

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

***Assoziation zwischen der Epstein-Barr Virus-Infektion
und der Multiplen Sklerose
im Kindes – und Jugendalter***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– *Aus der Medizinischen Fakultät* –

vorgelegt von

Sarah Magdalena Köllmann
aus Hamburg

Lübeck, 2007

- 1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Joachim Wagner**
- 2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Nitschke**

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2008
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.04.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

***Dreifach ist des Raumes Maß:
Rastlos fort ohn Unterlass
Strebt die Länge; fort ins Weite;
Endlos gießet sich die Breite;
Grundlos senkt die Tiefe sich.***

***Dir ein Bild sind sie gegeben:
Rastlos forwärts musst du streben,
Nie ermüdet stillestehn,
Willst Du die Vollendung sehn;
Musst ins Breite dich entfalten,
Soll sich dir die Welt gestalten;
In die Tiefe musst du steigen,
Soll sich dir das Wesen zeigen.***

***Nur Beharrung führt zum Ziel,
Nur die Fülle führt zur Klarheit,
Und im Abgrund wohnt die Wahrheit.***

- Friedrich von Schiller -

Inhaltsübersicht

1.	Einleitung	1
1.1	Das Epstein-Barr Virus.....	2
1.2	EBV-assoziierte Erkrankungen.....	8
1.2.1	Infektiöse Mononukleose.....	8
1.2.2	Orale Haarleukoplakie.....	9
1.2.3	Burkitt-Lymphom (BL).....	10
1.2.4	Morbus Hodgkin.....	10
1.2.5	Nasopharynxkarzinom (NPC).....	11
1.2.6	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (PTLD).....	11
1.3	Epidemiologie, Krankheitsbild und Differentialdiagnosen der Multiplen Sklerose.....	12
1.4	Therapeutische Möglichkeiten bei Multipler Sklerose.....	21
1.5	Ätiologie der Multiplen Sklerose und Assoziation mit dem Epstein-Barr Virus.....	26
1.6.	Fragestellung.....	30
2.	Materialien, Patienten und Methoden	32
2.1	Materialien.....	32
2.2	Patienten.....	34
2.3	Gesunde Kontrollen.....	34
2.4	Methoden:.....	35
2.4.1	DNA-Isolierung aus Plasma.....	35
2.4.2	DNA Konzentrationsbestimmung.....	37
2.4.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.4.4	Real-time quantitative (RQ) PCR.....	37
2.4.5	PCR Protokoll.....	39
2.4.6	Serodiagnostik EBV-spezifischer Antikörper.....	40
2.4.7	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay).....	42
2.4.8	ELISA Protokoll für EBV-Antikörper.....	43
2.4.9	Testauswertung des Biotests ELISA.....	44
2.4.10	ELISA Protokoll für Antikörper von HSV, VZV und CMV.....	46
2.4.11	Auswertung der Analysenergebnisse.....	47
2.4.12	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	47

3.	Ergebnisse	49
3.1	Zur Serologie der EBV-spezifischen Antikörper bei den MS Patienten.....	49
3.2	Zur Serologie der EBV-spezifischen Antikörper der Kontrollgruppe.....	51
3.3	Zur Serologie weiterer Herpesviridae der MS-Patienten.....	52
3.4	Zur Serologie weiterer Herpesviridae der Kontrollgruppe.....	52
3.5	PCR Ergebnis	52
4.	Diskussion	54
5.	Zusammenfassung	64
6.	Abkürzungsverzeichnis	65
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	67
8.	Literaturverzeichnis	68
9.	Anhang	82
9.1	Danksagung	82
9.2	Curriculum Vitae.....	83
9.3	Publikationen und Kongressbeiträge.....	86

1. Einleitung

Schon seit seiner Entdeckung 1964 wurde das Epstein-Barr Virus (EBV) wie kaum ein anderes Virus erforscht und untersucht, sodass wir heute tiefe Einblicke in dessen biologisches Verhalten und seine molekulare Strukturen besitzen. Großes Interesse erweckten einerseits die onkogene Potenz dieses Virus und andererseits die Abwehrstrategien des Menschen, der sein eigentlicher Wirt ist.

In den letzten Jahrzehnten eröffnete uns der medizinische Fortschritt zudem ein detailliertes Wissen über das menschliche Immunsystem und dessen mögliche Störungen. All dieses bietet eine breite Grundlage, die vielfältigen Infektionsmanifestationsformen, die das Epstein-Barr Virus imstande ist, auszulösen, besser verstehen zu können.

Seit geraumer Zeit werden auch Autoimmunerkrankungen mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert, darunter auch die „Enzephalomyelitis Disseminata“, bekannt als Multiple Sklerose (MS).

Warum gerade die Assoziation zu dieser Krankheit immer mehr an Interesse gewinnt zu einer Zeit, in der trotz intensiver Forschung die Ätiologie dieser Entmarkungserkrankung des zentralen Nervensystems noch immer ungeklärt ist, soll zum einen Gegenstand der vorliegenden Arbeit werden.

Dabei soll der Kernfrage nachgegangen werden, ob eine Assoziation von EBV und Multipler Sklerose im Kindes- und Jugendalter ebenso gefunden werden kann, wie Studien an erwachsenen MS-Patienten schon aufzeigen konnten.

So wird im ersten Teil der Arbeit zunächst auf die Biologie des Epstein-Barr Virus eingegangen und darauf folgend ein Einblick in das Spektrum EBV-assoziiierter Infektionsmanifestationen und maligner Erkrankungen gegeben. Anschließend werden die Erkrankung „Multiple Sklerose“, ihre Differentialdiagnosen im Kindesalter und die therapeutischen Möglichkeiten dargestellt.

Im praktischen Teil der Arbeit werden u.a. die von uns angewandte Methodik für die Erfassung der EBV-Serologie dargestellt und die Ergebnisse im anschließenden Ergebnisteil erläutert.

In der abschließenden Diskussion wird zu unseren Ergebnissen beurteilend Stellung genommen, deren Bedeutung für unsere Ausgangsfrage herausgearbeitet und mit dem Blick des derzeitigen Forschungsstandes betrachtet.

1.1 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV bzw. HHV4) entstammt dem Genus Lymphocryptovirus und ist innerhalb der Familie der Herpesviridae ebenso der Subfamilie der Gammaherpesvirinae zuzuordnen wie das Varizella-Zoster-Virus (VZV bzw. HHV3), das Zytomegalievirus (CMV bzw. HHV5), das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) und Typ 2 (HSV2), das Humane Herpesvirus Typ 6 (HHV6), Typ 7 (HHV7) und Typ 8 (HHV8).

Das EBV-Virus gehört zu den am weitesten verbreiteten humanpathogenen Viren: Es infiziert über 90% der Menschen und führt zu einer lebenslang persistierenden Infektion im menschlichen Organismus.

Nachgewiesen wurde das Virus erstmalig 1964 von M. Epstein, B.G. Achong und Y.M. Barr, denen es gelang, sog. Burkitt-Lymphom-Zellkulturen zu etablieren (Epstein und Barr, 1964) und durch elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Zelllinie herpesvirus-ähnliche Partikel in der Zellsuspension nachzuweisen (Epstein et al., 1964), welche sich biologisch von den bisher bekannten Mitgliedern der humanen Herpesvirusfamilie unterscheiden ließen.

Dass es sich bei diesen Partikeln um ein neuartiges Virus handelte, fiel dem Ehepaar Henle (Henle und Henle, 1966) bei dem erfolglosen Versuch auf, das Virus mit bis dahin bekannten Nachweisverfahren für bereits bekannte Herpesviren zu identifizieren. Mit der Entwicklung des sog. „Henle Tests“ (eines indirekt gegen die Viruspartikel gerichteten Immunfluoreszenztests) konnten sie dann belegen, dass es sich hier um ein neues Virus aus der Herpesgruppe handelte, welches nach seinen Erstbeschreibern von nun an „Epstein-Barr Virus“ benannt wurde.

Der Weg, der zu dieser bahnbrechenden Entdeckung des Virus führte, geht über den englischen Chirurgen Denis Burkitt, der als Missionsarzt in Uganda, Ostafrika, Ende 1950 begann, einen lymphosarkomatösen Tumor des Gesichts- und Halsbereiches, welcher gehäuft bei Kindern in Äquatorialafrika auftrat, eingehender auf Ätiologie und Epidemiologie hin zu untersuchen. Das in jahreszeitlicher Abhängigkeit gehäufte Auftreten des Tumors in feucht-warmen Gebieten sowie die dort ebenfalls regelmäßig auftretenden Infektionen, wie Gelbfieber und Malaria, ließen ätiologisch eine durch Vektorübertragung in Gang gesetzte infektiöse Genese dieses Tumors vermuten, der dem Lymphgewebe entspringt und heute nach seinem Erstbeschreiber „Burkitt-Lymphom“ genannt wird (Burkitt, 1958; Burkitt, 1962).

Mit der hier beschriebenen Entdeckung wurde das Epstein-Barr Virus damit zum ersten bekannten, mit einem menschlichen Malignom assoziierten Virus.

Seroepidemiologische Studien konnten bereits kurze Zeit nach dem Viruserst-

nachweis eine weltweite Verbreitung des Virus aufzeigen, wobei die Primärinfektion mit dem Virus im frühen Kindesalter zumeist klinisch asymptomatisch verläuft oder mit uncharakteristischen Symptomen einhergeht.

Bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen manifestiert sich eine Primärinfektion jedoch häufig mit dem klinischen Bild einer infektiösen Mononukleose (IM), einer selbst limitierenden lymphoproliferativen Erkrankung, die durch Fieber, Lymphknotenschwellung und Tonsillopharyngitis charakterisiert ist (Cohen, 2000) und als deren Erreger 1968 von Henle et al. das Epstein-Barr Virus ausfindig gemacht werden konnte.

Wie auch andere Herpesviren setzt sich das Epstein-Barr Virus aus dem die Virus-DNA enthaltenden Proteinkern, dem ikosaederförmigen Nukleokapsid, welches aus 168 Kapsomeren besteht, einem sich zwischen Kapsid und Hülle (Envelope) befindlichen Proteintegument und dem mit Glykoprotein-Spikes (von denen gp350/220 das Hauptglykoprotein bildet) versehenen Envelope zusammen (Khan et al., 1995). Das Virus-Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNS mit ca. 172×10^3 Basenpaaren (bp), welche für über 100 virale Gene kodiert; wobei differenzierte Muster einer begrenzten Zahl exakt regulierter Gene während verschiedener Formen der viralen Latenz sowie des lytischen Zyklus *in vitro* und *in vivo* exprimiert werden (Cohen, 2000).

Zwei Terminal Repeats aus sich wiederholenden $0,5 \times 10^3$ bp-starken Sequenzen bilden die Endpunkte des DNA-Stranges. Vier Internal Repeats aus 3×10^3 bp-starken Wiederholungen unterteilen das Genom in kurze und lange so genannte „Unique Sequences“ (Middeldorp et al., 2003).

Die EBV-Infektion beim Menschen erfolgt in der Regel über den Speichel, wobei besonders intensiver Lippen- und Zungenkontakt eine wichtige Rolle spielt (daher auch der Begriff „Kissing Disease“). Das Virus gelangt dann in den Oropharynx, wo es zunächst undifferenzierte Zellen der Basal- und Zwischenschichten des Oro- und Nasopharyngealepithels und des Zungenrandes infiziert. Man nimmt an, dass es nach der primären Epithelzellinfektion sekundär zur Infektion gewebeinfiltrierender B-Lymphozyten kommt (Sixbey et al., 1984), dass das Virus möglicherweise aber auch in der Lage ist, direkt oropharyngeale B-Zellen zu infizieren (Niedobitek et al., 1997), wobei letzterer Infektionsmodus jedoch *in vivo* nicht ganz zuverlässig zu identifizieren ist (Kanegane et al., 2002).

Das Epstein-Barr Virus besitzt einen Zelltropismus, bei dem B-Lymphozyten das Hauptziel der EB-Viren bilden. CD21 reagiert hierbei als Zelloberflächenprotein in B-Lymphozyten und wird durch die Interaktion mit dem viralen Hüllprotein

gp350/220 des Virus zum EBV-Rezeptor. Als Co-Rezeptor fungiert ein weiteres Glykoprotein des Virus, das gp42 mit den HLA-Klasse 2 positiven B-Zellen (Young und Rickinson, 2004).

Nach Internalisation des Virus durch Endozytose in zytoplasmatische Vesikel und Fusion der viralen Hüllmembran kommt es zur Freisetzung des Nukleokapsids und des Proteintegumentes in das Zytoplasma des Wirts. In B-Lymphozyten führt EBV hauptsächlich zu einer sog. latenten (nicht-produzierenden) Infektion und damit zur lebenslangen Persistenz im menschlichen Organismus, wozu auch andere Herpesviren befähigt sind.

Die Folge ist eine Immortalisation (B-Zelltransformation), d.h. die Infektion führt zu permanent wachsenden, transformierten Zelllinien. Die Fähigkeit von EBV, B-Lymphozyten in eine lymphoblastoide Zelllinie (LCL) zu transformieren, stellt unter den humanpathogenen Herpesviren eine Einzigartigkeit dar (Young und Rickinson, 2004).

In den EBV-infizierten Epithelien bewirkt die Infektion zumeist einen lytischen (d.h. produktiven) Zellzyklus, wobei es im Verlauf bei Virusträgern wiederholt zu sekundären Virämien wie auch gelegentlichen Virusausscheidungen über den Speichel kommen kann. Hierbei ist unter einer „lytischen Infektion“ eine vollständige Virusreplikation zu verstehen, die eine kontinuierliche Infektion epithelialer Zellen durch Virusreplikation, Zelluntergang, Virusfreisetzung und Infektion neuer Zellen bewirkt (Sixbey et al., 1984).

Während dieser Zyklen werden zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche EBV-spezifische Antigene exprimiert. In allen latent oder lytisch infizierten Zellen wird der Epstein-Barr-nukleäre-Antigenkomplex (EBNA) gebildet. Mit Beginn des lytischen Zyklus werden Proteine des „Early“-Antigenkomplexes gebildet, die nach ihrem Methanol-/Äthanolfixierungsverhalten in eine diffuse (D) und restriktive (R) Komponente unterteilt werden können.

Im weiteren Verlauf des lytischen Zyklus kommt es zur Expression von Strukturantigenen, wie z.B. dem Viruskapsidantigen (VCA) und Membranantigenen (MA), worunter das zuvor genannte Hüllprotein gp 350/220 den Hauptbestandteil ausmacht (Rickinson und Kieff, 1996). Letzterem kommt aber für die serologische Diagnostik keine besondere Bedeutung zu.

Im Gegensatz zum lytischen Zyklus einer EBV-Infektion werden während der sog. latenten Phase nur bestimmte Regionen des Genoms repliziert. Sie dienen der Viruspersistenz in der entsprechend infizierten Zelle.

Bei einer latenten EBV-Infektion werden in Abhängigkeit des Genexpressionsmusters drei Latenzphasen (Latenz 1-3) unterschieden, welche mit verschiedenen

EBV-assoziierten malignen Erkrankungen korrelieren. EBNA1 ist dabei das einzige virale Protein, das in allen Latenzphasen nachweisbar ist.

Während einer primären Infektion wird von den EBV-infizierten B-Zellen im peripheren Blut und den lymphatischen Organen typischerweise eine Latenz vom Typ 3 exprimiert (Wagner et al., 1995), was bedeutet, dass vor allem *Epstein-Barr nukleäres Antigen* (EBNA) 1, 2, 3a, 3b, 3c, drei Membranantigene (*latent membrane proteins* LMP1, 2a, 2b), zwei kleine, nicht-kodierende RNAs (*Epstein-Barr encoded RNAs*, EBER1 und -2) sowie BARFO exprimiert werden. Nach der Rekonvaleszenz persistiert EBV lebenslang in den B-Lymphozyten des peripheren Blutes und exprimiert dann im Wesentlichen nur noch LMP2a und EBNA1 (Tierney et al., 1994).

Bei der Latenz Typ 3 als „Proliferationsprogramm“ bindet sich EBNA1 mit hoher Affinität an die DNA der Wirtszelle, interagiert dort mit dem Plasmiderhaltungssignal oriP und ist auf diese Weise für die Aufrechterhaltung von zirkulären EBV-Episomen in den infizierten Zellen verantwortlich (Cohen, 2000, Daikoku et al., 2004).

Das *latent membrane protein 1* (LMP1) führt dann wie eine ligandenunabhängige, aktivierte Form eines CD40-Moleküls zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors *NF-kB* sowie zur Zytokinproduktion und B-Zellproliferation (Liebowitz, 1998, Le Clorennec et al., 2006). LMP2a aktiviert die Signal-transduktionskaskade des B-Zellrezeptors der infizierten B-Zelle. Als Konsequenz dieser EBV-induzierten Lymphoproliferation bei der Latenz Typ 3 kommt es neben den latent infizierten B-Zellen in einem kleinen Teil der Zellen auch zu einer lytischen Replikation des Virus, nachweisbar als freie Virämie im Plasma (Gan et al., 1994).

Die EBV-transformierten B-Zellen und auch die Zellen, in denen EBV repliziert wurde, sind damit hochgradig immunogen und induzieren eine effektive T-Zell- und Natürliche Killer (NK)-Zellimmunität (Callan et al., 1998), wobei die Mehrzahl EBV-infizierter Zellen während der Rekonvaleszenz der Primärinfektion eliminiert wird.

Aufgrund geringer Unterschiede im EB-Virus-Genom konnte man bisher zwei EBV-Subtypen differenzieren, EBV-1 und -2. Trotz nur geringer genetischer Differenzen weisen die beiden Virusgruppen in Bezug auf geografische Verteilung, biologisches Verhalten und Gewebetropismus jedoch deutliche Unterschiede auf.

Während in den westlichen Industriestaaten Infektionen innerhalb der immunkompetenten Bevölkerung überwiegend auf EBV Typ 1 zurückzuführen sind, werden in Afrika beide EBV-Typen in ungefähr gleicher Häufigkeit vorgefunden. Das Typ 2 Virus gilt dabei als weniger aggressiv und seine Proliferations-induktionsfähigkeit

als zu gering, um lymphoproliferative Erkrankungen zu verursachen, denn auch wenn es im peripheren Blut Immunsupprimierter häufig nachzuweisen ist, werden 90% der sog. posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD) von Typ 1, die übrigen 10% ohne nachgewiesene EBV-Beteiligung verursacht (Frank et al., 1995).

Im Erwachsenenalter beträgt die Durchseuchungsrate des Epstein-Barr Virus weltweit über 95% (de Thé et al., 1975), wobei das Alter bei der Primärinfektion des EB-Virus abhängig vom sozioökonomischen Status ist. So tritt in Entwicklungsländern mit geringerem Hygiene- und Lebensstandard die EBV-Primärinfektion mehrheitlich in den ersten drei Lebensjahren auf und verläuft meist asymptomatisch oder als unspezifischer Infekt der oberen Atemwege. In den westlichen Industriegesellschaften hingegen verlagert sich die Primärinfektion häufig in die Adoleszenz mit stärkerer Immunantwort des Wirtes, wo es bei etwa 50% der Spätinfizierten zu dem Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose kommt (Henle und Henle, 1970; Munch et al., 1997).

