise kaum immunkompetente Zellen vorliegen oder MHC Klasse II-Moleküle exprimiert werden, kommt es natürlicherweise nicht zur Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen über den sogenannten trimolekularen Komplex (T-Zellrezeptor, MHC-Klasse II-Molekül der antigenpräsentierenden Zelle mit dem spezifischen Autoantigen). Daher ist für eine entzündliche Demyelinisierung im ZNS die Einwanderung und Aktivierung von autoreaktiven Zellen pathogenetisch entscheidend. Es ist vorstellbar, daß auf dem Boden einer Bluthirnschrankenstörung (z. B. durch eine Virusinfektion des Endothels) oder getrieben durch das entzündliche Milieu mit Chemokinen / Adhäsionsmolekülen in der Umgebung einer Infektion vermehrt autoreaktive Lymphozyten einwandern. Aktivierte Zellen können auch bei intakter Bluthirnschranke ins Gehirn einwandern.⁸⁶ Es ist bekannt, daß myelin-spezifische Zellen, wie auch andere aktivierte Zellen, nur bei lokaler Expansion durch Zielantigenerkennung im ZNS verweilen, ansonsten wie Zellen anderer Spezifität dieses Kompartiment wieder verlassen.⁸⁷

1.3.2.3.2 Kreuzreaktivität (Molecular mimicry) und Epitope Spreading

Bei strukturellen Ähnlichkeiten zwischen immunogenen Epitopen neurotroper Viren und Myelinbestandteilen können im ZNS virus-spezifische T-Lymphozyten zusätzlich Oligodendrozyten schädigen. Hierbei kann es auch zur erwähnten Ausweitung der Antigenerkennung auf mehrere Epitope eines Myelinantigens (intramolekulares epitope

spreading) oder verschiedener Myelinbestandteile (intermolekulares epitope spreading) kommen.

1.3.2.3.3 Lokale Begleitreaktion im ZNS (Local Bystander Activation)

In der unmittelbaren Umgebung einer ZNS-Infektion kann es durch unspezifische Aufregulierung von proentzündlichen Faktoren zu einer Mitaktivierung myelinspezifischer T-Zellen und somit einer direkten oder indirekten Demyelinisierung kommen.

1.3.2.4 Aktivierung autoreaktiver Zellen bei systemischer Infektion

Entsprechend den Mechanismen bei zerebralen Infektionen gelten vergleichbare Prinzipien auch bei systemischen Infektionen, wenn autoreaktive Zellen außerhalb des ZNS aktiviert werden und wie in Kap. 1.3.2.3.1 beschrieben durch die Bluthirnschranke ins Gehirn einwandern.

1.3.2.4.1 Kreuzreaktivität (Molecular Mimicry)

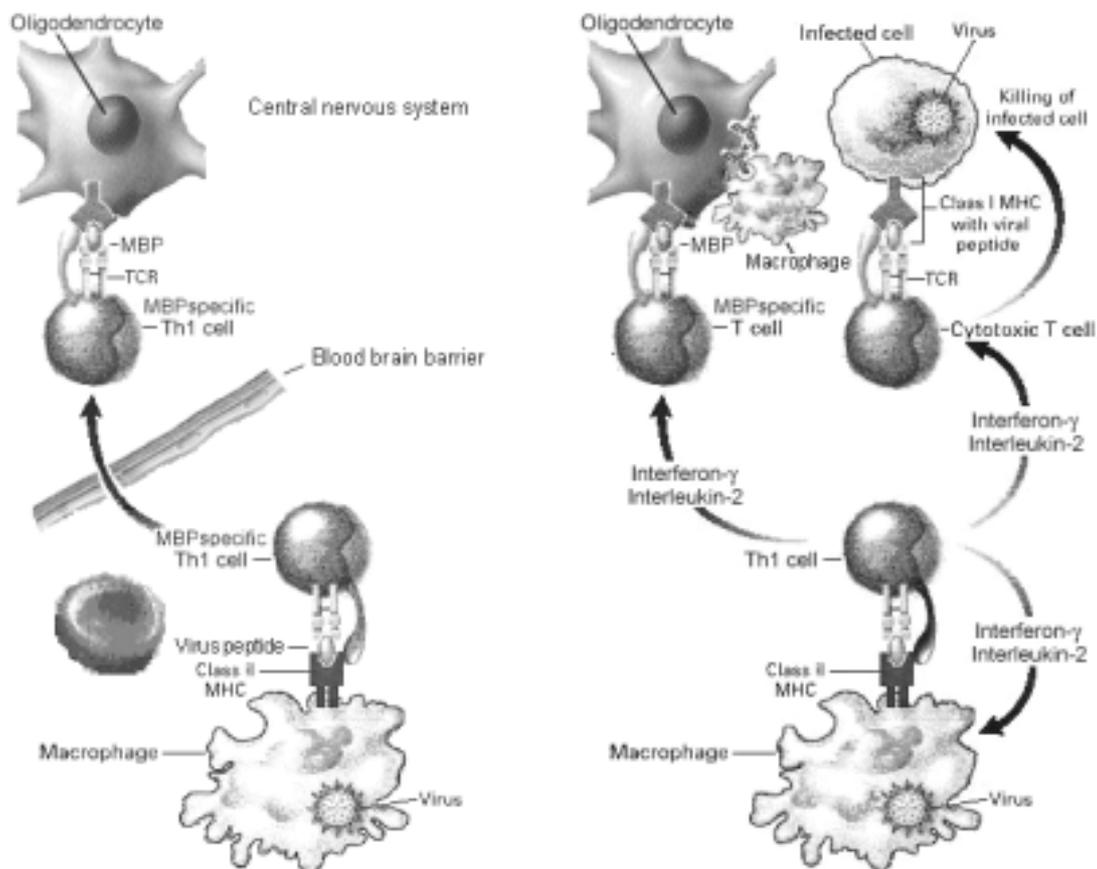
Das Prinzip der Molecular Mimicry wurde erstmals 1985 beschrieben, als gezeigt werden konnte, daß MBP-spezifische T-Zellen mit sequenzhomologen Epitopen von viralen Antigenen (HBV-Polymerase) kreuzreagierten.⁸⁸ Später gelang eine Aktivierung MBP-spezifischer T-Zellklone auch durch Stimulation mit nicht ausschließlich sequenzhomologen, jedoch strukturverwandten viralen und bakteriellen Peptiden.⁸⁹ Nach aktuellem Verständnis einer degenerierten Antigenerkennung von T-Zellen wird bei Würdigung des schlüssigen Grundprinzips einer höheren TCR-Flexibilität als früher angenommen Rechnung getragen.^{90 91} (Abb. 1A, vgl. Kap. 1.3.2.3.2)

1.3.2.4.2 Unspezifische Begleitreaktivität (Systemic Bystander Effect)

Tough et al. konnten zeigen, daß CD8⁺ T-Zellen unabhängig von T-Zellrezeptorsignalen (CD25/CD69), stimuliert durch IFN Typ I oder dessen Induktor Polyinosin-Polycytidylsäure (poly(I:C)), über längere Zeiträume *in vivo* überlebten. Außerdem konnte die klonale Expansion und das Überleben von antigen-spezifischen T-Zellen durch diese unspezifische Stimulation potenziert werden.

Abbildung 1: Übersichtsschemata von Molecular Mimicry (A) und Bystander Effect (B)
A: Durch Kreuzreaktivität zwischen Autoantigen und Fremdantigen (Viruspeptid) können autoreaktive (z. B. MBP-spezifische) T-Zellen im peripheren Immunsystem über den trimolekularen Komplex aktiviert werden. Diese Zellen können durch die Bluthirnschranke ins ZNS einwandern und erneut z. B. über organspezifische antigenpräsentierende Zellen mit dem eigentlichen Autoantigen aktiviert werden.

B: Im Rahmen einer virus-spezifischen Immunreaktion können auch autoreaktive (z. B. MBP-spezifische) T-Zellen mitaktiviert werden und somit zu einer Autoimmunreaktion beitragen. Abbildungen modifiziert nach Delves und Roitt⁹².



A

B

Die Autoren deuten die Langlebigkeit von $CD8^+$ -Gedächtnis-T-Zellen (Memory Cells) nach virusinduzierter Freisetzung von Typ I-IFN in zweierlei Richtung. Zum einen benötigen bereits vorhandene Gedächtniszellen nicht den ständigen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen oder kreuzreagierender Antigene, sondern es genügen gelegentliche Kontakte zu IFN Typ I, welches durch zwischenzeitliche Virusinfekte freigesetzt wird.

Zum anderen können während der Erstantwort auf Virusinfektionen im Sinne einer Adjuvansfunktion durch lokal sezerniertes IFN Typ I frühe Gedächtniszellen besser stimuliert werden und länger überleben.⁹³

Im Rahmen einer Autoimmunität würden diese Ergebnisse einen virusinduzierten Mechanismus der unspezifischen Aktivierung autoreaktiver Gedächtniszellen bedeuten.

Dies könnte auch erklären, warum aktive Virusinfektionen starke Immunantworten auslösen können, während Virus-Peptide ohne Zusatz künstlicher Adjuvantien nur schwach immunogen sind. Daneben können Mikroorganismen durch proliferative / supprimierende Wirkung auf distinkte T-Zellsubtypen bzw. durch Beeinflussung bestimmter Zytokinprofile das Immungleichgewicht stören, was möglicherweise zu einer Aktivierungskaskade latenter Autoimmunität führt.⁹⁴ Dies wurde durch Coxsackie-Virusinfektion in einem transgenen Mausmodell bereits für die Entstehung des ebenfalls autoimmunbedingten Typ-I Diabetes gezeigt.⁹⁵

1.3.2.4.3 Mikrobielle Superantigene

Beim Typ I-Diabetes wurde ein dem Maus-Mammary-Tumorvirus (MMTV) verwandtes, humanes endogenes Retrovirus (HERV) isoliert, welches ein MHC Klasse II-bindendes Superantigen kodiert. Es wurde postuliert, daß es durch Überbrückung von leeren Antigenbindungsstellen zwischen V β -Kette des T-Zellrezeptors (TCR) und MHC-Molekül der antigenpräsentierenden Zellen zu einer systemischen Aktivierung autoreaktiver T-Zellen kommen könnte.⁹⁶ Ende der 80er Jahre wurden retrovirale Sequenzen auch in einer Leptomeningeal-Zelllinie eines MS-Patienten⁹⁷ und später wiederholt auch in Zellen des Plexus choroideus und EBV-immortalisierten B-Zellen gefunden.⁹⁸ Da zusätzlich Superantigene häufig als Adjuvantien für die Auslösung der EAE eingesetzt wurden,⁹⁹ wäre über die superantigene Eigenschaft der sogenannten MS-assoziierten Retroviren (MSRV)⁹⁸ eine unspezifische Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im ZNS vorstellbar.

1.3.2.5 Mehrfachinfektion / Pathogenwechselwirkungen

In Anlehnung an die epidemiologischen Erkenntnisse aus den Migrationsstudien und der höheren Prävalenz in Ländern mit gehobenem hygienischen Standard wird versucht, der multifaktoriellen Genese bei fehlendem Nachweis eines einzelnen Umweltfaktors

durch komplexere Theorien gerecht zu werden. So vermutet man bislang nicht bekannte Viren mit langer Latenzphase oder eine Reaktivierung retroviraler Elemente durch z. B. Herpesinfektionen^{100, 101}

1.4 Viren mit möglicher Relevanz

1.4.1 Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)

Erstmals 1986 aus peripheren Blutlymphozyten von 6 immunsupprimierten Patienten isoliert, wurde das humane Herpesvirus 6 zunächst als humanes B-lymphotropes Virus (HBLV) bezeichnet,¹⁰² bevor man den bevorzugten T-Zelltropismus erkannte.

1.4.1.1 Taxonomie

Aufgrund seiner genetischen Verwandtschaft zum Cytomegalievirus (CMV) wird es den beta-Herpesviren zugeordnet. Anhand der Sequenz unterscheidet man zwischen den beiden Varianten HHV-6A und HHV-6B. HHV-6A konnte bislang keiner Krankheit zugeordnet werden, während HHV-6B als das ätiologische Agens des Dreitagefiebers (Exanthema subitum, Roseola infantum) gilt. Die Seroprävalenz beträgt weltweit > 95% bei einem Alter > 2 Jahren.¹⁰³ Etwa 5% sind dauerhaft HHV-6-IgM-seropositiv.

Das umhüllte DNA-Virus ist 160-200nm groß, das Genom ist 167kbp lang. Wirtszellen (CD4+/CD8+T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen) entwickeln bei Infektion einen typischen zytopathischen Effekt (CPE) mit Anschwellung und gelegentlich Synzytienbildung.¹⁰⁴ Weitere Auswirkungen auf Immunzellen, wie eine CD4-Expression an der Oberfläche von T-Zelllinien und CD8+T-Zellen/NK-Zellen wurden mit früher Genexpression oder einem Virion Protein, die Suppression von CD3/TCR mit der Replikation viraler DNA in Verbindung gebracht.¹⁰⁵ HHV-6 reduziert wachstumsfaktor-abhängiges Aussprossen von Makrophagen¹⁰⁶ und hemmt die Lymphoproliferation, ebenfalls über ein Virion Protein.¹⁰⁷ Die virusinduzierte IFN α -Sekretion erfolgt möglicherweise über Signaltransduktion durch Zell-zell-Interaktionen. Außerdem werden TNF α - und IL-1b-Expression auf transkriptioneller Ebene unabhängig von Virusinaktivierung induziert.¹⁰⁸

1.4.1.2 Pathogenität

Aufgrund der Nachweisbarkeit in Speichel und Mundspeicheldrüsen geht man von einer oralen Tröpfcheninfektion mit primärer Oropharynxbeteiligung aus. Das Virus persistiert in T-Lymphozyten und Oligodendroglia. HHV-6 ist mit kindlichen Fieberkrämpfen assoziiert und es gibt HHV-6-Enzephalitiden von milden bis hin zu letalen Verläufen mit disseminierter Demyelinisierung.^{109, 110} Über differentielle PCR-Technologie konnte HHV-6 DNA in aktiven MS-Plaques, jedoch in geringerer Menge auch in gesundem Gewebe und Nicht-MS-Patienten nachgewiesen werden.¹¹¹ Ferner konnten gegenüber gesunden Kontrollpersonen und solchen mit anderen neurologischen Erkrankungen erhöhte Antikörpertiter und DNA im Plasma nachgewiesen werden.¹¹²⁻¹¹⁴ Andere Arbeitsgruppen konnten diese Assoziation zur MS jedoch nicht reproduzieren.¹¹⁵⁻¹²¹ Eine gute Gegenüberstellung der veröffentlichten Daten geben Knox et al.¹²²

1.4.2 Influenzavirus¹²³

Bereits 412 v. Chr. wurden von Hippokrates Influenzaepidemien berichtet; die berühmte „Spanische Influenza“-Epidemie 1918-19 war weltweit für den Tod von 20-40 Millionen Menschen verantwortlich. Isoliert wurde das Virus erst 1933.¹²⁴

1.4.2.1 Taxonomie

Auf der Grundlage von Antigenitätsunterschieden ihrer Nukleoprotein- (NP) und Matrixprotein- (M) Antigene werden Isolate in die Gruppen A, B und C eingeteilt und weiter nach ihrem ursprünglichen Wirt, geographischen Ursprung, der Stammidentifikation und dem Jahr ihrer Isolation benannt. Üblicherweise wird bei menschlichen Virusisolaten der Wirtsname weggelassen. Die antigenen Determinanten Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) werden in Klammern angegeben. Ein Beispiel für den 1934 in Puerto Rico isolierten, in Forschungslaboren weltweit meistverwendeten humanen Influenza A-Referenzstamm ist: A/PR/8/34 (H1N1).

1.4.2.2 Virusstruktur und Antigenität (Shift/Drift)

Das Hämagglutinin (HA) macht 25% der viralen Proteine aus und ist an der Oberfläche des Virions gleichmäßig verteilt. Es ist für das Anheften an Sialoglykolipide/-proteine und Eindringen in die Zelle verantwortlich.

Die Neuraminidase (NA) ist aus einer einzelnen Polypeptidkette zusammengesetzt, und sitzt als pilzförmige Struktur mit vier Untereinheiten ebenfalls der Virionoberfläche auf. Das Nukleoprotein (NP), das Matrixprotein (M) mit seiner hochkonservierten Gensequenz und andere Nicht-Strukturproteine(NS1/2) spielen hier eine untergeordnete Rolle. Ab 1933 gerechnet, traten bedeutsame Antigenitätsverschiebungen (antigenic shifts) durch Gen-Rekombinationen auf. 1957 löste die asiatische Influenza (H2N2) den bisherigen Stamm H1N1 ab, 1968 das Hong Kong (H3N2) Virus; 1977 kehrte H1N1 zurück. Zu einem Antigendrift (antigenic drift) kommt es durch Anhäufung einer Serie von Punktmutationen im HA-Gen überwiegend bei Influenza A, seltener auch bei B und C. Dadurch kann es sogar während eines Krankheitsausbruchs zu einer antigenen Mikroheterogenität und somit verringerten Immunerkennung kommen.

1.4.2.3 Pathogenität und Krankheitsbild

Nach epidemiologischen und experimentellen Untersuchungen wird das Influenzavirus über hochkontagiöse Aerosole von Mensch zu Mensch übertragen. Dabei sind alle Subtypen sehr effiziente Interferon-Induktoren. Bei Symptombeginn läßt sich in Speichelsekret und Serum vor allem Interferon γ nachweisen, dessen höchste Sekretion ca. 1 Tag nach dem Höhepunkt des damit gut korrelierten Virustiters gemessen wird. Bei Infektion werden Antikörper gegen HA, NA, NP und M gebildet, wobei nur HA-/NA-Antikörper schützen.

Bei natürlichen Infektionen kommt es in 80% zu einer Antikörperantwort, einer kurzfristigen Leukozytose mit relativer Lymphopenie bis zum 3.-6. Tag nach Inokulation. Während der akuten Krankheitsphase und frühen Rekonvaleszenz kann eine Influenza A-Infektion auch DTH-Reaktionen und die Aktivierbarkeit von Blutlymphozyten unterdrücken. Dennoch können sich influenzaviruspezifische Zellantworten bilden.¹²⁵ Das klinische Bild umfaßt Husten, Schnupfen, Fieber, Hals-, Kopf- und Gliederschmerzen,

Abgeschlagenheit, sowie die Influenza-Pneumonie und bakterielle Superinfektionen als mögliche Komplikationen.

1.5 Infektionsprophylaxe

Influenzaepidemien sind jährlich für rund 20000 Todesfälle allein in den Vereinigten Staaten verantwortlich, so daß die Verhütung der Influenzainfektion und ihrer schweren Komplikationen eine vordringliche Aufgabe der Infektiologie darstellt.

1.5.1 Impfung

Die Influenzaschutzimpfung wird vor allem Menschen mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen einer Influenza-Infektion empfohlen. Dazu gehören ältere Personen (≥ 60 Jahren), Patienten mit chronischen Erkrankungen oder immunsuppressiver Therapie, sowie diejenigen, die in engem Kontakt mit diesen Personen wohnen oder arbeiten. Aufgrund der oben beschriebenen hohen Antigenvariabilität muß entsprechend der aktuellen Empfehlungen für die Impfstoffzusammensetzung durch die WHO jährlich geimpft werden. Während in den Vereinigten Staaten inaktivierte Influenzavirusstämme verwendet werden, werden in Europa Virusbestandteile (HA und NA) als sogenannte Spalt-Vakzine eingesetzt. Der Impfschutz besteht in der Regel 1-2 Wochen nach Impfung und kann vor der Erkrankung in 70-90 % schützen oder die Symptome wesentlich mildern. Da die Influenza-Saison jährlich etwa von November bis März geht, sollte eine Schutzimpfung zwischen September bis spätestens Mitte November erfolgen.¹²⁶

1.5.2 Influenzaschutzimpfung und Multiple Sklerose

Da man bei Patienten, die an einer Multiplen Sklerose erkrankt sind, durch virale Atemwegsinfektionen eine Gefahr der Schubauslösung oder Verschlechterung sieht (vgl. Kap. 1.3.1), wurde aus theoretischer Überlegung und nach Nutzen-Risikoabwägung die Influenzaschutzimpfung für MS-Patienten empfohlen (s. auch die Empfehlungen der ständigen Impfkommission des Robert Koch Instituts (STIKO)).¹²⁷ In klinischen Studien konnte überzeugend gezeigt werden, daß diese Impfung keine Verschlechterung der MS auslöste.^{79, 128-132}

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ein Hauptanliegen dieser Studie war die Untersuchung der Frage, wie und warum Infektionen anders als Impfungen bei Patienten mit klinisch gesicherter MS schubauslösend bzw. krankheitsverschlechternd wirken. In der diesbezüglich konzipierten Studie zur T-Zell-Autoimmunität während Influenza-Impfung und natürlich auftretender Atemwegsinfektionen bei MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (ViMS-Studie) sollte dieser Unterschied klinisch und immunologisch systematisch überprüft werden. Zu weiterführenden Untersuchungen auf zellulärer Ebene führten wir *in vitro*-Infektionen an dem etablierten Zellkultur-Modell MBP-spezifischer T-Zellen durch. Hierfür wurde das derzeit als „Viruskandidat“ aktuell diskutierte humane Herpesvirus 6 und das Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien für Biochemie

2.1.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Aceton (ca. 300 ml)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ammoniumhydroxid NH ₄ OH	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
bdH ₂ O (aus Serapur / -dest-Anlage)	Neurologische Uniklinik, Würzburg
Chloroform* (500 ml / 100 g Gehirn)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Methanol* (250 ml / 100 g Gehirn)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Salzsäure (HCl) 12N	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH) 5N	Merck, Darmstadt
Coomassie [®] Protein Assay	Pierce, Rockford, IL, USA

* vorgekühlt bei -20°C

2.1.1.2 Ansatz der Lösungen und Puffer

Gel-Färbelösung (Coomassie[®])

0,12 % (v/v) Serva-Blau R 250	Serva, Heidelberg
9,00 % (v/v) Essigsäure	Roth, Karlsruhe
45,00 % (v/v) Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
45,88 % bdH ₂ O	

Gel-Entfärbelösung

18 % (v/v) Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
6 % (v/v) Essigsäure	Roth, Karlsruhe
76 % (v/v) bdH ₂ O	

HPLC - Laufmittel A (als Ionenbildner)

0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
99,9 % (v/v) bdH ₂ O	

HPLC - Laufmittel B

Acetonitril (ACN)	Merck, Darmstadt
-------------------	------------------

Immunoblot - Färbemittel (gebrauchsfertig) Sigma-Aldrich, Deisenhofen

0,1 % (w/v) Ponceau S

5 % (v/v) Essigsäure

Immunoblot-Transfer-Puffer 10x konzentriert

144,0 g Glycin Merck, Darmstadt

30,30 g TRIS Merck, Darmstadt

ad 1000 ml bdH₂OImmunoblot-Transfer-Gebrauchspuffer

100 ml Puffer 10x siehe oben

200 ml Methanol J.T. Baker, Deventer, Holland

700 ml bdH₂OSDS-PAGE-Elektrodenlaufpuffer

25 mM TRIS Merck, Darmstadt

192 mM Glycin Merck, Darmstadt

0.1 % (w/v) SDS Merck, Darmstadt

SDS-Trenngel (12 %) = 10 ml3,3 ml bdH₂O

4,0 ml Rotiphere Gel 30 Roth, Karlsruhe

2,5 ml TRIS (1,5 M) pH 8,8 siehe unten

0,1 ml SDS 10 % Merck, Darmstadt

0,1 ml Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) Merck, Darmstadt

4 µl TEMED Sigma-Aldrich, Deisenhofen

SDS-Sammelgel (5 %) = 3 ml2,1 ml bdH₂O

0,5 ml Rotiphere Gel 30 Roth, Karlsruhe

0,38 ml TRIS (1,0 M) pH 6,8 siehe unten

30 µl SDS 10 % Merck, Darmstadt

30 µl Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) Merck, Darmstadt

3 µl TEMED Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Reduzierender Probenladepuffer

62,5 mM TRIS / HCl pH 8.8

8 % (w/v) SDS

15 % (w/v) Glycerin

0.01 % (v/v) Bromphenolblau

Molekulargewichtsmarker, leicht (LMW)

Pharmacia, Freiburg

94,0 kDa	Phosphorylase b
67,0 kDa	Albumin
43,0 kDa	Ovalbumin
30,0 kDa	Carbonanhydrase
20,1 kDa	Trypsin-Inhibitor
14,4 kDa	α Laktalbumin

2.1.1.3 Proteine und Antikörper

goat- α mIgG(H+L)-Peroxidase (POD)	Jackson Immunosciences / Dianova
goat- α rIgG-POD	Jackson Immunosciences / Dianova
m(IgG1) α rabbit/hMBP	Prof. Dr. C. Linington, München
m α r/hMOG	Dr. S. Jung, Neurologische Klinik
m(IgG1) α r/hP ₀	Dr. J. Archelos, Neurologische Klinik
m(IgG1) α hGFAP (G-A-5)	Böhringer, Mannheim
m(IgG2a) α h/bMBP (129-138)	Natutec/Labgen, Frankfurt (#CTS 710)
r(IgG) α b/hS100 A,B (polyklonal)	Immunotech / Dianova, Hamburg
P ₀ , rekombinantes humanes	Dr. A. Weishaupt, Neurologische Klinik

2.1.1.4 Weitere Materialien, Glas und Plastikware

Dialyse-Schlauch (Visking, Typ 36/32)	Roth, Karlsruhe
Filterpapier Whatman 41	Schleicher & Schüll, Dassel
Mikroliterspritze 100 μ l	Hamilton
Nitrozellulose-Membran BT 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Plastik-Küvetten 1 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Porzellanfilternutsche 180/110	Rosenthal, Selb
Scheidetrichter mit Teflonhahn 2 l	Schott, Mainz
Teflon-Kamm, Teflon-Spacer	Renner, Dannstadt
Vydac C4 Säule (250mm x 4mm i. D.)	Altech, Hohenbrunn
Waschflasche 2-3 l	Schott, Mainz
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.2 Material für Zellkultur

2.1.2.1 Puffer, Zellkulturmedien und Lösungen

PBS 10x

80,0 g	NaCl		Merck, Darmstadt
2,0 g	KCl		Roth, Karlsruhe
14,4 g	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O		Merck, Darmstadt
2,4 g	KH ₂ PO ₄		Merck, Darmstadt
ad 1000 ml	bdH ₂ O	pH 7,2	

PBS

100 ml	PBS 10x		siehe oben
ad 1000 ml	bdH ₂ O	sterilfiltriert	

Grundmedium (R₀)

	RPMI 1640	pH 7,4	Gibco, Eggenstein
100 U/ml	Penicillin		Biochrom, Berlin
100 µg/ml	Streptomycin		
2 mM	L-Glutamin		Gibco, Eggenstein

Stimulationsmedium, autolog (R₅)

R ₀		siehe oben
5 % (v/v)	Eigenserum	von entsprechenden Probanden

Stimulationsmedium, xenolog (R_{FCS})

R ₀		siehe oben
5 % (v/v)	fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe

MT-4-Zellkulturmedium (R₁₀)

R ₀		siehe oben
10 % (v/v)	fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe

Einfrriermedium (EM)

50 % (v/v)	R ₀	siehe oben
40 % (v/v)	Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
10 % (v/v)	DMSO	Roth, Karlsruhe
Lymphoprep	Dichte 1,077 g / ml	Nycomed, Oslo, Norwegen
[methyl]- ³ H - Thymidin	1 mCi/ml	ICN, Irvine, CA, USA (#24070)
Trypanblau	50 mg / 100 ml PBS	Roth, Karlsruhe

2.1.2.2 Zellkulturantigene und Reagentien

hMBP	1 mg / ml PBS steril	Präparation s. u. (Methoden)
IL2, rekomb.human	10 µg / ml PBS steril	Prof. Dr. W. Sebald, Phys.Chemie, Wü.
m(IgG2a)αhCD3 (X35)	lyo., ohne Azid	Coulter-Imunotech (#0178)
MOG, rekomb. humanes	3ng / ml	Dr. A. Weishaupt, Neurologische Klinik
PHA	5 µg / ml steril	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tetanus-Toxoid (4100 Lf/ml, 427,3 µg/ml)		Chiron-Behring, Marburg
Endotoxin-Test ETOXATE®		Sigma-Aldrich, Deisenhofen (#210-A1)

2.1.2.3 Zelllinien, Virusisolate und Impfstoff

MT-4-Zelllinie		ATCC, Rockville, Maryland, USA
Primäre T-Zelllinien spezifisch für MBP / TT		eigene Bestände
HHV-6B	(Isolat des Instituts)	B. Weißbrich, Virologie, Würzburg
Influenza A	(strain PR8/34)	S. Niewiesk, Virologie, Würzburg
Influvac® 98 / 99 und 99 / 00		Solvay, Hannover
Überstand EBV-infizierter B98.2 Zellen		C. Jassoy, Virologie, Würzburg

2.1.2.4 Antikörper, Puffer und Reagenzien für ELISA

m(IgG1κ)-αhIFNγ (Klon 2G1)		Endogen, Woburn, MA (#M700A)
m(IgG1)-αhIFNγ-Biotin (B133.5)		Endogen, Woburn, MA (#M701B)
m(IgG1)-αhTNFα (Klon MAb1)		Pharmingen, Hamburg (#18631D)
m(IgG1)-αhTNFα-Biotin (Mab11)		Pharmingen, Hamburg (#18642D)
r(IgG2a)-αhIL2 (MQ1-17H12)		Pharmingen, Hamburg (#18951D)
m(IgG1)-αhIL2-Biotin (B33-2)		Pharmingen, Hamburg (#23112D)
m(IgG1)-αhIL4 (8D4-8)		Pharmingen, Hamburg (#18651D)
r(IgG1)-αhIL4-Biotin (MP4-25D2)		Pharmingen, Hamburg (#18502D)
r(IgG1)-αh/viral IL10 (JES3-9D7)		Pharmingen, Hamburg (#18551D)
r(IgG2a)-αh/viral IL10-Biotin (JES3-12G8)		Pharmingen, Hamburg (#18562D)
IFNγ, rekombinantes humanes		Endogen, Woburn, MA (#R-IFNG-50)
TNFα, rekombinanter humaner		Pharmingen, Hamburg (#19761T)
IL2, rekombinantes humanes (4 ng / ml)		Pharmingen, Hamburg (#19621T)
IL4, rekombinantes humanes		Pharmingen, Hamburg (#19641V)
IL10, rekombinantes humanes		Pharmingen, Hamburg (#19701V)
Albumin, bovin, Fraktion V, low endotoxin		Sigma-Aldrich, Deisenhofen (#A4919)
Peroxidase-konjugiertes EW-Avidin (POD)		Jackson Immunotech / Dianova

Carbonat-Beschichtungspuffer 5x konzentriert (Coating Buffer, EC = 0,5 M)

4,2 g NaHCO₃ Merck, Darmstadt
 100 ml bdH₂O pH 8,2

PBS-Milchpulver 2 % (w/v) (PBS-MP) Lagerung in 50 ml - Aliquots bei -20°C

20 g Magermilchpulver (250 g) Heirler, Radolfzell
 100 ml PBS 10x siehe 2.1.2.1
 900 ml bdH₂O

ELISA-Substrat für 1 Platte (100 µl / Napf = 11 ml)

6,05 mg ABTS (1 mM = 0,55 mg / ml) Sigma-Aldrich, Deisenhofen
 11 ml Zitratpuffer siehe unten
 11 µl Perhydrol (H₂O₂) 30% Merck, Darmstadt

Waschpuffer (PBS-T)

100 ml PBS 10x siehe 2.1.2.1
 900 ml bdH₂O
 0,5 ml Tween 20 (= 0,05 %) Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Zitratpuffer (0,1 M) Lagerung in 50 ml - Aliquots bei -20°C

21 g Zitrat (C₆H₆O₇ x H₂O) Merck, Darmstadt
 1000 ml bdH₂O pH 4,35

2.1.2.5 Puffer, Antikörper-und Substratkits für ELISPOT

Carbonat-/Bicarbonat-Beschichtungspuffer (0,1 M) Lagerung bei 4°C

4,24 g Na₂CO₃
 5,04 g NaHCO₃
 ad 1000 ml bdH₂O pH 9,6 sterilfiltriert

ELISPOT - kit für IFN γ

Mabtech, Nacka, Schweden

m(IgG1 κ) α hIFN γ (1D1-K) 4°C 15 µg / ml EC
 m(IgG1 κ) α hIFN γ -Biotin (7B61) 4°C 1 µg / ml EC
 Alkalische Phosphatase 4°C 1:1000 EC

Alkalische Phosphatase-Substrat-Kit

Biorad, München (#170-6432)

