

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Professor. Dr. med. Stephan Zierz)

**Zerebrale Genexpression der Lewis-Ratte nach intrazerebraler Injektion des Superantigens
Staphylokokken Enterotoxin A**

Dissertation

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

vorgelegt

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

von Alexander Emmer
geboren am 17.10.1978 in Halle (Saale)
Betreuer: PD Dr. med. M. E. Kornhuber

Datum der Verteidigung: 07.05.2009

Gutachter:
Professor Dr. med. Peter Presek
Professor Dr. med. Johannes Schwarz

Meiner Familie

Kurzreferat

Superantigene scheinen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese einiger autoimmuner Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose einzunehmen. Dabei wird postuliert, dass Viren in der Pathogenese der MS-Erkrankung einen entscheidenden Anteil besitzen, deren Superantigen zur Auslösung der zerebralen Entzündung beiträgt.

In der vorliegenden Studie trat nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) eine perivaskuläre Entzündungsreaktion auf (Superantigen-Enzephalitis), die durch aktivierte Lymphozyten in der Blutbahn unterhalten wurde. 8 Tage nach intrazerebraler Injektion von SEA bzw. Lösungsmittel und 5 Tage nach intravenöser Injektion von aktivierten Milzzellen in Lewis-Ratten wurde die zerebrale Genexpression mittels Microarray-Technik untersucht. Von den 8 800 untersuchten Genen zeigten 109 eine signifikant vermehrte und mindestens 3fach über den Kontrollen liegende Genexpression. 29 Gene waren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant und ebenfalls mindestens 3fach vermindert exprimiert. Die durch die Microarray-Untersuchungen gewonnenen Resultate wurden anhand ausgewählter Gene mit konventioneller Polymerase-Ketten-Reaktions-Technik (PCR-Technik) sowie mit Real-Time-PCR überprüft. Dabei wurde eine weitgehende Übereinstimmung gefunden. Die nach SEA-Injektion differenziell vermehrt exprimierten Gene zeugen von einer intrazerebralen Immunreaktion, die von antigenpräsentierenden Zellen sowie CD8+ suppressorischen/zytotoxischen T-Zellen getragen wird. Die Ergebnisse spiegeln die vermehrt exprimierten Gene für verschiedene Chemokine, Makrophagen bzw. Mikrogliazellen sowie Astrozyten die Entzündungsreaktion und deren zerebrale Gewebsreaktion 8 Tage nach intrazerebraler Superantigeninjektion wieder. Ebenfalls waren Gene, die für aktive Phagozytose sowie für regenerative Gewebsprozesse sprechen vermehrt exprimiert. Im Vergleich mit Genexpressionsdaten aus zerebralem Gewebe bei Multipler Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und dem vorliegendem Modell fällt eine Reihe von Übereinstimmungen auf. Diese Übereinstimmungen sind plausibel, da es sich in allen 3 Fällen um eine intrazerebrale Entzündung handelt.

Diese Superantigen-Enzephalitis kann somit als ein neues Entzündungsmodell für die Multiple Sklerose, aber auch für andere zerebrale Autoimmunerkrankungen gelten.

Emmer, Alexander: Zerebrale Genexpression der Lewis-Ratte nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2008

Verzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Superantigene und ihre Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose und Autoimmunerkrankungen	1
1.2	Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose	3
1.3	Pathologische Anatomie und Histologie der Multiplen Sklerose	5
1.4	Pathogenese von Entmarkung und Gewebedestruktion bei MS	7
1.5	Tiermodelle für die zerebrale Entzündung der Multiplen Sklerose	8
1.5.1	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE)	9
1.5.2	Modelle virusinduzierter entzündlicher Entmarkung	9
1.5.3	Superantigen-Tiermodell der MS	10
1.6	Zielsetzung der Studie	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Materialien	11
2.2	Versuchstiere	12
2.3	Milzentnahme und Aufbereitung der Lymphozyten	12
2.4	Intrazerebrale Inokulation des Superantigens (Tag 1)	13
2.5	Injektion aktivierter Lymphozyten (Tag 3)	14
2.6	Gehirnentnahmen (Tag 8)	14
2.7	DNA-Array-Technik	15
2.7.1	Funktionsprinzip	15
2.7.2	Präparation der RNA für die Analyse der Genexpression	16
2.7.3	Präparation der cDNA für die Analyse der Genexpression	17
2.7.4	In vitro-Transkription (IVT)	18
2.7.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung	18
2.7.6	Microarray-Scan	19
2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.9	Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time-PCR)	23

3	Ergebnisse	25
3.1	Superantigen (SEA) und Genexpression	25
3.2	PCR und Real-time-PCR ausgewählter Gene	32
3.2.1	PCR	32
3.2.2	Real-Time-PCR	39
3.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Genchipuntersuchungen und Kontrollexperimente mittels Real-time-PCR	35
3.4	Injektionstrauma und Genexpression	39
4	Diskussion	42
4.1	Methodisches Vorgehen und Fehlerquellen	42
4.2	Einfluss der unspezifischen Gewebstraumatisierung auf die zerebrale Genexpression	44
4.3	Einfluss des Superantigens SEA auf die zerebrale Genexpression	45
4.3.1	Antigenpräsentation	46
4.3.2	Lymphozyten	47
4.3.3	Zytokine	48
4.3.4	Chemokine / Chemokinrezeptoren	49
4.3.5	Mikrobielle Reaktionen	51
4.3.6	Antiinflammatorische Gewebsreaktionen	53
4.3.7	Neuronale Regeneration	54
4.3.8	Wiederherstellung der Extrazellulären Matrix	54
4.3.9	Verschiedenes	55
4.4	Vermindert exprimierte Gene	56
4.5	Vergleich der Genexpressionsbefunde der Superantigenenzephalitis mit Genexpressionsbefunden bei Multipler Sklerose und der EAE	57
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Thesen	75
	Tabellarischer Lebenslauf	77
	Selbstständigkeitserklärung	78
	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Bildung des Superantigen-MHC-II-T-Zell-Rezeptor-Komplexes	2
Abb. 2	Bindung des Superantigens an MHC-II	3
Abb. 3	Charakteristische „Plaque“ im Rückenmark einer MS-Patientin	6
Abb. 4	Zerebrale MRT-Aufnahme (T1-Wichtung)	7
Abb. 5	Zerebrale MRT-Aufnahme (T2-Wichtung)	7
Abb. 6	Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens	15
Abb. 7	Aufspaltung und Hybridisierung der RNA	20
Abb. 8	Schematische Darstellung eines Real-time-PCR Zyklus	24
Abb. 9a	PCR (Aktin 22 C (Kontrollgen))	32
Abb. 9b	PCR (TIMP-1)	33
Abb. 9c	PCR (CCL5)	33
Abb. 9d	PCR (CD74)	33
Abb. 10a	Real-time-PCR (TIMP-1)	34
Abb. 10b	Real-time-PCR (CCL5)	34
Abb. 10c	Real-time-PCR (CD74)	35
Abb. 11a	Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung für TIMP-1	36
Abb. 11b	Signalintensitäten der Real-time-PCR für TIMP-1	36
Abb. 12a	Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung für CCL5	37
Abb. 12b	Signalintensitäten der Real-time-PCR für CCL5	37
Abb. 13a	Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung für CD74	38
Abb. 13b	Signalintensitäten der Real-time-PCR für CD74	38

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
Con-A	Concanavalin-A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ED	Enzephalomyelitis disseminata
EDSS	Expanded Disability Status Scale nach J. F. Kurtzke
FCS	Fetales Kälberserum
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IVT	In-vitro-Transkription
MBP	Basisches Myelinprotein
Min	Minuten
MOG	Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein
MRT	Magnet-Resonanz-Tomogramm
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Real-time-PCR	Real-time-Polymerase-Kettenreaktion
RSV	Respiratory syncytial virus
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SEA	Staphylokokken-Enterotoxin-A
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) werden in Erreger bedingte und nicht Erreger bedingte unterschieden. Zu den entzündlichen Erkrankungen ohne Erreger gehören u. a. die zerebrale Beteiligung bei systemischen Bindegewebserkrankungen, wie z. B. Sarkoidose, M. Behçet etc. Häufiger, und somit für die Neurologie wichtiger, sind die entzündlichen Erkrankungen ohne Erreger, die sich allein im ZNS manifestieren. Wichtigster Vertreter dieser Erkrankungen ist die Multiple Sklerose (MS). Ätiologie und Pathogenese der MS ist trotz großer Anstrengungen noch weitgehend unbekannt. Nachfolgend wird eine Übersicht zu den aktuellen Vorstellungen der Krankheitsentstehung gegeben. Es handelt sich speziell um die autoimmune Genese sowie eine mögliche virale Genese der Erkrankung. Kürzlich wurde eine mögliche Verbindung zwischen den beiden Modellvorstellungen postuliert. So erscheint es denkbar, dass virale immunstimulierende Stoffe (sog. Superantigene) die Entzündung bei MS auslösen. In der vorliegenden Arbeit wird die durch ein derartiges Superantigen hervorgerufene Enzephalitis hinsichtlich der zerebralen Genexpression näher untersucht.

1.1 Superantigene und ihre Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose und Autoimmunerkrankungen

Superantigene sind Proteine, die ein Molekulargewicht zwischen 14,5 und 28.5 kDa aufweisen (Lavoie et al., 1999). Sie werden in endogene und exogene Superantigene unterschieden. Die endogenen Superantigene sind körpereigene Antigene mit gering stimulierender Wirkung auf Lymphozyten. Deshalb werden sie auch „minor lymphocyte stimulating antigens“ genannt (Acha-Orbea et al., 1992).

Exogene Superantigene werden von Retroviren und grampositiven Bakterien, insbesondere Kokken gebildet, die eine enorme Stimulationskraft auf T-Lymphozyten haben. Neben den Staphylokokkenenterotoxinen A-E, G-Q und U, werden außerdem das Toxin-1 des toxischen Schocksyndroms (TSST-1) und das Exfoliativtoxin gebildet (Kotzin, 1994). Ähnlich wie gewöhnliche Peptidantigene binden auch die Superantigene an das MHC II Molekül der antigenpräsentierenden Zelle und stimulieren im Komplex die V-beta Kette der variablen Region (V-Region) des T-Zell-Rezeptors (Fields et al., 1996), dabei binden die Superantigene jedoch außerhalb der „normalen“ Antigenrinne des MHC-II-Moleküls (Dellabona et al., 1990) (Abb.1). Das Superantigen wird nicht phagozytiert und nachfolgend prozessiert, um am TCR/MHC-II-

Komplex binden zu können (Dellabona et al., 1990). Jedes der bekannten Superantigene weist ein spezifisches V-beta-Repertoire auf, über das diejenigen T-Lymphozyten aktiviert werden, die diese spezifischen V-beta-Elemente aufweisen (sog. oligoklonale Aktivierung). Dadurch ist es möglich, dass ein Superantigen bis zu 20 % aller T-Lymphozyten aktivieren kann. „Normale“ Antigene stimulieren demgegenüber nur etwa 0,001 % der T-Zellpopulation.

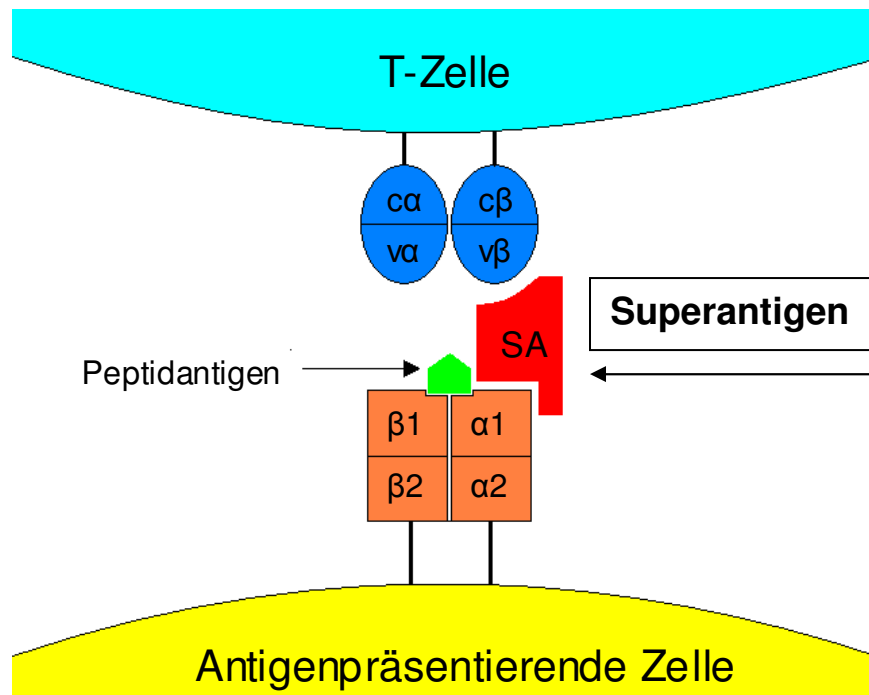


Abb. 1: Bildung des Superantigen-MHC-II-T-Zell-Rezeptor-Komplexes

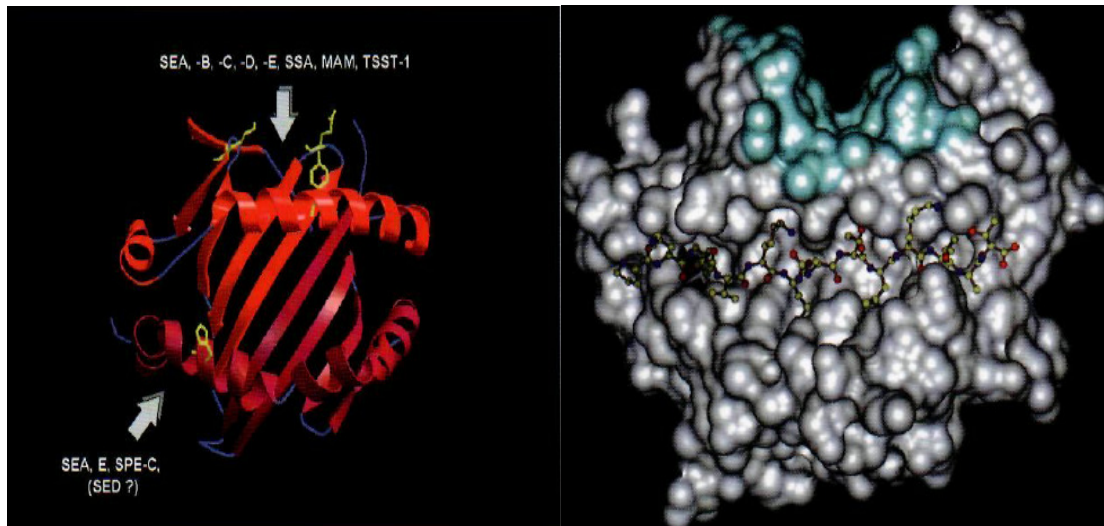


Abb.2: Bindung des Superantigens an MHC-II (aus Lavoie et al., 1999)

Analog zu den T-Zell-stimulierenden Superantigenen gibt es auch Superantigene, welche via Bindung an die Fab-Komponente (V(H) Region) der Immunglobuline ausschließlich B-Lymphozyten stimulieren (Neshat et al., 2000).

Superantigene wurden mit mehreren Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei sind nicht nur der toxische Schock oder das multiple Organversagen zu nennen (Brocke et al., 1996), sondern auch die chronische lymphatische Leukämie (Duan et al., 1992) oder der Insulin abhängige Diabetes mellitus (Fraser et al., 2000). Ebenso erscheint es möglich, dass Superantigene eine Rolle bei Erkrankungen wie dem Kawasaki-Syndrom, rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus, Psoriasis sowie atopische Dermatitis und Multiple Sklerose (MS) spielen (Torres et al., 2001).

1.2 Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die MS oder auch Enzephalomyelitis Disseminata (ED) ist die häufigste Erkrankung des zentralen Nervensystems in Europa und Nordamerika und kann bereits im frühen Erwachsenenalter zu dauerhafter und schwerwiegender neurologischer Behinderung führen. Die MS ist eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der bereits in der Frühphase neurodegenerative Veränderungen beobachtet werden (Noseworthy et al. 2000; Compston und Coles 2002). Die Ursache der Erkrankung ist noch unbekannt. Viele Autoren gehen davon aus, dass genetische, immunologische sowie Umweltfaktoren an der Ätiologie beteiligt sind. Die vorrangige Vorstellung zur Ätiologie beruht auf einer autoimmunen Reaktion von T- Lymphozyten gegen neuronale Antigene, was zu einer chronischen

Entzündungsreaktion und somit Destruktion der Myelinscheiden und Oligodendrozyten führt (Storch und Lassmann, 1997). Heutige immunpathogenetische Konzepte basieren auf autoreaktiven T-Zellen, die sich gegen Bestandteile der Myelinscheiden im Rahmen einer abnormen Immunantwort richten, mit folgender Demyelinisierung und Axondegeneration (Martin et al., 1992). Allerdings passen nicht alle Daten der Pathogenese, der zerebralen Bildgebung bzw. der Immuntherapie der MS zu diesem Konzept (Kornhuber et al., 2003, 2005, 2006).

Das gehäufte familiäre und in bestimmten ethnischen Gruppen vermehrte Auftreten der Erkrankung lässt auf genetische Faktoren schließen, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen. (Dyment et al., 1997). Anhand von Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass das relative Risiko für einen homozygoten Zwilling an einer MS zu erkranken, im Vergleich zur Normalbevölkerung etwa 250- bis 300fach erhöht ist, wenn dessen Geschwister bereits an MS erkrankte. Die Prävalenz bei angeheirateten oder adoptierten Familienmitgliedern ist im Gegensatz dazu nicht erhöht (Ebers, 2000). Die geographische Verteilung zeigt ein Nord-Süd-Gefälle, eine Häufung der Erkrankung in Nordeuropa sowie in Nordamerika mit einer Prävalenz von durchschnittlich 60/100 000 Einwohner und einer Inzidenz von 4 bis 8/100 000 Einwohner.

In Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass Umweltfaktoren an der Ätiologie beteiligt sind. Wenn der Umzug aus einem Hochrisikogebiet in ein Niedrigrisikogebiet (oder umgekehrt) vor der Pubertät erfolgt, wird die Prävalenz der neuen Heimat erworben, während bei einem entsprechenden Umzug nach der Pubertät die Prävalenz des Geburtslandes „mitgenommen“ wird. (Dean und Kurtzke, 1971). Sowohl genetische- als auch Umweltfaktoren tragen zum Erkrankungsrisiko bei. Gene, die mit der MS in Verbindung gebracht werden, sind vor allem Gene, die der Antigenpräsentation bzw. der Antigenerkennung dienen, also HLA-Gene sowie T-Zellrezeptorgene (McCombe et al., 1985, Pandey et al., 1981, Boylan et al., 1990). Insbesondere ist eine Assoziation der Gene für HLA-A3 und HLA-B7 (Chromosom 6) mit MS seit längerem bekannt. Die Assoziation des HLA-DR2-Gen ist vor allem in Nordeuropa und Nordamerika vorherrschend, während in anderen ethnischen Gruppen andere HLA-DR Typen mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Marrosu et al., 1988, Kurdi et al., 1977, Naito et al., 1978, Gorodezky et al., 1986). Aus diesen Ausführungen kann geschlossen werden, dass bei der MS eine genetische Disposition und Umweltfaktoren vorhanden sind, die den Krankheitsausbruch fördern. Möglicherweise spielt dabei der Umweltfaktor die entscheidende Rolle, denn anhand der o. g. Migrationsstudien lässt sich feststellen, dass Menschen, die vor dem 15. Lebensjahr aus einem Gebiet niedriger MS-Prävalenz in ein Gebiet hoher Prävalenz migrierten, ein erhöhtes Risiko besitzen, an der MS zu erkranken. Dies ist u. a. vereinbar mit der Vorstellung,

dass eine im Kindesalter erworbene Infektion letztlich zum späteren Ausbruch der Erkrankung der Multiplen Sklerose führt.

Als mögliche Infektionserreger werden vor allem Viren diskutiert. Tatsächlich bestehen histopathologische Ähnlichkeiten zwischen MS-Läsionen und denen bei viralen Tiermodellen (z. B. Coronavirus, Theilervirus) (Stohlman und Hinton 2001). Verdächtig werden hierbei das Masernvirus, das Ebstein-Barr-Virus sowie das Hundestaubevirus (Edwards et al., 1998). Das Humane Herpesvirus 6 oder Chlamydien, insbesondere Chlamydia pneumoniae wurden ebenfalls in Zusammenhang mit der MS gebracht (Willer and Ebers, 2000). Ferner wird ein Retrovirus (Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus) diskutiert. (Perron et al., 1997). Tatsächlich wurde der Befund einer erhöhten Aktivität der reversen Transkriptase im Liquor von MS-Patienten zum Anlass genommen, nach Retroviren bei MS zu fahnden. Keines der genannten Viren konnte jedoch bislang als eindeutiger Auslöser der MS identifiziert werden.

Die Viruspathogenese erklärt nicht die entzündlichen Aspekte dieser Erkrankung. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass die verschiedenen, bei MS beobachteten Immunphänomene, Folge viral kodierter superstimulatorischer Substanzen (sog. Superantigene) sein könnten. (Kornhuber et al., 2002; Kornhuber et al., 2003).

1.3 Pathologische Anatomie und Histologie der Multiplen Sklerose

Pathoanatomisches Kennzeichen der Erkrankung sind die sogenannten Plaques. Diese kommen vorrangig in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems vor, dabei sind die Prädisloktionsstellen periventikulär, entlang des Corpus callosum sowie im Bereich der Sehnerven und entlang der Sehbahn. Die Hinterstränge des Rückenmarkes und die lateralen Halsmarkbereiche sind ebenfalls vorzugsweise betroffen.

Makroskopisch erscheinen die Plaques in der weißen Substanz als grauweißliche, gut abgrenzbare polygonale Herde, die miteinander konfluieren können. Die Konsistenz des Gewebes erscheint deutlich erhöht gegenüber dem umgebenden Gewebe, was durch eine vermehrte Bildung von Narbengewebe in der Plaque hervorgerufen wird.

Histologisch zeigt sich in den Herden ein kompletter Verlust der Markscheiden, wobei die Axone im Gegensatz dazu relativ gut erhalten sind, aber die Gesamtzahl gegenüber gesundem Gewebe reduziert ist. Es zeigt sich hierbei das Bild einer segmentalen Entmarkung (Abb.3).

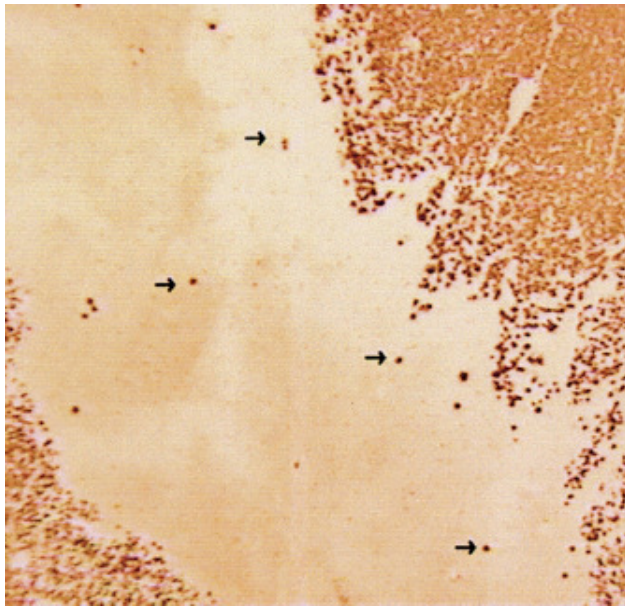


Abb. 3: Charakteristische „Plaques“ im Rückenmark einer MS-Patientin. Immunhistochemischer Nachweis von basischem Myelin-Protein in einem Gefrierschnitt. Innerhalb der Plaques sind einige wenige Axone myelinisiert (Pfeile). (Steck AJ, Schaeren-Wiemers N. Schweiz. Med. Wochenschr. 1999, 129: 1764-8)

Ältere Herde sind durch eine ausgeprägte fibrilläre Gliose gekennzeichnet. Es imponiert hier eine mäßiggradige Vermehrung von Astrogliazellen, deren Fortsätze mit Gliafibrillen bepackt sind, sowie die segmental entmarkten Axone.

Im Gegensatz dazu enthalten junge, aktive Herde Entzündungszellen und Makrophagen mit intrazytoplasmatischen Abbauprodukten, sog. Gitterzellen. Zu Beginn der Plaque-Entstehung kann allerdings auch Apoptose ohne Anwesenheit von Entzündungszellen im Vordergrund stehen (Barnett und Prineas, 2004).

Das Kriterium der unscharfen Begrenzung kann Ausdruck der erhöhten Zelldichte inklusive Entzündungszellen mit ödematöser Schwellung, aber auch Zeichen einer beginnenden Remyelinisierung in den Randbereichen sein (Prineas und Connell, 1979, Lassmann, 1983).

Weitere Plaquearten sind neben den oben beschriebenen typischen Plaques die sog. Markschattenherde, die konzentrischen und die destruktiven Plaque. Diese Plaquearten sind selten und wurden vor allem bei Patienten mit akuten oder subakuten Verlaufsformen der Multiplen Sklerose gesehen. Sie unterscheiden sich im Ausmaß und in der Ausdehnung der Entmarkung in der Plaque, wobei es bei den destruktiven Plaques, neben der typischen Entmarkung zu einer erheblichen Reduktion der Axone kommt. Eines haben diese Plaquearten untereinander, wie auch die typischen MS-Plaques gemeinsam. Vor allem in den Randzonen der Entmarkungsherde finden sich um die Axone dünne Myelinscheiden sowie verkürzte Internodien, die ein Hinweis auf eine Remyelinisierung sein können. Aus diesen Erkenntnissen kann geschlossen werden, dass möglicherweise verschiedene pathogenetische Ursachen zur Entmarkung führen können.

