

DISSERTATION

**Antikörper gegen native Myelinproteine und virale
Erreger bei Erstmanifestation entzündlich-
demyelinisierender Erkrankungen des Zentralen
Nervensystems im Kindesalter**

Rebecca Constance Selter

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Neurologische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer)

**Antikörper gegen native Myelinproteine und virale
Erreger bei Erstmanifestation entzündlich-
demyelinisierender Erkrankungen des Zentralen
Nervensystems im Kindesalter**

Rebecca Constance Selter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer
2. apl. Prof. Dr. B. Haslinger
3. Univ.-Prof. Dr. T. Misgeld

Die Dissertation wurde am 31.10.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012
angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	3
2	EINLEITUNG	4
2.1	Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen	4
2.1.1	<i>Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein</i>	7
2.1.2	<i>Komplementsystem</i>	8
2.1.3	<i>Natürliche Killerzellen</i>	9
2.1.4	<i>Virusinfektionen</i>	10
2.2	Entzündlich-demyelinisierende Erkrankungen des Zentralen Nervensystems im Kindesalter	13
2.2.1	<i>ADEM</i>	13
2.2.2	<i>Klinisch isoliertes Syndrom und Multiple Sklerose</i>	14
2.2.3	<i>Diagnostische Kriterien</i>	15
3	FRAGESTELLUNG	18
4	MATERIAL UND METHODEN	22
4.1	Geräte	22
4.2	Antikörper, Puffer, Medien, Kits	22
4.3	Patienten und Kontrollen	24
4.4	Detektion von Antikörpern gegen nMOG, nPLP und nAQP4	26
4.4.1	<i>Durchflusszytometrische Detektion und Quantifizierung der Antikörperantwort in Serum und Liquor</i>	26
4.4.2	<i>Nachweis intrathekaler Anti-nMOG IgG-Synthese</i>	29
4.4.3	<i>Zellkulturbedingungen</i>	29
4.5	In vitro Zytotoxizitäts-Assays	30
4.5.1	<i>Isolierung des IgG aus Patientenserum</i>	30
4.5.2	<i>Isolierung von PBMCs</i>	30
4.5.3	<i>Isolierung von NK-Zellen</i>	31
4.5.4	<i>Komplement-vermittelte Zytotoxizität</i>	32
4.5.5	<i>NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität</i>	32
4.6	Nachweis von Antikörpern gegen virale Proteine	33
4.7	Statistische Auswertung und EDV-Programme	34

5	ERGEBNISSE	35
5.1	Antikörper gegen native ZNS-Proteine	35
5.1.1	<i>Antikörper gegen nMOG, nPLP und nAQP4 im Serum</i>	35
5.1.1.1	<i>IgG-Antikörper gegen nMOG, nPLP und nAQP4</i>	35
5.1.1.2	<i>IgM-Antikörper gegen nMOG</i>	39
5.1.2	<i>IgG-Antikörper gegen nMOG im Liquor</i>	41
5.2	Zytotoxisches Potenzial der Antikörper gegen natives MOG <i>in vitro</i>	42
5.2.1	<i>Komplement-vermittelte Zytotoxizität</i>	42
5.2.2	<i>NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität</i>	44
5.3	Antikörper gegen Herpesviren	46
5.3.1	<i>EBV</i>	46
5.3.2	<i>HHV-6</i>	49
5.3.3	<i>HCMV</i>	51
6	DISKUSSION	54
6.1	Serum-IgG- und IgM-Antikörper gegen natives MOG	54
6.2	Intrathekale IgG-Synthese gegen natives MOG	59
6.3	Zytotoxizität des nMOG-IgG <i>in vitro</i>	60
6.4	Antikörper gegen EBV, HHV-6 und HCMV	62
7	ZUSAMMENFASSUNG	67
8	LITERATURVERZEICHNIS	69
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	83

1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

8-18C5	Monoklonaler Maus-IgG-Antikörper gegen nMOG
Abb.	Abbildung
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
CIS	Klinisch Isoliertes Syndrom
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflusszytometer)
h	Stunde(n)
HCMV	Humanes Cytomegalie-Virus (HHV-5)
HHV-6	Humanes Herpesvirus-6
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
LN18-AQP4	nAQP4-exprimierende LN18 Glioblastom-Zelllinie
LN18-CTR	LN18 Glioblastom-Zelllinie
LN18-MOG	nMOG-exprimierende LN18 Glioblastom-Zelllinie
LN18-PLP	nPLP-exprimierende LN18 Glioblastom-Zelllinie
MACS	Magnetic Activated Cell Sorter
MFI	Median Fluorescence Intensity (Median der Fluoreszenzintensität)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MS	Multiple Sklerose
nAQP4	Natives Aquaporin-4
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nMOG	Natives Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
nPLP	Natives Proteolipid Protein
O-10	Monoklonaler Maus-IgM-Antikörper gegen nPLP
OKBs	Oligoklonale Banden
PBMCs	Periphere Mononukleäre Blutzellen
Tab.	Tabelle
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter

2 EINLEITUNG

Während die Multiple Sklerose (MS) im Erwachsenenalter zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen zählt, sind entzündlich-demyelinisierende Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) bei Kindern selten. Über die pathogenetischen Mechanismen, die der Akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) und dem Klinisch isolierten Syndrom (CIS) beziehungsweise der MS im Kindesalter zugrunde liegen, ist wenig bekannt.

2.1 Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Insbesondere die histopathologischen Charakteristika der MS-Läsionen sprechen für eine Autoimmunpathogenese der Erkrankung. Diese sind gekennzeichnet durch entzündliche Infiltrate, Demyelinisierung, axonale Schädigung, Astrogliose und Remyelinisierung. Das Entzündungszellinfiltrat enthält aktivierte T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, aktivierte Mikroglia sowie Makrophagen (Hauser et al. 1986, Lucchinetti et al. 2000). Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung sowohl des humoralen als auch des zellulären Arms des Immunsystems an der Pathogenese der MS. Während CD4⁺ T-Zellen vor allem perivaskulär und im Bereich der Meningen überwiegen, finden sich CD8⁺ T-Zellen insbesondere im Parenchym der MS-Läsionen (Gay et al. 1997). Daneben können in Demyelinisierungsarealen Komplementproteine, Immunglobuline, proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Matrixmetalloproteinasen sowie diverse Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden (O'Connor et al. 2001, Gay et al. 1997, Lucchinetti et al. 2000, Barnett et al. 2004, Breij et al. 2008).

Man geht davon aus, dass in der Pathogenese der Multiplen Sklerose sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Beispielsweise im Rahmen von Infektionen (zur molekularen Mimikry siehe Kap. 2.1.4) oder in Folge einer Freisetzung von ZNS-Proteinen kommt es vermutlich bei genetisch suszeptiblen Individuen zu einer verstärkten Aktivierung myelinreaktiver T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen. Migrieren die aktivierten autoreaktiven Lymphozyten ins ZNS und wird ihnen dort das entsprechende Autoantigen an MHC-Moleküle gebunden präsentiert, kommt es zur T-Zell-Reaktivierung sowie möglicherweise zur T-Zell-abhängigen Aktivierung von B-Lymphozyten und Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (Archelos et al. 2000). Darüber hinaus kann es im entzündlichen Milieu der MS-Läsionen zu einer Bystander-Aktivierung weiterer B-Zellen kommen (O'Connor et al. 2001), die

möglicherweise ebenfalls mit Myelinkomponenten kreuzreagieren (Archelos et al. 2000). Auch autoreaktive T-Zellen, die normalerweise aufgrund schwacher Bindung an MHC/Peptid-Komplexe nicht aktiviert werden, können in einem immunstimulatorischen Kontext durch ihr spezifisches Antigen oder molekulare Mimikry aktiviert werden (Starr et al. 2003). CD4⁺ T-Zellen, die an MHC II-Moleküle gebundene Peptide auf Makrophagen und aktivierter Mikroglia erkennen und so reaktiviert werden können, sezernieren proinflammatorische Zytokine und Mediatoren, die Makrophagen anlocken. CD8⁺ T-Zellen können Zielzellen - im Zentralen Nervensystem Neurone oder Oligodendrozyten - direkt lysieren, wenn diese das spezifische Antigen gemeinsam mit MHC I an der Oberfläche exprimieren (Neumann et al. 2002). Aktivierte Makrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine, die ebenfalls zur Schädigung der umgebenden Zellen und Gewebe beitragen können. Eine ZNS-Gewebeschädigung führt wiederum zur Aktivierung von Mikroglia, die in der Folge vermehrt MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle exprimiert und durch Freisetzung von Zyto- und Chemokinen die Migration weiterer Monozyten und Lymphozyten in die Läsion fördert. Durch die Gewebeschädigung kann es zur Freisetzung weiterer Myelinkomponenten kommen, weitere Autoantigene werden möglicherweise potenziell autoreaktiven T-Zellen präsentiert und die Entzündungsreaktion so aufrechterhalten (Hemmer et al. 2002). Eine initiale humorale oder zelluläre Immunantwort gegen ein bestimmtes Epitop könnte sich zudem auf weitere Epitope im gleichen oder einem naheliegenden Molekül ausweiten, was als "epitope spreading" bezeichnet wird (Tuohy et al. 1997).

B-Zellen finden sich im Bereich der MS-Läsionen perivaskulär und im Bereich der Meningen und sezernieren Immunglobuline, die möglicherweise an Antigene auf Neuronen oder Oligodendrozyten binden (Storch et al. 1998a, Uccelli et al. 2005). Insbesondere an Myelinfragmente gebundene Antikörper gegen Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) wurden in MS-Läsionen nachgewiesen (Genain et al. 1999). Die Ablagerung von Antikörpern im Bereich des Myelins könnte zu Komplementaktivierung und nachfolgender komplementvermittelter Zerstörung der Oligodendrozyten, also zur Demyelinisierung führen. Aktivierte Komplementkomponenten fördern zudem die Migration von Lymphozyten und Makrophagen in das Entzündungsgebiet mit der Folge der Freisetzung von O₂-Radikalen, proinflammatorischen Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen. Neben der Initiierung der Komplement-Kaskade können an Zielstrukturen gebundene Antikörper eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität oder über Opsonierung die

Antikörper-vermittelte Phagozytose der Zielzelle durch Makrophagen initiieren (siehe Kap. 2.1.2. und 2.1.3). Die auf die akute entzündliche Phase folgende Gliose wird durch Astrozyten vermittelt. Von einer partiellen Remyelinisierung der demyelinisierten Axone durch Oligodendrozyten ist auszugehen (Adams et al. 1989, Ozawa et al. 1994, Lassmann et al. 1997, Brück et al. 2003).

Zusammenfassend wird in der Immunpathogenese der Multiplen Sklerose vermutlich auf Grundlage einer genetischen Prädisposition im Rahmen beispielsweise einer Infektion eine Immunantwort initiiert, die mit körpereigenen Proteinen kreuzreagiert. Aktivierte autoreaktive T- und B-Lymphozyten gelangen ins ZNS, treffen dort auf ihr Autoantigen, das auf Oligodendrozyten oder Neuronen exprimiert wird und führen nach ihrer Reaktivierung durch diverse Effektorfunktionen zur Schädigung dieser Zellen. Das entzündliche Milieu wird dabei durch Komponenten des angeborenen Immunsystems verstärkt und aufrechterhalten.

Die Akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) ist histopathologisch gekennzeichnet durch Infiltration von Makrophagen und T-Zellen insbesondere im Bereich der Venolen, in frühen Stadien enthält das Infiltrat auch Granulozyten. Perivenös finden sich Zeichen der Demyelinisierung, in späten Stadien sind Astrozytenproliferation und Gliose im Bereich der Läsionen möglich (Menge et al. 2005, Hu et al. 2009, Young et al. 2010).

Die Pathogenese der ADEM ist bis heute nicht sicher geklärt. Der enge zeitliche Zusammenhang mit Infektionen lässt jedoch vermuten, dass der Demyelinisierung am ehesten eine postinfektiöse Immunreaktion zugrunde liegt. Man geht davon aus, dass ein neurotroper viraler oder ein bakterieller Erreger durch eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke den Übertritt von ZNS-Autoantigenen ins Blut verursacht. Molekulare Mimikry wird ähnlich wie bei MS als möglicher pathogenetischer Mechanismus in der Entstehung der entzündlichen Läsionen angesehen. Antigenpräsentierende Zellen könnten auch im Rahmen einer peripheren Infektion in den lymphatischen Organen zu einer Kreuzaktivierung Myelin-reaktiver T- und B- Lymphozyten führen, mit der Folge einer Entzündungsreaktion gegen Oligodendrozyten- oder neuronale Proteine, wenn die Lymphozyten im ZNS auf das entsprechende Antigen treffen und reaktiviert werden (Menge et al. 2005, Tenenbaum et al. 2007). In der Folge dieser Entzündung könnten wiederum weitere Myelinproteine aus dem ZNS freigesetzt werden und in der Peripherie autoreaktive T-Zellen aktivieren, die den Entzündungsprozess aufrechterhalten und ausweiten.

Ob der Multiplen Sklerose und der Akuten disseminierten Enzephalomyelitis grundsätzlich unterschiedliche pathogenetische Prozesse zugrunde liegen oder sie ein Kontinuum darstellen, wird kontrovers diskutiert.

2.1.1 Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein

Oligodendrozyten sind verantwortlich für die Synthese und den Erhalt des Myelins im Zentralen Nervensystem. Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) ist ein Bestandteil der Oligodendrozytenmembran, der mittels des monoklonalen Maus-Antikörpers 8-18C5 identifiziert werden konnte. Es kommt im Gegensatz zu anderen Myelinproteinen ausschließlich im Zentralen Nervensystem vor. MOG macht nur etwa 0,01 bis 0,05% der Myelinproteine der Oligodendrozytenmembran aus und ist an der Oberfläche der Myelinscheide lokalisiert (Lington et al. 1984). Aufgrund seiner Exposition auf der Oberfläche des Myelins gilt es als ein mögliches Zielantigen demyelinisierender Erkrankungen des ZNS. Im Tiermodell der Experimentellen Autoimmunenzenzephalomyelitis (EAE) lässt sich sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort gegenüber MOG induzieren. Wird in Meerschweinchen durch aktive Immunisierung mit ZNS-Gewebshomogenat in Freundschem Adjuvans (CFA) eine EAE induziert und Serum der erkrankten Tiere in den Subarachnoidalraum gesunder Ratten infundiert, entwickeln diese Tiere Demyelinisierungsherde, deren Ausmaß mit dem Anti-MOG-Antikörpertiter korreliert, was für eine Rolle MOG-spezifischer Antikörper in der Pathogenese spricht (Lington et al. 1987). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei durch Transfer von MBP (Basisches Myelin Protein) -spezifischen T-Zellen induzierter EAE der Ratte die Injektion des monoklonalen Anti-MOG-Antikörpers 8-18C5 bei Krankheitsbeginn sowohl Krankheitsausmaß als auch -dauer erhöht (Lington et al. 1988). EAE-Induktion durch aktive Immunisierung mit MBP in CFA und nachfolgende Injektion von 8-18C5 führt ebenfalls zu schnellem Krankheitsprogress, hyperakuter Entzündung der weißen Substanz und ausgedehnter Demyelinisierung (Schluesener et al. 1987). Ein weiteres Modell zeigte, dass nach Immunisierung mit dem MOG-Peptid aa1-125 die enzephalitogene T-Zell-Antwort gegen andere MOG-Epitope gerichtet ist als die Antikörperantwort und dass aktive Immunisierung mit den T-enzephalitogenen Epitopen keine Demyelinisierung verursacht. Durch zusätzlichen adoptiven Transfer mit dem MOG-spezifischen Antikörper 8-18C5 hingegen entstehen Demyelinisierungsherde (Adelmann et al. 1995, Storch et al. 1998b). Im Modell der EAE ist also davon auszugehen, dass die

Entzündungsreaktion durch Immunisierung mit MBP oder Transfer enzephalitogener T-Zellen, die Demyelinisierung durch MOG-spezifische Antikörper verursacht wird.

In histopathologischen Studien konnten an zerfallende Myelinsegmente gebundene Antikörper gegen MOG in MS-Läsionen nachgewiesen werden, was für ihre Rolle auch in der Pathogenese der Demyelinisierung bei MS spricht (Genain et al. 1999, Storch et al. 1998a).

Erste Untersuchungen zur T- und B-Zell-Antwort gegenüber MOG bei MS Patienten zeigten eine höhere Frequenz MOG-spezifischer T- und B-Zellen sowie höhere Anti-MOG-IgG-Antikörpertiter bei Patienten gegenüber Kontrollen im Serum und Liquor (Sun et al. 1991, Xiao et al. 1991, Kerlero De Rosbo et al. 1993). Bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen wurden daraufhin jedoch ebenfalls Antikörper gegen MOG nachgewiesen, wenn auch transient (Reindl et al. 1999, Lindert et al. 1999). In einigen Kohorten wurde ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Anti-MOG-IgM-Antikörpertiters und dem Risiko der Entwicklung von MS beziehungsweise einer kürzeren Zeitspanne bis zum zweiten Schub beschrieben (Berger et al. 2003, Rauer et al. 2006, Tomassini et al. 2007), eine andere prospektive Studie wiederum zeigte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko durch das Vorhandensein von Anti-MOG-IgG Antikörpern (Wang et al. 2008). Andere Untersuchungen konnten zwar zeigen, dass der Antikörpertiter gegen MOG während eines Klinisch isolierten Syndroms (CIS) mit der Läsionslast im MRT korreliert, eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Entwicklung von MS nach einem CIS jedoch nicht bestätigen (Kuhle et al. 2007a, Kuhle et al. 2007b). Während einige Studien eine Assoziation zwischen Antikörperstatus und klinischem Verlaufstyp beschreiben konnten (Lalive et al. 2006, Zhou et al. 2006), zeigten andere Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen Anti-MOG-IgM bzw. -IgG und klinischem Schweregrad oder Verlauf (Pittock et al. 2007).

Die Heterogenität der Studien macht deutlich, dass der diagnostische und prädiktive Wert von Anti-MOG-Antikörpern bei Multipler Sklerose und Klinisch isoliertem Syndrom bisher unzureichend geklärt ist. Allerdings bestanden in den Assays zur Messung von Anti-MOG-Antikörpern erhebliche Unterschiede, die zumindest einen Teil der Diskrepanz erklären.

2.1.2 Komplementsystem

Das Komplementsystem als Teil der sogenannten angeborenen Immunabwehr besteht aus zahlreichen Plasmaproteinen, die durch Proteolyse aktiviert werden. Zu Beginn des

sogenannten klassischen Aktivierungsweges bindet die erste Komponente des Komplementsystems, das Protein C1q, an einen Antigen-Antikörper-Komplex auf einer Zelloberfläche. Nach kaskadenartiger Aktivierung weiterer Komplementproteine folgt als gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Reaktionswege die Aktivierung der terminalen Komplementkomponenten C5b, C6, C7, C8, C9. Diese bilden den Membranangreifenden Komplex (MAC), der zur Lyse der Zielzelle und somit zur Komplement-vermittelten Zytotoxizität (Complement dependent cytotoxicity, CDC) führt (Ingram et al. 2009). Weitere mögliche Folgen der Komplementbindung und -aktivierung sind die Opsonierung des Pathogens mit Anlockung von Makrophagen sowie die chemotaktische Wirkung auf Lymphozyten.

Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen wurden in den vergangenen Jahren wiederholt die Komplementproteine C3, C4, C6, C7, C8, C9, C9neo sowie Immunglobulin-Ablagerungen in Arealen aktiver Demyelinisierung in MS-Plaques identifiziert. Immunglobuline und C9neo, das die Aktivierung des terminalen lytischen Membranangreifenden Komplexes anzeigt, fanden sich insbesondere im Randbereich der Plaques (Storch et al. 1998a, Barnett et al. 2004). Obwohl in einer nachfolgenden Studie nur geringe Unterschiede zwischen MS Patienten und anderen neurologischen Erkrankungen hinsichtlich der Verteilung von Ig und den Komplementproteinen C3d und C9neo festgestellt werden konnten (Barnett et al. 2009), könnte Komplement-vermittelte Zytotoxizität an der Pathogenese des Oligodendrozytenverlustes in aktiven MS-Läsionen beteiligt sein.

2.1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) machen 10-15% der Lymphozyten im peripheren Blut aus. Insbesondere die frühe Abwehr viraler Infektionen ist eine zentrale Aufgabe der NK-Zelle (Biron et al. 1999, Morse et al. 2001). NK-Zellen sind in der Lage, über ihren Fc γ RIII-Rezeptor an IgG1- und IgG3-Antigen-Komplexe auf Zelloberflächen zu binden und auf diesem Weg eine Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) zu initiieren. Die Zytotoxizität der NK-Zelle wird vermittelt über die Freisetzung zytoplasmatischer Granula, die Perforin und Granzyme enthalten und so zur Porenbildung in der Zellmembran der Zielzelle und zum Zelltod führen (Biron et al. 1999). Die NK-Zelle ist in der Lage, diese Effektorfunktion ohne Stimulation durch Zytokine oder spezifische Antigene auszuführen, benötigt also zur Aktivierung keine vorangegangene Sensibilisierung (Morse et al. 2001). Aktivierte NK-Zellen sezernieren unter anderem

proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ (Morandi et al. 2008). IFN- γ führt zur Aktivierung von Makrophagen, aktivierte Makrophagen wiederum sezernieren IFN- α und IL-12 und führen so zur verstärkten NK-Zell-Aktivierung (Romagnani 1992). Die Proliferation, die zytotoxische Aktivität sowie die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen können durch die Gegenwart von IFN- α oder - β sowie von IL-12, die im Rahmen viraler Infekte vermehrt gebildet werden, um ein Vielfaches gesteigert werden (Morse et al. 2001, Biron et al. 1999).

Die Rolle der Natürlichen Killerzellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose ist unklar. NK-Zellen könnten im entzündlichen Umfeld der MS-Läsionen aktiviert und in Form Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) in den Demyelinisierungsprozess involviert werden (Morse et al. 2001, Morandi et al. 2008). Bei Patienten mit schubförmig-remittierend verlaufender MS zeigte sich eine Korrelation zwischen NK-Zell-Aktivität und Zunahme der Läsionslast im MRT innerhalb von zwei Jahren sowie eine Reduktion der NK-Zell-Aktivität im peripheren Blut während der Schübe, eventuell bedingt durch Sequestration der NK-Zellen ins ZNS (Kastrukoff et al. 1998). Fc γ R-Defizienz wirkt im Mausmodell der MOG-induzierten EAE protektiv, möglicherweise durch ineffizientes ADCC (Abdul-Majid et al. 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass NK-Zell-depletierte Mäuse eine mildere Form der EAE entwickeln (Winkler-Pickett et al. 2008).

2.1.4 Virusinfektionen

Infektionen durch neuro- oder lymphotrope Viren wurden wiederholt mit der Entstehung von Multipler Sklerose in Zusammenhang gebracht. Ein möglicher pathogenetischer Mechanismus beruht auf der Aktivierung autoreaktiver Zellen durch Kreuzreaktivitäten zwischen Selbst- und Fremd-Antigenen, der sogenannten molekularen Mimikry. T-Zellen, die Autoantigene mit mittlerer Affinität binden, werden im Thymus positiv selektiert und gelangen in die Peripherie. Werden diese potenziell autoreaktiven T-Zellen nun durch ein kreuzreagierendes virales Antigen aktiviert, können sie im ZNS bei Reaktivierung durch das Autoantigen eine entzündliche Gewebeschädigung induzieren (Fujinami et al. 1985, O'Connor et al. 2001, Sospedra et al. 2005).

Ursprünglich ging man davon aus, dass nur Peptide mit Aminosäure-Sequenzhomologien zur Kreuzaktivierung von T- und B-Zellen führen können. Untersuchungen zur Antigenerkennung myelinspezifischer T-Zellen zeigten jedoch, dass autoreaktive T-Zellen auch durch virale und bakterielle Peptide aktiviert werden

können, die keine mit dem Autoantigen übereinstimmenden Sequenzen aufweisen. Sowohl MHC II-Molekül als auch T-Zell-Rezeptor besitzen nur eingeschränkte Spezifität hinsichtlich der Peptidbindung, so dass die strukturellen Bedingungen für MHC-Molekül-Bindung und Erkennung durch die T-Zelle nicht nur durch ein einziges Peptid erfüllt werden können (Wucherpfennig et al. 1995, Hemmer et al. 1997, Vergelli et al. 1997, Hausmann et al. 1997, Wucherpfennig 2001, Zhou et al. 2004).

Darüber hinaus können virale Infektionen durch Aktivierung zytotoxischer T-Zellen oder eine Gewebeschädigung durch das Virus selbst die Freisetzung von Autoantigenen verursachen. Diese Autoantigene können im Verlauf durch Antigenpräsentierende Zellen prozessiert und präsentiert werden und so ebenfalls autoreaktive T-Lymphozyten aktivieren (Sospedra et al. 2005, Hemmer et al. 2006).