Nachfolgende Abbildung 1 stellt die primäre und persistierende EBV-Infektion grafisch dar:

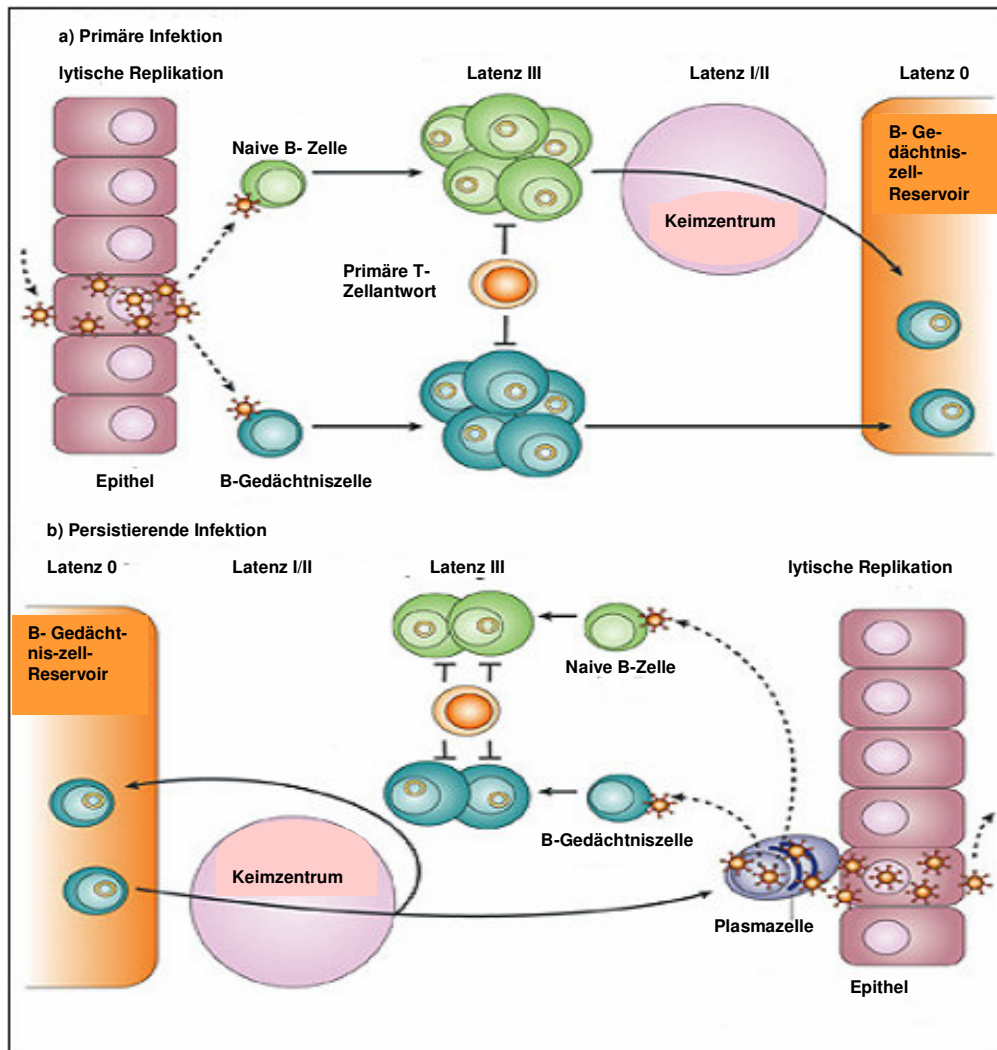


Abbildung 1. Darstellung der mutmaßlichen *in vivo* Interaktion zwischen dem Epstein-Barr Virus und seiner Wirtszelle (modifiziert nach Young und Rickinson, 2004)

- a) Primäre Infektion: Nach Eindringen des Virus in das Epithel, anschließender Ausbreitung, Interaktion mit B-Zellen und erster T-Zellantwort kommt es zur Expression der Latenz 3 in naiven B-Zellen. In den infizierten EBV-positiven B-Gedächtniszellen wird im Falle der Unterdrückung der viralen Genexpression von einer Latenz 0 des Virus gesprochen.
- b) Persistierende Infektion: Nach Rekrutierung im Keimzentrum und Interaktion werden verschiedene Latenzprogramme des Virus aktiviert. In B-Gedächtniszellen wird das Virus entweder der T-Zellantwort ausgeliefert oder es dringt mit den infizierten Plasmazellen in die Mukosa des Oropharynx ein, in der lytische Replikationen des Virus in Gang gesetzt werden und von der erneut freie Virämien ausgehen können.

1.2 EBV-assoziierte Erkrankungen

1.2.1 Infektiöse Mononukleose

Die Infektiöse Mononukleose (IM) ist das typische Erscheinungsbild einer EBV-Primärinfektion in der Adoleszenz und im frühen Erwachsenenalter. Sie manifestiert sich in der Regel nach einer ca. zwei- bis fünfwöchigen Inkubationszeit und ist im Prodromalstadium charakterisiert durch unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Appetitlosigkeit und hohes re- oder intermittierendes Fieber für wenige Tage bis zwei Wochen. Die IM ist oft gekennzeichnet durch Halslymphknotenschwellungen, besonders der Hals-, Kieferwinkel-, sowie der Nackenlymphknoten. In 70 bis 90% der Fälle kann es auch initial zu einer fibrinösen Tonsillopharyngitis kommen, die meist jedoch in der zweiten Woche rasch abheilt (Miller, 1990). Bei 50-60% der Patienten findet sich in der zweiten und dritten Woche der Krankheit eine Splenomegalie. Seltener Symptome einer IM sind Hepatitis sowie ein flüchtiges morbilliformes Exanthem. In 2,5-5% der Fälle treten als schwerwiegende Komplikationen auf: Milzruptur, hämolytische und aplastische Anämie, Thrombozytopenie und neurologische Affektionen, wie u.a. das Guillain-Barré-Syndrom und Meningoenzephalitiden (Schuster und Kreth 2001).

Bei gehäuftem Auftreten der Krankheit bei Kindern und Jugendlichen im Alter zwischen fünf und sechzehn Jahren hatte schon 1889 der deutsche Pädiater Dr. Emil Pfeiffer nur günstige Verläufe beobachten können. Die meisten Patienten mit IM haben eine nachweisbare Leukozytose mit einem 40-90%igen Anteil mononukleärer Zellen und ca. 10% atypischer Lymphozyten (nach Dr. Emil Pfeiffer benannte sog. „Pfeiffer Zellen“). Letztere sind in erster Linie zytotoxische T-Lymphozyten, die sich gegen EBV-infizierte Zellen richten. Die meisten Symptome der Infektiösen Mononukleose werden auf die Proliferation und Aktivierung dieser T-Lymphozyten als Antwort auf die EBV-Infektion zurückgeführt. Des Weiteren führt die Aktivierung von B-Lymphozyten durch EBV zu einer poliklonalen Ausschüttung heterophiler Antikörper (HA) und in einigen Fällen zu einem Anstieg von Kälteagglutininen, Kryoglobulinen, antinukleärer Antikörper oder des Rheumafaktors (Cohen 2000).

In der Regel sind im Frühstadium einer IM Antikörper gegen VCA-IgM-, IgG- und -IgA nachweisbar. Während das anti-VCA-IgM in der Regel nach zwei bis vier Monaten nicht mehr nachweisbar ist, bleibt das VCA-IgG als lebenslanger Indikator einer durchgemachten EBV-Infektion bestehen (sog. „Serumnarbe“).

Neben den akuten Verläufen der IM spricht man von einer Chronizität der Krankheit, wenn die Symptome länger als ein Jahr andauern.

Die chronisch aktive EBV-Infektion ist ein schweres, aber insgesamt seltenes Krank-

heitsbild, von dem meist Kinder und Jugendliche betroffen sind. Von einer anfänglichen akuten infektiösen Mononukleose ausgehend, entwickelt sich ein Krankheitsbild mit einer chronisch oder rezidivierend ausgeprägten Mononukleosesymptomatik mit Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, immer wiederkehrenden Episoden von persistierenden oder aufflackernden subfebrilen Temperaturen, Neuromyasthenien mit Kopfschmerzen, Übelkeit, Niedergeschlagenheit und dem sog. Chronic fatigue syndrom (CFS) (Schuster und Kreth, 1992). Häufig kommt es auch zur Panzytopenie und Hypergammaglobulinämie.

Wichtig ist, die Diagnose entsprechend abzusichern, da es weitere Erkrankungen aus dem rheumatischen oder endokrinologischen Formenkreis auszuschließen gilt. Ebenso besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner B- und T-Zell-Lymphome.

EBV-assoziierte Erkrankungen bei Immundefizienz

1.2.2 Orale Haarleukoplakie

Ein EBV-assoziiertes Krankheitsbild, welches in erster Linie Patienten betrifft, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, ist die orale Haarleukoplakie (OHL), eine benigne Epithelläsion der oralen Mukosa, speziell des lateralen Zungenrandes. Dort kommt es zu einer Hyperplasie des Plattenepithels, welches durch vorstehende weißliche Auflagerungen imponiert und durch eine EBV-induzierte gestörte Zelldifferenzierung bedingt ist. EBV-DNA und Antigene des lytischen Zyklus können regelhaft in den oberen keratinisierten Epithelzellen innerhalb der Läsion nachgewiesen werden (Greenspan et al., 1985, Walling et al., 2004).

Die auch unter AIDS auftretenden Lymphome kann man mindestens in zwei Formen einteilen; ein Burkitt-Lymphom-ähnliches und ein im Englischen als „large cellular lymphoma“ benanntes Lymphom, wobei letzteres rasch zum Tode führt. Die Häufigkeit einer EBV-Assoziation dieser Lymphome wird mit 35-50% angegeben (Young und Rickinson, 2004), im Falle einer cerebralen Lokalisation sogar mit nahezu 100%.

EBV-assoziierte Neoplasien

Um von einer EBV-assoziierten Neoplasie sprechen zu können, müssen nach Niedobitek et al. (1993) folgende Kriterien erfüllt sein:

1) Entweder der Nachweis von viralen Genomen in DNS-Extrakten in Verbindung mit Zeichen der Monoklonalität dieser viralen Genome oder 2) eindeutige morphologische Demonstrationen viraler Genome und/oder deren determinierter Produkte in den Tu-

morzellpopulationen.

1.2.3 Burkitt-Lymphom (BL)

Das hochmaligne, monoklonale B-Zell-Lymphom wurde zuerst von Denis Burkitt beschrieben, der diese Tumorart in Äquatorialafrika beobachtete. Die in Zentralafrika und Neu-Guinea vorkommende endemische Form des Burkitt-Lymphoms (BL) ist in 95% der Fälle mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert (Young und Rickinson, 2004). Neben der endemischen Form des Burkitt-Lymphoms sind heute das sporadische BL und das AIDS-assoziierte Burkitt-Lymphom bekannt, welche in lediglich 15% mit EBV assoziiert sind (Young und Rickinson, 2004). Das endemische Burkitt-Lymphom tritt vorwiegend in der Kindheit auf und befällt meist extranodale Areale wie den Ober- bzw. Unterkieferknochen, die Orbita oder das ZNS. Es zeichnet sich durch ein schnelles progressives Wachstum aus und kann in kurzer Zeit zu massiven Gesichtsentstellungen und Orbitaaffektionen führen.

Die sporadische und die AIDS-assoziierte Form des Burkitt-Lymphoms präsentieren sich zumeist als Abdominaltumoren und unterscheiden sich darüber hinaus vor allem hinsichtlich der Frequenz ihrer EBV-Assoziation (Young und Rickinson, 2004).

Welche pathogenetische Rolle EBV jedoch in der Tumorentstehung spielt, ist letztlich nicht vollständig geklärt (Young und Rickinson, 2004). Es wird jedoch von einer Mehrschritt-Theorie ausgegangen, wobei allen Formen des Burkitt-Lymphoms der letzte Schritt in der Tumorentstehung gemeinsam ist, nämlich die reziproke Translokation des distalen Anteils von Chromosom 8 nahe der *c-myc*-Region auf das Chromosom 14, seltener auch auf die Chromosomen 2 oder 22.

1.2.4 Morbus Hodgkin

Das Hodgkin-Lymphom tritt gehäuft in der westlichen Welt auf, in der es an malignen Lymphomen den größten Anteil hat. Die Altersverteilung der an Morbus Hodgkin erkrankten Personen verläuft zweigipflig mit einem ersten Gipfel der Inzidenz zwischen 25 und 30 Jahren und einem zweiten über das 45. Lebensjahr hinaus. Histologisches Kriterium für die Diagnose M. Hodgkin ist eine zerstörte Lymphknotenarchitektur und das Auftreten von mononukleären Hodgkin- bzw. mehrkernigen Sternberg-Reed-Zellen, welche die eigentlich malignen Zellen darstellen, jedoch nur einen geringen Teil der Tumormasse ausmachen. Diese wird zu über 98% von infiltrierenden nicht-malignen, hauptsächlich CD4+ T-Lymphozyten bestimmt (Rickinson und Kieff, 1996). Histologisch werden vier verschiedene Subtypen des Morbus Hodgkin unterschieden: die nodulär sklerosierende, die lymphozytenreiche und die lymphozytenarme Form sowie die Form der gemischten Zellularität. Es konnte aufgezeigt werden, dass Patien-

ten mit durchgemachter Infektiöser Mononukleose ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko aufweisen, ein Hodgkin-Lymphom zu entwickeln (Munoz et al., 1978, Hjalgrim et al., 2003).

Untermauert wurde die Assoziation von EBV mit dem M. Hodgkin durch die Entdeckung monoklonaler EBV-DNA in Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen (Weiss et al., 1987).

Insgesamt sind etwa 40-60% der Hodgkin-Lymphome mit EBV assoziiert, wobei der Mischtyp in etwa 60-70% der Fälle EBV-Marker aufweist, der nodulär sklerosierende Typ in etwa 40% und der lymphozytenreiche Subtyp nur sehr selten (Weiss et al., 1987; Weiss et al., 1998; Kanegane et al., 2002).

1.2.5 Nasopharynxkarzinom (NPC)

Das Nasopharynxkarzinom (NPC) lässt sich in drei verschiedene Typen einteilen und tritt gehäuft in Südostasien, insbesondere Südchina, in Nordafrika und unter den Eskimos in Alaska auf. Das NPC nimmt seinen Ausgang von den epithelialen Zellen des Nasen-Rachenraumes, ist in seiner wenig differenzierten bis anaplastischen Form das am häufigsten auftretende NPC und in nahezu 100% mit EBV assoziiert (Cohen, 2000).

Das NPC wächst polypoid oder exophytisch, manchmal ulzerierend bzw. diffus infiltrierend und metastasiert relativ früh in die oberen zervikalen Lymphknoten. Obwohl die Inzidenz des NPC große geografische Unterschiede aufweist, konnten keine Zusammenhänge zwischen der EBV-Assoziation und der geografischen Verteilung gefunden werden, wie es beim Burkitt-Lymphom der Fall ist, bei welchem die EBV-Assoziation auf die Regionen beschränkt ist, in denen es endemisch vorkommt.

Patienten mit Nasopharynxkarzinom zeigen erhöhte EBV-IgG-Antikörper gegen virale Strukturantigene, wie dem VCA oder EA, außerdem finden sich bei diesen Patienten Antikörper gegen VCA und EA der IgA-Klasse, die nach erfolgreicher Behandlung des Karzinoms wieder deutlich abfallen. Aus diesem Grunde wird die Messung EBV-spezifischer IgA-Antikörper als Screening zur NPC-Früherkennung und therapeutischer Verlaufsbeobachtung in Endemgebieten angewendet (Tsu et al., 2007).

1.2.6 Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (PTLD)

Unter dem Begriff lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (posttransplant lymphoproliferative disease, PTLD) wird eine Familie mehrheitlich EBV-induzierter lymphoider Tumore subsumiert, die von einer benignen B-Zell-Hyperplasie bis zu einem malignem Lymphom reicht und die durch iatrogene Immunsuppression nach Organtransplantation hervorgerufen wird.

Klinisch manifestiert sich die PTLD als IM-ähnliche Erkrankung, als fieberhafte Erkrankung mit Leukopenie, als lokalisiertes Lymphom, welches vor allem den Gastrointestinaltrakt, das ZNS oder das transplantierte Organ betrifft, oder als fulminante, disseminierte Erkrankung. Ebenso vermag eine PTLD eine Transplantatabstoßung vorzutäuschen, was zu einer Intensivierung der Immunsuppression führt, während das Gegenteil vonnöten wäre (Nalesnik, 2002).

Insgesamt ist die Diagnose einer PTLD schwierig, sie stützt sich auf das klinische Bild und wird durch die histopathologische Begutachtung von Gewebebiopsien gesichert, wobei suspekter Lymphknoten *in toto* exstirpiert werden. Auch hat die EBV-Serologie bei der Diagnosefindung nur geringe Bedeutung, da die Antikörperbildung bei der Immunsuppression der Patienten alteriert und verzögert ist.

Mehrere Studien zeigten mit Hilfe konventioneller, semiquantitativer PCR-Verfahren einen Anstieg von EBV-DNA im peripheren Blut bei Beginn einer PTLD als diagnostisch wertvollen Hinweis für die Diagnose einer PTLD (Baldanti et al., 2000, Gaeta et al., 2006).

Neben der genannten Auswahl von EBV-assoziierten Infektionsmanifestationsformen und malignen Erkrankungen werden auch Assoziationen des EBV mit Autoimmunerkrankungen diskutiert, wie z.B. mit der rheumatoiden Arthritis (Sawada und Takei, 2005), dem systemischen Lupus Erythematoses (Gross et al., 2005), der Autoimmunhepatitis (Vento et al., 1995) oder der multiplen Sklerose (Ascherio et al., 2001), auf deren Assoziation mit EBV im Folgenden eingegangen werden soll.

1.3 Epidemiologie, Krankheitsbild und Differentialdiagnosen der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) die auch als Polysklerose, Enzephalomyelitis disseminata oder Sclerosis multiplex bezeichnet wird, gehört zu den Entmarkungsenzephalomyelitiden und ist zumindest in unseren Breiten eine der häufigsten und zugleich schwersten organischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems, welche vorwiegend die weiße Substanz von Gehirn und Rückenmark betrifft (Schmidt, 1992; Steinbrecher et al., 1995). Die Zahl der Neuerkrankungen für Deutschland beträgt 4-8/100.000 (Kesselring, 2005).

Die Prävalenz der MS-Erkrankung variiert signifikant in verschiedenen geographischen Regionen der Welt von 0,8-10/100.000 Personen in Japan (Houzen et al., 2003) bis hin zu 248/100.000 Personen im Westen Kanadas (Pugliatti et al., 2002; Banwell, 2004). In Deutschland liegt die Prävalenz zwischen 50 und 100/100.000

(Steinbrecher et al., 1995), es kann somit in Deutschland von einer hohen Prävalenz gesprochen werden, da sie über 30/100.000 liegt. Von einer mittleren Prävalenz würde man ausgehen bei 10-30 Fällen/100.000 Einwohner, unter 5/100.000 gilt nach Kurtzke et al. (2000) ein Gebiet als Gebiet mit geringem Risiko.