Zerebrale MS-Läsionen können in vivo sehr sensitiv mittels Magnetresonanztomographie (MRT) nachgewiesen werden (Abb.4 und 5). Dabei wird zwischen aktiven (Kontrastmittel aufnehmenden) Läsionen und nicht aktiven, chronischen (nicht Kontrastmittel aufnehmenden) Läsionen unterschieden. Nur etwa 10 % der im MRT nachweisbaren Läsionen manifestieren sich mit klinischen Symptomen (Filippi et al., 1998).

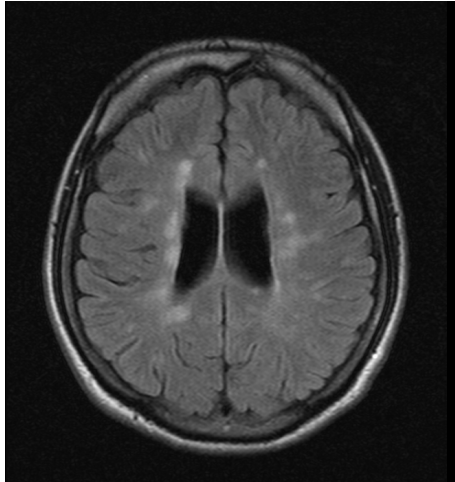


Abb. 4: Zerebrale MRT-Aufnahme (T1-gewichtet, Koronarschnitt) mit multiplen hyperintensiven, teilweise konfluierenden, periventrikulär gelegenen Läsionen

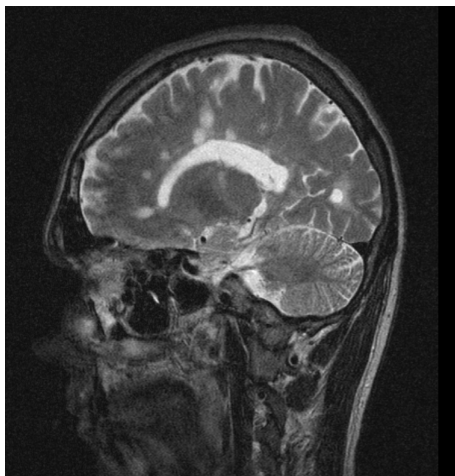


Abb.5: Zerebrale MRT-Aufnahme (T2-gewichtet, Sagittalschnitt) mit hyperintensiven, teilweise konfluierenden, periventrikulär gelegenen Läsionen

1.4 Pathogenese von Entmarkung und Gewebedestruktion bei MS

Allgemein wird davon ausgegangen, dass aktivierte T-Zellen, die die Blut-Hirnschranke passiert haben, von ZNS-eigenen antigenpräsentierenden Zellen (Mikrogliazellen, dendritische Zellen) dargebotenes Antigen erkennen und nachfolgend eine Entzündung im ZNS auslösen. Eine Demyelinisierung kann dabei prinzipiell durch primäre Schädigung der Oligodendroglia mit sekundärer Entmarkung oder durch direkte Zerstörung der Myelinscheiden entstehen. Bei der Pathogenese der Entmarkung bei der MS werden verschiedene Mechanismen diskutiert.

Immunglobulin- und Komplementablagerungen in den Plaques sprechen für eine antikörpervermittelte Demyelinisierung, unabhängig ob es sich um Autoantikörper oder um Antikörper einer Immunantwort im Rahmen der Infektabwehr handelt. Antikörper bei MS richten sich u. a. gegen das Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein (MOG), welches sowohl auf den Oligodendrozyten als auch auf den Myelinscheiden selbst exprimiert wird (Storch und Lassmann, 1997). Auch die Anwesenheit von TNF-alpha in den akuten Plaques ließ eine Beteiligung dieses Zytokins an der Entmarkung vermuten. Tatsächlich kann TNF alpha sowohl in vitro als auch in vivo eine Demyelinisierung mit Apoptose der Oligodendroglia induzieren (Brosnan und Raine, 1996). Völlig unabhängig von TNF-alpha können auch zytotoxische T-Zellen einen Untergang der Oligodendroglia auslösen. Dabei sind sowohl CD4+ Zellen als auch gamma/delta T-Lymphozyten involviert, während die Zielantigene wohl bestimmte Stressproteine oder das Fas-Antigen sind (Storch und Lassmann, 1997). Letztlich könnte eine primäre Schädigung der Oligodendrozyten auch direkt durch ein infektiöses Agens, z. B. durch Viren bedingt sein (Storch und Lassmann, 1997).

Neuere Studien an MS-Autopsien und -Biopsien zeigen, dass die zur Demyelinisierung führenden Mechanismen sehr heterogen sind. Dabei konnten vier verschiedene Muster der Entmarkung identifiziert werden (Lucchinetti et al., 2000). Diskutiert werden Entmarkungen, die über T-Lymphozyten und Makrophagen vermittelt werden, als antikörpervermittelte Mechanismen. Bei Patienten mit fulminantem Verlauf der Erkrankung werden darüber hinaus hypoxische Mechanismen der Gewebeschädigung diskutiert. Somit ist Heterogenität der strukturellen Veränderungen der MS-Herde sowie die klinische Heterogenität der Erkrankung zum Teil erklärbar (Lucchinetti et al., 2000). Die Pathogenese der Entmarkung ist zum jetzigen Zeitpunkt nur teilweise und unbefriedigend verstanden.

1.5 Tiermodelle für die zerebrale Entzündung der Multiplen Sklerose

Experimentelle Modelle besitzen aufgrund der schlechten Zugänglichkeit des menschlichen Gehirns als Forschungsobjekt einen hohen Stellenwert. Ein großer Anteil klinischer und immunologischer Erkenntnisse basiert auf den Ergebnissen von Tierexperimenten. Der Nachteil von geläufigen Tiermodellen besteht darin, dass die Krankheitsbilder nur unvollkommen nachgestellt werden können.

1.5.1 Experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE)

Durch Immunisation von Lymphozyten (CD4+ T-Lymphozyten) mit myelinspezifischen Antigenen, wird eine Entzündungsreaktion im Zentralen Nervensystem ausgelöst. Diese Entzündungsreaktion ist primär perivenös lokalisiert und kann abhängig von der verwendeten Tierart zu einer im Ausmaß stark variierenden Demyelinisierung im ZNS führen (Dal Canto et al., 1995). Im Allgemeinen wird gezeigt, dass aktivierte, autoreaktive T-Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überwinden, „ihr“ Myelin-Autoantigen im ZNS erkennen und eine Entzündungsreaktion auslösen, die durch Zytokinausschüttung und nachfolgende Aktivierung von Monozyten und Makrophagen gekennzeichnet ist (Bradl und Linington, 1996). Erst im Verlauf einiger Tage kommt es zu mehr oder weniger ausgeprägten Demyelinisierungen. Erste Symptome machen sich etwa 6 - 8 Tage nach Sensibilisierung bemerkbar. Auffällig werden die Tiere durch eine zunehmende Ataxie, wobei sich im Verlauf eine Parese der Hinterläufe entwickelt, die zum späteren Zeitpunkt in eine Plegie übergeht, begleitet von Harninkontinenz. Diese Symptomatik bildet sich innerhalb von zwei Wochen zurück. Das erste Rezidiv kann in der vierten Woche folgen (Dal Canto et al., 1995). Histologisch sind vor allem perivenöse Lymphozyteninfiltrationen zu beobachten. Makrophagen sind ebenfalls zu beobachten. Das Modell der EAE weist Ähnlichkeiten zur Entzündungsreaktion in MS-Herden auf. Es erklärt jedoch nicht hinreichend degenerative Prozesse bei MS, die parallel zur Entzündung ablaufen oder sogar dieservorausgehen (Kornhuber und Zierz, 2003, Kornhuber, 2006).

1.5.2 Modelle virusinduzierter entzündlicher Entmarkung

Als Alternative zur EAE wurden Virusmodelle etabliert (Wisniewski 1977). Zu nennen sind die Theiler-Virus-Enzephalitis, die Hundestaupenzephalitis und das Korona-Virus-Modell, die alle zu einer Enzephalomyelitis führen. Es kommt zur Neurodegeneration, die von einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Entzündung und Demyelinisierung begleitet ist. Ein an der Ätiologie potenziell beteiligter Umweltfaktor (möglicherweise eine Virusinfektion) wird in diesen Modellen berücksichtigt. Die am häufigsten untersuchte virale Enzephalomyelitis wird durch das Theiler-Virus ausgelöst. Theiler Viren aus der Gruppe der Picorna-Viren (Lipton und Friedmann, 1980) lösen bei Mäusen eine Enzephalomyelitis aus, die akut bis chronisch verläuft. Die akute Phase der Infektion ist durch die Infektion der Nervenzellen gekennzeichnet, während sich in der chronischen Phase großflächige Entmarkungsherde bilden. Interessanterweise lässt sich das Virusantigen in der chronischen Phase nur gering nachweisen (Dal Canto, 1982). Makrophagen scheinen bei dieser Entzündungsreaktion, insbesondere im Rahmen der Entmarkungsreaktion eine

Rolle zu spielen (Dal Canto, 1982). Friedmann et al. (1987) zeigten einen engen Zusammenhang der Histokompatibilitätsantigene der Klasse II mit der Entzündungsreaktion der Theiler-Virus-Enzephalitis. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob autoimmunologische Prozesse eine Rolle spielen oder die Entzündungsreaktion überwiegend gegen Virusantigene gerichtet ist.

1.5.3 Superantigen-Tiermodell der MS

Hierbei handelt es sich um eine fokale Leukenzephalitis der Ratte durch intrazerebrale Injektion von Enterotoxinen (Superantigene) und periphere Injektion aktivierter Milzzellen (Kornhuber et al., 2002). Dabei wird von der Hypothese ausgegangen, dass ein Erreger (z. B. neurotropes Retrovirus) intrazerebral Superantigene bildet und somit indirekt verantwortlich für die Immunphänomene im Rahmen der Multiplen Sklerose ist. Die Reaktion auf intrazerebral injizierte Staphylokokken-Enterotoxine wurde bei Lewis-Ratten histologisch untersucht (Kornhuber et al., 2002). Es zeigte sich eine Häufung der Entzündungsherde im Corpus callosum und periventrikulär. Der Unterschied zur EAE besteht darin, dass die aktivierten Lymphozyten nicht durch ein bestimmtes Antigen immunisiert sind. Hierbei werden im Gegensatz zur EAE aktivierte Lymphozyten peripher venös injiziert, die nicht gegen ein bestimmtes Antigen sensibilisiert sind. Die Lymphozyten erkennen im ZNS das vorher intrazerebral injizierte Superantigen. Dadurch wird eine der EAE und MS ähnliche Entzündungsreaktion hervorgerufen, die am 5. bis 6. Tag ihren Höhepunkt erreicht (Kornhuber et al., 2002).

1.6 Zielsetzung der Studie

In der vorliegenden Studie soll die differenzielle Genexpression im ZNS nach intrazerebraler Superantigeninjektion [Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA)] untersucht werden. Die Untersuchung verfolgt dabei mehrere Ziele: (1) Untersuchung der molekulargenetischen Veränderungen der durch Superantigeninjektion ausgelösten zerebralen Entzündungsreaktion, (2) die durch Superantigen ausgelöste Entzündungsreaktion soll neben den bisher durchgeführten histologischen Untersuchungen mit einer anderen Methode bestätigt werden, (3) die Genexpressionsmuster im ZNS, nach zerebraler Superantigeninjektion soll mit denen bei EAE bzw. MS erhobenen Befunden verglichen werden, um Hinweise auf Ähnlichkeiten oder Unterschiede zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Antifoam	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
2 nd -strand-buffer	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript II	Invitrogen, Karlsruhe
T7-(dT)24-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Ligase (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Polymerase (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
RnaseH (<i>E.coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
BSA	Invitrogen, Karlsruhe
Hering Sperm DNA	Promega, Mannheim
5 M NaCl (RNase-free)	Ambion, Austin, USA
MES	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
SSPE (20x)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Ziegen-IgG	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Anti-Streptavidin-Antikörper	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Chloroform	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
Biotin 11-CTP	Enzo Biochem Inc., USA
Biotin 16-UTP	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneChip Expression- Amplification Reagents	Affymetrix, Santa Clara, USA
EDTA (0,5 M)	Ambion, Austin, USA
NH4OAc	Ambion, Austin, USA
Phenol	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Isoamylalkohol	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Erythrozytenlysepuffer	Universitätsapotheke Halle
Genechip RG-U34A	Affymetrix, Santa Clara, USA
Tween 20	Pierce Chemicals, Rockford, USA

Concanavalin A	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Staphylokokkenenterotoxin A	Toxin Technology, Sarasota, USA
Nährmedium RPMI 1640	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
FCS	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim
Glutamin	Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim

2.2 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden von der Landesregierung genehmigt. Wir verwendeten männliche Lewis-Inzuchtratten mit einem Gewicht von circa 300 g. Im Vergleich zu bestimmten Meerschweinchen- oder Mäusearten sind diese Ratten für die EAE stärker suszeptibel (Paterson et al., 1970). Eine periphere Injektion der Immunzellen über die Schwanz-oder Penisvene kann problemlos erfolgen.

Die Tiere wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) im Tierstall der Martin-Luther-Universität unter Standardbedingungen (Makrolonkäfige, pelletiertes Rattenalleinfutter, Holzgranulateinstreu, täglich frisches Wasser) gehalten und von geprüften Versuchstierpflegern betreut. Vor der jeweiligen Versuchsdurchführung wurden die Tiere mindestens eine Woche gehandelt.

2.3 Milzentnahme und Aufbereitung der Lymphozyten

Die Tötung der Tiere erfolgte in einer mit CO₂-gefüllten, abgeschlossenen Kammer. Der eingetretene Tod der Versuchstiere wurde danach objektiviert. Nach Entfärbung der Augen wurde unter aseptischen Bedingungen die Bauchdecke eröffnet, die Milz frei präpariert und entnommen. Im Anschluss wurde das Milzgewebe unter sterilen Bedingungen mechanisch durch ein Sieb zerkleinert und die Zellsuspension in PBS aufgenommen. Danach erfolgten mehrere Waschkücheln mit Zentrifugation (1 200 g, 10 Min.) und Resuspension mit PBS und Verwerfen des Überstandes. Die noch in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten wurden nach Zugabe von 5 ml fetalem Kälberserum zur Schonung der Lymphozyten mit Lysepuffer (Ammoniumchloridlösung) für 4 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten weitere 3

Waschungen der Zellsuspension. Nun wurde die in der Suspension enthaltene Lymphozytenzahl mittels Zählkammer ermittelt. Somit konnte eine genau definierte Anzahl ($1,5 \times 10^6$ Zellen) pro Petrischale dem Nährmedium zugegeben werden. Zusätzlich wurden zur Stimulation der Lymphozyten das Mitogen Concanavalin A in der Dosierung $2,5 \mu\text{l/ml}$ in der Petrischale enthaltenem Nährmedium zugegeben. Die Dosierung wurde anhand einer zuvor durchgeführten Verdünnungsreihe gewählt, wobei bei dieser Dosis die höchste Proliferationsrate der Lymphozyten zeigte.

Die Entscheidung das Mitogen Concanavalin-A zur Aktivierung zu verwenden, bezog sich auf die Dissertation von Ganz et al., 2002, in der anhand von Proliferationsversuchen mit verschiedenen Mitogenen die höchste Proliferationsrate unter Concanavalin A gesehen wurde.

Die Lymphozyten wurden für 3 Tage bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Am 3. Tag wurde durch ein Lichtmikroskop die Proliferation der Lymphozyten beurteilt. Eine gute Proliferation konnte anhand von zusammenliegenden Zellhaufen erkannt werden. Bei positivem Proliferationsnachweis wurden die Zellen geerntet. Anschließend erfolgten mindestens 3 Waschvorgänge, und eine weitere Zählungen der in der Suspension vorhandenen Lymphozyten. Jedem Tier wurden ca. $1,5 \times 10^7$ Zellen injiziert. Die Injektion erfolgte direkt im Anschluss an die Zellernte, zudem wurden die Zellen auf Eis gekühlt, um eine möglichst geringe Schädigung der Zellen zu erreichen.

2.4 Intrazerebrale Inokulation des Superantigens (Tag 0)

Vor der Operation wurden die Tiere gewogen und markiert. Jedes Tier wog ca. 300 - 350g. In tiefer Narkose [Ketanest/Rompun i.p ($2\text{mg/kg KG}/ 1\text{-}2 \text{mg/kg KG}$)] wurde die Ausschaltung der Schmerzempfindung anhand interphalangealer Schmerzstimuli sichergestellt. Nach Hautdesinfektion wurde ein rechts paramedianer Hautschnitt entlang der Schädelkalotte vorgenommen, das Periost zu den Seiten verdrängt und ein Bohrloch, 2 mm rechts der Mittellinie und 2 mm hinter dem Bregma in der Schädelkalotte platziert. Durch dieses Bohrloch wurden $50 \mu\text{l}$ Superantigenlösung in 3 mm Tiefe langsam injiziert. Die Injektion galt als erfolgreich, wenn ein Teil der injizierten Flüssigkeit retrograd das Bohrloch verließ. Die Flüssigkeit wurde mit einem Tupfer aufgenommen. Danach erfolgten Hautnaht und Desinfektion dieser. Die Tiere wurden nach der Operation noch einige Zeit überwacht. Zur postoperativen Schmerzbekämpfung wurden Metamizoltropfen per os verabreicht. Die Narkosedauer betrug etwa 20 Minuten, die Operation dauerte durchschnittlich 10 Minuten. Nach einer kurzen Erholungsphase wurden postoperativ keine neurologischen Defizite beobachtet.

2.5 Injektion aktivierter Lymphozyten (Tag 3)

Die aktivierten Lymphozyten wurden während einer kurzen Narkose (Ketanest/Rompun i.p.) über die Penisvene injiziert. Es folgte die intravenöse Injektion von 0,5 ml des Zell-PBS-Gemisches ($1,5 \times 10^7$ Zellen). Nach Durchführung dieser Prozedur wurden die Tiere für einige Zeit beobachtet. Peri- und postoperativ blieben die Tiere unauffällig.

2.6 Gehirnentnahmen (Tag 8)

Die Gehirnentnahme erfolgte am 5. Tag nach intravenöser Injektion der aktivierten Lymphozyten. In tiefer Narkose (Ketanest/Rompun i.p.) wurden die Bauch- und Brusthöhle eröffnet und ein schräg angeschnittener Butterfly-Schlauch über den eröffneten linken Ventrikel des Herzens in die Aorta vorgeschoben. Es folgte die systemische Perfusion mit 4-8 °C kalter NaCl-Lösung. Unmittelbar vor Beginn der Perfusion wurde der rechte Vorhof des Herzens eröffnet. Die Perfusion dauerte etwa 20 Minuten bis zur völligen Entfärbung der Leber. Danach wurde der Schädel eröffnet. Dazu wurden mit einer Schere, ausgehend vom Foramen magnum die occipitalen Schädelanteile nach lateral weggebrochen. Anschließend erfolgte das Verschieben eines Scherenendes von dorsal flach unter das Schädeldach, welches zu den Seiten weggehoben wurde. Es folgte das Abziehen der Dura mater mit einer chirurgischen Pinzette. Nun konnte das Gehirn mit dem flachen Griffende des Skalpell von der Schädelbasis abgehoben werden. Die Injektionsstelle wurde visuell identifiziert. Mit einer Klinge wurde eine circa 2 mm dicke Scheibe in Richtung des Injektionskanals in koronarer Schnitfführung gewonnen. Diese Scheibe wurde in der Mitte geteilt und injizierte und nicht injizierte Hälfte separat in Isopropanol auf Trockeneis schockgefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung innerhalb von 6 Wochen bei -80 °C gelagert.

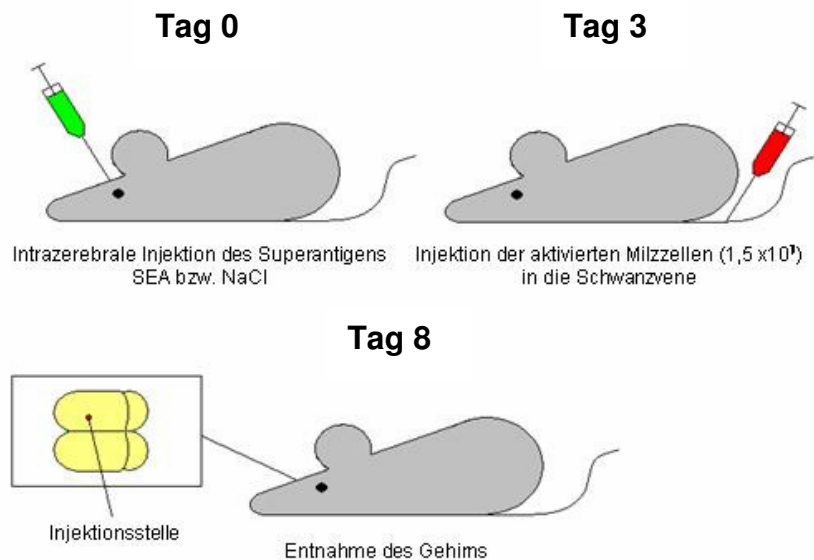


Abb. 6: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens.

2.7 DNA-Array-Technik

2.7.1 Funktionsprinzip

Die DNA-Array-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren (Watson-Crick-Basenpaarbildung). Dabei lagern sich zwei komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen. Auf einem Träger-Substrat immobilisierte DNA hybridisiert mit unterschiedlich fluoreszenz-markierten Targetnukleinsäuren aus verschiedenen zu vergleichenden Geweben. Die Orte und Intensität der Target-Hybridisierung werden nach Abwaschen unspezifisch gebundener Targets mit einem Fluoreszenzdetektor analysiert. Als Immobilisierungsmatrix werden beschichtete Glas-Objektträger oder Nylon/Nitrozellulose-Membranen verwendet. Die auf der Matrix an einem bestimmten bekannten Ort immobilisierte DNA wird als Proben-DNA bezeichnet. Die zu untersuchende markierte cDNA aus dem Experiment-Gewebe ist die Target-DNA. Diese wird über den Ort der Hybridisierung auf dem Chip identifiziert und mittels der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Wenn ein besonders kleines festes Substrat als Unterlage für die Proben-DNA verwendet wird, spricht man von DNA-Chips. Ein DNA-Array mit 100 000 spezifischen Flechten erlaubt die Untersuchung des

gesamten Genoms in einer einzigen Hybridisierung. Für Expressionsanalysen werden spezifische vom 3' Ende der mRNA abgeleitete cDNA-Proben oder direkt aus Datenbanksequenzen generierte Oligonukleotid-Proben verwendet. Diese werden auf dem Array mit Targets aus zwei mit verschiedener fluoreszenzmarkierter revers transkribierter cDNA hybridisiert. Die Fluoreszenzmarker lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Absorptions- und Emissionseigenschaften trennen. Genexpressions-Muster werden dementsprechend nach Hybridisierung über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den beiden verschiedenen Wellenlängen für die Gewebe erstellt.

2.7.2 Präparation der RNA für die Analyse der Genexpression

Für die Analyse wurde ausschließlich Gesamt-RNA ohne Aufreinigung von poly(A)+RNA präpariert. Die Zellen wurden in 1 ml TRIzol, einem gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemisch, pro 50 - 100 mg Gewebe oder 5 - 10 x 10⁶ Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Suspension durch eine Kanüle homogenisiert und die Suspension anschließend bei 12 000 g für 15 Min. bei 4 °C in 1,5 ml Gefäßen zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Zellklumpen in eine neues Reaktionsgefäß überführt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetztem TRIzol wurde die Probe 15 Sekunden gerüttelt und bei Raumtemperatur 3 Min. inkubiert, anschließend bei 12 000g 15 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Die obere, klare, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,5 ml Isopropanol pro ml eingesetztem TRIzol zur wässrigen Phase hinzugegeben, leicht gemischt und bei Raumtemperatur 10 Min. inkubiert, anschließend bei 12 000 g 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 1 ml 4 °C kaltem 75 - 80 % Äthanol pro ml eingesetztem TRIzol gewaschen und anschließend bei 7 500 g 5 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser (RN-ase-frei) resuspendiert. Die präparierte RNA wurde einer Qualitätskontrolle unterzogen (s. u.).