Im entzündlichen Milieu des durch eine Infektion geschädigten Gewebes mit aktivierten T-Zellen und proinflammatorischen Zytokinen können zudem lokale autoreaktive T-Zellen unspezifisch aktiviert und über diese Bystander-Aktivierung in den Entzündungsprozess involviert werden (Aichele et al. 1996, Wucherpfennig 2001).

Durch Kreuzaktivierung autoreaktiver B-Lymphozyten könnte molekulare Mimikry entsprechend zur Entwicklung von Autoantikörpern führen (Archelos et al. 2000). Die Immunisierung von Kaninchen mit dem Hepatitis-Viruspeptid HBVP, das eine Sequenzhomologie zu MBP aufweist, führt zur Entwicklung von Antikörpern gegen MBP und von mononukleären Zellen, die auf MBP-Exposition hin proliferieren sowie teilweise zu einer EAE-ähnlichen Histologie (Fujinami et al. 1985).

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass bestimmte Viren, insbesondere der Herpesgruppe, in die Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen involviert sein könnten. In diesem Zusammenhang wurde wiederholt eine mögliche Rolle der Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4) diskutiert, wobei die Studien kein einheitliches Bild ergeben. Über 90% der Bevölkerung ist mit EBV, einem lymphotropen γ -Herpesvirus, infiziert. Es persistiert nach der Primärinfektion lebenslang in B-Zellen (Rickinson et al. 1997). Auch EBV-antigenspezifische T-Zellen können noch Jahre nach der Primärinfektion nachgewiesen werden. In größeren Metaanalysen konnte eine Assoziation zwischen der latenten Infektion mit EBV und dem Risiko einer Erkrankung an MS gezeigt werden. Nahezu 100% der MS-Patienten sind EBV-positiv und zeigen im Vergleich zu Kontrollen höhere Titer gegenüber den Proteinen VCA und EBNA-1, die von latent infizierten B-Zellen exprimiert werden. Bei MS Patienten findet sich außerdem häufiger eine späte Primärinfektion, die sich als Mononukleose manifestiert (Hernan et al. 2001). Weniger als 1% der MS-Patienten sind seronegativ, hingegen etwa 5-10% der gesunden

Bevölkerung (Ascherio et al. 2000). In prospektiven Studien zeigte sich jedoch, dass gegenüber Kontrollen signifikant erhöhte Serum-IgG-Antikörpertiter gegen EBNA-1 schon bis zu 20 Jahre vor Erkrankungsbeginn der MS vorliegen (Ascherio et al. 2001, DeLorenze et al. 2006), was für eine Rolle der EBV-Infektion in einer frühen Phase der Pathogenese der MS spricht (Sundström et al. 2004, Levin et al. 2005, Wang et al. 2008). Zudem lassen sich im Liquor von MS Patienten Antikörper gegen EBV-Proteine, wie EBNA-1 und BRRF2 nachweisen (Cepok et al. 2005). In einer post mortem Untersuchung von Hirngewebe von MS Patienten wurden EBV-infizierte B-Zellen und Plasmazellen in Meningen und perivaskulären Arealen im Bereich der Läsionen der weißen Substanz in nahezu 100% der Fälle beschrieben (Serafini et al. 2007), diese Beobachtungen konnten in der Folge jedoch nicht bestätigt werden (Willis et al. 2009, Sargsyan et al. 2010). Neben der verstärkten humoralen Immunantwort gegenüber EBV wurden erhöhte Prävalenz sowie gesteigerte Proliferationskapazität und IFN- γ Produktion EBNA-1-spezifischer CD4+ Gedächtnis T-Zellen bei MS Patienten beschrieben (Lünemann et al. 2006). Eine Studie zeigte eine Assoziation zwischen EBNA-1 IgG-Antikörpertiter und Krankheitsaktivität im MRT bei MS Patienten (Farrell et al. 2009). Auch bei Kindern mit MS wurden gegenüber Kontrollen signifikant erhöhte IgG-Antikörperprävalenzen und -titer gegen EBNA-1 (83-87% vs. 42-64%) sowie gehäuftes Vorkommen von Antikörpern gegen EBV-VCA (91-98% vs. 64-72%) beschrieben (Alotaibi et al. 2004, Pohl et al. 2006, Banwell et al. 2007, Lünemann et al. 2008).

Das Humane Herpesvirus-6 (HHV-6), ein neuro- und lymphotropes β -Herpesvirus, das nach der Primärinfektion in CD4+ T-Zellen persistiert, wurde wiederholt mit der Entstehung von MS in Verbindung gebracht. Über 70-100% der Bevölkerung sind nach dem zweiten Lebensjahr seropositiv (Akhyani et al. 2000, Alvarez-Lafuente et al. 2004). Wichtige Hinweise auf eine Assoziation zwischen HHV-6 und Multipler Sklerose ergaben sich durch den immunhistochemischen Nachweis viraler Proteine in Oligodendrozyten in MS-Läsionen (Challoner et al. 1995). Eine Untersuchung der Anti-HHV-6 IgG-Antikörper im Serum von MS Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen zeigte eine signifikant höhere Seropositivitätsrate bei MS Patienten (Gutierrez et al. 2002). Zudem wurden HHV-6-mRNA und -DNA als Zeichen aktiver Virusreplikation im Blut beziehungsweise Serum von 16% der Patienten mit RR-MS, nicht jedoch von gesunden Kontrollen nachgewiesen. Dabei zeigte sich außerdem bei Patienten mit aktiver Infektion eine signifikant höhere Viruslast während der Schübe (Alvarez-Lafuente et al. 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass

über 50% der T-Zellen von MS Patienten, die die MBP-Sequenz 96-102 erkennen, durch eine homologe HHV-6 Peptidsequenz aktiviert werden können; bei diesen Patienten wurden auch erhöhte IgG-Antikörpertiter gegenüber MBP und HHV-6 nachgewiesen (Tejada-Simon et al. 2003). Im Liquor einer Subgruppe von MS-Patienten konnte eine intrathekale IgG-Synthese gegen HHV-6 gezeigt werden (Derfuss et al. 2005). Immunhistochemisch wurden Zellen, die aktiv mit HHV-6 infiziert waren, im ZNS von über 70% der MS Patienten nachgewiesen, insbesondere im Bereich der Demyelinisierungsherde (Knox et al. 2000). Zudem wurde in einer prospektiven Studie eine Assoziation zwischen HHV-6 IgG- Antikörpern im Serum und dem Erkrankungsrisiko beschrieben (Sundström et al. 2004).

Auch das Humane Cytomegalie-Virus (HCMV, HHV-5), ein β -Herpesvirus, dessen Durchseuchungsrate bei 40-100% der erwachsenen Bevölkerung liegt, könnte möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der MS spielen. Rhesusaffen, die mit dem HCMV-Peptid CMVmcp981-1003 immunisiert wurden, entwickelten MOG 34-56-reaktive CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen (Brok et al. 2007). Eine Studie zu Antikörperreaktivitäten gegenüber Viren bei Kindern mit MS zeigte allerdings keinen signifikanten HCMV-Titerunterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollen (Banwell et al. 2007).

2.2 Entzündlich-demyelinisierende Erkrankungen des Zentralen Nervensystems im Kindesalter

2.2.1 ADEM

Mit einer Inzidenz von 0,4-0,8/100.000 Einwohnern ist die Akute disseminierte Enzephalomyelitis eine relativ seltene Erkrankung (Leake et al. 2004, Menge et al. 2005). Es handelt sich um eine akute, monophasisch verlaufende, entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems, die vor allem Kinder im Alter von durchschnittlich fünf bis neun Jahren betrifft, wobei sich die Erkrankung jedoch auch bei jüngeren Kindern oder auch im Erwachsenenalter manifestieren kann (Suppiej et al. 2008, Anlar et al. 2003, Tenenbaum et al. 2002, Tenenbaum et al. 2007, Brass et al. 2003). In den meisten untersuchten Kollektiven sind beide Geschlechter etwa gleich häufig betroffen, teilweise fällt eine etwas höhere Erkrankungsrate bei Jungen auf (Leake et al. 2004, Tenenbaum et al. 2002, Anlar et al. 2003). In der Mehrzahl der Fälle tritt die ADEM postinfektiös in engem zeitlichen Zusammenhang mit viralen Infektionen, insbesondere der oberen Atemwege, seltener nach Impfungen,

insbesondere gegen Masern, Mumps oder Röteln auf (Dale et al. 2000, Tenenbaum et al. 2002, Brass et al. 2003, Dale et al. 2005, Tenenbaum et al. 2007). Die klinische Manifestation der postinfektiösen ADEM beginnt in der Regel etwa zwei Tage bis vier Wochen nach der Infektion (Tenenbaum et al. 2007, Dale et al. 2000). Die Symptomatik setzt subakut ein und ist typischerweise multifokal. Besteht ein polysymptomatischer subakuter Symptombeginn mit Enzephalopathie in zeitlichem Zusammenhang mit einer Infektion oder Impfung, ist die Diagnose ADEM wahrscheinlich (Menge et al. 2005). Häufige neurologische Symptome bei Kindern sind Ataxie, Hemiplegie, Pyramidenbahnzeichen, Bewusstseinsstörungen, Hirnstammsymptome; schwere neurologische Ausfälle sind möglich. Fieber, Erbrechen, Kopfschmerzen, Vigilanzstörungen bis zum Koma und Meningismus sind häufig und epileptische Anfälle treten in bis zu 20% der Fälle auf (Brass et al. 2003, Dale et al. 2000), was klinisch die Abgrenzung insbesondere gegenüber akut infektiösen Erkrankungen, wie beispielsweise der HSV-Enzephalitis, erschwert (Tenenbaum et al. 2002, Leake et al. 2004, Tenenbaum et al. 2007). Das Maximum der neurologischen Ausfälle wird durchschnittlich vier bis sieben Tage nach Symptombeginn erreicht (Dale et al. 2000, Tenenbaum et al. 2002). Die Prognose der ADEM ist meist günstig. Die Erkrankung verläuft im Großteil der Fälle selbstlimitierend, in 30% der Erkrankungsfälle persistieren jedoch - meist milde - neurologische Defizite (Suppiej et al. 2008). Etwa 10 bis 30% der Patienten mit ADEM erleiden ein oder mehrere Rezidive (Tenenbaum et al. 2002, Anlar et al. 2003). Der Übergang zur Multiplen Sklerose ist selten, aber möglich (Mikaeloff et al. 2004b, Krupp et al. 2007). Diese entwickelt sich wesentlich häufiger nach einem Klinisch isolierten Syndrom (Dale et al. 2007, siehe Kap. 2.2.2).

Die wichtigste Differenzialdiagnose der ADEM im Kindesalter stellt neben genetisch determinierten Leukenzephalopathien und infektiösen Meningitiden oder Enzephalitiden die Multiple Sklerose dar. Klinisch ist die ADEM von einem CIS nicht immer klar abzugrenzen, wobei beim CIS im Gegensatz zur ADEM keine Enzephalopathie bestehen sollte.

2.2.2 Klinisch isoliertes Syndrom und Multiple Sklerose

Während die Multiple Sklerose im Erwachsenenalter mit einer Inzidenz von 3-7/100.000 Einwohnern eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen darstellt, sind entzündlich-demyelinisierende Erkrankungen im Kindesalter relativ selten. Vor dem 16. Geburtstag manifestieren sich etwa 3-6% aller MS-Erkrankungen, 10-20% davon

wiederum innerhalb der ersten 10 Lebensjahre (Hanefeld 1992, Ozakbas et al. 2003, Simone et al. 2002, Mikaeloff et al. 2001, Mikaeloff et al. 2004b, Duquette et al. 1987, Dale et al. 2000, Boiko et al. 2002, Neuteboom et al. 2008). Bei Beginn der Erkrankung vor dem 10. Lebensjahr zeigte sich in den meisten Studien keine Geschlechterpräferenz, während bei Krankheitsmanifestation während der Pubertät Mädchen etwa 3-7 mal so häufig erkrankten wie Jungen, was das Verhältnis von etwa 2:1 im Erwachsenenalter deutlich übersteigt (Duquette et al. 1987, Simone et al. 2002, Pohl 2007, Boiko et al. 2002). Das durchschnittliche Erkrankungsalter der kindlichen MS liegt im Vergleich zu ADEM höher, bei 12 Jahren, wobei jedoch auch sehr junge Kinder erkranken können (Brass et al. 2003, Dale et al. 2005).

Die häufigsten Erstmanifestationen der MS bei Kindern entsprechen mit Optikusneuritis, Sensibilitätsstörungen, Hirnstamm- und zerebellären Funktionsstörungen sowie Paresen denen im Erwachsenenalter, doch auch Meningismus und Kopfschmerzen können bei Kindern die neurologischen Ausfälle begleiten und erschweren so die Diagnosestellung wie auch die Abgrenzung zu ADEM und infektiösen Ursachen (Dale et al. 2000).

Wie im Erwachsenenalter ist auch bei Kindern ein schubförmiger Verlauf mit 56-97% der Fälle die häufigste Form der MS (Boutin et al. 1988, Duquette et al. 1987, Boiko et al. 2002). Zwar verläuft die Erkrankung bei Kindern insgesamt langsamer progredient, Patienten mit Erkrankungsbeginn in der Kindheit werden dennoch im Mittel in jüngerem Alter rollstuhlpflichtig als Patienten mit Beginn im Erwachsenenalter (Duquette et al. 1987, Simone et al. 2002). Ein kurzes Intervall zwischen dem ersten und zweiten Schub sowie ein Alter über zehn Jahre bei der Erstmanifestation sind prognostisch ungünstig (Simone et al. 2002, Mikaeloff et al. 2004b).

2.2.3 Diagnostische Kriterien

Aufgrund der Variabilität der klinischen Präsentation eines CIS beziehungsweise der Multiplen Sklerose im Kindesalter sind die Diagnosekriterien der MS nach McDonald und Poser in der Diagnostik der Multiplen Sklerose bei Kindern, insbesondere vor dem zehnten Lebensjahr nur eingeschränkt anwendbar (Mikaeloff et al. 2004a, McDonald et al. 2001).

Einige klinische und radiologische Befunde erleichtern die Abgrenzung von CIS und ADEM. So erkranken Kinder zwischen dem dritten und zehnten Lebensjahr eher an ADEM, während das Alter bei Erstmanifestation einer Multiplen Sklerose im Durchschnitt höher ist (Leake et al. 2004, Tenenbaum et al. 2007, Dale et al. 2005). Die ADEM präsentiert sich als polysymptomatische Erkrankung. Bilaterale Optikusneuritis,

Kopfschmerzen, Lethargie, Ataxie, Fieber, Erbrechen, epileptische Anfälle, Meningismus und Enzephalopathie in Form von Bewusstseins- und Verhaltensänderungen sind häufige Befunde. Ein CIS im Kindesalter hingegen zeigt sich eher monosymptomatisch, zum Beispiel in Form einer unilateralen Optikusneuritis oder inkompletten Querschnittsmyelitis (Dale et al. 2000). Kürzlich stattgehabte Infektionen sind bei MS seltener als bei ADEM (etwa 20% vs. bis zu über 90%) (Brass et al. 2003, Leake et al. 2004). Pyramidenbahnzeichen, Hirnstamm- und zerebelläre Symptome sowie Sensibilitätsstörungen hingegen sind bei beiden Erkrankungen sehr häufig und lassen keine Differenzierung zu (Dale et al. 2005).

Ebenso wenig erlaubt der Liquorbefund eindeutige Schlüsse hinsichtlich der Diagnose. Zwar sind Oligoklonale Banden bei der kindlichen MS häufiger vorhanden (40-80% der Fälle) (Dale et al. 2000, Brass et al. 2003), können aber auch bei ADEM in bis zu 30% der Fälle transient nachweisbar sein (Mikaeloff et al. 2004b, Dale et al. 2000, Menge et al. 2005). Beide Erkrankungen können mit einer milden lymphozytären Pleozytose und leichter Proteinerhöhung im Liquor einhergehen (Boutin et al. 1988, Tenenbaum et al. 2002, Tenenbaum et al. 2007, Mikaeloff et al. 2004b, Dale et al. 2000).

Radiologisch zeigen sich einige Unterschiede hinsichtlich der Lokalisationen der Herde. Subkortikale Läsionen der weißen Substanz sind bei beiden Erkrankungen zu beobachten. Bei der ADEM finden sich daneben jedoch auch Herde in der kortikalen und subkortikalen grauen Substanz, vor allem in Form einer bilateralen Basalganglien- oder Thalamusläsion (Tenenbaum et al. 2002, Dale et al. 2005, Hartung et al. 2001). Bei MS im Erwachsenen- wie im Kindesalter zeigen sich im Gegensatz dazu vorrangig balkennahe und periventrikuläre Läsionen (Callen et al. 2009, Mikaeloff et al. 2004a).

Um die diagnostische Abgrenzung zwischen CIS und ADEM sowie deren Unterformen im Kindesalter zu erleichtern, wurden 2007 von der International Pediatric MS Study Group Kriterien zur Diagnosestellung der MS und verwandter Erkrankungen im Kindesalter veröffentlicht ("IPMS diagnostic criteria for childhood MS and related disorders", Krupp et al. 2007), die klinische und radiologische Befunde beinhalten. Das Patientenkollektiv, das Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wurde retrospektiv anhand dieser Diagnosekriterien klassifiziert.

Nach den IPMS-Kriterien ist ADEM definiert als Erstmanifestation einer entzündlichen Demyelinisierung mit akutem oder subakutem Beginn, die vor allem die weiße Substanz des ZNS betrifft. Für die Diagnosestellung einer ADEM muss dieses Erstereignis polysymptomatisch sein und eine Enzephalopathie, definiert als Bewusstseins- oder Verhaltensänderung, beinhalten. Im MRT zeigen sich fokale oder

multifokale Läsionen vor allem der supra- oder infratentoriellen weißen Substanz, eventuell auch des Thalamus oder der Basalganglien. Das Rückenmark kann ebenfalls Läsionen zeigen. Es gibt bei der ADEM keine radiologischen Hinweise auf vorangegangene Demyelinisierung. Neue Symptome oder MRT-Veränderungen innerhalb von drei Monaten nach dem Erstereignis beziehungsweise innerhalb von einem Monat nach Abschluss der Steroidtherapie werden als Teil der ADEM gesehen. Ein CIS ist definiert als demyelinisierendes Erstereignis, das klinisch mono- (zum Beispiel als isolierte Optikusneuritis oder partielle Querschnittsmyelitis) oder multifokal sein kann. Es zeigt sich jedoch im Gegensatz zur ADEM keine Enzephalopathie (außer bei Hirnstammläsionen). Nach den IPMS-Kriterien schließt Fieber diese Diagnose aus. MS im Kindesalter ist nach diesen Kriterien definiert durch das Auftreten von zwei oder mehr demyelinisierenden Ereignissen, die nicht den Kriterien für ADEM entsprechen und analog zu den Kriterien für Erwachsene (McDonald et al. 2001) zeitlich und räumlich disseminiert sind. Das zweite Ereignis muss für diese Diagnose nach frühestens vier Wochen und an anderer Lokalisation auftreten.

3 FRAGESTELLUNG

Ätiologie und Pathogenese entzündlich-demyelinisierender ZNS-Erkrankungen im Kindesalter sind nur teilweise verstanden. In den vergangenen Jahren wurden allerdings einige Myelinproteine identifiziert, die möglicherweise eine zentrale Rolle als Autoantigene im Demyelinisierungsprozess bei Multipler Sklerose im Erwachsenenalter spielen. Zahlreiche Befunde sprechen für eine Rolle von Autoantikörpern in der Pathogenese der Multiplen Sklerose. In den Läsionen finden sich B- und Plasmazellen sowie Antikörper- und Komplementablagerungen. Im Liquor von Patienten mit MS lassen sich eine oligoklonale Expansion von B-Zellen und intrathekale IgG-Synthese nachweisen. Ein Kandidatenantigen ist das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG). Wie oben dargestellt, sind das enzephalitogene Potenzial dieses auf der Oberfläche der Myelinscheide exponierten Proteins und die demyelinisierende Wirkung MOG-spezifischer Antikörper im Tiermodell bereits seit einigen Jahren bekannt. Antikörper gegen MOG wurden in mehreren Studien im Serum von Patienten mit MS nachgewiesen, wenn auch deren Krankheitsspezifität und pathogenetische Rolle unklar ist (siehe Kap. 2.1.1).

Proteolipid Protein (PLP), das einen Großteil der Myelinproteine ausmacht, wirkt ähnlich wie MOG im Tiermodell der Experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis enzephalitogen (Sobel et al. 1986) und induziert demyelinisierende Läsionen (Trotter et al. 1987). Antikörper gegen PLP konnten im Liquor einiger Patienten mit Optikusneuritis und Multipler Sklerose nachgewiesen werden (Warren et al. 1994).

Mit NMO-IgG, einem IgG-Antikörper gegen Aquaporin-4 (AQP4), konnte ein für die Neuromyelitis optica (NMO) spezifischer Biomarker identifiziert werden. Etwa 70% der Patienten mit NMO zeigen IgG-Antikörper gegen AQP4 (Lennon et al. 2004, Lennon et al. 2005). Auch bei Kindern sind diese Antikörper spezifisch für Neuromyelitis optica; bei Kindern mit ADEM, MS, monophasischer isolierter Optikusneuritis beziehungsweise Querschnittsmyelitis sowie bei gesunden Kindern sind sie nicht vorhanden (Banwell et al. 2008). Die Spezifität der AQP4-Antikörper im Kindesalter ist bisher allerdings ausschließlich bei diagnostisch gesicherter NMO untersucht worden, nicht beim klinischen Erstereignis einer demyelinisierenden Erkrankung (McKeon et al. 2008).

Bestimmte klinische und radiologische Befunde sind mit einer mehr oder weniger günstigen Prognose nach einem CIS im Kindesalter assoziiert. So sind ein Alter über zehn Jahre bei Erkrankungsbeginn und eine hohe initiale Schubfrequenz prognostisch

ungünstig (Simone et al. 2002, Mikaeloff et al. 2004b). Auch korreliert die Zahl der Herde im initialen MRT mit dem Risiko weiterer Schübe (Mikaeloff et al. 2004a). Bisher konnten jedoch keine serologischen Parameter identifiziert werden, die das Risiko der Entwicklung einer Multiplen Sklerose nach ADEM oder CIS bei Kindern mit hoher Spezifität vorhersagen oder die Diagnose dieser Erkrankungen frühzeitig sichern könnten. Auch ist die klinische Differenzialdiagnose zwischen ADEM und CIS bei jungen Patienten, wie oben ausgeführt, durchaus problematisch. Eine frühe Diagnosestellung, möglichst bereits bei Erstmanifestation, ist jedoch einerseits im Hinblick auf die Wahl der adäquaten Therapie, andererseits auch aufgrund der unterschiedlichen Langzeitprognose von ADEM und MS von Bedeutung. Während die ADEM durch einen monophasischen Verlauf mit Erholung innerhalb weniger Monate gekennzeichnet ist und in bis zu 80% eine vollständige Remission erreicht wird, ist die Prognose des CIS im Kindesalter schlechter (Dale et al. 2000, siehe Kap. 2.2.2).

Wie einige Studien zeigen konnten, verzögert eine frühe immunmodulatorische Therapie nach einem CIS bei Erwachsenen die Progression zur definitiven MS signifikant. Sowohl klinisch als auch radiologisch zeigten sich Vorteile einer frühen schubprophylaktischen Behandlung (Thrower 2007, Kappos et al. 2006, Coyle 2008). In den letzten Jahren gab es zudem Studien zur Sicherheit der Interferon-Therapie bei Multipler Sklerose vor dem 18. Lebensjahr, die eine deutliche Reduktion der Schubfrequenz zeigten und so insgesamt für den Einsatz immunmodulatorischer Therapien auch im Kindesalter sprechen (Mikaeloff et al. 2001, Pohl et al. 2005, Banwell et al. 2006, Ghezzi et al. 2007). Vor dem Hintergrund einer möglicherweise in Zukunft etablierten Schubprophylaxe auch bei sehr jungen Patienten erhält die Identifikation von zuverlässigen diagnostischen und prognostischen Kriterien, beispielsweise in Form spezifischer Serumantikörper, daher zunehmend klinische Relevanz. Daneben wären aufgrund der variablen Klinik insbesondere der ADEM differenzialdiagnostische Parameter zur Abgrenzung gegenüber infektiös-entzündlichen und anderen ZNS-Erkrankungen wünschenswert.