Epidemiologisch kann ein deutliches Nord-Süd-Gefälle mit hohem Erkrankungsrisiko im Norden Europas (sog. "Nord-Äquator-Gefälle"), in Nordamerika oberhalb des 37. Breitengrades, Kanada, im südlichen Australien und in Neuseeland beschrieben werden. Als „medium risk regions“ gelten die Gebiete Südeuropas, die südlichen Vereinigten Staaten und Nordaustralien, zu den sog. „low risk areas“ gehören Asien, Teile Südamerikas und Afrikas, vor allem um den Äquator (Sadovnick und Ebers, 1993; Heckl, 1994; Banwell, 2004). Zu berücksichtigen ist aber, dass die Einteilung der Risikogebiete auch innerhalb der geografischen Regionen sehr schwanken mag (Bauer et al., 1987), was anhand epidemiologischer Daten von dicht beieinander liegenden Gebieten, wie Sizilien und Malta, verdeutlicht werden konnte (Vassallo et al., 1979; Dean et al., 1979).

Anhand von Migrationsstudien konnte aufgezeigt werden, dass Immigranten, die während ihrer Kindheit in Gebiete mit hohem Risiko immigrierten, das MS-Risiko der neuen Heimat annahmen und nicht das ihres Herkunftslandes beibehielten. Ebenso verhielt es sich in umgekehrter Situation: d.h. dass Einwanderer aus risikoarmen Zonen einen anhaltenden Schutz gegenüber der Erkrankung in Risikogebieten besaßen, vorausgesetzt sie immigrierten nach der Pubertät (Schmidt, 1992; Sadovnick und Ebers, 1993; Casetta und Granieri, 2000).

Diese epidemiologischen Daten mögen verdeutlichen, dass mögliche Expositionen gegenüber pathogenen Umweltfaktoren in einer immunologisch vulnerablen Phase des Lebens, also in früher Kindheit vor Beginn der Pubertät, für eine spätere Manifestation der MS-Erkrankung entscheidend sein könnten.

Die MS-Erkrankung manifestiert sich zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr mit einem Überwiegen des weiblichen Geschlechts. (Greenfield und Norman, 1971; Bray et al., 1983; Duquette et al., 1987). Banwell (2004) gibt nach dem "Canadian Collaborative Project on Genetic Susceptibility to MS" ein Verhältnis für w:m von 2,54:1 an, Renoux et al. (2007) sprechen von 2,8:1,8. Männliche Personen scheinen auch in der Regel ein bis zwei Jahre später zu erkranken, haben aber eine erhöhte Tendenz für einen progressiveren Verlauf der Erkrankung (Ebers, 1986; Weinshenker und Ebers, 1987; Heckl, 1994). Frauen hingegen haben bei frühem Krankheitsbeginn und guter Rückbildungstendenz der Schübe eine sehr günstige Prognose.

Es ist seit den Erstbeschreibungen der Krankheit bekannt, dass die Multiple Sklerose im Erwachsenenalter primär schubförmig remittierend (sog. Relapsing-remitting-MS; RR-MS) auftritt, Banwell (2004) spricht von 90% der erwachsenen Erkrankten, die den Verlauf einer RR-MS durchmachen. Später kann die Erkrankung einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf annehmen. Die Intervalle zwischen den einzelnen Krankheitsschüben können stark variieren. Der klinischen Erstmanifestation mit meist guter Rückbildungstendenz folgt bei 25-50% der Patienten innerhalb eines Jahres ein erneuter Schub, bei 60-70% innerhalb von drei Jahren (Steinbrecher et al., 1995).

Ursache der Krankheitsschübe sind die in herdförmiger Verteilung sich auflösenden Markscheiden, wobei die daraus folgenden Funktionsstörungen der Axone zu einer veränderten Nervenleitgeschwindigkeit führen.

J.M. Charcot beschrieb erstmals (1868) die nach ihm benannte „Charcot-Trias“ dieses Krankheitsbildes: Nystagmus – skandierendes Sprechen – Intentionstremor, - wobei die Symptome selten isoliert beobachtet werden und dem vielfältigen klinischen Bild der Multiplen Sklerose nicht ausreichend gerecht werden.

Neben diesen genannten zerebellären Symptomen verursachen die disseminierten Entmarkungsherde v.a. auch zentrale Paresen, Sensibilitätsstörungen, die sich häufig mit für einige Tage andauernden Parästhesien, Hypo- oder Hyperästhesien äußern, und Bewegungsstörungen, die vor allem durch Schwäche einzelner Muskelgruppen charakterisiert sind und aus den Läsionen der Pyramidenbahn und des Kleinhirns resultieren. Gerade in der Frühphase der Erkrankung kommt es zu Optikusläsionen, bedingt durch eine Neuritis nervi optici (Retrobulbärneuritis), die für die Frühdiagnostik eine wichtige Rolle spielt. Auch Ataxie, Dysarthrie, Sexualstörungen, Sphinkterinsuffizienz oder Harninkontinenz gehören zum klinischen Spektrum, also vielfältige, auch psychopathologische Symptome. Schließlich, und nicht zu unterschätzen, prägen auch psychosomatische Aspekte das klinische Bild der Multiplen Sklerose (Heckl, 1994; Steinbrecher et al., 1995; Kesselring, 2005).

Die Diagnose Multiple Sklerose wird klinisch gestellt und erfordert 1.) Befunde, die sich mindestens zwei örtlich voneinander getrennten Läsionen des ZNS zuordnen lassen, sowie 2.) den Nachweis mindestens zwei zeitlich voneinander abgesetzter Schübe (RR-MS), oder einen mindestens ein Jahr anhaltenden schleichend progredienten Verlauf (CP-MS). Sind diese Kriterien erfüllt, so kann insbesondere bei jüngeren Menschen von einer Multiplen Sklerose ausgegangen werden (Steinbrecher et al., 1995). Nach den diagnostischen Kriterien von Poser et al. lässt sich die Diagnose häufig erst im Verlauf stellen (Poser et al., 1983).

Richtungweisend für die Diagnostik der Multiplen Sklerose mittels Magnetresonanztomographie (MRT) sind die multilokulären Plaque-Läsionen des ZNS, welche die eigentlichen Entmarkungsherde darstellen und vorwiegend periventrikulär, zerebellär, im Hirnstamm und im Myelon nachzuweisen sind. Des Weiteren hat große diagnostische Bedeutung ein typischer Liquorbefund mit Erhöhung der Zellzahl, wobei es sich in ca. 90% um Lymphozyten (vorwiegend T-Lymphozyten) handelt. Hinzu kommt eine Immunglobulinvermehrung bei vorwiegendem Anstieg der intrathekalen IgG-Produktion (Miller, 1998), einschließlich nachweisbarer oligoklonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung. Diese oligoklonalen Banden (Subfraktionen der γ -Globuline) sind nicht spezifisch für die Multiple Sklerose, sondern finden sich auch bei chronischen Infektionen des ZNS. Sie werden jedoch im Frühstadium der MS als prognostisch ungünstig gewertet. Auch nach Abklingen eines MS-Schubes bleiben die oligoklonalen Banden im Liquor noch nachweisbar (Kesselring, 2005). Die Präsenz der oligoklonalen Banden im Liquor und zusätzlich ein mono- oder multifokaler klinischer MRT-Befund gestatten es, nach den Poser-Diagnose-Kriterien eine „laborunterstützte sichere MS“ zu diagnostizieren (Poser et al., 1983). Nach den McDonald-Kriterien gilt ein positiver Liquorbefund mit zusätzlich positivem MRT und dem Nachweis eines klinischen Schubes als sichere Diagnose (McDonald et al., 2001).

Vorrangigen Stellenwert gerade im Initialstadium der Multiplen Sklerose hat das MRT-Verfahren, das zugleich die sensitivste Zusatzuntersuchung für die Diagnostik ist. Bedeutsam ist, dass es im Gegensatz zu unspezifischen EEG-Veränderungen, die sich meist erst im Verlauf der Multiplen Sklerose einstellen, vom Erkrankungsbeginn an pathologische Befunde darstellt und sich mittels des MRT auch frische von älteren Plaques unterscheiden lassen können (Kesselring, 2005).

Während der Multiplen Sklerose in der Erwachsenenneurologie eine der in Deutschland hohen Prävalenz entsprechend hohe Aufmerksamkeit zukommt, so gilt sie doch als relative Rarität im Kindesalter (Low und Carter, 1956; van der Knaap und Valk, 1995). Lange wurde die Erkrankung im Kindes- und Jugendalter unterschätzt. Heute gewinnt sie jedoch immer mehr an Beachtung, insbesondere auch durch die Tatsache, dass sich die Erkrankung mit steigender Tendenz schon im Kindes- und Jugendalter manifestiert (Banwell, 2004).

Erste Veröffentlichungen über die Multiple Sklerose im Kindesalter finden sich bereits 1896 von Oppenheim. Nobel berichtet 1912 von einem Kind, welches unter Spastik, Ataxie und Atrophie des N. Optikus litt und im Alter von 2 ½ Jahren verstarb. Autoptisch wurde dann die Diagnose einer akuten Multiplen Sklerose gestellt

(Nobel, 1912). Dieses Kind galt lange als jüngster bekannter Patient. Später berichteten auch Hauser et al. (1982) von einem zweijährigen Kind bei Diagnosestellung der MS.

Erste umfangreichere Beschreibungen von kindlichen MS-Erkrankungsfällen stammen aus den Jahren 1949 von Müller und 1956 von Low und Carter. Letztere beschrieben sieben Fälle von kindlicher MS.

1985 bezifferten Matthews und wenig später Wakei et al. (1994) die Häufigkeit der Erstmanifestation der Multiplen Sklerose vor dem zehnten Lebensjahr mit 0,3 Prozent. Tardieu und Mikaeloff sprechen von 2,7-4,4% aller MS-Erkrankungen, die sich im Kindes- und Jugendalter manifestieren, wobei die Erstmanifestationsrate unter zehn Jahren bei 0,2-1,6% liegt (Tardieu und Mikaeloff, 2004).

Duquette et al. (1987) sprechen von 5% aller MS-Patienten, die ihren ersten klinischen Krankheitsschub vor dem sechzehnten Lebensjahr erleiden.

Der Frage nach altersgebundenen Besonderheiten im Verlauf der MS-Erkrankung gingen Duquette et al. (1987) nach, die anhand eines Kollektivs von 125 an Multipler Sklerose erkrankten Kindern mit Krankheitsbeginn unter 16 Jahren von einem dominierenden benignen Verlauf der Erkrankung berichten konnten.

Zu einem anderen Ergebnis hingegen waren Sheremata et al. (1981) gekommen, die anhand von zwölf pädiatrischen MS-Patienten (Altersmedian 9,5 Jahre) von äußerst ungünstigen prognostischen Verläufen berichteten. Ebenso wie Weigel (1974), die eine Mortalität von 20% für kindliche Verlaufsformen der MS angab, da es vor allem bei Kindern häufiger zu sehr akuten Verläufen, verbunden mit Fieber, Bewusstseinstörungen und Krampfanfällen kommt.

Tardieu und Mikaeloff (2004) berichten, dass die große Mehrheit der pädiatrischen MS-Fälle die RR-MS Form erleidet und diese mit einer günstigen Prognose einhergeht. Weniger als 3% erkranken an der primär progressive Form (CP-MS), wobei jedoch 23% innerhalb eines Jahres ihren zweiten Schub erleiden. Die Gefahr, später eine sekundär progressive Form zu entwickeln, erscheint gering bei der „early onset“ MS (sog. EOMS mit Krankheitsausbruch vor dem 16. Lebensjahr).

Noseworthy et al. (2000) sprechen von 70% der erwachsenen MS-Erkrankten, die zwar initial eine RR-MS Form entwickeln und meist auch körperliche Behinderungen erleiden, die Krankheit aber selten während des späteren Verlaufs in die sekundär-progressive MS-Form übergeht. Simone et al., (2002) berichten von schlechten prognostischen Aussichten bei einem Krankheitsausbruch nach dem 14. Lebensjahr (sog. late onset MS). Nach Ghezzi et al. (2005) sind eine hohe Schubrate, kurze Intervalle zwischen erstem und zweitem Schub und hohe körper-

liche Behinderung nach dem ersten Jahr der Erkrankung sehr schlechte Prognosefaktoren.

Weitestgehend übereinstimmend wird in der Literatur berichtet, dass auch im Kindes- und Jugendalter das weibliche Geschlecht überwiegt (Duquette et al., 1987, Renoux et al., 2007). Es wird von Geschlechterdifferenzen bis zu einer Zahl von 12:0 berichtet (Izquierdo et al., 1986). Banwell berichtet von einem Verhältnis 1,17:1 (w:m) bei MS-Patienten unter zehn Jahren und in der Gesamtheit (Alter von 2,6 bis 17 Jahren) von 1,32:1. Die geringere Geschlechterdifferenz bei jüngeren Kindern noch vor der Pubertät mag auch für die mögliche Bedeutung eines hormonellen Faktors in der MS-Pathobiologie hinweisend sein (Banwell, 2004).

Als Problem in der Diagnosestellung der Multiplen Sklerose im Kindes- und Jugendalter kann der von mehreren Autoren beobachtete, als untypisch beschriebene Beginn der MS-Erkrankung genannt werden. So gehören enzephalopathische Bilder und Krampfanfälle häufiger zu den Symptomen einer Multiplen Sklerose im Kindesalter (Golden und Woody, 1987; Ness et al., 2007). Auch Hanefeld et al. (1997) und Bauer et al. (1990) weisen darauf hin, dass eine MS im frühen Kindesalter oft mit atypischen Zeichen einer meningealen Reizung, eines Hirnödems, Krampfanfällen oder Bewusstseinstörungen einhergeht und daher auch andere diagnostische Zuordnungen nahe legen kann, wie beispielsweise die Diagnose einer diffusen Enzephalomyelitis.

Ghezzi (2005) berichtet vom Auftreten hyperakuter Formen und enzephalopathischen Symptomen, des Weiteren schreiben Miller et al. (1990) über 8 an MS erkrankte Kinder, von denen zwei ein akut enzephalopathisches klinisches Bild präsentierten und drei ein dementielles Syndrom entwickelten.

Prinzipiell unterscheidet sich die Multiple Sklerose im Kindesalter klinisch und pathobiologisch nicht von der adulten MS (Hanefeld, 1992; Hanefeld et al., 1997; Banwell, 2004; Ghezzi, 2005).

Wenngleich die Art der Symptomatik, die Rückbildungstendenz der Symptome und der Krankheitsverlauf in den einzelnen Krankheitsphasen den gleichen Gesetzmäßigkeiten einer adulten MS-Form unterliegen, so ist gerade die Symptomatik der Manifestation einer MS im Kindesalter sehr verschieden: im Erwachsenenalter gelten Sensibilitätsstörungen und die Retrobulbärneuritis als typische Erstmanifestationen, aber auch motorische Störungen, zerebelläre Syndrome, Miktionsstörungen und Augenmotilitätsstörungen wie die internukleäre Ophthalmoplegie werden als häufig angeführt. Die initiale Diagnosestellung der MS im Kindesalter ist neben der irreführenden Erstsymptomatik auch aus dem Grunde erschwert, da die klassischen MS-Kriterien aus der Erwachsenen-Neurologie nicht ohne Weiteres bei der

pädiatrischen MS angewandt werden können (Tardieu und Mikaeloff, 2004). Lange Zeit wurden für die MS im Kindesalter keine eigenen Diagnose-Kriterien formuliert, welche allgemeine Aussagen über Symptom-konstellationen im Kindesalter erlauben (Rugieri et al., 2004), was unter anderem mit den zu geringen Fallzahlen zusammenhängen mag. Nachdem die Schumacher-Kriterien (Schumacher et al., 1965), die eine Altersbegrenzung beinhalten (Erkrankungsalter > 10 Jahre), von neuen Definitionen abgelöst wurden, gelten heute als deren etabliertesten die Poser-Kriterien (Poser et al., 1983) für die Diagnose der MS im Kindes- und Jugendalter als Grundlage.

Die Berücksichtigung dieser Kriterien ist insbesondere zur Abgrenzung der MS gegenüber speziellen, im Kindesalter zu diskutierenden Differentialdiagnosen, wie den Adrenoleukodystrophien, post- oder parainfektösen Enzephalitiden oder der akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) wichtig (Fadil et al., 2007), wobei sich letztere auch als eine initiale Präsentation einer MS im Erwachsenenalter repräsentieren kann (Schwarz et al., 2001, Wingerchuk, 2006).

Sowohl klinisch als auch kernspintomografisch ist die akute disseminierte Enzephalomyelitis eines der wichtigsten und häufigsten der differentialdiagnostisch gegen eine MS im Kindesalter abzugrenzenden Krankheitsbilder (Hanefeld et al., 1997, Pohl et al., 2007).

Auch bei der ADEM handelt es sich um eine akute entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche mit der Demyelinisierung der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark einhergeht.

Von dieser Erkrankung ist auch eine hämorrhagische Variante, die akute hämorrhagische Enzephalomyelitis (AHEM), mit schlechterem klinischen Verlauf bekannt (Mader et al., 2004). Ferner wird auch über eine multiphasische, disseminierte Enzephalomyelitis (MDEM) diskutiert, die assoziiert wird mit Infektionen oder dem Entzug von Steroiden (Tsai und Hung, 1996; Dale et al., 2000; Dale und Branson, 2005). Auch bei der MDEM kann die Abgrenzung zur Multiplen Sklerose bei der initialen Diagnostik Schwierigkeiten bereiten.

Vor allem Kinder und Jugendliche erkranken an der ADEM (Tardieu und Mikaeloff, 2004) wenngleich es aber keine strenge Altersbegrenzung bei dieser Erkrankung gibt. Zumeist wird die ADEM in Verbindung mit viralen Infektionen oder Impfungen gebracht (Heckl, 1994; Tenenbaum et al., 2002; Banwell, 2004), was ebenso wie die pathologisch-histologische Nähe der Befunde der ADEM zu denen der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE), zu einer Autoimmun-hypothese bezüglich der Entstehung dieses Krankheitsbildes führte. Nur selten wird sie aber im Anschluss an eine bakterielle Infektion beobachtet.

Auch die Sonderformen der Multiplen Sklerose, die *diffuse Sklerose Schilder*, auch als „Enzephalomyelitis periaxialis diffusa Schilder“ oder „myelinoklastischer Typ“ der MS bezeichnet, gilt es, als Differentialdiagnose in Betracht zu ziehen. Diese wurde von Schilder (1912) beschrieben, manifestiert sich vorwiegend zwischen dem fünften und dem vierzehnten Lebensjahr und präsentiert sich initial oft wie ein intrakranieller Tumor oder ein Abszess, wodurch die Erstellung einer Diagnose erschwert wird (Kurul et al., 2003; Garrido et al., 2004). Die Symptomatik der Sklerose Schilder beginnt meist mit psychischen Störungen, begleitet von multilokulären neurologischen Symptomen, wie u.a. Gesichtsfeldausfällen, Retrobulbärneuritis oder Pyramidenstörungen. Zur Diagnose der Schilder-Form einer MS gehört die differentialdiagnostische Abgrenzung gegen andere, das ZNS betreffende Erkrankungen im Kindesalter und somit der Nachweis einer normalen Fettsäurezusammensetzung im Serum, denn eine pathologische Erhöhung, typischerweise der langkettigen Fettsäuren, wäre u.a. ein charakteristischer Hinweis für die Diagnose „Adrenoleukodystrophie“. Ebenfalls gilt, eine peripher-neurologische Beteiligung oder Funktionsstörungen der Nebennieren für die Diagnose der „diffusen Sklerose Schilder“ auszuschließen, wie sie familienanamnestisch als Manifestation bei Leukodystrophien eruiert werden können (Poser et al., 1986).