Zur Aufreinigung der präparierten Gesamt-RNA bedienten wir uns dem RNeasy Mini Kit von Qiagen, Deutschland. Dabei wurde das Volumen der Probe mit RNase freiem Wasser auf 100 µl eingestellt. Die Probe wurde nach Vorschrift des Herstellers aufgearbeitet. Auf Grund der nahezu proteinfreien, durch TRIzol gereinigten RNA, verzichteten wir auf den Zusatz von alpha-Mercaptoethanol. Nun wurde, abweichend vom Herstellerprotokoll, die

RNA in zwei aufeinander folgenden Schritten mit jeweils 25 µl DEPC-Wasser eluiert. Die aufgereinigte RNA lag nun in wässriger Lösung (50 µl) vor. Es folgte die cDNA-Synthese. Hierbei wurden 15 µg RNA in maximal 10 µl H₂O verwendet. Im Fall zu geringer RNA-Konzentration musste eine Ethanol-Präzipitation erfolgen. Zur RNA-Lösung wurde DEPC-Wasser gegeben (Einstellung auf 150 µl Volumen). Darüber hinaus wurden 150 µl 5M NH₄OAc, 2,5 Volumenteile Ethanol und 0,5 µl Glykogen hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für 10 Min. bei 20 °C. Zentrifugation für 30 Min. bei 12 000 g und 16° C. Nun erfolgte das Waschen des Pellets mit 500 µl kaltem Ethanol (80 %) und die anschließende Zentrifugation bei 12 000 g und 16 °C. Nach Lufttrocknung des Pellet wurde die RNA in RNasefreiem Wasser resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

2.7.3 Präparation der cDNA für die Analyse der Genexpression

Einstellung des Volumens der RNA auf 15 µg/10 µl Zugabe von 1 µl T7-(dT)₂₄-Oligonukleotidprimer („Primer“) für die Primer-Hybridisierung. Es folgte die anschließende Inkubation für 10 Min. bei 70 °C und die Zentrifugation (5 s). Die Probe wurde für 2 Min. auf Eis gestellt. Nun erfolgte die Erst-Strang-Synthese, in der an die vorhandene RNA ein komplementärer Strang synthetisiert wird. Dies erfolgte unter der Verwendung des Superscript-Choice-Systems. Dabei wurden zu 11 µl der Primer hybridisierten RNA, 4 µl 1st-Strand-Buffer (5fach konzentriert), 2 µl 0,1 M DDT (Endkonzentration 0,01 M) und 1 µl 10 mM dNTP (Endkonzentration 0,5 mM) gegeben und der Ansatz bei 37 °C für 2 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 2 µl der reversen Transkriptase Superskript RT II und erneute Inkubation bei 37 °C für 60 Min. In der Zweit-Strang-Synthese wird aus dem cDNA-Strang ein DNA-Doppelstrang synthetisiert, jedoch der ursprüngliche RNA-Strang abgebaut. Herstellung des Syntheseansatzes: Zugabe von 3 µl dNTP (10 mM, Endkonzentration 0,2 mM), 1 µl E. coli DNA-Ligase (10 U/µl), 4 µl E.coli DNA Polymerase I (10 U/µl), 1 µl RNase H (2 U/µl) und 95 µl H₂O zu 30 µl 2nd-Strand-Buffer. Zu diesem Ansatz wurde der komplette Ansatz aus der Erst-Strang-Synthese gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation des Gesamtansatzes für 2 Stunden bei 16 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Es folgte die Aufreinigung der doppelsträngigen DNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurden Phase-Lock-Gel-Tubes bei 24 000 g für 1 Min. zentrifugiert. Dadurch wurde die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt. Der komplette Ansatz wurde in die so vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 166 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkoholgemisches (Verhältnis 25 : 24 : 1) wurde der Ansatz

kurz geschüttelt und für 2 Min. bei 12 000g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gleiche Menge 5 M NH₄OAc zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol sowie 0,5 µl Glykogen, das Mischen der Lösung und die Inkubation für 10 Min. bei -20 °C. Danach erneutes Zentrifugieren für 30 Min. bei 12 000 g und 16 °C. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl 4 °C kaltem Ethanol (80%ig) gewaschen und erneut bei 12 000g und 16 °C für 5 Min. zentrifugiert. Wiederholung des Waschvorgangs mit nachfolgender Trocknung des Pellets und Resuspension der DNA in 3 µl RNasefreiem Wasser.

2.7.4 In vitro-Transkription (IVT)

Durch den Vorgang der in vitro-Transkription wird die doppelsträngige DNA in RNA umgeschrieben. Dazu wurden neben unmarkierten auch biotin-gekoppelte Nukleotide verwendet, die zum Markieren der RNA-Moleküle dienen. Die IVT erfolgte unter Verwendung des MEGAscript T7 Kits. Der für diesen Vorgang erforderliche Ansatz setzt sich wie folgt zusammen: jeweils 2 µl ATP (75 mM, Endkonzentration 7,5 mM) und GTP (75 mM, Endkonzentration 7,5 mM), jeweils 1,5 µl Cytidin-Triphosphat (CTP) (75 mM, Endkonzentration 5,6 mM) und Uridin-Triphosphat (UTP) (75 mM, Endkonzentration 5,6 mM), jeweils 3,75 µl Biotin-CTP (10 mM, Endkonzentration 1,9 mM) und Biotin-UTP (10 mM, Endkonzentration 1,9 mM), jeweils 2 µl Puffer-Mix und Enzym-Mix. Zum Ansatz wurden 1,5 µl der frisch hergestellten und gereinigten DNA ausgegeben. Inkubiert wurde für 6 h bei 37 °C. Nach Abschluss der in vitro-Transkription wurde die synthetisierte RNA mit dem RNeasy Mini Kit gereinigt und einer Qualitätskontrolle unterzogen (s. u.). Die Analyse der RNA erfolgte über die Auftrennung in neutralen Agarosegelen (1,0 % Agarose in 1xTAE-Puffer mit Ethidiumbromid zur Anfärbung der Nukleinsäuren). Als Laufpuffer wurde 1xTAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) verwendet. Vor der Messung wurde die RNA 5 Min. bei 65 °C erhitzt und sofort für 2 Min. auf Eis gestellt. Es wurde 1 µg RNA pro Probe aufgetragen.

2.7.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurden die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt. Berechnung der Konzentration für RNA (gemessen bei 260 nm, Schichtdicke 1 cm): 1 OD = 40 µg/ml. Vor der Messung wurde die RNA für 5 Min. bei 65 °C erhitzt und sofort für 2 Min. auf Eis gestellt. Durch die Bestimmung

des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorption ($A_{260} : A_{280}$) erhält man eine Information über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Liegt der Quotient für RNA im Bereich 1,9 - 2,0 ist die RNA als rein anzusehen. Für die Aufreinigung mit TRIzol ist ein Wert zwischen 1,5 - 1,7 akzeptabel. Zur Analyse der Genexpression wurde der GenchipAffymetrix (rat genome U34A) für das Rattengenom verwendet. Für die Herstellung der Hybridisierungslösung wurden zuerst eine 12 M MES-Lösung (1,22 M MES (2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure), 0,89 M MES-Natriumsalz, in Wasser, pH 6,5, sterilfiltriert) und ein Hybridisierungspuffer (200 mM MES, 2 M [Na+], 40 mM EDTA, 0,02 % Tween20) hergestellt. Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurden 15 µg fragmentierte RNA (Endkonzentration 0,05 µg/µl) 15 µl Eucaryotic Hybridization Controls (Spike Controls, Endkonzentration 100 pM), 5 µl Control Oligonucleotide B2 (3 nM, Endkonzentration 50 pM), 3 µl Hering Sperm DNA (3 nM, Endkonzentration 0,1 mg/ml), 3 µl acetyliertes bovines Serum Albumin (BSA) (50 mg/ml, Endkonzentration 0,5 mg/ml) 150 µl des Hybridisierungspuffers und 104 µl Wasser zugegeben und gemischt. Vor der Inkubation auf den Array wurde die fragmentierte RNA enthaltene Hybridisierungslösung für 2 Min. bei 24 000g zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu sedimentieren. Die Arrays wurden auf Raumtemperatur erwärmt, mit 200 µl des Hybridisierungspuffers befüllt und für 10 Min. bei 45 °C unter Rotation im Hybridisierungssofen präinkubiert. Nach Entnahme des Puffers wurden die Arrays mit 200 µl der Hybridisierungslösung befüllt und im Hybridisierungssofen für 16 Stunden bei 45 °C inkubiert.

2.7.6 Microarray Scan

Nach der Inkubation wurde die Hybridisierungslösung entnommen. Die Arrays wurden mit 200 µl des Puffers Non-Stringent-Wash A befüllt [6 x SSPE (20 x SSPE Stock aus 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTA)], 0,01 % Tween20, in Wasser, sterilfiltriert, 0,005 % Antifoam und bis zur weiteren Verarbeitung bei RT im Dunkeln aufbewahrt. Des weiteren wurde der Puffer Stringent-Wash B hergestellt (100 mM MES, 0,1 M [Na+], 0,01 % Tween20, sterilfiltriert).

Für die Herstellung der SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin) wurde zuerst ein 2 x Färbepuffer hergestellt (200 mM MES, 2 M [Na+], 0,1 % Tween20, sterilfiltriert, 0,01 % Antifoam). Zu 400 µl des 2 x Farbe-Puffers wurden 360 µl Wasser, 32 µl acetyliertes BSA (50 mg/ml) und 8 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) zugegeben. In der Fluidics-Station des Systems wurden die hybridisierten Arrays mit der SAPE-Lösung für 30 Min. bei 25 °C inkubiert und automatisch mit den beiden Lösungen Non-Stringent-Wash-A und Stringent-Wash-B gewaschen. Die fertigen Arrays wurden bei 570 nm (Anregungswellenlänge 488 nm) bei einer Auflösung von 3 µm gescannt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Die gemessenen

Lichtintensitäten aus beiden Bildern werden automatisch pro Pixel gemittelt und das endgültige Bild des Arrays gespeichert. Die bereits mit SAPE gefärbten und gescannten Arrays können einem zweiten Färbeschritt unterzogen werden, bei dem es durch Verwendung biotinylierter anti-Streptavidin-Antikörper und erneuter Färbung mit SAPE zu einer Verstärkung der Fluoreszenzsignale kommt. Für die Antikörper-Lösung wurden zu 400 µl des Färbepuffers (355,2 µl Wasser, 32 µl acetyliertes BSA (50 mg/ml), 8 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml) und 4,8 µl biotinylierter anti-Streptavidin-Antikörper (0,5 mg/ml) gegeben. In der Fluidics-Station des Systems wurden die hybridisierten und bereits einmal gefärbten Arrays erneut mit der SAPE-Lösung für 10 Min. bei 25 °C inkubiert und automatisch mit den beiden Lösungen Non-Stringent-Wash A und Stringent-Wash B gewaschen (Waschprogramm EukGE-WS2). Die fertigen Arrays wurden erneut bei 570 nm (Anregungswellenlänge 488 nm), bei einer Auflösung von 3 µm mit einer Wiederholung gescannt. Die gemessenen Lichtintensitäten aus beiden Scans werden pro Pixel gemittelt und das endgültige Bild des Arrays gespeichert.

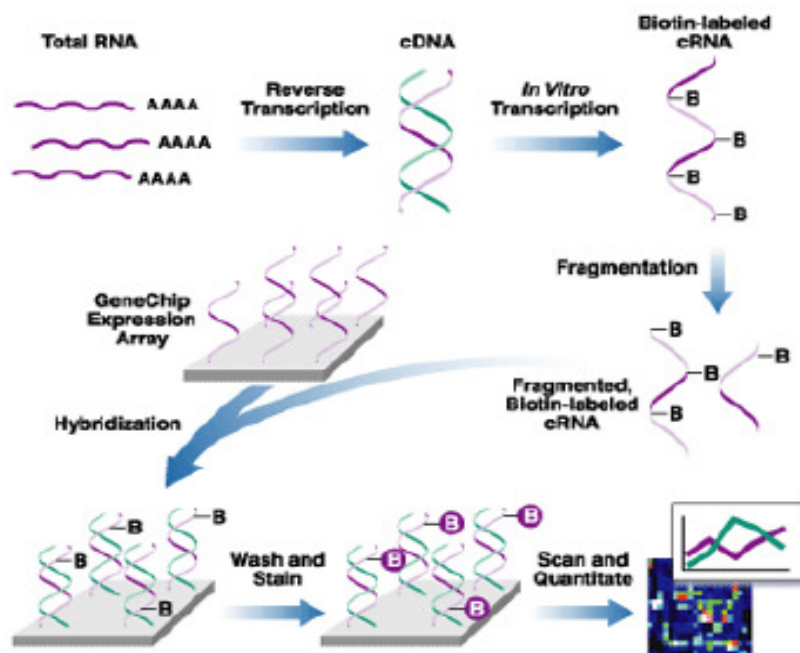


Abb. 7: Aufspaltung und Hybridisierung der RNA
 (Quelle: http://www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx)

2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode, die es ermöglicht, DNA-Sequenzen selektiv mit hoher Spezifität und Sensitivität zu vervielfältigen. Für diese Reaktion sind eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die abzulesende DNA-Sequenz, Nukleotide sowie optimale Reaktionsbedingungen (Temperatur, Primer) nötig. Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung der DNA, wobei diese in die beiden Einzelstränge getrennt wird. Dieser Vorgang erfolgt bei einer Reaktionstemperatur von 95 °C. Anschließend wird die Temperatur auf 60 °C gesenkt, damit die Oligonukleotidprimer (Startsequenzen) und die jeweiligen Einzelstränge der DNA ankoppeln können (Annealing). Nach diesem Vorgang muss die Temperatur auf ca. 72 °C erhöht werden, um optimale Bedingungen für die Verdopplung der Einzelstränge durch die Taq-Polymerase zu schaffen (Polymerisation). Das Temperaturoptimum hängt jedoch von der eingesetzten Polymerase ab. Die Einzelschritte werden im Folgenden wiederholt, bis genügend vervielfältigte DNA vorliegt. Danach erfolgte die Quantifizierung mittels Agarosegelelektrophorese.

Primer:

Name	Primersequenzen
CCL 5	Left primer 5'ATCCCCAGCTGGTTAGGACT 3' Right Primer 5'GTGCCCACGTGAAGGAGTAT 3'
Timp-1	Left primer 5'TCAGATTATGCCAGGGAACC 3' Right Primer 5'TCCCCAGAAATCATCGAGAC 3'
Osteopontin	Left primer 5'GAGGAGAAGGCGCATTACAG 3' Right Primer 5'ATGGCTTTCATTGGAGTTGC 3'
CD74	Left primer 5'GGGAGTGACCAAGCAGGATA 3' Right Primer 5'AATGGGGGTCCTTTAGATGG 3'

RT1-Da	Left primer 5' AGAAAACCCTCCTCCCAGAA 3' Right Primer 5' TGAGAGAAGGGGTAGCCTCA 3'
C3	Left primer 5' TGCTTCATGCATCAGTCACA 3' Right Primer 5' TTTAGGGCGTTTCTGCACTT 3'
Tenascin C	Left primer 5' GCCATGAAGGGATTTGAAGA 3' Right Primer 5' ACTGTGCGGGTAATTTCTGG 3'
CD8	Left primer 5' ACACTTCGCAAGGATGCTCT 3' Right Primer 5' GTTGCTGGTGATTGAGCAGA 3'
CCL2 (MCP-1)	Left primer 5' GACCTTCCAGATCCTGGTCA3' Right Primer 5' GAGGTCCTTTCTGACGCTTG 3'

PCR-Ansatz:

10 x PCR Puffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 µl
10 mM dNTP-Mix	0,5 µl
sense Primer	0,25 µl
antisense Primer	0,25 µl
Taq – DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	18,8 µl
cDNA	je 1µl

Lösungen/ Firma:

10 x PCR-Puffer	Promega
25 mM MgCl ₂	Promega
10 mM dNTP Mix	Fermentas
sense Primer 25 µM	MWG Biotech AG, Ebersberg
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	Promega

Die Reaktionsbedingungen für CCL5, CD74, TNC, TIMP-1, RT1-Bb, OSP, C3, CD8a waren wie folgt:

- Initialer Denaturierungsschritt 95 °C für 5 Min
- 30 Zyklen mit:
 - Denaturierung 94 °C für 30 Sek
 - Annealing 60 °C für 30 Sek
 - Extension 72 °C für 1 Min
- Finaler Extensionsschritt 72 °C für 7 Min

Für Aktin wurde dasselbe Programm gewählt, jedoch mit 22 Zyklen.

cDNA-Synthese:

Ansatz: 5 x RT-Puffer a 4 µl
 Oligo dT 18 Primer (0,5 µg/µl) a 1 µl
 10 mM dNTP Mix a 1 µl
 RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (2.000 U/µl) a 1 µl
 (jeweils von der Firma Fermentas)

Programm: 60 Min. bei 37 °C im PCR-Cycler (Eppendorf)
 5 Min. bei 90 °C zur Inaktivierung

2.9 Real-time Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR)

Die Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Diese beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (s. o.), wobei im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Anzahl der entstandenen Kopien mit dem sog. Lightcycler System nach jedem Zyklus gemessen

werden können. Das Lightcycler System basiert auf der Detektion eines in doppelsträngige Konstrukte interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR Green). Zum Zeitpunkt der Denaturierung liegt SYBR Green noch ungebunden vor und weist nur geringe Fluoreszenz auf. Im Elongationsschritt bei Annealingtemperatur (60 °C), bindet SYBR Green die nun vorliegende doppelsträngige DNA. In den nachfolgenden Polymerisationsschritten werden immer mehr Farbstoffmoleküle gebunden. Dadurch wird die Lichtemission von SYBR Green verstärkt, nachdem es durch einen Laserstrahl angeregt wurde. Die Leuchtintensität (abhängig von gebundenen SYBR-Green in der gebildeten DNA) verhält sich proportional zur Menge an gebildeten Amplifikaten.

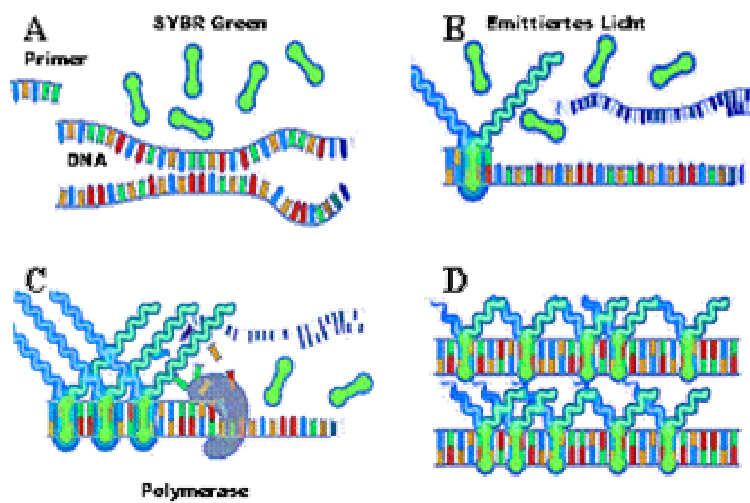


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Real-time PCR Zyklus unter Verwendung von SYBR- Green. Bild A: Denaturierung, Bild B: Annealing, Bild C: Elongation, Bild D: PCR-Produkt (aus Endres, 2005)

Materialien: QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Quiagen, Hilden, Deutschland

Ansatz :

SYBR Green	a 10 µl
Sense Primer	a 1 µl
Antisense Primer	a 1 µl
H ₂ O	a 6 µl
cDNA	a 2 µl

Die Reaktionsbedingungen für CCL5, CD74, TNC, TIMP-1, RT1-Bb, OSP, C3, CD8a waren wie folgt:

- | | | |
|---|---------------------------------|-------------------|
| - | Initialer Denaturierungsschritt | 95 °C für 15 Min. |
| - | 30 Zyklen mit: | |
| | - Denaturierung | 95 °C für 45 Sek. |
| | - Annealing | 60 °C für 45 Sek. |
| | - Extension | 72 °C für 1 Min. |
| - | Finaler Extensionsschritt | 72 °C für 5 Min. |

Cycler: Rotor Gene 3000 von Corbett life science

3. Ergebnisse

3.1. Superantigen (SEA) und Genexpression

In der vorliegenden Untersuchung wurde die zerebrale Genexpression mittels Microarray-Technik im Rattengehirn untersucht, und zwar nach intrazerebraler Injektion des T-Zell-Superantigens SEA im Vergleich mit Lösungsmittel (physiologische Kochsalzlösung) sowie mit Tieren, die lediglich narkotisiert wurden ohne eine intrazerebrale Injektion zu erhalten. In allen Gruppen wurden zusätzlich durch Pflanzenlectin (Concanavalin A) aktivierte Milzzellen in die Blutbahn gebracht, um ggf. eine zerebrale Immunreaktion zu verstärken (Kornhuber et al. 2002). Berücksichtigt wurden Gene mit einer Expressionsveränderung größer 3fach zu Gunsten der SEA-Gruppe gegenüber der NaCl-Gruppe.

Von 8 800 Genen zeigte sich in der SEA-Gruppe bei 109 Genen eine signifikant höhere Genexpression als in der mit NaCl injizierten Kontrollgruppe (Tabelle 1). Die differenzielle Expression ausgewählter Gene, die bedeutungsvoll erschienen, wurde durch Kontrollexperimente mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Real-time-PCR kontrolliert und bestätigt. Die linke (nicht injizierte) Hirnhälfte zeigte ebenfalls eine erhöhte Expression der kontrollierten Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Expression betrug ca. 50 %, im Vergleich zur rechten, injizierten Hirnhälfte. Von den untersuchten 8800 Genen zeigte sich in der SEA-Gruppe bei 29 Genen eine signifikant niedrigere Genexpression als in der mit NaCl injizierten Kontrollgruppe (Tabelle 2).

Die Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Technik sowie die PCR- und Real-time-PCR-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor der Kinderklinik der Universitätsklinik Halle durchgeführt.

Tabelle 1: Vermehrt exprimierte Gene. Gene, die nach intrazerebraler Injektion von Superantigen (Staphylokokken Enterotoxin A (SEA)) gegenüber mit Kochsalzlösung injiziertem Hirngewebe signifikant (mindestens 3facher Unterschied zu den Kontrollwerten) vermehrt exprimiert gemessen wurden. Aufgelistet sind die Nummer (sog. „Accession-Nummer“) mit den zugehörigen Genbezeichnungen und die entsprechenden Mittelwerte (von jeweils beiden Hemisphären) der Signalintensitäten des Fluoreszenzsignals in mit SEA injiziertem Hirngewebe sowie in mit Kochsalz injiziertem Hirngewebe. Das Ausmaß der relativen Veränderung wurde als Quotient aus dem Wert mit Injektion von SEA und dem Wert mit Injektion von NaCl angegeben.

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
<i>Antigenpräsentation</i>				
X13044	MHC II (CD72 Antigen)	3542	130	27,2
X14254	MHC II (invariant chain)	1209	45	26,9
X13044	MHC II (invariant chain gamma)	3569	171	20,9
X14254	MHC II	3265	167	19,6
X07551	MHC II B-alpha gene (RT 1 class II locus B alpha)	1384	113	12,2
X56596	MHC II B-1 beta chain (RT 1 class II, locus Bb)	1014	168	6,0
X53054	MHC II (protein complex)	1322	219	6,0
M64795	MHC I CRT 1-u	620	106	5,8
X67504	RT1 class Ib, locus Aw2	205	61	3,3
U31599	MHC II, DM beta	433	82	5,3
AI171966	MHC II, DM beta	1619	440	3,7
M36151	MHC II A-beta gene (RT1 class II locus Bb)	794	154	5,2
K02815	MHC II A-glycoproteine (RT-1 class II locus Ba)	1982	387	5,1
U31599	MHC II, DM beta	215	69	3,1
M15562	RT-1 class II (MHC II)	1180	231	5,1
X57523	TGF-beta-activated	310	83	3,7
<i>Lymphozyten</i>				
U24441	Matrix metallopeptidase 9	198	49	4,0
X03015	CD8 Antigen (alpha chain)	282	35	8,1
X14319	T-Zell Rezeptor (beta chain)	282	61	4,6
S79711	CD3 (gamma-chain)	68	14	4,9
M10072	CD 45 Antigen	130	32	4,1
D90404	Cathepsin C (Dipeptidyl Peptidase I)	476	148	3,2
AI045440	Sialophorin	75	24	3,1
<i>Chemokine/Chemokinrezeptoren</i>				
M14656	Osteopontin (Secreted phosphoprotein 1)	1694	94	18,0

Fortsetzung Tabelle 1

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
AA892854	CXCL13	442	63	7,0
AI009658	CCL 5, (RANTES)	1345	88	15,3
X17053	CCL 2 (MCP-1)	226	38	5,9
AA945737	CXCR4	60	11	5,5
U17035	CXCL10	175	40	4,4
X52498	TGF beta1	414	132	3,1
<i>Mikrogliale Reaktion/ Makrophagen</i>				
AA800318	Serping1	1085	285	3,8
M57276	CD53 Antigen	537	158	3,4
M65149	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	257	77	3,3
M24067	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1 (Serpin E1)	180	59	3,1
U10894	Allograft inflammatory factor 1	669	219	3,1
U09540	Cytochrome P450 Typ 1b1	223	40	5,6
AI176856	Cytochrome P450 (Cyp1b1)	289	70	4,1
U18729	Cytochrome b558 (alpha subunit (b245, alpha polypeptide)	985	169	5,8
<i>Phagozytose/Opsonierung</i>				
J02962	Galectin 3 (IgE-binding protein)	1220	87	14,0
M32062	Fc-gamma-Rezeptor 3	433	117	3,7
U39476	Vav 1 Oncogen	106	31	3,4
AI639117	Komplementfaktor B	268	65	4,1
M32062	Fc-gamma-Rezeptor II beta	597	173	3,5
X73371	Fc-gamma-Rezeptor	209	41	5,1
AA892775	Lysozym	4526	919	4,9
X52477	C3 (Pre-pro)	935	103	9,1
X71127	C1q (beta chain)	3632	649	5,6
AA891576	C1q	98	20	4,9
X71127	C1q (beta chain)	4234	884	4,8
AA891576	C1q (gamma polypeptide)	142	33	4,3
M29866	C3	1358	122	11,1
U42719	C4a	1453	416	3,5
M92059	Adipsin	138	25	5,5
AI639117	Komplementfaktor B	268	65	4,1
AA893280	Adipose differentiation related protein	563	135	4,2
D88666	Fatty acid-binding protein (adipocyte)	131	40	3,3
D10757	Proteosome (prosome, macropain) subunit, beta type 9	277	80	3,5

Fortsetzung Tabelle 1

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
<i>Extrazelluläre Matrix / Zelladhäsion</i>				
U59801	Integrin alpha M	84	18	4,7
U75405UTR#1	Alpha-1 Kollagen mRNA	2804	624	4,5
U15550	Tenascin-C	61	10	6,1
X70369	Kollagen Typ III alpha 1	862	165	5,2
S61865	Syndecan 1	105	20	5,3
M27207	Prokollagen, Typ 1, alpha 1	2070	568	3,6
AI231472	Prokollagen, Typ 1, alpha 1	999	308	3,2
AA894092	Periostin	47	14	3,4
AI071531	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	63	20	3,2
S66184	Lysyloxidase (Fibroblast)	140	16	8,8
X62952	Vimentin	2652	763	3,5
AI012030	Matrix-Gla-Protein	1932	561	3,4
AA892333	Tubulin, alpha 6	1662	553	3,0
<i>Antientzündliche Gewebsreaktion</i>				
M65149	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	257	77	3,3
AI045030	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP),delta	118	22	5,4
J02722	Heme oxygenase (decycling) 1	194	58	3,3
AI169327	TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1)	940	20	47,0
M22670	Alpha 2 Makroglobulin	219	9	24,3
M23566	Alpha-2-Makroglobulin	3153	989	3,2
AA900582	Alpha-2-Makroglobulin	1000	330	3,0
M86389	HSP-27 (heat shock 27 kDa protein 1)	1563	444	3,5
AA998683	HSP-27 (heat shock 27 kDa protein 1)	1386	273	5,1
AA817854	Coeruloplasmin	183	39	4,7
L33869	Coeruloplasmin	391	92	4,3
S77528	NF-IL6 (C/EBP-related transcription factor beta)	74	16	4,6
AI176456	Metallothionein	11045	2980	3,7
AA799323	Pleckstrin	99	29	3,4
<i>Zerebrale Reaktion</i>				
AF028784	GFAP (alternatively spliced form)	4474	1030	4,3
X06916	S100 (calcium binding prot. A4)	774	153	5,1

Fortsetzung Tabelle 1

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
<i>Verschiedenes/ Entzündungsassoziiert</i>				
L07114	Apolipoprotein B Komplex	378	23	16,4
AA946503	Lipocalin 2 (Apolipoprotein D)	629	45	14,0
X62322	Granulin	4118	1048	3,9
J05495	Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1	88	28	3,1
K03039	Leukocyte common antigen	35	10	3,5
AA892553	STAT-1	261	54	4,8
S67722	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	595	192	3,1
X61381	Interferon induced trans-membrane protein 3	2347	671	3,5
D21215	Coagulation factor 10	44	12	3,7
AA894029	Cytochrome b-245 beta polypeptide)	116	31	3,7
J02869	Cytochrome P450 (Cyp2d9)	153	43	3,6
D26393	Hexokinase II	143	33	4,3
AA946044	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene	79	21	3,8
S66024	CAMP responsive element modulator	68	19	3,6
M33648	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	192	56	3,4
AI233219	Endothelial cell-specific molecule 1	38	11	3,5
M19257	Retinol binding protein 1, cellular	653	199	3,3
L13192	Forkhead box D1	114	32	3,6
M18349	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	80	22	3,6
D30649	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	56	17	3,3
E00903	Natriuretic peptide precursor type A	362	112	3,2
U77038	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	68	22	3,1
M80367	Guanylate nucleotide binding protein	132	25	5,3

Tabelle 2: Vermindert exprimierte Gene. Gene, die nach intrazerebraler Injektion von Superantigen (Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) gegenüber mit Kochsalzlösung injiziertem Hirngewebe signifikant (mindestens 3facher Unterschied zu den Kontrollwerten) vermindert exprimiert gemessen wurden. Aufgelistet sind die Nummern (sog. Accession-Nummern) mit den zugehörigen Genbezeichnungen und die entsprechenden Mittelwerte (von jeweils beiden Hemisphären) der Signalintensitäten des Fluoreszenzsignals in mit SEA injiziertem Hirngewebe im Vergleich zu Kochsalz injiziertem Hirngewebe. Das Ausmaß der relativen Veränderung wurde als Quotient aus dem Wert mit Injektion von SEA und dem Wert mit Injektion von Kochsalz angegeben.