Darüber hinaus könnte ein Nachweis von krankheitsspezifischen Antikörpern bei Kindern mit ADEM oder CIS wertvolle Hinweise auf die zugrunde liegende Pathogenese der Erkrankungen geben. Autoantikörper gegen Myelinproteine könnten über verschiedene Mechanismen in die Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen involviert sein. So könnten sie über Antikörper-abhängige zellvermittelte (ADCC) oder Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC), die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Bindung an Fc-Rezeptoren auf NK-Zellen, Mastzellen

oder Makrophagen oder durch Opsonierung von Myelin mit nachfolgender Phagozytose zur Demyelinisierung beitragen (Archelos et al. 2000).

Für NMO-IgG konnte ein zytotoxisches Potenzial *in vitro* gezeigt werden. AQP4-spezifisches IgG aus Serum von NMO-Patienten bewirkt Komplementaktivierung, aus Liquor isoliertes IgG von NMO-Patienten vermittelt Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität sowie Komplement-vermittelte Lyse AQP4-exprimierender Zellen (Bennett et al. 2009). *In vivo* konnte durch den Transfer von NMO-Patienten-IgG bei Ratten mit EAE eine Verstärkung der Krankheitsaktivität und eine NMO-ähnliche Pathologie induziert werden (Bradl et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Antikörperreaktivitäten gegenüber nativem MOG, PLP und AQP4 bei Kindern mit Erstereignis einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung untersucht werden. Ausgehend von der Annahme, dass ADEM und CIS beziehungsweise MS eine unterschiedliche Ätiologie und Pathogenese zugrunde liegen könnte, wie das klinische Bild, der Verlauf und auch die radiologischen Befunde vermuten lassen, könnte sich möglicherweise eine unterschiedliche Immunantwort gegenüber Myelinbestandteilen zeigen. Neben der Detektion und Quantifizierung der Antikörperantwort gegen Myelinproteine und der Frage nach ihrem diagnostischen und prognostischen Wert bei Kindern mit ADEM und CIS steht die mögliche Rolle dieser Antikörper in der Pathogenese der Demyelinisierung im Mittelpunkt der Untersuchungen. Zur Detektion der Antikörper gegen die nativen ZNS-Proteine MOG, PLP und AQP4 wurden LN18-Glioblastom-Zelllinien verwendet, die jeweils das native Protein auf der Zellmembran exprimieren, so dass die physiologische Konformation und posttranslationale Modifikation des Proteins gewährleistet ist. Diese Zelllinien wurden auch zur Untersuchung der Antikörper-abhängigen zellvermittelten sowie der Komplement-vermittelten Zytotoxizität verwendet.

Herpesviren wurden wiederholt mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Epidemiologische Studien haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko EBV-Positiver gezeigt, nahezu alle MS Patienten sind EBV-positiv (siehe Kap. 2.1.4). Auch bei Kindern mit MS hat man erhöhte Antikörperreaktivitäten gegenüber EBV-Proteinen nachgewiesen. Eine Infektion durch HHV-6 und HCMV wurde ebenfalls wiederholt mit einem erhöhten Risiko, an Multipler Sklerose zu erkranken, in Verbindung gebracht. Bisher gab es allerdings keine Untersuchungen zu den Antikörperantworten gegenüber Herpesviren bei Erstmanifestation entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen im Kindesalter. Daher soll der Frage nachgegangen werden, ob bei Patienten mit CIS oder ADEM vermehrt Antikörper gegen die

Herpesviren HHV-4 (Epstein-Barr-Virus), HHV-5 (Humanes Cytomegalie-Virus) oder HHV-6 nachweisbar sind und so möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Infektion und der Entwicklung entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen im Kindesalter besteht.

Zusammenfassend sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es während der klinischen Erstmanifestation einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung (CIS und ADEM) im Kindesalter eine spezifische IgG- oder IgM-Antikörperantwort gegenüber den nativen ZNS-Proteinen nMOG, nPLP oder nAQP4?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Antikörperreaktivität gegenüber ZNS-Proteinen und Krankheitsentität oder klinischem Verlauf?
- Gibt es *in vitro* Hinweise auf eine pathogenetische Rolle myelinspezifischer Antikörper bei ADEM und CIS im Kindesalter?
- Findet sich bei Kindern eine Assoziation zwischen einer zurückliegenden Infektion mit den Herpesviren EBV, HCMV oder HHV-6 und entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen?
- Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den Antikörperantworten gegenüber ZNS- und Virusproteinen bei Erstmanifestation entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen im Kindesalter?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Geräte

CO ₂ -Zellkultur-Inkubator	Binder, Tuttlingen, Germany
Durchflusszytometer	CyAn ADP, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
ELISA Reader TECAN GENios	TECAN, Männedorf, Switzerland
Inkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Lichtmikroskop	VWR, West Chester, PA, USA
MACS-Sorter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
AutoMACS Pro Separator	
Nephelometer	BN ProSpec, Siemens, Erlangen, Germany
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Germany
Sterilbank Biowizard	Kojair, Vilppula, Finland
Vortexer Analog Vortex Mixer	VWR, West Chester, PA, USA
Zentrifugen:	
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, Waltham, MA
Centrifuge 5425	Eppendorf, Hamburg, Germany

4.2 Antikörper, Puffer, Medien, Kits

Alexa 488-konjugierte FACS-Antikörper

Goat anti mouse IgG	Invitrogen, Carlsbad, CA
Goat anti human IgG	Invitrogen, Carlsbad, CA
Goat anti mouse IgM	Invitrogen, Carlsbad, CA
Goat anti human IgM	Invitrogen, Carlsbad, CA

MACS-Antikörper

CD56 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
-----------------	---

ELISA-Kits

EA IgM	Biotest, Dreieich, Germany
EBNA-1 IgG	Biotest, Dreieich, Germany
HHV-6 IgG	Panbio, Sinnamon Park, QLD, Australia
HCMV IgG	Biotest, Dreieich, Germany

Waschpuffer

FACS-Puffer	1% FCS in 1x PBS
MACS-Puffer	500 ml 1x PBS
	2,5 g BSA
	2 ml EDTA

Puffer zur IgG-Isolierung

Bindungspuffer	Sodiumphosphat 20 mM
Elutionspuffer	Glycin-HCl 0,1 M (pH 2,7)
Tris-Puffer	Tris-HCl 1M (pH 9,0)

Zellkulturmedium und Zusätze

RPMI 1640 without Glutamin	PAA, Pasching, Austria
Dulbecco's PBS (Phosphate buffered saline) 1x without Ca + Mg	PAA, Pasching, Austria
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Blastizidin	PAA, Pasching, Austria

Weitere Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Carlsbad, CA
Protein G Sepharose	GE Healthcare, Piscataway, NJ
Sepharose Protein G4 Fast Flow	
Ficoll	Biochrom, Berlin, Germany
Biocoll Separating Solution	
GIBCO Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zellkulturflaschen 250 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
96-Well Mikrotiterplatte mit Rundboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
96-Well Zellkulturplatte mit Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
Einmal-Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Germany
FACS-Tubes	Becton Dickinson Labware, Franklin Lanes, NJ, USA

Zentrifugierröhrchen (15 ml und 50 ml)	TPP, Trasadingen, Switzerland
Zentrifugiersäule 0,8 ml	GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
Parafilm	American National Can, Chicago, IL, USA
Zählkammer	Omnilab, Bremen, Germany
Neubauer Improved	
Pipettierhilfen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Research	
Serologische Pipetten	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Falcon Spacesaver Serological Pipet (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Plastipak Spritze mit Luer-Lok Ansatz (50 ml)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Filter Millex-GS 0,22 µm	Millipore, Billerica, MA, USA
pH-Teststreifen	VWR, West Chester, PA, USA
Handsummenzähler	BaumerIVO, Frauenfeld, Switzerland

4.3 Patienten und Kontrollen

Das Kollektiv der Fall-Kontroll-Studie umfasste 105 Kinder und Jugendliche im Alter zwischen zwei und 16 Jahren. 47 dieser Kinder und Jugendlichen bildeten die Patientengruppe (25 männliche und 22 weibliche Patienten, Durchschnittsalter 7,63 Jahre, Spannweite 1,8-15,5 Jahre), von denen 19 an ADEM und 28 an CIS erkrankt waren (siehe Tab. 1). Die Diagnosestellung erfolgte anhand der "2007 International consensus criteria for a first episode of CNS demyelination in children" der International Pediatric MS Study Group, dargestellt in Kap. 2.2.3 (Krupp et al. 2007).

Seren und Liquores der pädiatrischen Patienten mit ADEM (n=19) und CIS (n=28) wurden in den Jahren 2002-2008 während der ersten klinischen Manifestation der entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung und vor Therapiebeginn gewonnen. Die pädiatrischen Patienten mit CIS zeigten fokale (Optikusneuritis, n=7, Hemisphärensyndrom, n=6, Hirnstammsyndrom, n=2, Kleinhirnsyndrom, n=2, Querschnittsmyelitis, n=1) oder multifokale (n=10) Ausfälle. Die Patienten wurden

prospektiv über einen Zeitraum von durchschnittlich zwei Jahren (Spannbreite 0,5-4,6 Jahre) hinsichtlich weiterer Krankheitsaktivität beobachtet.

Zwölf der Patienten mit initialem CIS und ein Patient mit ADEM entwickelten innerhalb des Beobachtungszeitraums eine klinisch definitive Multiple Sklerose.

Tabelle 1: Patientenkollektiv

Diagnosen, Geschlecht, Alter und Oligoklonale Banden (OKBs) bei Erkrankungsbeginn, Follow-up Zeitraum und Krankheitsverlauf der Patienten mit ADEM und CIS

Diagnose	ADEM (n=19)	CIS (n=28)
Geschlecht	13 männlich	12 männlich
Altersdurchschnitt (Spannweite)	5,2 Jahre (1,8-10,5 Jahre)	9,2 Jahre (2,5-15,5 Jahre)
OKBs bei Krankheitsbeginn	0/19	8/28 (6/8 Progress zu MS)
Follow-up Zeitraum	1,96 Jahre (0,5-4,6 Jahre)	2,02 Jahre (1,0-4,0 Jahre)
Progress zu MS	1/19	12/28

Neben den Patienten umfasste das Kollektiv 28 Kontrollpatienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (16 männlich, Durchschnittsalter 6,0 Jahre, Spannweite 0,3-14 Jahre), die unter Epilepsie, Entwicklungsstörungen, metabolischen Erkrankungen und Virusenzephalitis litten sowie 30 gesunde Kontrollen (Durchschnittsalter 11,0 Jahre, Spannweite 9-13 Jahre, 15 männlich). Daneben wurden Seren von 54 erwachsenen Patienten mit CIS (n=1), RR-MS (n=33), PP-MS (n=1) und SP-MS (n=19) verwendet. Das Durchschnittsalter der erwachsenen Patienten betrug 40 Jahre. Die pädiatrischen Patienten und Kontrollen wurden am Great Ormond Street Hospital, London in die Studie eingeschlossen, die erwachsenen MS Patienten an den Neurologischen Kliniken der Universität Düsseldorf und der Technischen Universität München. Die Genehmigung durch die Ethikkommissionen der Universitäten Düsseldorf, München und London lag vor.

4.4 Detektion von Antikörpern gegen nMOG, nPLP und nAQP4

4.4.1 Durchflusszytometrische Detektion und Quantifizierung der Antikörperantwort in Serum und Liquor

Für die Detektion von Antikörpern gegen natives MOG, AQP4 und PLP wurden etablierte humane LN18-Glioblastom-Zelllinien verwendet (Zhou et al. 2006, Bennett et al. 2009, Kalluri et al. 2010), die jeweils das native Protein exprimierten. Dazu wurde das jeweilige cDNA-PCR-Produkt aus humaner RNA (BD Biosciences, San Jose, CA) in das lentivirale Plasmid pLenti6/V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA) eingefügt und eine 293FT-Zelllinie unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) mit dem pLenti6/V5-MOG/-AQP4/-PLP-Vektor transfiziert. Virus enthaltender Überstand wurde dann zur Transduktion der LN18- Glioblastom-Zelllinie (LN18-MOG, LN18-AQP4, LN18-PLP) verwendet. Für die Kontroll-Zelllinie (LN18-CTR) wurde die LN18-Zelllinie mit dem leeren Vektor pLenti6/V5 transduziert (Zhou et al. 2006, Bennett et al. 2009, Kalluri et al. 2010).

Die stabile Expression der Proteine auf der Zellmembran wurde durch Immunhistochemie (Zhou et al. 2006) und Durchflusszytometrie verifiziert (in Abb. 4.1 für MOG dargestellt). Für die Durchflusszytometrie wurden 30.000 Zellen der LN18-CTR, LN18-MOG, LN18-AQP4 oder LN18-PLP Zelllinie in je 20 µl Vollmedium auf eine 96-Well Mikrotiterplatte gegeben und mit einem monoklonalen Antikörper gegen MOG (8-18C5) beziehungsweise PLP (O-10) oder mit AQP4-IgG positivem Serum von NMO-Patienten für 20 min auf Eis auf einem Kreisschüttler inkubiert und zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Ein Alexa Fluor 488-konjugierter Anti-Maus-IgG (LN18-MOG, Verdünnung 1:100), Anti-Human-IgG (LN18-AQP4, Verdünnung 1:100) beziehungsweise Anti-Maus-IgM (LN18-PLP, Verdünnung 1:50) Antikörper wurde anschließend als Sekundärantikörper zu den Zellen gegeben und diese 20 min auf Eis auf dem Kreisschüttler inkubiert, zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend in 140 µl Waschpuffer aufgenommen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abb. 4.1).

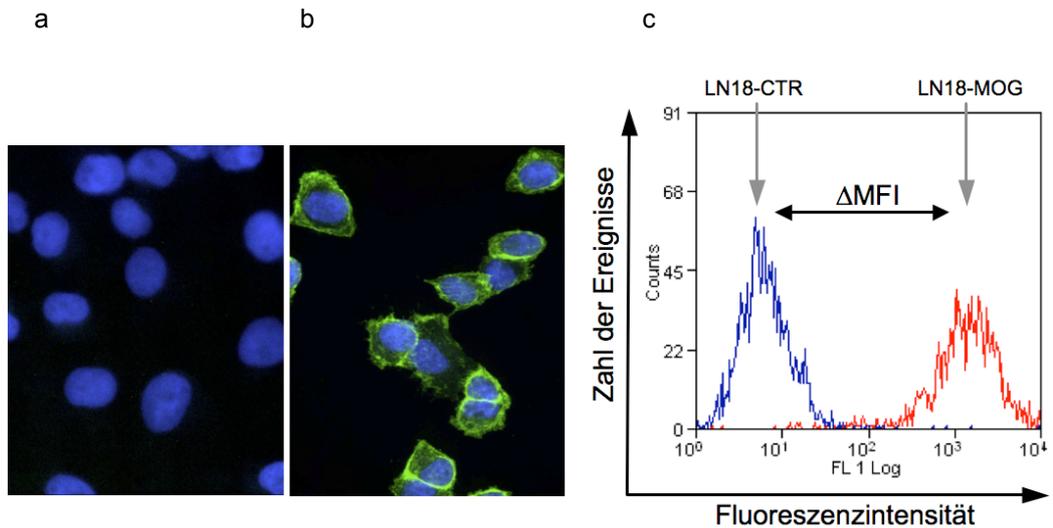


Abb. 4.1: Expression von MOG auf der Zellmembran

LN18-CTR (a) und LN18-MOG Zelllinie (b) nach Inkubation mit dem monoklonalen Anti-MOG Antikörper 8-18C5 und fluoreszierendem Sekundärantikörper. Immunzytochemie (nach Zhou et al. 2006)

c) Durchflusszytometrie nach Inkubation der LN18-CTR und LN18-MOG Zelllinie mit 8-18C5 und fluoreszierendem Sekundärantikörper (blau: LN18-CTR, rot: LN18-MOG).

Die Antikörperreaktivitäten der Seren und Liquores von Patienten und Kontrollen wurden mit Hilfe des im Folgenden beschriebenen Assays bestimmt (siehe auch Abb. 4.2). Auf einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden in jedes Well 30.000 LN18-CTR, LN18-MOG, LN18-AQP4 oder LN18-PLP Zellen in je 20 μ l Vollmedium gegeben. Die Seren wurden 1:50 in 20 μ l Vollmedium verdünnt, jeweils in Dubletten zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt, so dass eine endgültige Serumverdünnung von 1:100 erreicht wurde. Nun wurden die Zellen mit den Seren für 20 min auf Eis auf einem Kreisschüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Alexa Fluor 488-konjugierter Anti-Human-IgG- bzw. -IgM-Antikörper wurde 1:100 in Vollmedium verdünnt und pro Well wurden 20 μ l der Sekundärantikörper-Verdünnung zu den Zellen gegeben. Nun wurden die Zellen wiederum 20 min auf Eis auf dem Kreisschüttler inkubiert, zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend in 140 μ l Waschpuffer aufgenommen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Ausdruck der Antikörperbindung an die auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Der Δ MFI-Wert wurde als Maßeinheit für den spezifischen Antikörpertiter verwendet.

Dieser errechnet sich beispielsweise für die MOG-spezifischen IgG-Antikörper als

$$n\text{MOG IgG } \Delta\text{MFI} = \text{MFI [LN18-MOG]} - \text{MFI [LN18-CTR]}.$$

Alle Waschschrte beinhalten die Zugabe von 180µl FACS-Waschpuffer zur Zellsuspension beziehungsweise zum Zellpellet, anschließende Zentrifugation für 4 min bei 311g und Abwerfen des Überstandes.

Unspezifische Bindung von Serumbestandteilen an ubiquitäre Zellmembranproteine wurde durch parallele Verwendung der LN18-CTR-Kontrollzelllinie ausgeschlossen. Mit Hilfe von Titrationsexperimenten mit den jeweiligen Standard-Antikörpern (8-18C5, O-10, NMO-Serum) wurde die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Assays sichergestellt. Dazu wurden 10 Verdünnungen des Antikörpers in Konzentrationen von 0,001 bis 1 mg/ml hergestellt und das Experiment wurde nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt.

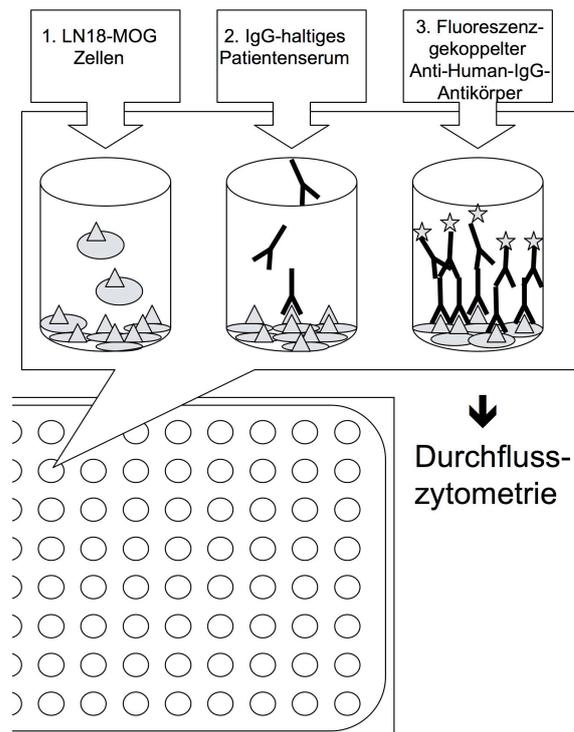


Abb. 4.2: Detektion nMOG-spezifischer IgG-Antikörper im Serum

Schematische Darstellung des Assays unter Verwendung der LN18-MOG Zelllinie in Verbindung mit nMOG-IgG positivem Patientenserum.

4.4.2 Nachweis intrathekaler Anti-nMOG IgG-Synthese

Zum Nachweis von Anti-nMOG IgG-Antikörpern im Liquor wurden zunächst die IgG-Konzentrationen einiger Anti-nMOG IgG-Antikörper-positiver und -negativer Seren und korrespondierenden Liquores mittels Nephelometrie ermittelt. Seren und Liquores wurden dann durch Verdünnung mit 1x PBS auf eine IgG-Konzentration von 5 mg/l eingestellt und die Antikörperreaktivitäten gegenüber der MOG-exprimierenden und der Kontroll-Zelllinie wie unten beschrieben (Kap. 4.4.1) bestimmt. So kann der spezifische Antikörperindex (AI) ermittelt werden, der sich wie folgt errechnet:

$$AI = (nMOG-IgG_{Liquor}/nMOG-IgG_{Serum}) / (Gesamt-IgG_{Liquor}/Gesamt-IgG_{Serum}).$$

$$Gesamt-IgG_{Liquor}/Gesamt-IgG_{Serum} = 5mg/l / 5mg/l = 1.$$

$$AI = nMOG-IgG_{Liquor}/nMOG-IgG_{Serum}.$$

Ein AI > 1.5 spricht für intrathekale Antikörpersynthese, das heißt für eine Produktion von MOG-spezifischen Antikörpern im ZNS.

4.4.3 Zellkulturbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ unter humiden Bedingungen in einem Inkubator kultiviert. Dem RPMI 1640 Zellkulturmedium wurden 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin zugesetzt. Dieses Medium wird im Folgenden als Vollmedium bezeichnet.

Der Zellkultur der proteinexprimierenden Zelllinien wurden zur Selektion der transfizierten Zellen 80 µl Blastizidin pro 12 ml Vollmedium zugegeben. Die Zellkultur wurde etwa zweimal wöchentlich folgendermaßen ausgedünnt: Zunächst wurde der Medium-Überstand entfernt und mit 6 ml 1xPBS Reste von Medium entfernt. Dann wurden die Zellen durch 5-minütige Inkubation mit 3 ml 0,05% Trypsin-EDTA bei Raumtemperatur von der Zellkulturflasche abgelöst. 6 ml Vollmedium wurde zugegeben und die Zellen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurden sie für 10 min bei 311g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Vollmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 in einer Neubauer-Zählkammer. Trypanblau erlaubt neben der Bestimmung der Zellzahl auch die Differenzierung zwischen vitalen und abgestorbenen Zellen. 1,5 Millionen Zellen pro Flasche wurden in 12 ml frischem Vollmedium unter Zugabe von 20 µl (LN18-CTR) beziehungsweise 80 µl (LN18-MOG, LN18-AQP4, LN18-PLP) Blastizidin resuspendiert.

4.5 In vitro Zytotoxizitäts-Assays

Zur Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften der Antikörper gegen natives MOG wurden zwei Ansätze gewählt, die Untersuchung der Komplement-vermittelten und der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität.

4.5.1 Isolierung des IgG aus Patientenserum

Für die beiden im Folgenden beschriebenen funktionellen Assays wurde zunächst aus einigen nMOG-IgG Antikörper-positiven und -negativen Patientenseren mit Hilfe von Protein G, das spezifisch die Fc-Region des humanen Immunglobulin G bindet, das Gesamt-IgG isoliert. Dazu wurden 150 µl Sepharose Beads auf eine 0,8 ml Zentrifugier-Säule gegeben, dann wurde diese dreimal mit 500 µl 1xPBS und einmal mit 500 µl Bindungspuffer gewaschen. 150 µl Serum wurde dann zusammen mit 50 µl Bindungspuffer auf jede Säule gegeben, vorsichtig gemischt und die Säule mit Parafilm verschlossen für 6 h bei 4 °C auf einem horizontalen Schüttler inkubiert (100 rpm). Nach der Inkubation wurde der nicht gebundene Rest des Serums abzentrifugiert (2 min bei 376 g), die Säule dreimal gewaschen und das Eluat jeweils verworfen. In zwei 2 ml Einmal-Reaktionsgefäße wurden jeweils 10 µl Tris-Puffer vorgelegt. Nun wurden auf die Säule 150 µl Elutionspuffer gegeben, nach 1 min Inkubation die Säule erneut zentrifugiert und das IgG so in das vorbereitete Reaktionsgefäß eluiert. Danach folgte eine pH-Kontrolle mittels pH-Teststreifen (Ziel-pH 7-8). Die letzten beiden Schritte wurden mit einem weiteren 2 ml Einmal-Reaktionsgefäß wiederholt. Alle Waschschriffe erfolgten, soweit nicht anders angegeben, mit 500µl 1xPBS und schlossen eine zweiminütige Zentrifugation bei 376 g ein. Anschließend wurden komplettes Serum, die abzentrifugierten, nicht gebundenen Serumbestandteile sowie das gewonnene IgG mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an die LN18-MOG- und LN18-CTR-Zelllinie überprüft (zur Methode siehe Kap. 4.4.1) und so die erfolgreiche Isolierung des IgG sichergestellt.