Farbreagens A (NBT, Dimethylformamid, MgCl₂) -20°C
 Farbreagens B (BCIP, Dimethylformamid) -20°C
 Farbentwicklungs-Puffer 25x (EC = 0,1 M TRIS pH 9,5) 4°C

Substrat-Gebrauchslösung bei Raumtemperatur (5 ml für 1 Platte)

Puffer 25x 200 µl
 bdH₂O 4800 µl

Farbreagens A 50 µl

Farbreagens B 50 µl

2.1.2.6 FACS-Puffer und Antikörper

PAB-Puffer

PBS		siehe oben
0.5 %	(w/v) BSA	Roth, Karlsruhe
0,1 %	(w/v) Natrium-Azid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt

PFA (Paraformaldehyd zum Fixieren und Virusinaktivieren)

4 g	PFA	
ad 100 ml	PBS	siehe oben

leicht erhitzen, evtl. NaOH nachtröpfeln

Antikörper

m(IgG1κ)-FITC (MOPC-21)	Pharmingen, Hamburg (#33814X)
m(IgG1κ)-PE (MOPC-21)	Pharmingen, Hamburg (#33815X)
m(IgG1κ)-CyC (MOPC-21)	Pharmingen, Hamburg (#33028X)
m(IgG2ακ)-PE (UPC 10)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (#P4810)
m(IgG1κ)αhCD3-CyC (UCHT1)	Pharmingen, Hamburg (#30108X)
m(IgG1κ)αhCD4-FITC (RPA-T4)	Pharmingen, Hamburg (#30154X)
m(IgG1κ)αhCD4-PE (13B8.2)	Coulter Immunotech, München (#0449)
m(IgG1κ)αhCD4-CyC (RPA-T4)	Pharmingen, Hamburg (#30158X)
m(IgG1)αhCD8-FITC (B9.11)	Coulter Immunotech, München (#0451)
m(IgG1κ)αhCD8-PE (HIT8A)	Pharmingen, Hamburg (#33295X)
m(IgG1κ)αhCD8-Cy (RPA-T8)	Pharmingen, Hamburg (#30328X)
m(IgG1)αhCD19-R-PE (SJ25-C1)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (P-7437)
m(IgG2a)αhCD25-FITC (B1.49.9)	Coulter Immunotech, München (#0478)
m(IgG2b)αhCD69-PE (TP1.55.3)	Coulter Immunotech, München (#1943)
m(IgG2a)αMHC-I-FITC (B9.12.1)	Coulter Immunotech, München
m(IgG1)αMHC-II-PE (Immu-357)	Coulter Immunotech, München

2.1.2.7 Antikörper und Antigene für Virus-Serologie

Der im FACS verwendete, ployklonale Maus-Antikörper gegen HHV-6B wurde von PD Dr. Christian Jassoy, Virologie Würzburg, bereitgestellt. Die serologischen Tests für Influenza, HHV-6 und andere respiratorische Viren wurden vom Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

2.1.2.8 Materialien für Blutentnahme und Zellkultur

Butterfly-Venenpunktionssystem (G19)	Braun
ELISA-Platten (96 Näpfe, Maxisorb)	Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen	Falcon / Becton Dickinson, Heidelberg
EDTA-Monovette (9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serum-Monovette (9ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozelluloseplatten (96 Näpfe, steril)	Millipore, Eschborn (MAHA S 4510)
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rotrand-Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Bottle-Top Sterilfilter (0,2 µm)	Nunc / Nalgene, Wiesbaden
Styroporständler, Styro-rack (5 x 10)	Hartenstein, Würzburg
Zellkulturflaschen (50 / 260 / 800 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6/12/24/48/96U/F Näpfe)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15 / 50 ml)	Falcon / Becton Dickinson / Sarstedt

2.1.3 Material für Molekularbiologie

2.1.3.1 Chemikalien, Puffer und Reagenzien

<u>RNA-Isolationskit RNeasy Mini</u>	Qiagen, Hilden
RNeasy Säulen	
RLT-Puffer	
1 % (v/v) β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
RW1-Waschpuffer	
RPE-Puffer	
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
RNase-freies Wasser	
<u>TRIS-Puffer</u>	
1,21 g TRIS (10 mM)	Merck, Darmstadt
ad 100 ml bdH ₂ O pH 8,8	
<u>DEPC-Wasser</u>	
0,1 % (w/v) DEPC	Merck, Darmstadt
in bdH ₂ O für mehrere Stunden rühren, anschließend autoklavieren	
Oligo (dT) 500 µg / ml	Pharmacia, Freiburg

Superscript II Reverse Transkriptase - kit LifeTechnologies, Eggenstein

Superscript II RT	200U / μ l	
First Strand Puffer	5x	
DTT	0,1 M	
dNTPs	10 mM	Pharmacia, Freiburg

PCR - Prämix pro Platte (4 ml)

ad 4000 μ l	H ₂ O LiChrosolv [®] (Chromatogr.)	Merck, Darmstadt
1200 μ l	MgCl ₂ 25mM	PE Biosystems, Weiterstadt
500 μ l	TaqMan [™] 10x Puffer A	PE Biosystems, Weiterstadt
150 U / ml	dATP	PE Biosystems, Weiterstadt
150 U / ml	dCTP	PE Biosystems, Weiterstadt
150 U / ml	dGTP	PE Biosystems, Weiterstadt
300 U / ml	dUTP	PE Biosystems, Weiterstadt
s. 2.1.5	Primer, Sense	PE Biosystems, Weiterstadt
s. 2.1.5	Primer, Antisense	PE Biosystems, Weiterstadt
s. 2.1.5	Sonde	PE Biosystems, Weiterstadt
25 μ l	AmpliTaq Gold [™]	PE Biosystems, Weiterstadt
50 μ l	AmpErase [™] UNG*	PE Biosystems, Weiterstadt

* Uracil-*N*-Glykosylase

2.1.3.2 Zytokinstandards und Oligonukleotide

Zytokinstandards	Dr. N. Kruse, Würzburg
Oligonukleotide	PE Biosystems, Weiterstadt

Sequenzen sind in Abschnitt 2.1.5 angeführt

2.1.4 Allgemeine Materialien und Geräte

Analysenwaage AE 160 (Histologie)	Mettler, Gießen
Analysenwaage BP 61 (Flachbau)	Sartorius, Göttingen
Autoklav (Vakulab HP)	Münchner Medizin Mechanik GmbH
Bestrahlungsanlage RT 250	Philips, Hamburg

Betaplate

Wallac-Skatron-Erntegerät 1295-004	Pharmacia, Freiburg
------------------------------------	---------------------

Wallac Einschweißgerät 1295-012	Pharmacia, Freiburg
Wallac-Szintilationszähler 1205	Pharmacia, Freiburg
Software (UltraTerm/MultiCalc)	Pharmacia, Freiburg
Begasungsbrutschrank mit 5 % CO ₂	Heraeus, Hanau
Diafilm Ektachrome	Kodak, Stuttgart

ELISA

Pentium PC Peakock, Wünnenberg - Haaren	
Reader Multiskan EX	Labsystems, Frankfurt
Programm Genesis	Labsystems, Frankfurt
Waschkamm Immunowash 12	Nunc, Wiesbaden

Elektrophorese und Western-Immunoblot

Elektrophoresekammer, Protean 2	Biorad, München
Immunoblotgerät Trans-Blot SD	Biorad, München
Power Pac 3000	Biorad, München
Schüttler Swip KS-10-A	Edmund Böhler

FACScan

PowerPC, Mac OS 7.5.3	Apple, Ismaning
Software CellQuest v3.0f (1996)	Becton Dickinson, Heidelberg
Speichermedium 100 MB Zip Disk	Iomega, Roy, Utah, USA

HPLC

HPLC-Controller LKB 2152	Pharmacia, Freiburg
HPLC-Pump LKB 2150	Pharmacia, Freiburg
Recorder LKB 2210	Pharmacia, Freiburg
Superrac LKB 2211	Pharmacia, Freiburg
UV-Monitor 655 A, variable Wellenlänge	Merck-Hitachi

Kühltechnik

Flüssigstickstoff	Tyczka, Würzburg
Flüssigstickstoffbehälter	Messer, Griesheim
Flüssigstickstoffvorratstank	Messer, Griesheim
Gefrierschrank (-22°C) Öko-Super	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank (-80°C) Sepatech	Heraeus, Hanau

Kühlschrank (4°C)	Bauknecht, Schorndorf
Latexhandschuhe Satin Plus, <u>puderfrei</u>	Safeskin, San Diego, CA, USA
Lyophilisator Lyovac GT 2	Amsco/Finn-Aqua, Hürth
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.
<u>Mikroskope</u>	
Durchlichtmikroskop IM	Zeiss, Oberkochen
Zählmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Objektiv Plan 40/0,65	Zeiss, Oberkochen
Okular +Kpl-W 10x/18	Zeiss, Oberkochen
Photomikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
Objektiv HMC10LWD CPlan0,25na ∞ /1	Olympus, Hamburg
Objektiv HMC20LWD LCA 0,40na ∞ /1	Olympus, Hamburg
Okular WH 10x / 22 ∞	Olympus, Hamburg
Photo-Automat MPS 30	Leica, Bensheim
Stereomikroskop M3Z (ELISPOT)	Wild, Heerbrugg (Schweiz)
Lichtquelle KL-1500-T	Schott, Mainz
Strichplatte (Okulareinsatz) 100 x 1 mm ²	Leica, Bensheim
pH-Meter pH 530	Wissenschaftl. Techn. Werkst., Weilheim
<u>Pipetten</u>	
Pipettierhilfe Akku pipetus	Hirschmann, Eberstadt
8-Kanalpipette Titerman 4908	Eppendorf, Hamburg
Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research 100	Eppendorf, Hamburg
Pipetman [®] P10, P200, P1000	Gilson (Abimed, Langenfeld)
Pasteurpipetten	Flow Laboratories,
Pipetten Glas 5/10/20 ml	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (weiß)	
Spektralphotometer Uvikon 930	Kontron, Eching
<u>Statistik - Programme</u>	
Excel [®]	Microsoft, Redmeond, WA, USA

StatView [®]	SAS, Cray, NC, USA
Sterilbank, Laminarflow GELAIRE BSB 6A	Flow Lab, Meckenheim
Sterilbank, Laminarflow NUAIRE	Zapf, Sarstedt
<u>Taqman 7700 Sequence Detector System</u>	ABI PRISM, Perkin Elmer, Weiterstadt
PowerPC, Mac OS 7.5.3	Apple, Feldkirchen
PowerBook 1400cs, Mac OS 8.0.1	Apple, Feldkirchen
Software SDS 1.6.3 (1998)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Speichermedium 1 GB Jaz Cartridge	Iomega, Roy, Utah, USA
Thermoblock (120°C)	Liebisch, Bielefeld
Ultrafiltration Seralpur / -dest	Seral, Rausbach - Baumbach
Ultra-Turrax	IKA, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.
Video-Dokumentations-System	Intas, Göttingen
Vortexer L 46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Wasserbad	Köttermann, Fa. Röwa, Heimsheim
Zählkammer, Neubauer improved, bright line	Superior / Marienfeld, Bad Mergentheim
<u>Zentrifugen</u>	
Biofuge 15 (Rotor #3754)	Heraeus, Hanau
Biofuge 15R (Rotor #3042)	Heraeus, Hanau
Centrikon T-42K (Rotor #A18C)	Kontron, Eching
Megafuge 1.0R (Rotor #2705)	Heraeus, Hanau
Varifuge 3.0R (Rotor #8074)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Viro)	Eppendorf, Hamburg

2.1.5 Oligonukleotid- und Peptidsequenzen

Oligonukleotide (Primer) für RT-PCR

β-Aktin S2	5´-ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA-3´	200 pM
β-Aktin AS2	5´-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3´	100 nM
IL2 S2	5´-TCA CCA GGA TGC TCA CAT TTA AGT-3´	200 nM
IL2 AS2	5´-GAG GTT TGA GTT CTT CTT CTA GAC ACT G-3´	300 nM
IL4 S2	5´-CAA GCA GCT GAT CCG ATT CC-3´	300 nM
IL4 AS2	5´-GGA ATT CAA GCC CGC CA-3´	300 nM

IL10 S3	5'-AGG CTA CGG CGC TGT CAT C-3'	300nM
IL10 AS3	5'-GGC ATT CTT CAC CTG CTC CA-3'	300nM
IFN γ S2	5'-CGA GAT GAC TTC GAA AAG CTG AC-3'	200nM
IFN γ AS2	5'-GGC GAC AGT TCA GCC ATC A-3'	200nM
TNF α S2	5'-AGG CGG TGC TTG TTC CTC A-3'	100nM
TNF α AS2	5'-GTT CGA GAA GAT GAT CTG ACT GCC-3'	100nM
β -Aktin Son2	5'-FAM-CAA GAT CAT TGC TCC TCC TGA GCG CA-TAMRA-3'	200nM
IL2 Son	5'-FAM-ACA TGC CCA AGA AGG CCA CAG AAC TG-TAMRA-3'	100nM
IL4 Son2	5'-FAM-CCC AGA GGT TCC TGT CGA GCC GTT-TAMRA-3'	100nM
IL10 Son3	5'-FAM-CTT CCC TGT GAA AAC AAG AGC AAG GCC-TAMRA-3'	100nM
IFN γ Son2	5'-FAM-TTG AAT GTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT GA-TAMRA	100nM
TNF α Son2	5'-FAM-CCA GAG GGA AGA GTT CCC CAG GGA C-TAMRA-3'	100nM

Überlappende Peptidsequenzen (1-13) von hMBP 17,2 kDa, Nomenklatur nach Ota ⁷

1-20	ASQKRPSQRHGSKYLATAST
11-30	GSKYLATASTMDHARHGFLP
21-40	MDHARHGFLPRHRDTGILDS
31-50	RHRDTGILDSIGRFFGGDRG
41-60	IGRFFGGDRGAPKRGSGKDS
51-70	APKRGSGKDSHHPARTAHYG
61-82	HHPARTAHYGSLPQKSHGRT
71-92	SLPQKSHGRTQDENPVVHFF
83-102	QDENPVVHFFKNIIVTPRTPP
93-112	KNIIVTPRTPPPSQGKGRGLS
113-132	LSRFSWGAEGQRPFGFYGGR
124-143	RPFGFYGGRASDYKSAHKGF
143-168	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRD
(17 kDa)	Kursivgedruckte Aminosäuren fehlen bei Ota und wurden ergänzt.

Zusätzliche Peptide (14-16) mit Berücksichtigung der 18,5 kDa - Haupt-Splice-Variante

50-69	GAPKRGSGKVPWLKPGRSPL
60-79	PWLKPGRSPLPSHARSQPGL
70-89	PSHARSQPGLCNMYKDSHHP
(21,5 kDa)	Konsensus-Nomenklatur nach Proteindatenbank

Drei Splice-Varianten (17200, 18500 und 21500 kDa) von hMBP

<u>1</u>	<u>11</u>	<u>21</u>	<u>31</u>	<u>41</u>
ASQKRPSQRH	GSKYLATAST	MDHARHGFLP	RHRDTGILDS	IGRFFGGDRG
ASQKRPSQRH	GSKYLATAST	MDHARHGFLP	RHRDTGILDS	IGRFFGGDRG
ASQKRPSQRH	GSKYLATAST	MDHARHGFLP	RHRDTGILDS	IGRFFGGDRG
<u>51</u>	<u>61</u>	<u>71</u>	<u>81</u>	<u>91</u>
APKRGSGK			DSHHPA	RTAHYGSLPQ
APKRGSGKVP	<i>WLKPGRSPLP</i>	<i>SHARSQPGLC</i>	<i>NMYKDSHHPA</i>	RTAHYGSLPQ
APKRGSGKVP	<i>WLKPGRSPLP</i>	<i>SHARSQPGLC</i>	<i>NMYKDSHHPA</i>	RTAHYGSLPQ
<u>101</u>	<u>111</u>	<u>121</u>	<u>131</u>	<u>141</u>
KSHGRTQDEN	PVVHFFKNIV	TPRTPPPSQG	<i>KGRGLSLSRF</i>	SWGAEQORPG
KSHGRTQDEN	PVVHFFKNIV	TPRTPPPSQG	K	GAEGQORPG
KSHGRTQDEN	PVVHFFKNIV	TPRTPPPSQG	<i>KGRGLSLSRF</i>	SWGAEQORPG
<u>151</u>	<u>161</u>	<u>171</u>	<u>181</u>	<u>191</u>
FGYGGRASDY	KSAHKGFKGV	DAQGTLSKIF	KLGGDRSRSG	SPMARR
FGYGGRASDY	KSAHKGFKGV	DAQGTLSKIF	KLGGDRSRSG	SPMARR
FGYGGRASDY	KSAHKGFKGV	DAQGTLSKIF	KLGGDRSRSG	SPMARR

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der ViMS-Studie

2.2.1.1 Patienten-/Probandenauswahl und Probengewinnung

An der ViMS-Studie der Neurologischen Poliklinik der Universität Würzburg nahmen 12 MS-Patienten mit schubförmigem Verlauf, ohne immunmodulatorische Behandlung in den letzten 6 Monaten, und 28 gesunde Kontrollspender teil, die in Alter und Geschlecht vergleichbar waren. Nach Begutachtung der Studie durch die örtliche Ethikkommission und Einverständniserklärung zur Teilnahme an dieser Studie (s. Kap. 6), wurde den Spendern 27 ml EDTA-Blut und 18 ml Serum abgenommen (vgl. Kap. 2.2.1.5), bevor diese mit 0,5 ml Influenza-Impfstoff Influvac[®] intramuskulär in den M. gluteus med. geimpft wurden. Bis auf gelegentliche Myalgien und Hautrötungen im Sinne von lokalen Impfreaktionen, sowie vereinzelt leichten Temperaturerhöhungen gab es keine primären Impfkomplicationen, wie dem Impftagebuch und gezielten Fragen bei den Kontrollterminen zu entnehmen war (vgl. Kap. 2.2.1.3).

2.2.1.2 Impfstoff

Der Spaltimpfstoff Inluvac[®] enthielt inaktive Bestandteile der nach Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für 1998/99 und 1999/2000 relevanten Influenza-Virusstämme. Im Einzelnen setzte sich der Impfstoff aus je 15 µg Hämagglutinin, sowie Neuraminidasen folgender Stämme zusammen:

A/Sydney/5/97 (H₃N₂) - ähnlich
A/Beijing/262/95 (H₁N₁) - ähnlich
B/Beijing/184/93 - ähnlich

und pro Dosis (0,5 ml) aus

0,05 mg Thiomersal

max. 50,00 µg Natriumdesoxycholat

max. 0,010 mg Formaldehyd

max. 0,015 mg Cetyltrimethylammoniumbromid,

in Spuren enthalten: Polysorbat 80, Gentamycin und Saccharose, sowie Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogensulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Wasser für Injektionszwecke.

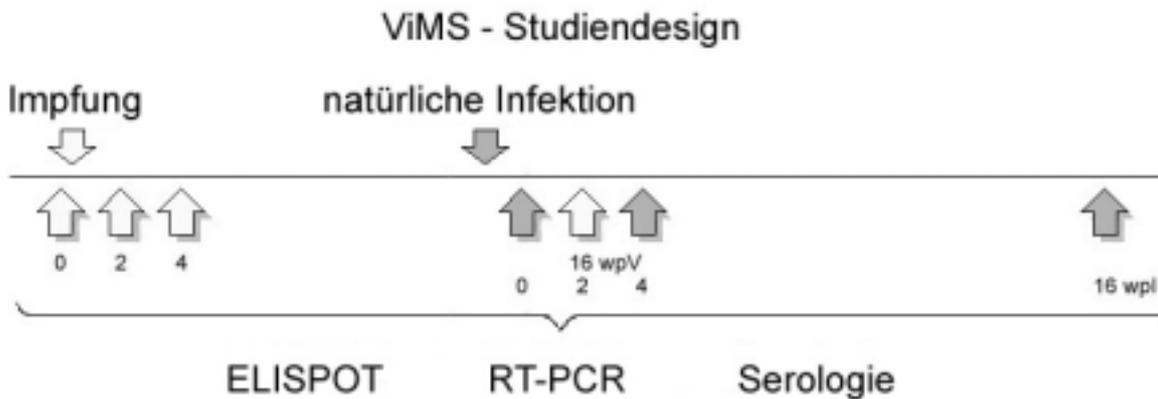
In vitro eingesetzter Impfstoff wurde vor Verwendung in ELISPOT-Stimulationsassays mit einem Dialyseschlauch (cut-off 18 - 20 kDa) 3 mal gegen 2 l PBS dialysiert. Die so entsalzte Präparation wurde in Zellkultur in einer Endverdünnung von 1:20 eingesetzt, entsprechend einer Endkonzentration von 3 µg Hämagglutinin (je Virus-Stamm) / ml.

2.2.1.3 Klinische und virologische Verlaufsbeobachtungen

Patienten und Probanden kamen wiederholte Male (d. h. 2 Wochen, 4 Wochen und 16 Wochen) nach Impftermin und zusätzlich im Falle eines natürlich erworbenen Infektes der oberen Luftwege (Tage, 2 Wochen, 4 Wochen, 16 Wochen) nach diesem Ereignis, um für weitere Verlaufsuntersuchungen Blut zu spenden (Abb. 2).

Dafür wurden jeweils 18 ml EDTA-Blut und 9 ml Serum abgenommen. Die Lymphozytenisolation, sowie Serumgewinnung und Lagerung erfolgte nach Standardprotokoll (Kap. 2.2.1.5). Die Verteilungsmuster und Variationen spezifischer T-Zellen wurde *ex vivo* mit dem IFN γ -ELISPOT durchgeführt, die von der Platte eingesammelten PBMC wurden in RLT-Puffer lysiert und zum Teil in PCR-Experimenten zur Quantifizierung von IFN γ - und IL4-mRNA weiterverwendet.

Abbildung 2: Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 16 Wochen nach Impfung (wpV, weiße Pfeile), bei zufällig aufgetretenen Atemwegsinfektionen zusätzlich in zeitlicher Nähe zum Infekt, sowie 2, 4, 16 Wochen danach (wpl, graue Pfeile) erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung spezifischer T-Zellantworten mit IFN γ -ELISPOT, RT-PCR und Virus-Serologie.



Serum-Fractionen wurden bei -20°C gelagert und Antikörpertiter gegen Influenza durch Dr. S. Niewiesk, Antikörpertiter gegen CMV, EBV, sowie an ausgewählten Seren von Patienten/Probanden mit Infekt gegen Influenza A/B, Parainfluenza I/III, Adeno-, RS-, Echo-, Coxsackieviren von der virologischen Diagnostik unter Leitung von Dr. B. Weißbrich durchgeführt. Zusätzlich dokumentierten die Probanden in einem standardisierten Fragebogen mögliche Impfreaktionen und Infektionszeichen, sowie bei MS-Patienten neurologische Symptome, welche am Ende ausgewertet wurden.

2.2.1.4 Allgemeines zum Umgang mit Zellkulturen

Bei der Zellkultur eukaryontischer Zelllinien sind sterile Arbeitsbedingungen sehr wichtig, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Deshalb sind besondere Vorsichtsmaßnahmen genau einzuhalten. Sämtliche Mediumbestandteile sowie die zur Arbeit verwendeten Pipetten und Zellkulturgefäße müssen keimfrei sein, was durch Sterilfiltration bzw. Autoklavieren erzielt wurde. Außerdem wurden alle Arbeitsschritte in einer Laminar-flow Sterilbank durchgeführt, die für einen keimfreien Luftstrom sorgte. Die Arbeitsfläche der Sterilbank wurde vor und nach jeder Benutzung mit 70 % igem vergällten Ethanol gereinigt. Glaspipetten wurden vor Benutzung mit einem in der Sterilbank befindlichen Bunsenbrenner abgeflammt, sowie die Flaschenhalse der benutzten Mediumflaschen und Zellkulturgefäße vor und nach Öffnen des Deckels. Die Deckel wurden, falls nötig, mit der Öffnung nach unten auf die Arbeitsfläche abgelegt, um eine

Verunreinigung durch versehentliches Darübergreifen zu vermeiden. Die Hände - bei potentiell infektiösen Arbeiten entsprechend die Handschuhe - wurden mehrfach, jedenfalls vor jedem Arbeitsbeginn mit Händedesinfektionsmittel gereinigt.

Weiterhin sind für quantitative Bestimmungen immunbiologischer Parameter möglichst standardisierte Techniken der Probengewinnung und *in vitro*-Untersuchungen essentiell, da vor dem Hintergrund einer Vielzahl von biochemischen, mikro- oder immunbiologischen Faktoren jede Variation der komplexen Systeme zu einer Potenzierung von Fehlermöglichkeiten führen kann. Daher wurden in sämtlichen Arbeitsschritten von der Blutentnahme über Stimulations- und Kulturbedingungen von *in vitro*-Assays (alle Zellkulturen wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert) bis hin zur Analyse möglichst einheitliche Versuchsabläufe eingehalten.

2.2.1.5 Blutentnahme und Lymphozytenisolierung

Entsprechend der benötigten Lymphozyten-Zellzahl wurden den Probanden / Patienten für die Zelllinienetablierung / -fortführung (36 - 90 ml EDTA, 9 - 18 ml Serum), *in vitro* Stimulations- (ViMS-Studie 18 - 27 ml EDTA, 9 ml Serum) bzw. Infektionsversuche (36 - 54 ml EDTA) Blut abgenommen. Dazu wurde bei den Probanden möglichst zwischen 8 und 9 Uhr morgens unter sterilen Bedingungen mit einer 20G Butterfly-Kanüle (Braun) die Vena cubita media punktiert und Blut durch langsames Ziehen und leichtes Schwenken vorsichtig entnommen. Nach Blutentnahme standen die Serummonovetten für mindestens 10 min bei RT, bevor sie bei 3000 x g für 10 min bei RT abzentrifugiert wurden. 3 - 8 ml des so gewonnenen Serums wurde in einem 3,5 ml Kryoröhrchen für 30 min im 56°C temperierten Wasserbad hitzeinaktiviert und zum Teil für die Herstellung des autologen Serums verwendet oder bei -20°C eingefroren. Der nicht-inaktivierte Rest wurde für weitere serologische Tests aliquotiert und ebenfalls bei -20°C tiefgefroren. Das Blut in den EDTA-Monovetten wurde innerhalb von 1-2 h weiterverarbeitet. Für ViMS-Probanden wurden 500 µl Vollblut in 2 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Aus dem restlichen EDTA-Blut wurden PBMC mittels der Lymphoprep-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt.

Dazu wurden 20 - 60 ml gerinnungsinaktiviertes (EDTA) Blut 1:1 mit PBS verdünnt. Je 20 ml des verdünnten Blutes wurden auf 10 ml Lymphoprep überschichtet. Durch Zentrifugation bei 483 x g für 25 min bei 20°C (ohne Bremse) erfolgte die Anreiche-

nung von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen in der Interphase, wonach die Zellen von jeweils zwei Interphasen mit einer 5 ml Plastikpipette in kreisenden Bewegungen eingesammelt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt wurden. Diese Zellen wurden 2 mal mit 50 ml PBS gewaschen (272 x g 10 min 4°C) und gegebenenfalls in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, bevor sie in 1 ml R₀ / R₅ gezählt und für weitere Versuche eingesetzt wurden.

2.2.1.6 Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung

Die genaue Ermittlung der Zellkonzentration ist für Zellkulturversuche unerlässlich und gerade bei ELISPOT-Assays kommt es auf exakte Zellverdünnungen an. Die Standardmethode hierfür ist die manuelle Auszählung mit der Neubauerkammer. Dazu wurden die Zellpellets mit einer 1000 µl Pipette in 1 ml R₀ bzw. R₅ gut resuspendiert. Dann wurden 10 µl Zellsuspension, 10 µl Trypanblaulösung (EC = 0,5 % (w/v)) und 80 µl PBS mit einer 200 µl Pipette gut gemischt, bevor nach einer kurzen Inkubation eine der beiden Zählkammern gefüllt wurde. Es wurden jeweils nur lebendige, also nicht blauangefärbte Zellen, in 16 Quadraten ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Lymphozyten} / V = z \times d \times V \times 10^4$$

V = Volumen der Suspension (hier 1 ml)

z = ausgezählte Zellen (ohne blauangefärbte Zellen und ohne Erythrozyten)

d = Verdünnungsfaktor (hier 10, da die Zellen 1:10 verdünnt sind)

2.2.1.7 Quantifizierung antigenspezifischer T-Zellen mit ELISPOT

Zur Etablierung eines Assays, mit dessen Hilfe der Anteil antigenspezifischer T-Zellen aus dem Blut unterschiedlicher Spender ermittelt werden kann, wurden im ELISPOT zahlreiche Antigenkonzentrationen, Zellverdünnungsreihen von sowohl spezifischen T-Zelllinien als auch PBMC, Blockierungsschritte und Inkubationszeiten ausgetestet, die hier nicht alle im Einzelnen aufgeführt werden können. Insbesondere für die ViMS-Studie wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet: Pro Spender wurden 24 bzw. 48 Näpfe einer sterilen Nitrozelluloseplatte mit 37,5 µg 1. Antikörper (1-D1-K) / 2,5 ml (= 50 µl / Napf) Carbonat-Bicarbonat-Puffer beschichtet. Nach einer 4 h Inkubation bei RT wurde die Platte 3 mal mit 200 µl sterilem PBS gewaschen, bevor die, in R₅ vorver-

dünnten Lymphozyten (200 µl / Napf) nach dem in Abb. 5a/b aufgeführten Pipettierschema ausplattiert und durch Antigenzugaben stimuliert wurden.

Tabelle 5a: 1. Pipettierschema des ELISPOT-Ansatzes (1998/99). Zur Veranschaulichung sind in Spalten 1-6 die Zellzahl $\times 10^5$ PBMC / 200µl, in Spalten 7-12 die entsprechenden Antigene dargestellt. Zwei Spender pro Platte. Verschiedene Kontrollen (*Kursivschrift*) wurden anfangs wenigstens 1 x / Spender mitgeführt (s. Tab. 6, Kap. 3.1.1)

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
A	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	Medium			Influenza A		
B	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	hMBP			Influenza A		
C	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	rhMOG			Influenza A		
D	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	rhMBP			Tetanus Tox		
E	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	rhP0			Tetanus Tox		
F	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	<i>DMSO</i>			Tetanus Tox		
G	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	<i>Essigsäure</i>			PHA / α CD3		
H	5,0	5,0	5,0	5,0	1,7	0,6	<i>Eiweiß 1:10</i>			Influvac 98/99		

Tabelle 5b: 2. Pipettierschema des ELISPOT-Ansatzes (1999/2000). Vier Spender pro Platte. Keine Negativkontrollen außer Mediumwert.

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
A	5,0	5,0	5,0	Medium								
B	5,0	5,0	5,0	hMBP								
C	5,0	5,0	5,0	rhMOG								
D	5,0	5,0	5,0	Tetanus Tox								
E	1,7	1,7	1,7	Tetanus Tox								
F	1,7	1,7	1,7	Influenza A								
G	1,7	1,7	1,7	Influvac 98/99								
H	1,7	1,7	1,7	Influvac 99/00								

Nach genau 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ in einem wegen Rüttelgefahr wenig frequentierten Begasungsbrutschrank wurden die Zellen der unstimulierten, bzw. mit TT, Flu, hMBP stimulierten Triplikatansätze, sowie unterschiedlicher Kontrollansätze in RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße eingesammelt, bei 3000 rpm für 6 min pelletiert und nach Absaugen des Überstands und Auffüllen mit 300 µl RLT-Puffer bei -80°C

tiefgefroren, bis sie zur weiteren Aufarbeitung (siehe Abschnitt 2.2.1.8) eingesetzt wurden. Die ELISPOT-Platte wurde mit einer 8-Kanalpipette 6 mal mit 200 μ l PBS-T kräftig gewaschen und ausgeklopft. Nach Zugabe von 2,5 μ g Biotin-gekoppelten 2. Antikörper (7-B6-1) / 2,5 ml PBS-T (50 μ l / Napf), wurde die Platte bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platte wurde wiederum 6 mal mit PBS-T gewaschen und bei RT für 1 h mit 1:1000 in PBS-T verdünnter Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 6 mal 200 μ l PBS-T wurde die Platte mit frisch angesetzter Substrat-Gebrauchslösung (RT !) für etwa 15 - 20 min inkubiert (blaue Farbentwicklung in der α CD3-Positivkontrolle) und 3 mal mit bdH_2O nachgewaschen. Die über Nacht getrocknete Platte wurde mit einem Stereomikroskop und Zählstrichplatte bei einer Vergrößerung von 25 x ausgezählt, wobei unspezifische Punkte (Spots) durch ihre unregelmäßige Form und Farbtiefe (kontrolliert bei einer Vergrößerung von 40 x) ausgeschlossen wurden.