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
J02705	Oncomodulin	26	138	5,3
AA894226	Similar to carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	7	31	4,4
AJ223083	Retinoid X receptor gamma	27	113	4,2
AF035963	Kidney injury molecule 1	10	39	3,9
K00994mRNA	Calbindin	10	41	4,1
AI639018	Similar to HCV NS3-transactivated protein 1 (predicted)	24	90	3,8
AI014135	Mss4 protein	61	231	3,8
M17523mRNA	Peptide YY	59	220	3,7
M20297	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (neuronal)	22	81	3,7
X16703	Insulin-like growth factor 2	13	49	3,8
Y07903	Apha-disintegrin and metalloprotease domain 3 (cyritestin)	8	30	3,8
AI639275	T-complex protein 11	15	53	3,5
AA893216	Transmembrane protein 27	17	59	3,5
M31173	Cysteine-rich secretory protein 1	13	47	3,6
U29174	Paired related homeobox protein-like 1	12	41	3,4
AA892881	ATPase, H transporting, lysosomal V1 subunit G3 (predicted)	14	47	3,4
X61933	ATPase, H+/K+ exchanging, alpha polypeptide	9	31	3,4
K01180	Fatty acid binding protein 2 intestinal	11	37	3,4
J02852	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 3a	24	80	3,3
AF061957	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8	17	56	3,3
AI145834	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	15	48	3,2
H31648	Kelch-like 18 (Drosophila) (predicted)	13	42	3,2
D45862	Leptin	25	81	3,2
AF063851	Mast cell protease 1	10	33	3,3

Fortsetzung Tabelle 2

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
AA799512	Ariadne homolog 2 (Drosophila) (predicted)	15	47	3,1
AA799575	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	11	35	3,2
AA945169	Transthyretin	4696	14535	3,1
AA799478	ADP-ribosylation factor-like 3	16	48	3,0
M82845	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	10	30	3,0

3.2 PCR und Real-time PCR ausgewählter Gene

3.2.1 PCR

Aufgetragen sind jeweils folgende Gehirnproben (von links nach rechts):

- Links:
- NaCl I (1. Gehirn mit NaCl-Injektion, linke Gehirnhälfte)
 - NaCl II (2. Gehirn mit NaCl-Injektion, linke Gehirnhälfte)
 - SEA I (1. Gehirn mit Superantigeninjektion (SEA), linke Gehirnhälfte)
 - SEA II (2. Gehirn mit Superantigeninjektion (SEA), linke Gehirnhälfte)
 - Kontrolle (Kontrollgehirn ohne Injektion, linke Gehirnhälfte)
- Rechts:
- NaCl I (1. Gehirn mit NaCl-Injektion, rechte Gehirnhälfte)
 - NaCl II (2. Gehirn mit NaCl-Injektion, rechte Gehirnhälfte)
 - SEA I (1. Gehirn mit Superantigeninjektion (SEA), rechte Gehirnhälfte)
 - SEA II (2. Gehirn mit Superantigeninjektion (SEA), rechte Gehirnhälfte)
 - Kontrolle (Kontrollgehirn ohne Injektion, rechte Gehirnhälfte)

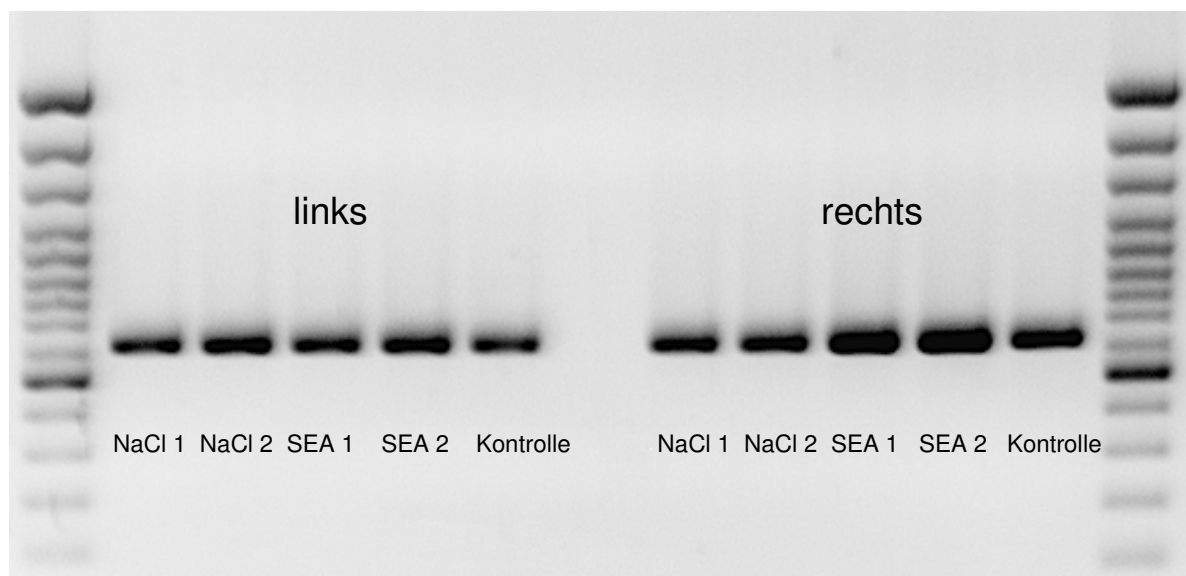


Abb. 9a: Aktin 22 C (Kontrollgen)

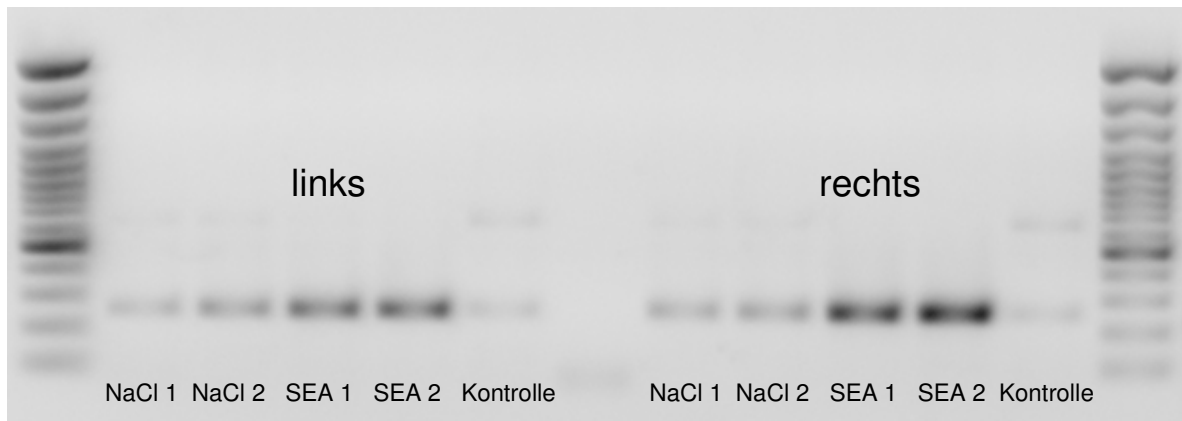


Abb. 9b: TIMP-1

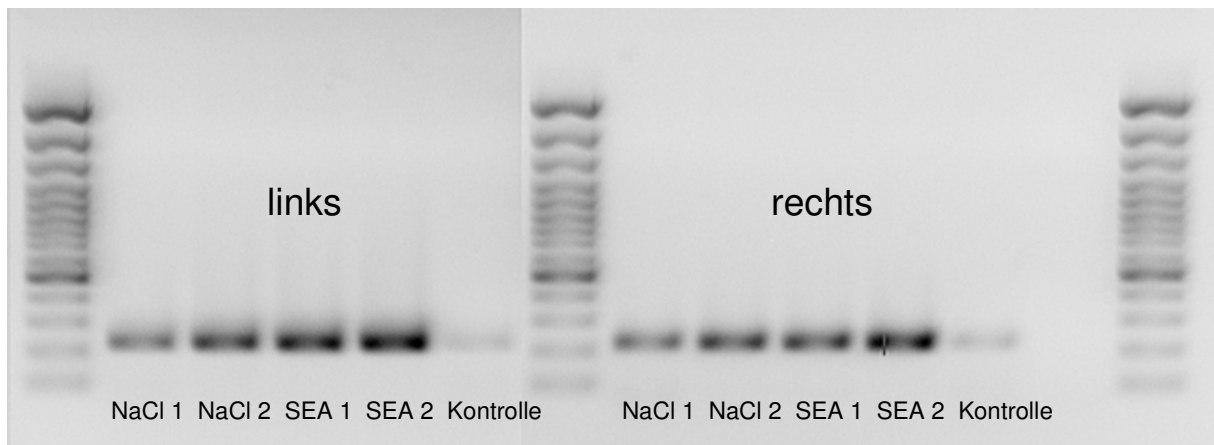


Abb. 9c: CCL5

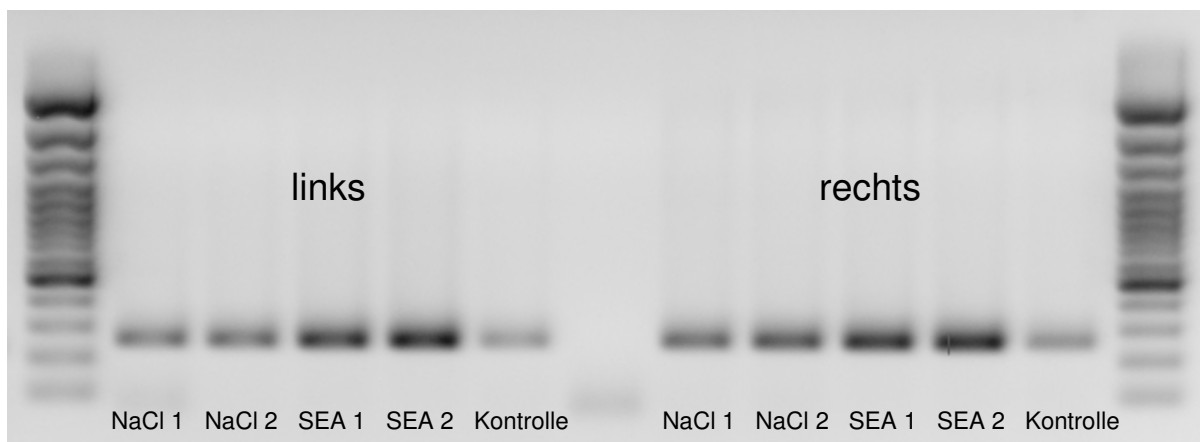


Abb. 9d: CD74

3.2.2 Real-time-PCR

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kontrollexperimente mittels Real-time-PCR gezeigt. Dargestellt sind die Signalintensitäten der jeweiligen Hirnhälften der Gehirne, in die SEA bzw. Lösungsmittel (NaCl) injiziert wurde.

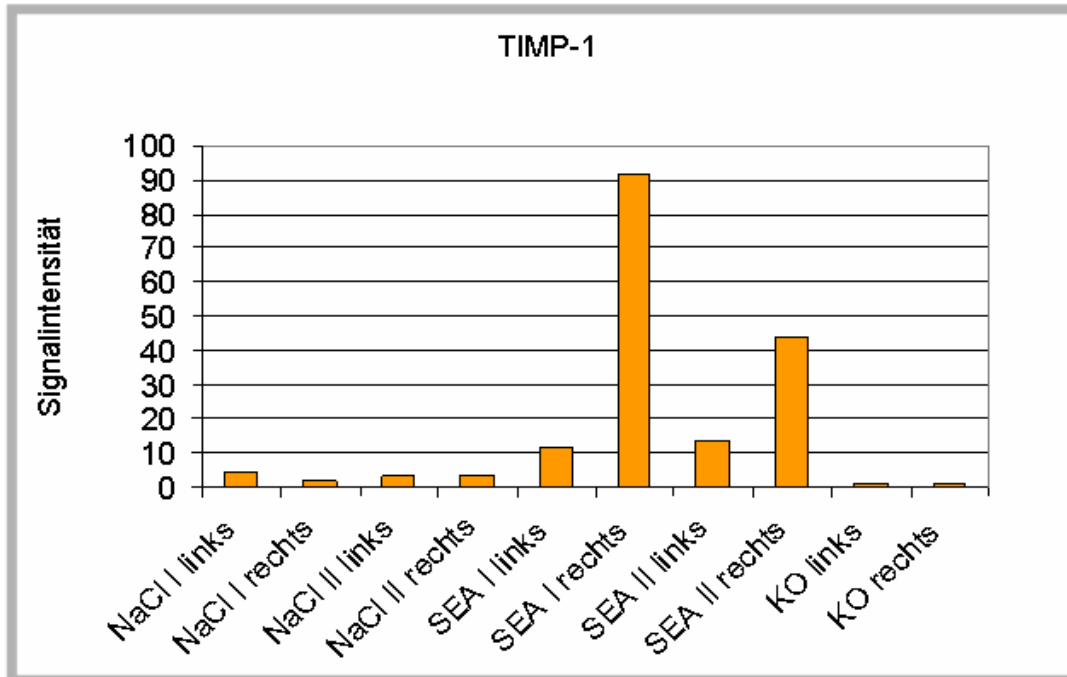


Abb. 10a: TIMP-1

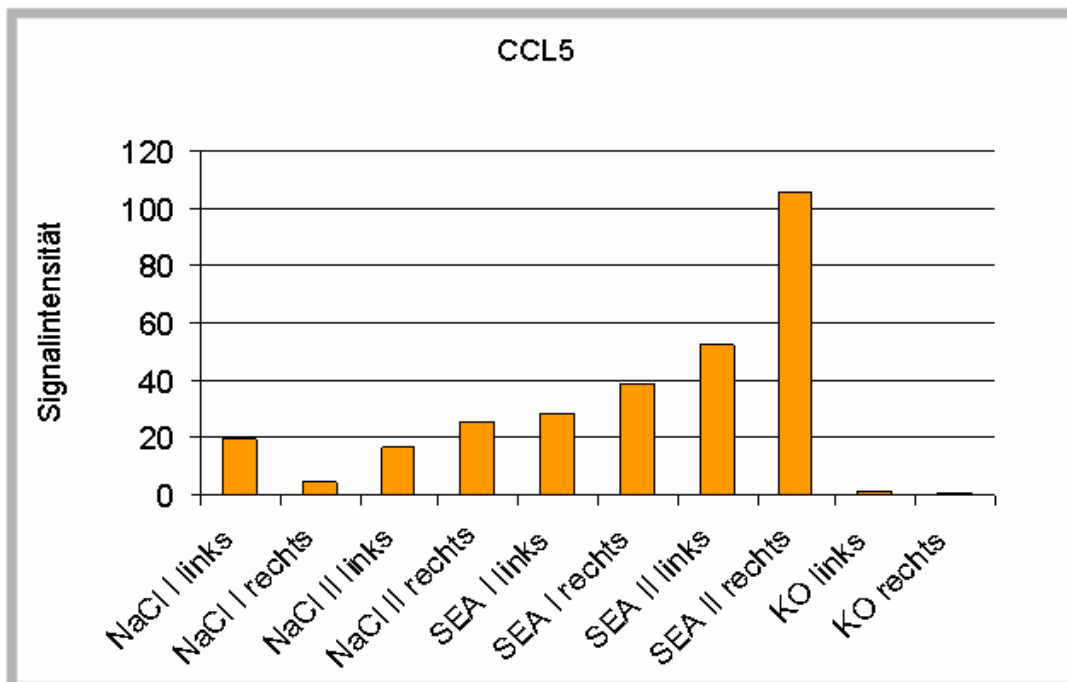


Abb. 10b: CCL5

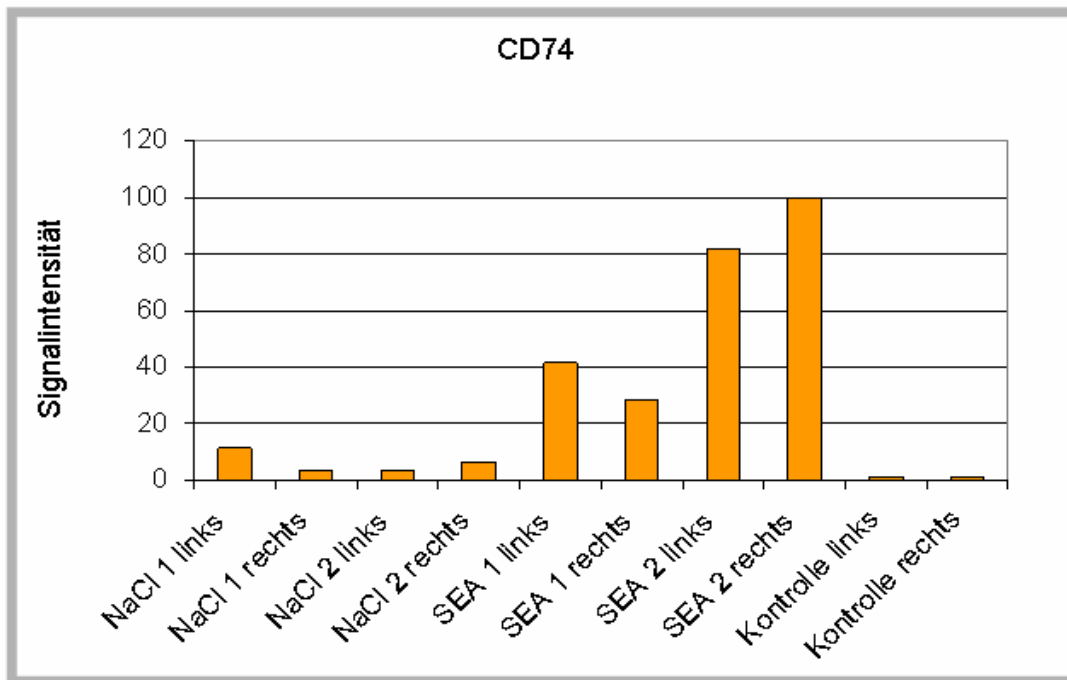


Abb. 10c: CD74

3.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Genchipuntersuchungen und Kontrollexperimente mittels Real-time-PCR.

Nachfolgend werden die durch Microarray-Untersuchungen und der Kontrollexperimente gewonnenen Ergebnisse ausgewählter Gene gegenübergestellt. Dargestellt sind die Signalintensitäten der Microarrayuntersuchungen sowie die Signalintensitäten der Real-time-PCR für die Gene für TIMP-1, CCL-5 (RANTES) und CD74. Diese Gene waren u.a. am höchsten differenziell vermehrt exprimiert. Es ergeben sich hierbei gute Übereinstimmungen des Genexpressionsmusters mit den Ergebnissen der Real-time-PCR.