4.5.2 Isolierung von PBMCs

Die Gewinnung der Peripheren Mononukleären Blutzellen (PBMCs) erfolgte mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation. Diese Methode der Zellseparation beruht auf der Verwendung unterschiedlich dichter Medien und dem dadurch erzeugten Dichtegradienten. Bei der Fraktionierung des Vollbluts mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich die Blutbestandteile während der Zentrifugation entsprechend ihrer Dichte in den einzelnen Schichten an. Die Dichte des

Polysaccharids Ficoll-Hypaque ist mit 1,077g/ml größer als die der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, die sich daher mit dem Plasma im Überstand sammeln, aber geringer als die von Erythrozyten sowie Granulozyten, die daher das Sediment im Zentrifugierrohr bilden. Die PBMCs sammeln sich aufgrund ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Überstand und dem Ficoll-Hypaque-Medium an. Zur Gewinnung der Peripheren Mononukleären Blutzellen wurde EDTA-Vollblut eines gesunden Spenders im Verhältnis 1:1 mit 1xPBS verdünnt. 10 ml Ficoll-Hypaque wurde in ein 50 ml Zentrifugierrohr vorgelegt und mit 30 ml des verdünnten Vollbluts überschichtet. Nun wurde für 35 min bei 478 g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde verworfen und der die PBMCs enthaltende Ring in der Interphase entnommen. Die PBMCs wurden nun gewaschen, indem das Zentrifugierrohr dreimal mit 1xPBS aufgefüllt und für 10 min bei 311g zentrifugiert wurde, bis der Überstand klar war. Das so aufgereinigte Zellpellet wurde nun in 10 ml Vollmedium aufgenommen und die Zellen in der Zählkammer gezählt.

4.5.3 Isolierung von NK-Zellen

Die NK-Zellen wurden mittels immunmagnetischer Separation mit Magnet-Beads nach dem Prinzip der positiven Selektion aus den PBMCs isoliert. Dieses Verfahren beruht auf der Markierung populationspezifischer Oberflächenproteine mit antikörpergekoppelten, magnetischen Beads. Die Zellen werden dann im MACS (Magnetic Activated Cell Sorter) entlang einer Säule separiert, die in einem Magnetfeld platziert ist, so dass die markierten Zellen an der Säule zurückgehalten werden, während die nicht markierten Zellen abgewaschen werden können. Bei der positiven Selektion wird zunächst die nicht markierte Zellpopulation erhalten und verworfen. Im Anschluss daran wird die Säule entfernt und die markierten Zellen können eluiert werden.

CD56 gilt als Oberflächenmarker für Natürliche Killerzellen (Biron et al. 1999). Die PBMCs wurden wie oben beschrieben isoliert und gezählt. Nun wurden auf 10^7 Zellen jeweils 80 μ l MACS-Puffer und 20 μ l CD56 MicroBeads hinzugegeben und die Zellen für 15 min auf Eis auf einem Kreisschüttler inkubiert. Danach wurden die markierten Zellen mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 311 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen (bis zu einer Dichte von maximal 10^8 Zellen pro 500 μ l) und auf die MACS-Säule gegeben. Nun wurde mit einem automatischen MACS-Sorter die markierte CD56+ Population durch positive Selektion von der CD56- Population getrennt. Die Reinheit der NK Zell-Population wurde anschließend mittels FACS überprüft und betrug > 95%.

4.5.4 Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Anhand des im Folgenden beschriebenen Assays wurde eine mögliche Beteiligung des Komplementsystems am Untergang der MOG-exprimierenden Zellen *in vitro* untersucht.

15 µg des aufgereinigten IgG (siehe Kap. 4.5.1) wurden in 20 µl Vollmedium aufgenommen und in Dubletten auf eine 96-Well Mikrotiterplatte mit Rundboden gegeben. Je Well wurden 30.000 LN18-MOG oder LN18-CTR-Zellen in 40 µl Vollmedium zugegeben und für 20 min auf Eis auf einem Kreisschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit FACS-Waschpuffer und einmal in Vollmedium gewaschen. 15 µl frisch gewonnenes Serum eines gesunden Probanden wurden als Komplementquelle hinzugefügt und die Zellen wurden auf eine 96-Well-Zellkulturplatte mit Flachboden übertragen. Mit Vollmedium wurden die Wells auf ein Volumen von je 150 µl aufgefüllt. Dann wurden die Zellen für 16 h bei 37°C und 5% CO₂ mit Antikörpern und Serum inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, adhärente Zellen mit 70 µl 0,05% Trypsin-EDTA abgelöst und beides gemeinsam in FACS-Tubes überführt. Die Auswertung der Zellzahl und -vitalität der Zellen in den einzelnen Wells erfolgte durch FACS-basierte Zellzählung, mit der sich nach entsprechendem Gating die vitalen LN18-Zellen von lysierten Zellen und Zelldetritus anhand ihrer Größe und Granularität unterscheiden lassen.

4.5.5 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität

Um der Frage nach dem pathogenen Potenzial der MOG-spezifischen IgG-Antikörper weiter nachzugehen, wurde mit dem folgenden Assay eine mögliche Rolle der Antikörper-abhängigen NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität in der Pathogenese der MS untersucht.

Das Gesamt-IgG einiger MOG-Antikörper-positiver und -negativer Patienten wurde wie in Kap. 4.5.1 beschrieben aus dem Serum isoliert. 6 µg des aufgereinigten IgG wurden in 40 µl Vollmedium aufgenommen und in Dubletten auf eine 96-Well Rundbodenplatte gegeben. Jedes Well enthielt zudem 30.000 LN18-CTR beziehungsweise LN18-MOG-Zellen in 40 µl Vollmedium. Die Zellen wurden nun mit dem IgG für 25 min auf dem Kreisschüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer und einmal mit Vollmedium gewaschen und auf eine 96-Well Zellkulturplatte mit Flachboden übertragen. 60.000 CD56+ NK Zellen in 40 µl Medium wurden in jedes Well hinzugegeben und die Wells dann mit Vollmedium auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt. Die Zellen wurden nun für 12 h bei 37°C in einem 5%

CO₂-Inkubator belassen. Danach wurde der Überstand abgenommen, adhärenente Zellen wurden mit 70 µl 0,05% Trypsin-EDTA gelöst und beides in FACS-Tubes gegeben. Die Auswertung der Zellzahl und -vitalität der Zellen in den einzelnen Wells erfolgte durch FACS-basierte Zellzählung.

4.6 Nachweis von Antikörpern gegen virale Proteine

Ein ELISA ist ein quantitativer Immunoassay, bei dem die Konzentration eines Antigens oder Antikörpers gegen ein bestimmtes Protein anhand des Umsatzes eines Substrates durch ein Enzym bestimmt wird. Beim hier verwendeten direkten ELISA ist ein Protein auf einer Mikrotiterplatte fixiert, die Probe wird hinzugegeben und vorhandene Antikörper gegen das Protein binden an dieses. Durch einen Waschschrift wird unspezifisch gebundenes Material entfernt. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird nun durch einen Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Sekundärantikörper gegen humanes IgG gebunden. Unspezifisch gebundener Antikörper wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Anschließend wird mit einer enzyspezifischen Substratlösung (TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) inkubiert. Zuletzt wird die Enzymreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, die eine Farbänderung von blau nach gelb hervorruft. Die Optische Dichte (OD) in den einzelnen Wells wird mit einem Spektralphotometer der Wellenlänge 450 nm (Referenzwellenlänge 615-690 nm) gemessen.

Zur Detektion von IgG-Antikörpern gegen das latente Epstein-Barr-Virus (EBV)-Antigen EBNA-1 p72 (Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 p72) wurde ein standardisiertes ELISA-Kit verwendet. Dieser ELISA detektiert sensitiv EBV-spezifische IgG-Antikörper im Serum. Die Auswertung erfolgt folgendermaßen: Nach der Messung wird der Leerwert (=Mittelwert der optischen Dichte (OD) der leeren Wells, $OD \leq 0,1$) von den Werten der Proben und Kontrollen abgezogen, mit dem so erhaltenen Wert wird weitergerechnet. Die Berechnung des Cut-off Wertes ergibt sich aus dem Mittelwert der OD der Negativkontrollen +0,2. Werte oberhalb des Cut-off sind als positiv definiert. IgM-Serumantikörper gegen die EBV-Antigene (EA) p54 und 138 wurden ebenfalls mit einem ELISA-Kit nachgewiesen. Die Auswertung entspricht weitgehend der des EBNA-1-ELISA.

Analog zur Detektion der EBV-Antikörper wurden IgG-Antikörper gegen die Fusionsproteine CG1 und CG2 des Humanen Cytomegalie-Virus (HCMV) mittels ELISA bestimmt. Hier berechnet sich der Cut-off Wert aus dem Mittelwert der negativen Kontrollen +0,3.

IgG-Antikörper gegen Humanes Herpesvirus-6 (HHV-6) wurden ebenfalls mit einem ELISA-Kit detektiert. Die Berechnung des Cut-off Wertes erfolgt hier unter Verwendung eines chargenspezifischen Kalibrationsfaktors. Dieser wird mit der durchschnittlichen Extinktion des dreifachen Kalibrationsserums multipliziert, um den Cut-off Wert zu berechnen. Die Berechnung des jeweiligen Indexwertes der Probe als Maß für den Antikörpertiter erfolgt durch Division der Extinktion der Probe durch den Cut-off Wert (Mittelwert der Kalibrationsseren multipliziert mit dem Kalibrationsfaktor).

Eine Primärinfektion mit EBV ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von Anti-EA-IgM ohne gleichzeitiges Vorhandensein von Anti-EBNA-1-IgG. Im Gegensatz dazu wird eine abgelaufene Primärinfektion, das heißt die latente Infektion mit EBV, durch Anti-EBNA-1 IgG ohne Anti-EA IgM charakterisiert. Für eine Reaktivierung nach abgelaufener Primärinfektion spricht das gleichzeitige Vorhandensein der EBV-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper. Analog dazu zeigen IgG-Antikörper gegen HHV-6 und HCMV eine abgelaufene Primärinfektion an.

4.7 Statistische Auswertung und EDV-Programme

Für die Durchflusszytometrie wurde Summit Software 4.3 (Beckman Coulter) verwendet, die ELISAs wurden mit Magellan 6 Software ausgewertet.

Die statistischen Tests wurden mit Graph Pad Prism 5.0 durchgeführt. Die Antikörpertiter der Patienten und der verschiedenen Kontrollgruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-*U*-Tests und des Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Für die Korrelationsanalysen wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung (ermittelt durch den Kolmogorov-Smirnov normality test) der Korrelationskoeffizient nach Pearson, im gegenteiligen Fall der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die Graphen wurden mit Graph Pad Prism 5.0 erstellt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Antikörper gegen native ZNS-Proteine

5.1.1 Antikörper gegen nMOG, nPLP und nAQP4 im Serum

5.1.1.1 IgG-Antikörper gegen nMOG, nPLP und nAQP4

Bei der durchflusszytometrischen Detektion von an die Zellmembran der nMOG-, nPLP- und nAQP4-exprimierenden Zelllinien gebundenen Serum-IgG-Antikörpern zeigte sich bei einigen Patienten mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen (ADEM und CIS) eine signifikante IgG-Antikörperreaktivität gegenüber nMOG. Repräsentative FACS-Histogramme Anti-nMOG IgG-negativer und -positiver Patienten sind in Abb. 5.1 dargestellt.

Weder bei den gesunden und neurologischen Kontrollpatienten noch bei Patienten mit ADEM und CIS konnten signifikante IgG-Antikörpertiter gegen nPLP oder nAQP4 nachgewiesen werden, lediglich ein Patient mit CIS war schwach nAQP4 IgG-positiv (Abb. 5.2).

Der Vergleich der Anti-nMOG IgG-Antikörpertiter bei Kindern mit ADEM und CIS und gesunden und neurologischen Kontrollen zeigte in der Gruppe der Patienten mit ADEM und CIS gegenüber beiden Kontrollgruppen signifikant erhöhte Antikörpertiter ($p < 0.001$, Abb. 5.3). Der Cut-off Wert für nMOG IgG-Seropositivität wurde definiert als $\Delta\text{MFI} = 38,1$ (Median+95% Perzentile der pädiatrischen gesunden und neurologischen Kontrollen), hohe Antikörpertiter wurden definiert als $\Delta\text{MFI} > 109,8$ (Median+99% Perzentile der pädiatrischen gesunden und neurologischen Kontrollen). Anti-nMOG-IgG-Antikörper waren bei 46,8% (22/47) der Patienten mit demyelinisierenden Erkrankungen und 7,1% der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (2/28) nachweisbar. Hohe Anti-nMOG IgG-Antikörpertiter konnten bei 40,4% (19/47) der Kinder mit demyelinisierenden Erkrankungen, nicht jedoch bei gesunden oder neurologischen Kontrollpatienten nachgewiesen werden.

Auch im Vergleich zu den Antikörperreaktivitäten bei erwachsenen Patienten mit CIS und MS waren die nMOG IgG-Titer bei Kindern mit ADEM und CIS signifikant erhöht ($p < 0.001$, Abb. 5.4).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Anti-nMOG IgG-Titern bei Patienten mit ADEM und CIS (Abb. 5.5), auch die Frequenz Anti-nMOG IgG hoch positiver Patienten unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden

Patientengruppen. 42,9% der Patienten mit CIS (12/28) waren nMOG IgG-positiv, 35,7% (10/28) waren hoch positiv. Patienten mit ADEM waren in 52,6% (10/19) nMOG IgG-positiv, hoch positiv waren 47,4% (9/19).

Die Anti-nMOG-Antikörpertiter bei Patienten mit CIS wurden hinsichtlich ihres prädiktiven Werts für die Entwicklung einer Multiplen Sklerose innerhalb des Follow-up-Zeitraums von durchschnittlich zwei Jahren (Spannweite 0,5-4,6 Jahre bei ADEM, 1,0-4,0 Jahre bei CIS) untersucht. Patienten mit Klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und Patienten mit Progress zu MS innerhalb von durchschnittlich zwei Jahren nach Erstmanifestation (CIS→MS) zeigten bei Erstmanifestation ähnlich hohe Antikörpertiter (Abb. 5.6). Ein Patient mit ADEM entwickelte eine Multiple Sklerose, er war bei Erstmanifestation nMOG IgG hoch positiv.

Eine Zusammenfassung der Antikörperreaktivitäten gegenüber nMOG bei Patienten und Kontrollen zeigt Tab. 2.

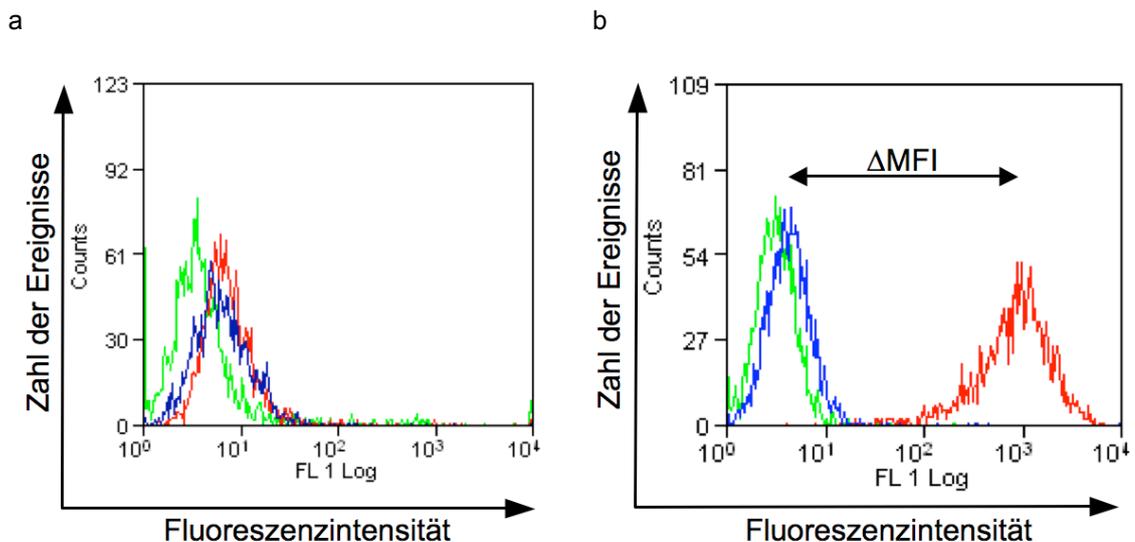


Abb. 5.1: Durchflusszytometrie zum Nachweis von Anti-nMOG IgG und Anti-nPLP IgG Antikörpern im Serum

Repräsentative FACS-Histogramme eines Anti-nMOG IgG-negativen und -positiven Patienten. Der spezifische Antikörpertiter gegenüber dem jeweiligen ZNS-Protein ergibt sich als Δ MFI aus der Differenz zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Protein-exprimierenden (LN18-MOG, rot), LN18-PLP, grün) und der Kontrollzelllinie (LN18-CTR, blau) nach Inkubation mit 1:100 verdünntem Patientenserum und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper.

- a) Patient: Anti-nMOG IgG-negativ, Anti-nPLP IgG-negativ
- b) Patient: Anti-nMOG IgG-positiv, Anti-nPLP IgG-negativ

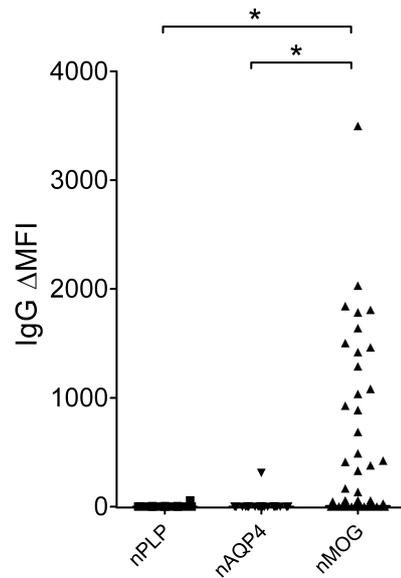


Abb. 5.2: IgG-Serumantikörper gegen nPLP, nAQP4 und nMOG bei Patienten und Kontrollen

IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber den nativen ZNS-Proteinen Proteolipid Protein (nPLP), Aquaporin-4 (nAQP4) und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (nMOG) bei Patienten und Kontrollen.

* $p < 0.001$.

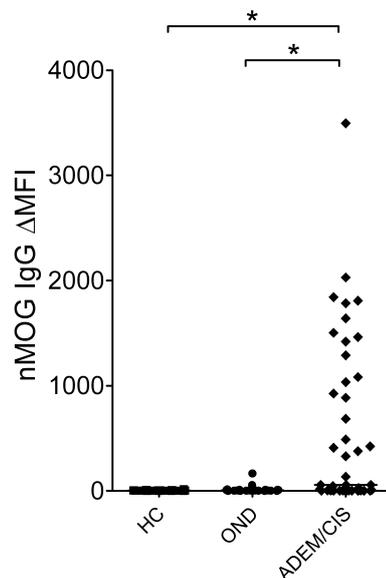


Abb. 5.3: IgG-Serumantikörper gegen nMOG bei Kindern mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen sowie gesunden und neurologischen pädiatrischen Kontrollen

Die IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber dem nativen ZNS-Protein nMOG bei Kindern mit ADEM und CIS (ADEM/CIS), gesunden Kontrollen (HC) und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND) wurden nach Inkubation der jeweiligen Zelllinie mit Serum der Patienten und Kontrollen in der Verdünnung 1:100 und nachfolgender Markierung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der spezifische Antikörpertiter berechnet sich als $nMOG \text{ IgG } \Delta MFI = MFI[LN18-MOG] - MFI[LN18-CTR]$. Mittelwerte aus drei Messungen und Median der Gruppen (horizontale Markierung) sind angegeben.

* $p < 0.001$

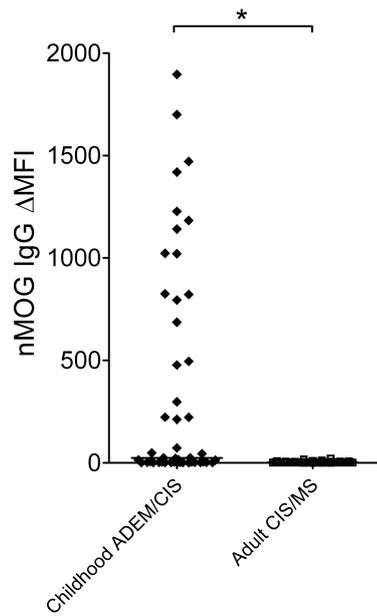


Abb. 5.4: IgG-Serumantikörper gegen nMOG bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen

IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber nMOG bei Kindern mit ADEM und CIS (Childhood ADEM/CIS) im Vergleich zu Erwachsenen mit CIS und MS (Adult CIS/MS). Der Median der Gruppen ist angegeben (horizontale Markierung).

* $p < 0.001$

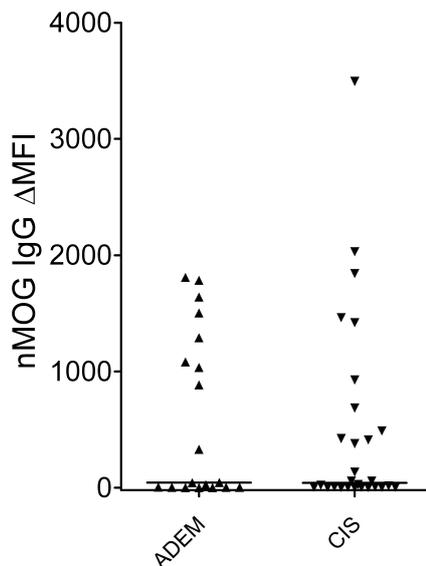


Abb. 5.5: IgG-Serumantikörper gegen nMOG bei ADEM und CIS

IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber nMOG bei Kindern mit ADEM und CIS. Der Median ist angegeben (horizontale Markierung).

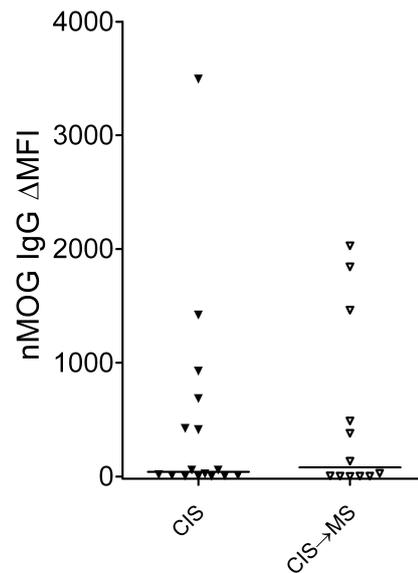


Abb. 5.6: IgG-Serumantikörper gegen nMOG und Krankheitsverlauf bei Patienten mit Klinisch isoliertem Syndrom

IgG-Antikörperreaktivitäten gegen nMOG bei Kindern mit Klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und mit Progression zu MS innerhalb des Beobachtungszeitraums von durchschnittlich zwei Jahren (CIS → MS). Der Median ist angegeben (horizontale Markierung).

5.1.1.2 IgM-Antikörper gegen nMOG

Die durchflusszytometrische Detektion von IgM-Antikörpern gegen natives Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein zeigte bei drei Patienten aus dem Patientenkollektiv Anti-nMOG IgM-Antikörper. Diese Anti-nMOG IgM-positiven Patienten waren an ADEM erkrankt und zeigten ebenfalls hohe IgG-Antikörpertiter gegen nMOG. Somit wiesen drei der 19 Patienten mit ADEM (15,8%) IgM-Antikörper gegen nMOG auf. Abb. 5.7 zeigt repräsentative FACS-Histogramme Anti-nMOG IgM-negativer und -positiver Patienten. Weder bei Patienten mit CIS noch bei neurologischen und gesunden pädiatrischen Kontrollen konnten Anti-nMOG IgM-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 5.8).