2.2.1.8 Quantifizierung von Zytokin-mRNA mit RT-PCR

2.2.1.8.1 RNA-Isolation

Gesamt-RNA aus PBMC- und T-Zellkulturen wurde mittels Qiagen RNeasy mini kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers präpariert. Dazu wurden die eingefrorenen, in 300 μ l RLT-Puffer gelösten und bei -80°C tiefgefrorenen Zellpellets (7 - 8 x 10⁵ Zellen / Reaktionsgefäß und Ansatz, siehe 2.2.1.7) bei RT aufgetaut und mit einer 1 ml Insulinspritze über eine 20G Kanüle 5 - 6 mal komplett geschert. Nach Zugabe des gleichen Volumens (300 μ l) 70% Ethanol wurde das Gemisch in den RNeasy-Säulen für 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säulenmembran mit 700 μ l der RW1-Waschlösung und nach Verwendung eines neuen Auffangröhrchens zwei weitere Male mit je 500 μ l der RPE-Lösung gewaschen, wobei beim letzten Schritt mit der maximalen Drehzahl (15000 rpm) für 2 min zentrifugiert wurde. Die über den gesamten Reinigungsprozeß an die Säulenmembran gebundene RNA wurde nun mit 33 μ l RNase-freiem Wasser für 1 min bei 10000 rpm in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert. Die RNA wurde sofort danach zu cDNA transkribiert (siehe 2.2.1.8.2)

2.2.1.8.2 Reverse Transkription (RT)

Die RNA (siehe 2.2.1.8.1) wurde nach Zugabe von 3 μ l Oligo (dT) (500 μ g/ml) für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 12 μ l First Strand Buffer, 6 μ l 0.1 M DTT und 3 μ l 10mM dNTPs wurde der Ansatz für weitere 50 min bei 42°C inkubiert, wobei ca. 2 min nach Beginn dieser Zeitspanne die Transkription mit 3 μ l hinzugegebener Superscript II reverser Transcriptase (200 U/ml) aktiviert wurde. Das Enzym wurde schließlich 10 min bei 70°C denaturiert. Für die β -Aktin-Bestimmung und Normierung auf 10^6 β -Aktin-Moleküle wurden 2 μ l der erhaltenen cDNA-Lösung mit 198 μ l DEPC-Wasser (Analysequalität) verdünnt und zusammen mit der unverdünnten cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.1.8.3 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bestimmung der β -Aktin und Zytokin-mRNA Konzentrationen

PCR-Reaktionen für β -Aktin-cDNA (1:100 verdünnt) und Zytokin-cDNA (eingestellt auf 1×10^6 β -Aktinmoleküle, s. 2.2.1.8.4) wurden nach den Ausführungen von Kruse et al.¹³³ durchgeführt, mit leichten Abweichungen in der Wahl der Oligonukleotide zugunsten der Sensitivität (vgl. 2.1.5). Verwendete Zytokinstandards wurden von Dr. N. Kruse unter Verwendung des pCR-Script™ Amp SK(+) - Vektorsystems (Stratagene, Heidelberg) aus PBMC konstruiert und freundlicherweise zu Verfügung gestellt. Die Standardreihe für eine Zytokin- bzw. β -Aktin-PCR-Serie von zumeist 3 bis 4 Läufen, wurde am Vormittag eines PCR-Versuchstages folgendermaßen hergestellt:

In einem separaten, plasmid-/DNAfreien Prä-PCR-Raum wurden 7 x 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 450 μ l TRIS-Puffer pH 8,2 gefüllt und anschließend im PCR-Raum 90 μ l aus dem ersten Röhrchen auf 10 μ l des entsprechenden Standardaliquots (1×10^8 Moleküle) pipettiert. Im Weiteren wurden nach 6 sec Vortexen und kurzem Anzentrifugieren (ca. 6 sec, bis 2000 rpm) 50 μ l in das nächste Reaktionsgefäß pipettiert, bis 7 x 10er Verdünnungen zwischen 10 und 1×10^7 Molekülen / 10 μ l vorlagen. Diese Standardreihe wurde für den Versuchstag, max. für fünf PCR-Läufe (12 h), verwendet und erwies sich innerhalb dieses Zeitraums bei 4°C als stabil. Sämtliche PCR-Reaktionen wurden mit dem Taqman / ABI PRISM 7700 Sequence Detector unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, 40 Zyklen mit 15 sec bei

95°C und 1 min bei 60°C, und einer abschließenden 5 min Inkubation bei 25°C. Oligonukleotid-Sequenzen und Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sind in Abschnitt 2.1.3 zusammengefaßt. Die auf der Festplatte des Aufnahmecomputers (Macintosh PowerPC) gespeicherten Rohdaten und Meßdateien wurden zur weiteren Analyse auf ein 1 GB-Speichermedium übertragen und an einem PowerBook 1400 cs mit der gleichen Software (Sequence Detection Software 1.6.3, Perkin Elmer, 1998) ausgewertet.

2.2.1.8.4 Standardisierung der cDNA-Konzentration

Gemäß der aus Triplikaten gemittelten β -Aktin-Konzentrationen (s. Formel) wurden in dem Datenverarbeitungsprogramm Excel[®] Verdünnungen berechnet, anhand derer entsprechend ihrer cDNA-Ausgangskonzentration 2 - 4 Aliquots zu je $3,5 \times 10^6$ Moleküle β -Aktin / 35 μ l DEPC-Wasser aus den ursprünglichen cDNA-Präparationen angefertigt wurden. In einigen Präparationen war die cDNA-Ausbeute so gering, daß die β -Aktin-cDNA-Konzentration auf 5×10^5 bzw. 2×10^5 / μ l eingestellt werden mußte. Die hieraus gewonnenen Zytokinerggebnisse wurden daraufhin rechnerisch bereinigt und sofern möglich in graphischen Darstellungen mit einem Stern gekennzeichnet.

	$m = a \times b \times c;$	$m =$ Mittelwerte der β -Aktin PCR
\Rightarrow	$b = m / (a \times c);$	$a =$ eingesetztes Volumen (=10 μ l)
\Rightarrow	b / μ l = $m \times 10$	$b =$ erwartete β -Aktinmoleküle
		$c =$ cDNA (1:100) (= 1 / 100)

2.2.2 Methoden des virologisch-immunologischen Teils

2.2.2.1 Humanes basisches Myelinprotein (hMBP)

2.2.2.1.1 Präparation von humanem basischen Myelinprotein (hMBP)

Die Lipid-Extraktion aus weißem Hirngewebe wurde modifiziert nach der Methode von Eylar¹³⁴. Das Prinzip der biochemischen Aufreinigung von MBP beruht auf der Trennung von basischen Proteinanteilen von den übrigen, sauren Bestandteilen des Myelins und wird durch die folgenden 5 Schritte erreicht:

- 1) Entfetten mit Chloroform / Methanol
- 2) Saure Extraktion bei pH 2
- 3) Neutralisation bei pH 5,5
- 4) Ammoniumsulfat-Fällung
- 5) Acetonpräzipitation

Das Gehirn eines nicht an einer ZNS-Erkrankung (Unfall) Verstorbenen wurde unmittelbar nach Entnahme in kaltem PBS transportiert und gewaschen, bevor Teile der weißen Substanz bei -80°C tiefgefroren wurden. Für die Präparation wurden 100g weiße Substanz (-80°C , < 7 h post mortem), eingewickelt in Alufolie, mit einem Hammer zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden gewogen und in einem Becherglas unter schrittweiser Zugabe 200 ml vorgekühlten Methanols (-20°C) mit Hilfe des Ultra-Turrax weiter homogenisiert. Dabei wurde über 3-5 min abwechselnd jeweils 15 sec homogenisiert und abgewartet, um eine Erwärmung des Gewebematerials zu vermeiden. Nach Zugabe von 500 ml vorgekühltem Chloroform (-20°C) wurde wieder für 3-5 min homogenisiert. Zur Abtrennung des Chloroforms wurde das Homogenat in einen Scheidetrichter gefüllt. Bei 4°C bildeten sich nach 3-5 h zwei klar getrennte Phasen, eine trübe obere und eine klare untere Phase. Die klare, chloroformhaltige Phase wurde verworfen und die trübe Phase mittels Waschflasche und Wasserstrahlpumpe in einer Porzellanfilternutsche mit 2 Whatman 41-Filterpapieren filtriert. Es wurde mit ca. 100-200 ml Aceton nachgewaschen und vorsichtig mit einem kleinen Spatel umgerührt, um letztendlich sandfarbenes Pulver zu erhalten. Die getrocknete Masse wurde mit dem Spatel vom Filter gekratzt und mit 400 ml Wasser 3 min homogenisiert. Das Homogenat wurde angesäuert ($\text{pH} < 2$) und über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren extrahiert.

Schließlich wurde der saure Extrakt bei 3000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand mit NH_4OH auf einen pH von 5,5 eingestellt und bei 4°C für 1 h gerührt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm für 30 min bei 4°C wurden die basischen Proteinanteile durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur 50% Sättigung (= 354 g/l umgerechnet auf das Gesamtvolumen) gefällt. Dabei wurde nach 20 min Rühren mit 5 N NaOH ein pH von 6 eingestellt und die Fällung unter ständigem Rühren über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Die gefällte Lösung wurde bei 3000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet anschließend nochmals mit einer 50 % igen Ammoniumsulfatlösung ($\text{H}_2\text{O}+(\text{NH}_4)\text{SO}_4$) gewaschen. Die Pellets wurden in 10-20 ml bdH_2O resuspendiert und mit der 9 fachen Menge (180 ml) eiskaltem Aceton aufgefüllt, danach mit 1 ml/l konzentrierter HCl angesäuert, um Proteindegradation zu verhindern. Nach Überführung in 50 ml Röhrchen und kurzer Reaktion bei RT (weiße Ausfällung), wurde mit halb geöffneten Deckeln bei 1800 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Die Pellets mit dem gereinigten MBP wurden in 30 ml H_2O resuspendiert und in einen Dialyseschlauch gefüllt. Die Dialyse gegen 2 mal 10 l bdH_2O erfolgte bei 4°C über Nacht. Das Dialysat wurde bei 1800 rpm für 20 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand in einer mit Parafilm bedeckten Glasschale bei -80°C tiefgefroren. Nach einem Tag wurde der Parafilm mehrfach durchlöchert und die tiefgefrorene Lösung lyophilisiert.

2.2.2.1.2 Quantitative Proteinbestimmung

Für Proteinbestimmungen wurde der Coomassie[®] Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Wenn Coomassie Protein bindet, verschiebt sich das Absorptionsspektrum von 465 nm auf 595 nm und gleichzeitig ändert sich die Farbe des Reagens von grün/braun nach blau. Wegen der nicht-linearen Abhängigkeit des Farbumschlags bei steigenden Proteinkonzentrationen, wurden die Absorptionswerte mit einer BSA-Standardkurve verglichen. Für die hMBP-Proteinbestimmung wurden im Einzelnen 5 mg des lyophilisierten Proteins in 1 ml bdH_2O aufgenommen. Lösungen mit unbekanntem Proteingehalt wurden unverdünnt eingesetzt. 1 ml raumtemperierte Coomassie[®]-Lösung wurde nach Zugabe folgender Proteinlösungen / Kontrollen gemischt und der Farbumschlag unmittelbar an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gemessen:

Referenzküvetten 1/2: 20 μl PBS bzw. entsprechendes Lösungsmittel

Probenküvette 3: 10 μl Probe

Probenküvette 4: 20 μl Probe

Probenküvette 5: 40 μl Probe

Bei Abweichen der auf die 20 μl - Probe bereinigten Konzentrationen um mehr als 10 % der Standardabweichung, wurde die Meßreihe mit angepaßten Verdünnungen wiederholt.

2.2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, nach Maniatis)

Das lyophilisierte MBP wurde gewogen und ein Teil zu 1 mg / ml in PBS gelöst. Zwischen 5 und 20 µl der Proteinlösung wurden mit reduzierendem Probenladepuffer im Wasserglas gekocht durch ein 12 % iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Proteinelektrophorese wurde in einer Protean 2 Elektrophorese-Kammer bei einer Spannung von 100 V für ca. 90 min durchgeführt. Das Gel wurde für 30 min bei RT in eine Färbelösung gelegt und leicht geschwenkt.

2.2.2.1.4 Western-Immunoblot

Zwei Minigele wurden in einer Blotvorrichtung auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Der Transfer des Proteins aus dem SDS-Gel erfolgte in einem luftblasenfreien Sandwich aus drei Lagen Whatman-Filterpapier, dem SDS-Gel, der Nitrozellulose-Membran BT 85 und drei Lagen Whatman-Filterpapier. Der Transfer erfolgte mittels eines Gebrauchspuffers, der immer frisch aus einem 10 fach konzentrierten Puffer angesetzt wurde. Der Transfer dauerte 30 min bei einer maximalen Stromstärke von 100 mA pro Gel. Nach Markierung der rechten oberen Ecke, Waschen und Ponceau-S - Färbung der Membran, wurden mit einem Skalpel jeweils zwei Streifen aus einer Laufbahn geschnitten, die nach Beschriftung in je 2 ml PBS für 1 - 2 h auf dem Schüttler wieder entfärbt wurden. Erstantikörper (gegen MBP, MOG, S100, P₀) wurden 1:1000 gelöst, außer anti-GFAP (1:100) und für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde mit 2% Milchpulver in PBS-T für 2-3 Stunden geblockt, bevor in allen Versuchen außer für S100-präinkubierte Streifen (Ziege-anti-Ratte IgG) mit POD-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG (Zweitantikörper) in einer (1:3000)-Verdünnung bei RT 2 - 3 h geschüttelt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde dann mit frisch angesetztem, gefiltertem (0,45 µm) und mit 10 µl H₂O₂ zugesetztem 0,1 % (w/v) Diaminobenzidin (DAB) gefärbt.

2.2.2.1.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das Prinzip der Hochdruckflüssigkeitschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit einzelner Proteinfractionen an eine Säule über hydrophobe Wechselwirkungen. Die hier beschriebene umgekehrte Phasen (RP) HPLC wurde mit der

Unterstützung von C. Söder im Institut für Physiologische Chemie nach folgendem Protokoll von G. Giegerich¹³⁵ durchgeführt:

Eine MBP-Lösung von 100 µg / 5 ml wurde auf eine mit Vydac C4 - Material gefüllte, mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) equilibrierte Säule aufgetragen. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde von einem Pumpenprogramm gesteuert, durch Mischung von reinem Laufmittel A (bdH₂O mit 0,1% (v/v) TFA) von Pumpe A und reinem Laufmittel B (ACN) von Pumpe B. Die Elution des Proteins erfolgte mit folgendem verkürzten, mehrstufig linearen Gradienten:

0	-	25 % ACN	in	5 min
25	-	45 % ACN	in	50 min
45	-	100 % ACN	in	10 min

Die Flußrate betrug 0,7 ml / min

2.2.2.1.6 Ansequenzierung des humanen basischen Myelinproteins (hMBP)

Das gereinigte MBP wurde im Institut für Physiologische Chemie (Prof. Hoppe) ansequenziert.

2.2.2.2 Autoreaktive T-Zelllinien

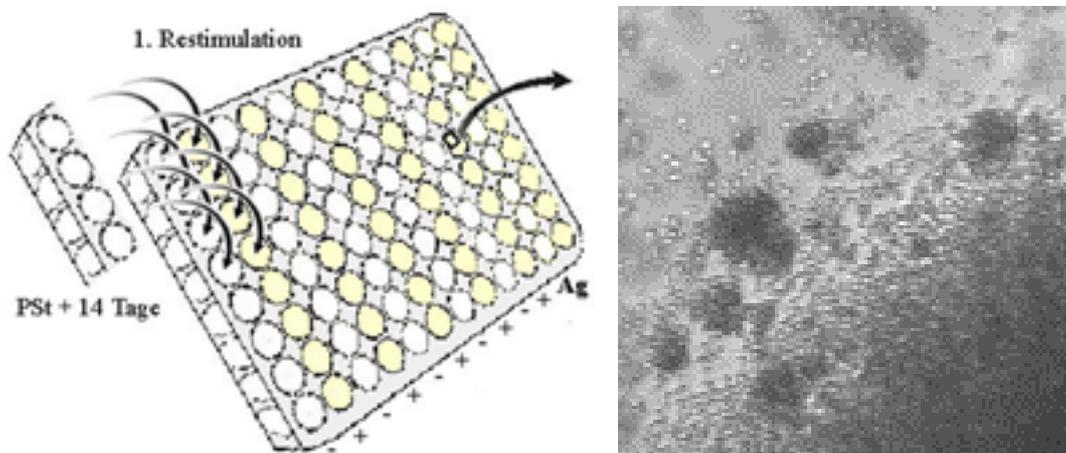
2.2.2.2.1 Etablierung von autoreaktiven T-Zelllinien

Die schrittweise Selektion für ein bestimmtes Antigen spezifischer T-Zellen durch Auswahl der spezifisch proliferierenden T-Zellen und wiederholte Stimulationen wurden sich bei der hier verwendeten Split-well-Methode zu Nutze gemacht. Für eine Primärstimulation wurden, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, aus 20ml EDTA-Blut eines freiwilligen Spenders mit der Lymphoprep - Dichtegradientenzentrifugation ca. 2×10^7 PBMC isoliert, die in einem Verhältnis von 2×10^5 / 100 µl R₅ und Napf auf einer 96-Napf-Rundbodenplatte ausgesät und mit 20 µg hMBP bzw. 20 Lf TT pro ml stimuliert wurden. Die Zellen wurden nach drei Tagen mit 100 µl frischen Medium (R₅) versorgt, das 10 ng / ml rekombinantes humanes IL2 enthielt. Bis zu 14 - 21 Tage nach Primärstimulation wurden alle 3 - 4 Tage jeweils 100 µl des verbrauchten Mediums abgesaugt und die Zellen mit 100 µl frischem IL2-haltigen Medium versorgt. Für die 1. Restimulation wurden aus 40 ml EDTA-Blut des gleichen Spenders ca. 4×10^7 PBMC isoliert, um entsprechend für zwei Zellkulturplatten ausreichend APC zu haben. Diese

Zellen wurden 20 min bei 40 Gy bestrahlt, damit sie noch Antigen präsentieren, nicht jedoch weiter proliferieren konnten. Die Zellen aus der Primärstimulation wurden auf der Platte bei 272 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit R₀ gewaschen und nach Resuspension in 100 µl R₅ mit einer Mehrkanalpipette auf zwei neue 96-Napf-Rundbodenplatten in jeweils zwei benachbarte Näpfe zu 50 µl aufgeteilt. Nach Zugabe von 2 x 10⁵ bestrahlten APC / 50 µl in jeden Napf wurden die jeweils rechten Näpfe der zugehörigen Paare mit dem spezifischen Antigen in derselben Konzentration versorgt, wie bei der Primärstimulation, die jeweils ungeraden Spalten der beiden Platten blieben ohne Antigen (Abb. 3, links).

Abbildung 3: Schema der Split-well-Methode (links): Etwa 14 Tage nach Primärstimulation (PSt) wurden die T-Zellen im Rahmen der 1. Restimulation auf zwei benachbarte Näpfe einer neuen Zellkulturplatte aufgeteilt und der jeweils rechte Napf mit Antigen (Ag) versorgt. Zur 1. IL2-Versorgung (3 Tage später) wurden nur die antigenspezifischen, im Vergleich zur Negativkontrolle proliferierenden Näpfe selektiert.

Der Lichtmikroskopische Ausschnitt (rechts, 400x) einer proliferierenden T-Zellkultur im Rundboden-Napf zeigt Proliferationshaufen (Cluster) und am Rand erkennbare T-Zellblasten (Selektionskriterien). Die Negativkontrolle bildet keine Cluster aus.



Nach drei Tagen wurden alle Näpfe mit frischem IL2-haltigen Medium versorgt, und beginnend mit dem nächsten Tag wurden in den folgenden drei Tagen diejenigen antigenstimulierten Näpfe markiert, die im Vergleich ihrer zugehörigen Negativkontrolle mikroskopisch erkennbar mehr oder größere Zellanhäufungen (Cluster, Abb.3, rechts) bildeten oder besser proliferierten. Zur nächsten IL2-Versorgung wurden dann nur die Zellen der markierten Näpfe auf eine neue Platte überführt und bei starker Proliferation

nötigenfalls geteilt. Bei jeder folgenden IL2-Versorgung wurde versucht, die Zellen weiter aufzuteilen und zu vermehren.

In etwa 2 - 3 wöchigen Abständen wurden die T-Zellen stets nach dem gleichen Ablauf restimuliert. Dazu wurden wieder autologe APC in der benötigten Anzahl präpariert (2×10^5 / Napf) und ausplattiert. Es wurden oligoklonale T-Zellen (also solche aus gleichen Ursprungsnapfen) eingesammelt, zweimal gewaschen und in einem Verhältnis von $2 - 4 \times 10^4$ / Napf mit den APC und dem spezifischen Antigen kultiviert. Nach der 3. Restimulation wurde die Antigenspezifität ermittelt (s. 2.2.2.2.2) und bei Reproduzierbarkeit und ausreichender Expansion unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle vor jeder nächsten Restimulation ein Teil der Zellen für spätere Versuche eingefroren (s. 2.2.2.2.6).

2.2.2.2.2 Proliferationsmessung und Stimulationsindex (SI)

Für Proliferationsstudien wurden ruhende T-Zellen in einer Konzentration von $2 - 4 \times 10^4$ Zellen pro Napf mit 2×10^5 bestrahlten (40 Gy) autologen PBMC und Antigen in $100 \mu\text{l}$ R₅ / Napf in 96-Napf-Rundbodenmikrotiterplatten ausgesät. Alle getesteten Antigene wurden als Dreifachansätze in einer Konzentration von $20 \mu\text{g}$ Antigen / ml, mit Ausnahme von Tetanus Toxoid ($20 \text{ Lf} / \text{ml} = 2,08 \mu\text{g} / \text{ml}$) eingesetzt. Die Zellen wurden 72 h in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert und nach 16 - 18 h Inkubation mit $0,2 \mu\text{Ci } ^3\text{H} - \text{Thymidin}$ / Napf mit einem Betaplate-Erntegerät auf Glasfaser - Filtermatten geerntet. Die an den, für mindestens 2 1/2 h bei 60°C getrockneten Filter gebundene Radioaktivität wurde mit einem Betaplate Flüssigszinillationszähler gemessen. Das Verhältnis der Zerfälle pro Minute bei den antigen- / peptidstimulierten Zellen bezogen auf vergleichbare Zellen ohne Stimulation, wurde als Stimulationsindex (SI) bezeichnet. Dieser für die Antigenspezifität einer Zelllinie bezeichnende Faktor gibt somit an, um das Wievielfache diese Zelllinie durch das spezifische Antigen proliferiert.

2.2.2.2.3 Bestimmung der Peptidspezifität (Epitope Mapping)

Für die Charakterisierung der Peptidspezifität einer Zelllinie, die sich im Proliferationstest als für Gesamt-MBP spezifisch erwies (vgl. 2.2.2.5), wurde beschriebener Test zum nächsten Restimulationszyklus mit 16, sich meist um 10 Aminosäuren überlappenden, synthetisierten MBP-Peptiden (Sequenzen s. Material 2.1.) wiederholt. Das jewei-

lige Peptid wurde in einer Konzentration von 10 µg / ml verwendet, und die so, bei Dreifachansätzen gemessene Einbaurate des ³H- Thymidins wurde mit der einer unstimulierten Kontrolle verglichen. Dieser Test wurde für jede Zelllinie zum nächstmöglichen Zeitpunkt einmal wiederholt.

2.2.2.2.4 Phänotypisierung und FACS

T-Zelllinien wurden 2 bzw. 3 Tage nach Antigenstimulation im Vergleich mit nicht restimulierten Zellen gefärbt. 2 x 10⁵ Zellen pro Ansatz wurden in PAB-Puffer gewaschen (272 x g, 5 min 4°C) und anschließend 30 min auf Eis im Dunkeln mit dem in PAB-Puffer (90 µl) verdünnten Antikörpern (10 µl) inkubiert. Die optimalen Antikörperkonzentrationen wurden durch vorherige Verdünnungsreihen evaluiert. Gelegentlich war es bei Dreifachfärbungen nötig, den Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Antikörper nach den anderen Antikörpern und einem weiteren Waschschrift zu inkubieren, zumeist konnten alle Antikörper und Isotypen jedoch gleichzeitig zugegeben werden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 300 µl PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte in einem FACScan-Gerät, wobei jeweils 10000 Zellen gemessen wurden. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm CellQuest[®] analysiert.

2.2.2.2.5 Charakterisierung der Zytokinsekretion und ELISA

Zur Bestimmung des für die jeweilige Zellpopulation typischen Zytokinprofils wurden 12, 48 und 72 h nach Antigenstimulation Überstände von Replikaten einer Zelllinie, sowie entsprechende, unstimulierte Kontrollen gesammelt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. In verschiedenen Zytokin-ELISAs wurden dann unverdünnte 50 µl Aliquots der Verlaufsuntersuchung einer Zelllinie und möglichst der übrigen Zelllinien einer Stimulation auf der gleichen Platte getestet. Dafür wurde eine ELISA-Platte für 1 h bei 37°C mit in Puffer verdünntem 1. Antikörper beschichtet. Nach 2 maligem Waschen mit PBS-T und einem Immuno-Waschkamm, sowie nachfolgendem kräftigem Ausklopfen, wurden mit PBS-MP (250 µl / Napf) 30 min bei 37°C freie Bindungsstellen blockiert. Danach wurde 2 mal gewaschen und die zuvor aufgetauten, auf einer extra Zellkulturplatte zu einer Standardreihe in R₅ vorverdünnten Zytokinstandards, sowie Zellkulturüberstände in 50 µl Volumina auf die Platte übertragen. Die Platte wurde für 30 (IFN_γ, TNF_α und IL2) - 45 min (IL4 und IL10) bei 37°C inkubiert, bevor nach 4 mali-

gem Waschen mit dem in PBS-MP verdünnten, biotinylierten 2. Antikörper für 30 - 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Nach 4 maligem Waschen wurde die in PBS-MP verdünnte Avidin-Peroxidase aufgetragen, die 30 min bei 37°C belassen wurde. Nach 5 maligem Waschen mit PBS-T und einmaligem mit Zitratpuffer reagierten 100µl ELISA-Substrat (1mM ABTS) / Napf für 2 - 5 min (IFN γ , TNF α , IL2) bzw. bis zu einer Stunde (IL4, IL10) bei RT, bevor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm (Referenzfilter bei $\lambda = 492$ nm) an einem ELISA-Photometer gemessen wurde. Da wegen der variablen Farbentwicklungszeiten die Reaktion nicht gestoppt wurde, galt der Farbumschlag der hohen Standardkonzentrationen als Richtwert für die Messung. Bei mehrfachen Messungen in 5 - 10 min Abständen erwies sich dieses Vorgehen als konsistent.

2.2.2.2.6 Kryokonservierung und Rekultivierung

Da sich Zelllinien bei höherer Restimulationszahl differenzieren und wichtige Eigenschaften verlieren können, zudem eine längere Kultivierung die Gefahr der mikrobiellen Kontamination in sich birgt, wurden Teile der T-Zellen jeweils vor Restimulation eingefroren. Hierzu wurden T-Zellen eingesammelt und pelletiert. Die Zellen wurden zu einer Dichte von $0,4 - 1 \times 10^7$ T-Zellen in 1 ml kaltem EM resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt, welche zwischen zwei Styroporständern sofort bei -80°C eingefroren wurden. Durch die Styroporisolation fiel die Temperatur im Kryoröhrchen innerhalb von Stunden langsam auf -80°C ab. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen in flüssigen Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte standardisiert nach einem schonenden, von der Ulmer Transfusionsimmunologie entwickelten Verfahren. Dabei wurde ein Kryoröhrchen direkt aus dem flüssigen Stickstoff im 37°C warmen Wasserbad zügig (1-2 Minuten) angetaut. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde mit einer 1000er Pipette vorsichtig in ein mit 100 µl kaltem R₀ vorbereitetes 50 ml Röhrchen überführt. Innerhalb von 10 min wurde in Minutenabständen das Röhrchen durch Zugabe von ansteigenden Volumina (120 µl, 150 µl, 190 µl, 260 µl, 360 µl, 520 µl, 860 µl, 1690 µl, 4750 µl, 10 ml) aufgefüllt, um das im EM enthaltene DMSO auszuverdünnen, jedoch nicht die Zellen durch einen zu raschen Anstieg des osmotischen Gradienten zu schädigen. Nach einer Zentrifugation bei 272 x g und 4°C für 8 - 10 min, gefolgt von einmal Waschen in R₀ konnten die meist über 85 % vitalen T-Zellen unmittelbar restimuliert werden. Auch

andere Zellen, wie PBMC wurden ebenso aufgetaut, bevor sie bestrahlt und als APC eingesetzt wurden.

2.2.2.3 *In vitro*-Infektionsversuche

2.2.2.3.1 Virusisolation und –konzentrierung

Das in Hühnereiweiß vermehrte Influenza-Virusisolat A/PR/8/34 (bis zum Einsatz konstant bei -20°C gelagert) wurde von Dr. Stefan Niewiesk, das HHV-6B-Isolat von Dr. Benedikt Weißbrich, beide Virologie Würzburg, freundlicherweise zu Verfügung gestellt. Michaela Götzelmann, Virologie, vermehrte das humane Herpesvirus 6 in MT-4-Trägerzellkulturen durch regelmäßiges Passagieren auf nicht-infizierten MT-4-Zellen in R_{10} . Durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen entstand ein Lysat HHV-6B infizierter MT-4-Zellen, welches durch Ultrazentrifugation durch ein Sukrosekissen (60%) konzentriert wurde.

2.2.2.3.2 Virustiterbestimmung

Die Viruskonzentrationen der Virus-Stammlösungen wurden für Influenza mit dem Hämagglutinationstest und für HHV-6 zytofluorimetrisch bestimmt.

2.2.2.3.2.1 Hämagglutinationstest (HAT)

Die Konzentration der Influenzavirus-Stammlösungen wurde in hämagglutinierenden Einheiten (HAE) angegeben. Hierbei wurde im sogenannten HAT die minimal nötige Verdünnung bestimmt, um eine Agglutination von Gänse-Erythrozyten zu erreichen. Die verwendeten Virus-Stammlösungen hatten Infektionspartikeldichten von $1,3 \times 10^6$ HAE / ml (Aliquot #7) und $2,5 \times 10^7$ HAE / ml (Aliquot #6).

2.2.2.3.2.2 Zytofluorometrie (FACS)

Auf 24-Napf-Microtiterplatten wurden MT-4-Zellen als Monolayer ausplattiert und in Serienverdünnungen HHV-6-Stammlösung zugegeben. In Titrationsversuchen wurde diejenige Viruskonzentration bestimmt, die nötig war, um eine MT-4-Zellkultur zu infizieren. Hierzu wurde nach vorheriger Membranpermeabilisierung mit einem HHV-6-spezifischen polyklonalen Antikörper aus der Maus (freundlicherweise erhalten von PD Christian Jassoy, Virologie) gefärbt. Die daraufhin im FACS ermittelte TCID_{50} betrug für das Lysat 1×10^2 / ml, für das Viruskonzentrat nach Ultrazentrifugation 1×10^7 / ml.

2.2.2.3.3 Virusinfektion von PBMC

Für die Virus-Infektionsversuche mit Influenza (Flu) und HHV-6B wurden PBMC von HHV-6-seropositiven gesunden Spendern aufgereinigt (vgl. 2.2.1.5). In 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden in 1 ml R_0 1×10^6 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Flu (MOI zwischen 1 und 10^{-5} HAE / Zelle) bzw. HHV-6 (MOI zwischen 10^{-2} und 10^{-6} TCID₅₀ / Zelle) bei 37°C + 5 % CO₂ für 1 h inkubiert. Nicht-infizierte Kontrollen wurden stets gleich inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit R_0 wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen / 100 µl R_{FCS} und Napf, mit oder ohne Zugabe von 10 µg / ml Phytohämagglutinin (EC) kultiviert. Die Zellen wurden mikroskopisch inspiziert und deren Proliferation nach 3 Tagen bestimmt (vgl. 2.2.2.2.2).

2.2.2.3.4 Koinkubationsmodelle

Unter der Vorstellung einer möglichen Relevanz des Infektionsmodus, wurden >80% durchinfizierte MT-4 Zellen, anhand des zytopathischen Effekts (CPE) mikroskopisch beurteilt, und nicht-infizierte MT-4 Zellen mit PBMC zusammen in Kultur gehalten. Die eingesetzten Kombinationen reichten von einem Verhältnis (MT-4-Zellen : PBMC) zwischen 1:1 und 1:900. Analog zu Abschnitt 2.2.2.11.3 wurden die Proliferationswerte nach 3 Tagen gemessen.