Genchip

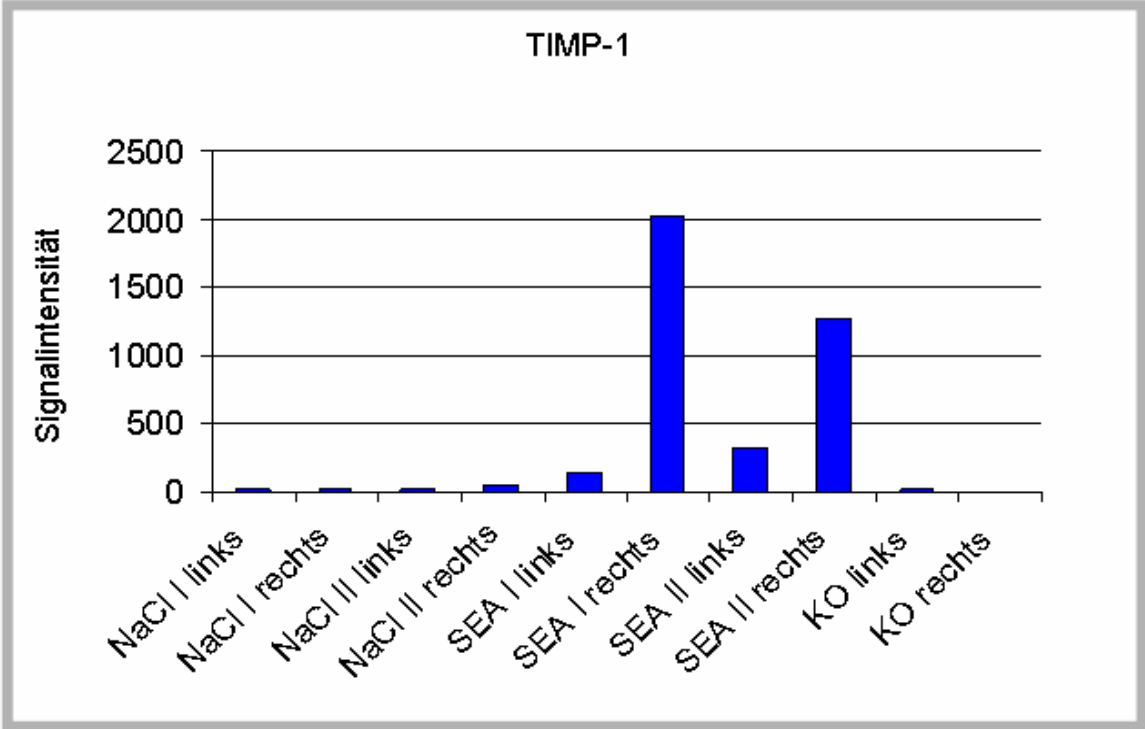


Abb. 11a: Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung für TIMP-1

Real-time-PCR

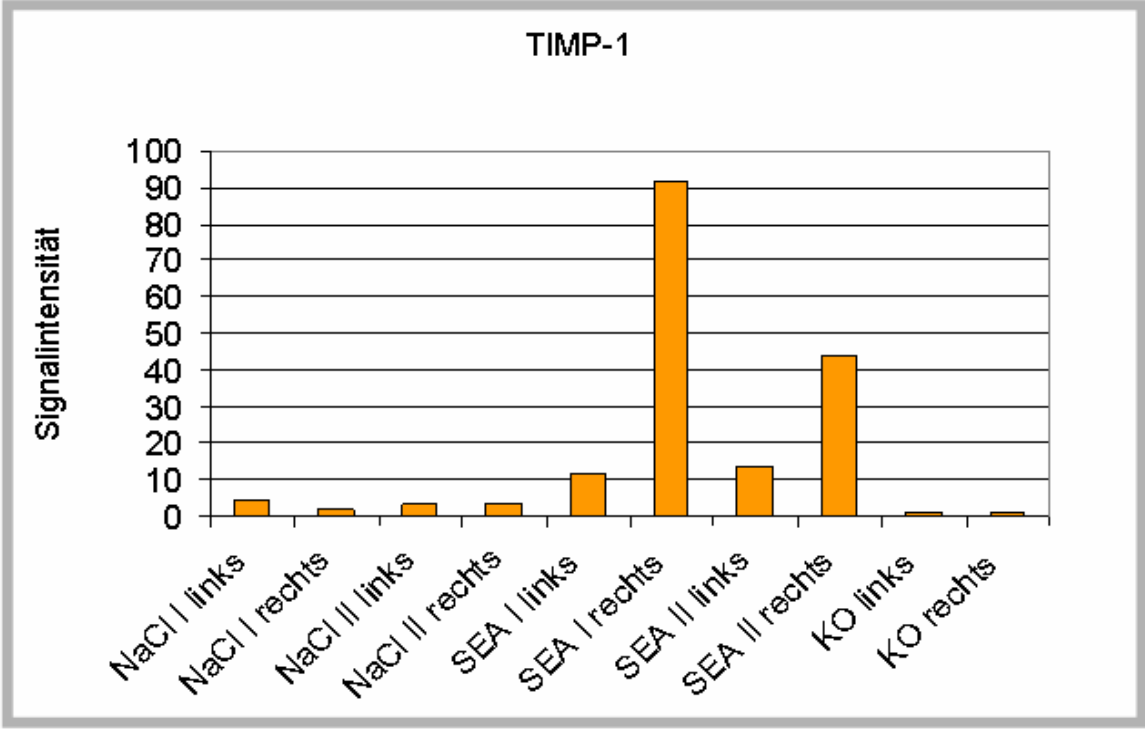


Abb. 11b: Signalintensitäten der Real-time-PCR für TIMP-1

Genchip

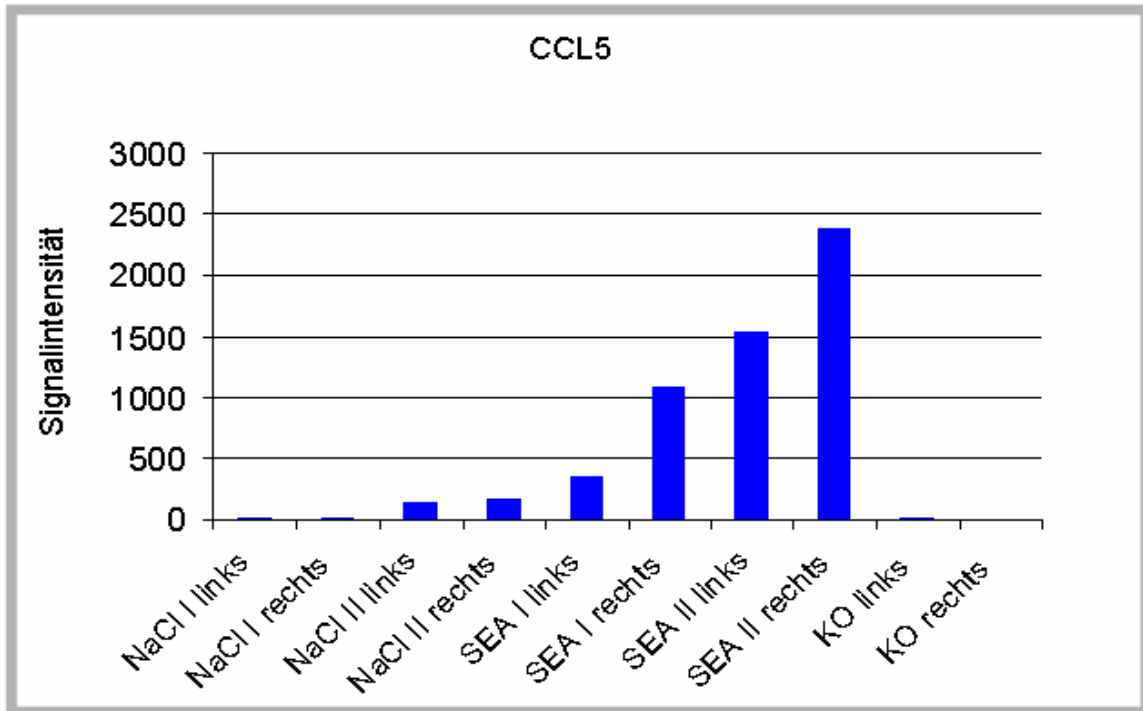


Abb. 12a: Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung für CCL5

Real-time-PCR

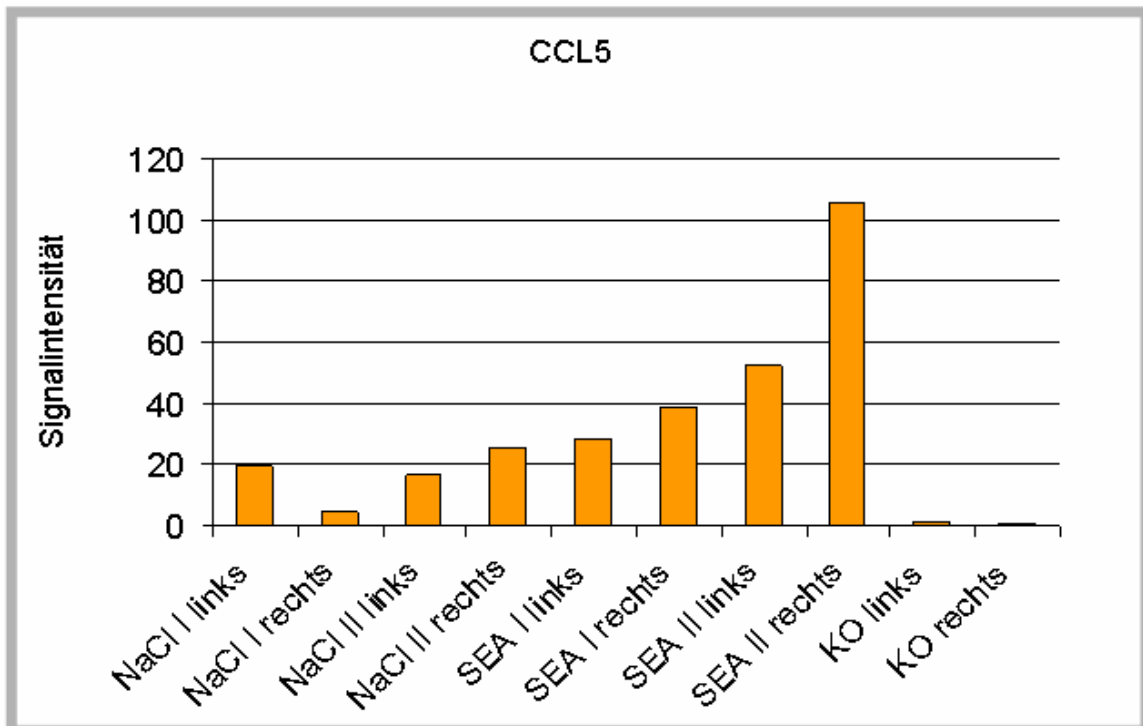


Abb. 12b: Signalintensitäten der Real-time-PCR für CCL5

Genchip

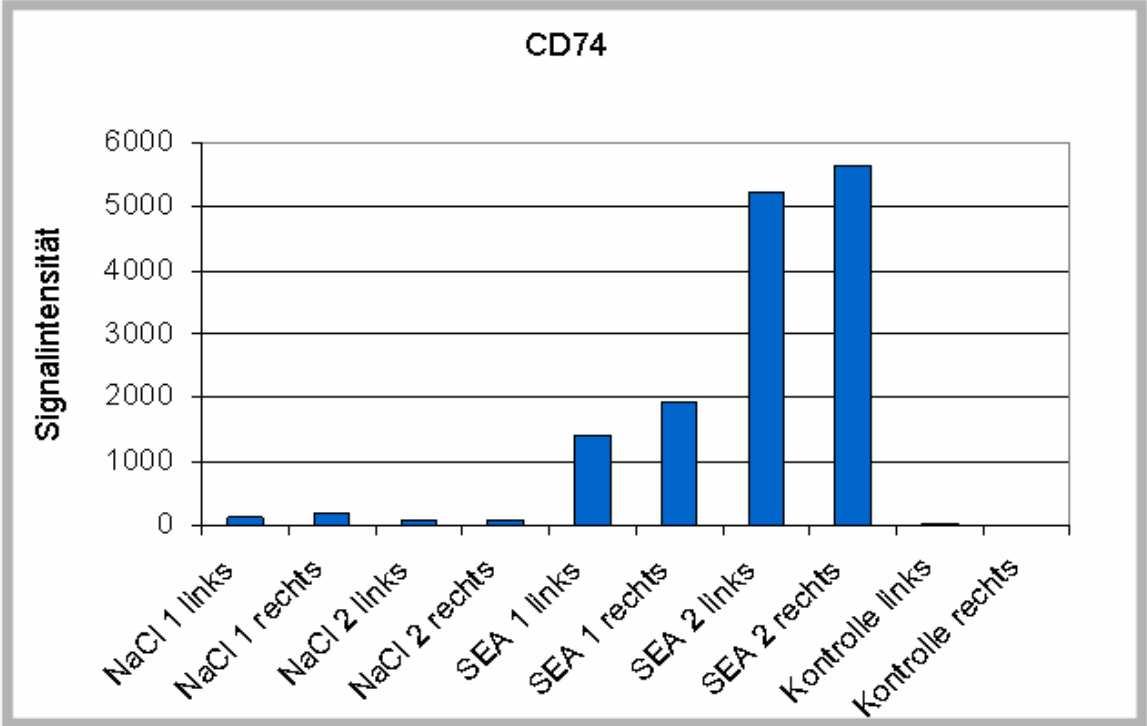


Abb. 13a: Signalintensitäten der Microarray-Untersuchung für CD74

Real-time-PCR

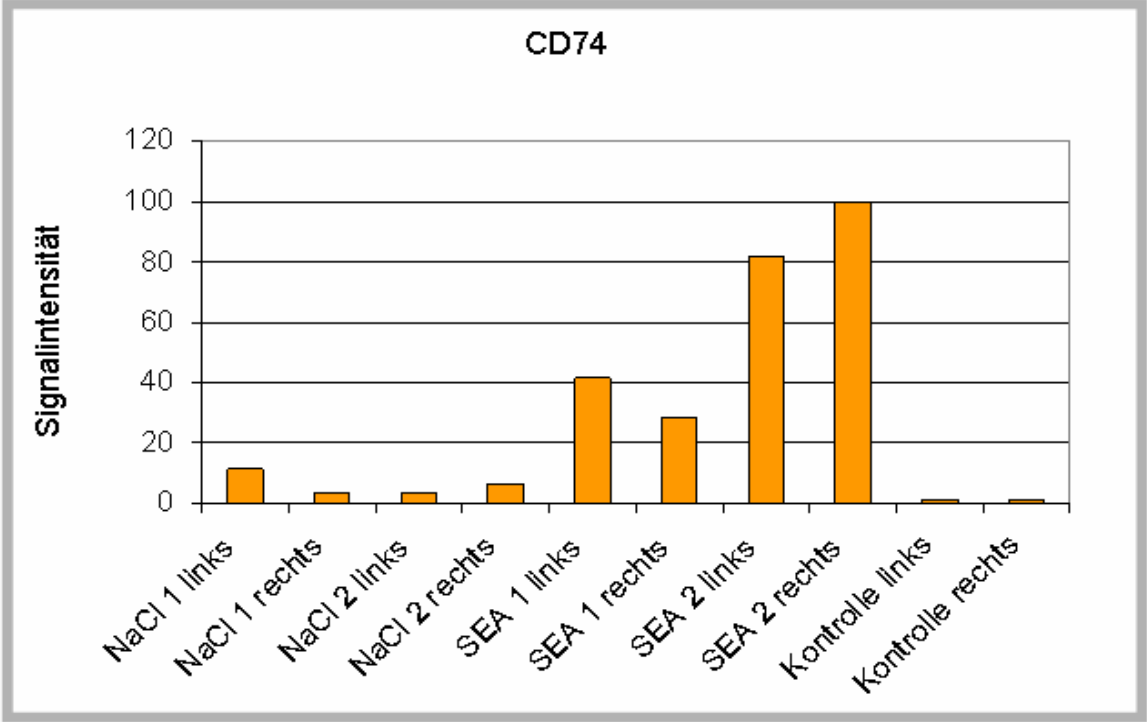


Abb. 13b: Signalintensitäten der Real-time-PCR für CD74

3.4 Injektionstrauma und Genexpression

Um Veränderungen abschätzen zu können, die allein durch das Injektionstrauma bedingt sind, wurde die NaCl-Gruppe mit der Kontrollgruppe (keine Injektion) verglichen. Dabei waren von 8 800 Genen 6 nach intrazerebraler Injektion von Kochsalzlösung signifikant (> 3fach) vermehrt exprimiert und 40 entsprechend vermindert. Die vermehrt exprimierten Gene ließen sich folgenden Gruppen zuordnen: Immunsystem, neuronale Gene, verschiedene Enzyme, extrazelluläre Matrix, Sauerstofftransportproteine und Verschiedene. Die signifikant vermindert exprimierten Gene gehörten zu folgenden Gruppen: Immunsystem, Regulationsfaktoren, Stressreaktion, Ionenkanäle/Ionentransporter, Enzymexpression, neuronale Reaktion, Sauerstoffradikale, Neurotransmitter-Rezeptoren, Blutssystem, Verschiedene. Die einzelnen Gene sind auf Grund der Vielzahl der Gene hier nicht aufgezählt. Es soll eine Auswahl von Gengruppen tabellarisch vorgestellt werden.

Tabelle 3: Differentielle Genexpression 5 Tage nach zerebraler Injektion von physiologischer Kochsalzlösung im Vergleich zu Tieren, die lediglich eine Allgemeinanästhesie erhalten hatten. Dargestellt sind die mehr als **3fach** differenziell **vermehrt** exprimierten Gene. Aufgelistet sind die Nummer (sog. „Accession-Nummer“) mit den zugehörigen Genbezeichnungen und die entsprechenden Mittelwerte (von jeweils beiden Hemisphären) der Signalintensitäten des Fluoreszenzsignals des mit NaCl injiziertem Hirngewebes sowie des Hirngewebes ohne Injektion. Das Ausmaß der relativen Veränderung wurde als Quotient aus dem Wert mit Injektion von SEA und dem Wert mit Injektion von Kochsalz angegeben. Es handelt sich überwiegend um solche Gene, für die bereits in vorhergehenden Studien eine Veränderung nach zerebraler Gewebstraumatisierung gezeigt worden war (Lu et al., 2004; Poulsen et al., 2005; Sandhir et al., 2004, Zhang et al., 1999; Estus et al., 1994).

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
<i>Immunsystem</i>				
AA891576	Complement component 1	55	12	4,7
X53087	Interleukin 4	38	12	3,2
<i>Neuronale Stressreaktion</i>				
E03082	Nerve growth factor	55	16	3,4
<i>Verschiedene</i>				
AI639243	CDNA clone rz00750 3	58	17	3,4
AA875362	Transcribed locus 3	63	19	3,3
V01201	Envelope protein	58	19	3,0

Tabelle 4: Differenzielle Genexpression 5 Tage nach zerebraler Injektion von physiologischer Kochsalzlösung im Vergleich zu Tieren, die lediglich eine Allgemeinanästhesie erhalten hatten. Dargestellt sind die mehr als **3fach** differenziell **vermindert** exprimierten Gene. Aufgelistet sind die Nummer („Accession-Nummer“) mit den zugehörigen Genbezeichnungen und die entsprechenden Mittelwerte (von jeweils beiden Hemisphären) der Signalintensitäten des Fluoreszenzsignals des mit NaCl injiziertem Hirngewebes sowie des Hirngewebes ohne Injektion. Das Ausmaß der relativen Veränderung wurde als Quotient aus dem Wert mit Injektion von SEA und dem Wert mit Injektion von Kochsalz angegeben.

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
<i>Immunsystem</i>				
AJ003148	GAS-7 (growth arrest specific 7)	81	254	3,1
D10728	Lymphocyte antigen CD5	14	42	3,0
AA925752	CD36/ Microglia-scavenger	5	32	6,4
<i>Stressreaktion</i>				
AB009889	Prolactin-like protein H	13	45	3,5
S74898	Prostaglandin F2 alpha	45	148	3,3
M31155	Prolactin-like protein B	10	47	4,7
<i>Regulationsfaktoren</i>				
AI177161	NF-E2-related factor 2	114	343	3,0
<i>Onkogene</i>				
J02705	Oncomodulin mRNA	20	140	7,0
<i>Stressreaktion</i>				
K02814	Major acute phase protein	52	156	3,0
Z75029	Heat-shock-protein 70 kDa	22	85	3,9
<i>Ionenkanäle/Ionentransporter</i>				
U31772	Calcium channel alpha-1D	10	56	5,6
U12973	Solute carrier family 6 member 18	13	44	3,4
<i>Enzymexpression</i>				
M98826	Phosphorylase kinase gamma 1	8	49	6,1
AA892953	Carbonic anhydrase VB	6	42	7,0
M99567	Phospholipase C beta-3	11	36	3,3
D28753	Cyclin dependent kinase	9	45	5,0
Y12319	Ataxin	11	34	3,1
<i>Neuronale Reaktion</i>				
AF050661	Activity and neurotransmitter-induced early gene 9	17	65	3,8
U65916	Ankyrin	14	45	3,2
U12336	Acetylcholine receptor	15	50	3,3
AA899808	Lysosomal membrane	8	32	4,0
<i>O₂-Radikale</i>				
J02861	Cytochrome P450 2c 13	15	46	3,1
M57718	Cytochrome P450 IV A1	12	36	3,0

Fortsetzung Tabelle 4

Nummer	Genbezeichnung	SEA	NaCl	Relative Veränderung
<i>Neurotransmitter-Rezeptoren</i>				
L31622	Acetylcholine receptor beta 2	69	240	3,5
AI176191	Calcium-sensing receptor like 1	13	43	3,3
AF005099	Neuronal pentraxin receptor	17	62	3,6
<i>Blutsystem</i>				
U20907	5-HT4L-receptor mRNA	24	87	3,6
AA860062	Albumin	14	48	3,4
AA893496	Nuclear phosphoprotein 32 family, member A	9	32	3,6
<i>Verschiedene</i>				
M86514	Proline-rich protein mRNA	7	40	5,7
AF060116	Cortactin-binding protein 1	38	124	3,3
U32681	Dmbt1 LOC691969	6	43	7,2
X99797	Testis specific X-linked gene	5	40	8,0
AI639418	Deiodinase	17	59	3,5
K01391	TrpE protein	10	30	3,0
AA893485	Protein kinase C	9	36	4,0
S58529	Integrin beta 3 subunit	24	74	3,1
L08831	Glucose-dependent insulinotropic peptide	14	64	4,6
AI639275	T-complex protein 11	18	55	3,1
AI177161	NF-E2-related factor 2	114	343	3,0

4. Diskussion

4.1 Methodisches Vorgehen und Fehlerquellen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die zerebrale Genexpression nach intrazerebraler Injektion von Superantigen im Vergleich mit Injektion des Lösungsmittels bzw. Allgemeinnarkose ohne Lösungsmittelinjektion untersucht und zwar nach intravenöser Injektion von ConA-aktivierten Milzzellen. Letztere dienten der Verstärkung der Superantigenenzephalitis (Kornhuber et al., 2002). Ebenfalls wurden auch bei beiden Kontrollbedingungen in gleicher Weise und Menge ConA-aktivierte Milzzellen in die Blutbahn injiziert. Aus der zeitlichen Dynamik der durch ConA-Blasten verstärkten Superantigenenzephalitis ergab sich eine maximale Entzündungsreaktion zwischen dem 4. und 8. Tag nach i.-v. Injektion der ConA-Blasten bzw. zwischen dem 7. und 11. Tag nach intrazerebraler Superantigeninjektion (Kornhuber et al., 2002). Für die Untersuchung der differentiellen zerebralen Genexpression wurde ein Zeitpunkt mit maximaler Entzündungsreaktion gewählt, nämlich 5 Tage nach i.-v. Injektion der ConA-Blasten bzw. 8 Tage nach intrazerebraler Superantigeninjektion. Es wurde lediglich ein Zeitpunkt untersucht, um einerseits die zu erwartende Datenflut bewältigen zu können und um andererseits die Kosten der verwendeten Genchips überschaubar zu halten. Durch dieses Vorgehen war es nicht möglich, die differentielle Genexpression der Superantigenentzündung im zeitlichen Verlauf zu berücksichtigen. Der Zeitpunkt der maximalen Entzündung wurde deshalb gewählt, um evtl. einen Vergleich mit Befunden der zerebralen Genexpression in Plaques von Patienten mit Multipler Sklerose ziehen zu können. Bei diesen Patienten werden die Gewebeproben in der Regel nicht aus einer im Initialstadium befindlichen Entzündung gewonnen werden können.

Ein weiterer methodischer Aspekt betrifft die zerebrale Gewebsentnahme. In der vorliegenden Arbeit wurde eine zerebrale Gewebsscheibe mit einer Schichtdicke von etwa 3 mm der injizierten Gehirnhälfte koronar dem Injektionskanal folgend, von der dorsalen Cortexoberfläche ausgehend gewonnen. Von jeder Gewebsscheibe wurden mediale und laterale Anteile so entfernt, dass ein etwa 3 x 3 x 9 mm messender Quader resultierte. Somit lag stets ausreichend viel Material vor, um zuverlässig RNA präparieren zu können. Andererseits umfasste der entnommene Gewebsquader vermutlich nicht nur entzündetes Hirngewebe. Aus diesem Grunde unterschätzen die gefundenen Messwerte für die differentielle Genexpression eventuell die im Kernbereich der Entzündung vorliegende differentielle Genexpression.

Die Gen-Array-Technik erfasst lediglich die Gene, deren Kopien nach der Transkription in Form von Messenger-RNA (mRNA) vorliegen. Diese Technik ermöglicht eine Momentaufnahme der Genexpression. Gene, die für einen bestimmten Vorgang (z. B. Zellvermehrung) nicht benötigt werden, werden auch nicht erfasst, es sei denn, RNA ist noch von einem jüngst erfolgten Transkriptionsvorgang in der Zelle vorhanden. In der vorliegenden Studie wurde die Genexpression nach Superantigenexpression im ZNS im Vergleich zu intrazerebraler Injektion des Lösungsmittels untersucht (sog. differenzielle Genexpression). D. h., dass Gene, die im Gehirn unter Versuchs- und Kontrollbedingung in ähnlicher Weise exprimiert waren, nicht signifikant differenziell exprimiert gemessen wurden. Diese Gruppe von Genen umfasst nicht nur wenig exprimierte Gene, sondern auch solche Gene, deren Expression unter verschiedenen Bedingungen relativ gleich bleibt. Letztere Gengruppe wird als sog. House-keeping-Gene bezeichnet. House-keeping-Gene (wie z. B. das Gen für Aktin) eignen sich hervorragend, um methodische Einflüsse auf die Ergebnisse zu erfassen (vgl. Kapitel Real-time PCR).

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 8 800 Gene in die Untersuchung einbezogen. Zur Auswertung wurde eine eigens für den Zweck der Datenflut bei Genchipuntersuchungen entwickelte Statistik-Software eingesetzt (Significance Analysis of Microarrays, SAM, Version 2.20; Tusher et al., 2001). Diese Software wird von der Mehrzahl der Anwender von Genchips eingesetzt (Oberthuer et al., 2006; Mandruzzato et al., 2006, Golkari et al., 2007). Bei Genchip-Untersuchungen ergibt sich das allgemeine statistische Problem, tatsächlich signifikante Resultate von zufällig signifikanten Ergebnissen möglichst scharf zu trennen. Zufällige Einflüsse auf die gemessenen Fluoreszenz-Signalintensitäten erscheinen recht gering ausgeprägt zu sein. Eventuell spielen sie im Bereich unterhalb von Werten von etwa 30 eine gewisse Rolle. In diesem Bereich finden sich z. B. einige differenziell unter SEA vermindert exprimierte Werte, für die sich keine plausible Erklärung findet. Aus diesem Grund wurden lediglich signifikant differenziell exprimierte Gene mit einer Signalintensität von mindestens 30 herangezogen. D. h., dass bei dem Vergleich von SEA- mit NaCl-Injektion bzw. NaCl- mit keiner Injektion eine Signalintensität von 30 in einer der beiden Gruppen erreicht sein müsste. Bei diesem cut-off-Wert werden auch Gene berücksichtigt, die ohne Injektion bzw. nach NaCl-Injektion eine relativ niedrige Signalintensität aufweisen. Dies trifft z. B. für Leukozytengene und Zytokingene in den Kontrollproben zu. Tatsächlich kommen Leukozyten im ZNS nahezu nicht vor (sog. immunologisches Privileg). Daher ist eine Expression von Leukozytengenen in den Kontrollgehirnen nur in sehr geringem Maße zu erwarten. Genau dies wurde beobachtet. Ähnliches gilt für Gene, die für Chemokine kodieren, die z. B. von Leukozyten freigesetzt werden. Die niedrigen Expressionswerte in den Kontrollgehirnen können daher als Beleg für allenfalls geringe zufällige Einflüsse auf die Signalintensität angesehen werden (Beleg für die Qualität der Messungen). Um die zufällig

signifikanten Veränderungen gering zu halten wurde in der vorliegenden Studie eine Veränderung der Genexpression um mindestens den 3fachen Wert in den Kontrollproben gefordert. Dieser Faktor kann als moderat betrachtet werden, da von anderen Autoren ein Faktor von 2 (Ibrahim et al., 2001) oder auch von 4 (Marcin et al., 2003) gefordert wird.

Um die mit Microarray-Technik gefundenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden einzelne Gene mit vermehrter differenzieller Expression sowie einige sog. House-keeping-Gene (s.o.) mit gleicher Expression unter den verschiedenen Versuchsbedingungen mittels einer anderen Untersuchungstechnik untersucht. Für diesen Zweck wurden die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die Real-Time-PCR herangezogen. Tatsächlich lieferten diese Kontrolleexperimente übereinstimmende Ergebnisse der mit Microarray-Technik beobachteten Genexpression. Aus diesem Grund darf angenommen werden, dass es sich insgesamt um valide Ergebnisse handelt.

4.2 Einfluss der unspezifischen Gewebstraumatisierung auf die zerebrale Genexpression

In den ersten 24 h nach einer zerebralen Gewebstraumatisierung, etwa durch eine Injektionsverletzung, kommt es zur vermehrten Expression einer Vielzahl von Genen (Lu et al., 2004, Nogradi et al., 2003, Garcia et al., 1999, Al-Ali et al., 1984, Qi et al., 2004, Bellander et al., 2004). Demgegenüber findet sich in der vorliegenden Untersuchung 8 Tage nach Superantigeninjektion eine Reihe von Genen signifikant vermindert exprimiert, im Vergleich zu Kontrollen ohne solche Injektion. Zu den Genen, deren Expression sowohl von den o. g. Autoren als auch in der vorliegenden Untersuchung bestimmt wurde, gehören u. a. die Gene für HRD1, heat shock protein 70, Aromatase, Saure Phosphatase 1, Interleukin 6, TNF-alpha Converting Enzyme, und Carboanhydrase.