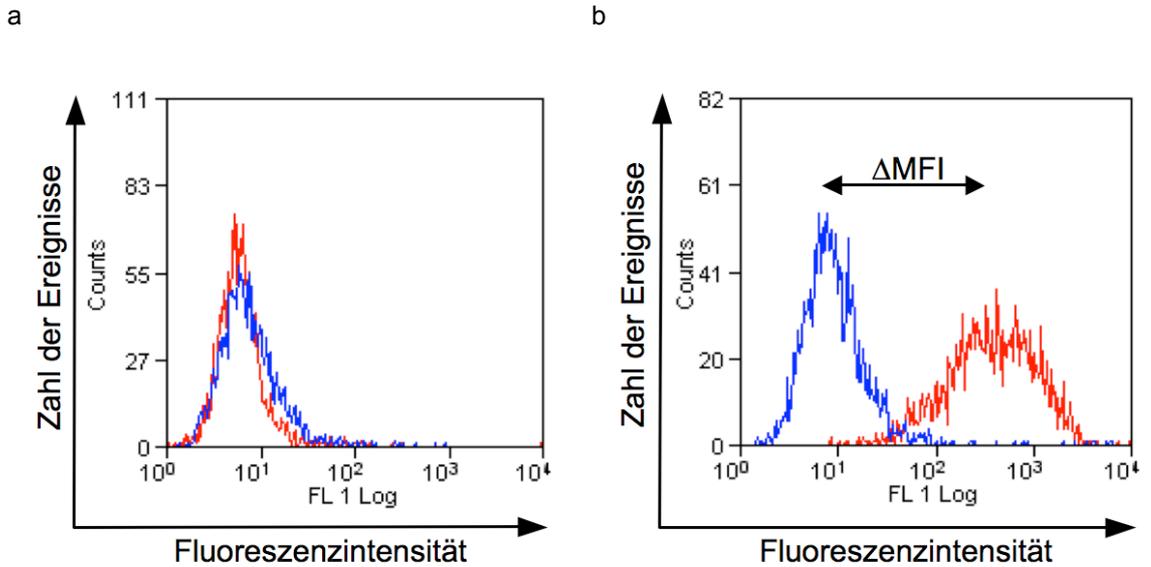


Abb. 5.7: Durchflusszytometrie zum Nachweis von Anti-nMOG IgM Antikörpern im Serum

Repräsentative FACS-Histogramme eines Anti-nMOG IgM-negativen und -positiven Patienten. Der spezifische Antikörpertiter gegenüber MOG ergibt sich als ΔMFI aus der Differenz zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Protein-exprimierenden (LN18-MOG, rot) und der Kontrollzelllinie (LN18-CTR, blau) nach Inkubation mit 1:100 verdünntem Patientenserum und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper.

a) Patient: Anti-nMOG IgM-negativ

b) Patient: Anti-nMOG IgM-positiv

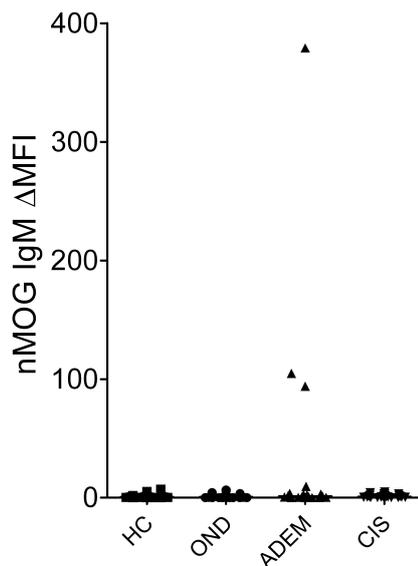


Abb. 5.8: IgM-Serumantikörper gegen nMOG

IgM-Antikörperreaktivitäten gegen nMOG bei Patienten mit ADEM und CIS sowie neurologischen (OND) und gesunden (HC) Kontrollen.

Tabelle 2: IgG- und IgM-Antikörper gegen natives MOG im Serum bei Patienten und Kontrollen

Diagnose	nMOG-IgG hoch positiv	nMOG-IgM hoch positiv
HC	0/30 (0%)	0/30 (0%)
OND	0/28 (0%)	0/28 (0%)
ADEM	9/19 (47,4%)	3/19 (15,8%)
CIS	10/28 (35,7%)	0/28 (0%)
ADEM → MS	1/1 (100%)	0/1 (0%)
CIS → MS	5/12 (41,7%)	0/12 (0%)

HC: gesunde Kontrollen, OND: andere neurologische Erkrankungen, ADEM: Akute disseminierte Enzephalomyelitis, CIS: Klinisch isoliertes Syndrom, MS: Multiple Sklerose

5.1.2 IgG-Antikörper gegen nMOG im Liquor

Zum Nachweis einer intrathekalen Synthese nMOG-spezifischer IgG-Antikörper wurden die Antikörperreaktivitäten in Serum und Liquor einiger Patienten untersucht. Hierzu wurden die IgG-Konzentrationen in Liquor und Serum auf die gleiche Konzentration verdünnt und die Bindung an die LN18-MOG Zelllinie untersucht.

In Abb. 5.9 sind die nMOG-spezifischen Antikörperindices der Liquor-Serum-Paare dargestellt. Drei der untersuchten Patienten wiesen intrathekale nMOG-spezifische IgG-Synthese auf, in diesen Fällen lag der spezifische Antikörperindex über 1.5. Diese drei Patienten gehörten der Patientengruppe mit Klinisch isoliertem Syndrom an.

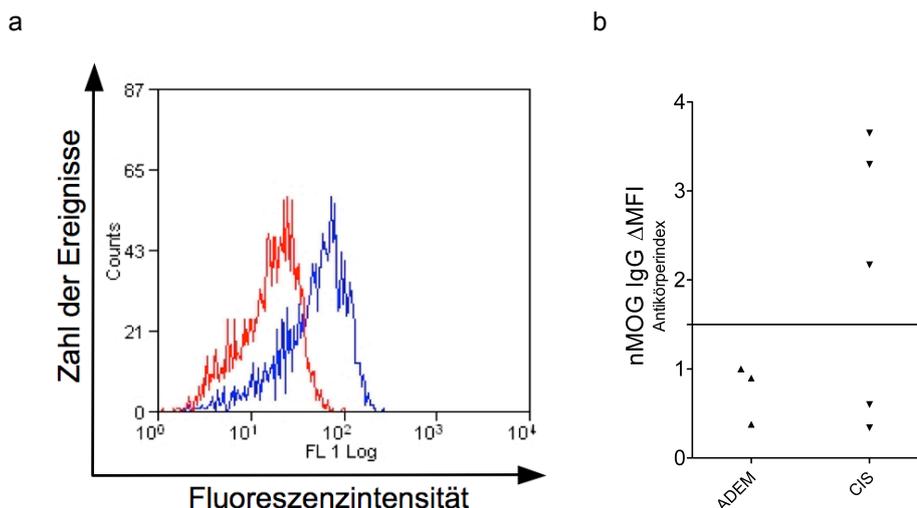


Abb. 5.9: Intrathekale nMOG-spezifische IgG-Synthese

a) Repräsentatives FACS-Histogramm eines Patienten mit IgG-Antikörpern gegen nMOG in Serum (rot) und Liquor (blau).

b) Antikörperindices einiger Patienten mit ADEM und CIS. Der Index berechnete sich als Quotient der nMOG-spezifischen IgG-Antikörper in Liquor und Serum bei gleicher Gesamt-IgG-Konzentration. Ein Antikörperindex >1.5 (horizontale Linie) spricht für intrathekale Synthese MOG-spezifischer IgG-Antikörper.

5.2 Zytotoxisches Potenzial der Antikörper gegen natives MOG *in vitro*

5.2.1 Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Komplement-vermittelten Zytotoxizität *in vitro* sind in Abb. 5.10-5.12 zusammengefasst. Nach Inkubation der nMOG-exprimierenden Zelllinie (LN18-MOG) sowie der Kontrollzelllinie (LN18-CTR) mit IgG nMOG-IgG-positiver und -negativer Patienten sowie Anti-nMOG-Antikörper-negativem Serum als Komplementquelle zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Komplement-abhängigen Lyse der Zellen (Abb. 5.10 und 5.11). Es konnte keine Korrelation zwischen nMOG-IgG-Antikörpertiter im Serum und Ausmaß des Komplement-vermittelten zytotoxischen Potenzials des IgG *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 5.12).

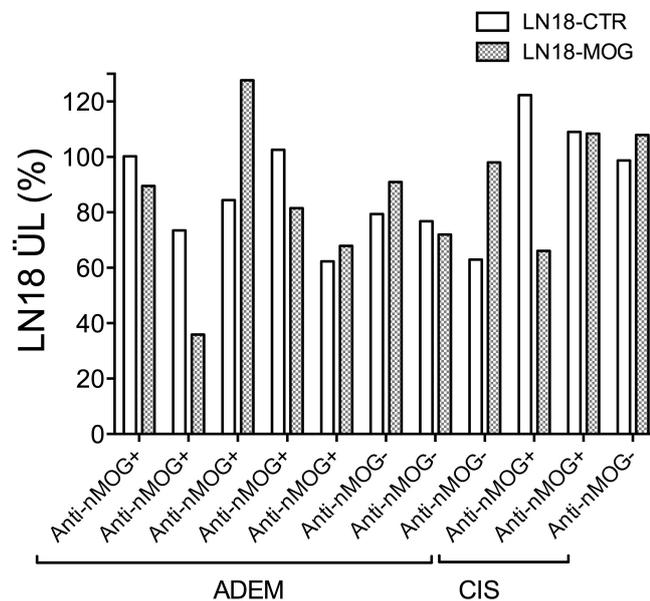


Abb. 5.10: Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Prozentuales Überleben (LN18 ÜL (%)) der LN18-MOG und LN18-CTR Zellpopulationen nach 16-stündiger Inkubation mit IgG von Anti-nMOG-Antikörper-positiven (Anti-nMOG+) beziehungsweise Anti-nMOG-Antikörper-negativen (Anti-nMOG-) Patienten mit ADEM und CIS sowie Serum als Komplementquelle. Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen sind angegeben.

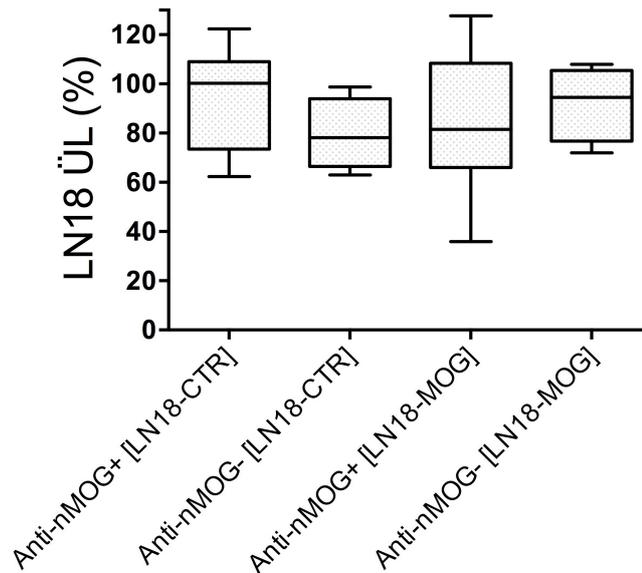


Abb. 5.11: Komplement-vermittelter zytotoxischer Effekt der IgG-Antikörper nMOG-IgG-positiver und nMOG-IgG-negativer Patienten auf die LN18-CTR- und LN18-MOG-Zelllinie

Prozentuales Überleben (LN18 ÜL (%)) der LN18-CTR und LN18-MOG Zellpopulationen nach Inkubation mit IgG-Antikörpern von Anti-nMOG-positiven (Anti-nMOG+, n=7) und Anti-nMOG-negativen Patienten (Anti-nMOG-, n=4) und Komplementquelle.

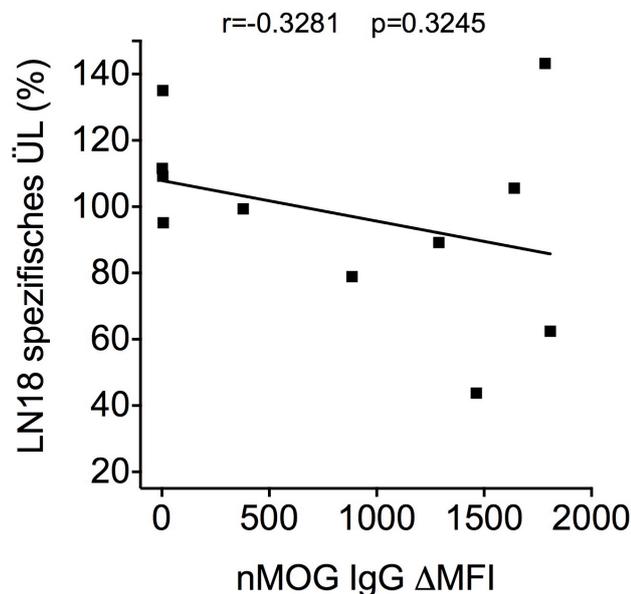


Abb. 5.12: IgG-Serumantikörpertiter gegen nMOG und zytotoxische Aktivität des IgG nach Komplementzugabe

Korrelation zwischen nMOG IgG-Antikörpertiter (nMOG IgG ΔMFI) und prozentuaalem spezifischem Überleben der LN18-MOG-Zelllinie [LN18 ÜL (%) = 100% – (prozentuales Überleben (LN18-CTR) – prozentuales Überleben (LN18-MOG))] nach Inkubation mit IgG und Komplement. Das spezifische Überleben wurde aus Mittelwerten aus jeweils zwei Messungen des prozentualen Überlebens der LN18-CTR- und LN18-MOG-Zelllinie berechnet.

5.2.2 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität

IgG-Antikörper, die aus Anti-nMOG-IgG-positiven Patientenseren isoliert wurden, hatten im *in vitro* Assay zur NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf MOG-exprimierende Zellen im Vergleich zu IgG aus Antikörper-negativen Seren (Abb. 5.13). Es zeigte sich eine signifikant stärkere NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität ($p < 0.03$) von nMOG-Antikörper-haltigem Serum-IgG auf die MOG-exprimierende Zelllinie im Vergleich zu nMOG-Antikörper-negativem Serum-IgG. Dagegen haben IgG-Antikörper der Anti-nMOG-IgG positiven Patienten keine NK-Zell-vermittelten zytotoxischen Effekte auf die LN18-CTR Zelllinie, die kein MOG auf der Zellmembran exprimiert ($p < 0.005$, Abb. 5.14).

Es zeigte sich zudem eine signifikante Korrelation zwischen Serum-Anti-nMOG-IgG-Antikörpertitern der Patienten und dem Ausmaß der Antikörper-abhängigen NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität (Abb. 5.15).

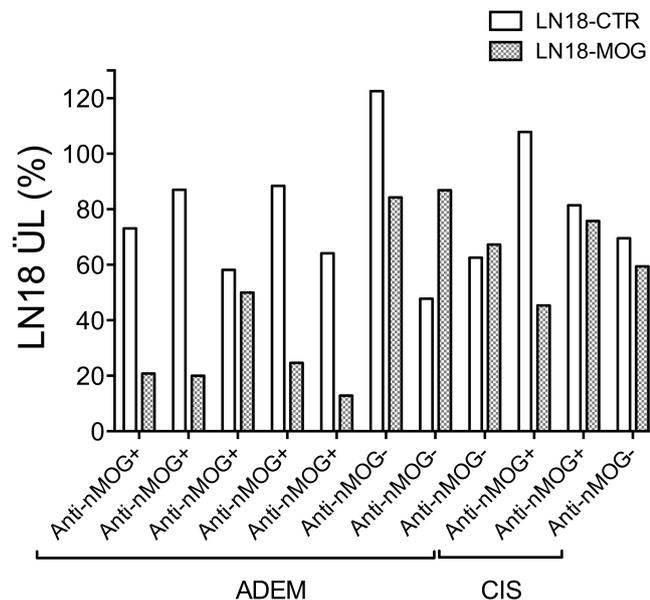


Abb. 5.13: Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Prozentuales Überleben (LN18 ÜL (%)) der LN18-MOG und LN18-CTR-Zellpopulationen nach 12-stündiger Inkubation mit IgG Anti-nMOG-positiver (Anti-nMOG+) bzw. Anti-nMOG-negativer (Anti-nMOG-) Patienten mit ADEM und CIS sowie CD56+ NK-Zellen. Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen sind angegeben.

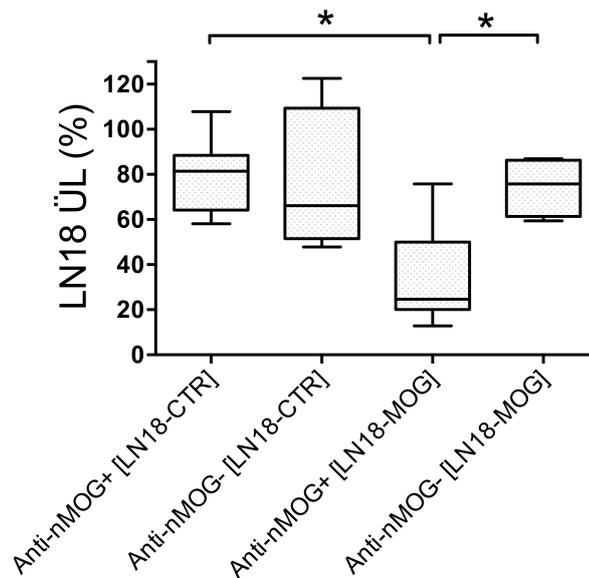


Abb. 5.14: NK-Zell-vermittelter zytotoxischer Effekt der IgG-Antikörper nMOG-IgG-positiver und nMOG-IgG-negativer Patienten auf die LN18-CTR- und LN18-MOG-Zelllinie

Prozentuales Überleben (LN18 ÜL (%)) der LN18-MOG und LN18-CTR Zellpopulationen nach Inkubation mit Anti-nMOG-positivem (Anti-nMOG+, n=7) und Anti-nMOG-negativem IgG (Anti-nMOG-, n=4) und NK-Zellen.

* p<0.03

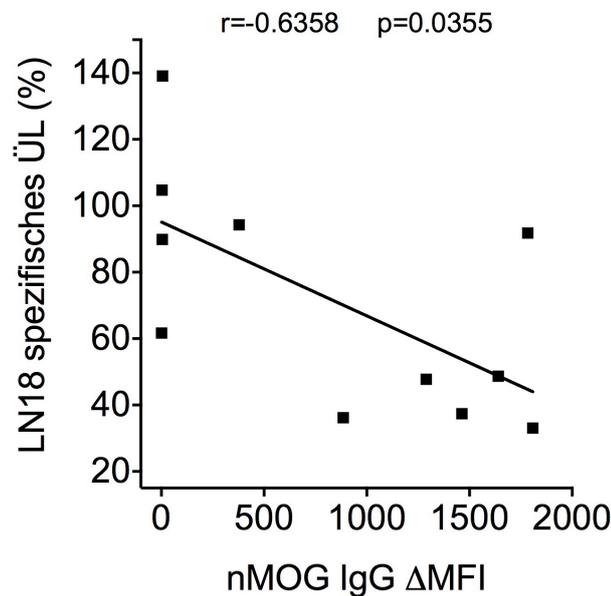


Abb. 5.15: IgG-Serumantikörpertiter gegen nMOG und zytotoxische Aktivität des IgG nach Zugabe von NK-Zellen

Korrelation zwischen nMOG IgG-Antikörpertiter (nMOG IgG ΔMFI) und prozentalem spezifischem Überleben [LN18 ÜL (%) = 100% – (prozentuales Überleben (LN18-CTR) – prozentuales Überleben (LN18-MOG))] nach Inkubation mit IgG und NK-Zellen. Das spezifische Überleben wurde aus Mittelwerten aus jeweils zwei Messungen des prozentualen Überlebens der LN18-CTR- und LN18-MOG-Zelllinie berechnet.

5.3 Antikörper gegen Herpesviren

5.3.1 EBV

Die Auswertungen der ELISAs zur Detektion von Antikörpern gegen die EBV-Proteine EBNA-1 und EA sind in Tab. 3 und Abb. 5.16 - 5.20 dargestellt. 43,1% der neurologischen und gesunden Kontrollpatienten, 42,1% der Kinder mit ADEM und 64% der Patienten mit Klinisch isoliertem Syndrom zeigten eine erhöhte IgG-Antwort gegenüber EBNA-1 (Abb. 5.16). Patienten mit CIS zeigten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Titer ($p=0.0318$). Zwischen Patienten mit CIS und mit Progression zu MS innerhalb von zwei Jahren besteht in diesem Kollektiv kein signifikanter Unterschied bezüglich des EBNA-1 IgG-Antikörperstatus (66,7% vs. 60%, Abb. 5.17).

IgM-Antikörper gegen EA konnten ausschließlich bei drei Kindern detektiert werden, die an ADEM erkrankt waren. 15,8% (3/19) der ADEM-Patienten waren somit Anti-EA IgM-positiv (Abb. 5.18, Abb. 5.19).

Es zeigte sich keine Assoziation zwischen IgG-Antikörpertitern gegen nMOG und gegen EBNA-1 bei EBNA-1 IgG-positiven Patienten mit ADEM und CIS (Abb. 5.20).

Tabelle 3: IgG-Antikörper gegen EBNA-1 und IgM-Antikörper gegen EA bei Patienten und Kontrollen

Diagnose	EBNA-1 IgG positiv	EA IgM positiv
HC	15/30 (50%)	0/30 (0%)
OND	10/28 (35,7%)	0/28 (0%)
ADEM	8/19 (42,1%)	3/19 (15,8%)
CIS	16/25 (64%)	0/25 (0%)
CIS → MS	6/10 (60%)	0/10 (0%)

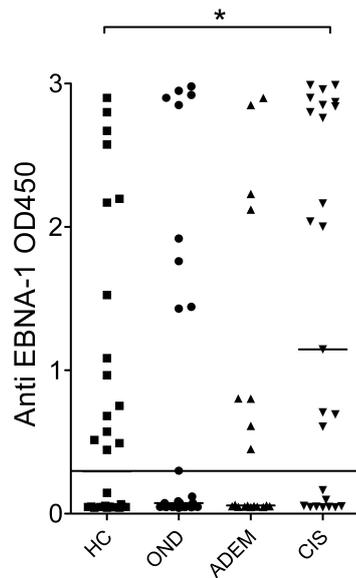


Abbildung 5.16: IgG-Antikörper gegen EBV bei Patienten und Kontrollen

IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber EBNA-1 bei Patienten mit ADEM und CIS sowie gesunden (HC) und neurologischen (OND) Kontrollen. OD450 = Optische Dichte bei 450 nm (Maß für den Antikörpertiter). Der Median ist angegeben.

Cut-off für Seropositivität = 0.297 (horizontale Linie).

* $p < 0.05$

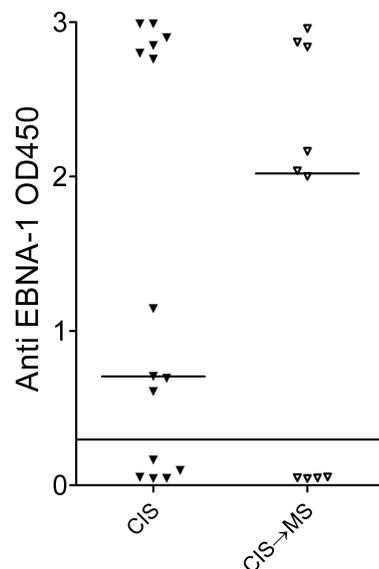


Abb. 5.17: EBNA-1 IgG und Krankheitsverlauf

Anti-EBNA-1 IgG-Antikörpertiter bei Patienten mit CIS und mit Progression zu MS innerhalb von durchschnittlich zwei Jahren nach einem CIS (CIS → MS). Der Median ist angegeben.

Cut-off für Seropositivität = 0.297 (horizontale Linie).

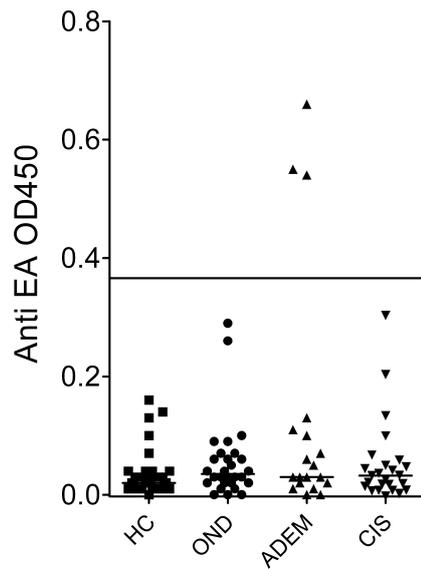


Abb. 5.18: IgM-Antikörper gegen EBV bei Patienten und Kontrollen

IgM-Antikörperreaktivitäten gegenüber EA bei Patienten mit ADEM und CIS und gesunden (HC) und neurologischen (OND) Kontrollen. Der Median ist angegeben.

Cut-off für Seropositivität = 0.366 (horizontale Linie).