2.2.2.3.5 Virusinfektion von antigenspezifischen T-Zelllinien

T-Zellen wurden üblicherweise aus Kultur verwendet, und zwar zumeist 14 - 21 Tage nach der letzten Restimulation. Die Zellen wurden eingesammelt und zweimal gewaschen, bevor sie in entsprechenden Mengen (zumeist 8×10^4 - 3×10^5) auf 15 ml Röhrchen verteilt wurden und im Institut für Virologie mit entsprechend in 1 ml R_0 vorverdünnten Virus-Konzentrationen zwischen MOI 1 bis 10^{-5} HAE / Zelle bei Flu und 10^{-2} bis 10^{-6} TCID₅₀ / Zelle bei HHV-6B mit halb aufgeschraubten Deckeln bei 37°C und 5 % CO₂ für 1 h inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen einmal mit R_0 gewaschen und als Triplikate in einer Konzentration von 2×10^4 / 100 µl R_5 bzw. R_{FCS} und Napf ausgesät.

2.2.2.3.6 Virusinfektion von APC für die spezifische T-Zellstimulation

Als APC wurden für die T-Zelllinien PeR frische PBMC isoliert, während für alle übrigen aufgetaute Zellen verwendet wurden, die vorwiegend nach Leukapherese eingefro-

ren worden waren. Die für die Infektion benötigten Zellen (unter Einbeziehung eines 15% igen Verlusts durch den folgenden Inkubationsvorgang mit dem Virus) wurden in Aliquots mit Zellzahlen zwischen 8×10^5 - 4×10^6 in 15 ml Röhrchen gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen wie die T-Zellen vorinkubiert (vgl. 2.2.2.3.5). Um auf gleiche MOIs zu kommen, mußten wegen der 10fachen Zellzahl auch die Virusverdünnungen für die APC 10fach konzentrierter sein. Nach Waschen wurden die infizierten T-Zellen (vgl. 2.2.2.3.5) mit nicht-infizierten APC (2×10^5 / 100 μ l R₅ bzw. R_{FCS}), umgekehrt die in unterschiedlichen MOIs infizierten APC mit nicht-infizierten T-Zellen zusammen kultiviert. Die nicht-infizierten Zellen wurden stets unter gleichen Inkubations- und Mediumbedingungen gehalten. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte T-Zellen mit nicht-infizierten APC zusammengegeben. Alle Kombinationen wurden auf einer 96-Napf-Rundbodenplatte in Triplikaten, der Virusversuch VCPA 21 in Sechsfachansätzen jeweils mit und ohne Antigen (TT bzw. MBP) kultiviert. Die Proliferation wurde nach Protokoll gemessen (vgl. 2.2.2.2.2 und 2.2.2.3.5)

2.2.2.4 Untersuchungen zu HHV-6-Reaktivierung im Serum

2.2.2.4.1 Probenmaterial

Es wurden Serumproben u. a. von einer Therapiestudie (Pentoxiphyllin (PTX) bei schubförmiger MS) auf HHV-6 Reaktivierung untersucht. Die ca. 3 Jahre konstant bei -80°C gelagerten Proben wurden im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg auf HHV-6-Antikörper und HHV-6-DNA untersucht. Das Kontingent setzte sich zusammen aus Proben von 62 MS-Patienten mit schubförmigem Verlauf, zum Zeitpunkt der Blutentnahme aber stabiler Phase. 20 Patienten aus dieser Gruppe waren mit PTX behandelt und 23 erhielten Placebo. Es wurden Serumproben von 19 Patienten mit schubförmigen Verlauf eingeschlossen, die nicht an besagter Studie teilgenommen hatten und 12 von gesunden Kontrollspendern.

2.2.2.4.2 Virus-Serologie

Anti-HHV-6-Antikörper wurden vom Institut für Virologie und Immunbiologie durch einen indirekten Immunfluoreszenztest mit HHV-6-infizierten MT-4 Zellen getestet. Für die IgG-Bestimmung wurde, angefangen mit 1:10, jede Serumprobe in einer 4-fach-Verdünnungsreihe aufgetragen. Für IgM-Bestimmungen wurden die Serum-Aliquots

mit RF-Absorbens (Dade Behring, Marburg) vorbehandelt, um Rheumafaktoren und HHV-6-spezifische IgG zu entfernen, und anschließend als 1:10 - Verdünnung eingesetzt.

2.2.2.4.3 Virus-DNA-Isolation und semi-nested PCR

DNA wurde aus 200 µl Serum mit Hilfe des QIAamp Blood kits (Qiagen, Hilden) nach den Empfehlungen des Herstellers extrahiert. Im letzten Schritt wurde die DNA in 50 µl ddH₂O eluiert. Für die PCR-Analyse wurden 10 µl der extrahierten Proben zu 40 µl PCR Prämix pipettiert. Primer-Sequenzen für die äußere PCR:

HH61 (CAGTGTGTAG TTCGGCAGCC CCGAG)

HH62 (AAGCTTGCAC AATGCCAAAA AACAG)

Die Primer wurden von den übrigen Bestandteilen des Prämixes durch eine Wachsschicht getrennt, um auf diese Weise die „Hot-Start“-Technik verwenden zu können. Die Amplifikation wurde mit 42 Zyklen bei 55°C Anlagerungstemperatur durchgeführt. Für größere Sensitivität wurde eine semi-nested PCR durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µl des PCR-Produkts aus dem ersten Lauf zu 50 µl PCR-Prämix gegeben, der das Primer-Paar HH62 und HH63 (CTCGAGTATG CCGAGACCCC TAATC) enthielt. Die Reaktion lief in 25 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 55°C ab. PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung bestimmt. Negativkontrollproben und Kontrollen des Reagens wurden in jeden PCR-Lauf einbezogen. Niedrige Konzentrationen von Plasmidkontrollen (0,1 fg pro Reaktion) wurden in allen Extraktions- und Amplifikationsschritten eingeschlossen.

2.2.3 Auswertung und Statistik

Die graphischen Darstellungen und statistischen Berechnungen wurden mit dem Datenverarbeitungsprogramm Excel[®] durchgeführt, die Auswertungen der ViMS-Studie zudem mit StatView[®]. Die verwendeten Testverfahren wurden im Text der jeweiligen Abbildungen genannt.

3 Ergebnisse

3.1 Vakzinierung und Immunreaktion bei MS (ViMS-Studie)

3.1.1 Basisdemographische Daten

Zwischen 10/98 und 4/99 wurden 5 MS-Patienten und 26 alters- und geschlechtzugeordnete, gesunde Kontrollpersonen, zwischen 10/99 und 3/00 weitere 7 Patienten mit der gesicherten Diagnose einer MS und 3 gesunde Kontrollpersonen (eine von ursprünglich 4 Kontrollpersonen wurde nicht geimpft) mit der Influenza-Spaltvakzine (Influvac®) geimpft und nachuntersucht. Hiervon hatten 6 Patienten und 4 Kontrollpersonen einen Infekt der oberen Luftwege, wobei ein Kontrollspender mit Infekt nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde, da er als Labormitarbeiter häufig Kontakt zu Myelinantigenen hatte. Von den übrigen 9 Studienteilnehmern mit Infekt, gab es nur von zwei Patienten und einer Kontrollperson komplette Daten zu allen 7 Zeitpunkten. Aus diesen Gründen konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Dennoch sei exemplarisch im Kapitel ein Fall veranschaulicht.

Von den 12 untersuchten Patienten hatten sieben einen schubförmigen Verlauf mit einer medianen Krankheitsdauer von $11,9 \pm 7$ Jahren. Ein Patient hatte während des Untersuchungszeitraums von 16 Wochen nach Impfung einen Schub, dieser Patient und vier weitere hatten Atemwegsinfektionen. Der mittlere EDSS bei Studienbeginn und -ende war 2,0 (1,0 – 3,5). Weitere fünf Patienten hatten einen sekundär chronischen Krankheitsverlauf mit einer medianen Dauer von $17,8 \pm 5,5$ Jahren. Ein Patient mit sekundär chronischem Verlauf hatte einen Infekt der Atemwege. Der mediane EDSS war bei Studienbeginn 6,0 (3,0 – 6,5) und unverändert bei Studienende 6,0 (3,5 – 6,5).

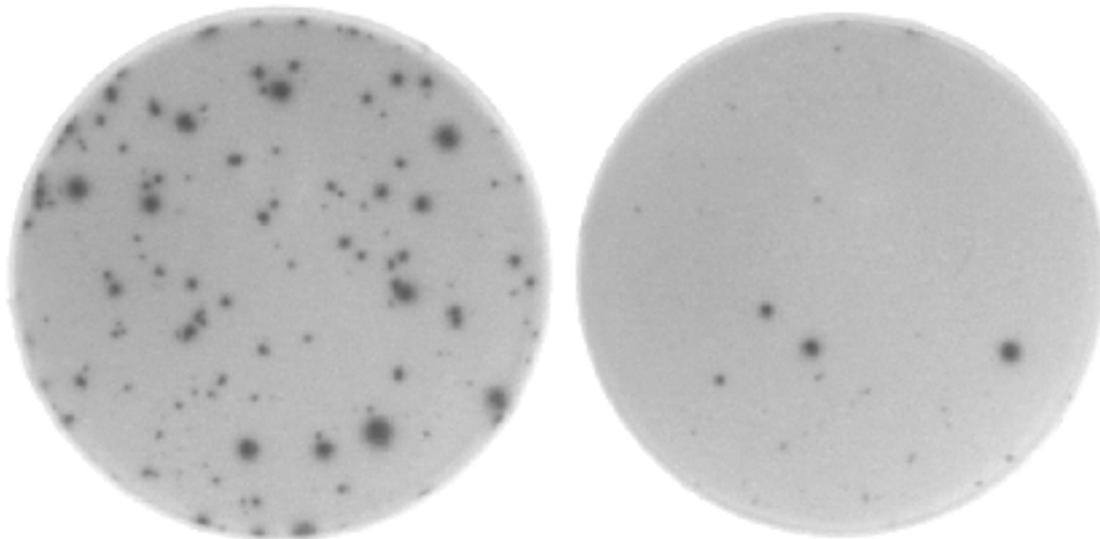
Tabelle 6: Basisdemographische Daten der ViMS-Studie:

Spender	n	Alter \pm SD		Geschlecht (%)	Infektionen
MS-Patienten	12	41.1 ± 9.9	f	8 (66.7)	6
			m	4 (33.3)	
Kontrollspender	28	31.1 ± 6.5	f	15 (53.6)	3
			m	13 (46.4)	

3.1.2 Immunreaktion nach Impfung und Infektion

Im Folgenden wurden in Kurzzeitkulturen im Rahmen der ViMS-Studie zelluläre Immunantworten gegen myelin-spezifische Autoantigene, Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) und dialysierte Impfantigene, TT als Referenzantigen und α CD3-Antikörper als Positivkontrolle, vor und zu mehreren Zeitpunkten nach Influenzaschutzimpfung, sowie natürlich aufgetretenen Atemwegsinfektionen untersucht. Mit dem ELISPOT wurde die zelluläre IFN γ -Sekretion auf Einzelzellebene bestimmt (Abb. 4), um so Rückschlüsse auf die Frequenz der im Blut zirkulierenden antigenspezifischen T-Zellpopulationen zu ziehen. Mit der quantitativen Echtzeit-RT-PCR konnte die antigen-induzierte Expression von IFN γ -mRNA bestimmt werden, welche sehr frühe und geringgradige Veränderungen der T-Zellaktivierung anzeigt.

Abbildung 4: IFN γ -Einzelzellsekretion auf Nitrozellulosemembranen des ELISPOT-Assays (x 16) nach Kurzzeitstimulation von $1,67 \times 10^5$ PBMC mit Influenza A/PR/8/34 (links ca. 80 spots) und 5×10^5 PBMC mit einem Antigen wie MBP, gegen das weniger spezifische Zellen reagieren (rechts 4 spots).



3.1.2.1 T-Zellquantifizierung und ELISPOT

In Vorexperimenten konnte ein ELISPOT-Assay zur sicheren Detektion und Quantifizierung IFN γ -sezernierender Zellen entwickelt werden. In Etablierungs-Assays ergaben sich bei adäquater Antigen-/ α CD3-/PHA-Stimulation verlässliche Werte mit einem ü-

berwiegend sehr niedrigen Hintergrund. Für Negativkontrollen und Antigenstimulationen, deren spezifische Zellen in einer erwarteten Frequenz unter 10^{-5} vorliegen (MBP, MOG) erwies sich eine Ausgangsverdünnung von 5×10^5 PBMC / Napf, für TT, Flu-Stimulationen eine 1:3-Verdünnung (ca. $1,67 \times 10^5$ PBMC / Napf), für α CD3 bzw. PHA eine 1:9-Verdünnung (ca. $5,56 \times 10^4$ PBMC / Napf) als sinnvoll. Über eine Verdünnungsreihe mit MBP-spezifischen T-Zellen (1 – 10000) konnte für einen weiten Bereich (10-1000 eingesetzte Zellen) eine lineare Abhängigkeit zwischen $\text{IFN}\gamma$ -spots (3-300) und spezifisch aktivierten Zellen gezeigt werden. Die für TT und Flu konsequent durchgeführte Triplikats-Dreifachverdünnungsreihe zeigte eine Korrelation von $r^2 > 0,96$ zwischen ermittelten Spots und eingesetzten PBMC (5×10^5 , $1,67 \times 10^5$, $5,56 \times 10^5$) für Zellpopulationen mit hohen Vorläuferfrequenzen im Blut von $> 20/10^5$ PBMC und $r^2 > 0,85$ für niedrigere Frequenzen.

Zur Etablierung des ELISPOT-Assays wurden verschiedene Untersuchungsbedingungen getestet, bevor die oben beschriebene Standardmethode (s. Kap. 2.2.2.10) für weitere Experimente durchgehend verwendet wurde.

Dies gelang aufgrund einer insgesamt schwachen Antikörperfärbung und unspezifischer Hintergrundsignale nicht für Th2-Zytokine. Trotz Verwendung der von zwei verschiedenen Herstellern (Mabtech, Pharmingen) empfohlenen Antikörperpaare waren sowohl die Sekretion von IL-4 oder IL-10 als auch die Antikörperbindung an diese Zytokine bedeutend schlechter.

Die in der ViMS-Studie auf denselben Platten mitgetesteten Lösungsmittel (Tab. 7) zeigten kaum Hintergrundaktivität, weshalb deren Einfluß auf die Immunogenität der in diesen Lösungsmitteln gelösten Antigene vernachlässigt werden konnte.

Tabelle 7	Lösungsmittel	gelöstes Antigen
	EW 1:10	Flu 1:10
	Essigsäure	rhMOG 20 μ g/ml
	DMSO	Peptide

3.1.2.2 Quantifizierung von Zytokin-mRNA und RT-PCR

3.1.2.3 β -Aktin-cDNA-Konzentrationen

Nach Einsammeln der für 12, 48 und 72 Stunden kultivierten Zellen aus 3 Kulturnapfen, Zellyse, RNA-Isolation, reverser Transkription und Verdünnung konnten mit der quantitativen RT-PCR für unstimulierte MBP-spezifische T-Zellen β -Aktin-Konzentrationen von $6,6 - 622 \times 10^4/\mu\text{l}$, für MBP-stimulierte $340 - 20800 \times 10^4/\mu\text{l}$ gemessen werden. Aus den PBMC-Primärkulturstimulationen der ViMS-Studie lagen die β -Aktin-Konzentrationen zwischen $1,9 \times 10^4$ und $7,6 \times 10^6$, das Mittel war $1,1 \times 10^6$.

3.1.2.4 Methodenvergleich zwischen RT-PCR und ELISPOT

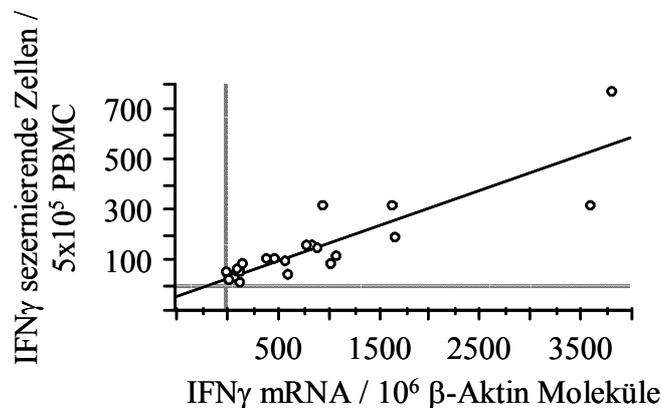
3.1.2.4.1 Antigenunabhängiger Vergleich im Rahmen der ViMS-Studie

Im direkten Vergleich zwischen $\text{IFN}\gamma$ -Expression (RT-PCR) und Anzahl der $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Zellen (ELISPOT) aus den gesammelten Proben der ViMS-Studie (s. Kap. 2.2.2.10) war der Korrelationskoeffizient niedrig (0,44). Betrachtet man die Proben der einzelnen Spender getrennt voneinander, kann nach Ausschluß vereinzelter Ausreißer bei 7/12 Spendern eine lineare Korrelation $> 70\%$, bei 9/12 noch $> 60\%$ ermittelt werden. Die einzelnen Assays ($n=16$) für sich betrachtet sind abgesehen von einer Ausnahme mit Koeffizienten von $r^2 > 0,65$, allerdings mitunter divergenten Steigungen in den Trendlinien, gut korreliert.

3.1.2.4.2 Methodenvergleich nach Influenzastimulation (ViMS-Studie)

Bei einer Auswahl von Ansätzen ($n=23$), in welchen mit Influenzaprotein und den beiden Impfstoffen stimuliert wurde, ergaben sich zwischen $\text{IFN}\gamma$ -mRNA (RT-PCR) und $\text{IFN}\gamma$ -spots (ELISPOT) gute Korrelationen nach Influenzastimulation ($r^2=0,63$), nach Stimulation mit dem Impfstoff 98/99 ($r^2=0,63$) und 99/00 ($r^2=0,77$) (Abb. 5).

Abbildung 5: Methoden-Vergleich zwischen RT-PCR ($\text{IFN}\gamma$ -mRNA-Expression) und ELISPOT ($\text{IFN}\gamma$ Sekretion) an Ergebnissen von 13 Spendern im Rahmen der ViMS-Studie. $r^2 = 0.766$, $p < 0.0001$



3.1.2.4.3 Immunitätsäquivalenz zwischen Flu A/PR/8/34 und den Impfstämmen

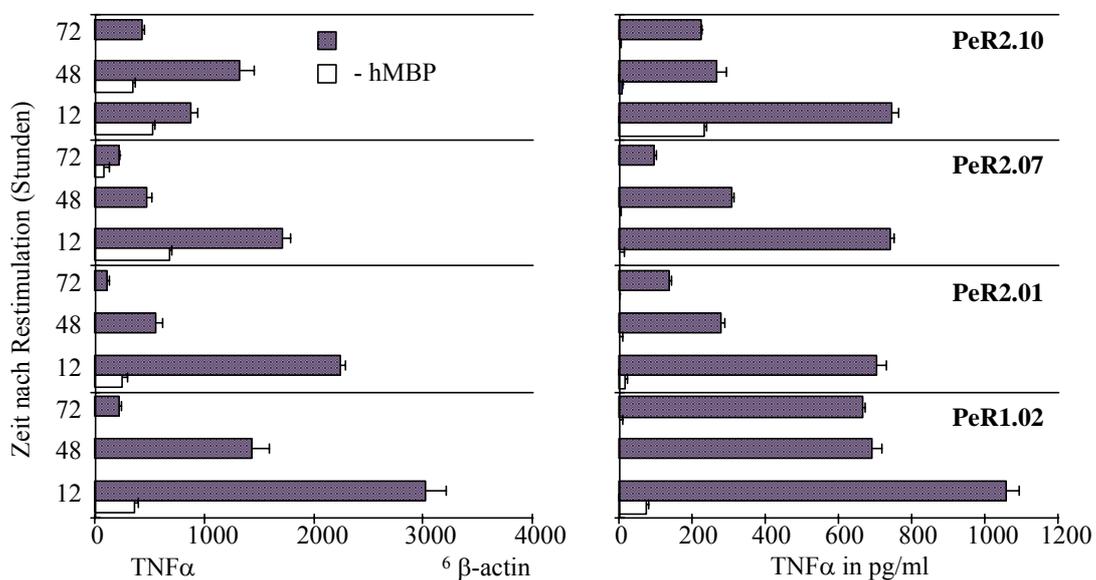
Im Vergleich der beiden Impfstoffpräparationen (98/99 und 99/00) mit dem durchgehend verwendeten Influenzavirusprotein nach UV-Inaktivierung konnte im ELISPOT eine hoch signifikante Korrelation ($p < 0,0001$) mit Koeffizienten von $r^2=0,89$ für Influvac[®] 98/99 und $r^2=0,91$ für Influvac[®] 99/00 ermittelt werden. Dabei war die Übereinstimmung zwischen beiden Impfstoffen 97,8%. Mit RT-PCR ergaben sich etwas schwächere Korrelationen hinsichtlich $\text{IFN}\gamma$ -Expression nach Stimulation mit Influenzaprotein und Influvac[®] 98/99 ($r^2=0,78$) bzw. Influvac[®] 99/00 ($r^2=0,82$), sowie zwischen beiden Impfstoffen (87,1%).

3.1.2.5 Methodenvergleich zwischen RT-PCR und ELISA

Unter verschiedenen Gesichtspunkten wurde die Korrelation zwischen Zytokin-Expression mit RT-PCR und Zytokin-Produktion mit ELISA untersucht. Im Rahmen der Immunphänotypisierung der antigen-spezifischen T-Zelllinien wurden die mRNA-

und entsprechenden Zytokinproteinprofile zu verschiedenen Zeitpunkten direkt miteinander verglichen. Generell gab es trotz standardisierter Untersuchungsbedingungen keine gute Korrelation zwischen den untersuchten Parametern. Für $\text{TNF}\alpha$ hingegen entsprachen zu jedem Zeitpunkt die gemessenen mRNA-Moleküle gut den im Überstand von MBP-spezifischen T-Zellkulturen ermittelten Zytokinmengen (Abb. 6)

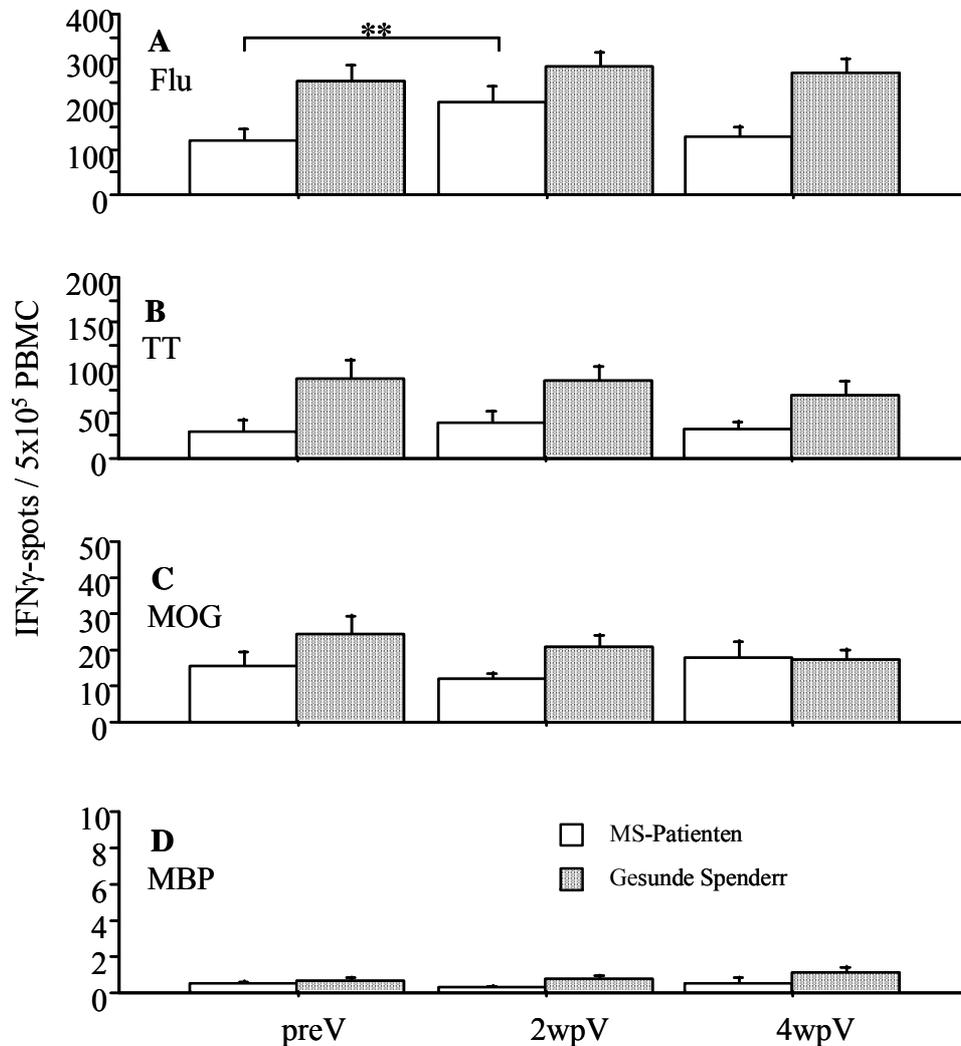
Abbildung 6: Vergleich zwischen $\text{TNF}\alpha$ -mRNA Expression und $\text{TNF}\alpha$ Sekretion, gezeigt an vier MBP-spezifischen T-Zelllinien eines Spenders, jeweils zu verschiedenen Zeiten nach Restimulation gemessen. Fehlerbalken: + SD (Doppelbestimmungen)



3.1.3 T-Zellantworten nach Influenzaschutzimpfung

Bereits 2 Wochen nach Impfung konnte bei den MS-Patienten im ELISPOT ein Anstieg der influenza-spezifischen T-Zellen gemessen werden ($p = 0,008$), während bei den gesunden Kontrollspendern schon vor Impfung ein hoher Ausgangswert vorhanden war (Abb. 7).

Abbildung 7: Häufigkeiten antigen-spezifischer T-Zellen für Flu, TT, MOG, MBP (IFN γ -ELISPOT) vor (preV) bzw. 2 und 4 Wochen nach Influenzaschutzimpfung (wpV) von MS-Patienten und gesunden Spendern. Fehlerbalken: + SEM, ** $p = 0,008$ (Student t -Test)



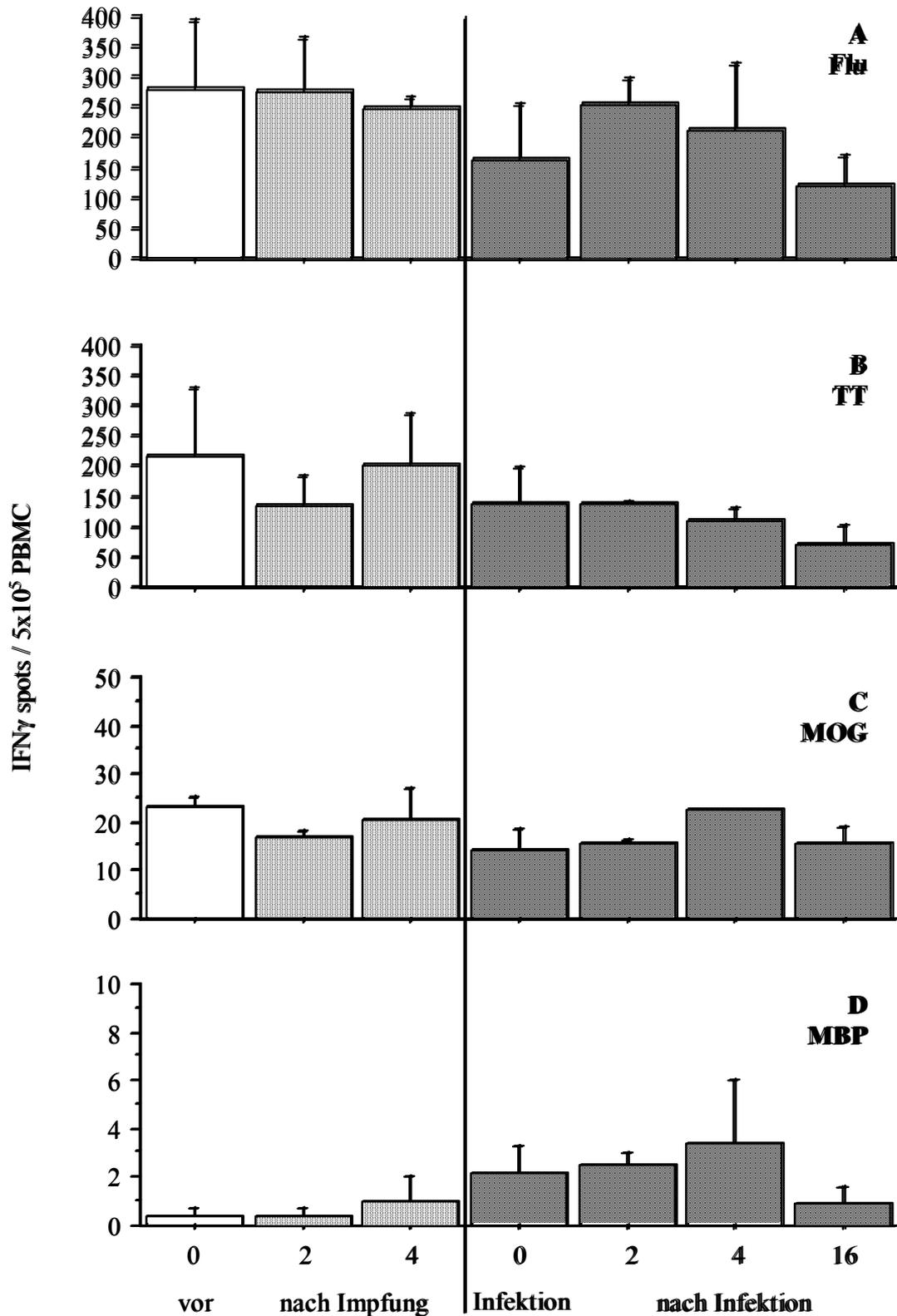
Individuelle T-Zellantworten wurden nach Ausprägung weiter untergliedert in starke Antworten gegen Influenza-Antigenstimulation (mindestens 2facher Anstieg der IFN γ -spots, und zwar 2 oder 4 Wochen nach Impfung im Vergleich zu dem Ausgangswert vor Impfung) und schwache Antworten (weniger als 2facher Anstieg der IFN γ -spots). Die Ansprechraten der MS-Patienten mit 5/12 (stark) und 6/12 (schwach) unterschieden sich nicht wesentlich von denen der gesunden Kontrollgruppe mit 5/28 (stark) und 18/28 (schwach). Ein MS-Patient und fünf gesunde Kontrollspender zeigten überhaupt keinen

Anstieg der Influenza-spezifischen IFN γ -spots nach Impfung. Bei 13 Spendern, teilweise aus der Infektgruppe, wurden mit RT-PCR für die IFN γ -mRNA-Expression nach *in vitro*-Stimulation mit Influenzaprotein ähnliche Ergebnisse beobachtet, was für eine gute Korrelation der beiden Methoden spricht. Ein solcher Zusammenhang konnte für IL4 nicht gefunden werden. An ausgewählten Überständen wurde die IFN γ -Sekretion untersucht. Sogar in Proben von Näpfen, die im ELISPOT eine hohe IFN γ -Antwort zeigten, konnte mit einem sensitiven IFN γ -ELISA kein IFN γ nachgewiesen werden. Dies spricht für die nahezu vollständige Bindung von IFN γ an die antikörperbeschichtete Nitrozellulosemembran des ELISPOT. Spezifische Antworten im IFN γ -ELISPOT gegen TT, MBP und MOG blieben in beiden Gruppen während des gesamten Beobachtungszeitraumes unverändert (vgl. Abb. 7).

3.1.4 T-Zellantworten nach natürlicher Atemwegsinfektion

Im Gegensatz dazu ließen sich um oder bis zu zwei Wochen nach einer zufälligen Atemwegsinfektion vermehrt MBP-spezifische T-Lymphozyten nachweisen (Abb. 8). Nicht weiter gestiegen ist die Zahl Influenza-spezifischer Zellen. Die geringfügig erhöhte mittlere Antwort auf MBP um vier Wochen nach Impfung kann teilweise durch einen Spender erklärt werden, der kurz nach Impfung eine in der Patientenaufzeichnung dokumentierte, Infektion mit leichten Infektzeichen durchgemacht hatte.

Abbildung 8: Antigen-spezifische T-Zellantworten dreier Impflinge, die vor dem 16-Wochentermin an einem Atemwegsinfekt erkrankten. Bis zu 4 Wochen danach zeigt sich ein nicht signifikanter Anstieg MBP-spezifischer T-Zellen. Fehlerbalken: + SEM.