Die „Neuromyelitis Optica“ (NMO), synonym „Devic’s Disease“, gilt als eine Form der Multiplen Sklerose, die zwar zu der Hauptvariante der MS im jungen Erwachsenenalter zählt, aber auch bei Kindern auftreten kann (Kuroiwa, 1985, Pohl et al., 2007). Die Bezeichnung der Erkrankung resultiert aus der typischen Symptomkonstellation einer Querschnittsmyelitis, kombiniert mit einer oft bilateralen Neuritis nervi optici (Wingerchuk et al., 1999, Lalive et al., 2007). Es können jedoch auch andere Regionen von dem Entmarkungsprozess betroffen sein als nur das Myelon und der Sehnerv (Domingues et al., 2004, Hengstman et al., 2007).

Auch auf die differentialdiagnostische Schwierigkeit, das zufällige Zusammentreffen zweier, bei klassischer MS häufiger Symptome – der Retrobulbärneuritis und der Querschnittsmyelitis – von dem als eigenständig definierten Bild der „Neuromyelitis optica“ abzugrenzen, wurde u.a. von Heckl (1994) und Weinshenker (2007) hingewiesen. Ferner wird eine sehr schlechte Prognose der Devic’s Disease immer wieder bestätigt (Ghezzi et al., 2004; Banwell, 2004).

Als Auswahl weiterer Differentialdiagnosen der Multiplen Sklerose im Kindesalter sind noch folgende Entmarkungserkrankungen zu nennen: die viralen und toxischen Leukenzephalopathien, parainfektiose Enzephalitiden, wie sie bei Mumps, Masern und Röteln vorkommen können, Leukodystrophien, Neuroborreliose und

die Enzephalitis im Rahmen eines Immundefektes (insbesondere bei AIDS). Auch die Neurosarkoidose und Autoimmunerkrankungen wie der Lupus Erythematodes gehören zu den Differentialdiagnosen einer Multiplen Sklerose (Winfield et al., 1983; Hanefeld et al. 1997; Fadil et al., 2007).

Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über eine Auswahl von Differentialdiagnosen:

<ol style="list-style-type: none">1) Post-/parainfektiose Enzephalomyelitis : durch Immunreaktion bedingte Enzephalomyelitis im Rahmen bzw. in der Folge von Infektionskrankheiten bzw. Impfungen. Die Abgrenzung zum 1. Schub einer MS ist oft erst durch die weitere Verlaufsbeobachtung möglich.2) ADEM/MDEM: in der Regel einphasiger Krankheitsverlauf mit meist charakteristischem MRT-Befund3) Leukodystrophie/Leukenzephalie: hinweisende Stoffwechselfdiagnostik4) Borreliose: AK-Nachweis in Serum und Liquor5) AIDS-Enzephalitis: HIV-Diagnostik6) Neuromyelitis optica (DEVIC): Retrobulbärneuritis und Myelitis transversa, wird auch als Sonderform bzw. besondere Lokalisation einer akuten MS bezeichnet

Tabelle 1. Auswahl der Differentialdiagnosen zur Multiplen Sklerose

Grundsätzlich handelt es sich bei der Multiplen Sklerose des Kindes und des Erwachsenen um die gleiche Erkrankung (Hanefeld et al., 1997; Ghezzi, 2005). Auch im Kindesalter kommt es bei der Multiplen Sklerose zu einer Demyelinisierung im ZNS und normal strukturiertes Myelin gesunder Markscheiden wird zerstört. Es werden jedoch einige charakteristische Unterschiede beobachtet: während die Erkrankung im Erwachsenenalter häufig schleichend beginnt, zeigt die kindliche Multiple Sklerose oft einen Beginn mit akut einsetzenden Beschwerden, die gelegentlich sogar zunächst an einen Hirntumor bzw. einen Hirnabszess denken lassen. Auch scheint eine Beteiligung des Hirnstammes oder des Kleinhirns bei Kindern häufiger als bei Erwachsenen vorzukommen (Hanefeld et al., 1997).

Für die Diagnostik werden wie bei den Erwachsenen u.a. das MRT-Verfahren zur Darstellung möglicher ZNS-Läsionen sowie Liquoruntersuchungen zur Analyse oligoklonaler Banden eingesetzt (Banwell, 2004), wobei Pohl et al. (2004) oligoklonalen Banden im Liquor für die frühe Diagnose der early-onset MS (EOMS) die

gleiche Sensitivität zusprechen wie bei der Diagnostik der adulten MS-Form.

Die vorangestellte Auswahl einer Vielzahl von Erkrankungen, welche die Multiple Sklerose im Kindes- und Jugendalter klinisch oder diagnostisch imitieren können, unterstreicht die Forderung von Van Lieshout et al. (1993), auch im Kindesalter strenge diagnostische Kriterien bei der Diagnose einer Multiplen Sklerose anzuwenden, um nicht gerade im Kindesalter bei oft atypischer Klinik falsche Zuordnungen zu treffen, sondern durch rechtzeitige Diagnosestellung einen schweren Verlauf aufzuhalten.

1.4 Therapeutische Möglichkeiten bei Multipler Sklerose

Die pathogenetischen Konzepte sowie die therapeutischen Möglichkeiten bei der Multiplen Sklerose befinden sich seit einigen Jahren in grundlegendem Wandel. Fortschritte in der Biotechnologie, bessere Kenntnis der MS-Pathogenese, bessere Methoden zur Erfassung des Krankheitsprozesses und Fortschritte in der Methodologie haben zu einer Vielzahl neuer Therapiemöglichkeiten geführt.

Dennoch ist die Multiple Sklerose bis heute nicht heilbar und eine nebenwirkungsarme und hocheffiziente Therapie immer noch ein nicht erreichtes Ziel.

Umfangreiche, kontrollierte Studien über die Behandlung der Multiplen Sklerose bei Kindern und Jugendlichen sind rar (Pohl et al., 2007, Rostásy, 2007). Die Therapie orientiert sich daher auch an den Behandlungsrichtlinien, die aus der Erwachsenenmedizin bekannt sind (Hanefeld et al., 1997; Tardieu und Mikaeloff, 2004).

Hierzu soll zunächst ein kurzer Überblick über eine Auswahl gängiger Therapieverfahren gegeben werden:

Entzündungshemmung:

Erwiesen wurde durch mehrere kontrollierte Studien, dass eine Behandlung mit Steroiden (ACTH oder Glukokortikoiden) die Besserung von MS-Schüben beschleunigt (Beer und Kesselring, 1991; Boissy und Fox, 2007). Möglicherweise geschieht dies durch eine Kombination von antiinflammatorischer Wirkung, immun-suppressivem Effekt und antiödematöser Wirkung auf perifokale Hirnödeme. Diskutiert wird darüber hinaus ein direkter physiologischer Effekt dieser Substanzgruppe auf das Leitungsverhalten der demyelinisierten Axone (Troiano et al., 1987).

Ein Angriffspunkt der Kortikoide bei der multiplen Sklerose ist zunächst die gestörte Blut-Hirnschranke, was die Wirkung auf das dadurch bedingte interstitielle Ö-

dem erklärt.

Üblicherweise gibt man während eines akuten Schubes Prednison als Stosstherapie (sog. pulse therapy) insgesamt für vier bis sechs Wochen. Im Normalfall bilden sich die Symptome unter der Stosstherapie innerhalb der ersten Wochen nach Therapiebeginn langsam zurück. Da die Zellzahl im Liquor meist spontan rückläufig ist, lässt sich ein Effekt dieser Therapie auf die typische Liquor-Pleozytose der Multiplen Sklerose schwer nachweisen.

Versucht wurde auch, den Verlauf der Multiplen Sklerose durch intrathekale Gaben von Kortikoiden zu beeinflussen. Ein Vorteil der systemischen Anwendung gegenüber wurde jedoch nicht immer festgestellt (Mazzarello et al., 1983) und der Einsatz ist umstritten (Hoffmann et al., 2003). Vor allem hinsichtlich einer Besserung spinaler Symptome ist die intrathekale Gabe jedoch der systemischen überlegen. Wirkliche Langzeiterfolge für die MS-Erkrankten waren jedoch weder mit Kortisonderivaten noch mit ACTH zu erzielen (Kesselring, 2005).

Immunsuppressiva und Immunmodulatoren:

Die immunmodulatorische Behandlung hat in den letzten Jahren durch die positiven Ergebnisse mehrerer großer, multizentrisch durchgeführter Therapiestudien einen wichtigen Durchbruch erlebt.

Gegenwärtig zählen zu den spezifisch für die Behandlung der MS mit unterschiedlichen Indikationen zugelassenen Substanzen u.a. die Interferon β -Präparate, Glatirameracetat sowie das Zytostatikum Mitoxantron.

Durch Klasse 1 Evidenzstudien konnte die Wirksamkeit dieser Substanzen bei der MS klinisch durch signifikante Reduktion der Schubfrequenz und paraklinisch durch eine Reduktion der Läsionslast in der Kernspintomografie eindeutig belegt werden (Hartung et al., 2002)

Weitere neuere Medikamente wie FTY-720, ein oraler Immunmodulator, der durch Abwandlung des Pilzproduktes Myriocin gewonnen wird, sowie Xaliproden, auch ein oraler Immunmodulator, der bereits bei degenerativen Erkrankungen des Nervensystems klinisch eingesetzt wurde, sind jedoch bezüglich der Wirksamkeit bei der Multiplen Sklerose noch in der Erprobungsphase (klinische Phase 2) (Pinschewer et al., 2000; Baumruker et al., 2007).

Auch über den Einsatz des Immunsuppressivum Mycophenolatmofetil wurde bei therapierefraktären MS-Patienten berichtet (Ahrens et al., 2001).

Ein weiteres immunsuppressives Medikament, das momentan in der Behandlung der MS untersucht wird, ist das Pixantrone (BBR 2778), ein AZA-Anthracenedion, welches initial als Chemotherapeutikum entwickelt wurde und derzeit an Patienten

mit relapsing-remitting MS (RR-MS) erprobt wird (Gonsette, 2004).

Auch Cyclophosphamid wird bei schweren progredienten Verläufen eingesetzt, ebenso Azathioprin, Cyclosporin A und Methothrexat. Die genannten nicht-selektiven Immunsuppressiva wirken hauptsächlich durch ihre antiproliferativen zytostatischen Effekte und reduzieren die Anzahl möglicherweise autoaggressiver immunkompetenter Zellen.

Die Interferone, insbesondere INF Beta-1b (Betaseron/Betaferon) und INF Beta-1a (Avonex/Rebif), reduzieren die Anzahl der frischen Läsionen (im MRT erkenntlich) und der Schubraten in der Langzeitbehandlung. Als vermutlich wichtigste Wirkung antagonisiert INF Beta-1b viele Funktionen des Interferon- γ und senkt u.a. die Produktion von Entzündungsmediatoren durch Makrophagen. Zusätzlich hemmt Interferon β die T-Zellproliferation und stellt zu einem gewissen Grad die Suppressor-T-Zellfunktion wieder her. Durch die Hemmung von Metallproteinasen verringert IFN β vermutlich auch die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Kesselring, 2005).

Des Weiteren vermag Copolymer-1 (Glatiramerazetat, Copaxone), ein in der Regel gut verträgliches synthetisches Polypeptid (aus vier natürlich vorkommenden L-Aminosäuren), ebenso die Schubrate und die Zahl frischer Läsionen im MRT erkennbar zu verringern (Ruggieri et al., 2007). Auch in der Langzeittherapie konnten signifikante Therapieerfolge mit der Reduktion von Schubraten, vor allem bei Patienten mit noch kurzer Krankheitsdauer, ermittelt werden. Man geht durch die nachgewiesene Induktion von Wachstumsfaktoren durch Glatiramerazetat von einer neuroprotektiven Wirkung dieses Medikamentes aus.

Neben einer Vielzahl weiterer effektiver Präparate, namentlich auch derjenigen, die dem Einsatz gegen Spastik und Blasenstörungen zur Verfügung stehen, werden auch Behandlungsmaßnahmen mittels Plasmapherese (die der Entfernung von Autoantikörpern oder Immunkomplexen dient) oder intravenöse Gaben von Immunglobulinen eingesetzt (Kesselring, 2005, Pohl et al., 2007).

Einen weitaus höheren Stellenwert, als allgemein angenommen wird, verdient die symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose einschließlich der Krankengymnastik, den Ergotherapien und weiterer spezieller Bewegungstherapien, denn jegliche immobilitätsverhindernde Behandlungsmaßnahmen tragen zur Lebensverlängerung der Patienten bei (Poser, 1985). Auch auf die besondere Wichtigkeit der psychosozialen Betreuung von Betroffenen und deren Familienmitglieder oder die Teilnahme an Selbsthilfegruppen soll hier hingewiesen werden.

Die Hinweise aus histopathologischen Untersuchungen unterstützen jedoch die

klinisch beobachtete Heterogenität der Multiplen Sklerose, sodass die Etablierung einheitlicher Therapien für alle MS-Patienten folglich schwierig zu realisieren scheint (Lassmann et al., 2001).

Wie anfangs schon erläutert, orientiert sich die Behandlung der Multiplen Sklerose im Kindes- und Jugendalter an den Richtlinien der Erwachsenenmedizin.

Neben der Bedeutung der medikamentösen Therapie weist Hanefeld (1998) auf den Umfang weiterer Aspekte, die mit der Verkündung der Diagnose "MS" speziell im Kindes- und Jugendalter einhergehen sollten, wie z.B. ein grundlegendes Verständnis für die Krankheit, deren Symptome und Komplikationen zu vermitteln, Hilfestellung anzubieten, um mit den durch die Krankheit entstehenden Lebenseinschränkungen zu Recht zu kommen, Schule und weitere Ausbildung individuell möglich zu machen und bisherige Sozialstrukturen und soziale Einbindungen den Umständen entsprechend aufrecht zu erhalten.

So lässt sich nach Banwell (2004) die Behandlung der pädiatrischen Multiplen Sklerose einteilen in:

- 1) die Behandlung akuter Schübe
- 2) gezielte immunmodulatorische Therapie (sog. Disease-modifying-therapy, DMT)
- 3) Management der gesamten Symptomproblematik und Verhinderung zunehmender Beeinträchtigungen und Behinderungen

Für die Behandlung akuter Schübe im Kindes -und Jugendalter wird wie bei Erwachsenen die intravenöse Gabe von Kortikosteroiden vorgeschlagen, wobei zunächst mit einer Dosis von 20-30 mg/kg/d für 3-5 Tage begonnen wird (Banwell, 2004; Tardieu und Mikaeloff, 2004, Pohl et al., 2007).

Für eine Langzeittherapie mit Kortikosteroiden bei Kindern- und Jugendlichen gilt es besonders, eine niedrige Dosis einzuhalten da vor allem Wachstumsretardierung eine große Gefahr ist; seltenere Nebenwirkungen wie Bluthochdruck, Hyperglykämie, Hybernatriämie sowie Hypokaliämie sind aber genauso zu beachten (Pohl et al., 2007).

Immunmodulatorische Therapien mit Interferonen und Glatiramerazetat bewiesen auch in der pädiatrischen MS einen Erfolg; so wird empfohlen, frühzeitig mit der medikamentösen Therapie zu beginnen, um einen weiteren Krankheitsverlauf möglichst aufzuhalten und die Langzeitprognose optimal zu verbessern (Rostásy, 2007, Pohl et al., 2007). So konnten vor allem bei dem Einsatz von Interferonen bei der RRMS eine Besserung der Schubfrequenz von 29-34% (Galetta et al., 2002, Banwell, 2004) und für das Interferon beta-1a eine Reduktion der inflamma-

torischen Aktivität der ZNS-Läsionen festgestellt werden (PRISMS, 2000).

Zwar konnten Pohl et al. (2005) anhand einer retrospektiven Kohorten-Studie an 51 pädiatrischen Patienten mit early onset MS (EOMS) unter der Therapie von IFN-Beta-1a deutliche Reduktionen der Schübe während der Therapie im Vergleich zum Therapiebeginn (durchschnittliche Therapiedauer 17 Monate) feststellen und zugleich auch eine gute Toleranz der Kinder auf die subkutan zu verabreichenden Medikamentengaben, hier steht aber noch die klinische Phase III an, um über die Effizienz des Medikamentes im Kindesalter noch genauere Aussagen machen zu können (Pohl et al., 2005).

Auch von dem Einsatz von Cyclophosphamid bei der MS im Kindes- und Jugendalter wird berichtet, insbesondere bei Kindern mit mehr als drei Krankheitsschüben im Jahr und einem Nichtansprechen auf immunmodulatorische Therapien (Khan et al., 2001; Weiner und Cohen, 2002, Pohl et al., 2007). Hier gilt jedoch ein sehr vorsichtiger Einsatz des immunsuppressiven Medikamentes mit dem Potenzial zu Malignom-Entstehung und dem Risiko zur Unfruchtbarkeit (Banwell, 2004).

Nach Hanefeld et al. (1997) hat sich ebenfalls die immunsuppressive Behandlung mit dem Purinderivat Azathioprin bewährt. Gerade in der Langzeitbehandlung zur Reduzierung der Schwere und Anzahl der Schübe bei fortgeschrittener MS-Erkrankung konnte es Erfolge zeigen. Auch hier gilt eine strenge Indikation bei Kindern, insbesondere bei Mädchen, aufgrund möglicher teratogener Nebenwirkungen.

Neben der genannten medikamentösen Therapieauswahl spielen gerade bei Kindern- und Jugendlichen die symptomatischen Therapien eine ganz wesentliche Rolle während des gesamten Krankheitsverlaufes, denn die häufigen Begleitscheinungen der early onset Multiplen Sklerose, wie Müdigkeit, Schwächegefühle, Konzentrationsschwierigkeiten und vor allem kognitive Defizite, aber auch emotional bedingte Stimmungsschwankungen bedürfen einer großen Aufmerksamkeit (Banwell, 2004).

So sollte im Hinblick auf die umfangreiche Diagnose „MS“ im Kindesalter den symptomatischen Therapien und anderen individuellen Behandlungen inklusiv psychotherapeutischer Maßnahmen neben dem medikamentösen Einsatz eine herausragende Rolle beigemessen werden.

1.5 Ätiologie der Multiple Sklerose und Assoziation mit dem Epstein-Barr Virus

Der Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Epstein-Barr Virus und der Erkrankung an Multipler Sklerose sind in den vergangenen Jahren einige Autoren nachgegangen (Sumaya et al., 1985; Bray et al., 1992; Munch et al., 1997; Wandinger et al., 2000; Wagner et al., 2000; Ascherio und Munch, 2000; Levin et al., 2003; Haahr et al., 2004; Sundström et al., 2004; Levin et al., 2005; Ascherio und Munger, 2007). Durch signifikant erhöhte EBV-spezifische Seromarker bei MS-erkrankten Erwachsenen gegenüber Patienten mit anderen Erkrankungen des Nervensystems und den gesunden Kontrollen konnte ein solcher Zusammenhang deutlich bestätigt werden.

Für gleiche Untersuchungen an pädiatrischen MS-Patienten sind vergleichsweise kaum Studien veröffentlicht (Alotaibi et al., 2004, Pohl et al., 2006).