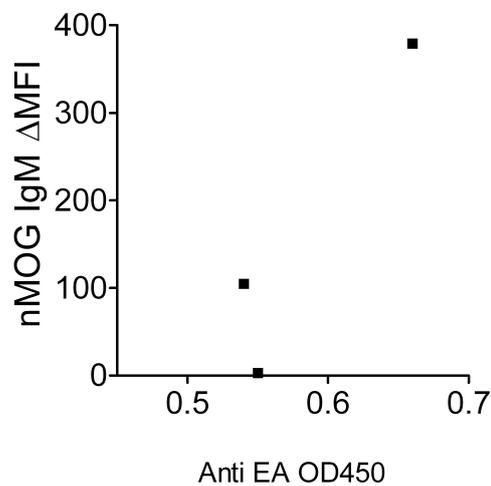


Abb. 5.19: EA IgM- und nMOG IgM-Titer

EA IgM- und nMOG IgM-Titer bei EA IgM-positiven Patienten mit ADEM

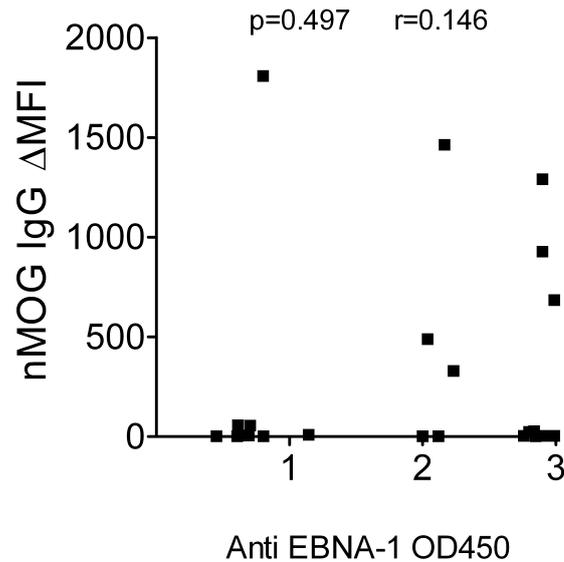


Abb. 5.20: Korrelationsanalyse

Korrelation zwischen Anti-EBNA-1 IgG- und Anti-nMOG IgG-Titer bei EBNA-1 IgG-positiven Patienten mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen.

5.3.2 HHV-6

Die Untersuchung der IgG-Antikörperantwort gegen HHV-6 zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Antikörperprävalenz zwischen Patienten mit ADEM und CIS und Kontrollen (Tab. 4 und Abb. 5.21). Zudem bestand hinsichtlich Antikörpertitern und -prävalenz kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit CIS und solchen mit Progress zu MS innerhalb von zwei Jahren (92,9% vs. 80%, Abb. 5.22). Die Korrelation zwischen Anti-HHV-6- und Anti-nMOG IgG-Antikörpertitern bei HHV-6 positiven Patienten mit demyelinisierenden Erkrankungen erreichte kein Signifikanzniveau (Abb. 5.23).

Tabelle 4: IgG-Antikörper gegen HHV-6 bei Patienten und Kontrollen

Diagnose	HHV-6 IgG positiv
HC	25/30 (83,3%)
OND	25/28 (89,3%)
ADEM	14/18 (77,8%)
CIS	21/24 (87,5%)
CIS → MS	8/10 (80%)

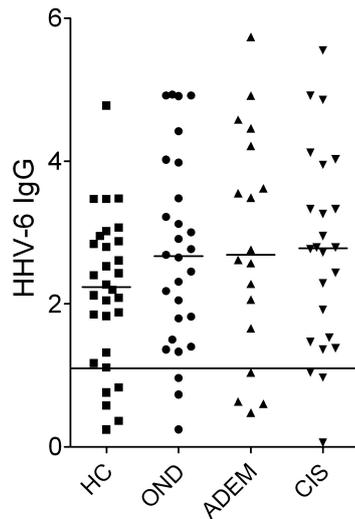


Abb. 5.21: IgG-Antikörper gegen HHV-6 bei Patienten und Kontrollen

IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber HHV-6 bei Patienten mit ADEM und CIS sowie gesunden (HC) und neurologischen (OND) Kontrollen. Der Median ist angegeben.

Cut-off für Seropositivität = 1.1 (horizontale Linie).

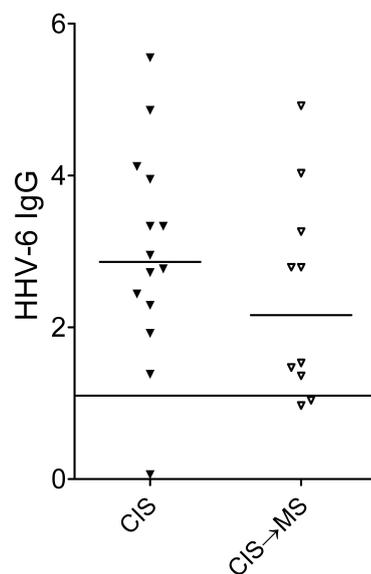


Abb. 5.22: HHV-6 IgG und Krankheitsverlauf

Anti-HHV-6 IgG bei Patienten mit CIS und mit Progress zu MS innerhalb des Follow-up Zeitraums von durchschnittlich zwei Jahren. Der Median ist angegeben.

Cut-off für Seropositivität = 1.1 (horizontale Linie).

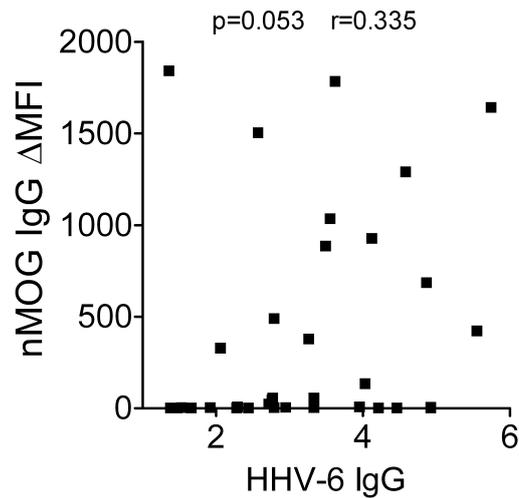


Abb. 5.23: Korrelationsanalyse

Korrelation zwischen HHV-6-IgG und nMOG-IgG bei HHV-6 IgG-positiven Patienten mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen.

5.3.3 HCMV

Patienten mit CIS zeigten im Vergleich zu gesunden und neurologischen Kontrollen signifikant erhöhte IgG-Antikörpertiter gegen HCMV ($p=0.0097$, siehe Tab. 5 und Abb. 5.24). Allerdings bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit CIS und solchen mit Progression zu MS innerhalb des Beobachtungszeitraums (58,3% vs. 44,4%, Abb. 5.25). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Anti-nMOG- und Anti-HCMV -IgG-Titer bei HCMV-positiven Patienten (Abb. 5.26).

Tabelle 5: IgG-Antikörper gegen HCMV bei Patienten und Kontrollen

Diagnose	HCMV IgG positiv
HC	1/30 (3,3%)
OND	4/28 (14,3%)
ADEM	3/15 (21,4%)
CIS	11/21 (52,4%)
CIS → MS	4/9 (44,4%)

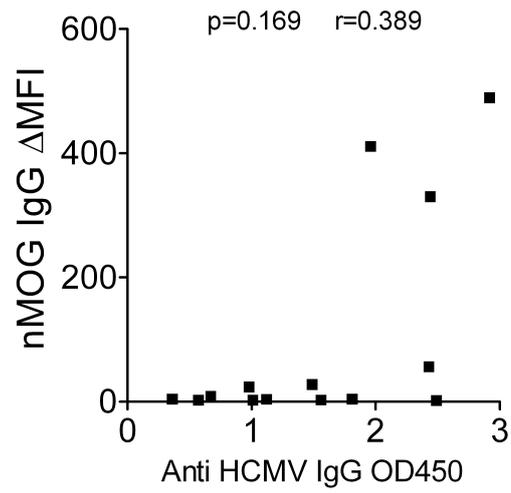


Abb. 5.26: Korrelationsanalyse

Korrelation zwischen Anti-HCMV IgG und Anti-nMOG IgG bei HCMV-IgG-positiven Patienten mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen.

6 DISKUSSION

Ausgehend von verschiedenen Studien, in denen Antikörper gegen Myelinproteine bei Patienten mit Multipler Sklerose nachgewiesen werden konnten (siehe Kap. 2.1.1), wurden in der vorliegenden Arbeit die Antikörperantworten gegenüber den nativen ZNS-Proteinen nMOG, nPLP und nAQP4 bei Kindern mit Erstmanifestation einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung untersucht.

Da die pathogenetischen Mechanismen, die dem Klinisch isolierten Syndrom und der Akuten disseminierten Enzephalomyelitis zugrunde liegen, nicht hinreichend geklärt sind, in histopathologischen Studien aber Komplement- und Antikörperablagerungen in MS-Läsionen nachgewiesen werden konnten (siehe Kap. 2.1.1 - 2.1.3), sollte im Falle eines Nachweises von Serum-Antikörpern das zytotoxische Potenzial dieser Antikörper *in vitro* untersucht werden.

Vor dem Hintergrund des wiederholten Nachweises erhöhter Antikörpertiter gegen Herpesviren, insbesondere EBV, bei erwachsenen Patienten mit Multipler Sklerose (siehe Kap. 2.1.4) stellte sich die Frage nach stattgehabten viralen Infektionen während der Erstmanifestation entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen im Kindesalter. Daher wurden auch die Antikörperantworten gegenüber den Herpesviren EBV, HHV-6 und HCMV untersucht. Schließlich ergab sich aus den Antikörpernachweisen die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und der Entwicklung Myelin-spezifischer Antikörper.

6.1 Serum-IgG- und IgM-Antikörper gegen natives MOG

Histopathologische Befunde, insbesondere der Nachweis von Plasmazellen, IgG- und Komplementablagerungen in den Läsionen sowie das Vorhandensein von Oligoklonalen Banden im Liquor von Patienten mit MS lassen auf eine Rolle von B-Zellen und Antikörpern in der Pathogenese der Multiplen Sklerose schließen (Hauser et al. 1986, Gay et al. 1997, O'Connor et al. 2001).

Lucchinetti et al. beschrieben vier histopathologische Typen von MS-Läsionen, die sich in der Zusammensetzung des Zellinfiltrats sowie der Antikörper- und Komplementablagerungen unterscheiden. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass nicht ein einziger Mechanismus, sondern unterschiedliche Trigger über verschiedene Effektormechanismen zur Pathogenese der MS beitragen können (Lucchinetti et al. 2000). Barnett et al. zeigten jedoch, dass im Krankheitsverlauf intraindividuell unterschiedliche Läsionscharakteristika vorherrschen, was für eine

Heterogenität der histopathologischen Charakteristika in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium spricht (Barnett et al. 2004). Auch Beij et al. konnten 2008 die interindividuelle Diversität der MS-Läsionen nicht bestätigen, sie beschrieben bei etablierter MS eine homogene Histopathologie aktiv-demyelinisierender Läsionen, gekennzeichnet durch Komplement- und Antikörperablagerungen sowie Makrophageninfiltrate (Breij et al. 2008). In allen genannten histopathologischen Studien gelang jedoch der Nachweis von Antikörperablagerungen im Bereich der MS-Läsionen. Die Untersuchung der Gene der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette von B-Zellen im Liquor von MS-Patienten zeigte ausgeprägte somatische Hypermutationen, was für eine antigenabhängige Affinitätsreifung der B-Zellklone in Folge wiederholter Exposition gegenüber dem selben Antigen und gegen eine unspezifische Bystander-Aktivierung der B-Zellen im entzündlichen Milieu spricht (Qin et al. 1998, Colombo et al. 2000, Hemmer et al. 2002, Owens et al. 2003).

Autoantikörpern gegen ZNS-Proteine wurde wiederholt eine pathogenetische Rolle im Demyelinisierungsprozess bei MS und verwandten Erkrankungen zugeschrieben. NMO-IgG, ein Antikörper gegen Aquaporin-4, konnte als spezifischer Serummarker bei Neuromyelitis optica identifiziert und der Nachweis als diagnostisches Kriterium etabliert werden (Lennon et al. 2004, Wingerchuk et al. 2006). Bei Multipler Sklerose wird insbesondere MOG als potenzielles Autoantigen der Immunantwort diskutiert. MOG wird auf der Myelinoberfläche exprimiert und seine extrazelluläre N-terminale Domäne ist leicht für Autoantikörper erreichbar (Kroepfl et al. 1996).

Im Tiermodell der EAE tragen MOG-spezifische Antikörper zum Demyelinisierungsprozess bei (Schluesener et al. 1987, Linington et al. 1988, Adelman et al. 1995) und in MS-Läsionen konnten MOG-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (O'Connor et al. 2005). Zudem wurden Antikörper gegen MOG wiederholt im Serum von Patienten mit MS und CIS detektiert, doch die Ergebnisse bezüglich diagnostischer und prädiktiver Wertigkeit des Antikörpernachweises variieren stark (Reindl et al. 1999, Berger et al. 2003, Kuhle et al. 2007b). Erste Untersuchungen zeigten bei MS-Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen MOG in Serum und Liquor (Sun et al. 1991, Xiao et al. 1991, Kerlero De Rosbo et al. 1993), doch die Spezifität der Antikörper für MS blieb unklar (Reindl et al. 1999, Lindert et al. 1999). In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Anti-MOG-Antikörpertiters und der Prognose nach einem Klinisch isolierten Syndrom (Tomassini et al. 2007, Rauer et al. 2006, Kuhle et al. 2007b), dem klinischen Verlauf (Lalive et al.

2006, Zhou et al. 2006) und der Läsionslast im MRT (Kuhle et al. 2007a) kontrovers beurteilt.

Die Heterogenität der Ergebnisse ist sicherlich zum einen in Unterschieden der Studienpopulationen begründet, andererseits in der unterschiedlichen Methodik zur Detektion der Antikörper. In den meisten Studien wurden MOG-Antikörper mittels ELISA oder Western Blot detektiert. Nur in wenigen Studien wurde bisher natives MOG zur Detektion der Antikörper verwendet (Zhou et al. 2006, Lalive et al. 2006, O'Connor et al. 2007). Pittock et al. konnten durch parallele Verwendung von Western Blot und ELISA zur Detektion von MOG-spezifischen Antikörpern zeigen, dass diese beiden Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und schlossen, dass die Verwendung linearer MOG-Epitope, die *in vivo* nur teilweise auf der Myelinoberfläche lokalisiert sind, zur Detektion von pathogenetisch relevanten Antikörpern problematisch ist (Pittock et al. 2007). Die Verwendung einer Zelllinie, die wie in der vorliegenden Arbeit ein natives humanes Protein auf der Zelloberfläche exprimiert, bietet durch die Integration des Proteins in die Zellmembran sowie dessen physiologische Konformation und die astrozytäre posttranslationale Modifikation die Möglichkeit, Antikörper gegen den extrazellulären Anteil des nativen Proteins detektieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit zeigten etwa 40% der Kinder mit ADEM und CIS hohe IgG-Antikörpertiter gegen natives MOG. Die Antikörpertiter waren gegenüber den gesunden und neurologischen pädiatrischen Kontrollen signifikant erhöht. Auch von erwachsenen Patienten mit MS und CIS unterschied sich die Höhe der Antikörpertiter signifikant. Es zeigte sich jedoch bezüglich der Antikörperprävalenz oder der Titerhöhe weder ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit ADEM und CIS noch zwischen Patienten mit CIS und solchen, die innerhalb des Beobachtungszeitraums von durchschnittlich zwei Jahren nach dem Erstereignis eine Multiple Sklerose entwickelten. IgM-Antikörper gegen nMOG konnten im Serum von drei Patienten mit ADEM nachgewiesen werden.

Weder gesunde und neurologische Kontrollpatienten noch Kinder mit ADEM oder CIS zeigten signifikant erhöhte IgG-Antikörpertiter gegen natives PLP oder AQP4.

So haben die Anti-nMOG IgG-Antikörper in diesem Patientenkollektiv bei klinischer Erstmanifestation einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung im Kindesalter keine Aussagekraft hinsichtlich der Differenzialdiagnose zwischen ADEM und CIS und können auch nicht die Entwicklung von MS innerhalb von zwei Jahren prognostizieren, doch die Befunde sprechen für eine spezifische IgG-Antikörperantwort gegen natives

MOG bei Kindern mit Akuter disseminierter Enzephalomyelitis und Klinisch isoliertem Syndrom. Kinder mit Erstmanifestation entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen waren bisher nicht Gegenstand der Untersuchungen MOG-spezifischer Antikörper. Auch gab es nur eine Studie, die Antikörper gegen natives MOG bei Patienten mit ADEM untersuchte (O'Connor et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnten somit erstmals hohe Antikörpertiter gegen natives MOG bei Kindern mit ADEM und CIS nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung der Spezifität der MOG-Antikörper bei Kindern mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen wäre die Untersuchung des Antikörperstatus in einem größeren Kollektiv von Kindern mit infektiösen und metabolischen ZNS-Erkrankungen sowie anderen Autoimmunerkrankungen notwendig. Könnte sich bei Kindern eine Spezifität der Antikörper bestätigen, wären sie bei unklaren klinischen Bildern möglicherweise sogar in Zusammenschau mit klinischen und radiologischen Befunden zur Abgrenzung eines Erstereignisses entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen gegenüber infektiösen und metabolischen ZNS-Erkrankungen hilfreich.

IgM-Antikörper gegen natives MOG wurden bei knapp 16% der Patienten mit ADEM nachgewiesen. Dieser Befund ist vereinbar mit der Annahme einer akuten postinfektiösen Autoimmunreaktion bei ADEM. Weder bei gesunden und neurologischen Kontrollpatienten noch bei Patienten mit CIS konnten IgM-Antikörper gegen natives MOG nachgewiesen werden. Der Nachweis von Anti-MOG-Antikörpern der Klasse IgM bei Erstmanifestation einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung könnte ein spezifischer, wenn auch kein sensitiver Hinweis auf das Vorliegen einer ADEM sein. Zudem könnten sich aus dem Nachweis der IgM-Antikörper Hinweise auf eine unterschiedliche Pathogenese von ADEM und CIS ergeben. Bei ADEM, die sich meist 2-4 Wochen nach Infektionen oder Impfungen manifestiert, kommt es möglicherweise primär zu einer Freisetzung von ZNS-Autoantigenen im Rahmen der initialen Infektion und nach einigen Wochen zu einer frühen IgM-Antikörperantwort gegenüber MOG. Im Gegensatz dazu könnten bei Patienten mit CIS primär IgG-Antikörper gegen Myelinkomponenten vorliegen. Auch bezüglich dieser Fragestellung wären die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs und longitudinale Untersuchungen wünschenswert.

Aufgrund dieser Arbeit ist nicht davon auszugehen, dass der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen natives MOG zur Differenzierung zwischen ADEM und CIS bei Kindern mit klinischer Erstmanifestation einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung beiträgt. Auch in einer vorherigen Studie konnte bei Patienten mit ADEM

bereits Antikörper gegen MOG nachgewiesen werden (O'Connor et al. 2007). Die Homogenität der Antikörpertiter in den Gruppen der Kinder mit CIS und solchen, die innerhalb der folgenden zwei Jahre nach dem Erstereignis eine definitive MS entwickelten, zeigt in diesem Kollektiv, dass ein hoher IgG-Antikörpertiter gegen nMOG während eines CIS bei Kindern nicht prädiktiv für die Progression zu definitiver MS im genannten Zeitraum ist. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen einiger Studien überein, in denen keine prognostische Bedeutung MOG-spezifischer Antikörper nach einem CIS festgestellt werden konnte (Kuhle et al. 2007b).

Sinnvoll wäre allerdings eine Ausweitung des klinischen Nachbeobachtungszeitraums insbesondere der Patienten mit CIS, um die Möglichkeit einer späteren Progression zu MS einzuschließen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass bei zehn der 13 Kinder mit Progress zu MS in diesem Kollektiv der zweite Schub innerhalb des ersten Jahres nach Erstmanifestation auftrat. Banwell et al. beobachteten, dass bei einem Großteil der Kinder mit MS das zweite klinische Ereignis innerhalb eines Jahres nach der klinischen Erstmanifestation folgt (Banwell et al. 2007).

Wünschenswert wäre zudem die Beobachtung der Entwicklung der Antikörpertiter im weiteren Krankheitsverlauf bei CIS und ADEM. Daraus könnten sich weitere Hinweise auf eine unterschiedliche pathogenetische Rolle der Antikörper bei diesen Erkrankungen ergeben. In einer Studie, die etwa zeitgleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde, konnten bereits vergleichbar hohe MOG-spezifische Antikörpertiter bei pädiatrischen Patienten mit MS nachgewiesen werden (McLaughlin et al. 2009). Über den Antikörperverlauf bei Patienten mit ADEM gibt es bisher keine Daten.

Unter pathogenetischen Gesichtspunkten wäre es darüber hinaus sinnvoll, bei einer größeren Gruppe von Kindern mit infektiös-entzündlichen Erkrankungen des ZNS, wie beispielsweise Virusenzephalitiden, die Antikörperreaktivitäten gegen natives MOG zu untersuchen. Dies könnte einen wichtigen Beitrag zur Fragestellung leisten, ob Anti-nMOG-Antikörper in der Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen primär auftreten oder möglicherweise mit einer größeren Wahrscheinlichkeit eine unspezifische Antwort auf entzündliche ZNS-Gewebeschädigungen allgemein darstellen. Im Rahmen des entzündlichen Milieus der MS-Läsionen könnte es sekundär zu einer polyklonalen unspezifischen B-Zellantwort kommen oder eine initial gegen ein bestimmtes Epitop gerichtete Immunantwort sich auf benachbarte Epitope ausweiten (Tuohy et al. 1997). Auch eine Antikörperproduktion als Epiphänomen der

Gewebeschädigung mit Antigenfreisetzung und sekundärer B-Zell-Aktivierung wäre denkbar.

Gegen eine sekundäre generalisierte Autoantikörperinduktion in Folge einer initialen Gewebeschädigung oder einer unspezifischen B-Zell-Antwort spricht aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit allerdings die fehlende Nachweisbarkeit von Antikörpern gegen PLP und AQP4 im untersuchten Patientenkollektiv.

Der fehlende Nachweis AQP4-spezifischer Antikörper bei Patienten mit ADEM bestätigt die Spezifität des NMO-IgG für Neuromyelitis optica bei pädiatrischen Patienten (Banwell et al. 2008). Dies ist von Bedeutung, da eine ADEM sich als isolierte Optikusneuritis oder Querschnittsmyelitis manifestieren kann. Das Fehlen von vergleichbar hohen Antikörpertitern bei erwachsenen Patienten mit MS und CIS könnte zudem ein Hinweis auf eine unterschiedliche Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter sein.

6.2 Intrathekale IgG-Synthese gegen natives MOG

In ZNS-Läsionen von Patienten mit Multipler Sklerose konnten in verschiedenen Studien MOG-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Genain et al. 1999, O'Connor et al. 2005). Auch im Liquor von Patienten mit MS wurden Antikörper gegen MOG sowie MOG-reaktive T-Zellen nachgewiesen (Sun et al. 1991, Xiao et al. 1991). Allerdings wurden auch bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen mittels Western Blot intrathekale IgG-Antikörper gegen MOG detektiert (Reindl et al. 1999).

Im vorliegenden Patientenkollektiv konnte eine intrathekale IgG-Produktion gegen natives MOG bei drei von fünf Patienten mit CIS festgestellt werden, von denen einer innerhalb des Beobachtungszeitraums MS entwickelte.

Dieser Befund ist kongruent zu den genannten Studien, in denen der Nachweis von MOG-spezifischen Antikörpern im Liquor und in ZNS-Läsionen von MS-Patienten gelang.

Limitierend hinsichtlich der Signifikanz des Nachweises der intrathekalen Anti-nMOG IgG-Antikörper ist in der vorliegenden Arbeit allerdings die kleine Stichprobe. Dennoch ergibt sich aus dem Nachweis einer intrathekalen Synthese von MOG-spezifischen Antikörpern bei Kindern mit CIS ein weiterer Hinweis auf eine mögliche pathogenetische Rolle der IgG-Antikörper gegen MOG bei Klinisch isoliertem Syndrom.

6.3 Zytotoxizität des nMOG-IgG *in vitro*

Histopathologische Studien konnten zeigen, dass Oligodendrozytenverlust ein Merkmal der MS-Läsionen in frühen Krankheitsstadien ist (Barnett et al. 2004). Die pathogenetischen Prozesse, die dem Oligodendrozytenuntergang zugrunde liegen, sind jedoch nicht hinreichend verstanden. Für Neuromyelitis optica spezifische Serum- und Liquor-IgG-Antikörper gegen Aquaporin-4 haben *in vitro* zytotoxische Effekte auf AQP4-exprimierende Zellen und induzieren im Tiermodell eine Neuromyelitis optica-ähnliche Pathologie (Hinson et al. 2007, Bennett et al. 2009, Bradl et al. 2009).

Die Tatsache, dass wiederholt Immunglobulin-Ablagerungen in aktiven MS-Läsionen identifiziert wurden, lässt die Frage nach der pathogenetischen Relevanz von Antikörpern im Prozess der Demyelinisierung aufkommen. In histopathologischen Untersuchungen konnten Komplementproteine in MS-Läsionen nachgewiesen werden (Storch et al. 1998a, Barnett et al. 2009), bei erwachsenen MS-Patienten wurde ein zytotoxischer Effekt des Serums auf MOG-exprimierende Zellen gezeigt (Zhou et al. 2006).