Nach einem Hirntrauma kommt es zu einer Reihe von Gewebsreaktionen. Neben einem durch die mechanischen Kräfte ausgelösten direkten Zellschaden mit zytotoxischem Ödem zeigen sich indirekte Folgeerscheinungen, die z. T. auf eine traumatisch bedingte Ischämie mit Gewebshypoxie und Azidose mit daraus resultierendem ATP-Mangel zurückgehen. Nachfolgend kann ein sekundäres zytotoxisches Ödem entstehen. In diesem Rahmen strömt vermehrt Kalzium in die Zelle. Betrifft der Kalziumstrom Neurone, so ist eine vermehrte Neurotransmitterfreisetzung die Folge. Tatsächlich kann die dadurch ausgelöste exzessive Neurotransmitterfreisetzung Energie verbrauchende Gewebsprozesse anstoßen und somit zum

ATP-Mangel beitragen. Es ist von einem Circulus vitiosus auszugehen. Die vermehrte Genexpression unmittelbar nach dem Gewebstrauma dürfte Ausdruck des geschilderten Hypermetabolismus sein. Die 8 Tage nach dem Trauma in der vorliegenden Arbeit gemessene Verminderung der Genexpression könnte auf eine Erschöpfung dieses initialen Hypermetabolismus zurückgehen. Demgegenüber sind wenige Gene in dieser Phase vermehrt exprimiert. Dazu zählen u. a. Gene, die mit einer Immunreaktion assoziiert sind: Gene für Complement Faktor 1, Interleukin 4, Immunglobulin E. Evtl. hängt die vermehrte Expression dieser Gene mit der beginnenden Abräumreaktion nach dem zerebralen Injektionstrauma zusammen.

4.3 Einfluss des Superantigens SEA auf die zerebrale Genexpression

Die Genexpression nach Superantigen-Injektion wurde im Gehirngewebe mit der nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (dem Lösungsmittel des Superantigens) verglichen (Tabelle 1). Bei diesem Vorgehen wird der Einfluss einer unspezifischen Gewebsalteration durch die Traumatisierung der Allgemeinanästhesie und des operativen Eingriffs einschließlich Lösungsmittelinjektion vom eigentlichen Einfluss der Superantigenenzephalitis abgezogen, so dass der alleinige Effekt der Superantigene verbleibt. Zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme, also 8 Tage nach Superantigeninjektion bzw. 5 Tage nach Verstärkung der Superantigenenzephalitis mittels i. v. Injektion Con-A-aktivierter Milzzellen ließen sich folgende Gruppen differenziell exprimierter Gene unterscheiden: Antigenpräsentation, Lymphozyten, Chemokine/Chemokinrezeptoren, Mikrogliale Reaktion/Makrophagen, Phagozytose/Opsonierung, Extrazelluläre Matrix/Zelladhäsion, Antientzündliche Gewebsreaktion, Zerebrale Reaktion, Verschiedenes/entzündungsassoziiert. Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine Reaktion des Hirngewebes auf die Entzündung. Z.B. werden astrogliale Proteine wie das GFAP signifikant vermehrt exprimiert. Eine Reaktion hirneigener Mikrogliazellen ist demgegenüber auf Grund der Genexpressionsdaten schwer von der hämatogenen Entzündungsreaktion abzugrenzen. Für Letztere spricht die vermehrte Expression von Genen, die im Gehirngewebe nicht oder nur minimal konstitutiv exprimiert werden wie z. B. T-Zellrezeptorgene oder Gene, die für MHC-Klasse I-Moleküle kodieren. Die beschriebenen Ergebnisse bestätigen die zuvor durchgeführten histologischen Untersuchungen der Superantigen-Enzephalitis (Kornhuber et al., 2003; Gerlach, persönliche Mitteilung). Da das Superantigen offensichtlich eine Entzündung auslösen konnte, muss davon ausgegangen werden, dass dieses im Gehirn auf MHC-Molekülen präsentiert wurde.

Die o. g. Genveränderungen finden sich am Tag 5 nach Injektion der aktivierten Lymphozyten bzw. am Tag 8 nach intrazerebraler Injektion des Superantigens. Es ist somit nicht möglich, anhand der vorliegenden Genexpressionsdaten eine Aussage über die frühe Phase der SEA-Enzephalitis zu treffen. Insbesondere sind zum Untersuchungszeitpunkt im Rahmen der SEA-Enzephalitis die in der frühen Phase der Immunantwort zu erwartenden Entzündungsmediatoren wie Interleukin 2, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha oder Interferon- gamma nicht signifikant differenziell exprimiert. Vorherrschend sind demgegenüber u. a. Gene der Antigenpräsentation, der Aktivierung von Monozyten bzw. Mikrogliazellen, Phagozytose einschließlich Komplementaktivierung sowie einer bereits ablaufenden antientzündlichen Gegenreaktion.

4.3.1 Antigenpräsentation

Die einzigen im Gehirn vorhandenen konstitutiv antigenpräsentierenden Zellen sind Mikrogliazellen und dendritische Zellen (Karman et al., 2004; Gehrmann et al., 1993). Daher ist die Initiierung der Superantigenentzündung ohne Mikrogliazellen bzw. zerebrale dendritische Zellen kaum vorstellbar. Wird das Superantigen ins Gehirn injiziert, so ist davon auszugehen, dass es an MHC-Klasse II-Moleküle auf Mikrogliazellen bindet. Tatsächlich spricht die Induktion einer Enzephalitis nach Superantigeninjektion in das Gehirn für diese Annahme. Wandern aktivierte Lymphozyten in das Gehirn ein, so erkennen sie auf diesen hirneigenen antigenpräsentierenden Zellen das Superantigen und setzen verschiedene Zytokine (s. u.) frei. Für die ausgeprägte Immuninteraktion spricht u. a. die Vielzahl vermehrt exprimierter Gene für MHC-I bzw. MHC-II-Moleküle. Die Zytokinfreisetzung wirkt u. a. auch auf die Mikrogliazellen. Diese Einschätzung stützt sich auf parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen, die belegen, dass zum Zeitpunkt der Hirngewebsentnahme 8 Tage nach intrazerebraler SEA-Injektion die Mikrogliazellen im Bereich um die SEA-Injektion stark aktiviert darstellbar sind (Huth, persönliche Mitteilung). Daher geht die vermehrte Expression der Gene für folgende Proteine evtl. auf die Mikrogliaaktivierung zurück: Serping1, CD53 antigen, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) delta.

Nachdem eine Entzündung in Gang gesetzt wurde, können auch Astrozyten zur Antigenpräsentation stimuliert werden (Falsig et al., 2006, Stuve et al., 2002). Dies kommt durchaus in Betracht. So ist z. B. das Gen für das astrozytenspezifische Protein GFAP (glial fibrillary acidic protein) nach SEA-Injektion 4,3fach vermehrt differenziell exprimiert.

4.3.2 Lymphozyten

Das auf zerebralen Mikrogliazellen bzw. dendritischen Zellen präsentierte Superantigen wird offensichtlich von T-Lymphozyten erkannt. Dafür spricht die vermehrte Expression des Gens für den Pan-T-Zellmarker CD3. Dieser Befund belegt, dass T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke aktiv überwunden haben. Dabei ist vor allem die Basalmembran zu passieren. Die in der vorliegenden Studie beobachtete vermehrte Expression des Gens für Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) kann als indirekter Beleg für diese aktive Durchwanderung der Basalmembran gewertet werden, denn Matrix-Metalloproteinasen sind unentbehrlich für Fortbewegungen von Zellen, insbesondere Lymphozyten durch die extrazelluläre Matrix. Ferner war die Expression multipler, für MHC-Klasse-II-Moleküle kodierender Gene, vermehrt nachweisbar. Bei der Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle werden überwiegend CD4+ T-Lymphozyten stimuliert (Gay et al., 1988). Man würde daher annehmen, dass die über MHC-Klasse-II-Moleküle aktivierbaren CD4+ T-Helferzellen im Rahmen der Enzephalitis dominieren. Dies ist nicht der Fall. Tatsächlich machen CD4+ T-Zellen nur einen Bruchteil der immunhistochemisch im Hirngewebe nachweisbaren T-Zellpopulation nach intrazerebraler SEA-Injektion aus (Gerlach, persönliche Mitteilung). In Übereinstimmung damit fanden sich in der vorliegenden Arbeit Gene, die für CD4 kodieren, nach SEA-Injektion nicht signifikant differenziell im Hirngewebe exprimiert waren. Demgegenüber wird die Superantigen-Enzephalitis histologisch/enzymhistochemisch überwiegend von CD8+ T-Lymphozyten dominiert (Gerlach, persönliche Mitteilung). Dazu passend waren in der vorliegenden Arbeit Gene, die für das Protein CD8 kodieren (spezifisch für zytotoxische/suppressorische T-Zellen) nach SEA-Injektion im Hirngewebe signifikant vermehrt exprimiert nachweisbar. CD8+ T-Zellen werden vorrangig über Peptide in Verbindung mit MHC-I-Moleküle stimuliert (Jelonek et al., 1998). Die hier erhobenen Ergebnisse wären also vereinbar mit der Interpretation, dass das verwendete Superantigen bei den verwendeten Lewis-Ratten bevorzugt an MHC-I-Moleküle bindet und so von CD8+ T-Lymphozyten erkannt wird. Tatsächlich ist diese Möglichkeit wenig wahrscheinlich, weil (1) MHC-I-Moleküle im zentralen Nervensystem nahezu nicht konstitutiv exprimiert werden und (2) über eine Bindung des hier verwendeten Superantigens SEA an MHC-I-Moleküle in der Literatur nicht berichtet wurde. Demgegenüber ist gut belegt, dass SEA an MHC-II-Moleküle bindet. Letztere sind auch konstitutiv auf Mikrogliazellen exprimiert (s. o.). Es ist daher anzunehmen, dass SEA im Zusammenhang mit MHC-II-Molekülen im Gehirn der Lewis-Ratte bevorzugt von CD8+ T-Zellen erkannt wird. Über Stimulation von CD8-Zellen durch Superantigen im Kontext mit MHC-II-Molekülen wurde berichtet (Fraser, 1989). Die zusätzlich denkbare Möglichkeit, dass CD8+ T-Zellen bevorzugt Zugang zum zentralen Nervensystem bekommen, ist wenig wahrscheinlich, denn in verschiedenen EAE-Modellen prädominieren CD4+ T-Zellen im ZNS (Sobel und

Kuchroo, 1992). Im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Ergebnissen ist es erwähnenswert, dass auch in zerebralen Herden von Patienten mit Multipler Sklerose entgegen der Erwartung CD8+ T-Zellen vorherrschen (Liu et al., 2007, Jilek et al., 2007). Da CD4+ T-Zellen durch SEA in Verbindung mit MHC- II-Molekülen sicherlich massiv aktiviert worden wären, und da diese Zellen Zugang zum Gehirn erhalten, wird SEA offensichtlich nicht oder nur unwesentlich von CD4+ T-Zellen erkannt.

Die Expression von Genen, die für T-Zellrezeptoranteile kodieren, war nach SEA-Injektion lediglich 2- bis 3fach im Vgl. mit Kontrollen vermehrt exprimiert, so dass die Werte nicht in der Ergebnistabelle aufgeführt sind. Neben dem T-Zellrezeptor spielt für die Antigenerkennung der T-Zellen das Sialoprotein CD43 eine wichtige Rolle (Fierro et al., 2006). Tatsächlich war CD43 in der vorliegenden Studie nach SEA-Injektion signifikant vermehrt exprimiert. Dieser Befund entspricht einer ähnlich vermehrten Expression bei EAE (Ford et al., 2003 und 2006).

CD72, ein 45 kDa schweres Typ II transmembranes, für die Antigenpräsentation bedeutsames Glycoprotein, das neben B-Zellen auch auf Untergruppe von T-Zellen (sowohl CD4+ als auch CD8+) und dendritischen Zellen auf der Zelloberfläche vorhanden ist, ist in der vorliegenden Arbeit mit 27facher Veränderung am höchsten in den mit SEA behandelten Gehirnen im Vergleich zu Gehirnen, die mit Kochsalz behandelt wurden, exprimiert. CD72 fungiert als Ligand für CD5 (Adhäsionsmolekül (T-Zellen und Subpopulation von B-Zellen)). Da CD72 auf der Oberfläche von dendritischen Zellen hochexprimiert vorhanden ist (Massard et al., 1996), stammt die Expression von CD72 vorrangig von dendritischen Zellen oder T-Zellen. Darüber hinaus gibt es in immunhistochemischen Untersuchungen keinen starken Hinweis für die Anwesenheit von B-Zellen (Gerlach, persönliche Mitteilung). Gene, die für Immunglobuline kodieren, waren in dieser Untersuchung nicht vermehrt exprimiert gemessen worden. Der Anstieg von CD 72 nach SEA-Expression geht vermutlich auf die Summe verschiedener eingewanderten bzw. aktivierten ortsständigen Immunzellpopulationen zurück.

4.3.3 Zytokine

Die durch SEA vermittelte Immunreaktion der CD8+ zytotoxischen T-Zellen mit zerebralen antigenpräsentierenden Zellen führt mutmaßlich über die frühe Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL2, TNF-alpha etc. zur Enzephalitis. Tatsächlich waren jedoch die Gene für diese Immunmediatoren in der vorliegenden Studie nicht vermehrt exprimiert nachweisbar. Wenn das dem SEA verwandte Superantigen SEB in Mäuse injiziert wurde, zeigt

sich eine stark vermehrte, frühzeitige Expression von TNF-alpha und IL2 mit einem Maximum 20 Min. nach der Injektion (Miethke et al., 1992; Johnson et al., 1991). Es handelt sich also um „frühe“ Entzündungsmediatoren, deren Expression im vorliegenden Fall 8 Tage nach intrazerebraler Superantigeninjektion und 5 Tage nach intravenöser Injektion aktivierter Milzzellen in die Blutbahn nicht mehr nachweisbar war. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete vermehrte Expression der Gene verschiedener Chemokine (s. u.) folgt daher vermutlich einer anderen Kinetik. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Befunde ähneln denen der zerebralen Genexpression von MS-Patienten. Tatsächlich wurde in Herden von MS-Patienten kein Hinweis für eine vermehrte Expression von IL2 und TNF-alpha gefunden. (Lindberg et al., 2004).

4.3.4 Chemokine / Chemokinrezeptoren

Gegenüber den gesamten Zytokinen waren verschiedene Chemokine im Vgl. zu den NaCl-Kontrollgehirnen signifikant vermehrt exprimiert. Chemokine spielen vor allem eine Rolle für die Rekrutierung von Immunzellen via Chemotaxis. Dies sind im vorliegenden Fall RANTES (CCL5), Osteopontin, MCP-1 (CCL2) und CXCL10, sowie ein entsprechender Rezeptor für MCP-1 (CCR2). Nachfolgend werden diese chemotaktischen Immunmediatoren diskutiert.

Das T-Zell-spezifische RANTES-Protein (CCL5) war ca. 16fach in der SAE-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe vermehrt exprimiert. Eine vermehrte RANTES-Expression nach Superantigenstimulation wurde in Zellkulturexperimenten bereits gezeigt (Jedrzkiewicz S., 1999). Dieses Zytokin wirkt chemotaktisch auf Monozyten, T-Helfer-Gedächtniszellen und eosinophile Granulozyten. In aktiven MS-Herden wurde CCL5 ebenfalls erhöht exprimiert gefunden, was auf die Aktivität von T-Zellen, Makrophagen und Mikrogliazellen zurückgeführt wird (Boven et al., 2000). Zum Zeitverlauf der RANTES-Genexpression liegen in der Literatur bislang keine Mitteilungen vor. Aus den hier vorgestellten Messungen einer vermehrten Expression von RANTES, 8 Tage nach der intrazerebralen Superantigeninjektion kann geschlossen werden, dass RANTES nicht zu den früh exprimierten Zytokinen (wie IL2 oder TNF-alpha) gehört sondern zu den verzögert oder zweiphasig exprimierten.

Osteopontin (Secreted phosphoprotein 1) fungiert als Zytokin, das die Expression von Interferon-gamma und Interleukin 12 fördert. Die Produktion von Interleukin 10 wird durch Osteopontin vermindert. Weiterhin ist es unentbehrlich im Signalweg der zellulären Immunität. Dabei ist lösliches Osteopontin (im Unterschied zu membrangebundenen) chemotaktisch aktiv (Standal et

al., 2004). Es fördert die Migration von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen (Standal et al., 2004). Es wird vermutet, dass Osteopontin allgemein die Ausprägung und die Progression der Multiplen Sklerose beeinflusst (Chiocchetti et al., 2005). Erhöhte Serum-Osteopontin-Werte wurden bei MS-Patienten mit sekundär progressivem, schubförmig-remittierendem, und primär progressivem Verlauf der Multiplen Sklerose im Vergleich zu gesunden Personen gefunden (Comabella et al., 2005). Dabei waren die Osteopontin-Serumwerte bei Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf im Schub höher als während der Remission. Ebenfalls zeigten sich erhöhte Osteopontinwerte mit erhöhter Entzündungsaktivität am Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Kim et al., 2004). Osteopontin besitzt sowohl einen antiinflammatorischen als auch neuroprotektiven Effekt. Diese Eigenschaften wurden u. a. anhand von Osteopontin-knock-out-Mäusen mit experimentell induzierten Schlaganfällen im Vergleich mit Kontrollgruppen herausgearbeitet, wobei in knock-out-Mäusen sich das Infarktareal im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vergrößerte (Schroeter et al., 2006). Osteopontin als antiinflammatorisches Zytokin wäre prinzipiell auch als therapeutischer Ansatz denkbar.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), Synonym: CCL2 ist ein Zytokin, welches als „Lockstoff“ für Monozyten dient, jedoch nicht für neutrophile Granulozyten. MCP1 ist im Bereich der Randzone in zerebralen MS-Läsionen vermehrt exprimiert (Tanuma et al., 2006). Bei der EAE wurde eine vermehrte zerebrale Expression von MCP-1 mit der Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut in Verbindung gebracht (Hofmann et al., 2002; Gonzales-Amaro und Sanchez-Madrid, 2002). Da auch nach zerebralen Infarkten MCP-1 vermehrt exprimiert wird, und zwar bereits Stunden nach dem experimentellen Infarkt ereignis, bevor Entzündungszellen einwandern, scheint es möglich zu sein, dass MCP-1 von hirneigenen Zellen gebildet wird (Rankine et al., 2006). Hierfür kommen insbesondere Mikrogliazellen in Betracht. Für diese Möglichkeit spricht auch der Befund, dass bei experimenteller Herpes-Simplex-Enzephalitis vorrangig Gliazellen an der Zytokinproduktion von MCP-1 beteiligt sind (Marques et al., 2006). Über den Ursprung von MCP-1 kann aus den vorliegenden Genexpressionsexperimenten nicht geschlossen werden. Aus immunhistochemischen Untersuchungen nach SEA-Enzephalitis geht hervor, dass im Unterschied zu den zahlreichen, deutlich vermehrt aktivierten Mikrogliazellen nur eine verhältnismäßig geringe Zahl an Makrophagen/Monozyten im entzündeten Gewebe vorhanden ist (Huth, Halle, persönliche Mitteilung). Es ist daher anzunehmen, dass in den vorliegenden Untersuchungen die vermehrte MCP-1 Expression überwiegend auf Mikrogliazellen zurückgeht.

CXCL10 ist ein durch Interferon gamma induzierbares Zytokin, das auf T-Zellen und Monozyten/Makrophagen chemotaktisch wirkt. In der vorliegenden Studie war CXCL10 nach

intrazerebraler SEA-Injektion 4,3fach stärker exprimiert als nach NaCl-Injektion. CXCL10 wurde im Bereich der Randzone aktiv entzündlicher MS-Herde vermehrt exprimiert beobachtet (Tanuma et al., 2006). In diesem Zusammenhang ist die Tatsache bemerkenswert, dass mit Theilers Virus infizierte Astrozyten CXCL10 signifikant vermehrt produzieren.

Das am stärksten differenziell exprimierte Gen kodiert das Protein Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). Es gehört zur Familie der Proteaseinhibitoren und inaktiviert irreversibel Metalloproteinasen, insbesondere die Metalloproteinase 9. Pagenstecher et al zeigten 1998 am Tiermodell der EAE, dass eine vermehrte Expression von TIMP-1 Genen mit erhöhter Inflammation im Nervengewebe korreliert. Ferner konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit akuter disseminierte Enzephalomyelitis eine Korrelation zwischen vermehrten Auftreten von Gadolinium aufnehmenden zerebralen Herden und erhöhten TIMP-1 Serumkonzentrationen gibt (Ichiyama, Kajimoto et al., 2006). Wenn also MMP9 durch TIMP-1 gehemmt wird, kann die Immunzellmigration nicht adäquat ablaufen. Somit ist die Expression von TIMP-1 als anti-inflammatorisch einzustufen.

Serumuntersuchungen bei Multiple Sklerose-Patienten zeigten eine erhöhte Serumkonzentration von TIMP-1 (Lee et al., 1999). Daraus wurde geschlossen, dass ein erhöhtes Konzentrationsverhältnis von MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9) und TIMP-1 neue MS-Läsionen im ZNS vorhersagen könnte (Lee et al., 1999; Waubant et al., 1999). Tatsächlich ist eine vermehrte TIMP-1-Expression nicht spezifisch für eine autoimmune Entzündung im ZNS. Dieses Protein ist nämlich auch bei viralen Enzephalitiden vermehrt exprimiert gefunden worden (Zhou et al., 2005). Der Befund, dass die Expression von TIMP-1 nach Superantigenexposition im ZNS deutlich vermehrt exprimiert wird, stützt somit die Interpretation einer unspezifischen Entzündungsreaktion.

4.3.5 Mikrogliale Reaktionen

Neben den oben diskutierten Aufgaben von Mikrogliazellen bei der Initiierung der Entzündung im zerebralen Gewebe, zeichnen sich weitere Funktionen ab, die auch bei und nach Sistieren der Entzündung eine Rolle spielen. In der vorliegenden Studie war die Expression verschiedener Gene für Komplementfaktoren signifikant vermehrt (Komplement- Komponente 3, 4a, C1q bzw. deren Anteile, Komplement Faktor B, Serping 1 und Komplement-Faktor D (Adipsin). Solche Komplementfaktoren können von Mikrogliazellen synthetisiert werden (Raivich und Banati, 2004). Komplementfaktoren tragen z. B. zur Opsonierung von Zelltrümmern bei, so dass diese

leichter phagozytiert werden können. Tatsächlich sind Mikrogliazellen auch zur Phagozytose fähig (Raivich und Banati, 2004). Um an Zelltrümmer zu gelangen bedarf es der Fortbewegung der Zellen. Diese erfolgt durch amöboide Bewegungen. Nach SEA-Injektion ist die Expression des Gens für Integrin alpha M im Vergleich zu Injektion von NaCl 4,5fach signifikant erhöht. Integrine dienen insbesondere der zellulären Adhäsion mit der extrazellulären Matrix. Diese Adhäsion kann für die amöboide Fortbewegung der Mikrogliazellen bzw. Monozyten/Makrophagen eine Rolle spielen (Friedl und Brocker, 2000). Demgegenüber waren Gene für Selectine in der vorliegenden Studie gegenüber den NaCl-Kontrollen nicht signifikant verändert. Selectine sind vor allem für das Anheften von Immunzellen an das Endothel mit nachfolgender Extravasation wichtig. Tatsächlich scheint die Immunzellmigration aus dem Blut in das Gehirn zum Zeitpunkt der Untersuchung soweit abgeschlossen zu sein, dass eine vermehrte Expression von Selectingenen nicht (mehr) zu beobachten war.

Ein Protein, das mit der Initiierung von Phagozytose bei Makrophagen und bei Mikrogliazellen in Verbindung gebracht wird, ist Vav1 (Wilkinson et al., 2006). Ferner spielt Vav1 eine Rolle für die Migration von Makrophagen (Wells et al., 2005). Das Gen für Vav1 war in der vorliegenden Arbeit nach SEA-Injektion 3,4fach vermehrt exprimiert. Allerdings spielt dieses Gen auch für die Signalkaskade nach Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor auf T-Lymphozyten eine Rolle (Tybulewicz, 2005). Da bei der SEA-Enzephalitis sowohl T-Zell-abhängige Mechanismen als auch Phagozytose eine Rolle spielen, ist aufgrund der vorliegenden Daten schwer zu unterscheiden, ob evtl. beide Mechanismen für die vermehrte Expression des Vav1-Gens verantwortlich sind.

Galektin-3 ist ein galaktose-spezifisches Lectin mit der Eigenschaft Immunglobulin E zu binden und neutrophile Granulozyten zu stimulieren. Bei Mikrogliazellen korreliert die Galektin-3-Expression mit der Fähigkeit zur Phagozytose (Rotshenker, 2003). Darüber hinaus soll Galectin-3 zur Apoptose führen. Evtl. hat Galectin-3 eine antiinflammatorische Aufgabe im Rahmen der Immunantwort. In der vorliegenden Arbeit war Galektin-3 im Rahmen der Superantigenenzephalitis 14fach vermehrt differenziell exprimiert. Ähnlich vermehrte Expression von Galektin-3 wurde zuvor bei der EAE beobachtet (Reichert und Rotshenker, 1999). Allerdings spielen neutrophile Granulozyten bei der SEA-Enzephalitis keine Rolle (Kornhuber et al., 2003, Gerlach, persönliche Mitteilung).

Im Rahmen der SEA-Enzephalitis war ferner eine Reihe von Cytochromen signifikant vermehrt exprimiert. Dazu gehören Cytochrom P450 Typ 1b1, Cytochrom b558, Cytochrom b-245. Diese

Cytochrome werden mit der Aktivität von Makrophagen bzw. Mikrogliazellen in Verbindung gebracht (Baron et al., 1998; Rise et al., 2004; Kalinina et al., 2002, Garcia und Segal, 1998).