Ätiologisch betrachtet, ist die MS trotz zahlloser Untersuchungen und Diskussionen immer noch weitgehend ungeklärt (Munch et al., 1997; Wandinger et al., 2000; Alotaibi et al., 2004). Etliche epidemiologische Studien weisen jedoch darauf hin, dass ein komplexes Zwischenspiel zwischen Umwelttriggerfaktoren (wie Infektionen), genetischen Faktoren und Dysfunktionen in der Immunregulation nach gegenwärtigem Verständnis zu einer Manifestation der Multiplen Sklerose beitragen (Munch et al., 1997; Ascherio et al., 2001; Wiendl et al., 2004). So werden heute vor allem die Virustheorie und die Annahme eines neuroallergischen Reaktionsmechanismus ernsthaft diskutiert. Wichtig scheint hierbei die Exposition möglicher Umweltfaktoren in einer immunologisch vulnerablen Phase während der Kindheit (d.h. vor dem fünfzehnten Lebensjahr) zu sein, welche für eine spätere Manifestation der Multiplen Sklerose entscheidend sein könnten (Sadovnick und Ebers, 1993; Noseworthy et al., 2000; Banwell, 2004; Alotaibi et al., 2004). Die Annahme einer Virustheorie beruht dabei auf folgenden Erkenntnissen:

- Epidemiologische Erhebungen weisen darauf hin, dass die Exposition bestimmter infektiöser Agenzien im Kindes- oder Jugendalter prädisponierend für die Multiple Sklerose wirken (Sadovnick und Ebers, 1993; Haahr et al., 2004).
- Virologische Untersuchungen bei Tier und Mensch haben gezeigt, dass Viren in der Lage sind, über komplexe pathogenetische Mechanismen, wie Kreuzreaktionen, nach langen Inkubationszeiten chronisch-entzündliche Entmarkungsprozesse des ZNS hervorzurufen und autoimmune Geschehen

zu triggern (Ufret-Vincenty et al., 1998; Gold et al., 2000).

- Immunologische Analysen bei MS-Patienten haben veränderte Immunreaktionen in Serum- und Liquorproben auch gegen virale Antigene erkennen lassen (Schmidt, 1992; Kesselring, 2005).

Neben Umwelteinflüssen infektiöser Genese werden insbesondere auch immunogenetische Prädispositionsfaktoren, wie bestimmte humane Leukozyten-Antigen Typen (HLA), mit einem gesteigerten MS-Erkrankungsrisiko assoziiert, wobei in bestimmten Populationen in Nord- und Mitteleuropa sowie in Nordamerika die Haplotypen DRB1*1501, DQB1*0602 und DQA1*0102 in den MS-Erkrankten überrepräsentiert sind (Hauser et al., 1989; Ligers et al., 2001; Banwell, 2004). So kommt es nach einer Studie mit über 900 MS-Patienten besonders bei Trägern von HLA-Typ DR15 zu einem früheren Ausbruch der Erkrankung als bei MS-Patienten, die dieses Allel nicht tragen (Masterman et al., 2000).

Auch ein zwanzigfach erhöhtes Erkrankungsrisiko von Familienmitgliedern MS-Erkrankter und die 25-30%ige Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen zeigt eine genetische Prädisposition (Sadovnick und Ebers, 1993; Steinbrecher et al., 1995).

Hanefeld et al. (1997) messen einer möglichen Veränderung der mitochondrialen DNA (mtDNA) eine genetische Bedeutung zu, von den untersuchten pädiatrischen MS-Patienten wiesen 29% diese entsprechende Veränderung der mtDNA auf.

Gegenwärtige Konzepte basieren darauf, dass die Autoimmunerkrankung im ZNS durch autoreaktive T-Zellen im Rahmen einer Autoimmunantwort gegen Bestandteile der Myelinscheiden verursacht wird, die eine Demyelinisierung, Inflammation und Axondegeneration zur Folge hat (Martin et al., 1992; Compston und Coles, 2002). Eine Voraussetzung für die Einwanderung autoreaktiver T-Zellen in das Zielorgan ist ihre vorhergehende Aktivierung im peripheren Lymphsystem, beispielsweise im Lymphknoten. Die genaue Ursache dieser Aktivierung ist nicht bekannt, möglich erscheinen das sog. „molekulare Mimikry“¹ oder die Aktivierung durch präsentierte Selbstantigene (Benoist und Mathis, 2001; Olson et al., 2005, Libbey et al., 2007).

Im Rahmen einer ersten demyelinisierenden Episode, hervorgerufen durch eine Kreuzreaktion, werden Myelinantigene in die Peripherie freigesetzt, die dann im

¹ Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, bei dem aufgrund von Sequenzhomologien zwischen einem Fremdantigen und einem Autoantigen durch Kreuzaktivierung eine Immunantwort gegen körpereigene Bestandteile initiiert wird.

lymphatischen System B- und T-Zellantworten nach sich ziehen. Die Aktivierung der Lymphozyten, die mit einer komplexen Kaskade von Adhäsionsmolekül- und Chemokinrezeptor-Expressionen einhergeht, ermöglicht dann die Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke ins Parenchym. Dieser Prozess löst im ZNS eine lokale Reaktivierung von CD4- und auch vermutlich von zytotoxischen CD8 T-Zellen aus (Babbe et al., 2000). Des Weiteren kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder Lymphotoxin (LT), und zur Freisetzung von Stickoxid (NO), die dann im Verlauf möglicherweise die Demyelinisierung der Myelinscheiden und eine axonale Schädigung vorantreiben (Lassmann et al., 2001, Lassmann et al., 2007). Unklar ist weiterhin, ob der Axonschaden die Folge aktiver Zerstörung durch Makrophagen oder CD8 T-Zellen ist oder ob eine sekundäre Schädigung der Demyelinisierung und die damit verbundene erhöhte Vulnerabilität der Axone gegenüber toxischen Mediatoren die Ursache ist (Bjartmar und Trapp, 2003, Agrawal und Yong, 2007).

Die lokale inflammatorische Reaktion, in die auch B-Lymphozyten und Makrophagen eingebunden sind, wird durch Chemokin-vermittelte Rekrutierung weiterer Immunzellen über die Blut-Hinschranke in das ZNS aufrechterhalten. Sowohl bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie, aber auch bei deren Restimulation im ZNS könnten bei diesem autoimmunopathogenetischen Modell Viren eine bedeutende Rolle spielen.

Auf die Virustheorie zurückkommend, lässt sich sagen, dass schon früh empirisch belegt wurde, dass das Epstein-Barr Virus die Kriterien zu der Hypothese einer Assoziation von EBV und Multipler Sklerose erfüllt oder dass EBV zumindest einen möglichen Kandidaten für ein infektiöses Agens darstellt (Warner und Carp, 1988; Martyn et al., 1993; Haahr und Höllsberg, 2006, Ascherio und Munger, 2007).

So wiesen Studien an MS-Patienten aus verschiedensten geografischen Regionen eine EBV-Seropositivität von 99-100% auf, was einen signifikanten Unterschied zu den gesunden, alters- und geschlechtsabgestimmten Kontrollgruppen darstellte, bei denen die EBV-Seropositivität lediglich bei 84-95% lag (Bray et al., 1983; Sumaya et al., 1985; Munch et al., 1997). Weitere sozio-epidemiologische Studien konnten aufzeigen, dass in den Entwicklungsländern eine 80-95%ige Seropositivität von EBV bereits im Alter zwischen zwei und drei Jahren besteht, wobei in westlichen Ländern die Seropositivität im Alter von vier Jahren nur bei 51% liegt und erst im Alter von durchschnittlich neunzehn Jahren der Großteil der Bevölkerung eine 80-95%ige EBV-Seropositivität erreicht (de Thé et al., 1975, Ghezzi et al., 1997; Casetta und Granieri, 2000).

Interessant ist, dass diejenigen Regionen (vornehmlich Entwicklungsländer), in denen eine frühe EBV-Infektion vorherrscht, eine niedrige MS-Prevalenz-Rate aufweisen, wohingegen in den entwickelten westlichen Industriestaaten mit höherem Lebensstandard und allgemein späterer EBV-Infektion ein höheres MS-Risiko besteht (Evans und Niedermann, 1989; Haahr et al., 2004). Durch diesen Zusammenhang wurde die Annahme postuliert, dass die Pathogenese der MS eine altersabhängige Auseinandersetzung des Immunsystems mit EBV beinhaltet. Auch die Migrationsstudien mögen hinweisend für eine virale Triggerung während der Kindheit in die MS-Ätiologie sein: sie konnten aufzeigen, dass das MS-Risiko der neuen Heimat der Zugewanderten nur dann „adaptiert“ wurde, wenn die Immigranten noch vor der Pubertät eingewandert waren und somit möglicherweise noch keine EBV-Infektionen durchgemacht hatten (Sadovnick und Ebers, 1993).

Vor allem durch serologische Untersuchungen an MS-Patienten wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz erhöhte Antikörper gegen *Epstein-Barr nuclear antigen1* (EBNA1) und gegen *viral capsid antigen* (VCA) gefunden (Bray et al., 1983; Munch et al., 1997; Levin et al., 2005).

Für Ascherio et al. (2001) sind die erhöhten EBV-Antikörper deutliche Bestätigungen für die Assoziation zwischen dem EB-Virus und einem erhöhten Risiko der MS-Erkrankung, wobei jedoch Hunter und Hafler (2000) darauf hinweisen, dass diese Ergebnisse lediglich die immune Dysregulation der Multiplen Sklerose widerspiegeln können.

Des Weiteren finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass Patienten, die als EBV-Primärinfektion eine infektiöse Mononukleose durchmachten, auch ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Multiplen Sklerose haben, das mit einer Latenzzeit von etwa zwölf Jahren und einem Risikoverhältnis von 2,8-3,1 verbunden ist (Martyn et al., 1993; Haahr et al., 2004, Haahr und Höllsberg, 2006). Die Häufigkeit einer ZNS-Komplikation der Infektiösen Mononukleose als Primärinfektion mit EBV wird von Bray et al. (1992) mit 1-5% angegeben. Als klinisches Beispiel wird in dieser Studie von fünf Patienten berichtet, die als Folge einer neurologisch komplizierten primären EBV-Infektion progressive ZNS-Defizite erlitten. Als Folgekrankheit, die bei vier Patienten im Verlauf von vier bis zwölf Jahren auftrat, wurde Multiple Sklerose diagnostiziert, der fünfte Patient entwickelte eine akute disseminierte MS mit diffusen neurologischen Defiziten, die über zwei Jahre persistierten. Die Autoren betonen jedoch, dass diese Fälle zwar eine klinische Assoziation von komplizierter primärer EBV-Infektion und sowohl chronischer als auch akuter Multipler Sklerose erlauben, dennoch aber nicht die Schlussfolgerung gerechtfertigen,

dass EBV eine MS verursache.

Die von Warner und Carp (1988) publizierte virale Hypothese, EBV sei maßgeblich an der MS-Erkrankung beteiligt, basiert auf folgenden Annahmen: MS ist verursacht durch eine EBV-Infektion bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen, die zuvor noch nicht mit dem EB-Virus infiziert waren. Gleichzeitig sind sie für diese Erkrankung prädestiniert durch folgende Merkmale: einen bestimmten HLA-Typ, T-Suppressor-Zell-Aktivität, ihren Immunstatus und zusätzlich die Fähigkeit einer lebenslangen Persistenz des Virus in seinem Wirt und weitere Faktoren, welche die Immunantwort auf eine EBV-Infektion steuern (Batchelor, 1985).

Da alle MS-Patienten der zuvor erwähnten Studien eine signifikant erhöhte EBV-Seropositivität aufzeigen konnten, hielten die Autoren eine direkte ZNS-Infektion mit EBV zwar für unwahrscheinlich, aber nicht für ausgeschlossen und kamen daher übereinstimmend zu der Annahme, dass das Virus, - auf welche Weise auch immer -, eine Auswirkung auf die Pathogenese der Multiple Sklerose hat. Die Vermutung, dass EBV keine direkte ZNS-Infektion verursacht, konnten Hilton et al. (1994) bestätigen, die weder im Liquor noch in ZNS-Läsionen MS-Erkrankter durch in situ Hybridisierung oder PCR-Verfahren EBV-spezifische RNA nachweisen konnten.

Während die Assoziation von EBV mit der Multiplen Sklerose im Erwachsenenalter statistisch signifikant ist, ist hingegen die pathobiologische Signifikanz dieser Beobachtung noch fragwürdig, da mehr als 90% der gesunden, westlichen Population EBV-seropositiv sind (Ascherio et al., 2001). Möglich ist darum auch, dass ein anderer kausaler Faktor zugrunde liegt, der einerseits die beobachtete Veränderung in der humoralen Immunantwort gegen EBV bewirkt und andererseits eine Rolle bei der Entstehung der MS spielt.

Wenn das Epstein-Barr Virus tatsächlich mit der Ätiologie der Multiplen Sklerose zusammenhängt, so sollten pädiatrische MS-Patienten zu dem Zeitpunkt ihrer Diagnosestellung bereits eine serologische Evidenz von früheren EBV-Expositionen aufweisen können (Alotaibi et al., 2004, Pohl et al., 2006).

1.6 Fragestellung

Durch etliche epidemiologische und Fall-Kontrollstudien konnte eine Assoziation des Epstein-Barr Virus mit der Enzephalomyelitis disseminata (Multiple Sklerose) festgestellt werden. Durch die signifikante EBV-Seropositivität der MS-Patienten im Gegensatz zu den gesunden Kontrollgruppen wurde die Forschung in ihrer Annahme bestä-

tigt, dass das Virus eine Rolle in der Ätiologie der Multiplen Sklerose spielt (Wagner et al., 2000; Wagner et al., 2004; Levin et al., 2005 u.a.).

Die MS-Ätiologie und Pathobiologie im Kindes- und Jugendalter ist auch trotz zahlloser Untersuchungen noch weitestgehend ungeklärt, doch auch hier zeigen erste Fall-Kontrollstudien einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Epstein-Barr Virus und der Entstehungsgenese der Erkrankung. Diese Assoziation wurde jedoch bei weitem noch nicht so eingehend untersucht wie bei erwachsenen MS-Patienten und detaillierte virologische Studien der pädiatrischen Multiplen Sklerose sind noch unzureichend (Alotaibi et al., 2004, Pohl et al., 2006).

Da Kinder und Jugendliche im Vergleich zu Erwachsenen weniger Infektionen durchgemacht haben, erscheinen sie uns daher als optimale Studienkandidaten, um sie auf Infektionen, insbesondere mit dem Epstein-Barr Virus, als möglichen Kofaktor für die Ätiologie der Multiplen Sklerose zu untersuchen.

So ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, der Fragestellung nachzugehen, inwieweit es möglich ist, einen positiven oder sogar signifikanten Hinweis für die Assoziation zwischen dem Epstein-Barr Virus und der Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose bei Kindern und Jugendlichen zu finden.

Durch die Messung der Viruslast, die serologische Bestimmung von EBV-spezifischen Antikörpern und im Vergleich auch weiterer Herpesviridae soll im Rahmen einer Fall-Kontrollstudie dieser Frage im Folgenden nachgegangen werden.

2. Materialien, Patienten und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Reagenzien:

Aqua Spüllösung (Delta Pharma, Pfullingen)

CRP-Forward-Primer (Tib Molbiol, Berlin) (Sequenz: 5'-CTT GAC CAG CCT CTC TCA TGC-3')

CRP-Reverse Primer (Tib Molbiol, Berlin) (Sequenz: 5'-TGC AGT CTT AGA CCC CAC CC-3')

CRP-Sonde (Tib Molbiol, Berlin) (Sequenz: 5'-FAM TTT GGC CAG ACA GGT AAG GGC CAC C-TAMRA-3')

Distilled Water (DNase-, RNase- free, Gibco, Paisley, Scotland)

EBNA1-Forward Primer (Tib Molbiol, Berlin) (Sequenz: 5'-CCG GTG TGT TAT ATG GAG-3')

EBNA1-Reverse-Primer (Tib Molbiol, Berlin) (Sequenz: 5'-GGG AGA CGA CTC AAT GGT GTA-3')

EBNA1-Sonde (Applied Biosystems, Cheshire, UK) (Sequenz: 5'-Vic TGC CCT TGC TAT TCC ACA ATG TCG TCT T-TAMRA-3')

Ethanol vergällt 100% (Apotheke Universitätsklinik, Lübeck)

TaqMan Universal PCR-Mastermix (PE Applied Biosystems, Branchburg, USA)

2.1.2. ELISA:

Biotest Anti-EBNA-IgG ELISA (Biotest, Dreieich, Germany)

Biotest Anti-EBV-EA-IgG & IgM ELISA (Biotest, Dreieich, Germany)

Biotest Anti-EBV EA-(D) IgA ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany)

Biotest Anti-EBV VCA-IgG ELISA (Biotest, Dreieich, Germany)

Enzygnost Anti-HSV-IgG (Dade Behring GmbH, Marburg, Germany)

Enzygnost Anti-VZV-IgG (Dade Behring GmbH, Marburg, Germany)

Enzygnost Anti-CMV-IgG (Dade Behring GmbH, Marburg, Germany)

2.1.3 Reagenzien zur DNA-Extraktion:

QIAamp DNA Blood Midi Kit for DNA purification (Qiagen, Hilden)

Qiagen-Protease (Qiagen, Hilden)

2.1.4 Enzyme zur PCR-Durchführung:

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (PE Applied Biosystems, Branchburg, USA)

2.1.5 Zelllinie:

Namalwa (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, ACC 24)

2.1.6 Laborbedarf:

Einmalpipetten 10 ml (Greiner, Frickenhausen)

Eppendorf-Combitips plus 2,5 ml, 5 ml (Eppendorf, Hamburg)

Optical Caps (Applied Biosystems Cheshire, United Kingdom)

96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, Cheshire, United Kingdom)

Mikrotubes 0,5 ml, 1,5 ml ReagiergefäÙe (Sarstedt, Nümbrecht)

Pipettenspitzen 0,5-10 µl 10-100 µl, 100-1000 µl, (Greiner, Frickenhausen)

Rundbodenröhrchen 5 ml (DB Falcon, Erembodegem, Belgien)

SafeSeal-Tips 2,5 µl, 10 µl, 100 µl (Pipettenspitzen, DNase-, RNase-, pyrogenfrei, Biozym, Hess. Oldendorf)

Transferpipetten 3,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

Zentrifugentröhrchen 15 ml (Greiner, Frickenhausen)

2.1.7 Geräte:

Abi Prism 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt)

Brutschrank 37 °C (Heraeus, Hamburg)

ELISA-Waschanlage (Tecan GmbH, Austria)

Eppendorf-Multipette (Eppendorf, Hamburg)

Eppendorf-Pipetten 0,5-2,5 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Eppendorf-Zentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)

Omnifuge: Rotanda / TRC (Hettich, Tuttlingen)

Spektralphotometer für ELISA: Spectra Reader (SLT Labinstruments, Crailsheim)

Spektralphotometer: Ultrospec 2000 (Pharmacia, Biotech, Freiburg)

Sterilwerkbank (Heraeus, Hamburg)

Tiefkühlschrank -80 °C: Ultralow (Sanyo Biomedical, Ewald Innovationstechnik, Bad Nenndorf)

Vortexmischer: MS1-Minishaker (IKA-Werke, Staufen)

Wasserbad + 70 °C: (Julabo, Seelbach)

2.1.8 Software:

Abi Prism 7700 Sequence Detection Software (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt)

Easy Base (SLT Labinstruments, Crailsheim)

Swift Multi Wavelength (Pharmacia, Biotech, Cambridge, UK)

SPSS 8.0 Windows (SPSS Inc., Richmond, USA)

2.2 Patienten

Für die Untersuchungen stand uns von 74 Kindern und Jugendlichen Plasma-Probenmaterial zur Verfügung, welches uns von einer pädiatrischen MS-Multi-centerstudie zugesandt wurde, die die MS-Proben deutschlandweit zugesendet bekommt.