Die Rolle der Natürlichen Killerzellen in der Pathogenese entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen ist unklar. Einige Studien gaben Hinweise auf eine mögliche Rolle von NK-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose. Ein Fehlen des FcR γ -Rezeptors der NK-Zellen wirkt wie auch ein Mangel an NK-Zellen im Mausmodell der MOG-induzierten EAE protektiv, möglicherweise durch verminderte Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Abdul-Majid et al. 2002, Winkler-Pickett et al. 2008). Bei Patienten mit schubförmiger MS konnte eine Korrelation zwischen NK-Zell-Aktivität und Läsionslast im MRT sowie eine Reduktion der NK-Zell-Aktivität im peripheren Blut während der Schübe, möglicherweise durch Migration der NK-Zellen ins ZNS, gezeigt werden (Kastrukoff et al. 1998). Zudem waren in einer Studie Patienten mit Multipler Sklerose gegenüber gesunden Kontrollen signifikant häufiger HLA-Bw4-negativ (Lorentzen et al. 2009). HLA-Bw4 ist der Ligand des inhibitorischen KIR3DL1-Rezeptors auf Natürlichen Killerzellen, die Interaktion zwischen KIR3DL1 auf NK-Zellen und HLA-Bw4 auf Zielzellen führt zur Inhibierung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zelle, dementsprechend führt HLA-Bw4-Negativität zu verstärkter Aktivierung der NK-Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung des Komplementsystems sowie der Antikörper-abhängigen NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität am Untergang der Oligodendrozyten *in vitro* untersucht. Dabei ergab sich kein Anhalt für eine Rolle des

Komplementsystems im Demyelinisierungsprozess bei ADEM und CIS im Kindesalter, IgG aus nMOG-positiven Patientenseren in Verbindung mit Komplement hatte keinen signifikanten zytotoxischen Effekt auf MOG-exprimierende Zielzellen. Möglicherweise liegen demyelinisierenden Erkrankungen im Kindesalter andere pathogenetische Mechanismen zugrunde als bei Erwachsenen, wie auch die deutlich höheren Antikörpertiter gegen MOG bei Kindern mit ADEM und CIS im Vergleich zu erwachsenen Patienten mit CIS und MS vermuten lassen.

Im Gegensatz dazu ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Rolle der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität im Demyelinisierungsprozess. Aus Anti-nMOG IgG-positiven Patientenseren isoliertes IgG induzierte *in vitro* in Verbindung mit natürlichen Killerzellen die Lyse MOG-exprimierender Zellen. Der zytotoxische Effekt von IgG der nMOG-IgG-positiven Patienten auf MOG-exprimierende Zellen war gegenüber dem Effekt auf die Kontrollzelllinie signifikant.

Darüber hinaus zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Anti-nMOG IgG-Titer im Serum der einzelnen Patienten und der NK-Zell-vermittelten zytotoxischen Aktivität des IgG.

Der Nachweis von Autoantikörpern im Serum bedeutet nicht zwangsläufig, dass diese pathogenetisch von Bedeutung sind. Voraussetzungen für die Pathogenität eines Antikörpers sind zunächst sein Vorhandensein am Ort der Gewebeschädigung und die Erkennung der nativen Form des Zielantigens (O'Connor et al. 2005). Somit stellt sich die Frage nach der pathogenetischen Relevanz der in diversen Studien nachgewiesenen Antikörper gegen denaturiertes MOG im Serum von erwachsenen Patienten mit MS. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Glioblastom-Zelllinie verwendet, die das humane Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein in seiner nativen Konformation auf der Zelloberfläche exprimiert. Bei einigen Patienten wurde in der vorliegenden Arbeit zudem die intrathekale Synthese von MOG-spezifischem IgG gezeigt. Zwar ist aus Ergebnissen, die *in vitro* gewonnen wurden, nicht ohne weiteres ein Rückschluss auf eine pathogenetische Rolle von Antikörpern *in vivo* möglich, die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass IgG-Antikörper gegen das native Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein *in vitro* NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität induzieren können. Anti-nMOG IgG-Antikörper könnten demnach über Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) eine Rolle im Demyelinisierungsprozess bei Kindern mit ADEM und CIS spielen, was mit dem histopathologisch nachgewiesenen Oligodendrozytenverlust in frühen Krankheitsstadien bei MS vereinbar ist (Barnett et al. 2004).

In der Zusammenschau könnte bei Kindern mit entzündlich-demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen durch mangelnde Inhibition oder einen gesteigerten Aktivierungszustand der NK-Zellen oder aber begünstigt durch das proinflammatorische Milieu der MS-Läsionen der inhibitorische Effekt der auf Oligodendrozyten exprimierten MHC-I-Moleküle überwunden und über die Bindung MOG-spezifischer Antikörper eine zytotoxische NK-Zell-Antwort in Form des ADCC initiiert werden.

Daneben wäre eine weitere Form der Zytotoxizität denkbar, die ebenfalls durch Bindung des Fc-Rezeptors der NK-Zelle an zellgebundene Antikörper bedingt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Mikroglia über den Fc-Rezeptor *in vitro* durch Quervernetzung von Anti-MOG-Antikörpern Veränderungen des MOG-Proteins selbst sowie auch des Zytoskeletts von Oligodendrozyten initiieren kann (Marta et al. 2008). Analog könnte dieser Mechanismus auch durch die Bindung des Fc-Rezeptors von NK-Zellen an MOG-spezifische Antikörper, die an die Oligodendrozytenmembran binden, ausgelöst werden.

6.4 Antikörper gegen EBV, HHV-6 und HCMV

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Antikörperreaktivitäten gegenüber nMOG lassen darauf schließen, dass bei einem Teil der Kinder mit CIS und ADEM eine Immunantwort gegen MOG besteht, die möglicherweise auch pathogenetische Relevanz im Demyelinisierungsprozess hat. Die initialen Ereignisse, die zur Entwicklung der MOG-spezifischen Antikörper führen, sind allerdings nicht klar.

Virale Antigene können durch molekulare Mimikry zu Autoimmunreaktionen führen (Fujinami et al. 1985, Wucherpfennig et al. 1995, Hemmer et al. 1997), insbesondere Herpesviren wurden wiederholt mit MS assoziiert. Zwar gab es bereits Studien zur Assoziation von Virusinfektionen mit Multipler Sklerose bei Kindern (Alotaibi et al. 2004, Pohl et al. 2006, Banwell et al. 2007, Lünemann et al. 2008), bisher jedoch keine Untersuchungen zum Antikörperstatus beim klinischen Erstereignis einer entzündlich-demyelinisierenden ZNS-Erkrankung im Kindesalter.

Hohe EBV-spezifische Antikörpertiter wurden wiederholt im Serum von erwachsenen MS Patienten nachgewiesen, eine Studie zeigte sogar einen Zusammenhang zwischen Antikörpertiter und Krankheitsaktivität im MRT (Farrell et al. 2009). Ob die EBV-Infektion jedoch das ZNS selbst betrifft, bleibt umstritten (Serafini et al. 2007, Willis et al. 2009, Sargsyan et al. 2010). In einer Studie wurde allerdings ein Zusammenhang zwischen den IgG-Antikörperantworten gegenüber MOG und EBNA-1 bei erwachsenen MS Patienten beschrieben (Wang et al. 2008).

Auch HHV-6 wurde wiederholt mit der Entstehung von MS assoziiert. Hinweise ergaben sich unter anderem durch den Nachweis viraler Proteine in Oligodendrozyten in MS-Läsionen (Challoner et al. 1995) sowie HHV-6-spezifischer IgG-Antikörper im Serum und Liquor von MS-Patienten (Gutierrez et al. 2002, Sundström et al. 2004, Derfuss et al. 2005). Auch die Infektion durch HCMV wurde mehrfach mit der Entwicklung von MS in Verbindung gebracht, erhöhte HCMV-spezifische Antikörpertiter bei Kindern mit MS fanden sich jedoch bisher nicht (Banwell et al. 2007).

Daher wurden neben der Antikörperantwort gegenüber ZNS-Autoantigenen auch die Antikörperreaktivitäten gegen EBV, HCMV und HHV-6 untersucht, zudem die Beziehung zwischen zurückliegender Virusinfektion und dem Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen nMOG.

Kinder mit klinisch isoliertem Syndrom zeigten verglichen mit gesunden pädiatrischen Kontrollen signifikant erhöhte IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber dem EBV-Protein EBNA-1, welches eine latente EBV-Infektion anzeigt sowie gegenüber HCMV. Die HCMV-Seropositivitätsrate war bei Patienten mit CIS deutlich erhöht gegenüber gesunden Kontrollen, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und Patienten mit ADEM. Auch IgG-Antikörper gegen EBV waren häufiger bei Patienten mit CIS als in den Kontrollgruppen nachweisbar, obwohl das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppen höher war. Jedoch zeigten auch EBNA-1 IgG-negative Patienten Antikörper gegen nMOG. Eine Korrelation zwischen Anti-EBNA-1-IgG- und Anti-nMOG IgG-Titern bei EBV-IgG-positiven Patienten zeigte sich nicht, was gegen eine kreuzreagierende Antikörperantwort gegenüber den Proteinen spricht. Analog fand sich keine Assoziation zwischen den IgG-Antikörpertitern gegenüber HCMV und nativem MOG bei HCMV-seropositiven Patienten. Der von Wang et al. 2008 postulierte Zusammenhang zwischen den IgG-Antikörpertitern gegenüber MOG und EBNA-1 bei erwachsenen MS-Patienten kann in diesem Kollektiv somit nicht bestätigt werden. Zugrunde liegen könnte den unterschiedlichen Ergebnissen einerseits die unterschiedliche Patientenkohorte, andererseits die unterschiedlichen Methoden der Antikörperdetektion. Während Wang et al. die MOG-spezifischen Antikörper mit einem ELISA bestimmten, verwendeten wir eine Zelllinie, die MOG auf der Zelloberfläche exprimiert und so die Detektion von Antikörpern gegen das native Protein ermöglicht. Patienten mit Progress zu MS innerhalb des Beobachtungszeitraums von durchschnittlich zwei Jahren zeigten weder signifikant höhere Titer gegenüber EBV und

HCMV noch eine höhere Seropositivitätsrate als Patienten mit Klinisch isoliertem Syndrom.

Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das frühe EBV-Protein EA, das für eine frische Infektion und in Gegenwart von EBNA-1 IgG für eine Reaktivierung der Infektion spricht, gelang in diesem Kollektiv ausschließlich bei Kindern mit ADEM. Drei der Patienten mit ADEM, jedoch kein Patient mit CIS und keiner der neurologischen und gesunden Kontrollen zeigte EA IgM-Antikörper. Zwei der drei EA IgM-positiven Patienten waren EBNA-1 IgG-positiv, entsprechend einer Reaktivierung, bei einem Patienten ließen sich ausschließlich IgM-Antikörper als Zeichen einer frischen EBV-Infektion nachweisen.

Die Untersuchung der IgG-Antikörperantworten gegenüber HHV-6 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich Antikörpertitern und Seroprävalenz. Auch zeigte sich bei seropositiven Patienten mit ADEM und CIS kein Zusammenhang zwischen den IgG-Antikörpertitern gegenüber HHV-6 und MOG.

Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Studien, in denen bei Kindern mit MS im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Antikörperprävalenzen und -titer gegenüber EBV beschrieben wurden (Alotaibi et al. 2004, Pohl et al. 2006, Lünemann et al. 2008, Banwell et al. 2007). Allerdings konnten in einer früheren Studie bei Kindern mit MS keine erhöhten HCMV-Antikörpertiter festgestellt werden (Banwell et al. 2007).

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den oben genannten Studien zur Assoziation von HHV-6-Infektion und MS bei Erwachsenen.

Eine frische Infektion mit EBV oder eine Reaktivierung könnte eine Rolle in der Entwicklung von Anti-nMOG Antikörpern der Klasse IgM spielen, denn bei zwei von drei Kindern mit Anti-nMOG-IgM konnten auch IgM-Antikörper gegen EA nachgewiesen werden. Alle drei nMOG IgM-positiven ADEM-Patienten waren EBNA-1 IgG-positiv, zwei von ihnen zeigten erhöhte IgM-Titer gegen EA als Zeichen der Reaktivierung.

Die Befunde in diesem Kollektiv sprechen weder für eine Rolle der HHV-6-Infektion in der Entwicklung demyelinisierender Erkrankungen, noch für eine Kreuzreaktivität zwischen HHV-6 und MOG.

Obwohl sich kein Hinweis ergab, dass das Vorhandensein von Anti-nMOG-IgG-Antikörpern mit einer zurückliegenden EBV-oder HCMV-Infektion zusammenhängt, könnten diese Infektionen zur Entwicklung eines Klinisch isolierten Syndroms beitragen. Neben einer Kreuzaktivierung autoreaktiver T- oder B-Zellen (O'Connor et

al. 2001, Sospedra et al. 2005) könnten Virusinfektionen auch durch die Freisetzung von Autoantigenen durch Gewebeschädigungen im Rahmen der Infektion (Sospedra et al. 2005, Hemmer et al. 2006), durch eine unspezifische B-Zell-Aktivierung im lokalen entzündlichen Milieu von MS-Läsionen (Archelos et al. 2000) oder durch die Infektion und Immortalisierung autoreaktiver B-Zellen mit nachfolgender Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (Pender 2003) eine chronische Autoimmunantwort initiieren. Andererseits könnte auch die Apoptose EBV-infizierter B-Zellen in MS-Läsionen zu einer Freisetzung von EBNA-1 und in der Folge zu hohen EBV-spezifischen Antikörpertitern führen (Rand et al. 2000), die ohne pathogenetische Relevanz sind. Allerdings konnten bei Erwachsenen schon bis zu 30 Jahre vor MS-Manifestation erhöhte EBNA-1-Antikörpertiter festgestellt werden, was für eine Rolle der EBV-Infektion früh in der Pathogenese der MS und gegen eine sekundäre Antikörperproduktion als Ursache der hohen EBV-Antikörpertiter spricht (DeLorenze et al. 2006).

Darüber hinaus könnten die Antikörperbefunde durchaus Hinweise auf eine möglicherweise unterschiedliche Pathogenese von ADEM und CIS geben: Während eine zurückliegende EBV- oder HCMV-Infektion in diesem Patientenkollektiv mit einem erhöhten Risiko eines Klinisch isolierten Syndroms assoziiert ist, könnte eine frische EBV-Infektion oder -Reaktivierung zur Entwicklung einer ADEM beitragen und eine IgM-Antikörperantwort gegen natives MOG induzieren.

Zusammenfassend zeigt sich bei Kindern mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen keine Korrelation zwischen dem Anti-nMOG IgG-Titer und den Antikörperantworten gegenüber den untersuchten Viren EBV, HHV-6 und HCMV. Diese Beobachtung spricht stark gegen eine Kreuzreaktivität zwischen den diesen Viren und MOG als Ursache der Synthese der MOG-spezifischen IgG-Antikörper bei einem Teil der Patienten. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine akute EBV-Infektion oder -Reaktivierung bei einer Untergruppe von Patienten mit ADEM eine frühe IgM-Antwort gegen natives MOG triggert, denn EA-IgM war bei zwei von drei Anti-MOG IgM positiven Patienten nachweisbar. Die gegenüber den gesunden Kontrollen signifikant erhöhten IgG-Antikörpertiter gegenüber HCMV sowie EBV bei Patienten mit CIS bedürfen weiterer Untersuchungen, sprechen aber für eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch diese Infektionen unabhängig vom MOG-IgG-Antikörperstatus. Bei fehlender Kreuzreaktivität mit nativem MOG kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage nach der möglichen pathogenetischen Rolle einer frühen Infektion durch EBV oder HCMV nicht sicher beantwortet werden. In diesem

Zusammenhang wäre bei Patienten mit CIS die Untersuchung auf Antikörper gegenüber weiteren lymphotropen Viren (z.B. HHV-7) anzustreben, um der Möglichkeit erhöhter Antikörperreaktivitäten infolge einer unspezifischen polyklonalen B-Zell-Antwort (Archelos et al. 2000) oder der Freisetzung von viralen Proteinen aus apoptotischen B-Zellen (Rand et al. 2000) bei einem CIS nachzugehen. Die Tatsache, dass die Antikörpertiter gegenüber HHV-6 bei den Patienten im vorliegenden Kollektiv nicht signifikant erhöht waren, spricht allerdings gegen eine unspezifische generalisierte B-Zell-Aktivierung. Auch waren die EBV-IgG-positiven Patienten nur teilweise identisch mit den HCMV-IgG-positiven Patienten.

Zu beachten ist in jedem Fall, dass sich die IgG-Antikörperreaktivitäten gegenüber EBV und HCMV bei Patienten mit ADEM von den Antikörpertitern in den Kontrollgruppen nicht wesentlich unterscheiden. Problematisch ist in diesem Zusammenhang jedoch das niedrige Durchschnittsalter der Patienten mit ADEM im Vergleich zu Patienten mit CIS und den Kontrollgruppen. Sollte sich diese Beobachtung allerdings in weiteren Studien bestätigen, könnte sie ein Hinweis auf mögliche pathogenetische Unterschiede zwischen ADEM und CIS sein.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden Seren von 47 Kindern im Alter zwischen 1,8 und 15,5 Jahren mit Erstereignis einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung (Akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM, n=19), Klinisch isoliertes Syndrom (CIS, n=28)) sowie 28 Kinder mit anderen neurologischen Erkrankungen und 30 gesunde Kinder auf das Vorkommen von IgG- und IgM-Antikörpern gegen natives Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (nMOG), natives Proteolipid Protein (nPLP) sowie natives Aquaporin-4 (nAQP4) untersucht. Dazu wurden transfizierte LN18-Glioblastomzelllinien verwendet, die die nativen Proteine auf der Zellmembran exprimierten, sowie eine Kontrollzelllinie. Durch Inkubation der Zellen mit Serum und Alexa 488-gekoppeltem fluoreszierendem Sekundärantikörper sowie anschließende Durchflusszytometrie erfolgte die Detektion und Quantifizierung der Antikörperantworten. Daneben wurden bei einigen Patienten MOG-spezifische IgG-Antikörper im Liquor nachgewiesen. Zur Untersuchung einer möglichen pathogenetischen Rolle der Antikörper gegen natives MOG wurden die MOG-exprimierende sowie die Kontrollzelllinie mit aufgereinigtem Patienten-IgG sowie je nach Fragestellung mit komplementhaltigem Serum zur Untersuchung der Komplement-vermittelten Zytotoxizität beziehungsweise mit Natürlichen Killerzellen zur Untersuchung der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die Überlebensraten der Zellpopulationen bestimmt. Zudem wurden IgM-Antikörper gegen das Epstein-Barr-Virus (EBV)-Protein EA sowie IgG-Antikörper gegen das EBV-Protein EBNA-1, gegen Humanes Herpesvirus-6 (HHV-6) sowie gegen Humanes Cytomegalie-Virus (HCMV) bei Patienten und Kontrollen mittels ELISA detektiert.

Bei Kindern mit ADEM und CIS zeigten sich gegenüber gesunden und neurologischen Kontrollen signifikant erhöhte IgG-Antikörpertiter gegen natives MOG, etwa 40% der Kinder mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen waren hoch positiv. Die Antikörperreaktivitäten unterschieden sich weder signifikant zwischen Patienten mit ADEM und CIS noch zwischen Patienten mit CIS und solchen mit weiterer Krankheitsaktivität innerhalb des Beobachtungszeitraums von durchschnittlich zwei Jahren. Weder bei Kindern mit Erstereignis einer demyelinisierenden Erkrankung noch in den Kontrollgruppen konnten Antikörper gegen natives PLP oder AQP4 nachgewiesen werden. Bei einigen Kindern mit CIS zeigte die Liquoruntersuchung eine intrathekale Synthese von IgG-Antikörpern gegen natives MOG. IgM-Antikörper gegen

natives MOG wurden bei drei Kindern mit ADEM, jedoch nicht bei Patienten mit CIS oder Kontrollen nachgewiesen. Die Untersuchung der Antikörper-abhängigen NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität zeigte einen signifikanten zytotoxischen Effekt von MOG-positivem Patienten-IgG in Verbindung mit NK-Zellen auf die MOG-exprimierende Zelllinie sowie eine Korrelation zwischen Anti-nMOG IgG-Antikörpertiter und zytotoxischem Effekt des IgG.

Die IgG-Antikörperreaktivitäten gegen EBV und HCMV waren bei Patienten mit Klinisch Isoliertem Syndrom gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht, gegenüber HHV-6 zeigte sich keine erhöhte IgG-Antikörperreaktivität bei Kindern mit ADEM oder CIS. Es bestand keine Assoziation zwischen virusspezifischen IgG-Antikörperreaktivitäten und IgG-Antikörpern gegen natives MOG bei EBV-, CMV- oder HHV-6 IgG-positiven Patienten. IgM-Antikörper gegen EA konnten nur bei drei Patienten mit ADEM nachgewiesen werden, zwei der EA IgM-positiven Patienten waren Anti-nMOG IgM-positiv.

Hohe Anti-nMOG IgG-Titer diskriminieren Kinder mit ADEM und CIS von gesunden Kontrollen und Kindern mit anderen neurologischen Erkrankungen. Im Gegensatz dazu zeigten sich weder erhöhte Antikörpertiter gegen AQP4 noch gegen PLP, so dass bei Kindern mit ADEM und CIS von einer spezifischen Antikörperantwort gegenüber MOG auszugehen ist. Dennoch trägt der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen nMOG bei klinischer Erstmanifestation einer demyelinisierenden Erkrankung weder zur Differenzierung zwischen CIS und ADEM bei, noch haben die Antikörpertiter beim Erstereignis einen prognostischen Wert hinsichtlich der Entwicklung einer MS innerhalb von durchschnittlich zwei Jahren. Die spezifische Bindung von Serum-Antikörpern von Kindern mit CIS und ADEM an die MOG-exprimierende Zelllinie sowie die Zytotoxizität der Antikörper *in vitro* lässt darauf schließen, dass MOG ein Zielantigen des humoralen Immunsystems bei Kindern mit entzündlich-demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS darstellt. Zwei der EA IgM-positiven Patienten mit ADEM waren Anti-nMOG IgM-positiv, so dass bei einem Teil der Patienten mit ADEM eine EBV-Infektion oder -Reaktivierung eine frühe IgM-Antwort gegen natives MOG auslösen könnte. Die Ergebnisse lassen zudem darauf schließen, dass zwar die latente Infektion mit HCMV oder EBV das Risiko eines CIS erhöht, die Entwicklung von IgG-Antikörpern gegen natives MOG jedoch nicht durch eine EBV-, HHV-6- oder HCMV-Infektion getriggert wird.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Majid K.B., Stefferl A., Bourquin C., Lassmann H., Linington C., Olsson T., Kleinau S., Harris R.A. Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 55 (2002) 70-81.
- Adams C.W., Poston R.N., Buk S.J. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 92 (1989) 291-306.
- Adelmann M., Wood J., Benzel I., Fiori P., Lassmann H., Matthieu J.M., Gardinier M.V., Dornmair K., Linington C. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63 (1995) 17-27.
- Aichele P., Bachmann M.F., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* 152 (1996) 21-45.
- Akhyani N., Berti R., Brennan M.B., Soldan S.S., Eaton J.M., McFarland H.F., Jacobson S. Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis* 182 (2000) 1321-1325.
- Alotaibi S., Kennedy J., Tellier R., Stephens D., Banwell B. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 291 (2004) 1875-1879.
- Alvarez-Lafuente R., De Las Heras V., Bartolome M., Picazo J.J., Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* 61 (2004) 1523-1527.
- Anlar B., Basaran C., Kose G., Guven A., Haspolat S., Yakut A., Serdaroglu A., Senbil N., Tan H., Karaagaoglu E., Karli Oguz K. Acute disseminated encephalomyelitis in children: outcome and prognosis. *Neuropediatrics* 34 (2003) 194-199.
- Archelos J.J., Storch M.K., Hartung H.P. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47 (2000) 694-706.