Das Beispiel eines MS-Patienten (Spender 17) mit Atemwegsinfektion und Fieber genau am 16-Wochentermin nach Impfung spiegelt im Zeitverlauf und in direkter Gegenüberstellung der verwendeten Methoden (IFN γ -RT-PCR und IFN γ -ELISPOT) die Immunantworten gegen Influenza, MOG und MBP wider (Abb. 9ab), wobei MS-Patienten und gesunde Kontrollspender keine erkennbaren Unterschiede zeigten. Zum Zeitpunkt der Infektion stellt sich im ELISPOT-Assay ein deutlicher Anstieg der zellulären Antwort gegen MBP dar, nicht jedoch gegen andere Proteine oder in der sonst gut korrelierten RT-PCR. Zwar kam es auch bei den anderen beiden Spendern zu einem Anstieg der MBP-reaktiven T-Zellen innerhalb von 2 Wochen nach Infekt (Abb. 8D), doch war diese Reaktion nicht konsistent bei allen Probanden mit Infektion nachzuweisen. Bei vier MS-Patienten mit leichten Atemwegsinfektionen ohne Fieber, die außerhalb der Studie untersucht wurden, es also keine Ausgangswerte vor Infektion gibt, waren überhaupt keine MBP-spezifischen Zellen detektierbar, obwohl die PBMC zur gleichen Zeit, gelegentlich auf der gleichen Platte getestet wurden wie PBMC mit nachweisbarer Antwort auf MBP (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 9a: Antigen-spezifische T-Zellantworten gegen MBP und MOG bei einem MS-Patienten (Spender #17), der genau am 16-Wochentermin der Nachbeobachtungszeit einen fieberhaften Infekt der oberen Atemwege erlitten hatte. Inf: Infektion, wpV: Wochen nach Impfung, wpI: Wochen nach Infektion, n d: nicht bestimmt. Fehlerbalken kennzeichnen +SD.

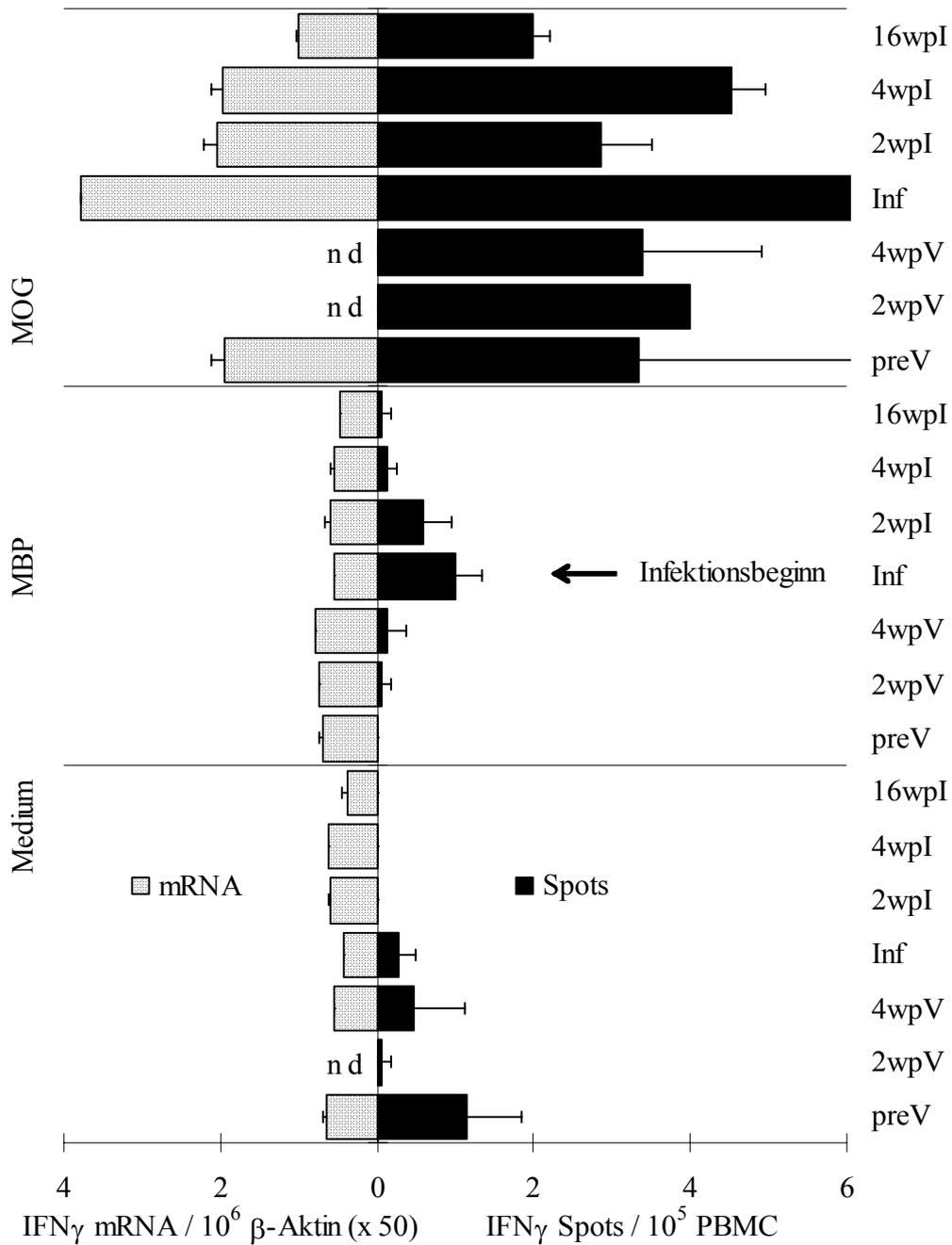
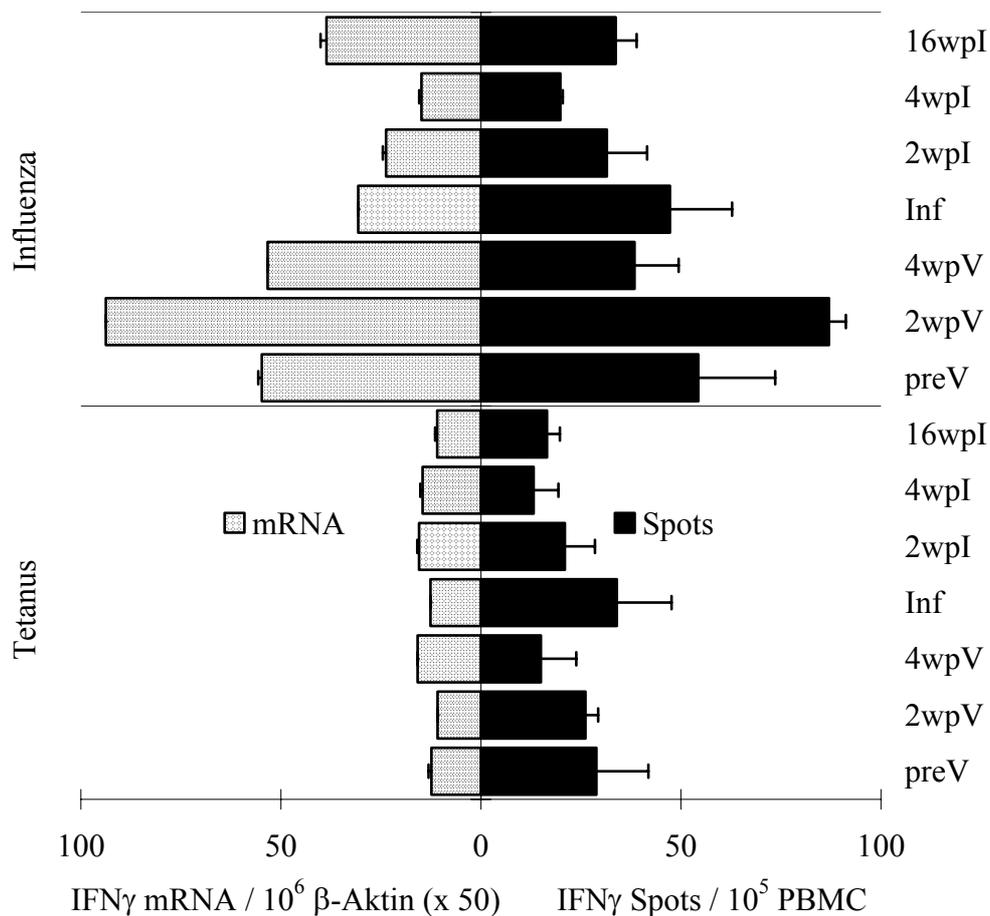


Abbildung 9b: Antigen-spezifische T-Zellantworten gegen Flu und TT bei einem MS-Patienten (Spender #17), der genau am 16-Wochentermin der Nachbeobachtungszeit einen fieberhaften Infekt der oberen Atemwege erlitten hatte. Inf: Infektion, wpV: Wochen nach Impfung, wpl: Wochen nach Infektion. Fehlerbalken kennzeichnen +SD.



3.1.5 Virus-Serologie nach Impfung und Atemwegsinfektion

Das Verhältnis zwischen hohen (Titeranstieg mindestens auf das Zweifache des Ausgangswertes) und niedrigen Antikörperantworten gegen Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) war zwischen MS-Patienten (8/12 niedrig, 3/12 hoch) und Kontrollpersonen (15/28 niedrig, 8/28 hoch) gleich (Tab. 8). Ein anhand des Titeranstiegs beurteiltes Impfversagen betraf 8 % der MS-Patienten und 18 % der Kontrollpersonen.

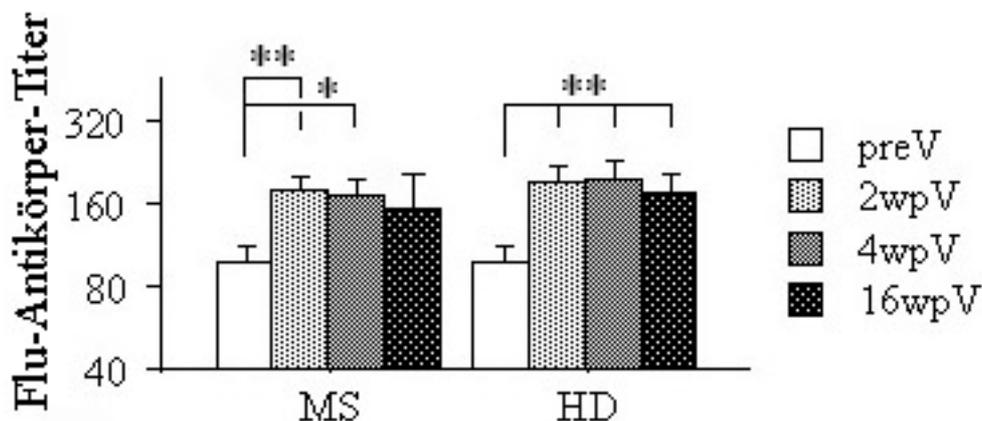
Tabelle 8: Impfantwortraten gemessen am Flu-Antikörpertiter-Anstieg bei MS-Patienten (MS, n = 12) und gesunden Kontrollpersonen (HD, n = 28) nach Grippe-schutzimpfung.

Kollektiv	gute Impfantwort (Titeranstieg ≥ 2 x)		mäßige Impfantwort (Titeranstieg < 2 x)		Keine Impfantwort (Titer unverändert)	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
MS = 12	3	25 %	8	67 %	1	8 %
HD = 28	8	28 %	15	54 %	5	18 %

Die mittleren Antikörpertiter zeigten in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg ab zwei Wochen nach Impfung (Abb. 10).

In keiner Serumprobe von Probanden, die während der Nachbeobachtungszeit an einer zufälligen Infektion der Atemwege erkrankt sind, fanden sich erhöhte Antikörpertiter gegen die untersuchten respiratorischen Viren.

Abbildung 10: Mittlere anti-Flu-Antikörpertiter vor (preV), 2, 4 und 16 Wochen nach Impfung (wpV) mit der Spaltvakzine Influvac[®] bei MS-Patienten (MS, n = 12) und gesunden Kontrollpersonen (HD, n = 28). Die Fehlerbalken kennzeichnen SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Student t -Test).



3.2 Virologisch-immunologische Untersuchungen

Die oben gezeigten Ergebnisse einer Immunaktivierung nach vorausgegangener Virusinfektion (s. Kap. 3.1.4) sollten im Folgenden anhand myelin-spezifischer T-Zellen überprüft werden. Hierzu war es zunächst nötig, spezifische T-Zelllinien zu generieren

und zu charakterisieren, bevor *in vitro*-Infektionen mit dem humanen Herpesvirus-6 (HHV-6) und Influenzavirus (Flu) durchgeführt werden konnten.

3.2.1 Humanes basisches Myelinprotein (hMBP)

Das in den folgenden Experimenten verwendete humane Myelinprotein (hMBP) wurde aus der weißen Substanz eines menschlichen Gehirns (7 h post mortem) aufgereinigt. Das SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte zwei Banden, entsprechend der beiden Hauptsplicevarianten 18,5 kDa und 21,5 kDa (Abb. 11). Die Spezifität des MBP gegenüber anderen Hirnbestandteilen wurde mittels Western-Blot nachgewiesen (Abb. 12). Keiner der gegen andere Hirnbestandteile gerichteten Antikörper erkannte das geblottete Protein. Somit enthält die Präparation keine Verunreinigungen durch Oligodendrozytenglykoprotein (MOG), Astrozyten (S100), Mikroglia (GFAP). Als weitere Negativkontrolle wurde ein gegen das periphere Myelin P₀ gerichteter Antikörper verwendet, der ebenfalls nicht anfärbte.

Darüberhinaus kam in der HPLC ein schmaler, hoher Gipfel an der für hMBP typischen Stelle des Acetonitril-Gradienten zur Darstellung (s. a. Giegerich 1990¹³⁵). Es konnte eine über 99%ige Reinheit des MBP mit nur einem geringen Bestandteil einer anderen Bindungsfähigkeit als MBP nachgewiesen werden (Abb. 13).

Eine Ansequenzierung des gereinigten Proteins durch Dr. Viviane Hoppe am Institut für Physiologische Chemie II scheiterte aufgrund einer Blockierung am amino-terminalen Ende. Auf eine erneute Sequenzierung einzelner Peptide (interne Sequenzen) nach vorheriger Spaltung (z. B. mit Cyanbromid (CNBr) nach Methionin, tryptisch nach Lysin und Arginin oder mit der sogenannten V8-Spaltung nach Glutaminsäure) wurde im Hinblick auf die oben erwähnten, eindeutigen Ergebnisse verzichtet.

Abbildung 11: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. 10 μg des gereinigten humanen basischen Myelinproteins auf ein 12,5 %iges Gel geladen (Spuren 1-3). M bezeichnet die Spur mit dem Leichtmolekularmarker.

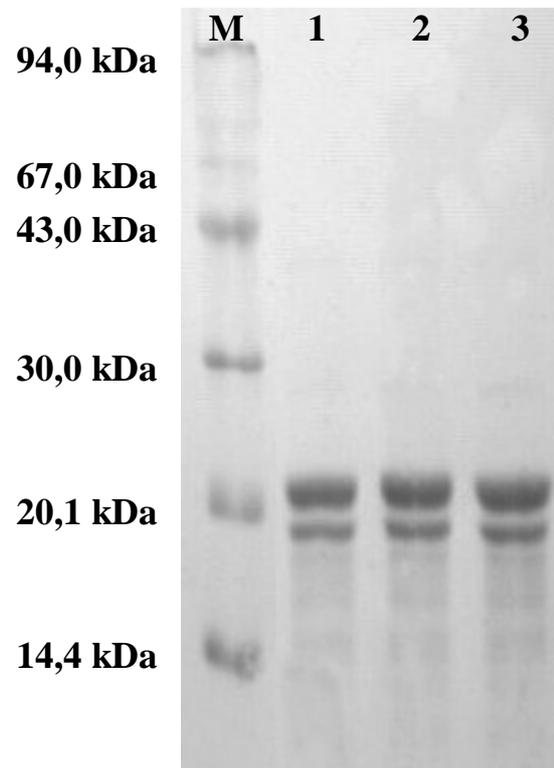


Abbildung 12: Western-Blot zum Ausschluß von Verunreinigung durch andere Hirnbestandteile als MBP. Die auf dem Gel in Abb. 11 erhaltenen Banden wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und einzelne Streifen mit folgenden Antikörpern gefärbt: α MBP 1:300 (A), 1:1000 (B und 1), α MOG 1:1000 (2), α S100 1:1000 (3), α GFAP 1:100 (4), α P₀ 1:1000 (5), nur mit PBS-T (6). Banden der ersten (MBP₁) und zweiten (MBP₂) Präparation werden lediglich durch MBP-spezifische Antikörper angefärbt (schwarze Pfeile), nicht durch Antikörper, die gegen andere Hirnbestandteile (MOG, S100, GFAP) bzw. peripheres Myelin (P₀) gerichtet sind.

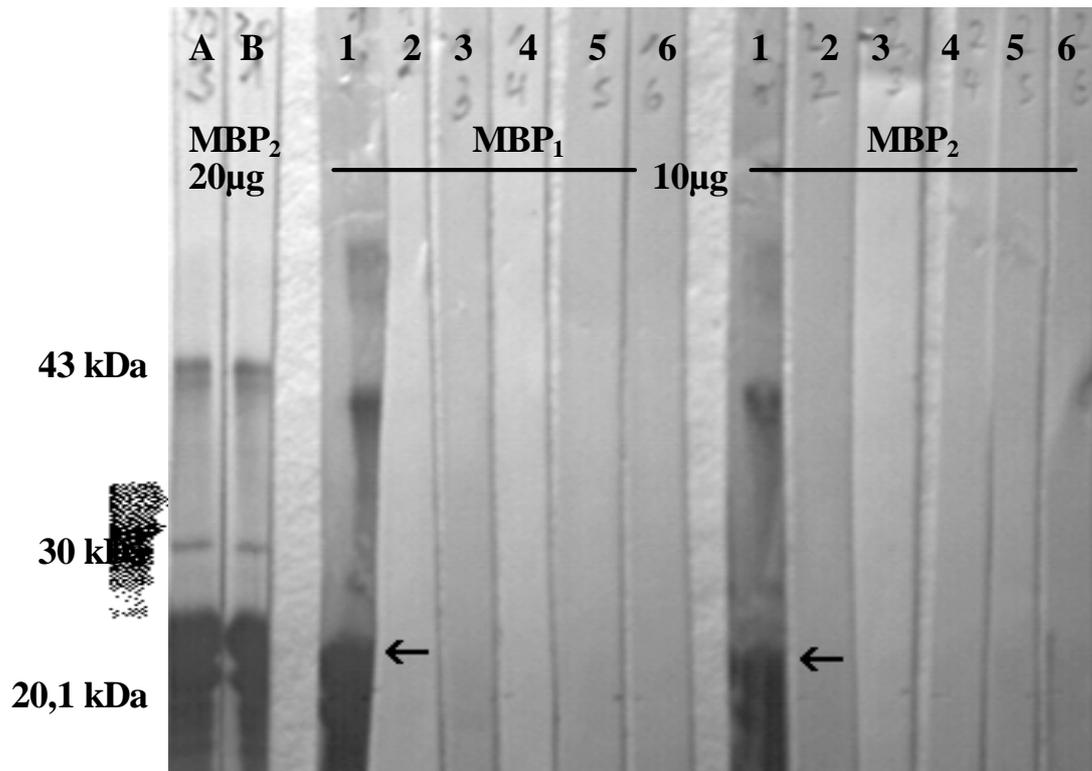
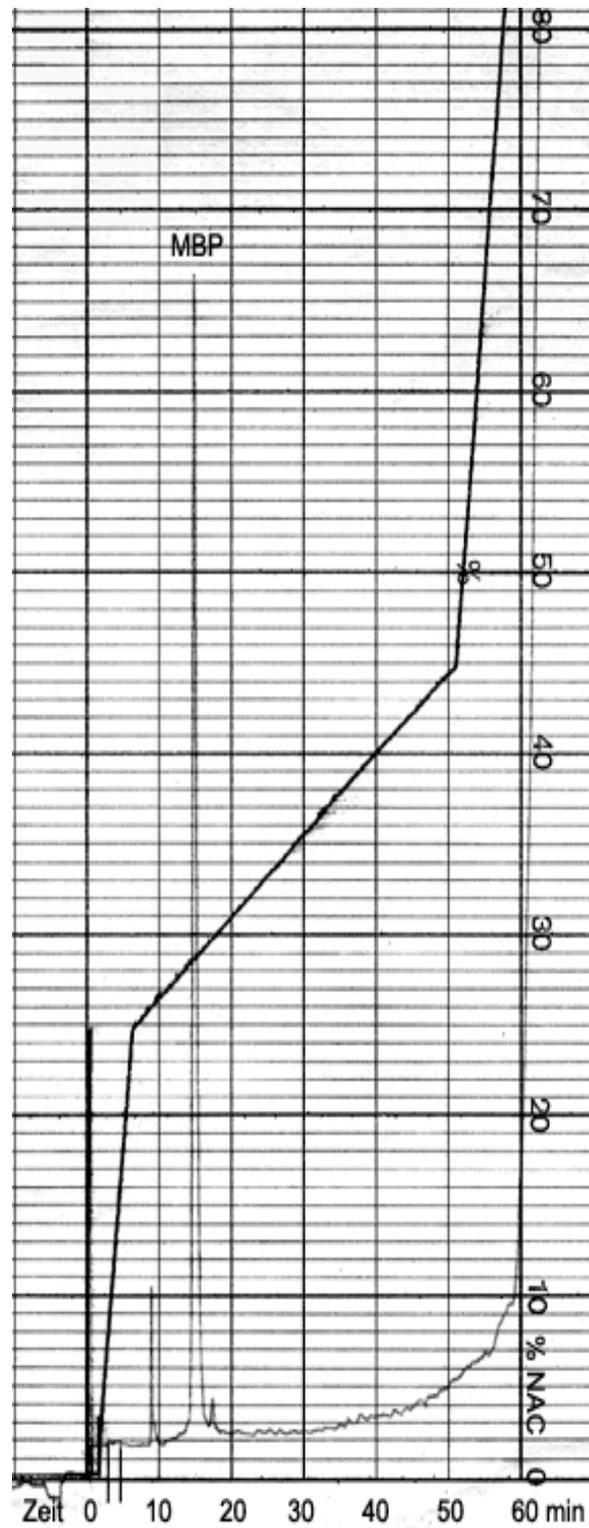


Abbildung 13: Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) des gereinigten humanen basischen Myelinproteins. Zur Darstellung kommt eine schmale, hochgipflige Hauptfraktion (MBP) bei 28,5 % NAC, entsprechend etwa 99% des eingesetzten Materials.



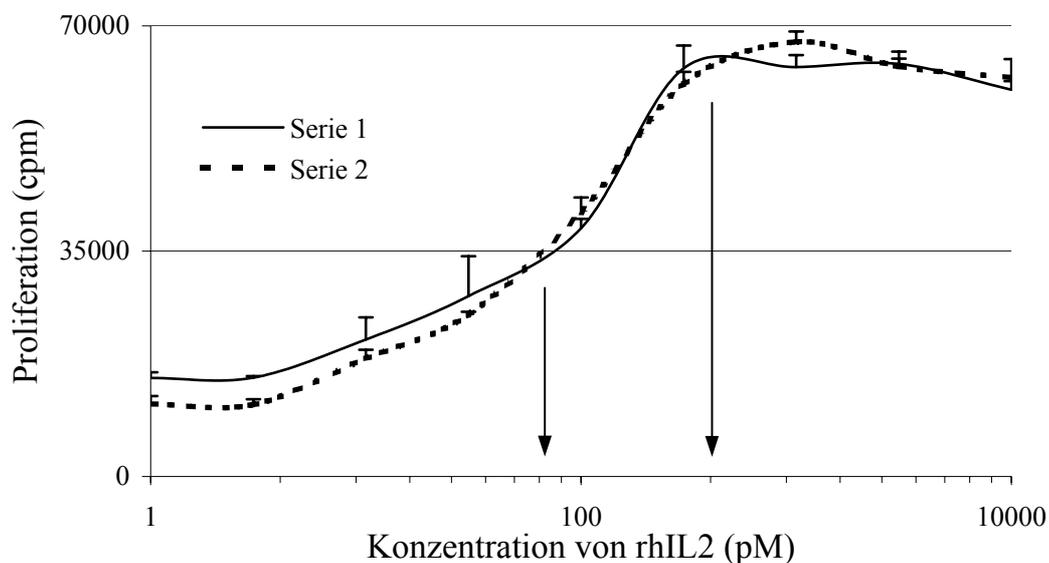
3.2.2 MBP-spezifische T-Zelllinien

Nach der Split-well-Methode wurden von 3 gesunden Spendern insgesamt 8 MBP-spezifische T-Zelllinien und von zahlreichen anderen Spendern auch TT-spezifische T-Zelllinien erfolgreich etabliert. Diese ließen sich über einen Zeitraum von einigen Monaten und bis zu 9 Restimulationen in etwa 2-4 wöchigen Abständen kontaminationsfrei in Kultur halten und nach schonendem Einfrieren jeweils vor einer bevorstehenden Restimulation und raschem Auftauen mit sofortiger oder nach Übernachtskultur erfolgter Antigenstimulation wieder in Kultur halten, ohne ihre im folgenden beschriebenen Eigenschaften zu verlieren. Zwischen den Restimulationen wurden in dreitägigen Abständen frisches Medium und rekombinantes humanes IL2 zugegeben, welches in mindestens 4 unabhängigen Vorversuchen auf seine optimale Konzentration getestet wurde.

3.2.2.1 Vorexperimente und Kulturoptimierung

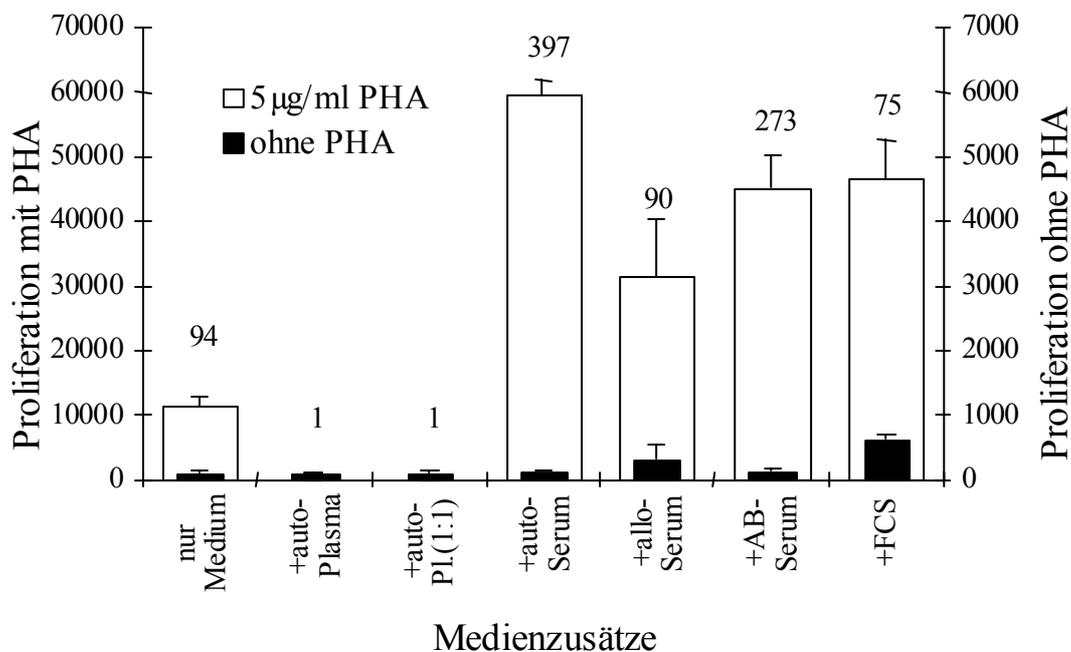
Als minimale optimale Endkonzentration für IL2 wurde $300\text{pM} = 4,65 \times 10^{-9} \text{ g/ml}$ (Molekulargewicht $15500 \text{ g/l} = 1\text{M}$) = ca. 4 Units ($1\text{U} = 80\text{pM}$) ermittelt (Abb. 14).

Abbildung 14: Über Verdünnungsreihen von rekombinantem humanem IL2 (rhIL2) in zwei voneinander unabhängigen Testserien wurde anhand der Proliferation von PBMC, welche drei Tage zuvor mit PHA vorstimuliert wurden, die spezifische Aktivität (1 Unit (U) = 80 pM bei 50% der maximalen Proliferation (ca. 35000 cpm)) und minimale Konzentration (300 pM = ca. 4 U) für eine optimale Proliferation ermittelt. Fehlerbalken: + 2 x SD (Dreifachbestimmungen).



In vergleichbaren Versuchsansätzen mit MBP-spezifischen T-Zelllinien zeigte sich, daß eine Zugabe von IL2 am Tag 5 nach Restimulation keine zusätzliche Proliferationssteigerung brachte, wohl aber am Tag 7 nach obiger Konzentrationsabhängigkeit, bzw. wesentlich früher bei unstimulierten Zellen. Erwähnenswert ist, wie sich nach initialen Experimenten und, bestätigt im weiteren Verlauf, an etablierten Linien zeigte, daß nur autologes Serum als Medienzusatz optimale Generierungs- und Kultivierungsbedingungen gewährte. Sowohl xenogene (FCS) als auch allogene (allogenes oder AB-Serum) Fremdproteine führten zu einer unspezifischen Stimulation menschlicher T-Zellen. Bei der 9. Restimulation der MBP-spezifischen T-Zelllinie PeR2.7 ergab sich mit autologem Serum ein Stimulationsindex von 257, während dieser mit AB-Serum nur 96 betrug. In einem anderen Ansatz verhinderten Plasma (Zitratzusatz) oder PBS die mitogeninduzierte Proliferation; ohne jeglichen Serumzusatz war diese vermindert (Abb. 15).

Abbildung 15: Austestung der Stimulationsbedingungen unterschiedlicher Serumzusätze (jeweils 5%, außer PI (1:1)), exemplarisch an PBMC eines Spenders. Die Zahlen über den Balken geben den Stimulationsindex als Grad der Spezifität der jeweiligen Stimulation an. Die größte Spezifität (SI=397) wurde durch die Verwendung von autologem Serum erzielt. Fehlerbalken + 2 x SD (Dreifachbestimmungen)



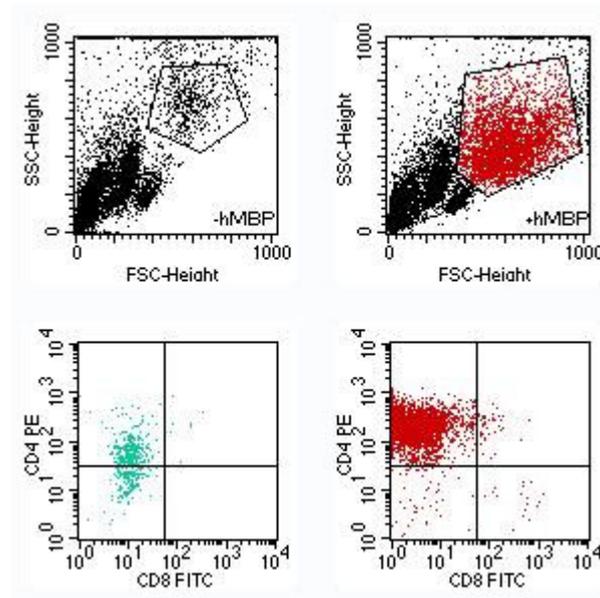
Etwa ab der 6. Restimulation wurden neben dem Hauptepitop keine anderen Peptide mehr erkannt, dafür wurden zum Teil die Stimulationsindices geringer.

In Abb. 16 wird der unspezifische Stimulationseffekt durch Fremdserum deutlich. Nur bei T-Zelllinien mit der Bezeichnung AIB mußte für diesen Versuch auf FCS umgestellt werden, was sich durch einen überaus hohen Hintergrund der Negativkontrolle und der nicht erkannten Peptide bemerkbar machte. Dennoch konnte unabhängig von der dadurch geringeren Spezifität des Assays bei zwei von drei T-Zelllinien das stimulierende MBP-Epitop festgestellt werden. In folgenden Versuchen wurde für rekultivierte AIB-Linien entweder wieder Eigenserum oder im Vergleich zu FCS weniger störendes AB-Serum verwendet.