Eine Serumprobe pro Kind bestand aus ca. 1-2 ml Material, wobei dieses bei insgesamt 73 Patienten hinreichend genug für alle durchzuführenden Laboruntersuchungen war und somit im Folgenden von einer Patientensammlung von insgesamt 73 ausgegangen wird. Bei diesen Patienten handelt es sich um sicher an „early-onset“ Multipler Sklerose erkrankte, wobei die Diagnose MS entsprechend der Poser Kriterien (Poser et al., 1983) gestellt wurde. Alle Patienten waren ausführlich klinisch-neurologisch und anamnestisch von erfahrenen Neuro-pädiatern untersucht und die erhobenen Daten standardisiert dokumentiert worden. Da die Probenentnahme zum Großteil mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung zusammenfiel, ist die überwiegende Mehrheit der Patienten noch nicht medikamentös behandelt gewesen. Steroidgaben waren einem Teil der Patienten jedoch schon verabreicht worden, was jedoch im Hinblick auf unsere serologischen Untersuchungen nicht von Relevanz ist.

Das Geschlechterverhältnis der MS-Probanden von Knaben und Mädchen betrug 1:1,8 und die Altersspannweite lag zwischen 8 bis 23 Jahren (wobei das Alter bei Entnahme der Probe gemeint ist), der Altersmedian lag bei 15 Jahren (Details siehe anschließende Tabelle 2).

Nach Erhalt des ungekühlt eingetroffenen, in Mikrotubes aufbewahrten Probenmaterials der Patienten wurde dieses zunächst bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3 Gesunde Kontrollen

Als Kontrollgruppe für die pädiatrischen MS-Patienten diente das Material von 77 hier in der Kinderklinik der Universität zu Lübeck stationär aufgenommenen Kindern und Jugendlichen mit annähernd gleicher Alters- und Geschlechtsverteilung von w:m 1:1,2, Altersspannweite von 7 bis 19 Jahren, Altersmedian 15 Jahre (De-

tails siehe Tabelle 2). Nötige Voraussetzung für die Kontrollprobanden war, nicht an einer hämatologisch/onkologischen Erkrankung zu leiden.

Mit dem Einverständnis der Kontrollprobanden wurden die gewonnenen Plasma-Proben von der hiesigen klinischen Chemie des Universitätsklinikums Lübeck an unser hämatologisch/onkologisches Labor weitergegeben und in Eppendorf-Mikrotubes zunächst ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

Übersicht über MS-Patienten			Übersicht über Kontrollgruppe		
Alter bei Entnahme	Anzahl Mädchen	Anzahl Jungen	Alter bei Entnahme	Anzahl Mädchen	Anzahl Jungen
8	1		7	1	2
9			8	2	3
10	1	1	9	3	4
11	1	4	10	1	2
12	3	4	11	3	2
13	7	1	12	1	4
14	6	4	13	2	7
15	11	2	14	3	5
16	7	4	15	6	1
17	4	3	16	3	7
18	3	1	17	1	3
19	3		18	4	3
20			19	4	
21		1			
22					
23	1				
Gesamt:	n = 48	n = 25	Gesamt:	n = 34	n = 43

Tabelle 2. Übersicht über die Altersverteilung von MS-Patienten und deren Kontrollgruppe

2.4 Methoden

2.4.1 DNA-Isolierung aus Plasma

Die DNA-Isolierung aus Plasma dient der Gewinnung von DNA aus dem Proben- und Kontrollmaterial, welche dann nach Durchführung der DNA- Konzentrationsbestimmung am Spektralphotometer für das Real-time-PCR Verfahren eingesetzt werden kann. Das folgende Protokoll entstammt einem kommerziell erhältlichen Kit zur Isolierung von DNA (*QIAamp Blood Midi Kits*, Qiagen, Hilden). Das Prinzip der

Methode beruht darauf, mittels einer zugefügten Protease (Qiagen Protease), welche DNase- und RNase- frei ist, die Proben- und Kontroll suspension anzudauen, dem Lysat als Lösungsmittel Ethanol hinzuzufügen und durch mehrmalige Zentrifugationsschritte durch einen Membranfilter (QIAamp silica membrane) und Zugabe von Puffersubstanzen die DNA auszuwaschen. Durch den Salzgehalt und den pH-Wert des Lysates wird dabei verhindert, dass Proteine und andere Verunreinigungen auf der Membran zurückgehalten werden.

Protokoll

- In ein 15 ml Falcon-Röhrchen 1,2 ml Lysepuffer (Buffer AL) vorlegen sowie 100 µl Qiagen Protease dazu pipettieren und gut vortexen.
- 500 µl Plasma auf den AL-Puffer geben.
- Im Wasserbad bei 70° C inkubieren für 10 Min.
- 1 ml Ethanol (100%) hinzugeben, gut mischen und das Lysat auf die Membran Säulentubes (QIAamp Midi column) gießen.
- Bei 3000 g drei Min. zentrifugieren, anschließend das Filtrat verwerfen, 2 ml Waschpuffer (Buffer AW1) auf die Filter pipettieren und 1 Min. bei 4500 g zentrifugieren.
- 2 ml Waschpuffer (Buffer AW2) auf die Filter pipettieren, Filtrat im Röhrchen lassen und 15 Min. bei 4500 g zentrifugieren.
- Das Filtrat verwerfen, den Filter in ein neues Röhrchen überführen, 200 µl Elutionspuffer (Buffer AE) auf die Filter pipettieren, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 5 Min. bei 4500 g zentrifugieren.
- Das Filtrat (ca. 200 µl) nochmals auf die Filter geben und 5 Min. bei 4500 g zentrifugieren.
- Das gewonnene Eluat für die DNA-Konzentrationsbestimmung aufheben.

Das Eluationsvolumen betrug im Falle des Plasmas etwa 200 µl. Um eine maximale Konzentration an DNA zu erhalten, wurde im letzten Protokollschritt das 200 µl Filtrat des ersten Eluationsvorganges ein zweites Mal durch den Membranfilter gegeben und zentrifugiert.

Durch das ursprünglich eingesetzte Plasma-Volumen von 500 µl haben wir damit am Ende eine Konzentrationserhöhung um den Faktor 2,5 erreicht.

2.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und die Reinheit der in dem Elutionspuffer gelösten DNA werden am Spektralphotometer durch Extinktionsmessung bei 260-280 nm bestimmt. Dabei entspricht die Extinktion bei 260 nm der Menge der gelösten Nukleinsäuren. Deren Konzentration (in $\mu\text{g/ml}$) wird durch Multiplikation des O.D.-Wertes mit $50\mu\text{g/ml}$ berechnet. Anhand des Quotienten aus der Extinktion bei 260 nm und 280 lässt sich die Reinheit der Proben beurteilen. So sollte dieser Quotient zwischen 1,7 und 1,9 liegen, da sonst die Proteinverunreinigung zu groß wäre.

2.4.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter Nukleinsäure-Fragmente *in vitro* (Mullis und Faloona, 1987). Sie besteht aus einer Abfolge gleichförmiger Zyklen aus jeweils drei Reaktionsschritten. Zuerst wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang (Template) bei 95°C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt erfolgt bei 60°C die Anlagerung (Annealing) von Einzelstrang-Oligonukleotiden (Primern) an die Zielsequenz. Dabei ist der Forward-Primer komplementär zum 5'-Ende des Plus-Stranges und der Reverse-Primer komplementär zum 5'-Ende des Minus-Stranges. Am Ende des Zyklus steht die Bildung von Doppelstrang-Templates bei 72°C (Primer Extension) durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Dieses Enzym entstammt dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, hat ein Temperaturoptimum von ca. 70°C und ist für eine begrenzte Zeit auch bei Temperaturen von 95°C stabil. Zur Synthese von Doppelstrang-DNA aus DNA-Einzelsträngen benötigt es als Startpunkt ein Stück Doppelstrang-DNA. Diese wird durch die Anlagerung des Primers an die Zielsequenz geliefert.

Durch einen Reaktionszyklus können die in der Probe vorliegenden Templates verdoppelt werden. Bei n Zyklen kann ein einzelnes DNA-Molekül theoretisch auf eine Anzahl von 2^n Templates vervielfältigt werden.

Durch eine Aktivitätsminderung der Polymerase liegt die tatsächliche Ausbeute jedoch bei 10^6 bis 10^7 Kopien (Saiki et al., 1988).

2.4.4 Real-time quantitative (RQ) PCR

Eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR stellt das quantitative PCR-Verfahren in Echtzeit dar, die sog. „Real-time“ quantitative PCR (RQ-PCR) (*TaqMan Technology, Applied Biosystems*).

Durch Detektion sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale im PCR-Reaktionsgefäß

entfallen die üblichen post-PCR Analyseschritte zum Sichtbarmachen der Amplifikate, wie z.B. Gelelektrophorese und Southern Blotting. Neben einem geringeren Arbeitsaufwand führt dies vor allem auch zu einer Verringerung der Übertragungskontamination.

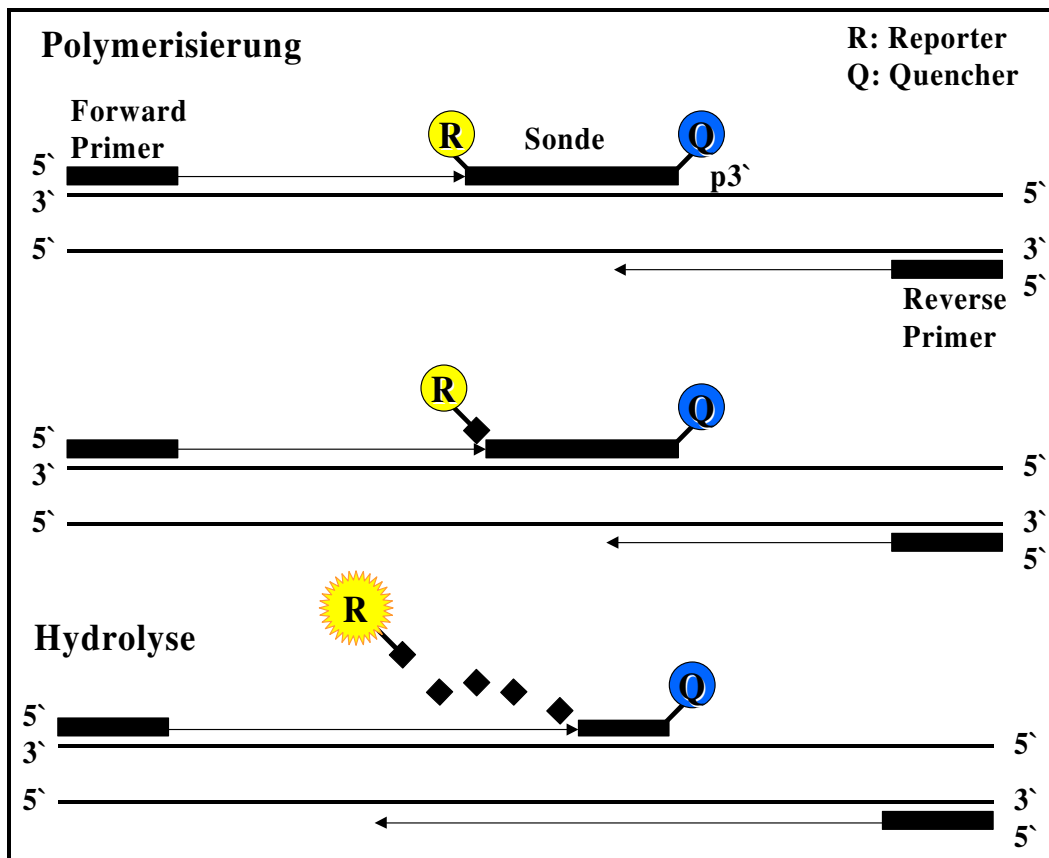
Bei diesem Verfahren wird die Registrierung eines bei der DNA-Amplifizierung von einem fluoreszierenden Farbstoff freigesetzten Signals zur Quantifizierung der im Ansatz enthaltenen DNA-Konzentration verwendet.

Die RQ-PCR basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq (*Thermus aquaticus*)-DNA-Polymerase. Zusätzlich zu beiden Primern wird ein drittes Oligonukleotid dem PCR-Ansatz zugesetzt, welches spezifisch zwischen beiden Primern an der nachzuweisenden Zielsequenz bindet. Diese der Zielsequenz komplementäre Oligonukleotidsonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluorogenen Reporter-Farbstoff und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. In der Annealing Phase der PCR hybridisiert sie zusammen mit den Primern an den Matrizen-Strang. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt der Quencher-Farbstoff die Fluoreszenzaktivität des Reporter-Farbstoffes durch einen Fluoreszenz Energietransfer (FET), solange Reporter und Quencher in unmittelbarer räumlicher Nähe an der Sonde gebunden sind.

In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und beginnt, sie zu verdrängen. Es entsteht eine y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff unterbrochen, sodass der Reporter-Farbstoff zu fluoreszieren beginnt. Es wird somit ein sequenzspezifisches Fluoreszenzsignal generiert, dessen Intensität mit jedem PCR-Zyklus entsprechend der Amplifikation der Zielsequenz zunimmt und mit Hilfe des Fluoreszenz-Detektors *ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems* (einem Thermocycler) erfasst werden kann. Dabei ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge an nachzuweisenden Zielsequenzen und wird nach jedem PCR-Zyklus als PCR-Kinetik aufgezeichnet. Die gemessenen Daten können dann mit der Sequence Detection Software ausgewertet werden.

Durch den direkten Nachweis des Amplifikationsproduktes über den gesamten Verlauf der PCR wird bei der Taqman-PCR erstmals eine objektive Quantifizierung ermöglicht. Die hohe Sensitivität und Reliabilität des Nachweisverfahrens gewährleistet zudem eine optimale Voraussetzung der quantitativen Untersuchung von Genexpressionen.

Die nachfolgende Abb. 2 stellt das RQ-PCR Verfahren grafisch dar.



Durch das Schneiden der sequenzspezifischen Sonde während des Polymerisationsschrittes wird ein Fluoreszenzsignal generiert, dessen Intensität proportional zur Anzahl der Amplifikate ist.

Abb. 2: Prinzip der „Real-time“ quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (RQ-PCR) durch Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase

Reaktionsansatz:

Zur Quantifizierung der in den Plasmaproben enthaltenen Epstein-Barr Virus-DNA erfolgt die RQ-PCR in einer Doppelbestimmung mit einer EBNA1-spezifischen Sonde, an die der Reporter-Farbstoff VIC gekoppelt ist. Das nachfolgende Protokoll folgt den Angaben des Herstellers (*Perkin Elmer Applied Biosystems*).

2.4.5 PCR-Protokoll:

PCR-Ansatz (50 µl) für Plasmaproben, bestehend aus:

- 25 µl Universal PCR Mastermix (enthält: AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, dNTPs, Mg⁺, AmpErase UNG, Referenzfarbstoff, Puffer)

- 1,5 µl EBNA1-Forward Primer (10 µM)
- 1,5 µl EBNA1-Reverse Primer (10 µM)
- 1,25 µl EBNA1 Sonde (10 µM)
- 0,2 µl CRP-Forward Primer (10 µM)
- 0,2 µl CRP-Reverse Primer (10 µM)
- 0,5 µl CRP Sonde (10 µM)
- 0,05 µl Aqua dest.
- 20 µl Probe (Template)

Das Pipettierprotokoll wird mit der Menge der eingesetzten Proben bzw. der Standardreihe multipliziert.

Nach diesem Schema erfolgt auch die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Standardverdünnungsreihe aus Namalwa-DNA sowie der Negativkontrolle, der statt DNA 20µl Aqua dest. zugesetzt wird.

Auf einer 96-Gefäss-Reaktionsplatte finden also 40 Proben in Doppelbestimmung mit einer Negativkontrolle und die sieben Standardverdünnungen, beide jeweils auch in Doppelbestimmung, Platz.

2.4.6 Serodiagnostik EBV-spezifischer Antikörper

Um den Serostatus der Patienten in Bezug auf das Epstein-Barr Virus ermitteln zu können und dabei zwischen EBV-Seronegativen, EBV-Seropositiven ohne Anzeichen für eine aktive Infektion, bzw. primären und endogenen reaktivierten Infektionen zu unterscheiden, wurden EBV-spezifische Antikörper vom Typ IgG, IgM und IgA, jeweils gerichtet gegen das *early antigen* (D) (EA), untersucht. Bei dem early-Antigenkomplex unterscheidet man eine restriktive (R) und eine diffuse (D) Komponente, die sich durch ihr Äthanol-/Methanolfixierungsverhalten erklären. Des Weiteren wurden die MS-Proben und Kontrollprobanden auf den Typ IgG gegen EBV-spezifisches nukleäres Antigen1 (EBNA1) und gegen *viral capsid antigen* (VCA)-IgG mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht.

Handelt es sich um eine akute EBV-Infektion, so werden EA-IgM und VCA-IgM als erstes im Serum nachweisbar. Darauf folgen EA-IgG und als Zeichen der Epithelbeteiligung das EA-IgA.

Im Verlauf kann dann die Konzentration dieser Antikörper im Regelfall unter die Nachweisgrenze absinken.

Etwa zeitgleich mit dem Absinken der Konzentration der gegen das early-antigen gerichteten Antikörper erreicht IgG gegen EBNA1 detektierbare Mengen und bleibt

für einen größeren Zeitraum serologisch nachweisbar. Seine Bestimmung dient als Hinweis auf eine länger zurückliegende Infektion.

Die serologische Diagnostik macht sich nun die Tatsache zunutze, dass unterschiedliche virus-spezifische Antigen-Komplexe in verschiedenen Stadien des replikativen EBV-Zyklus exprimiert werden. Mit Hilfe des ELISA lassen sich Antikörper, die gegen diese Antigenkomplexe gebildet werden, aufspüren, wodurch man ein charakteristisches Spiegelbild des zyklus-abhängigen Antigen-erscheinens erhält.

Die Beurteilung der serologischen Befunde im longitudinalen Verlauf erfolgt anhand des folgenden Interpretationsschemas (Hornef et al., 1995):

EBV-seronegativ: weder in Voruntersuchungen, noch in der von uns untersuchten Proben lassen sich EBV-spezifische Antikörper nachweisen.

EBV-seropositiv mit länger zurückliegender Serokonversion: Hierbei sind Antikörper vom Typ IgG gegen EBNA1 messbar. IgG, IgM, sowie IgA gegen *early antigen* (EA) sind hingegen nicht oder ausschließlich EA-IgG nachweisbar.

Primäre Infektion: Eine Primärinfektion galt als nachgewiesen, wenn bei Abwesenheit von EBNA1-Antikörpern (oder unterhalb eines Schwellenwertes von 0,5) erhöhte anti-EA IgM und/oder anti-EA IgG-Titer, bei gleichzeitiger Seropositivität für VCA-IgM und VCA-IgG vorlagen. Positive Nachweise von anti EA-IgA erhärten den Befund einer Primärinfektion.