4.3.6 Antiinflammatorische Gewebsreaktionen

Im Rahmen der SEA-Enzephalitis ist eine Reihe von Genen vermehrt exprimiert, die in ihrer Gesamtheit eine antiinflammatorische Reaktion widerspiegeln. Dazu gehören auch antientzündliche Chemokine wie das oben bereits diskutierte TIMP-1. Es handelt sich vor allem um Proteine, die in der Lage sind, proteolytische Enzyme zu hemmen oder oxidativen Stress abzufangen. Dazu gehören alpha-2-Makroglobulin, Metallothionein, Hitzeschock-Protein 27, Hämoxygenase-1, C/EBP-related transcription factor beta, Coeruloplasmin, Pleckstrin.

Das Gen für alpha-2-Makroglobulin war in der vorliegenden Arbeit nach SEA-Injektion im Entzündungsbereich 25fach stärker exprimiert als nach Lösungsmittelinjektion. Damit gehört es zur Gruppe der am stärksten differenziell exprimierten Gene. Alpha-2-Makroglobulin hat eine starke antiapoptotische Wirkung (Zorin et al., 2006). Neben der Fähigkeit verschiedene Zytokine zu binden, inhibiert alpha-2-Makroglobulin alle 4 Klassen von Proteasen. Es wird u.a. von Makrophagen, Mikrogliazellen und von Astrozyten sezerniert (Hong-Brown and Brown, 1994; Larin et al., 2002; Gao et al., 2002). Darüber hinaus beeinflusst alpha-2-Makroglobulin die Migration von Makrophagen im Bereich der extrazellulären Matrix (Larin et al., 2002). Für Alpha-2-Makroglobulin wurde ferner ein EAE supprimierender Effekt nachgewiesen (Hunter et al., 1991).

Astrozyten, Mikrogliazellen, Makrophagen und Neurone sind in der Lage, das Protein Metallothionein zu exprimieren (West et al., 2004; Zatta et al., 2002). In der vorliegenden Studie war das Gen für Metallothionein nach SEA-Injektion 3,7 mal stärker exprimiert als nach Lösungsmittelinjektion. Eine ähnlich vermehrte Expression dieses Proteins wurde in MS-Plaques (Penkowa et al., 2003) und bei EAE beobachtet (Espejo et al., 2005). Die Expression der antioxidativen Metalloproteine wird vor allem mit einer astroglialen Reaktion auf oxidativen Gewebssstress in Verbindung gebracht (Espejo und Martinez-Caceres, 2005). Tatsächlich beugt die Behandlung mit Metallothioneinen bei EAE der Gewebsschädigung (d. h. Demyelinisierung und Axonverlust) vor (Penkowa und Hidalgo, 2003). Man kann sowohl vom Zeitverlauf der Expression bei EAE und bei MS als auch aufgrund der pharmakologischen Wirkung von einer antiinflammatorischen Reaktion sprechen. Eine ähnliche Wirkung kommt dem nach SEA-Injektion 3,2fach vermehrt exprimierten Gen für Hämoxygenase-1 zu, einem Hitzeschock-Protein,

das Hämoglobin zu antioxidativ wirkenden Bilirubin und Kohlenmonoxid metabolisiert. Für dieses Protein wurde gezeigt, dass es im Rahmen der EAE allmählich im Hirngewebe ansteigt mit einem Maximum etwa 7 Tage nach EAE-Induktion (Levine und Chakrabarty, 2004; Liu et al., 2001; Tan et al., 2004). In diesem Rahmen ist bemerkenswert, dass das Gen für das Hitzeschock-Protein (HSP) 27 bei der SEA-Enzephalitis im Vergleich mit Lösungsmittelinjektion 5fach vermehrt exprimiert war. HSP 27 korreliert mit vermehrtem zellulärem Überleben in Gegenwart zytotoxischer Stimuli (Concannon et al., 2003). Tatsächlich ist HSP27 in die Apoptose-Regulation über den Caspase-Signalweg involviert (Concannon et al., 2003; Didelot et al., 2006). Bei EAE wurde eine signifikant vermehrte Expression von HSP27 beobachtet (Tajouri et al., 2003).

4.3.7 Neuronale Regeneration

Das Gen für Metastasin (kalziumbindendes Protein S100A4) war nach Injektion von SEA im Gehirngewebe 5fach höher exprimiert als nach NaCl-Injektion. Dieses Protein wird im intakten ZNS ausschließlich von Astrozyten exprimiert (Kozlova und Lukanidin, 1999). Hohe Genexpressionen von Metastasin im ZNS scheint eine entscheidende Rolle im Überleben von Neuronen sowie an der neuronalen Regeneration zu spielen (Novitskaya et al., 2000; Pedersen et al., 2004). Die Expression des Proteins S100A4 konnte in Astrozyten nachgewiesen werden, wobei eine erhöhte Expression mit einer vermehrten Migrationsfähigkeit der Astrozyten einhergeht (Takenaga et al., 2006). Gleichzeitig kommt es zu einer steigenden Expression der Gene für die Metalloproteasen MMP-9 und MMP-14, welche die Migration wiederum fördern. Bei angiogenetischen Vorgängen vermag Metastasin einen Platz in der Signalkaskade einzunehmen. (Semov et al., 2005). Somit scheint Metastasin einen wesentlichen Anteil bei Regenerationsvorgängen im ZNS zu haben.

4.3.8 Wiederherstellung der extrazellulären Matrix

In der vorliegenden Untersuchung war das Gen für Lysyl-Oxidase nach SEA-Injektion im ZNS 8,6fach stärker exprimiert als nach NaCl-Injektion. Lysyl-Oxidase ist ein Schlüsselenzym bei der Vernetzung von Kollagen und Elastin zur Wiederherstellung einer intakten extrazellulären Matrix (Trackman et al., 1998). Tatsächlich war eine Vielzahl von Genen für Bestandteile der extrazellulären Matrix nach SEA-Injektion ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert. Dazu zählen die Gene für (Expressionslevel im Vergleich zu Kontrolltieren in Klammern): Tenascin C (6fach), alpha-1-Kollagen Typ III (5,2fach), Syndecan 1 (5,2fach), alpha-1-Kollagen (4,5fach), alpha-1-

Prokollagen Typ I (3,6fach), Vimentin (3,5-fach), Matrix-Gla-Protein (3,4fach), Periostin (3,2fach), oxidiertes LDL-Rezeptor-1 (3,1fach) und alpha-Tubulin (3fach). Die Wiederherstellung der extrazellulären Matrix ist neben der Integrität des ZNS wichtig für die geordnete Regeneration neuronaler Elemente, etwa von Axonen.

4.3.9 Verschiedenes

Eine Reihe von Genen, die nach SEA-Injektion im Vergleich zu NaCl-Injektion vermehrt exprimiert waren, ließ sich nicht einer der oben aufgeführten Funktionen im Rahmen der Superantigen-Enzephalitis zuordnen. Es handelt sich u. a. um die Gene für Granulin, Lipocalin und STAT1.

Granulin zeigt eine relativ hohe Expression bereits in den Kontrollgehirnen und war nach SEA-Injektion etwa 4fach vermehrt exprimiert. Granulin wird u. a. mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht und soll als extrazelluläres Zytokin fungieren (<http://www.expasy.org/uniprot/P23785>). Eine veränderte Expression ist im Rahmen zerebraler Entzündungsprozesse bislang - soweit aus den Datenbanken zu eruieren – nicht beschrieben worden. Dies liegt vermutlich daran, dass dieses Protein bislang nicht gründlich untersucht wurde.

Zu den nach SEA-Injektion am stärksten differenziell exprimierten Genen zählen die für Lipocalin, Apolipoprotein D (24fach vermehrt exprimiert nach SEA-Injektion) und Apolipoprotein B (16fach vermehrt exprimiert nach SEA-Injektion). Das Gen für Lipocalin zählt zu den sog. „late response genes“ (Howe et al., 2006). Die Funktion von Lipocalin D ist unbekannt. Es wird vermutet, dass es beim Transport kleiner, hydrophober Moleküle wichtig ist (Del Valle et al., 2003). In primären Zellkulturen wird Lipocalin von Oligodendrozyten sezerniert, nachdem diese Zellen über das von aktivierten Mikrogliazellen sezernierte IL-1 stimuliert wurden (Howe et al., 2006). Ferner ist beobachtet worden, dass die meisten Astrozyten Apolipoprotein D exprimieren (Navarro et al., 2004). Apolipoprotein D wird eine Rolle bei zerebralen Regenerationsprozessen zugeschrieben (Navarro et al., 2004). Letztlich ist jedoch zu wenig über Lipocalin bekannt, als dass die Rolle im Rahmen der SEA-Enzephalitis näher eingegrenzt werden kann. Dies trifft ebenso für Apolipoprotein B zu. Ebenso sind aktuell keine Arbeiten hinsichtlich der Apolipoprotein B Expression bei der EAE oder MS in der Literatur bekannt.

STAT-1 (signal transducer and activator of transcription) ein Transkriptionsfaktor nimmt eine Schlüsselstellung im Rahmen der antiviralen Immunantwort ein. Interferone (IFN-alpha und IFN-

beta) binden an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die letztlich in der Aktivierung der Transkription von interferon-stimulierten Genen endet. Somit wird ein antiviraler Status der Zelle erreicht. STAT-1 ist in der vorliegenden Arbeit 4,8fach in der SEA-Gruppe vermehrt exprimiert. Ebenfalls konnte anhand Microarrayuntersuchungen bei Patienten mit schubförmig verlaufender MS eine vermehrte Expression von STAT-1 gefunden werden (Frisullo et al., 2006). Eine vermehrte STAT1-Expression findet sich nicht nur in Gehirnen von MS-Patienten sondern auch im Rahmen viraler Enzephalitiden (Wacher et al., 2007, Roberts et al., 2004, Masliah et al., 2005). Ebenfalls konnte im Rahmen der EAE eine vermehrte Expression von STAT1 gesehen werden (Jee et al., 2001). Möglicherweise hat das Superantigen SEA einen ähnlichen Effekt auf zerebrale Neurone. Das dem Superantigen SEA verwandte Staphylokokken Enterotoxin B moduliert über den auf T-Zellen exprimierten Interferon-gamma-Rezeptor die STAT1-Aktivierung (Plaza et al., 2007). Gene, die für Interferone kodieren, konnten in der vorliegenden Arbeit am 8. Tag nach Superantigeninjektion nicht vermehrt exprimiert gefunden werden. Das wäre weniger zu erwarten, da die Initialphase der Entzündung zu diesem Zeitpunkt bereits abgelaufen ist. Jedoch ist das Gen, das für das Interferon-induzierte transmembrane Protein 3 kodiert, 3,5fach vermehrt exprimiert, was einen indirekten Hinweis auf stattgehabte Interferonproduktion gibt. Möglich wäre in der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung von STAT1 direkt durch SEA über die auf T-Zellen befindlichen Interferonrezeptoren.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass der Aktivierung von STAT1 eine wichtige Rolle zugeschrieben, jedoch aber nicht auf die Entzündungsart geschlossen werden kann. Die Aktivierung von STAT1 ist eher ein allgemeiner Teilaspekt der Entzündungsreaktion und geht nicht allein mit einer autoimmunen Reaktion einher.

4.4 Vermindert exprimierte Gene

Verminderte Expression neuronaler Proteine. Unter SEA sind im Vergleich zur Lösungsmittelinjektion eine Reihe solcher neuronaler Proteine signifikant vermindert exprimiert. Dazu gehören: Retinoid-X-receptor-gamma, cholinergic receptor (nicotinic, alpha polypeptide 2, neuronal), potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 8, ATPase, Protonenpumpen (H⁺ transporting, V1 subunit G, isoform 3, H⁺/K⁺ ATPase), Insulin-like growth factor II receptor. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen findet sich bei MS und EAE ebenfalls eine Reihe von Genen neuronaler Proteine (z. B. Neurotransmitterrezeptoren, Ionenkanalproteine) vermindert exprimiert (Lock et al., 2002; Tajouri et al., 2003). Da es sich nicht um jeweils die genau entsprechenden Gene handelt, sind diese nicht in Tabelle 5 (s. u.) aufgeführt.

Eventuell sind auch weitere der unter SEA vermindert exprimierte Gene im Rahmen der neuronalen Funktionsstörung unter der superantigen-induzierten Entzündung zu sehen. So gibt es z. B. eine Population calbindin-positiver Interneurone im zentralen Nervensystem (Wolansky et al., 2007). Die verminderte Calbindin-Expression unter SEA könnte also eine Funktionsstörung dieser Neurone widerspiegeln. Oncomodulin ist, in cochleären Haarzellen konstitutiv exprimiert (Sakaguchi et al., 1998). Auch wenn über eine Expression im zentralen Nervensystem nichts bekannt ist, erscheint es denkbar, dass Oncomodulin in einem Teil zerebraler Neurone vorkommt. Daneben wird Oncomodulin allerdings auch von Makrophagen gebildet (Filbin, 2006). Da eine Reihe von Makrophagenproteinen unter SEA signifikant vermehrt exprimiert ist, passt die verminderte Expression von Oncomodulin nicht in das Bild der vermehrten Aktivität von Makrophagen bzw. Mikrogliazellen. Demgegenüber dürfte die Verminderung der konstitutiv hohen Transthyretinexpression (Präalbumin) eher auf eine Funktionsstörung des Plexus choroideus zurückgehen (Fung et al., 1988). Die durch Mastzellen produzierte Mastzell-Protease wurde bei der Multiplen Sklerose mit dem neurodegenerativen Prozess in Verbindung gebracht. Jedoch wurden dabei erhöhte Werte gefunden, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, in der verminderte Werte bei den mit SEA behandelten Gehirnen gesehen werden konnten. Für diese Diskrepanz kann derzeit keine Erklärung angeführt werden.

4.5 Vergleich der Genexpressionsbefunde der Superantigenenzephalitis mit Genexpressionsbefunden bei Multipler Sklerose und der EAE

In Tabelle 5 sind die in der vorliegenden Arbeit vermehrt bzw. vermindert exprimiert gefundenen Gene im Vergleich mit Microarray Arbeiten bei MS und EAE dargestellt. Die in der vorliegenden Studie nach Superantigeninjektion im Vergleich zu NaCl-Injektion gefundenen differenziell exprimierten Gene sind durchaus mit denen verschiedener Studien zur MS und EAE ähnlich. Dieses Ergebnis ist auch zu erwarten, da es sich jeweils um eine Entzündung im zentralen Nervensystem handelt. Für Virus-Modelle der MS-Erkrankung liegen noch keine Microarrayuntersuchungen vor. Zur Genexpression bei Virus-Enzephalitiden liegen deutlich weniger Daten vor, als zu MS und EAE. Aus diesem Grund wurde die Virus-Enzephalomyelitis hier außer Betracht gelassen.

Bisher wird aus der Ähnlichkeit des Genexpressionsmusters zwischen MS und EAE gefolgert, dass die EAE ein gutes Modell für die MS darstellt. Letztlich zeigen die in der vorliegenden

Studie erhobenen Befunde eine umfangreiche Übereinstimmung der Genexpression nach SEA-Injektion in das Gehirn mit der Genexpression im Gehirn von MS-Patienten bzw. im Nervengewebe von EAE-Tieren. Diese Übereinstimmung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich in allen 3 Fällen um eine T-Zell-vermittelte Entzündung handelt. Übereinstimmende Ergebnisse finden sich insbesondere für die differenziell vermehrte Expression von Genen, die für Proteine der Antigenpräsentation (MHC-I, MHC-II), der Lymphozytenreaktion (z. B. T-Zell-Rezeptor), für Chemokine (Osteopontin, RANTES, MCP-1, CXCL10). Ebenfalls waren Gene für Proteine der extrazellulären Matrix (Integrin alpha M, Tenascin-C), der antientzündlichen Gewebsreaktion (Metallothionein) sowie entzündungsassoziierte Proteine wie STAT-1 bei MS, EAE und der Superantigenenzephalitis differenziell vermehrt exprimiert. Die Ergebnisse stützen somit die Auffassung, dass die Entzündung eine gemeinsame Endstrecke darstellt, über die kaum auf die Ursache der Erkrankung MS geschlossen werden kann.

Tabelle 5: Vergleich von Genexpressionsbefunden aus den Untersuchungen der Superantigenenzephalitis in der vorliegenden Arbeit mit Genexpressionsbefunden aus Studien der Multiplen Sklerose sowie der EAE.

Genprodukt	MS	EAE	SEA- Enzephalitis
<i>Antigenpräsentation</i>			
MHC II	↑ Lock et al., 2002	↑ Carmody et al., 2006	↑
MHC I	↑ Tajouri et al., 2003		↑
<i>Lymphozyten</i>			
Matrix metalloproteinase 9	↑ Steinman et al., 1999		↑
CD8 antigen alpha chain	↑ Liu et al., 2007		↑
T-cell receptor beta chain	↑ Lock et al., 2002	↑ Carmody et al., 2006	↑

Genprodukt	MS	EAE	SEA- Enzephalitis
CD3 gamma-chain (T-Zellrez.)	↑ Liu et al., 2007		↑
CD 45 antigen	↑ Liu et al., 2007		↑
Leukocyte common antigen	↑ Liu et al., 2007		↑
Cathepsin C (Dipeptidyl Peptidase I)		↑ Marks et al., 1977 Carmody et al., 2006	↑
Sialophorin (CD43)		↑ Ford et al., 2003, 2006	↑
<i>Chemokine/Chemokinrezeptoren</i>			
Secreted Phosphoprotein 1 (Osteopontin)	↑ Lock et al., 2002 ↓ Lindberg et al., 2004	↑ Kim et al., 2004	↑
Chemokine (C-C-motiv ligand) 5, RANTES	↑ Boven et al., 2000	↑	↑
Early response JE gene (chemokine C-C motiv ligand 2 (MCP-1))	↑ Tanuma et al., 2006	↑ Hofmann et al., 2002 Gonzales et al., 2002	↑
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	↑ Tanuma et al., 2006 Tajouri et al., 2003	↑ Tajouri et al., 2003	↑

Fortsetzung Tabelle 5

Genprodukt	MS	EAE	SEA- Enzephalitis
Transforming growth factor, beta 1 (TGF beta1)	↓ Lindberg et al., 2004 ↑ Becker et al., 1997 Lock et al., 2002	↑ Carmody et al., 2006	↑
<i>Mikrogliale Reaktion</i>			
CD53 antigen		↑ Carmody et al., 2006	↑
<i>Phagozytose/Opsonierung</i>			
IgE-binding protein (Galectin 3)		↑ Reichert et al., 1999	↑
Vav 1 oncogene		↑ Carmody et al., 2006	↑
Fc gamma-receptor	↑ Lock et al., 2002		↑
Lysozym	↑ Lock et al., 2002		↑
Complement C1q	↑ Tajouri et al., 2003		↑
Complement component 3	↑ Lock et al., 2002		↑
Complement component 4a		↑ Tajouri et al., 2003	↑
Fatty acid-binding protein (adipocyte)		↑ Carmody et al., 2006	↑

Genprodukt	MS	EAE	SEA- Enzephalitis
<i>Extrazelluläre Matrix / Zelladhäsion</i>			
Integrin alpha M	↑ Lock et al., 2002	↑ Carmody et al., 2006	↑
Tenascin-C	↑ Lock et al., 2002	↑ Carmody et al., 2006	↑
Collagen type III alpha 1	↓ Tajouri et al., 2003	↓ Tajouri et al., 2003	↑
Tubulin, alpha 6	↑ Tajouri et al., 2003		↑
<i>Antientzündliche Gewebsreaktion</i>			
Heme oxygenase (decycling) 1		↑ Levine et al., 2004 Liu et al., 2001 Tan et al., 2004	↑
TIMP-1		↑ Pagenstecher et al., 1998	↑
Alpha 2 Makroglobulin		↑ Hunter et al., 1991	↑
Heat shock 27kDa protein 1		↑ Tajouri et al., 2003	↑
NF-IL6(C/EBP-related Transcription factor beta)	↑ Lock et al., 2002		↑
Metallothionein	↑ Penkowa et al., 2003 Lock et al., 2002 Tajouri et al., 2003	↑ Espejo et al., 2005	↑

Fortsetzung Tabelle 5

Genprodukt	MS	EAE	SEA- Enzephalitis
<i>Zerebrale Reaktion</i>			
GFAP (alternatively spliced form)		↑ Tani et al., 1996	↑
<i>Verschiedenes/ Entzündungsassoziiert</i>			
Granulin	↑ Tajouri et al., 2003		↑
STAT-1	↑ Frisullo et al., 2006	↑ Jee et al., 2001 Carmody et al., 2006	↑
Coagulation factor 10		↑ Carmody et al., 2006	↑
Hexokinase II		↑ Carmody et al., 2006	↑
Protein tyrosine phosphatase, receptor type C		↑ Carmody et al., 2006	↑
Guanylate nucleotide binding protein		↑ Carmody et al., 2006	↑

5. Zusammenfassung

Nach intrazerebraler Expression des Superantigens Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) tritt eine perivaskuläre Entzündungsreaktion auf (Superantigen-Enzephalitis), die durch aktivierte Lymphozyten in der Blutbahn unterhalten wird. Diese Superantigen-Enzephalitis kann als ein neues Entzündungsmodell für zerebrale Autoimmunerkrankungen wie z. B. Multiple Sklerose gelten. Über die Pathogenese der Superantigen-Enzephalitis ist noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die zerebrale Genexpression bei Lewis-Ratten 8 Tage nach intrazerebraler Injektion von SEA im Vergleich zur Injektion von Lösungsmittel bzw. keiner Injektion mittels sog. Microarray-Technik untersucht. Alle Versuchstiere erhielten 5 Tage nach der initialen Narkose eine intravenöse Injektion von $1,5 \times 10^7$ aktivierten Milzzellen. Dadurch kann die SEA-Enzephalitis verstärkt werden.

Nach Injektion des Superantigens SEA im Vergleich zur Lösungsmittelinjektion zeigten von den 8 800 untersuchten Genen 109 eine signifikante und mindestens 3fach über den Kontrollen liegende vermehrte Expression. 29 Gene waren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant und ebenfalls mindestens 3fach vermindert exprimiert. Die mittels Microarray-Technik gewonnenen Resultate wurden anhand ausgewählter Gene mit konventioneller Polymerase-Ketten-Reaktions-Technik (PCR-Technik) sowie mit Real-time-PCR überprüft. Dabei wurde eine weit gehende Übereinstimmung gefunden.

Die differenziell nach SEA-Injektion vermehrt exprimierten Gene zeugen von einer intrazerebralen Immunreaktion, die von antigenpräsentierenden Zellen (MHC Klasse II-Gene) sowie CD8+ suppressorischen/zytotoxischen T-Zellen (Gene für den pan-T-Zell-Marker CD3 sowie für CD8) getragen wird. Zum Zeitpunkt der Untersuchung spiegeln die vermehrt exprimierten Gene für verschiedene Chemokine (Gene für CXCL13, CXCL10, CCL5, Osteopontin, MCP-1, TGF beta 1), Makrophagen bzw. Mikrogliazellen (z. B. Gene für Serping 1, CCAAT/enhancer binding protein) sowie Astrozyten (z. B. Gen für GFAP) die Entzündungsreaktion und deren zerebrale Gewebsreaktion wieder. Die vermehrte Expression von Komplementfaktoren sowie Integrin-alpha spricht für aktive Phagozytose, vermutlich als Ausdruck der Abräumreaktion der im Rahmen der Entzündung anfallenden Zelltrümmer. Ferner sprechen die vermehrt exprimierten Gene verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix für regenerative Gewebsprozesse.

Gegenüber der Genexpression nach intrazerebraler Superantigeninjektion spielt das Injektionstrauma eine untergeordnete Rolle. Acht Tage nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (im Vgl. mit keiner Injektion) waren 6 von 8 800 untersuchten Genen mindestens

3fach vermehrt und 40 Gene vermindert exprimiert. Verminderte Genexpression wurde für Gene gefunden, die mit neuronaler Aktivität assoziiert sind. Vermehrt exprimierte Gene fallen demgegenüber zu diesem Zeitpunkt nach dem Trauma kaum ins Gewicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die zuvor bereits histologisch gefundene Entzündungsreaktion nach intrazerebraler Superantigen-Injektion. Der Vergleich der Daten der vorliegenden Studie mit Daten zur differenziellen Genexpression aus zerebralem Gewebe bei Multipler Sklerose oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), ergibt eine Reihe von Übereinstimmungen. Diese umfassen u. a. Gene für Lymphozyten, Chemokine, Mikrogliale Reaktion, Phagozytose/Opsonierung, Extrazelluläre Matrix/Zelladhäsion, zerebrale Reaktion. Diese Übereinstimmung ist plausibel, weil es sich in allen 3 Fällen um eine von T-Zellen getragene intrazerebrale Entzündung handelt. Unterschiede betreffen z. B. die Expression von Genen für Immunglobuline, die im Gehirngewebe bei MS und EAE vermehrt exprimiert gefunden wurden, nicht aber nach T-Zell-Superantigeninjektion ins Gehirn.