3.2.2.3 Phänotypisierung durch FACS

Drei Tage nach Antigenstimulation grenzte sich durchflußzytometrisch am klarsten eine Blastenpopulation spezifischer CD4⁺-T-Helferzellen ab (Abb. 17), die im Vergleich zu unstimulierten Zelllinien eine 3-25fache Aufregulierung ihres IL-2-Rezeptors (α -Kette, CD25) zeigten und eine leichte Herunterregulierung von VLA-4 (CD49d).

Abbildung 17: Phänotypisierung der Th1-T-Zelllinie PeR1.2 mittels Einzelzell-Fluorozytometrie (FACS). Nach der 7. Restimulation zeigten sich ohne Zugabe des spezifischen Antigens (MBP) wenig aktivierte Blasten (Polygon, links) und sowohl CD4^{neg} als auch CD4^{pos} T-Zellen (unten links), mit MBP (rechts) war eine deutliche Blastenpopulation erkennbar, sowie 97% CD4^{pos} Zellen (rechts unten).



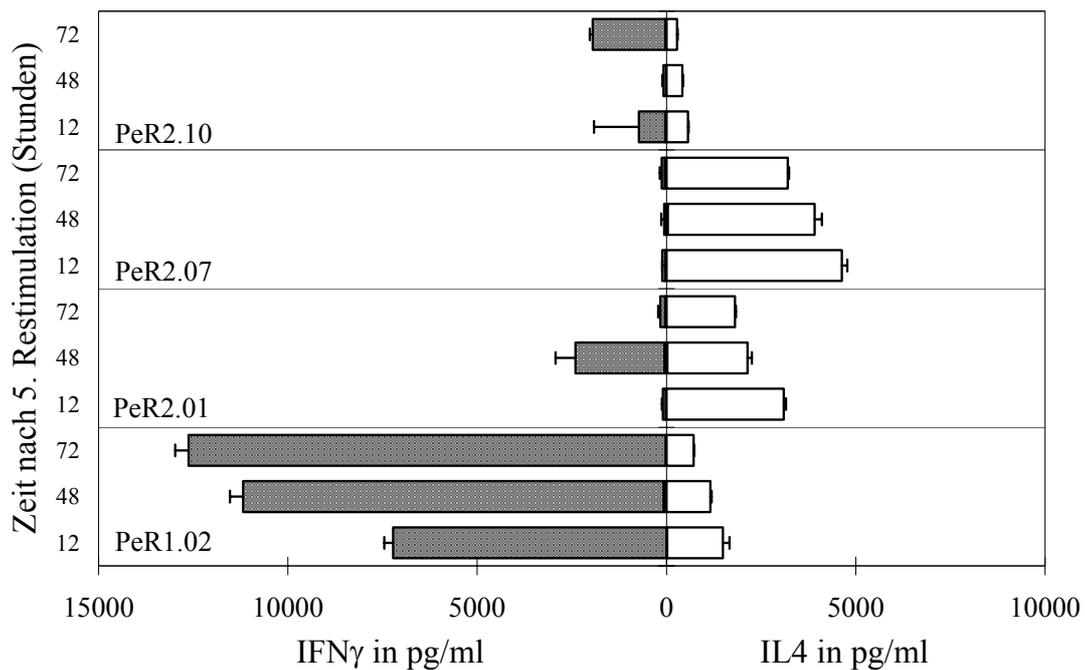
3.2.2.4 Charakterisierung der Zytokinsekretion und ELISA

Zu Beginn dieser Arbeit konnten sensitive und spezifische ELISA-Assays zu Th1- (IFN γ , TNF α , IL-2) und Th2-Zytokinen (IL-4, IL-10) etabliert werden. Die Standardreihen und Interassay-Kontrollen wurden stabil und zuverlässig detektiert, die Konfidenzintervalle lagen für die gezeigten Daten (Duplikatsbestimmungen) deutlich unter 10%. Von insgesamt 8 MBP-spezifischen T-Zelllinien sezernierten vier (AlB5, AlB8, BoK4.1, PeR1.2) dominant Th1-Zytokine (IFN γ , TNF α) und zwei (PeR2.7, PeR2.10) deutliche Mengen von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-10). Zwei weitere Linien (AlB4, PeR2.1) wurden aufgrund ihres gleichmäßig verteilten Zytokinprofils (IFN γ , TNF α , IL-4 und IL10) als Th0-Linien bezeichnet (Tab. 9). Abbildung 18 zeigt diese Muster in direkter Gegenüberstellung der Zytokine IFN γ und IL-4 für die vier MBP-spezifischen T-Zelllinien des Spenders PeR nochmals graphisch und verdeutlicht, daß dieses Th1/Th2-Verhältnis zu verschiedenen Zeitpunkten (Überstände wurden 12, 48 und 72 Stunden nach Restimulation eingesammelt) unterschiedlich ausfällt (vgl. * in Tab. 9).

Tabelle 9: Einteilung der 8 MBP-spezifischen T-Zelllinien anhand der im Zellkulturüberstand (48 Stunden nach 4./5. Restimulation) durch ELISA bestimmten Zytokine. Das Verhältnis zwischen dem Th1-Zytokin IFN γ und dem Th2-Zytokin IL4 führte zur Einteilung in Th1- (>1), Th2- (<1) oder Th0-Zelllinien (ca. 1). Restim.: Restimulation.

Linie	Spender	Restim.	IFNγ \pm SD	IL4 \pm SD	IFNγ:IL4	Phänotyp
1	PeR1.02	5	11100 \pm 349	962 \pm 3,3	11,5	Th1
2	PeR2.01	5	2347 \pm 528	2047 \pm 194	1,2	Th0*
3	PeR2.07	5	63 \pm 76	3475 \pm 24	0,02	Th2
4	PeR2.10	5	75 \pm 27	383 \pm 13	0,2	Th2*
5	BoK4.1	4	10100 \pm 1400	554 \pm 14	18,2	Th1
6	AlB4	4	8170 \pm 145	6207 \pm 341	1,3	Th0
7	AlB5	4	11000 \pm 162	220 \pm 39	50	Th1
8	AlB8	4	11548 \pm 2049	2124 \pm 112	5,4	Th1

Abbildung 18: Charakterisierung der T-Zelllinien anhand Zytokinsekretion. Gegenübergestellt sind die im Überstand zu den angegebenen Zeitpunkten gemessenen IFN γ - und IL4-Konzentrationen bei vier T-Zelllinien. Ein Überwiegen der IFN γ -Sekretion weist die Linie PeR1.02 als Th1-Zelllinie aus, während die anderen Linien aufgrund des eher immunmodulatorischen Profils (IL4) als Th2- bzw. anhand des ausgewogenen Verhältnisses zwischen Th1- und Th2- Zytokinen als noch nicht eindeutig differenziert (Th0) einzustufen sind (vgl. Tab. 9). Negativkontrollen <2%, Fehlerbalken: + SD



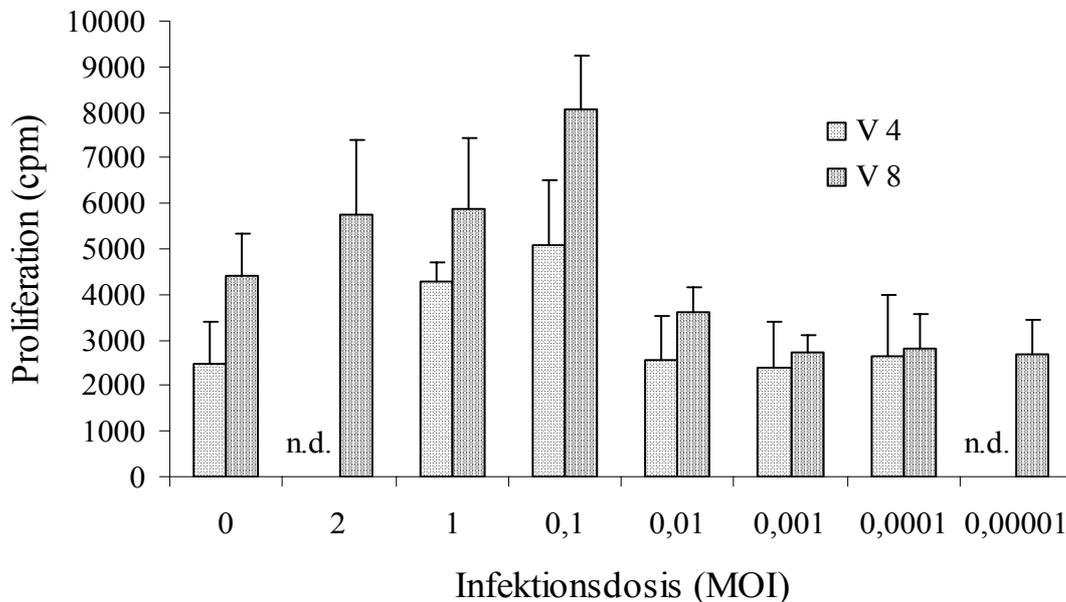
3.2.3 *In vitro*-Infektion humaner T-Zellen

3.2.3.1 Proliferation von PBMC nach Virusinfektion

3.2.3.1.1 *In vitro*-Infektion von PBMC mit Influenza A/PR/8/34 (H1N1)

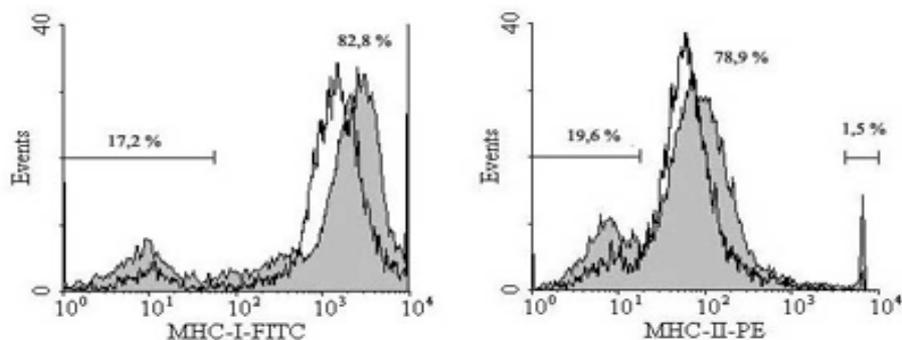
Die Proliferation von unstimulierten PBMC wurde durch Infektion mit MOI zwischen 2 und 0,1 gesteigert. Dabei waren unabhängig vom Influenza-Antikörpertiter des einzelnen Spenders geringere Virusmengen bis zum Erreichen eines individuellen Titers bessere Stimulatoren (Abb. 19). Die mitogen-induzierte Proliferation war abhängig vom Spender in demselben Titerbereich geringfügig herabgesetzt.

Abbildung 19: Proliferationssteigerung unstimulierter PBMC nach *in vitro*-Infektion mit Influenza A/PR/8/34 in einem Dosisbereich zwischen 0,1 bis 2 MOI. Beispielhaft an zwei Infektionsversuchen V4 und V8. Fehlerbalken: 2 x SD.



FACS-Analysen von MHC-Klasse I und II Molekülen an Tag 1, 2 und 3 nach Influenzainfektion von PBMC ergaben im Zeitverlauf eine leichte Aufregulierung der Klasse II-Moleküle, was sich aber im Schwankungsbereich der nichtinfizierten Kontroll-PBMC bewegte (Abb. 20).

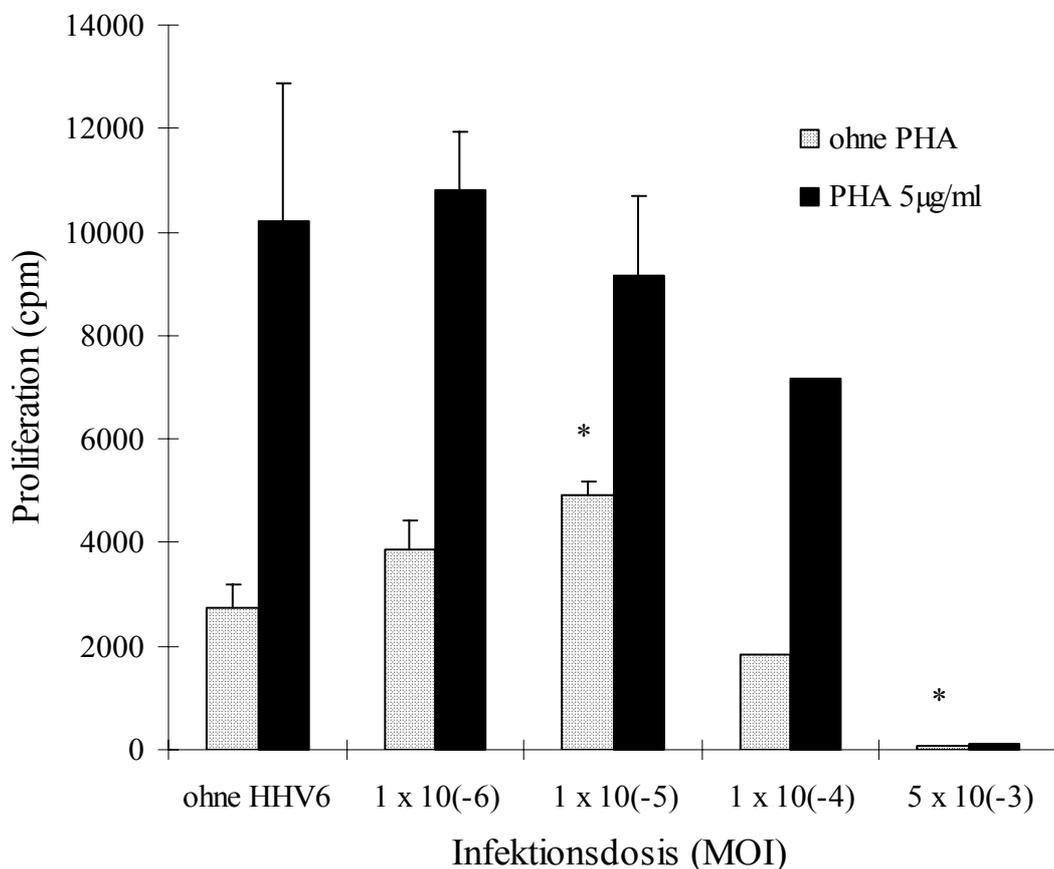
Abbildung 20: FACS-Analyse (Histogramme) mit leicht hochregulierter MHC-I- (links) und MHC-II- (rechts) Expression 24 Stunden nach *in vitro*-Infektion von PBMC mit Influenza A/PR/8/34 (grau) im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Umriß).



3.2.3.1.2 *In vitro*-Infektion von PBMC mit HHV-6B

Nach Infektion mit zellfreiem HHV-6B kam es bei allen durchgeführten Experimenten zu einer Proliferationshemmung im Bereich von 1 – 0,001 MOI und bei niedrigen Titern (0,0001 – 0,00001 MOI) zu einer virusinduzierten Stimulation der PBMC von seropositiven Spendern. Die mitogen-induzierte Proliferation war nach HHV-6B-Infektion in einem vergleichbaren Titerbereich nicht signifikant inhibiert (s. Abb. 21).

Abbildung 21: Proliferation von PBMC eines seropositiven Spenders durch *in vitro*-HHV-6B-Infektion in niedriger Dosis (MOI 1×10^{-5}). Bei hohen Dosen kommt es zur Hemmung der Zellproliferation. Fehlerbalken: 2 x SD, * $p < 0.05$ (Student *t*-Test)

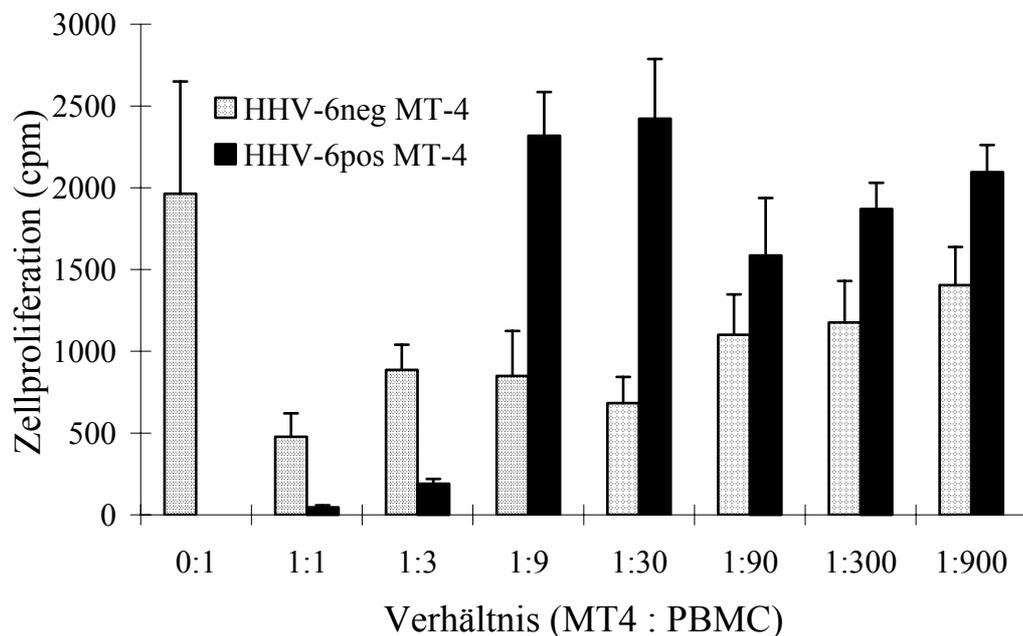


3.2.3.2 Koinkubationsmodell mit HHV-6B-infizierten MT-4 Zellen

Durch die Kokultur mit bestrahlten MT-4-Zellen (infiziert oder nicht infiziert) wurde generell die spontane Zellproliferation von PBMC gehemmt. Dieser Effekt war bei entsprechend höherem Anteil PBMC (1:90 - 1:900) geringer. Allenfalls kam es bei einem

Verhältnis HHV-6B-positiver MT-4-Zellen : PBMC von 1:9 – 1:30 zu einer nicht-signifikant erhöhten Proliferation gegenüber der PBMC-Reinkultur (Abb. 22).

Abbildung 22: Hemmung der spontanen Proliferation von PBMC eines seropositiven Spenders durch Kokultur mit HHV-6B-infizierten (schwarze Balken) und nicht infizierten MT-4-Zellen (graue Balken). Bei der HHV-6B^{pos} MT-4-Zell-Kokultur läßt dieser immunsuppressive Effekt bei geringerem MT-4-Verhältnis (< 1:9) deutlicher nach, als bei den nicht infizierten MT-4-Zellen. Zwischen 1:9 und 1:30 HHV-6B^{pos} MT-4-Zellen : PBMC kam es zu einer leichten Zunahme der Zellproliferation. Fehlerbalken: 2 x SD

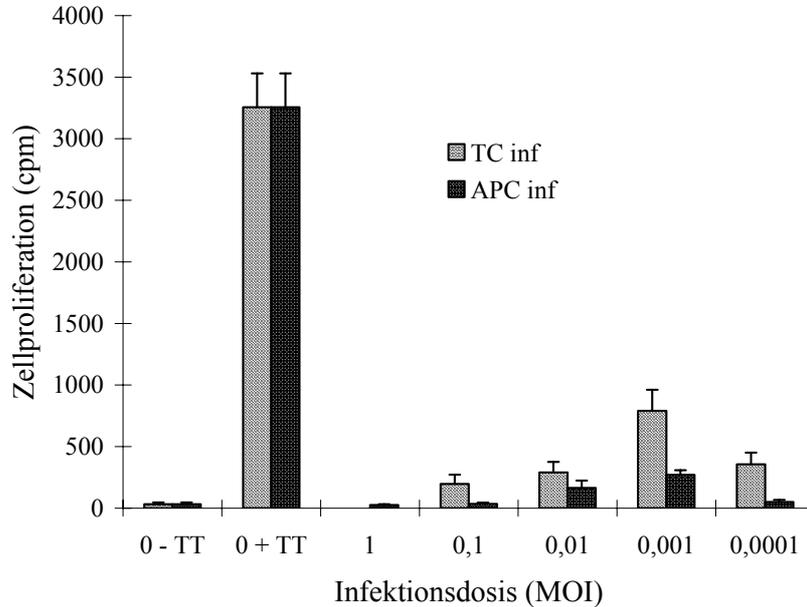


3.2.3.3 Proliferation antigenspezifischer T-Zelllinien nach Virusinfektion

3.2.3.3.1 *In vitro*-Infektion antigenspezifischer Zellen mit Flu A/PR/8/34 (H1N1)

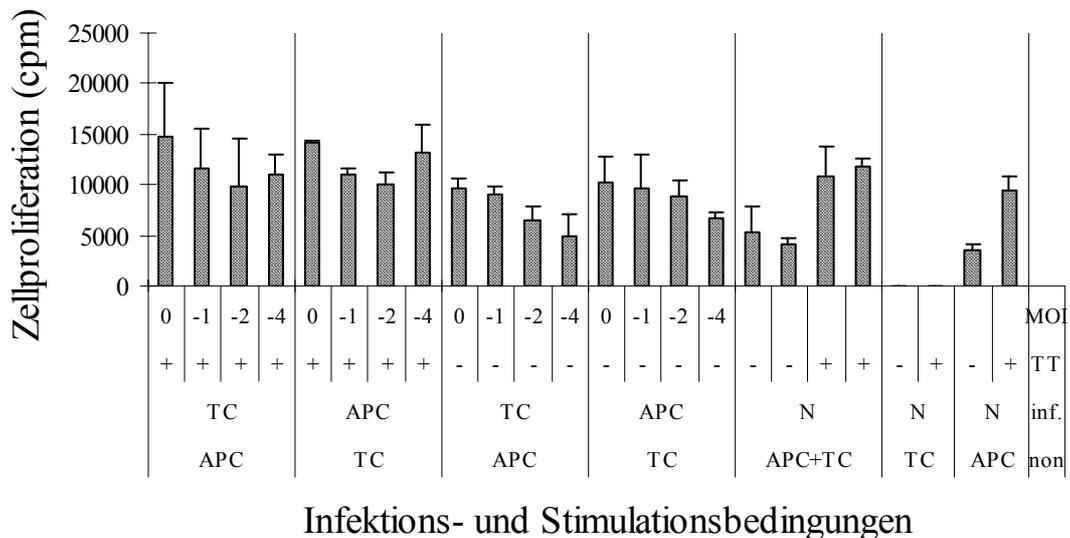
Nach Influenzainfektion kam es bei allen 5 untersuchten TT-spezifischen T-Zelllinien zu einer deutlichen Suppression der antigenspezifischen Proliferation in einem Titerbereich von MOI 1 – 0,0001. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt, wenn isoliert die antigenpräsentierenden Zellen (bestrahlte autologe PBMC) infiziert wurden, im Vergleich zu isoliert infizierten TT-spezifischen T-Zellen mit nicht-infizierten APC (Abb. 23).

Abbildung 23: Hemmung der Proliferation am Beispiel der TT-spezifischen T-Zelllinie OmU4.5.3 nach differentieller Infektion von APC (deutlicherer Effekt) bzw. T-Zellen mit Influenza A/PR/8/34 während der 4. Restimulation. Fehlerbalken: 2 x SD.



14 Tage nach der 5. Restimulation der TT-spezifischen T-Zelllinie OmU4.5.3 ergab sich nach getrennter Infektion der T-Zellen bzw. APC folgendes Bild (Abb. 24)

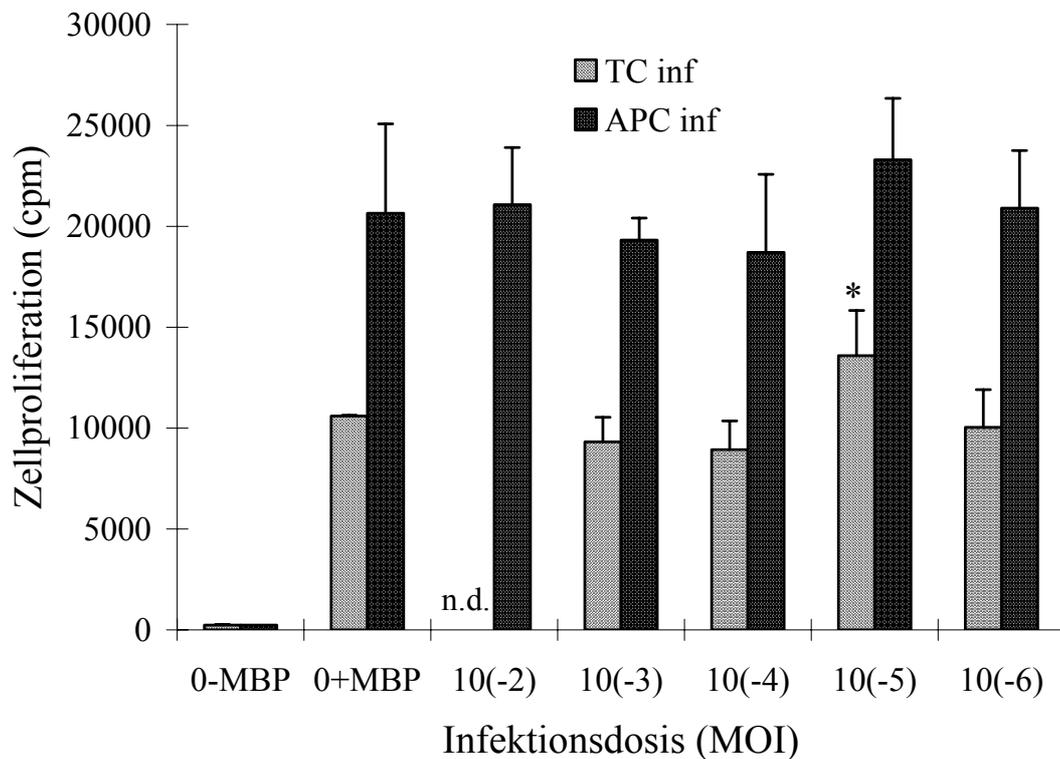
Abbildung 24: Gesteigerte Proliferation der TT-spez. T-Zelllinie OmU4.5.3 nach Infektion mit Influenza A/PR/8/34 während der 5. Restimulation, allerdings auch der PBMC (APC) ohne T-Zellen (vorletzte Spalten) als Hinweis für eine nicht ausreichende Bestrahlung. Fehlerbalken: 2 x SD (Doppelbestimmungen); lg MOI (10^{-4} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; $10^0 = 1$); +/- TT; TC inf. = T-Zellen infiziert; APC inf. = bestrahlte PBMC infiziert; keine Angabe / non / N = nicht infiziert.



3.2.3.3.2 *In vitro*-Infektion antigenspezifischer Zellen mit HHV-6B

Abgesehen von einer Steigerung der MBP-spezifischen Proliferation bei isolierter T-Zell-Infektion der Th1-T-Zelllinie PeR1.2 mit einer Infektionsdosis (MOI) von 1×10^{-5} TCID₅₀ ($p = 0,044$) in einem einzigen Experiment (Abb. 25), wurde die antigenspezifische Stimulation in zwei weiteren Versuchen mit der Th2-T-Zelllinie PeR2.1 kaum von der vorherigen Infektion mit HHV-6B beeinflusst.

Abbildung 25: Gesteigerte antigen-spezifische Proliferation der MBP-spezifischen Th1-T-Zelllinie PeR1.2 (5. Restimulation) durch differentielle Infektion der T-Zellen (SI = 45) mit HHV-6B, Infektion der APC (SI = 88) ohne Effekt. Fehlerbalken: 2 x SD (Dreifachbestimmungen), * $p < 0,05$ (Student *t*-Test).



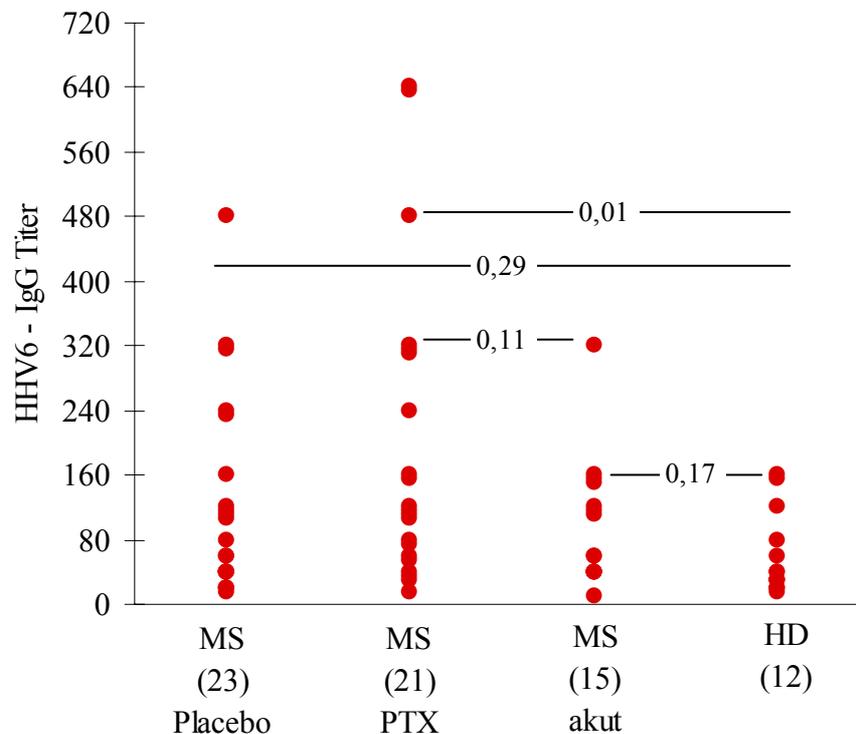
3.2.4 Untersuchungen zu HHV-6-Reaktivierung im Serum

Neben den Infektionsversuchen sollte zusätzlich in der nachfolgenden klinisch-virologischen Studie die aktuell diskutierte Assoziation zwischen HHV-6 und MS überprüft werden. Hierzu wurden serologische und molekulargenetische Befunde von unterschiedlichen MS-Patienten mit denen von gesunden Kontrollspendern verglichen.

3.2.4.1 HHV-6-Serologie

Von 74 Serumproben konnten 71 Anti-HHV-6-IgG-Titer bestimmt werden, da von einer Probe die Kodierung nicht zugeordnet werden konnte und bei zwei weiteren eine Bestimmung aufgrund antizellulärer Antikörper nicht erfolgte. Die 71 auswertbaren Proben wurden vier Gruppen zugeteilt: 23 MS-Patienten erhielten 1994 im Rahmen einer PTX-Therapiestudie der Neurologischen Universitätsklinik Göttingen¹³⁶ Placebo, 21 Patienten den Phosphodiesterasehemmer Pentoxifyllin (PTX). Unabhängig von dieser Studie waren 1992 Serumproben von 15 Patienten in einer akuten Krankheitsphase und 12 gesunden Kontrollpersonen gesammelt worden (Abb. 26). Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich unberücksichtigt einer unteren Grenztiterschwelle nur zwischen der Kontrollgruppe (n = 12) und der PTX behandelten Gruppe signifikante Unterschiede ($p = 0,01$). Aus keiner der untersuchten Serumproben konnte Anti-HHV-6-IgM nachgewiesen werden.

Abbildung 26: IgG-Titer gegen HHV-6 in Seren von 4 verschiedenen Populationen: Die Gruppen MS Placebo, MS PTX sind 44 Patienten, die an einer Medikamenten-Studie mit/ohne PTX teilgenommen haben, MS akut während einer akuten Krankheitsphase und HD sind gesunde Kontrollspender. Zahlen: p -Werte (Mann-Whitney-U-Test)



3.2.4.2 HHV-6-DNA-Nachweis mit semi-nested PCR

Sowohl mit dem Standard-Primer-Paar der Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg als auch unter Verwendung des Primer-Paars der aktuellen Arbeiten über HHV-6^{137, 138} konnte in einer bis 0,1 fg Kontrollplasmid sensitiven semi-nested PCR in keiner der untersuchten Proben Virus-DNA nachgewiesen werden (Abb. 27).

Abbildung 27: Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte einer semi-nested PCR für HHV-6 aus Patientenserum (in zwei Reihen) und HHV-6-Kontrollplasmid mit/ohne vorherige DNA-Extraktion (Ende der zweiten Reihe). M₁: DNA-Marker der Reihe 1; M₂: DNA-Marker der Reihe 2.



4 Diskussion

Vor dem Hintergrund der komplexen Autoimmunhypothese der Multiplen Sklerose und Hinweisen für eine mögliche Virusassoziation, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Teilaspekte untersucht. Zum einen sollten in der sogenannten ViMS-Studie klinisch-immunologische Unterschiede in der Reaktion antigenspezifischer T-Lymphozyten nach viralen Atemwegsinfektionen und der Influenzaschutzimpfung herausgearbeitet werden.

Zum anderen sollten in einer klinisch-virologischen Studie die aktuell diskutierte Assoziation der MS mit dem lympho- und neurotrophen humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) überprüft, sowie mögliche Interaktionen des aktiven Influenza- und HHV-6-Virus in einem etablierten Autoimmun-Zellkulturmodell untersucht werden.