Endogene Reaktivierung: Wenn zusätzlich zur Langzeitpositivität von anti-EBNA-IgG hohe Titer von anti-EA-IgM (OD-Werte > 0,5) bzw. von anti EA-IgG (OD-Werte > 1,0) gemessen werden konnten, sind wir von einer endogenen Reaktivierung ausgegangen.

Die nachfolgende Abbildung 3 stellt die serologische EBV-Verlaufsdagnostik grafisch dar:

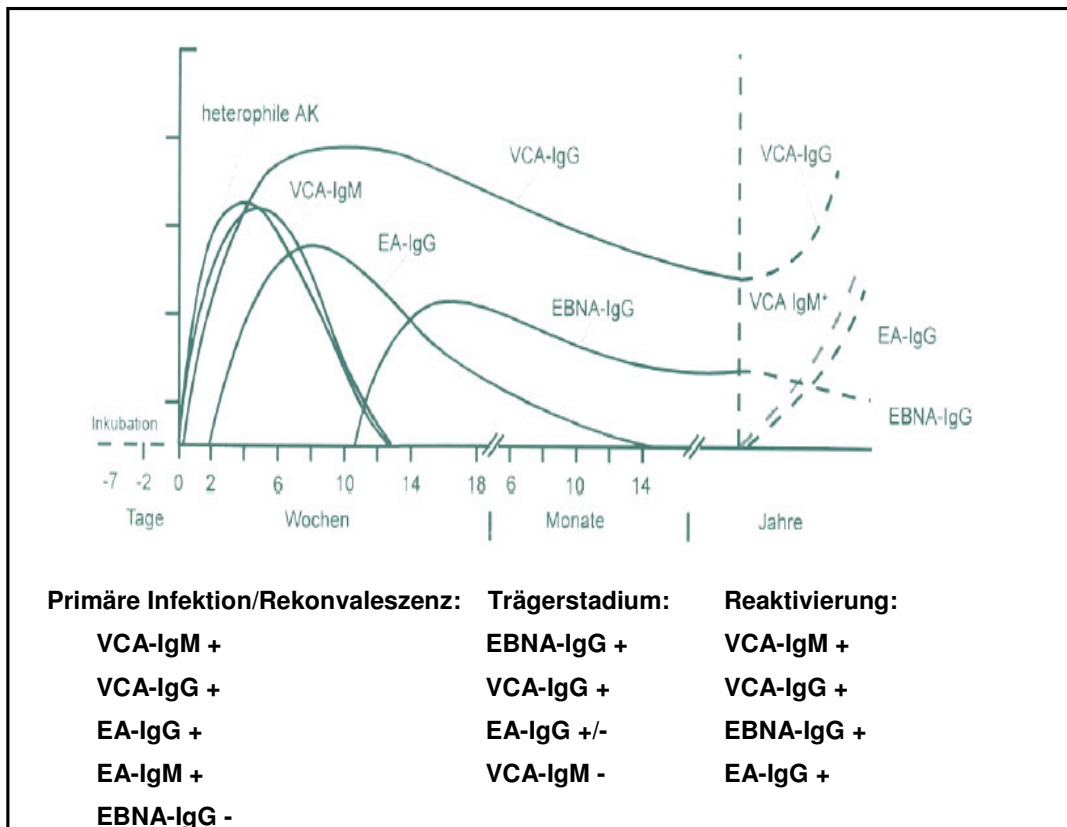


Abbildung 3. Zum longitudinalen Verlauf der EBV-Serodiagnostik

2.4.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay)

Der semiquantitative Nachweis EBV-spezifischer Antikörper erfolgte in unseren Laboruntersuchungen mittels Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).

Für die EBV-spezifischen Antikörper wurden die kommerziell erhältlichen ELISA von *Biotest*, (Dreieich, Germany), bzw. *Euroimmun* (Lübeck, Germany) auf der Basis rekombinanter EBV-Antigene verwendet.

Der Biotest ELISA ist ein hochempfindlicher indirekter Enzymimmunoassay zum Nachweis von EBV-spezifischen Antikörpern im Blut oder Plasma: die Mikrotiter-testplatten der Tests sind mit einem rekombinanten Antigen des Epstein-Barr Virus beschichtet.

Im Folgenden soll das Prinzip hierbei kurz geschildert werden: in einem ersten Schritt interagieren die an den Nöpfchen der Mikrotiterplatte gebundenen (sog. feste Phase) Antigene mit den in der zugesetzten Plasmaprobe gesuchten spezifischen Antikörpern. Enthält die Plasmaprobe Antikörper gegen die immobilisierten Antigene, kommt es zu Antigen-Antikörperbindungen. Nach einem ersten Waschvorgang wird zur Darstellung

der gebundenen Antikörper in einem zweiten Schritt mit den entsprechenden, gegen die jeweilige Immunglobulinklasse des gesuchten Antikörpers gerichteten monoklonalen Antikörpern des Enzym-Konjugates inkubiert, das dann eine sich anschließende Farbreaktion katalysiert. Das unspezifisch gebundene Material wird in mehreren Waschprozessen eliminiert, ebenfalls wird das nicht gebundene Konjugat in einem weiteren Waschvorgang entfernt. Nach Zusatz eines Farbstoff-Substrates (Chromogen) und darauf folgender Inkubation führt die einsetzende Enzymreaktion zu einem Farbumschlag, welcher eine anschließende photometrische Auswertung erlaubt.

Dass hierbei die ELISA-Bestimmung indirekt erfolgt, bedeutet, dass der jeweilige Indikator nicht mit einem spezifischen Reaktanden verknüpft ist, sondern der Weg über einen Zweitantikörper beschriftet wird und nach Substratzugabe dann die vorausgegangene spezifische Bindung angezeigt werden kann.

Die anschließende, im Spektralphotometer gemessene Extinktion ist dabei proportional zur Menge der initial gebundenen spezifischen Antikörper in der gemessenen Plasmaprobe.

Die serologische Untersuchung erfolgte auf fünf verschiedene, EBV-spezifische Antikörper: anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen1 (EBNA1)-IgG, anti-early-Antigen (EA-D)-IgG, -IgA, und -IgM, sowie auf das viral capsid Antigen (VCA)-IgG.

Folgende rekombinante Antigene werden dabei in den Testkits verwendet: EBNA1-p72, EA (D)- p54 und EA p138, sowie VCA p23/p18.

Auf jeder Mikrotiterplatte, auf der 45 Plasmaproben in Doppelbestimmung Platz finden, werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle (P/N) sowie eine Leerprobe (Blank, bzw. Kalibrator) mitgeführt.

2.4.8 ELISA Protokoll für EBV-Antikörper:

- Von allen Proben und ihren Referenzen (P/N) (mit Ausnahme von EA-IgA (hier sind diese bereits gebrauchsfertig)) 25 µl in Rundbodenröhrchen geben und Zugabe von 500 µl gebrauchsfertiger Probenverdünnung.
- Von jeder verdünnten Probe 200 µl in jeweils zwei Wells der Mikrotiterplatte pipettieren (da Doppelbestimmung!). Anschließend pipettieren der Positiv-/ Negativkontrollen.
- Ausnahme: für die Blank 200 µl Proben-Verdünnung pur in das Näpfchen pipettieren (die Kontrollseren bei EA-IgA sind bereits gebrauchsfertig).
- Sorgfältiges Abkleben der Testplatte und Inkubation bei 37°C für 60 Min. (bzw. 30 Min. bei EA-IgA)

- Nach Beendigung der ersten Inkubation fünfmaliger Waschvorgang (Ausnahme hier bei EA-IgA, hier nur dreimaliger Waschvorgang!)
- Zugabe von 100 µl Konjugat (Peroxidase-markiertes monoklonales Anti-Human IgG, IgA, IgM)
- Wieder mit Haftfolie verschließen und Konjugat-Inkubation bei 37 °C für 30 Min.
- Nach Beenden der zweiten Inkubation wiederholter Waschvorgang. Die Platte kurz und kräftig ausschlagen und
- Je 100 µl Substrat Lösung (TMB) in jedes Well und 15 bzw. 30 Min. bei Raumtemperatur (18° bis 25 °C) inkubieren.
- Bei gewisser Geschwindigkeit Zugabe von 100 µl Stop-Lösung und möglichst rasch anschließende photometrische Auswertung mit dem Spektralphotometer bei 450 nm Messwellenlänge gegen eine Referenzwellenlänge von 615 bis 690 nm.

2.4.9 Testauswertung des Biotests ELISA:

Nach Messung aller Extinktionen bei 450 nm wird der Blank-Mittelwert von allen Kontroll- und Probewerten abgezogen. Die Extinktion des Blank-Mittelwertes (O.D.-Wert) darf nicht höher als 0,1 sein.

Die Kontrollen müssen nach Abzug des Blank folgende Bedingungen erfüllen:

- OD-Mittelwert der Negativkontrolle: $\leq 0,2$
- OD-Mittelwert der Positivkontrolle: $\geq 0,4$

für Anti-EBV EA IgG, EBNA IgG und VCA IgG gilt:

- OD-Mittelwert der Positivkontrolle: $\geq 0,8$

Wenn die Mittelwerte der Kontrollen die oben genannten Kriterien nicht erreichen, ist das Testergebnis ungültig und darf nicht dokumentiert werden.

Berechnung des Cut-off-Wertes:

Der Cut-off-Wert berechnet sich aus dem Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrolle NKx plus 0,2.

Cut-off-Wert $\text{NKx} + 0,2$

Die Grauzone liegt im Bereich zwischen Cut-off-Wert und Cut-off Wert minus 10-20 %.

Interpretation der Ergebnisse:

Proben mit einer Extinktion unterhalb der Grauzone sind als negativ zu bewerten.

- a) Falls die Extinktion einer Probe in dem Grauzonenbereich liegt, darf kein nega-

tiver Immunstatus befundet werden. Folgeprobe messen!

- b) Falls die Extinktion größer oder gleich dem Cut-off-Wert ist, so ist die Probe positiv für EBV-spezifische Antikörper.

Testauswertung für Anti-EBV-EA-(D)-IgA (Euroimmun):

Hier entspricht die Extinktion des Kalibrators dem oberen Grenzwert des Referenzbereiches für nicht-infizierte Personen. (Cut-off). Extinktionswerte von Patientenproben oberhalb des Extinktionswertes des Kalibrators gelten als positiv, die darunter liegen als negativ. Neben dieser qualitativen Aussage erlaubt die Berechnung einer Ratio eine semiquantitative Abschätzung des Ergebnisses.

Folgende Formel dient zur Berechnung der Ratio:

$$\frac{\text{Extinktion der Kontrolle bzw. Patientenprobe}}{\text{Extinktion des Kalibrators}} = \text{Ratio}$$

Es gelten folgende Befundinterpretationen:

Ratio < 0,8:	negativ
Ratio ≥ 0,8 bis <1,1:	grenzwertig
Ratio ≥ 1,1:	positiv

Bei Doppelbestimmungen ist der Mittelwert für die Berechnung der Ratio zu verwenden. Weichen die Ergebnisse einer Doppelbestimmung erheblich voneinander ab, empfiehlt es sich, die Probe erneut zu messen.

Für die Untersuchung der Plasmaproben der MS-Patienten und der gesunden Kontrollprobanden auf HSV,- VZV- und hCMV-Antikörper wurde ebenfalls die Methode des ELISA verwendet, hierbei jedoch das kommerziell erhältliche *Enzygnost (DADE Behring, Marburg, Germany)*, welches dem qualitativen Nachweis und der quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen die jeweiligen Herpesviridae dient.

Bezüglich des anti-HSV-IgG ELISA ist darauf hinzuweisen, dass der Test nicht spezifisch zwischen HSV 1 & 2 unterscheidet.

Die in den Untersuchungsproben enthaltenen spezifischen Antikörper gegen HSV, VZV und hCMV binden sich während der ELISA Untersuchungen an das Antigen in den Reaktionsvertiefungen der Mikrotiterplatte (sog. solid phase). Zu dieser Antigen-Antikörperbindung wird der Zweitantikörper (Anti-Human-IgG/POD Konjugat) zugegeben. Im Verlauf setzt dann der Enzymanteil des Konjugates die Chromogen-Gebrauchslösung unter Bildung einer blauen Farbe um. Durch Zugabe von Stop-Lösung (POD) wird dann die Reaktion mit einem sichtbaren Farbumschlag in den rea-

gierenden Reaktionsvertiefungen beendet.

Bei den hier verwendeten Enzygnost-Testplatten, welche mit jeweils inaktivierten HSV,- VZV- oder CMV-Antigenen beschichtet sind, finden 46 Proben in Doppelbestimmung Platz, wobei die linke Reihe eines ELISA-Riegels Antigene aus HSV, CMV oder VZV-infizierten Zellen (permanenten Affennierenzellen bzw. humanen Fibroblasten), die rechte Reihe hingegen Antigene aus nicht infizierten Zellen (= Kontrollantigene) enthält.

2.4.10 ELISA Protokoll für Antikörper von HSV, VZV und CMV:

- Zunächst von allen Proben inklusive der Referenzen (P/N) 20 µl in ein Verdünnungsröhrchen geben und Zugabe von 400 µl angefärbten Proben-Puffer-POD. (0,05 molarer Tris/HCL-Pufferlösung => Verdünnung 1
- Für jede Probe weitere zwei ml nicht angefärbten Proben-Puffer-POD in ein Verdünnungsröhrchen vorlegen => Verdünnung 2
Nun jeweils 200 µl aus Verdünnung 1 in Verdünnung 2 geben => Verdünnung 3
- Von jeder Probe in jeweils zwei Wells der Mikrotiterplatte (da Doppelbestimmung) 200 µl der Verdünnung 3 geben, wobei zuerst die Patientenproben einzupipettieren sind und anschließend die Referenzproben (P/N) zu Beginn und am Ende der Messserie.
- Anschließendes Abkleben der Testplatte und Inkubation bei 37°C für 60 Min.
- Unmittelbar anschließender (fünfmaliger) Waschvorgang mit verdünnter Waschlösung.
- Zugabe von 100 µl Konjugat (Anti-Human-IgG-Anteil eines Kaninchen-Antikörpers gegen Human-IgG konjugiert mit Peroxidase) in jede Vertiefung.
- Testplatte abkleben und Konjugat-Inkubation für 60 Min. bei 37°C.
- Fünfmal waschen mit Waschpuffer.
- Zugabe von 100 µl Substrat-Chromogen-Gebrauchslösung in jede Vertiefung.
- Substrat Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur (lichtgeschützt).
- Je Vertiefung 100 µl Stop-Lösung dazugeben.
- Innerhalb einer Stunde am Spektralphotometer photometrieren bei 450 nm (als Wellenlänge der Referenzmessung von 615-690 nm)

2.4.11 Auswertung der Analysenergebnisse:

Aus den Extinktionsdifferenzen der Referenzen (P/N) wird der Mittelwert gebildet. Der ELISA beigelegten sog. „Barcodewertetabelle“ wird der angegebene Nominalwert entnommen und durch den im Test erzielten ΔE -Mittelwert für die Referenz P/N dividiert und so der Korrekturfaktor ermittelt. Für die qualitative Auswertung gelten folgende Kriterien:

Anti-HSV, CMV, VZV-IgG negativ	$\Delta E < 0,1$ (Grenzwert)
Anti-HSV, CMV, VZV-IgG positiv	$\Delta E > 0,2$
Anti-HSV, CMV, VZV-IgG grenzwertig	$0,100 \leq \Delta E \leq 0,2$

Untersuchungsproben mit einem grenzwertigen Ergebnis müssen erneut in Doppelbestimmungen gemessen werden. Wird das Ergebnis bestätigt, sind die Proben als grenzwertig einzustufen, andernfalls als positiv oder negativ.

Quantitative Auswertung mit Hilfe der *alpha*-Methode

Proben mit IgG-Antikörperreaktivitäten oberhalb des Grenzwertes können mit Hilfe der *alpha*-Methode quantitativ ausgewertet werden.

Zur Berechnung dürfen nicht eingesetzt werden:

- 1.) Messwerte (ΔE) korrigiert $<$ (Grenzwert)
- 2.) Messwerte (ΔE) unkorrigiert $\geq 2,5$.

Die korrigierten ΔE -Messwerte der Untersuchungsproben werden zur Berechnung der Antikörperaktivität in die nachfolgende Formel eingesetzt (*alpha* Methode):

$$\log_{10} \textit{Titer} = \alpha \times \Delta E^{\beta}$$

Dabei sind die chargenabhängigen Konstanten α und β den Testkits beigelegten Barcodewertetabellen zu entnehmen und testspezifisch für eine Aktivitätsangabe als Titer festgelegt.

2.4.12 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung der Beurteilung, ob sich das Auftreten von serologischen EBV-Reaktivierungen, bzw. HSV h-CMV und VZV-Reaktivierungen innerhalb der Patientengruppen und der Kontrollgruppen statistisch signifikant unterscheiden, wurde von uns der „ X^2 -Test“ (Chi-Square Test) angewandt, wobei ein p -Wert von gleich oder kleiner 0,001 als statistisch signifikant angesehen wurde.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney- U -

Test analysiert, auch hier galt p gleich oder kleiner 0.001. Mit Hilfe des Software Programms SPSS 8.0 for Windows (SPSS Inc., Richmond, USA) wurden hierbei die Berechnungen durchgeführt.

Um eine grafische Übersicht der Analysenergebnisse zu erhalten, wurden diese in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt. (siehe grafische Abbildung 4).

Der Box-Whisker-Plot (sog. Schachteldiagramm) liefert dabei eine anschauliche Zusammenfassung über die Häufigkeitsverteilung der SP-Daten, wobei er verschiedene Maße in einem Diagramm zusammenfasst, wie den Median, oberes und unteres Quartil und die Extremwerte, bzw. die Ausreißer.

Der Median ist hierbei in der Box eingezeichnet, welcher durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck von der Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung vermittelt. Als sog. „Whisker“ werden die horizontalen/vertikalen Linien bezeichnet. In der Literatur finden sich drei verschiedene Definitionen über die Länge der Whisker.

Mit Hilfe dieser Box-Whisker-Plots erhält man einen Überblick über die Form der statistischen Verteilung, die den Daten zugrunde liegt.

3. Ergebnisse

3.1 Zur Serologie der EBV-spezifischen Antikörper bei den MS Patienten

Die Plasmaproben der 73 pädiatrischen MS-Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommen wurden, sowie der Kontrollgruppe (n = 77) wurden anhand des Enzymimmunoassays (ELISA) zunächst auf fünf verschiedene EBV-Seromarker analysiert.

Durch die serologischen Untersuchungen der MS-Patientenproben konnte zunächst geklärt werden, ob eine positive oder negative Serologie für den jeweilig zu untersuchenden EBV-spezifischen Antikörper vorlag. Hierfür wurden die Ergebnisse des ELISA-Verfahrens mit anschließender Spektralphotometer-Messung, den Angaben der jeweiligen ELISA Test-Hersteller folgend, nach den schon ausgeführten Analysevorgaben ausgewertet.

Durch die anschließende analytische Auswertung der serologischen Ergebnisse mit Hilfe des Chi-Square Tests und des Mann-Whitney-U-Tests wurden die Werte auf ihre Signifikanz geprüft. Als positiv galt eine nach den Auswahlkriterien der jeweiligen ELISA gemessene Extinktion oberhalb des berechneten Cut-off-Wertes bzw. der ermittelten Ratio.