- Ascherio A., Munch M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11 (2000) 220-224.
- Ascherio A., Munger K.L., Lennette E.T., Spiegelman D., Hernan M.A., Olek M.J., Hankinson S.E., Hunter D.J. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 286 (2001) 3083-3088.
- Banwell B., Krupp L., Kennedy J., Tellier R., Tenenbaum S., Ness J., Belman A., Boiko A., Bykova O., Waubant E., Mah J.K., Stoian C., Kremenchutzky M., Bardini M.R., Ruggieri M., Rensel M., Hahn J., Weinstock-Guttman B., Yeh E.A., Farrell K., Freedman M., Iivanainen M., Sevon M., Bhan V., Dilenge M.E., Stephens D., Bar-or A. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 6 (2007) 773-781.
- Banwell B., Reder A.T., Krupp L., Tenenbaum S., Eraksoy M., Alexey B., Pohl D., Freedman M., Schelensky L., Antonijevic I. Safety and tolerability of interferon beta-1b in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 66 (2006) 472-476.
- Banwell B., Tenenbaum S., Lennon V.A., Ursell E., Kennedy J., Bar-Or A., Weinshenker B.G., Lucchinetti C.F., Pittock S.J. Neuromyelitis optica-IgG in childhood inflammatory demyelinating CNS disorders. *Neurology* 70 (2008) 344-352.
- Barnett M.H., Parratt J.D., Cho E.S., Prineas J.W. Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann Neurol* 65 (2009) 32-46.
- Barnett M.H., Prineas J.W. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55 (2004) 458-468.
- Bennett J.L., Lam C., Kalluri S.R., Saikali P., Bautista K., Dupree C., Glogowska M., Case D., Antel J.P., Owens G.P., Gilden D., Nessler S., Stadelmann C., Hemmer B. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 66 (2009) 617-629.
- Berger T., Rubner P., Schautzer F., Egg R., Ulmer H., Mayringer I., Dilitz E., Deisenhammer F., Reindl M. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 349 (2003) 139-145.

- Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 189-220.
- Boiko A., Vorobeychik G., Paty D., Devonshire V., Sadovnick D. Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology* 59 (2002) 1006-1010.
- Boutin B., Esquivel E., Mayer M., Chaumet S., Ponsot G., Arthuis M. Multiple sclerosis in children: report of clinical and paraclinical features of 19 cases. *Neuropediatrics* 19 (1988) 118-123.
- Bradl M., Misu T., Takahashi T., Watanabe M., Mader S., Reindl M., Adzemovic M., Bauer J., Berger T., Fujihara K., Itoyama Y., Lassmann H. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 66 (2009) 630-643.
- Brass S.D., Caramanos Z., Santos C., Dilenge M.E., Lapierre Y., Rosenblatt B. Multiple sclerosis vs acute disseminated encephalomyelitis in childhood. *Pediatr Neurol* 29 (2003) 227-231.
- Breij E.C., Brink B.P., Veerhuis R., Van Den Berg C., Vloet R., Yan R., Dijkstra C.D., Van Der Valk P., Bo L. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63 (2008) 16-25.
- Brok H.P., Boven L., Van Meurs M., Kerlero De Rosbo N., Celebi-Paul L., Kap Y.S., Jagessar A., Hintzen R.Q., Keir G., Bajramovic J., Ben-Nun A., Bauer J., Laman J.D., Amor S., T Hart B.A. The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* 182 (2007) 135-152.
- Brück W., Kuhlmann T., Stadelmann C. Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206 (2003) 181-185.
- Callen D.J., Shroff M.M., Branson H.M., Li D.K., Lotze T., Stephens D., Banwell B.L. Role of MRI in the differentiation of ADEM from MS in children. *Neurology* 72 (2009) 968-973.
- Cepok S., Zhou D., Srivastava R., Nessler S., Stei S., Bussow K., Sommer N., Hemmer B. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115 (2005) 1352-1360.

- Challoner P.B., Smith K.T., Parker J.D., MacLeod D.L., Coulter S.N., Rose T.M., Schultz E.R., Bennett J.L., Garber R.L., Chang M., Et Al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 7440-7444.
- Colombo M., Dono M., Gazzola P., Roncella S., Valetto A., Chiorazzi N., Mancardi G.L., Ferrarini M. Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Immunol* 164 (2000) 2782-2789.
- Coyle P.K. Early treatment of multiple sclerosis to prevent neurologic damage. *Neurology* 71 (2008) S3-7.
- Dale R.C., Branson J.A. Acute disseminated encephalomyelitis or multiple sclerosis: can the initial presentation help in establishing a correct diagnosis? *Arch Dis Child* 90 (2005) 636-639.
- Dale R.C., De Sousa C., Chong W.K., Cox T.C., Harding B., Neville B.G. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain* 123 (2000) 2407-2422.
- Dale R.C., Pillai S.C. Early relapse risk after a first CNS inflammatory demyelination episode: examining international consensus definitions. *Dev Med Child Neurol* 49 (2007) 887-893.
- DeLorenze G.N., Munger K.L., Lennette E.T., Orentreich N., Vogelman J.H., Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 63 (2006) 839-844.
- Derfuss T., Hohlfeld R., Meinl E. Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol* 252 (2005) 968-971.
- Duquette P., Murray T.J., Pleines J., Ebers G.C., Sadovnick D., Weldon P., Warren S., Paty D.W., Upton A., Hader W., Et Al. Multiple sclerosis in childhood: clinical profile in 125 patients. *J Pediatr* 111 (1987) 359-363.
- Farrell R.A., Antony D., Wall G.R., Clark D.A., Fisniku L., Swanton J., Khaleeli Z., Schmierer K., Miller D.H., Giovannoni G. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology* 73 (2009) 32-38.

- Fujinami R.S., Oldstone M.B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230 (1985) 1043-1045.
- Gay F.W., Drye T.J., Dick G.W., Esiri M.M. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120 (1997) 1461-1483.
- Genain C.P., Cannella B., Hauser S.L., Raine C.S. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5 (1999) 170-175.
- Ghezzi A., Amato M.P., Capobianco M., Gallo P., Marrosu M.G., Martinelli V., Milanese C., Moiola L., Milani N., La Mantia L., Patti F., Pozzilli C., Trojano M., Comi G., Zaffaroni M. Treatment of early-onset multiple sclerosis with intramuscular interferonbeta-1a: long-term results. *Neurol Sci* 28 (2007) 127-132.
- Gutierrez J., Vergara M.J., Guerrero M., Fernandez O., Piedrola G., Morales P., Maroto M.C. Multiple sclerosis and human herpesvirus 6. *Infection* 30 (2002) 145-149.
- Hanefeld F. Multiple sclerosis in childhood. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5 (1992) 359-363.
- Hartung H.P., Grossman R.I. ADEM: distinct disease or part of the MS spectrum? *Neurology* 56 (2001) 1257-1260.
- Hauser S.L., Bhan A.K., Gilles F., Kemp M., Kerr C., Weiner H.L. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19 (1986) 578-587.
- Hausmann S., Wucherpfennig K.W. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Curr Opin Immunol* 9 (1997) 831-838.
- Hemmer B., Archelos J.J., Hartung H.P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3 (2002) 291-301.
- Hemmer B., Fleckenstein B.T., Vergelli M., Jung G., McFarland H., Martin R., Wiesmuller K.H. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 185 (1997) 1651-1659.

- Hemmer B., Nessler S., Zhou D., Kieseier B., Hartung H.P. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2 (2006) 201-211.
- Hernan M.A., Zhang S.M., Lipworth L., Olek M.J., Ascherio A. Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 12 (2001) 301-306.
- Hinson S.R., Pittock S.J., Lucchinetti C.F., Roemer S.F., Fryer J.P., Kryzer T.J., Lennon V.A. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 69 (2007) 2221-2231.
- Hu W., Lucchinetti C.F. The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. *Semin Immunopathol* 31 (2009) 439-453.
- Ingram G., Hakobyan S., Robertson N.P., Morgan B.P. Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker. *Clin Exp Immunol* 155 (2009) 128-139.
- Kalluri S.R., Illes Z., Srivastava R., Cree B., Menge T., Bennett J.L., Berthele A., Hemmer B. Quantification and functional characterization of antibodies to native aquaporin 4 in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 67 (2010) 1201-1208.
- Kappos L., Polman C.H., Freedman M.S., Edan G., Hartung H.P., Miller D.H., Montalban X., Barkhof F., Bauer L., Jakobs P., Pohl C., Sandbrink R. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 67 (2006) 1242-1249.
- Kastrukoff L.F., Morgan N.G., Zecchini D., White R., Petkau A.J., Satoh J., Paty D.W. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 86 (1998) 123-133.
- Kerlero De Rosbo N., Milo R., Lees M.B., Burger D., Bernard C.C., Ben-Nun A. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest* 92 (1993) 2602-2608.
- Knox K.K., Brewer J.H., Henry J.M., Harrington D.J., Carrigan D.R. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: systemic active infections in patients with early disease. *Clin Infect Dis* 31 (2000) 894-903.
- Kroepfl J.F., Viise L.R., Charron A.J., Linington C., Gardinier M.V. Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem* 67 (1996) 2219-2222.

- Krupp L.B., Banwell B., Tenenbaum S. Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. *Neurology* 68 (2007) S7-12.
- Kuhle J., Lindberg R.L., Regeniter A., Mehling M., Hoffmann F., Reindl M., Berger T., Radue E.W., Leppert D., Kappos L. Antimyelin antibodies in clinically isolated syndromes correlate with inflammation in MRI and CSF. *J Neurol* 254 (2007a) 160-168.
- Kuhle J., Pohl C., Mehling M., Edan G., Freedman M.S., Hartung H.P., Polman C.H., Miller D.H., Montalban X., Barkhof F., Bauer L., Dahms S., Lindberg R., Kappos L., Sandbrink R. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med* 356 (2007b) 371-378.
- Lalive P.H., Menge T., Delarasse C., Della Gaspera B., Pham-Dinh D., Villoslada P., Von Budingen H.C., Genain C.P. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 2280-2285.
- Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C., Rodriguez M. Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 3 (1997) 133-136.
- Leake J.A., Albani S., Kao A.S., Senac M.O., Billman G.F., Nespeca M.P., Paulino A.D., Quintela E.R., Sawyer M.H., Bradley J.S. Acute disseminated encephalomyelitis in childhood: epidemiologic, clinical and laboratory features. *Pediatr Infect Dis J* 23 (2004) 756-764.
- Lennon V.A., Kryzer T.J., Pittock S.J., Verkman A.S., Hinson S.R. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202 (2005) 473-477.
- Lennon V.A., Wingerchuk D.M., Kryzer T.J., Pittock S.J., Lucchinetti C.F., Fujihara K., Nakashima I., Weinshenker B.G. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364 (2004) 2106-2112.
- Levin L.I., Munger K.L., Rubertone M.V., Peck C.A., Lennette E.T., Spiegelman D., Ascherio A. Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 293 (2005) 2496-2500.

- Lindert R.B., Haase C.G., Brehm U., Linington C., Wekerle H., Hohlfeld R. Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* 122 (1999) 2089-2100.
- Linington C., Bradl M., Lassmann H., Brunner C., Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130 (1988) 443-454.
- Linington C., Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* 17 (1987) 61-69.
- Linington C., Webb M., Woodhams P.L. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* 6 (1984) 387-396.
- Lorentzen A.R., Karlsen T.H., Olsson M., Smestad C., Mero I.L., Woldseth B., Sun J.Y., Senitzer D., Celius E.G., Thorsby E., Spurkland A., Lie B.A., Harbo H.F. Killer immunoglobulin-like receptor ligand HLA-Bw4 protects against multiple sclerosis. *Ann Neurol* 65 (2009) 658-666.
- Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47 (2000) 707-717.
- Lünemann J.D., Edwards N., Muraro P.A., Hayashi S., Cohen J.I., Munz C., Martin R. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 129 (2006) 1493-1506.
- Lünemann J.D., Huppke P., Roberts S., Brück W., Gartner J., Munz C. Broadened and elevated humoral immune response to EBNA1 in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 71 (2008) 1033-1035.
- Marta C.B., Bansal R., Pfeiffer S.E. Microglial Fc receptors mediate physiological changes resulting from antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neuroimmunol* 196 (2008) 35-40.
- McDonald W.I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H.P., Lublin F.D., MFarland H.F., Paty D.W., Polman C.H., Reingold S.C., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., Van Den Noort S., Weinshenker B.Y., Wolinsky J.S. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the

- International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50 (2001) 121-127.
- McKeon A., Lennon V.A., Lotze T., Tenenbaum S., Ness J.M., Rensel M., Kuntz N.L., Fryer J.P., Homburger H., Hunter J., Weinshenker B.G., Krecke K., Lucchinetti C.F., Pittock S.J. CNS aquaporin-4 autoimmunity in children. *Neurology* 71 (2008) 93-100.
- McLaughlin K.A., Chitnis T., Newcombe J., Franz B., Kennedy J., McArdel S., Kuhle J., Kappos L., Rostasy K., Pohl D., Gagne D., Ness J.M., Tenenbaum S., O'Connor K.C., Vigiotta V., Wong S.J., Tavakoli N.P., De Seze J., Idrissova Z., Khoury S.J., Bar-Or A., Hafler D.A., Banwell B., Wucherpfennig K.W. Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen in pediatric multiple sclerosis. *J Immunol* 183 (2009) 4067-4076.
- Menge T., Hemmer B., Nessler S., Wiendl H., Neuhaus O., Hartung H.P., Kieseier B.C., Stüve O. Acute disseminated encephalomyelitis: an update. *Arch Neurol* 62 (2005) 1673-1680.
- Mikaeloff Y., Adamsbaum C., Husson B., Vallee L., Ponsot G., Confavreux C., Tardieu M., Suissa S. MRI prognostic factors for relapse after acute CNS inflammatory demyelination in childhood. *Brain* 127 (2004a) 1942-1947.
- Mikaeloff Y., Moreau T., Debouverie M., Pelletier J., Lebrun C., Gout O., Pedespan J.M., Van Hulle C., Vermersch P., Ponsot G. Interferon-beta treatment in patients with childhood-onset multiple sclerosis. *J Pediatr* 139 (2001) 443-446.
- Mikaeloff Y., Suissa S., Vallee L., Lubetzki C., Ponsot G., Confavreux C., Tardieu M. First episode of acute CNS inflammatory demyelination in childhood: prognostic factors for multiple sclerosis and disability. *J Pediatr* 144 (2004b) 246-252.
- Morandi B., Bramanti P., Bonaccorsi I., Montalto E., Oliveri D., Pezzino G., Navarra M., Ferlazzo G. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res* 57 (2008) 1-5.
- Morse R.H., Seguin R., McCrea E.L., Antel J.P. NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* 116 (2001) 107-115.
- Neumann H., Medana I.M., Bauer J., Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25 (2002) 313-319.

- Neuteboom R.F., Boon M., Catsman Berrevoets C.E., Vles J.S., Gooskens R.H., Stroink H., Vermeulen R.J., Rotteveel J.J., Ketelslegers I.A., Peeters E., Poll-the B.T., De Rijk-Van Andel J.F., Verrips A., Hintzen R.Q. Prognostic factors after a first attack of inflammatory CNS demyelination in children. *Neurology* 71 (2008) 967-973.
- O'Connor K.C., Appel H., Bregoli L., Call M.E., Catz I., Chan J.A., Moore N.H., Warren K.G., Wong S.J., Hafler D.A., Wucherpfennig K.W. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 175 (2005) 1974-1982.
- O'Connor K.C., Bar-Or A., Hafler D.A. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21 (2001) 81-92.
- O'Connor K.C., McLaughlin K.A., De Jager P.L., Chitnis T., Bettelli E., Xu C., Robinson W.H., Cherry S.V., Bar-Or A., Banwell B., Fukaura H., Fukazawa T., Tenenbaum S., Wong S.J., Tavakoli N.P., Idrissova Z., Vigiotta V., Rostasy K., Pohl D., Dale R.C., Freedman M., Steinman L., Buckle G.J., Kuchroo V.K., Hafler D.A., Wucherpfennig K.W. Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat Med* 13 (2007) 211-217.
- Owens G.P., Ritchie A.M., Burgoon M.P., Williamson R.A., Corboy J.R., Gildea D.H. Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol* 171 (2003) 2725-2733.
- Ozakbas S., Idiman E., Baklan B., Yulug B. Childhood and juvenile onset multiple sclerosis: clinical and paraclinical features. *Brain Dev* 25 (2003) 233-236.
- Ozawa K., Suchanek G., Breitschopf H., Brück W., Budka H., Jellinger K., Lassmann H. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 117 (1994) 1311-1322.
- Pender M.P. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 24 (2003) 584-588.
- Pittock S.J., Reindl M., Achenbach S., Berger T., Brück W., König F., Morales Y., Lassmann H., Bryant S., Moore S.B., Keegan B.M., Lucchinetti C.F. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pathologically proven multiple

- sclerosis: frequency, stability and clinicopathologic correlations. *Mult Scler* 13 (2007) 7-16.
- Pohl D., Epidemiologie und Genetik, in: Zettl U.K., Köhler W., Buchmann J. (Eds.), *Multiple Sklerose im Kindes- und Jugendalter*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2007.
- Pohl D., Krone B., Rostasy K., Kahler E., Brunner E., Lehnert M., Wagner H.J., Gartner J., Hanefeld F. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology* 67 (2006) 2063-2065.
- Pohl D., Rostasy K., Gartner J., Hanefeld F. Treatment of early onset multiple sclerosis with subcutaneous interferon beta-1a. *Neurology* 64 (2005) 888-890.
- Qin Y., Duquette P., Zhang Y., Talbot P., Poole R., Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 102 (1998) 1045-1050.
- Rand K.H., Houck H., Denslow N.D., Heilman K.M. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 173 (2000) 32-39.
- Rauer S., Euler B., Reindl M., Berger T. Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77 (2006) 739-742.
- Reindl M., Linington C., Brehm U., Egg R., Dilitz E., Deisenhammer F., Poewe W., Berger T. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 122 (1999) 2047-2056.
- Rickinson A.B., Moss D.J. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15 (1997) 405-431.
- Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* 13 (1992) 379-381.
- Schluesener H.J., Sobel R.A., Linington C., Weiner H.L. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 139 (1987) 4016-4021.

- Serafini B., Rosicarelli B., Franciotta D., Magliozzi R., Reynolds R., Cinque P., Andreoni L., Trivedi P., Salvetti M., Faggioni A., Aloisi F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204 (2007) 2899-2912.
- Simone I.L., Carrara D., Tortorella C., Liguori M., Lepore V., Pellegrini F., Bellacosa A., Ceccarelli A., Pavone I., Livrea P. Course and prognosis in early-onset MS: comparison with adult-onset forms. *Neurology* 59 (2002) 1922-1928.
- Sobel R.A., Van Der Veen R.C., Lees M.B. The immunopathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis induced in rabbits with bovine proteolipid protein. *J Immunol* 136 (1986) 157-163.
- Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23 (2005) 683-747.
- Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 139-176.
- Storch M.K., Piddlesden S., Haltia M., Iivanainen M., Morgan P., Lassmann H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43 (1998a) 465-471.
- Storch M.K., Stefferl A., Brehm U., Weissert R., Wallstrom E., Kerschensteiner M., Olsson T., Linington C., Lassmann H. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8 (1998b) 681-694.
- Sun J., Link H., Olsson T., Xiao B.G., Andersson G., Ekre H.P., Linington C., Diener P. T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol* 146 (1991) 1490-1495.
- Sundström P., Juto P., Wadell G., Hallmans G., Svenningsson A., Nystrom L., Dillner J., Forsgren L. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 62 (2004) 2277-2282.
- Suppiej A., Vittorini R., Fontanin M., De Grandis D., Manara R., Atzori M., Gallo P., Battistella P.A. Acute disseminated encephalomyelitis in children: focus on relapsing patients. *Pediatr Neurol* 39 (2008) 12-17.
- Tejada-Simon M.V., Zang Y.C., Hong J., Rivera V.M., Zhang J.Z. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53 (2003) 189-197.

- Tenembaum S., Chamoles N., Fejerman N. Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. *Neurology* 59 (2002) 1224-1231.
- Tenembaum S., Chitnis T., Ness J., Hahn J.S. Acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology* 68 (2007) S23-36.
- Thrower B.W. Clinically isolated syndromes: predicting and delaying multiple sclerosis. *Neurology* 68 (2007) S12-15.
- Tomassini V., De Giglio L., Reindl M., Russo P., Pestalozza I., Pantano P., Berger T., Pozzilli C. Anti-myelin antibodies predict the clinical outcome after a first episode suggestive of MS. *Mult Scler* 13 (2007) 1086-1094.
- Trotter J.L., Clark H.B., Collins K.G., Wegeschiede C.L., Scarpellini J.D. Myelin proteolipid protein induces demyelinating disease in mice. *J Neurol Sci* 79 (1987) 173-188.
- Tuohy V.K., Yu M., Weinstock-Guttman B., Kinkel R.P. Diversity and plasticity of self recognition during the development of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 99 (1997) 1682-1690.
- Uccelli A., Aloisi F., Pistoia V. Unveiling the enigma of the CNS as a B-cell fostering environment. *Trends Immunol* 26 (2005) 254-259.
- Vergelli M., Hemmer B., Kalbus M., Vogt A.B., Ling N., Conlon P., Coligan J.E., McFarland H., Martin R. Modifications of peptide ligands enhancing T cell responsiveness imply large numbers of stimulatory ligands for autoreactive T cells. *J Immunol* 158 (1997) 3746-3752.
- Wang H., Munger K.L., Reindl M., O'Reilly E.J., Levin L.I., Berger T., Ascherio A. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies and multiple sclerosis in healthy young adults. *Neurology* 71 (2008) 1142-1146.
- Warren K.G., Catz I., Johnson E., Mielke B. Anti-myelin basic protein and anti-proteolipid protein specific forms of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 35 (1994) 280-289.
- Willis S.N., Stadelmann C., Rodig S.J., Caron T., Gattenloehner S., Mallozzi S.S., Roughton J.E., Almendinger S.E., Blewett M.M., Brück W., Hafler D.A., O'Connor K.C. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 132 (2009) 3318-3328.

- Wingerchuk D.M., Lennon V.A., Pittock S.J., Lucchinetti C.F., Weinshenker B.G. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66 (2006) 1485-1489.
- Winkler-Pickett R., Young H.A., Cherry J.M., Diehl J., Wine J., Back T., Bere W.E., Mason A.T., Ortaldo J.R. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol* 180 (2008) 4495-4506.
- Wucherpfennig K.W. Structural basis of molecular mimicry. *J Autoimmun* 16 (2001) 293-302.
- Wucherpfennig K.W., Strominger J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80 (1995) 695-705.
- Xiao B.G., Linington C., Link H. Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol* 31 (1991) 91-96.
- Young N.P., Weinshenker B.G., Parisi J.E., Scheithauer B., Giannini C., Roemer S.F., Thomsen K.M., Mandrekar J.N., Erickson B.J., Lucchinetti C.F. Perivenous demyelination: association with clinically defined acute disseminated encephalomyelitis and comparison with pathologically confirmed multiple sclerosis. *Brain* 133 (2010) 333-348.
- Zhou D., Hemmer B. Specificity and degeneracy: T cell recognition in CNS autoimmunity. *Mol Immunol* 40 (2004) 1057-1061.
- Zhou D., Srivastava R., Nessler S., Grummel V., Sommer N., Brück W., Hartung H.P., Stadelmann C., Hemmer B. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 19057-19062.

9 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Selter R.C., Brilot F., Grummel V., Kraus V., Cepok S., Dale R.C., Hemmer B. Antibody responses to EBV and native MOG in pediatric inflammatory demyelinating CNS diseases. *Neurology* 74 (2010) 1711-1715.

Brilot F., Dale R.C., Selter R.C., Grummel V., Kalluri S.R., Aslam M., Busch V., Zhou D., Cepok S., Hemmer B. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease. *Ann Neurol* 66 (2009) 833-842.

Vortrag:

Selter R.C., Brilot F., Dale R.C., Cepok S., Grummel V., Zhou D., Hemmer B. Antibodies to Epstein-Barr virus and myelin oligodendrocyte glycoprotein in childhood inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system (V183).

82. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2009).

Posterpräsentationen:

Selter R.C., Brilot F., Dale R.C., Grummel V., Kalluri S.R., Aslam M., Busch V., Zhou D., Cepok S., Hemmer B. Antibodies against native myelin oligodendrocyte glycoprotein in childhood inflammatory demyelinating diseases (P1604). 13th Congress of the European Federation of Neurological Societies (2009).

Selter R.C., Brilot F., Dale R.C., Grummel V., Kalluri S.R., Aslam M., Busch V., Zhou D., Cepok S., Hemmer B. Antikörper gegen natives Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein bei Kindern mit entzündlich demyelinisierenden Erkrankungen (DGKJ-PO-143). 105. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (2009).

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bernhard Hemmer, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, die hervorragende Betreuung der Arbeit sowie sein Engagement für die Veröffentlichung der Ergebnisse.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Klinische Neuroimmunologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Cepok für die Hilfe bei der Auswertung der EBV-ELISAs und Verena Grummel für die Unterstützung bei den FACS-Experimenten.

Fabienne Brilot, PhD und Russell Dale, PhD vom Children's Hospital at Westmead, Sydney danke ich für die Bereitstellung der Seren und Liquores und der klinischen Daten.