Die vorliegende Untersuchung trägt zur Vertiefung des Verständnisses der Pathogenese der Superantigenenzephalitis bei. Der Zeitverlauf der zerebralen Genexpression nach Superantigeninjektion bedarf weiterer Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

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

Al-Ali SY, Robinson N: Neuronal and oligoendrocytic response to cortical injury: ultrastructural and cytochemical changes. *Histochem J* 16 (1984) 165 - 178

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

Baron JM, Zwadio-Klarwasser G, Jugert F, Hamann W, Rubben A, Mukhtar H, Merk HF: Cytochrome P450 1B1: a major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem Pharmacol* 56 (1998) 1105 - 1110

Becker K.G., Mattson D.H., Powers J.M., Gado A.M., Biddison W.E: Analysis of a sequenced cDNA library from multiple sclerosis lesions. *J Immunol* 77 (1997) 27 - 38

Bellander BM, Bendel O, Von Euler G, Ohlsson M, Svensson M: Activation of microglial cells and complement following traumatic injury in rat entorhinal-hippocampal slice cultures. *J Neurotrauma* 21 (2004) 605 - 615

Boven LA, Montagne L, Nottet HS, De Groot CJ. Macrophage inflammatory protein -1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol* 122 (2000) 257 - 263

Bradl M, Linington C: Animal models of demyelination. *Brain Pathol* 6 (1996) 303 - 311

Brocke S, Piercy C, Steinman L: Superantigens in demyelinating disease. *Springer Semin Immunopathol* 18 (1996) 51 - 56

Brosnan CF, Raine CS: Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 6 (1999) 243 - 257

Boylan KB, Takahashi N, Paty DW, Sadovnick AD, Diamond M, Hood LE, Prusiner SB: DNA length polymorphism 5' to the myelin basic protein gene is associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 27 (1990) 291 - 297

Carmody RJ, Hilliard B, Maguschak K, Chodosh LA, Chen YH: Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol* 133 (2002) 95 - 107

Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liquori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U: Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 163 (2005) 172 - 178

Comabella M, Pericot I, Goertsches R, Nos C, Castillo M, Blas Navarro J, Rio J, Montalban X: Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 158 (2005) 231 - 239

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

- Concannon CG, Gorman AM, Samali A: On the role of HSP27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8 (2003) 61-70
- Dal Canto MC: Uncoupled relationship between demyelination and primary infection of myelinating cells in Theiler's virus encephalomyelitis. *Infect Immun* 35 (1982) 1133 - 1138
- Dal Canto MC, Melvold RW, Kim BS, Miller SD: Two models of multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microsc Res Tech* 32 (1995) 215 - 229
- Dean G, Kurtzke JF: On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3 (1971) 725 - 729
- Del Valle E, Navarro A, Astudillo A, Tolivia J: Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J Histochem Cytochem* 51 (2003) 1285 - 1290
- Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoist C, Mathis D: Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62 (1990) 1115 - 1121
- Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C: Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 172 (2006) 171 - 198
- Duan X, Nerl C, Janssen O, Kabelitz D: B-cell maturation in chronic lymphocytic leukaemia. IV. T-cell-dependent activation of leukaemic B cells by staphylococcal enterotoxin "superantigens". *Immunology* 75 (1992) 420 - 426
- Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC: Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 6 (1997) 1693-1698
- Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 21 (2000) 815 - 817
- Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD: Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64 (1998) 736-741
- Espejo C, Penkowa M, Demestre M, Montalban X, Martinez Caceres EM: Time course expression of CNS inflammatory, neurodegenerative tissue repair markers and metallothioneins during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 132 (2005) 1135 - 1149
- Espejo C, Martinez-Caceres EM: The role of metallothioneins in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1051 (2005) 88 - 96
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr: Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neural apoptosis. *J Cell Biol* 127 (1994) 1717 - 1727
- Falsig J, Porzgen P, Lund S, Schratzenholz A, Leist M: The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem* 96 (2006) 893 - 907
- Fields BA, Malchiodi EL, Li H, Ysern X, Stauffacher CV, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA: Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature* 384 (1996) 188 - 192

Fierro NA, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y: TCR-dependent cell response is modulated by timing of CD43 engagement. *J Immunol* 176 (2006) 7346 - 7353

Filbin MT: How inflammation promotes regeneration. *Nature Neuroscience* 9 (2006) 715 - 717

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

Ford ML, Evavold BD: Modulation of MOG 37-50-specific CD8+ T cell activation and expansion by CD43. *Cell Immunol* 240 (2006) 53 - 61

Ford ML, Onami TM, Sperling AI, Ahmed R, Evavold BD: CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 171 (2003) 6527 - 6533

Fraser JD: High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. *Nature* 339 (1989) 221 - 223

Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T: Superantigens – powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today* 6 (2000) 125 - 132.

Friedl P, Brocker EB: The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 41 - 64

Friedmann A, Beller DI: Simultaneous expression of Ia and cytotoxic activity by macrophages, and the consequences for antigen presentation. *Immunology* 61 (1987) 435 - 441

Frisullo G, Angelucci F, Caggiula M, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Sancricca C, Mirabella M, Tonali PA, Batocchi AP: PSTAT1, pSTAT3 and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res* 84 (2006) 1027 - 1036

Fung WP, Thomas T, Dickson PW, Aldred AR, Milland J, Dziadek M, Power B, Hudson P, Schreiber G: Structure and function of the rat transthyretin (prealbumin) gene. *J Biol Chem* 263 (1988) 480 - 488

Gao F, Bales KR, Dodel RC, Liu J, Chen X, Hamble H, Farlow MR, Paul SM, Du Y: NF-kappaB mediates IL-1beta-induced synthesis/release of alpha2-macroglobulin in a human glial cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 105 (2002) 108 - 114

Garcia RC, Segal AW: Phosphorylation of the subunits of cytochrome b-245 upon triggering of the respiratory burst of human neutrophils and macrophages. *Biochem J* 252 (1998) 901 - 904

Garcia Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB: Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89 (1999) 567 - 578

Gay D, Buus S, Pasternak J, Kappler J, Marrack P: The T-cell accessory molecule CD4 recognizes a monomorphic determinant on isolated Ia. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 5629 - 5633

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

Gerlach Kristina, Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Golkari S, Gilbert J, Prashar S, Procnier JD: Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnol J* 5 (2007) 38 - 49

Gonzales-Amaro R, Sanchez-Madrid F: Intercellular adhesion molecules and chemotaxis factors in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Rev Neurol* 35 (2002) 985 - 993

Gorodezky C, Najera R, Rangel BE, Castro LE, Flores J, Velazquez G, Granados J, Sotelo J: Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexicans. *Hum Immunol* 16 (1986) 364 - 374

Hofmann N, Lachnit N, Sreppel M, Witter B, Neiss WF, Guntinas-Lichius O, Angelov DN: Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 and MIP-1 alpha by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC Immunol* 26 (2002) 3 - 11

Hong-Brown LQ, Brown CR: Cytokine and insulin regulation of alpha 2 macroglobulin, angiotensinogen, and hsp 70 in primary cultured astrocytes. *Glia* 12 (1994) 211 - 218

Howe CL, Mayoral S, Rodriguez M: Activated microglia stimulate transcriptional changes in primary oligodendrocytes via IL-1beta. *Neurobiol Dis* 23 (2006) 731 - 739

Hunter N, Weston KM, Bower NA: Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by alpha 2-macroglobulin. *Immunology* 73 (1991) 58 – 63

Huth Kathleen, Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Ibrahim SJ, Mix E, Böttcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, Thiesen HJ: Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124 (2001) 1927 - 1938

Ichiyama T, Kajimoto M, Suenaga N, Maeba S, Matsubara T, Furukawa S: Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor (TIMP-1) in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 172 (2006) 182 - 186

Jedrzkiwicz S, Kataeva G, Hogaboam CM, Kunkel SL, Strieter RM, McKay DM: Superantigen immune stimulation evokes epithelial monocyte chemoattractant protein 1 and RANTES production. *Infect Immun* 67 (1999) 6198 – 6202

Jee Y, Kim G, Tanuma N, Matsumoto Y: STAT expression and localization in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 114 (2001) 40 – 47

Jelonek MT, Classon BJ, Hudson PJ, Margulies DH: Direct binding of the MHC class I molecule H-2Ld to CD8: interaction with the amino terminus of a mature cell surface protein. *J Immunol* 160 (1998) 2809 - 2814

Jilek S, Schlupe M, Rossetti Ao; Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, Du Pasquier RA: CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 123 (2007) 105 - 113

Johnson HM, Russell JK, Pontzer CH: Staphylococcal enterotoxin superantigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 198 (1991) 765 - 771

Kalinina N, Agrotis A, Tararak E, Antropova Y, Kanellakakis P, Ilvynskaya O, Quinn MT, Smirnov V, Bobik A: Cytochrome b558-dependent NAD(P)H oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 2037 - 2043

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z: Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunol Lett* 92 (2004) 107 - 115

Kim MD, Cho HJ, Shin T: Expression of osteopontin and its ligand, CD44; in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 151 (2004) 78 - 84

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

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

Kornhuber ME, Presek P, Zierz S: Differential influence of immune therapy on relapses and progression in multiple sclerosis: interpretation and therapeutic consequences. *Fortschr Neurol Psychiatr* 73 (2005) 143 - 149

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

Kotzin BL: Superantigens and their role in disease. *Hosp Pract (Off Ed)* 29 (1994) 59-63, 68 - 70

Kozlova EN, Lukanidin E: Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein is selectively expressed in white matter astrocytes and is up-regulated after peripheral nerve or dorsal root injury. *Glia* 27 (1999) 249 - 258

Kurdi A, Ayeshe I, Abdallat A, Maayata U: Different B Lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis in Arabs and North Europeans. *Lancet* 1 (1977) 1123 - 1125

Larin SS, Gorlina NK, Kozlov IG, Cheredeev AN, Zorin NA, Zorina RM: Binding of alpha2-macroglobulin to collagen type I: modification of collagen matrix by alpha2-macroglobulin induces the enhancement of macrophage migration. *Russ J Immunol* 7 (2002) 34 - 40

Lassmann H: Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Schriftenr Neurol.* 25 (1983) 1 - 135

Lassmann H, Bartsch U, Montag D, Schachner M: Dying-back oligodendroglialopathy: a late sequel of myelin-associated glycoprotein deficiency. *Glia* 19 (1997) 104 - 110

- Lavoie PM, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP: Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol Rev* 168 (1999) 257 - 269
- Lee MA, Palace J, Stabler G, Ford J, Gearing A, Miller K: Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 122 (1999) 191 - 197
- Levine SM, Chakrabarty A: The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1012 (2004) 252 - 266
- Lindberg RL.P., De Groot C J. A., Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, Leppert D: Multiple sclerosis as a generalized CNS disease – comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol* 152 (2004) 154 - 167
- Liu GZ, Fang LB, Hjelmstrom P, Gao XG: Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 13 (2007) 149 - 155
- Liu Y, Zhu B, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS: Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroreport* 12 (2001) 1841 - 1845
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H: Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in immune encephalomyelitis. *Nat Med* 8 (2002) 500 - 508
- Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti, R, Hartings JA, Whipple R, Vahey MT, Polavarapu RG, Woller KL, Tortella FC, Dave JR: Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J Neurosci Res* 77 (2004) 843 - 857
- 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
- Mandruzzato S, Callegaro A, Turcatel G, Francescato S, Montesco MC, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Rossi CR, Biciato S, Wang E, Marincola FM, Zanovello P: A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma. *J Transl Med* 4 (2006) 50
- Marks N, Grynbaum A, Levine S: Proteolytic enzymes in ordinary, hyperacute, monocytic and passive transfer forms of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res* 123 (1977) 147 - 157
- Marques CP, Hu S, Sheng W, Lokensgard JR: Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Res* 121 (2006) 1 - 10
- Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, Spinicci G, Pishedda MP, Goddi F, Cossu P, Pirastu M: Sardinian multiple sclerosis is associated with HLA-DR4: a serologic and molecular analysis. *Neurology* 38 (1988) 1749 - 1753
- Martin R, McFarland HF, McFarlin DE: Immunological Aspects of Demyelinating Diseases. *Annual Review of Immunology* 10 (1992) 153 - 187

- Maslah E, Roberts ES, Langford , Everall I, Crews L, Adame A, Rockenstein E, Fox HS: Patterns of gene dysregulation in the frontal cortex of patients with HIV encephalitis. *J Neuroimmunol* 157 (2005) 163 – 175
- Massard G, Tongio MM, Wihlm JM, Morand G: The dendritic cell lineage: a ubiquitous antigen-presenting organization. *Ann Thorac Surg* 61 (1996) 252 - 258
- McCombe PA, Clark P, Frith JA, Hammond SR, Stewart GJ, Pollard JD, McLeod JG: Alpha-1 antitrypsin phenotypes in demyelinating disease: an association between demyelinating disease and the allele PiM3. *Ann Neurol* 18 (1985) 514 - 516
- Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H: T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 175 (1992) 91 - 98
- Naito S, Kuroiwa Y, Itoyama T, Tsubaki T, Horikowa A, Sasazuki T, Noquchi S, Ohtsuki S, Tokuomi H, Miyatake T, Takahta N, Kawanami S: HLA and Japanese MS. *Tissue Antigens* 12 (1978) 19 - 24
- Navarro A, Del Valle E, Tolivia J: Differential expression of apolipoprotein D in human astroglial and oligodendroglial cells. *J Histochem Cytochem* 52 (2004) 1031 - 1036
- Neshat MN, Goodglick L, Lim K, Braun J: Mapping the B cell superantigen binding site for HIV-1 gp 120 on a V(H)3 Ig. *Int Immunol* 12 (2000) 305 - 312
- Nogradi A, Domoki F, Degi R, Borda S, Pakaski M, Szabo A, Bari F: Up-regulation of cerebral carbonic anhydrase by anoxic stress in piglets. *J Neurochem* 85 (2003) 843 - 850
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Weinshenker RM, Brian G: Medical Progress: Multiple sclerosis. *NEJM* 343 (2000) 938 - 952
- Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E, Lukanidin E: Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* 275 (2000) 41278 - 41286
- Oberthuer A, Warnat P, Kahlert Y, Westermann F, Spitz R, Brors B, Hero B, Eils R, Schwab M, Berthold F, Fischer M: Classification of neuroblastoma patients by published gene-expression markers reveals a low sensitivity for unfavorable courses of MYCN non amplified disease. *Cancer Lett* 250 (2006) 250 - 267
- Pagenstecher A, Stalder AK, Kinacid CL, Shapiro SD, Campbell IL: Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* 152 (1998) 729 - 741
- Pandey JP, Goust JM, Salier JP, Fudenberg HH: Immunoglobulin G heavy chain (Gm) allotypes in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 67 (1981) 1797 – 1800
- Paterson PY, Drobish DG, Hanson MA, Jacobs AF: Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 37 (1970) 26 - 40
- Pedersen MV, Kohler LB, Grigorian M, Novitskaya V, Bock E, Lukanidin E, Berezin V: The Mts/100A4 protein is a neuroprotectant. *J Neurosci Res* 77 (2004) 777 - 786

Penkowa M, Espejo C, Ortega-Aznar A, Hidalgo J, Montalban X, Martinez Caceres EM: Metallothionein expression in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Cell Mol Life Sci* 60 (2003) 1258 - 1266

Penkowa M, Hidalgo J: Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocyte precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 72 (2003) 574 - 586

Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B: Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 7583 - 7588

Plaza R, Rodriguez-Sanchez JL, Juarez C: Staphylococcal enterotoxin B in vivo modulates both gamma interferon receptor expression and ligand-induced activation of signal transducer and activator of transcription 1 in T cells. *Infect Immun* 75 (2007) 306 - 313

Poulsen CB, Penkowa M, Borup R, Nielsen FC, Cáceres M, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Giralt M, Hidalgo J: Brain response to traumatic brain injury in wild type and interleukin-6 knockout mice: a microarray analysis. *J Neurochem* 92 (2005) 417 - 432

Prineas JW, Connell F: Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5 (1979) 22 - 31

Qi X, Okuma Y, Hosoi T, Kaneko M, Nomura Y: Induction of murine HRD1 in experimental cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 130 (2004) 30 - 38

Raivich G, Banati R: Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 46 (2004) 261 - 281

Rankine EL, Hughes PM, Botham MS, Perry VH, Felton LM: Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *Eur J Neurosci* 24 (2006) 77 - 86

Reichert F, Rotshenker S: Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. *Exp Neurol* 160 (1999) 508 - 514

Rise ML, Jones SR, Brown GD, von Schalburg KR, Davidson WS, Koop BF: Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiol Genomics* 20 (2004) 21 - 35

Roberts ES, Burudi EM, Flynn C, Madden LJ, Roinick KL, Watry DD, Zandonatti MA, Taffe MA, Fox HS: Acute SIV infection of the brain leads to upregulation of IL6 and interferon-regulated genes: expression patterns throughout disease progression and impact of neuroAIDS. *J Neuroimmunol* 157 (2004) 81 - 92

Rotshenker S: Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci* 21 (2003) 65 - 72

Sakaguchi N, Henzl MT, Thalmann I, Thalmann R, Schulte BA: Oncomodulin is expressed exclusively by outer hair cells in the organ of Corti. *J Histochem Cytochem* 46 (1998) 29 - 40

Sandhir R, Puri V, Klein RM, Berman NE: Differential expression of cytokines during secondary neuron death following brain injury in old and young mice. *Neurosci Lett* 369 (2004) 28 - 32

Schroeter M, Zickler P, Denhardt DT, Hartung HP, Jander S: Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice. *Brain* 129 (2006) 1426 - 1437

Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V: Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 280 (2005) 20833 – 20841

Sobel RA, Kuchroo VK: The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis induced with myelin proteolipid protein. T-cell receptors in inflammatory lesions. *J Immunol* 149 (1992) 1444 - 1451

Standal T, Borset M, Sundan A: Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodelling. *Exp Oncol* 26 (2004) 179 - 184

Steck AJ, Schaeren-Wiemers N: Multiple sclerosis: epidemiology molecular pathology and therapy. *Schweiz Med Wochenschr* 129 (1999) 1764 – 1768

Stohlman SA, Hinton DR: Viral induced demyelination. *Brain Pathol* 11 (2001) 92 - 106

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

Stuve O, Youssef S, Slavin AJ, King CL, Patarroyo JC, Hirschberg DL, Brickey WJ, Soos JM, Piskurich JF, Chapman HA, Zamvil SS: The role of MHC class II transactivator in class II expression and antigen presentation by astrocytes and susceptibility to central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 169 (2002) 6720 - 6732

Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AEG, Nagra RM, Tourtelotte WW, Griffith LR: Quantitative and qualitative changes in gene expression pattern characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Molecular Brain Research* 119 (2003) 170 - 183

Takenaga K, Kozlova EN: Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes. *Glia* 53 (2006) 313 - 321

Tan GJ, Zhu YF, Cao CF, Zhao XY, Ma CS, Yang TZ: Dynamic changes of heme oxygenase-1 protein and mRNA in the brains of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *Sheng Li Xue Bao* 56 (2004) 579 - 584

Tani M, Glabinski AR, Tuohy VK, Stoler MH, Estes ML, Ransohoff RM: In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 148 (1999) 889 - 896

Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y: Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 112 (2006) 195 - 204

Torres BA, Kominski S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM: Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med (Maywood)* 226 (2001) 164 – 176

- Trackman PC, Graham RJ, Bittner HK, Carnes DL, Gilles JA, Graves DT: Inflammation-associated lysyl oxidase protein expression in vivo, and modulation by FGF-2 plus IGF-1. *Histochem Cell Biol* 110 (1998) 9 - 14
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 5116 - 5121
- Tybulewicz VL: Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17 (2005) 267 - 274
- Wacher C, Muller M, Hofer MJ, Getts DR, Zabarar R, Ousman SS, Terenzi, F, Sen GC, King NJ, Campbell IL: Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distict virus. *J Virol* 81 (2007) 860 - 871
- Waubant E, Goodkin DE, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, Stewart T, Andersson PB, Sabler G, Miller K: Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 53 (1999) 1397 - 1401.
- Wells CM, Bhavsar PJ, Evans IR, Vigorito E, Turner M, Tybulewicz V, Ridley AJ: Vav1 and Vav2 play different roles in macrophage migration and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res* 310 (2005) 303 - 310
- West AK, Chuah MI, Vickers JC, Chung RS: Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain. *Rev Neurosci* 15 (2004) 157 - 166
- Wilkinson B, Koenigsnecht-Talboo J, Grommes C, Lee CY, Landreth G: Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signalling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J Biol Chem* 281 (2006) 20842 - 20845
- Willer CJ, Ebers GC: Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. *Curr Opin Neurol* 13 (2000) 241 - 247
- Wolansky T, Pagliardini S, Graer JJ, Dickson CT: Immunocytochemical characterization of substance P receptor (NK(1)R)-expressing interneurons in the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 502 (2007) 427 - 421
- Zatta P, Zambenedetti P, Stella MP, Licastro F: Astrocytosis, microgliosis, metallothionein-I-II and amyloid expression in high cholesterol-fed rabbits. *J Alzheimers Dis* 4 (2002) 1 - 9
- Zhang D, Dhillon HS, Mattson MP, Yurek DM, Prasad RM: Immunohistochemical detection of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal after experimental brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 272 (1999) 57 - 61.
- Zhou J, Marten NW, Bergmann CC, Macklin WB, Hinton DR, Stohlman SA: Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor during viral encephalitis. *J Virol*. 79 (2005) 4764 - 4773
- Zorin NA, Zorina VN, Zorina RM: The role of macroglobulin family proteins in the regulation of inflammation. *Biomed Khim* 52 (2006) 229 - 238

Thesen

1. Die Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) ist nur teilweise aufgeklärt. Für die bei der MS im zentralen Nervensystem (ZNS) ablaufenden Entzündungsvorgänge gibt es bislang 2 Tiermodelle: (1) die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und (2) die virale Enzephalomyelitis. Beide Tiermodelle erklären unterschiedliche Aspekte der MS-Erkrankung. Um beide Modelle zu verbinden wurde kürzlich ein neues Tiermodell etabliert, bei dem die Entzündung durch sog. Superantigene im ZNS ausgelöst werden (s. u.). Superantigene können von Viren oder Bakterien gebildet werden.
2. Nach intrazerebraler Injektion des Superantigens Staphylokokken-Enterotoxin-A (SEA) tritt eine perivaskuläre Entzündungsreaktion auf (Superantigen-Enzephalitis), die durch aktivierte Lymphozyten in der Blutbahn unterhalten wird. Über die Pathogenese der Superantigen-Enzephalitis ist noch wenig bekannt.
3. In der vorliegenden Untersuchung wurde die zerebrale Genexpression bei Lewis-Ratten 8 Tage nach intrazerebraler Injektion von SEA im Vergleich zur Injektion von Lösungsmittel bzw. keiner Injektion mittels sog. Microarray-Technik untersucht. Alle Versuchstiere erhielten 5 Tage nach der initialen Narkose eine intravenöse Injektion von $1,5 \times 10^7$ aktivierten Milzzellen, um die SEA-Enzephalitis zu verstärken.
4. Nach Injektion des Superantigens SEA im Vergleich zur Lösungsmittelinjektion zeigten von den 8800 untersuchten Genen 109 Gene eine signifikant und mindestens 3fach über den Kontrollen liegende Genexpression, 29 Gene waren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant und ebenfalls mindestens 3-fach vermindert exprimiert.
5. Die differenziell nach SEA-Injektion vermehrt exprimierten Gene zeugen von einer intrazerebralen Immunreaktion, die von antigenpräsentierenden Zellen (MHC-Klasse II-Gene) sowie CD8+ suppressorischen/zytotoxischen T-Zellen (Gene für den pan-T-Zell-Marker CD3 sowie für CD8) getragen wird. Zum Zeitpunkt der Untersuchung spiegeln die vermehrt exprimierten Gene für verschiedene Chemokine (Gene für Osteopontin, Rantes, MCP-1, CXCL10, TGF beta 1), Makrophagen bzw. Mikrogliazellen (z. B. Gene für Serping 1, CD53-antigen) sowie Astrozyten (Gen für GFAP) die Entzündungsreaktion und deren zerebrale Gewebsreaktion wieder. Die vermehrte Expression von Galectin 3, Fc-gamma-receptor, Complement component 1, 3, 4 spricht für aktive Phagozytose, vermutlich als Ausdruck der Abräumreaktion der im Rahmen der Entzündung anfallenden Zelltrümmer. Ferner sprechen die vermehrt exprimierten Gene verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix für regenerative Gewebeprozesse.

6. Die relativ wenigen signifikant vermindert exprimierten Gene spiegeln u. a. die verminderte Funktion neuronaler Elemente wieder.
7. Acht Tage nach dem Injektionstrauma (Vergleich der Genexpression nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung im Vgl. ohne Injektion) waren 6 von 8800 untersuchten Genen mindestens 3fach vermehrt und 40 Gene vermindert exprimiert. Verminderte Genexpression wurde für Gene gefunden, die mit neuronaler Aktivität assoziiert sind, z. B. Ankyrin. Vermehrt exprimierte Gene fallen demgegenüber zu diesem Zeitpunkt nach dem Trauma kaum ins Gewicht. Es kann angenommen werden, dass das Injektionstrauma keinen Einfluss auf die differenzielle Genexpression im Rahmen der Superantigenenzephalitis hat, weil ebenfalls durch eine Injektion traumatisierte Tiere als Kontrollen verwendet wurden.
8. Die vorliegende Untersuchung trägt zur Vertiefung des Verständnisses der Pathogenese der Superantigenenzephalitis bei. Der Zeitverlauf der zerebralen Genexpression nach Superantigeninjektion bedarf weiterer Untersuchungen.
9. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die zuvor bereits histologisch gefundene Entzündungsreaktion nach intrazerebraler Superantigen-Injektion. Die Ergebnisse zur differenziellen Genexpression zeigen eine relativ gute Übereinstimmung mit Daten aus zerebralem Gewebe bei Multipler Sklerose oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Emmer
Vorname	Alexander
Geburtsdatum	17.10.1978
Geburtsort	Halle (Saale)
Wohnort	Halle (Saale)

Ausbildung

1985 - 1991	Polytechnische Oberschule „Frédéric Joliot-Curie“ in Halle (Saale)
1991 – 1997	„Südstadtgymnasium“ in Halle (Saale)
1998 – 2004	Studium der Humanmedizin an der „Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
24.11.2004	Approbation als Arzt
seit 12/2004	Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Neurologie der „Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg“

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle (Saale),

Danksagung

Ich möchte Herrn Professor S. Zierz, dem Direktor der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die freundliche Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Erstellung der Dissertation danken.

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

Weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Dr. M. Staeger für seine uneingeschränkte Unterstützung bei der Planung und Durchführung des methodischen Teils der Arbeit und die Möglichkeit, die ihm unterstehenden Laboreinrichtungen nutzen zu können.

Danken möchte ich Frau Volkmer, medizinisch technische Assistentin im o.g. Labor der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität für ihre große Unterstützung und Geduld bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Techniken insbesondere der Gen-Array-Technik.

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

Nicht vergessen möchte ich meine Familie und auf diesem Wege für ihre intensive Unterstützung und große Geduld, die sie für mich aufgebracht hat, danken.