4.1 Impfung und Infektion bei der MS (ViMS-Studie)

Aufgrund der Krankheitsverschlechterung im Rahmen von viralen Atemwegsinfektionen (vgl. Kap. 1.3.1.6.3) bestand bezüglich verschiedener Schutzimpfungen Unsicherheit bei MS-Patienten und behandelnden Ärzten, inwieweit diese eine ungünstige Wirkung auf den Krankheitsverlauf haben könnten. In einigen zum Teil aktuellen Arbeiten,^{79, 130, 132} konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, daß bei der Influenzaschutzimpfung kein erhöhtes Risiko für Multiple-Sklerose-Patienten in Bezug auf eine Krankheitsverschlechterung oder Auslösung von Schüben besteht. Über diese epidemiologischen Daten hinaus stellte sich die Frage, welche Unterschiede zwischen Impfung und Infektion bezüglich autoreaktiver Immunreaktionen bestehen. In der mit diesem Ziel konzipierten ViMS-Studie wurden insbesondere die Auswirkungen der Influenzaschutzimpfung, sowie natürlich auftretender Infektionen der oberen Luftwege auf autoreaktive T-Zell-Antworten bei gesunden Probanden und MS-Patienten untersucht. Hierzu waren sensitive Nachweismethoden zur seriellen Untersuchung der Zahl und funktionellen Reaktivität autoantigen-spezifischer T-Zellen nötig, wie sie im folgenden beschrieben werden.

4.1.1 Frequenz und Reaktivität spezifischer T-Zellen im Blut

Zur Untersuchung der im Blut zirkulierenden Vorläuferfrequenz autoreaktiver T-Zellen wurde früher auf umständliche Weise die Klonierungsfrequenz mit einem auf Selektion basierenden *in vitro*-Verdünnungs-Assay (LDA) ermittelt, um auf die tatsächlich *in vivo* vorliegende Zahl rückschließen zu können. Aufgrund der Kulturbedingungen waren die Ergebnisse oft artefiziell und ungenau.¹⁴ Durch die einfache Bestimmung der in Primärkultur (*ex vivo*) spezifisch stimulierbaren Gedächtniszellen ist heute eine genauere Abschätzung der tatsächlichen Verhältnisse auch seltener autoreaktiver T-Zellen möglich, was mit verschiedenen Methoden (ELISPOT, intrazelluläre Zytokin- / Tetramerfärbung im FACS) gezeigt werden konnte.^{139 140}

In dieser Arbeit wurde der sensitive IFN γ -ELISPOT als funktionelles Nachweisverfahren autoreaktiver T-Zellfrequenzen auf Einzelzellebene mit der hierzu gut korrelierten, quantitativen RT-PCR kombiniert, um selbst minimale Veränderungen bei seltenen antigen-spezifischen T-Zellen zu erkennen. Zusätzlich konnten gemäß Studiendesign durch häufige Untersuchungszeitpunkte auch kurzzeitige Veränderungen anti-myelinspezifischer T-Zellantworten im Blut einzelner Patienten oder Spender nach Impfung oder Infektion untersucht werden, wenngleich aktivierte T-Zellen möglicherweise nur kurz in diesem Kompartiment verweilen.^{86, 87}

Für das Autoantigen MBP wurde bei den meisten Spendern im Blut eine Frequenz von etwa 1×10^{-5} (MBP-spezifische T-Zellen pro PBMC) bestimmt. Dies lag somit im unteren Bereich der methodischen Nachweisgrenze, was sich auch mit Angaben aus der Literatur deckt.¹⁴¹ Olsson und Mitarbeiter fanden im Blut von MS-Patienten 2,7-5,2 MBP-spezifische T-Zellen / 10^5 PBMC, im Liquor sogar bis zu 185 / 10^5 mononukleäre Liquor-Zellen.¹⁴ Kleinere Unterschiede der Nachweisgrenzen und ermittelten Größenangaben antigen-spezifischer T-Zellen zwischen den Arbeitsgruppen werden methodisch u. a. durch Antikörperauswahl, Stimulationsbedingungen, einschließlich Qualität des eingesetzten Antigens, vor allem aber auch von den laborinternen Ausschlußkriterien unspezifischer spots durch Untersucher oder Lesegerät beeinflusst. Neben der hohen interindividuellen Variabilität, wie sie bei vielen funktionellen Assays der klinischen Immunologie ein statistisches Problem darstellt, fielen diese Unterschiede durch individuelle Verlaufsuntersuchungen mit einem streng konstant gehaltenen und kontrollierten

Assay-System nicht ins Gewicht. Entgegen der Kritik der ELISPOT-Methodik bei niedrigen T-Zell-Vorläuferfrequenzen¹⁴¹ konnten wir mit einer MBP-spezifischen T-Zelllinie zeigen, daß in einem Bereich von 10-1000 pro Napf eingesetzte Zellen durch den ELISPOT-Assay linear abgebildet werden. Zusätzlich konnten wir bei einzelnen Spendern nach durchgemachter Infektion mit dieser Methode durchaus einen deutlichen Anstieg MBP-spezifischer T-Zellen nachweisen (vgl. Kap. 3.5.4). Auch andere generierten mit Hilfe des ELISPOT-Assays verlässliche Daten von seltenen, (auto)reaktiven T-Zellen, welche bei Goulder et al. ebenfalls eine hohe Korrelation zu der Tetramer-Technologie aufwiesen.^{14, 140, 142, 143}

Wie schon andere Arbeitsgruppen konnten auch wir keinen zahlenmäßigen Unterschied MBP-spezifischer T-Lymphozyten zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollspendern finden.^{7-11, 144, 145} Auch Zellzahl oder Reaktivität anderer Spezifitäten unterschied sich während Impfung oder Atemwegsinfektion in beiden Gruppen nicht. Ungeachtet seiner pathogenetischen Relevanz spiegelt jedoch der in der Literatur beschriebene hohe Liquoranteil möglicherweise die Tatsache wieder, daß sich ein Großteil der myelinspezifischen Zellen in diesem Kompartiment befindet, und somit der Nachweis im Blut häufig nur in einem sehr engen Zeitfenster gelingt, wenn man von einer Aktivierung autoantigenspezifischer Zellen im Blut ausgeht.^{86, 87}

T-Zellen, die gegen die verwendete Präparation des rekombinant in *E. coli* hergestellten humanen MOGs in Zellkultur reagierten, wurden im ELISPOT durchwegs in hoher Frequenz und interindividueller Variabilität von $7,4 \pm 10 / 10^5$ PBMC nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse ($2,6 \pm 1,4 / 10^5$) erzielten auch andere in gesunden Primaten.¹⁴⁶ Bei vielen rekombinant hergestellten Proteinen, wie auch bei der verwendeten MOG-Präparation, ist es ein bekanntes Phänomen, daß bakterielle oder andere immunogene Bestandteile die proteinspezifische Immunantwort überlagern können (persönliches Gespräch mit Dr. C. G. Haase, Neurologie Essen). Dabei handelt es sich vor allem um His-Tag-Residuen, welche im Aufreinigungsprozeß nicht abspaltbar waren, weniger um hochimmunogene Lipopolysaccharide (LPS), wie im ETOXATE-Test ausgeschlossen werden konnte. Abgesehen von möglicherweise falsch hohen Absolutzahlen waren hierfür die intraindividuellen, relativen Verläufe MOG-spezifischer Antworten in der ViMS-Studie nicht betroffen, da der Anteil immunogener Kontaminanten in der für alle

Experimente verwendeten identischen Präparation konstant blieb. Für die Generierung MOG-spezifischer Langzeitkulturen war dieses rekombinante Protein aus genannten Gründen allerdings nicht verwendbar, was auch dazu führte, daß aufgrund der geringen Verfügbarkeit des natürlichen Proteins in neueren Arbeiten stets ausschließlich synthetische MOG-Peptide Verwendung finden.¹⁴² Hingegen ist MBP in hoher Reinheit und Menge aus menschlichem Gehirn aufzureinigen (vgl. Kap. 3.2.1). Für die Fragestellung der impf- bzw. infektriggetriggerten Stimulierbarkeit autoreaktiver Zellen wurden beide Proteine als relevant angesehen und im ELISPOT-Assay eingesetzt. Trotz einer ebenso hohen Reinheit und Endkonzentration der verwendeten Peptide gelang es im ELISPOT-Assay nicht, peptidspezifische Antworten zu messen. Möglicherweise sind hierfür Unterschiede in der Prozessierung und Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen verantwortlich, da T-Zell-Peptide und bestimmte Proteine unabhängig von intrazellulärer Prozessierung an MHC-II-Moleküle gebunden werden.¹⁴⁷

4.1.2 ELISPOT, ELISA und quantitative RT-PCR

Im Rahmen der ViMS-Studie zeigte sich insbesondere für Kurzzeitstimulationen mit gut definierten und immunogenen Antigenen wie das Influenzavirusprotein oder die Impfstoffpräparation eine sehr gute Korrelation zwischen der Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen – gemessen mit IFN γ -ELISPOT – und der Menge an exprimierter IFN γ -mRNA der korrespondierenden Ansätze – gemessen mit RT-PCR. Unterschiede bei anderen Antigenen sind möglicherweise auch darin begründet, daß im ELISPOT-Assay nicht die rein quantitative IFN γ -Sekretion des Gesamtansatzes, wie bei RT-PCR oder ELISA, sondern vor allem die Anzahl der IFN γ -sezernierenden Zellen bestimmt wird. Die Sekretionsmenge jeder einzelnen Zelle wurde zwar grob miterfaßt (große versus kleine spots), diese Größe ging jedoch nicht in die Auswertung mit ein. In der Literatur sind für IFN γ und IL4 mit murinen Splenozyten vergleichbare Korrelationen gezeigt worden¹⁴⁸, wobei die Korrelation zwischen RT-PCR für IFN γ -mRNA und dem IFN γ -ELISPOT wohl aufgrund höherer Sensitivität im Vergleich zum ELISA besser war. Auch wurde bereits zwischen ELISPOT und der direkten Tetramer-Technologie eine hohe Korrelation ($r^2=0,9$) gezeigt.¹⁴⁰ Der Methodenvergleich zwischen Zytokinproteinkonzentration im ELISA und entsprechenden Zytokin-mRNA-Mengen in der quantitativen RT-

PCR wurde entsprechend an MBP-spezifischen Zellkulturüberständen bzw. Zellen durchgeführt, da aufgrund der geringeren Sensitivität des ELISA Primärkulturen nicht geeignet gewesen wären. Bei der Untersuchung zahlreicher Zytokine zeigte sich v. a. für TNF α (vgl. Abb. 6) eine gute Korrelation beider Methoden, was gerade aufgrund der posttranslationalen Regulation von TNF α eine hohe Methodenreliabilität erkennen läßt. Da dies allerdings nur einen Teilaspekt der vorliegenden Arbeit darstellt, sei auf die Arbeit von Dr. Nils Kruse in unserem Labor verwiesen.¹³³

4.1.3 Zelluläre und humorale Impfantworten

Die erhobenen Daten belegen, daß nach Impfung mit der Influenzaspaltvakzine weder bei MS-Patienten noch bei gesunden Kontrollspendern erhöhte T-Zellantworten gegen die Autoantigene MBP oder MOG auftreten, obwohl nach Impfung durchwegs gute zelluläre und humorale Reaktionen gegen das Influenzavirus beobachtet wurden.

Aufgrund der klinisch schwer zu überprüfenden Impfeffizienz wird diese häufig anhand der serologischen und zellulären Antworten rückgeschlossen.^{149, 150} Der Antikörper-Titeranstieg gegen Influenza in unserer Studie gleicht den Ergebnissen der oben erwähnten Multicenter-Studie von Miller¹³⁰, die zellulären Influenza-spezifischen Antworten darüberhinaus den Angaben von Mokhtarian¹³¹, was für einen guten Impferfolg spricht.

Da nur Patienten ohne immunmodulierende / -suppressive Therapie geimpft wurden, können bezüglich Wirksamkeit bei Patienten unter immunmodulatorischer Therapie keine direkten Rückschlüsse gezogen werden. Unter Berücksichtigung anderer Studien mit guten Antikörperantworten nach Influenzaimpfung bei AIDS-Patienten oder Patienten unter dauerhafter immunsuppressiver Therapie (Asthma, Nieren-/ Leber-/ Herztransplantation, usw.) wäre eine Ausweitung dieser Indikation auch auf MS-Patienten mit immunsuppressiver Therapie vorstellbar.¹⁵¹

4.1.4 MBP-spezifische T-Zellen während Atemwegsinfektion

Dahingegen beobachteten wir eine milde Reaktion MBP-spezifischer T-Zellen nach respiratorischen Infekten. Der früheste Zeitraum war bei einem MS-Patienten 1 Tag nach Beginn der im Impftagebuch dokumentierten Erkältungskrankheit. Dieser Unterschied zwischen der im Vergleich zur gleichbleibend niedrigen MBP-Reaktivität wäh-

rend Vakzinierung und der erhöhten MBP-spezifischen T-Zellfrequenz im Zusammenhang mit Atemwegsinfektionen läßt sich z. B. mit einer stärkeren Immunantwort gegenüber dem invasiven Lebendvirus, sowie Unterschieden hinsichtlich Infektionsort, Umgebungsreaktion und „lymphatischer Rachenring“ erklären. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß virale Infektionen, unter anderem über Interferoninduktion zu einer generellen Immunaktivierung (vgl. Abb. 2) bzw. Aufregulierung co-stimulierender Moleküle führen.^{74, 81, 93}

4.1.5 Autoimmunität nach Impfung oder Infektion

In Kontrast zu infektassoziierten Autoimmunreaktionen bekräftigen die Daten dieser Studie die Impfsicherheit der Influenzavakzinierung bei MS-Patienten, wie sie klinisch schon von zahlreichen anderen Autoren dokumentiert wurde.^{79, 128-132} Außerdem konnten durch die hier vorliegende Untersuchung Befürchtungen über eine mögliche impfassozierte Auslösung von Autoimmunreaktionen, wie Kreuzreaktivität (Molecular Mimicry) oder unspezifische Begleitreaktion (Bystander Effect) wenigstens für MBP und MOG vermindert werden.

Da man andererseits die Risiken einer Schubausslösung oder Verschlechterung der MS im zeitlichen Zusammenhang mit einer Infektion der oberen Luftwege kennt, wurde im epidemiologischen Bulletin 41/98 des Robert-Koch-Instituts, Berlin, darauf hingewiesen, daß bei Nutzen-Risiko-Abwägung der zu erwartende Nutzen der Influenzaschutzimpfung bei MS-Patienten in den Vordergrund trete und somit gemäß Empfehlungen der ständigen Impfkommission am Robert-Koch-Institut (STIKO) bei dieser Gruppe der chronisch Kranken zu empfehlen ist.¹²⁷

4.2 Virologisch-Immunologische Untersuchungen

Vor dem Hintergrund der infektassoziierten Immunaktivierung schien es bedeutsam, den Einfluß von Virusinfektionen auf zellulärer Ebene zu betrachten. Es wurden das Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) aufgrund des Bezuges zum ersten Teil der Arbeit, sowie das humane Herpesvirus 6 (HHV-6B) aufgrund der aktuellen Diskussion eines postulierten Zusammenhangs mit der Multiplen Sklerose^{111-113, 117, 119, 138, 152} untersucht. Dabei wurde zunächst die spontane Proliferation peripherer Blutlymphozyten (PBMC), sowie die mitogeninduzierte Proliferationsrate nach *in vitro*-Infektion mit oben genann-

ten Viren ermittelt. Im Folgenden wurde sowohl die unspezifische, als auch die antigen-abhängige Proliferation spezifischer T-Zellen nach differentieller Virusinfektion der T-Zellen bzw. APC untersucht.

4.2.1 Humanes Zellkulturmodell für die Multiple Sklerose

Für die aus den Infektionsversuchen gewonnenen Ergebnisse waren die Etablierung und zuverlässigen Kulturbedingungen des verwendeten autoimmunen Zellkulturmodells essentiell. Wie in Kap. 3.2 gezeigt, waren die Voraussetzungen hinsichtlich Spezifität und Oligoklonalität erfüllt und eine Immun-Phänotypisierung nach Oberflächenmarkern und Zytokinprofil möglich.^{7, 9} Darüberhinaus stellte sich die Verwendung von autologem Medium im Vergleich mit gepooltem AB-Serum oder FCS als optimaler Medienzusatz heraus. Mit der klassischen Split-well-Methode und bestrahlten PBMC als antigenpräsentierende Zellen gelang es, acht MBP-spezifische und zahlreiche TT-spezifische Langzeitkulturen zu generieren.

4.2.2 *In vitro*-Infektionsversuche mit Influenzavirus A

In den Infektionsversuchen mit Influenza kam es bei niedrigeren mehr als bei hohen Infektionsdosen in einem Bereich von MOI 0,1 bis 2 zu einer Proliferation der unstimulierten PBMC, was auf die Proliferation Influenza-spezifischer T-Zellen der seropositiven Spender zurückzuführen ist. Hingegen war sowohl die mitogenvermittelte (PBMC) als auch die antigen-spezifische (TT- und MBP-spezifische T-Zelllinien) Proliferation durch die *in vitro*-Infektion mit Influenzavirus vermindert, unabhängig davon, ob Effektorzellen oder Präsenter infiziert wurden. Somit bestätigte sich *in vitro* die supprimierende Wirkung auf die mitogen- und antigen-induzierte Proliferation.^{153, 154} Wenngleich es sich bei Influenza um ein Virus mit primärem respiratorischen Epithelzelltropismus handelt und die zum Teil lymphopenischen Effekte noch nicht hinreichend erklärt sind, so sind doch abortive Infektionen von Lymphozyten beschrieben.¹⁵⁵ Anhand dieser Daten kann keine lineare Erklärung einer postulierten Schub- oder sogar Krankheitsauslösung durch Infektion mit Influenzaviren abgeleitet werden. Dennoch ist eine sekundäre Immunaktivierung über die *in vivo* zu beobachtende IFN γ -Ausschüttung^{153, 156, 157} als Sekundärphänomen und möglicher Stimulus einer Bystander-Aktivierung autoreaktiver T-Zellen denkbar, zumal in einer klinischen Phase-II-Studie die Applikation von IFN γ

bei MS-Patienten deutlich schubauslösend wirkte.⁷⁴ Eine Aufregulierung myelin-spezifischer T-Zellen konnte im Rahmen der ViMS-Studie nach Impfung nicht festgestellt werden, obwohl es zu einer impfbedingten Zunahme Influenza-spezifischer T-Zellen gekommen war. Nach den ELISA-Befunden und der ELISPOT-Hintergrundfärbung in dieser Arbeit zu schließen, welche bei Verwendung von 5%igem autologen Serum auch vom IFN γ -Gehalt des Serums abhängt, kam es nach Impfung nicht zu signifikant erhöhten Mengen IFN γ im Serum. Dies könnte an der wesentlich stärkeren Immunaktivierung und dem nachgewiesenermaßen höherem IFN γ -Anstieg einer natürlichen Infektion als unter Immunstimulierung mit attenuiertem Lebendvirus oder gereinigtem HA liegen.¹²⁵

4.2.3 *In vitro*-Infektionsversuche mit HHV-6B

In einem experimentellen Infektionsmodell konnte bei HHV-6B-Infektionsdosen (MOI) von über 10^{-4} TCID₅₀ die Proliferation frisch isolierter PBMC gehemmt werden. Dies entspricht auch den Erfahrungen aus anderen Laboren, in denen mit HHV-6 gearbeitet wird. Dabei kommt es möglicherweise über eine Herabregulierung des T-Zellrezeptor-Komplexes CD3¹⁰⁵, durch Hemmung der IL2-Synthese¹⁵⁸ sowie über Apoptoseinduktion¹⁵⁹ zu einer Hemmung der T-Lymphozyten-Proliferation. Bemerkenswerterweise treten diese Effekte bei wesentlich niedrigeren Infektionsraten zwischen 10^{-6} bis 10^{-5} TCID₅₀ nicht auf. Hier wurde ein signifikanter Anstieg der spontanen Proliferationsrate beobachtet, was am ehesten durch Stimulation HHV-6-spezifischer T-Zellen bei seropositiven Spendern erklärbar ist. Diese HHV-6-spezifische Proliferation konnte von anderen durch Monozytendepletion oder antikörpervermittelte IL2-Rezeptor-Blockade gehemmt werden.¹⁶⁰ Man könnte hypothetisieren, daß bei hohen Virusmengen die intrinsische immunsuppressive Wirkung des Virus die Stimulation virusspezifischer T-Zellen übertrifft. Da die unspezifische Mitogenstimulation von PBMC antigenunabhängig funktioniert, ist hier ein Überwiegen des immunsuppressiven Effekts nachzuvollziehen, was in unseren Experimenten bei allen Infektionsdosen der Fall war. Eine autoantigen-spezifische Stimulation konnte also weder über einen unspezifischen Bystander-Effekt noch über Molecular Mimicry gezeigt werden. Dies wurde in einer sehr aktuellen Arbeit bestätigt.¹⁶¹

4.2.4 Klinische Untersuchungen zur HHV-6-Reaktivierung

Gemäß der kontrovers diskutierten Assoziation zwischen HHV-6 und Multipler Sklerose und der Fähigkeit des Virus, in menschlichen CD4⁺ T-Zellen und Monozyten zu persistieren, sowie dessen hohe Prävalenz in Oligodendrozyten und Mikroglia legen eine mögliche Rolle in der postulierten Viruspathogenese der MS nahe.

In einer klinischen und laborunterstützten Studie zur Evaluierung von HHV-6-Durchseuchung bzw. möglicher Hinweise auf eine Reaktivierung wurden Serumproben auf anti-HHV-6-Antikörper und Virus-DNA hin untersucht. Hierbei konnten bei 62 MS Patienten und 12 Kontrollspendern weder IgM-Antikörper gegen HHV-6 noch Virus-DNA nachgewiesen werden. Darüberhinaus fanden sich zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede der IgG-Titer gegen HHV-6, außer bei dem Pentoxifyllin-behandelten MS-Kollektiv, welches im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Titer aufwies. Diese Titererhöhung ließe sich durch den postulierten PTX-vermittelten Th2-shift¹³⁶, entweder über den Mechanismus unspezifisch erhöhter Antikörperproduktion oder einer spezifischen humoralen Antwort auf eine latente HHV-6-Reaktivierung durch vorübergehende Immunsuppression erklären. Der fehlende Nachweis von HHV-6-DNA im Serum der untersuchten Populationen spricht gegen eine maßgebliche Rolle als einzelnes Virus in der Pathogenese der MS, zumal im Vergleich zu einer Vielzahl von Negativ-Ergebnissen^{117, 119, 121, 161} die wenigsten Forschergruppen^{112, 113, 115, 138} einen signifikanten Unterschied zu gesunden Kontrollpersonen nachweisen konnten.

4.3 Zusammenfassung

In der sogenannten ViMS-Studie, bei der MS-Patienten und gesunde Kontrollpersonen mit einer Influenza-Spaltvakzine geimpft und für einen zum Teil viermonatigen Zeitraum im Verlauf nachbeobachtet wurden, ergab sich weder mit dem sensitiven IFN γ -ELISPOT noch mit der quantitativen RT-PCR ein Anhalt für erhöhte Autoimmunreaktivität gegen die zwei untersuchten Myelin-Antigene MBP und MOG. Im Gegensatz dazu konnten mit dem IFN γ -ELISPOT-Assay bei einigen gesunden Spendern und MS-Patienten nach natürlichen Atemwegsinfektionen eine erhöhte Frequenz autoreaktiver MBP-spezifischer T-Lymphozyten beobachtet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten durch Zellkulturinfektionen mit Influenzavirus oder HHV-6 weder an Primärzellkulturen noch in einem etablierten *in vitro*-Modell für MS-Autoimmunität an MBP-spezifischen T-Zellen eine immunstimulierende Wirkung gezeigt werden. Bei niedrigen Infektionsdosen kam es zur Proliferation einer wahrscheinlich virus-spezifischen Zellpopulation, bei höheren Dosen wurde dieser Effekt durch die bekannte Immunsuppression der *in vitro*-Infektion mit HHV-6 übertroffen.

In einer umfassenden Untersuchung von Serumproben von gesunden Spendern und MS-Patienten in unterschiedlichen Krankheitsphasen wurden trotz sensitiver Nachweismethoden keine erhöhten Antikörper-Titer (IgG/IgM) gegen HHV-6 oder HHV-6-DNA nachgewiesen, woraus geschlossen werden darf, daß die untersuchten Viren keine intrinsische Pathogenität für die Entstehung von Autoimmunität bei der MS aufweisen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöhte Anti-HHV-6-IgG-Titer bei PTX-behandelten MS-Patienten lassen sich als mögliches Epiphänomen durch die immunmodulatorische (Th2-vermittelte) Wirkung des Medikaments deuten.

In Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich die anfangs angedeuteten Modelle einer virusvermittelten Autoimmunpathogenese der MS nicht eindeutig einordnen. Die Ergebnisse der ViMS-Studie, unterstützt durch zahlreiche Untersuchungen anderer Gruppen, weisen in Bezug auf Schubausslösung oder Verschlechterung auf einen generellen immunaktivierenden Mechanismus im Sinne einer unspezifischen Begleitreaktion durch Infektion aber nicht durch Influenzaschutzimpfung hin (vgl. Abb. 1b). Dabei spielt wohl nicht eine einzelne Virusinfektion (vgl. Antikörperbefunde, Kap. 3.1.5) die maßgebliche Rolle in einem schon auf immunologischer Ebene recht komplexen Netzwerk, sondern können prinzipiell verschiedene (beliebige) Viren zum Anstoßen einer Autoimmunkaskade beitragen, wenn sie auf einen konstitutionell oder temporär empfänglichen Wirtsorganismus treffen. Dies ist auch vom Infektionsort und -milieu abhängig. Bei der vorliegenden Multifaktorialität und Heterogenität der Subpopulationen sind monolineare Erklärungsansätze bislang zum Scheitern verurteilt gewesen. Aber aus dem Fehlen eines Beweises kann nicht der Beweis für das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen Virusinfektionen und Autoimmunreaktionen geschlossen werden.

5 Literatur

1. Martyn, C. The epidemiology of multiple sclerosis. In: Matthews, W.B., editor. *McAlpine's multiple sclerosis*. New York: Churchill Livingstone; 1991. p. 3-40.
2. Weinshenker, B.G., Bass, B., Rice, G.P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 1989;112(Pt 1):133-146.
3. Martin, R., McFarland, H.F. and McFarlin, D.E. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153-187.
4. Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. and Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-717.
5. Noseworthy, J.H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 1999;399(6738 Suppl):A40-47.
6. Martin, R., Jaraquemada, D., Flerlage, M., Richert, J., Whitaker, J., Long, E.O., et al. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 1990;145(2):540-548.
7. Ota, K., Matsui, M., Milford, E.L., Mackin, G.A., Weiner, H.L. and Hafler, D.A. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990;346(6280):183-187.
8. Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B. and Lisak, R.P. Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol* 1983;81(2):435-440.
9. Pette, M., Fujita, K., Kitze, B., Whitaker, J.N., Albert, E., Kappos, L., et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990;40(11):1770-1776.
10. Muraro, P.A., Vergelli, M., Kalbus, M., Banks, D.E., Nagle, J.W., Tranquill, L.R., et al. Immunodominance of a low-affinity major histocompatibility complex-binding myelin basic protein epitope (residues 111-129) in HLA-DR4 (B1*0401) subjects is associated with a restricted T cell receptor repertoire. *J Clin Invest* 1997;100(2):339-349.
11. Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L. and Hafler, D.A. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;179(3):973-984.

12. Scholz, C., Patton, K.T., Anderson, D.E., Freeman, G.J. and Hafler, D.A. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol* 1998;160(3):1532-1538.
13. Burns, J., Bartholomew, B. and Lobo, S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999;45(1):33-39.
14. Olsson, T., Zhi, W.W., Hojberg, B., Kostulas, V., Jiang, Y.P., Anderson, G., et al. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* 1990;86(3):981-985.
15. Voskuhl, R.R., Martin, R., Bergman, C., Dalal, M., Ruddle, N.H. and McFarland, H.F. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* 1993;15(2):137-143.
16. Muraro, P.A., Pette, M., Bielekova, B., McFarland, H.F. and Martin, R. Human autoreactive CD4+ T cells from naive CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity. *J Immunol* 2000;164(10):5474-5481.
17. Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., McFarland, H.F. and Martin, R. Antigen-specific immunomodulation confirms the encephalitogenic potential of myelin basic protein peptide (83-99) in multiple sclerosis (abstract). *Neurology* 2000;54 (Suppl 3)(7):A 148.
18. Rivers, T., Sprunt, D. and Berry, G. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 1933;58:39-53.
19. Gold, R., Hartung, H.P. and Toyka, K.V. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000;6(2):88-91.
20. Sun, J.B., Olsson, T., Wang, W.Z., Xiao, B.G., Kostulas, V., Fredrikson, S., et al. Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol* 1991;21(6):1461-1468.
21. Trotter, J.L., Hickey, W.F., van der Veen, R.C. and Sulze, L. Peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein and selected peptides. *J Neuroimmunol* 1991;33(1):55-62.
22. Burns, J.B. and Littlefield, K. Human T lymphocytes reactive with whole myelin recognize predominantly myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 1989;24(1-2):67-74.
23. Rösener, M., Muraro, P.A., Riethmüller, A., Kalbus, M., Sappeler, G., Thompson, R.J., et al. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a novel candidate autoantigen in demyelinating diseases. *J Neuroimmunol* 1997;75(1-2):28-34.

24. Zhang, Y., Burger, D., Saruhan, G., Jeannet, M. and Steck, A.J. The T-lymphocyte response against myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1993;43(2):403-407.
25. Link, H., Sun, J.B., Wang, Z., Xu, Z., Love, A., Fredrikson, S., et al. Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992;38(1-2):63-73.
26. Kerlero de Rosbo, N., Hoffman, M., Mendel, I., Yust, I., Kaye, J., Bakimer, R., et al. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol* 1997;27(11):3059-3069.
27. Kojima, K., Berger, T., Lassmann, H., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Gehrman, J., et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 1994;180(3):817-829.
28. van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., van Stipdonk, M.J., Persoon-Deen, C., Geutskens, S.B. and van Noort, J.M. EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Immunol* 1999;162(1):129-135.
29. van Noort, J.M., van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., el Ouagmiri, M., Polman, C.H., Lassmann, H., et al. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 1995;375(6534):798-801.
30. Banki, K., Colombo, E., Sia, F., Halladay, D., Mattson, D.H., Tatum, A.H., et al. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;180(5):1649-1663.
31. Kerlero de Rosbo, N. and Ben-Nun, A. T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Autoimmun* 1998;11(4):287-299.
32. Wekerle, H. Remembering MOG: autoantibody mediated demyelination in multiple sclerosis? *Nat Med* 1999;5(2):153-154.
33. Lehmann, P.V., Forsthuber, T., Miller, A. and Sercarz, E.E. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992;358(6382):155-157.
34. Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Johnson, J.M., Mathisen, P.M., et al. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 1998;164:93-100.

35. Johnson, R.T. The virology of demyelinating diseases. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl:S54-60.
36. Marie, P. Sclérose en plaques et maladies infectieuses. *Prog Med* 1884;12:287-289.
37. Kurtzke, J.F. Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology* 1980;30(7 Pt 2):61-79.
38. Kurtzke, J.F. Multiple sclerosis in time and space - geographic clues to cause. *J Neurovirol* 2000;6 Suppl 2(5):S134-140.
39. Ebers, G.C., Bulman, D.E., Sadovnick, A.D., Paty, D.W., Warren, S., Hader, W., et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 1986;315(26):1638-1642.
40. Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993;33(3):281-285.
41. Mumford, C.J., Wood, N.W., Kellar-Wood, H., Thorpe, J.W., Miller, D.H. and Compston, D.A. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994;44(1):11-15.
42. Eldridge, R., Herndon, C.N. and al, e. Multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 1987;317:50.
43. Kurtzke, J.F. and Hyllested, K. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and epidemiological features. *Ann Neurol* 1979;5(1):6-21.
44. Sheremata, W.A., Poskanzer, D.C., Withum, D.G., MacLeod, C.L. and Whiteside, M.E. Unusual occurrence on a tropical island of multiple sclerosis. *Lancet* 1985;2(8455):618.
45. Poser, C.M., Hibberd, P.L., Benedikz, J. and Gudmundsson, G. Analysis of the 'epidemic' of multiple sclerosis in the Faroe Islands. I. Clinical and epidemiological aspects. *Neuroepidemiology* 1988;7(4):168-180.
46. Poser, C.M. and Hibberd, P.L. Analysis of the 'epidemic' of multiple sclerosis in the Faroe Islands. II. Biostatistical aspects. *Neuroepidemiology* 1988;7(4):181-189.
47. Cooke, R.G. MS in the Faroe Islands and the possible protective effect of early childhood exposure to the "MS agent". *Acta Neurol Scand* 1990;82(4):230-233.
48. Benedikz, J., Magnusson, H. and Gudmundsson, G. Multiple sclerosis in Iceland, with observations on the alleged epidemic in the Faroe Islands. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl 2:S175-179.

49. Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L. and Zaller, D.M. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 1993;72(4):551-560.
50. ter Meulen, V. and Katz, M. The proposed viral etiology of multiple sclerosis and related demyelinating diseases. In: Raine, C., McFarland, H. and Tourtellotte, W., editors. *Multiple sclerosis: clinical and pathogenetic basis*. London: Chapman & Hall; 1997. p. 287-305.
51. Stohlman, S.A. and Hinton, D.R. Viral induced demyelination. *Brain Pathol* 2001;11:92-106.
52. Horvath, C.J., Simon, M.A., Bergsagel, D.J., Pauley, D.R., King, N.W., Garcea, R.L., et al. Simian virus 40-induced disease in rhesus monkeys with simian acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Pathol* 1992;140(6):1431-1440.
53. Zurbriggen, A., Yamawaki, M. and Vandeveld, M. Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. *Lab Invest* 1993;68(3):277-284.
54. Bailey, O.T., Pappenheimer, A.M., Cheever, F.S. and Daniels, J.B. A murine hepatitis virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. *J Exp Med* 1949;90:195-212.
55. Weiner, L.P. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Arch Neurol* 1973;28(5):298-303.
56. Yokomori, K., Asanaka, M., Stohlman, S.A., Makino, S., Shubin, R.A., Gilmore, W., et al. Neuropathogenicity of mouse hepatitis virus JHM isolates differing in hemagglutinin-esterase protein expression. *J Neurovirol* 1995;1(5-6):330-339.
57. Theiler, M. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. *J Exp Med* 1937;65:705-719.
58. Jakob, J. and Roos, R.P. Molecular determinants of Theiler's murine encephalomyelitis-induced disease. *J Neurovirol* 1996;2(2):70-77.
59. Fazakerley, J.K. and Webb, H.E. Semliki Forest virus-induced, immune-mediated demyelination: adoptive transfer studies and viral persistence in nude mice. *J Gen Virol* 1987;68 (Pt 2):377-385.
60. Dal Canto, M.C., Rabinowitz, S.G. and Johnson, T.C. Virus-induced demyelination. Production by a viral temperature-sensitive mutant. *J Neurol Sci* 1979;42(1):155-168.
61. Narayan, O. and Clements, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989;70 (Pt 7):1617-1639.

62. Haase, C.G., Faustmann, P.M. and Diener, H. Idiopathic inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system: differentiating between acute disseminated encephalomyelitis and malignant multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 1999;6(3):221-226.
63. ter Meulen, V., Stephenson, J.R. and Kreth, W.H. Subacute sclerosing panencephalitis. In: Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R., editors. *Comprehensive Virology*. New York: Plenum Press; 1983. p. 105-159.
64. Frey, T.K. Neurological aspects of rubella virus infection. *Intervirology* 1997;40(2-3):167-175.
65. Padgett, B.L. and Walker, D.L. New human papovaviruses. *Progr Med Virol* 1976;22:1-35.
66. Carrigan, D.R., Harrington, D. and Knox, K.K. Subacute leukoencephalitis caused by CNS infection with human herpesvirus-6 manifesting as acute multiple sclerosis. *Neurology* 1996;47(1):145-148.
67. Ho, D.D., Rota, T.R., Schooley, R.T. and al, e. Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1985;313:1493-1497.
68. Levy, J.A., Shimabukuro, J., Hollander, H. and al, e. Isolation of AIDS-associated retroviruses from cerebrospinal fluid and brain of patients with neurological symptoms. *Lancet* 1985;2:586-588.
69. Osame, M., Usuku, K., Izumo, S. and al, e. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986;2:1031-1032.
70. Moore, G.R.W., Traugott, U., Scheinberg, L.C. and Raine, C.S. Tropical spastic paraparesis: a model of virus-induced cytotoxic T cell mediated demyelination. *Ann Neurol* 1989;26:523-530.
71. Goswami, K.K., Randall, R.E., Lange, L.S. and Russell, W.C. Antibodies against the paramyxovirus SV5 in the cerebrospinal fluids of some multiple sclerosis patients. *Nature* 1987;327(6119):244-247.
72. Norrby, E. Viral antibodies in multiple sclerosis. In: Melnich, J.L., editor. *Progress in medical virology*. Basel: Karger; 1978.
73. Reiber, H., Ungefehr, S. and Jacobi, C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998;4(3):111-117.
74. Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S. and Johnson, K.P. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987;1(8538):893-895.

75. Panitch, H.S. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl:S25-28.
76. Sibley, W.A., Bamford, C.R. and Clark, K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985;1(8441):1313-1315.
77. Andersen, O., Lygner, P.E., Bergstrom, T., Andersson, M. and Vahlne, A. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J Neurol* 1993;240(7):417-422.
78. Edwards, S., Zvartau, M., Clarke, H., Irving, W. and Blumhardt, L.D. Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64(6):736-741.
79. De Keyser, J., Zwanikken, C. and Boon, M. Effects of influenza vaccination and influenza illness on exacerbations in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;159(1):51-53.
80. von Herrath, M.G. Obstacles to identifying viruses that cause autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 2000;107(2):154-160.
81. Souberbielle, B.E., Szawlowski, P.W. and Russell, W.C. Is there a case for a virus aetiology in multiple sclerosis? *Scott Med J* 1995;40(2):55-62.
82. Hafler, D.A. The distinction blurs between an autoimmune versus microbial hypothesis in multiple sclerosis [comment]. *J Clin Invest* 1999;104(5):527-529.
83. Barnaba, V. Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity. *Immunol Rev* 1996;152:47-66.
84. Webb, H.E. and Fazakerley, J.K. Can viral envelope glycolipids produce autoimmunity with reference to the CNS and multiple sclerosis? *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984;10:1-10.
85. Dalgleish, A.G., Fazakerley, J.K. and Webb, H.E. Do human T-lymphotrophic viruses (HTLVs) and other enveloped viruses induce autoimmunity in multiple sclerosis? *Neuropathol Appl Neurobiol* 1987;13(4):241-250.
86. Wekerle, H., Engelhardt, B., Risau, W. and Meyermann, R. Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro. *Brain Pathol* 1991;1(2):107-114.
87. Hickey, W.F. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991;1(2):97-105.

88. Fujinami, R.S. and Oldstone, M.B.A. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985;230:1043-1045.
89. Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80(5):695-705.
90. Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., et al. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 1997;185(9):1651-1659.
91. Gran, B., Hemmer, B., Vergelli, M., McFarland, H.F. and Martin, R. Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* 1999;45(5):559-567.
92. Delves, P.J. and Roitt, I.M. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(2):108-117.
93. Tough, D.F., Borrow, P. and Sprent, J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 1996;272(5270):1947-1950.
94. Oldstone, M.B. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *Faseb J* 1998;12(13):1255-1265.
95. Horwitz, M.S., Bradley, L.M., Harbertson, J., Krahl, T., Lee, J. and Sarvetnick, N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998;4(7):781-785.
96. Conrad, B., Weissmahr, R.N., Böni, J., Arcari, R., Schüpbach, J. and Mach, B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997;90:303-313.
97. Perron, H., Geny, C., Laurent, A., Mouriquand, C., Pellat, J., Perret, J., et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol* 1989;140(6):551-561.
98. Perron, H., Garson, J.A., Bedin, F., Beseme, F., Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(14):7583-7588.
99. Torres, B.A. and Johnson, H.M. Modulation of disease by superantigens. *Curr Opin Immunol* 1998;10(4):465-470.
100. Sommerlund, M., Pallesen, G., Moller-Larsen, A., Hansen, H.J. and Haahr, S. Retrovirus-like particles in an Epstein-Barr virus-producing cell line derived

- from a patient with chronic progressive myelopathy. *Acta Neurol Scand* 1993;87(2):71-76.
101. Haahr, S. and Munch, M. The association between multiple sclerosis and infection with Epstein-Barr virus and retrovirus. *J Neurovirol* 2000;6 Suppl 2:S76-79.
 102. Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;234(4776):596-601.
 103. Braun, D.K., Dominguez, G. and Pellett, P.E. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):521-567.
 104. Pellett, P.E. and Black, J.B. Human herpesvirus 6. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. and al., e., editors. *Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 2587-2608.
 105. Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S.E., Markham, P.D., et al. Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* 1991;147(2):685-691.
 106. Burd, E.M., Knox, K.K. and Carrigan, D.R. Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood* 1993;81(6):1645-1650.
 107. Horvat, R.T., Parmely, M.J. and Chandran, B. Human herpesvirus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 1993;167(6):1274-1280.
 108. Flamand, L., Gosselin, J., DqAddario, M., Hiscott, J., Ablashi, D.V., Gallo, R.C., et al. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol* 1991;65(9):5105-5110.
 109. Kamei, A., Ichinohe, S., Onuma, R., Hiraga, S. and Fujiwara, T. Acute disseminated demyelination due to primary human herpesvirus-6 infection. *Eur J Pediatr* 1997;156(9):709-712.
 110. Novoa, L.J., Nagra, R.M., Nakawatase, T., Edwards-Lee, T., Tourtellotte, W.W. and Cornford, M.E. Fulminant demyelinating encephalomyelitis associated with productive HHV-6 infection in an immunocompetent adult. *J Med Virol* 1997;52(3):301-308.
 111. Challoner, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16):7440-7444.

112. Sola, P., Merelli, E., Marasca, R., Poggi, M., Luppi, M., Montorsi, M., et al. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56(8):917-919.
113. Wilborn, F., Schmidt, C.A., Brinkmann, V., Jendroska, K., Oettle, H. and Siegert, W. A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J Neuroimmunol* 1994;49(1-2):213-214.
114. Ablashi, D.V., Lapps, W., Kaplan, M., Whitman, J.E., Richert, J.R. and Pearson, G.R. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Multiple Sclerosis* 1998;4(in press).
115. Liedtke, W., Malessa, R., Faustmann, P.M. and Eis-Hubinger, A.M. Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. *J Neurovirol* 1995;1(3-4):253-258.
116. Sanders, V.J., Felisan, S., Waddell, A. and Tourtellotte, W.W. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol* 1996;2(4):249-258.
117. Martin, C., Enbom, M., Soderstrom, M., Fredrikson, S., Dahl, H., Lycke, J., et al. Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand* 1997;95(5):280-283.
118. Merelli, E., Bedin, R., Sola, P., Barozzi, P., Mancardi, G.L., Ficarra, G., et al. Human herpes virus 6 and human herpes virus 8 DNA sequences in brains of multiple sclerosis patients, normal adults and children. *J Neurol* 1997;244(7):450-454.
119. Mayne, M., Krishnan, J., Metz, L., Nath, A., Auty, A., Sahai, B.M., et al. Infrequent detection of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 1998;44(3):391-394.
120. Rotola, A., Cassai, E., Tola, M.R., Granieri, E. and Di Luca, D. Human herpesvirus 6 is latent in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67(4):529-531.
121. Goldberg, S.H., Albright, A.V., Lisak, R.P. and Gonzalez-Scarano, F. Polymerase chain reaction analysis of human herpesvirus-6 sequences in the sera and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol* 1999;5(2):134-139.

122. Knox, K.K., Brewer, J.H., Henry, J.M., Harrington, D.J. and Carrigan, D.R. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: systemic active infections in patients with early disease. *Clin Infect Dis* 2000;31:894-903.
123. Murphy, B.R. and Webster, R.G. Orthomyxoviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. and al., e., editors. *Virology*. 2 ed. New York: Raven Press, Ltd.; 1990. p. 1091-1151.
124. Smith, W., Andrew, C.H. and Laidlaw, P.O. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1933;1:66-68.
125. Ennis, F.A. and Meager, A. Immune interferon produced to high levels by antigenic stimulation of human lymphocytes with influenza virus. *J Exp Med* 1981;154(5):1279-1289.
126. CDC. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2001;50(RR-4).
127. RKI. Hinweise zur Influenzaschutzimpfung bei Multipler Sklerose. *Epidemiologisches Bulletin* 1998;41/98:291.
128. Sibley, W.A., Bamford, C.R. and Laguna, J.F. Influenza vaccination in patients with multiple sclerosis. *JAMA* 1976;236(17):1965-1966.
129. Salvetti, M., Pisani, A., Bastianello, S., Millefiorini, E., Buttinelli, C. and Pozzilli, C. Clinical and MRI assessment of disease activity in patients with multiple sclerosis after influenza vaccination. *J Neurol* 1995;242(3):143-146.
130. Miller, A.E., Morgante, L.A., Buchwald, L.Y., Nutile, S.M., Coyle, P.K., Krupp, L.B., et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of influenza immunization in multiple sclerosis. *Neurology* 1997;48(2):312-314.
131. Mokhtarian, F., Shirazian, D., Morgante, L., Miller, A., Grob, D. and Lichstein, E. Influenza virus vaccination of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 1997;3(4):243-247.
132. Confavreux, C., Suissa, S., Saddier, P., Bourdes, V. and Vukusic, S. Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. *Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group*. *N Engl J Med* 2001;344(5):319-326.
133. Kruse, N., Moriabadi, N.F., Toyka, K.V. and Rieckmann, P. Characterization of early immunological responses in primary cultures of differentially activated human peripheral mononuclear cells. *J Immunol Methods* 2001;247:131-139.
134. Eylar, E.H., Kniskern, P.J. and Jackson, J.J. Myelin basic proteins. *Methods Enzymol* 1974;32(Part B):323-341.

135. Giegerich, G., Pette, M., Fujita, K., Wekerle, H., Epplen, J.T. and Hinkkanen, A. Rapid method based on reversed-phase high-performance liquid chromatography for purification of human myelin basic protein and its thrombic and endoproteinase Lys-C peptides. *J Chromatogr* 1990;528(1):79-90.
136. Rieckmann, P., Weber, F., Gunther, A., Martin, S., Bitsch, A., Broocks, A., et al. Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996;64(2):193-200.
137. Secchiero, P., Carrigan, D.R., Asano, Y., Benedetti, L., Crowley, R.W., Komaroff, A.L., et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995;171(2):273-280.
138. Soldan, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997;3(12):1394-1397.
139. Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D., Zajac, A. and Ahmed, R. In vivo dynamics of anti-viral CD8 T cell responses to different epitopes. An evaluation of bystander activation in primary and secondary responses to viral infection. *Adv Exp Med Biol* 1998;452:123-142.
140. Goulder, P.J., Tang, Y., Brander, C., Betts, M.R., Altfeld, M., Annamalai, K., et al. Functionally inert HIV-specific cytotoxic T lymphocytes do not play a major role in chronically infected adults and children. *J Exp Med* 2000;192(12):1819-1832.
141. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., et al. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1997;210(2):149-166.
142. Wallstrom, E., Khademi, M., Andersson, M., Weissert, R., Linington, C. and Olsson, T. Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 1998;28(10):3329-3335.
143. Pelfrey, C.M., Rudick, R.A., Coteleur, A.C., Lee, J.C., Tary-Lehmann, M. and Lehmann, P.V. Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokine production. *J Immunol* 2000;165(3):1641-1651.
144. Martin, R., Voskuhl, R., Flerlage, M., McFarlin, D.E. and McFarland, H.F. Myelin basic protein-specific T-cell responses in identical twins discordant or concordant for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1993;34(4):524-535.

145. Diaz-Villoslada, P., Shih, A., Shao, L., Genain, C.P. and Hauser, S.L. Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen. *J Neuroimmunol* 1999;99(1):36-43.
146. Villoslada, P., Abel, K., Heald, N., Goertsches, R., Hauser, S.L. and Genain, C.P. Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates. *Eur J Immunol* 2001;31(10):2942-2950.
147. Vergelli, M., Pinet, V., Vogt, A.B., Kalbus, M., Malnati, M., Riccio, P., et al. HLA-DR-restricted presentation of purified myelin basic protein is independent of intracellular processing. *Eur J Immunol* 1997;27(4):941-951.
148. Favre, N., Bordmann, G. and Rudin, W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi- quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods* 1997;204(1):57-66.
149. Ghendon, Y. The immune response to influenza vaccines. *Acta Virol* 1990;34(3):295-304.
150. Süss, J., Schmidt, S., Kretschmar, M. and Wohanka, N. The modulation of the specific and non-specific host response in case of influenza virus infection and vaccination in man. *Exp Pathol* 1991;41(3):121-134.
151. Flachenecker, P., Moriabadi, N.F., Niewiesk, S. and Rieckmann, P. Immunization and multiple sclerosis: clinical and immunological implications. *Int MSJ* 2001;7(3):79-87.
152. Soldan, S.S., Leist, T.P., Juhng, K.N., McFarland, H.F. and Jacobson, S. Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2000;47(3):306-313.
153. Dolin, R., Murphy, B.R. and Caplan, E.A. Lymphocyte blastogenic responses to influenza virus antigens after influenza infection and vaccination in humans. *Infect Immun* 1978;19:867-874.
154. Lewis, D.E., Gilbert, B.E. and Knight, V. Influenza virus infection induces functional alterations in peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:3777-3781.
155. Brownson, J.M., Mahy, B.W.J. and Hazleman, B.L. Interaction of influenza A virus with human peripheral blood lymphocytes. *Infect Immun* 1979;25:749-756.
156. Ennis, F.A., Meager, A., Beare, A.S. and al., e. Interferon induction and increased natural killer-cell activity in influenza infections in man. *Lancet* 1981;2:891-893.

157. Hertzog, P.J., Wright, A., Harris, G., Linnane, A.W. and Mackay, I.R. Intermittent interferonemia and interferon responses in multiple sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;58(1):18-32.
158. Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D. and Menezes, J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation [published erratum appears in *Blood* 1995 Jul 1;86(1):418]. *Blood* 1995;85(5):1263-1271.
159. Inoue, Y., Yasukawa, M. and Fujita, S. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J Virol* 1997;71(5):3751-3759.
160. Koide, W., Ito, M., Torigoe, S., Ihara, T., Kamiya, H. and Sakurai, M. Activation of lymphocytes by HHV-6 antigen in normal children and adults. *Viral Immunol* 1998;11(1):19-25.
161. Cirone, M., Cuomo, L., Zompetta, C., Ruggieri, S., Frati, L., Faggioni, A., et al. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: A study of t cell cross-reactivity to viral and myelin basic protein antigens. *J Med Virol* 2002;68(2):268-272.

6 Anhang

Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg



Ethik-Kommission der Med. Fakultät • Josef-Schneider-Str. 2 • 97080 Würzburg

97080 Würzburg
Josef-Schneider-Straße 2, Bau 11
Telefon (0931) 201 3856
Telefax (0931) 201 3860

Herrn
Priv.-Doz. Dr. P. Rieckmann
Neurologische Klinik u.
Poliklinik d. Universität
Josef-Schneider-Str. 11

97080 Würzburg

Studien-Nr. 97/98 Unsere Zeichen: G05cm
(bei Rückfragen immer angeben)

Würzburg, den 02.11.1998

Ihre Studie zum Thema: „Einfluß von Impfungen und Infektionen auf Immunreaktionen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems“

Sehr geehrter Herr Doktor Rieckmann,

in der Sitzung der Ethik-Kommission vom 26. Oktober 1998 wurde o. g. Studie auf der Basis folgender Unterlagen beraten: Antrag vom 22. September 1998, Patienteninformation und Einverständniserklärung. Nach Vorlage einer revidierten Fassung der schriftlichen Patienteninformation bestehen seitens der Kommission keine Bedenken gegen die geplante klinische Studie.

Sie werden gebeten, Ihrem Antrag und Studienprotokoll entsprechend vorzugehen und die im Fragebogen zum Antrag aufgeführten Angaben bzw. Auflagen sowie die Deklaration des „Weltärztebundes von Helsinki und Tokio“ hinsichtlich der ethischen und rechtlichen Aspekte biomedizinischer Forschung am Menschen zu beachten.

Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethik-Kommission betrifft unser Votum nur die ethische Beurteilung des Projektes und der beabsichtigten Patientenaufklärung. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern, so daß alle zivil- und haftrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, von dieser Seite zu tragen sind.

Mit freundlichen Grüßen

i. V. G. Nissen
Prof. Dr. G. Nissen
Vorsitzender
der Ethik-Kommission

Neurologische Universitätsklinik und Poliklinik im Kopfklinikum

Direktor: Prof. Dr. Klaus Toyka

Patienteninformation zur Studie:

Einfluß von Impfungen und Infektionen auf Immunreaktionen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems

Sehr geehrte, liebe Patienten,

im Rahmen der hier beschriebenen Studie sollen Erkenntnisse über den Einfluß von Impfungen und Infektionen auf die Immunreaktionen gegen körpereigenes Eiweiß gewonnen werden. Bei entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems finden sich Immunreaktionen gegen Bestandteile von Nervengewebe, die zu klinischen Symptomen führen können. Oft kommt es nach Infektionen zum Auftreten neuer oder Verschlechterung bereits bestehender Symptome (Schub). Auf der anderen Seite treten diese Beschwerden im Rahmen von Impfungen sehr viel seltener auf. In mehreren Untersuchungen konnte z.B. gezeigt werden, daß eine Gripeschutzimpfung keinen Einfluß auf die Krankheitsaktivität oder das Voranschreiten von neurologischen Symptomen hat.

Bei der Krankheitsentstehung und -verschlimmerung, die durch Infektionskrankheiten mitbedingt wird, geht man davon aus, daß durch die Infektion Immunzellen aktiviert werden, die sich gegen körpereigene Eiweißverbindungen richten. Diese Zellen können dann in das Nervensystem einwandern und dort zur Zerstörung von Nervengewebe führen.

Diese Ausführungen betonen die negativen Einflüsse einer Virusinfektion auf eine bereits bestehende Autoimmunkrankheit, und verdeutlichen, welche wichtige Rolle der Beseitigung solcher schädigender Faktoren zukommt. Nun gilt die Verhütung von Virusinfektionen bekannterweise als der beste Schutz, und die Impfung als wirksamste Form, um dies zu gewährleisten.

Die Gripeschutzimpfung ist diesbezüglich eine vorbeugende Maßnahme, von der man annehmen darf, daß sie sowohl aus unserem derzeitigen Verständnis, als auch nach vielen klinischen Beschreibungen für sinnvoll erachtet werden kann und schubauslösenden Infektionen vorbeugen soll.

Ablauf der Studie:

Im Rahmen dieser Studie sollen direkt vor der Impfung oder bei einem bestehenden Infekt der oberen Luftwege sowie zu festgelegten Zeitpunkten danach Blutproben abgenommen und die Blutzellen untersucht werden.

Zu vier Zeitpunkten, nämlich am selben Tag, zwei und vier Wochen, sowie 4 Monate nach der Impfung werden Ihnen jeweils 30 ml Blut aus einer Armvene entnommen. Bei der ersten Blutentnahme, also am Tag der Impfung, werden insgesamt 60 ml Blut entnommen.

Die Influenza-Schutzimpfung wird mit einer sogenannten Spaltvakzine aus nicht mehr aktiven Bestandteilen verschiedener Virusstämme, wie sie nach den aktuellsten Berichten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlen wird, durchgeführt. Der Impfstoff (Influvac®) ist in Deutschland zugelassen. Da sich Influenza-Viren aufgrund eines besonderen Mechanismus in ihrer Struktur verändern können, sollte eine Impfung immer saisonal an die entsprechenden Virus-Untergruppen angepaßt werden und sollte daher jährlich wiederholt werden. Der Impfschutz hängt auch von dem Abwehrsystem des Geimpften ab, weshalb in der hier dargestellten Studie aus einem Teil des entnommenen Blutes eine individuelle Erfolgskontrolle (Antikörper-Titer) durchgeführt wird.

Sollten Sie innerhalb von einem Jahr nach der Impfung an einem Infekt der oberen Luftwege erkranken, melden Sie sich bitte telefonisch in der Neurologischen Poliklinik der Universität Würzburg (Tel.: 0931-2015768), um Termine für die weiteren Blutentnahmen (2, 4 und 16 Wochen nach Beginn des Infektes) mit einem der Studienärzte zu vereinbaren.

Risiken und Komplikationen:

Im Allgemeinen ist die Impfung gut verträglich. Ernste Nebenwirkungen sind bei Beachtung der Kontraindikationen für eine Gripeschutzimpfung nicht zu erwarten. Sie wird von den Gesundheitsbehörden für ältere Menschen und solche empfohlen, die aufgrund prädisponierender Vorerkrankungen oder aufgrund hoher Sozialkontakte besonders gefährdet sind. Wie eingangs erwähnt, ist nach neueren Untersuchungen kein negativer Einfluß der Gripeschutzimpfung auf den Verlauf der multiplen Sklerose bekannt.

Gelegentlich kann es an der Impfstelle zu örtlich begrenzten Beschwerden kommen, z. B. Hautrötung, Juckreiz oder leichte Verhärtung. Selten tritt eine geringfügige Temperaturerhöhung oder Müdigkeit auf.

Personen, bei denen eine Überempfindlichkeit gegen Hühnereiweiß oder Antibiotika bekannt ist, können an der Studie nicht teilnehmen, da bei ihnen die Gefahr einer allergischen Reaktion besteht.

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können Ihre Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit zurückziehen und aus der Studie ausscheiden, ohne daß Ihnen hieraus ein Nachteil für die weitere Behandlung entsteht.

Einverständniserklärung:

Ich bin ausführlich über die Durchführung und Ziele dieser Studie aufgeklärt worden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich über den Ablauf der Studie und die damit verbundenen Blutentnahmen im Rahmen der Gripeschutzimpfung sowie zum Zeitpunkt von Infektionen zu informieren. Mit der wissenschaftlichen Auswertung der im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten in anonymisierter Form bin ich einverstanden. Meine Fragen wurden ausführlich und zufriedenstellend beantwortet. Über die seltenen, aber möglichen Nebenwirkungen bin ich eingehend aufgeklärt worden. Zur Vermeidung solcher Zwischenfälle, bestätige ich, daß bei mir keine Allergie gegen Hühnereiweiß oder Antibiotika bekannt ist. Sollte ein Zwischenfall während oder kurz nach der Impfung auftreten, bin ich mit den zur Abwendung gesundheitlicher Schäden notwendigen Maßnahmen einverstanden.

Mir ist bekannt, daß ich jederzeit ohne Angabe von Gründen meine Teilnahme an dieser Studie widerrufen kann, ohne daß mir daraus Nachteile in meiner weiteren Behandlung entstehen.

Meine Fragen wurden vollständig und für mich verständlich beantwortet, es bestehen keine weiteren Fragen mehr.

Hiermit erkläre ich,, geb. am
meine Zustimmung zur Teilnahme an oben beschriebener Studie.

Würzburg, den

.....
Unterschrift der Patientin/des Patienten

.....
Unterschrift der Ärztin/des Arztes

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des 3. Graduiertenkollegs „Infektiologie“ der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die gemeinnützige Hertiestiftung, sowie durch Mittel der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG) gefördert

Herrn Prof. Dr. Peter Rieckmann danke ich für die freundliche und ausdauernde Betreuung dieser Arbeit, seine stete Präsenz und Diskussionswilligkeit, sowie die nötigen Freiheiten in Planung und Durchführung

Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen sei für die ehrenwerte Übernahme der Zweitbegutachtung herzlich gedankt, da ich mir kaum einen fachkundigeren Repräsentanten der Neurovirologie für das Thema dieser Arbeit vorstellen kann

Herrn Prof. Dr. Klaus Viktor Toyka für die gute Ausbildung in seiner Klinik, einschließlich der konsequenten Förderung meiner wissenschaftlichen Entwicklung

Herrn PD Dr. Stefan Niewiesk danke ich für seine intensive Betreuung des virologischen Teils der Arbeit, weiter für methodische Hilfestellungen und wertvolle Anregungen zur ViMS-Studie, sowie für die Bereitstellung des Influenzavirusstamms A/PR/8/34

Heike Menzel und Gabi Köllner sei für die unschätzbare Hilfe und ihr Verständnis bei meinen ersten Schritten der Zellkultivierung gedankt

Dr. Frank Straube danke ich für seine uneingeschränkt hilfreiche Diskussionsbereitschaft zu immunologischen Feinheiten und FACS

Bei Mio Lalic-Mülthaler bedanke ich mich für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und wertvollen Diskussionen

Dr. Oliver Grauer schätze ich für den Austausch neuroimmunologischer Zusammenhänge und wegen seiner tiefgehenden Kenntnisse über Dendritische Zellen

PD Dr. Stefan Jung gilt mein Dank für langjährige und beständige Diskussionsbereitschaft und methodische Unterstützung

Dr. Benedikt Weißbrich danke ich für seine offenen Diskussionen und Ermunterungen, sowie zahlreiche virologische Untersuchungen (PCR, Serologie) und die Überlassung des HHV-6B-stocks

Dr. Franz Weilbach sei für zahlreiche Anregungen und Aufmunterungen gedankt

Dr. Andreas Weishaupt und Susi Hellmig danke ich für die Unterstützung bei der Biochemie (Proteinaufreinigung, SDS-PAGE, Westernblot, Proteinbestimmung) und die Überlassung des rekombinanten MOG

Danksagung

Dr. Niels Kruse lehrte mich wesentliche Details der Molekularbiologie und Zytokinfor-
schung, insbesondere die Technik der Taqman-RT-PCR

Prof. Dr. Walter Sebald sei gedankt für die großzügige Bereitstellung seines rekombi-
nanten humanen IL2, ohne das nichts gelaufen wäre

Ralph Nanan sei für Tips und Hilfen bei der Etablierung des ELISPOTs gedankt

Dr. Boris Kallmann bin ich für Tips und Tricks der Zellkultur und des ELISA dankbar

Prof. Dr. Martin Pette danke ich für die Inspiration und seine bereitwillig offenbarten
Erfahrungen zur T-Zellkultur

Prof. Dr. Paul Viktor Lehmann danke ich für Diskussionen über ELISPOT

Prof. Dr. Ralf Gold sei für das Gastrecht in seinem Labor gedankt

Dr. Werner Fries und Dr. Annette Kolb-Mäurer danke ich für Ihre Fähigkeiten bei der
Generierung humaner Dendritischer Zellen

Dr. Axel Greiner danke ich für die Methodik der B-Zell-Generierung

Dr. Ursula Merschorf (geb. Balling) bin ich für Diskussionen zur T-Zellkultur dankbar

Dr. C. G. Haase bin ich für Gespräche über MOG dankbar

Dr. Gisela Wohlleben sei gedankt für Neuerungen bei der Leukapherese

bei Michaela Götzelmann bedanke ich mich für die Hilfe bei der HHV-6- Vermehrung

PD Dr. Christian Jassoy und Inge bin ich für die Überlassung der EBV-Zellen und die
Hilfe bei EBV-Transformationen dankbar

Dr. Christian Söder danke ich für seine spontane Hilfe bei der HPLC

zahlreichen anderen, deren Hilfe nicht in die Arbeit eingeflossen ist, doch insgesamt für
das Verständnis der Immunologie unabhkömmlich war, sei ebenfalls gedankt

bei vielen freiwilligen Spendern bedanke ich mich herzlich, insbesondere bei denen, die
für die Etablierung der Zellkulturen in fast 2 wöchigem Abstand, manchmal über meh-
rere Monate diese Arbeit existentiell unterstützt haben

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Moriabadi
Vorname	Neville Fairdoon
Geburtsdatum	29. März 1970
Geburtsort	Bad Kissingen
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnung	Langgasse 3, 97247 Eisenheim

Schulbildung

1976-1980	Grundschule Passau-Neustift
1980-1989	Adalbert-Stifter-Gymnasium Passau

Berufsausbildung

1990-1992	Medizinstudium Erlangen-Nürnberg
1992-1995	Klinisches Studium in Würzburg
1995-1996	Praktisches Jahr: Missionsärztliche Klinik, Würzburg Institute of Neurology, Queen Square, London
1/97-5/00	Graduiertenkolleg „Infektiologie“, Promotion und Arzt im Praktikum, Neurologische Universitätsklinik, Würzburg
8/00-8/02	Assistenzarzt, Neurologische Universitätsklinik, Regensburg (Schlaganfall-, Überwachungsstation, Onkologie, Poliklinik)
8/02-heute	Assistenzarzt, Bezirksklinikum für Psychiatrie, Werneck

Nebentätigkeiten

1992-1995	Organisation von Vortragsreihen und interdisziplinären Seminaren zur Ethik in der Medizin (SEM)
11/95	Organisation eines überregionalen Medizinethik- Kongresses zum Thema „Der medizinische Blick auf Behinderung“

Untereisenheim, 12.12.2002