Bei grenzwertigen Testergebnissen wurde die Patientenprobe erneut untersucht und mit dem Ergebnis der ersten verglichen. Die Bewertung der Ergebnisse beider Proben erlaubte so eine Aussage über mögliche Titerveränderungen, wobei es bei den serologischen Untersuchungen zu keinen uneindeutigen Ergebnissen hinsichtlich Positivität/Negativität in den Untersuchungsserien gekommen war.

Für das *viral capsid antigen* (VCA)-IgG als Seromarker persistierender EBV-Infektionen konnte bei den MS-Patienten eine 100%-ige Seropositivität gemessen werden, d.h. 73/73 der untersuchten Patienten waren seropositiv (Chi-square =23,2; $p < 0,001$).

Bestätigt wurde diese hohe Seropositivität durch das ebenfalls virusspezifische *Epstein-Barr nuclear antigen1* (EBNA1)-IgG. Etwa acht bis zwölf Wochen nach der EBV-Erstinfektion werden EBNA1-Antikörper gebildet, deren Nachweis als Parameter einer länger zurückliegenden Serokonversion dient.

Bezüglich des EBNA1-IgG waren 72/73 Proben serologisch positiv, was eine Seropositivität von 98,7% bedeutet (im Chi-Square ermittelt = 21,4; $p < 0,001$) und demnach eine 1,3%-ige Negativität, bezogen auf alle untersuchten MS-Probanden. Bei der einen MS-Patientin, die serologisch für EBNA1 negativ war, konnte durch

wiederholte Messungen dieses negative Ergebnis bestätigt werden. Die Patientin zeigte jedoch eine VCA-IgG Seropositivität bei sonst negativen EBV-spezifischen Seromarkern, wodurch eine EBV-Primärinfektion ausgeschlossen ist.

Das EBNA1-IgG dient, wie beschrieben, als Marker einer länger zurückliegenden Serokonversion bei gleichzeitiger Negativität von anti-EA-IgG, -IgM und EA-IgA (*early antigen*) oder ausschließlicher Nachweisbarkeit von EA-IgG.

Die nachfolgend gemessenen weiteren, EBV-spezifischen Antikörper, wie anti-EA-IgG, -IgM und -IgA, sind Indikatoren für eine endogene Replikation von EBV im menschlichen Körper.

Für das anti-*early antigen* (D)-IgG ließ sich eine nicht signifikante Seropositivität von 9% (6/73; neg = 91%) ermitteln. Auch *early antigen* (EA) vom Typ -IgM wies mit einer 15%-igen Seropositivität (11/73; neg = 85%) keine Signifikanz auf. Ebenso anti-EA-IgA, welches mit 0/73 der MS-Patienten eine 100%-ige Seronegativität nachweisen ließ.

Die serologische Nachweisbarkeit von Antikörpern gegen anti-EA-IgM und/oder anti-EA-IgG bei gleichzeitigem Nichtvorhandensein von Antikörpern gegen EBNA1 würde für eine primäre Infektion mit dem Epstein-Barr Virus sprechen.

Da bei diesen Seromarkern jedoch in der Prävalenz oder Reaktivität keine signifikanten Seropositivitäten nachzuweisen waren, dafür aber eine 98-100%-ige Positivität für EBNA1 und VCA-IgG, kann damit eine EBV-Primärinfektion der MS-Patienten sicher ausgeschlossen werden.

Die Konstellation von VCA-IgG Seropositivität in Verbindung mit Antikörpern gegen EBNA1-IgG ist als Immunität gegen eine EBV-Primärinfektion zu werten.

Aus folgender Abb. 4 der Box-Whisker-Plots wird die Signifikanz von VCA-IgG und EBNA1-IgG im Vergleich zu der Kontrollgruppe grafisch ersichtlich.

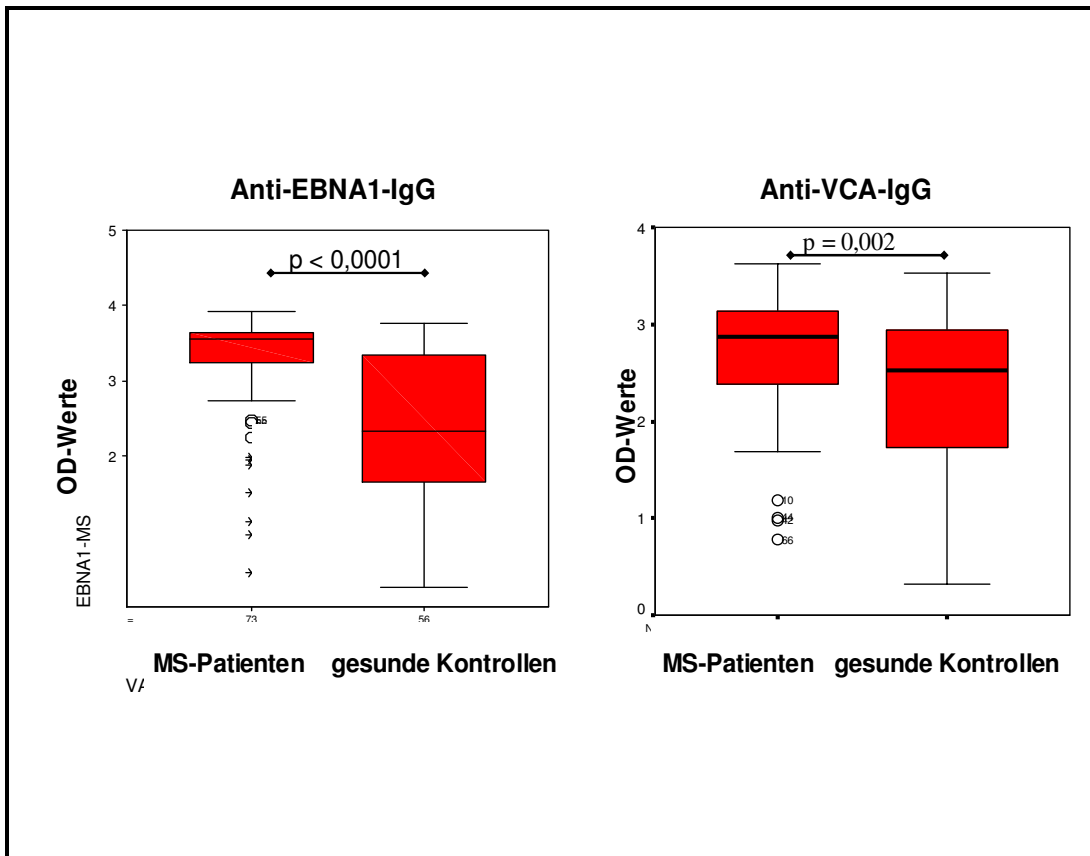


Abbildung 4.: Anti EBNA1-IgG und anti-VCA-IgG Titer von pädiatrischen MS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Darstellung der OD (optical density)-Werte als quantitativer Messwert der Antikörperkonzentrationen im Serum. Die MS-Patienten zeigen signifikant erhöhte EBV-Titer im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2 Zur Serologie der EBV-spezifischen Antikörper der Kontrollgruppe

Bei den eingesetzten 77 Kontrollplasmen mit ungefähr gleicher Alters- und Geschlechtsverteilung konnte eine serologische EBV-VCA-IgG-Positivität von 56/77 festgestellt werden. Das bedeutet, dass 72,7% in dieser Gruppe seropositiv waren (neg = 27,3%). Verglichen mit der 100%-igen Seropositivität der MS-Patienten liegt für letztere ein signifikanter Unterschied von $p < 0,002$ vor.

Für das anti-EBNA1-IgG fanden sich in der Kontrollgruppe 55/77 seropositiv, also 71,4%, (neg = 28,6%), was ebenso eine Signifikanz zu den 98,7% Seropositiven der Patientengruppe darstellt ($p < 0,0001$).

Für die weiteren EBV-spezifischen Antikörper konnten folgende, im Vergleich zu den MS-Patienten sich nicht signifikant unterscheidende Seropositivitäten von EA-

IgG zu 9% (7/77; neg = 91%) EA-IgM zu 8% (6/77; neg = 92%) und EA-IgA zu 2,6% (2/77; neg = 97,4%) ermittelt werden.

3.3 Zur Serologie weiterer Herpesviridae der MS-Patienten

Als zusätzlichen Vergleich zu den EBV-Seromarkern wurden sowohl die MS-Patienten als auch die Kontrollgruppe auf weitere IgG-Antikörper gegen andere Herpesviridae, wie das humane Cytomegalievirus (hCMV), das Herpes-Simplex-Virus (HSV) 1&2 sowie gegen das Varizella-Zoster-Virus mittels Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) untersucht.

Hierbei fanden sich im Vergleich mit den Kontrollprobanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisse wie nachfolglich:

Bezüglich des anti-HSV-IgG (der Test unterscheidet nicht sensitiv zwischen HSV 1&2) waren 37/73 MS-Patienten seropositiv (50,7%; neg = 49,3%). Für das humane Cytomegalievirus waren 11/73 MS-Patienten seropositiv (15,1%; neg = 85%).

Bei dem zuletzt gemessenen Herpesvirus, dem Varizella-Zoster-Virus, war eine deutlich erkennbare höhere Seropositivität in beiden Untersuchungsgruppen zu verzeichnen, so zeigten 69 MS-Patienten eine Antikörperreaktivität, das entspricht 94,5% (neg = 5,5%).

3.4 Zur Serologie weiterer Herpesviridae der Kontrollgruppe

Bei der serologischen Auswertung der Herpesviridae erhielten wir folgende Ergebnisse in der Kontrollgruppe: Für das anti-HSV-IgG erhielten wir eine positive Antikörperreaktivität in 45% der Fälle (35/77; neg = 55%), für das humane Cytomegalievirus waren 23% positiv (18/77; neg = 77%) und für das Varizella-Zoster-Virus konnten wir, der MS-Gruppe ähnlich, eine vergleichsweise hohe Seropositivität von 91% auswerten (70/77; neg = 9%).

Die hohe Seropositivität in beiden Gruppen lässt auf die frühe und hohe Durchseuchung des Varizella-Zoster-Virus schließen, wobei keine Signifikanz zwischen MS-Patienten und Kontrollprobanden im Ergebnis besteht. Die serologische Auswertung der anderen Herpesviridae ist vergleichsweise nicht signifikant.

3.4 PCR Ergebnis

Neben der ausführlichen EBV-Serologie führten wir mittels der quantitativen Real-time PCR-Analyse (*TaqMan ABI Prism 7700, PE Applied Biosystems*) bei den MS-Probanden und der Kontrollgruppe den Nachweis von EBV-DNA im Plasma durch,

wobei beim Ansatz gemäß dem im Methodenteil ausgeführten PCR-Protokolls vorgegangen wurde.

Das Ergebnis ergab eine bezüglich der PCR-Diagnostik 100%-ige Negativität der MS-Patienten ebenso wie der Kontrollprobanden.

Dieses negative Resultat in beiden Untersuchungsgruppen bedeutet, dass keine EBV-Reaktivierungen mittels der Viruslastmessung von freier EBV-DNA im peripheren Blut nachzuweisen waren. Dies schließt jedoch eine serologische EBV-Seropositivität zum gleichen Zeitpunkt nicht aus.

Nachfolgende Tabelle 3 enthält die serologischen Ergebnisse in Übersicht:

	MS-Patienten	Gesunde Kontrollen
Anti-VCA-IgG-positiv¹	73/73 (100%)	56/77 (72,7%)
Anti-EBNA1-IgG-positiv²	72/73 (98,7%)	55/77 (71,4%)
Anti-HSV-IgG-positiv³	37/73 (50,7%)	35/77 (45,5%)
Anti-hCMV-IgG-positiv³	11/73 (15,1%)	18/77 (23,4%)
Anti-VZV-IgG-positiv³	69/73 (94,5%)	70/77 (90,9%)

¹ $\chi^2 = 23,2$; $p < 0,001$

² $\chi^2 = 21,4$; $p < 0,001$

³ = nicht signifikant

Tabelle 3:

Seropositivität für Herpesviren (EBV, HSV, hCMV und VZV) von pädiatrischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen. MS-Patienten waren in 100% der Fälle EBV-infiziert und damit signifikant häufiger als gesunde Kontrollen. Dieser EBV-Serostatus mit Anti-VCA-IgG als Parameter der persistierenden EBV-Infektion wurde mit einem zweiten Parameter (Anti-EBNA1-IgG) kontrolliert und bestätigt. Keine Unterschiede zeigten sich für die Seropositivität von persistierenden HSV-, hCMV- und VZV-Infektionen.

4. Diskussion

Anhand der dargestellten serologischen Ergebnisse konnten wir bei den MS-Patienten eine 100%-ige EBV-Seropositivität durch die signifikant erhöhten Antikörpertiter der EBV-spezifischen Seromarker VCA-IgG (100%) und EBNA1-IgG (98,7%) im Vergleich zu den Kontrollprobanden nachweisen. Gleichzeitig konnten wir das Fehlen einer typischen Konstellation einer EBV-Primärinfektion zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigen.

Konsequenz aus den serologisch signifikanten Ergebnissen der Seromarker für eine persistierende EBV-Infektion (VCA), bzw. einer länger zurückliegenden Seroconversion (EBNA1) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und Probenentnahme ist die Tatsache, dass die 73 untersuchten pädiatrischen Patienten mit „early onset“ Multipler Sklerose bereits vor Beginn des Krankheitsausbruches mit EBV infiziert gewesen sind.

Alotaibi et al. (2004) weisen darauf hin, dass pädiatrische MS-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon einen serologischen Beweis für eine frühere EBV-Infektion aufweisen müssten, wenn das Epstein-Barr Virus tatsächlich in die Initiation der Erkrankung involviert ist.

Die Tatsache, dass unsere gesamten untersuchten MS-Patienten aufgrund der serologischen Konstellation der EBV-Seromarker vor Ausbruch der Erkrankung mit dem EB-Virus infiziert sind, lässt sich auch mit der Annahme von Wandinger et al. (2000) vereinbaren, dass das Epstein-Barr Virus vielmehr als eine Voraussetzung der MS-Entstehung und weniger als eine Konsequenz der Erkrankung verstanden werden könne.

Wie aus unseren serologischen Ergebnissen ersichtlich, waren die anti-EBV-EA-IgG und -IgM Titer der MS-Probanden vergleichbar mit denen der Kontrollen. Auch die Gruppe Munch et al. (1998) fand bei signifikant erhöhtem anti-EBNA1 Titer keine signifikanten anti-EA-IgG und anti-EA-IgM Erhöhungen bei erwachsenen MS-Patienten.

Es ist wichtig, die Bestätigung aus der Literatur, dass auch akute symptomatische EBV-Infektionen (wie bspw. die infektiösen Mononukleose) mit ZNS-Demyelinisierungen einhergehen können (Bray et al., 1992), in diesem Zusammenhang zu erwähnen, wenngleich die große Mehrheit erwachsener MS-Patienten keinen klinischen oder serologischen Nachweis einer akuten infektiösen Mononukleose-Erkrankung zum Zeitpunkt der MS-Diagnose aufweist. Vielmehr lässt sich bei ihnen eine 100%-ige EBNA1-, bzw. VCA-Seropositivität als Indiz einer länger zurückliegenden EBV-Infektion nachweisen (Bray et al., 1983; Larsen et al., 1985;

Ascherio et al., 2000).

Dennoch können EBV-Infektionen, klinisch sich als sehr verschiedenartige neurologische Syndrome präsentierend, unter anderem aseptische Meningitiden, Enzephalitis, postinfektiöse Polyneuritis, Cerebellitis oder auch akute Psychosen auslösen (Bray et al., 1992, Volpi, 2004).

Obgleich die genaue Pathogenese noch unklar ist, scheinen generell alle Teile des Nervensystems einer neurologisch komplizierten EBV-Infektion gegenüber vulnerebel zu sein (Silverstein et al., 1972; Bell und McCormick, 1981).

Haahr et al. (1992, 2004) konnten durch prospektive Studien ein 2,8fach höheres Auftreten von Multipler Sklerose bei Patienten mit vorheriger Infektiöser Mononukleose bei später EBV-Primärinfektion feststellen. In einer schwedischen Studie beschrieben Lindberg et al. (1991) das Risiko für eine Multiple Sklerose nach durchgemachter Infektiöser Mononukleose sogar als 3,7fach erhöht.

An die nun folgenden Interpretationen anzuschließen, lässt sich unser Ergebnis der signifikanten EBV-Serologie der pädiatrischen MS-Patienten auf verschiedene Weise erklären:

- 1) Die MS-Pathogenese wird durch die EBV-Infektion initiiert oder vorangetrieben.
- 2) Ein frühes, klinisch noch nicht apparentes Stadium der Multiplen Sklerose erhöht die Empfänglichkeit von B-Zellen für eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus.
- 3) Es besteht ein gemeinsamer, bisher noch ungeklärter Mechanismus, der die Chance für eine frühe EBV-Infektion und die Entstehung einer „early-onset“ MS erhöht (Alotaibi et al., 2004).

Den genannten Interpretationsmöglichkeiten gegenüber hat sich vor allem die Annahme durchgesetzt, dass die Immunantwort auf Umweltfaktoren (viraler Art) während eines vulnerablen Zeitfensters in der Kindheit für das Entstehen der Multiplen Sklerose-Erkrankung in einer Weise verantwortlich gemacht werden kann (Ascherio et al., 2001; Haahr et al, 2004).

Nach Ascherio et al. (2001) und Bray et al. (1992) sind es mehrere Gründe, die plausibel erscheinen lassen, dem Epstein-Barr Virus hierbei eine besondere Aufmerksamkeit zu schenken: eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus führt zur persistierenden B-Zell-Infektion und anschließender Expansion der transformierten B-Zell-Klone, die jedoch durch eine ausgeprägte T-Zellantwort und die Produktion von Antikörpern gegen die spezifischen viralen EBV-Antigene in ihrer Proliferation eingedämmt werden.

An sich ist die EBV-spezifische T-Zellantwort nicht pathogen, da autoimmune T-

Zellen im ruhenden Stadium bei den meisten gesunden EBV-positiven Erwachsenen vorhanden sind. Aufgrund der massiven Aktivierung des gesamten Immunsystems könnte es jedoch im Rahmen der T-Zellantwort gegen EBV-Antigene durch molekulares Mimikry (d.h. ein fremdes Peptid imitiert ein Selbstantigen) zu einer potentiell pathogenen Aktivierung kreuzreagierender, autoreaktiver T-Zellklone kommen. Für einen MS-Patienten wurde dieser Mechanismus kürzlich belegt und eine Kreuzreaktivität eines T-Zellklones zwischen einem EBV-DNA-Polymerase-Peptid, präsentiert durch eine DR2-positive humane B-Zelllinie (DRB5*0101), und einem Peptid des basischen Myelinproteins (DRB1*1501) gefunden. Letzteres bildet bekanntermaßen die Hauptkomponente der Myelinscheide und ist wesentlich von der Inflammation bei der Multiplen Sklerose betroffen. Diese Entdeckung von Lang et al. (2002) stellt eine funktionelle immunologische Grundlage für einer Kreuzaktivierung autoreaktiver T-Zellen dar.

Ebenfalls von Bedeutung ist die Entdeckung, dass EBV in B-Lymphozyten die Expression des B-Zell-Oberflächen-Proteins alpha-B-Crystallin induziert, eines Hitzeschockproteins, was als ein immundominantes Myelin-Antigen des ZNS bei MS-Patienten identifiziert werden konnte (Van Sechel et al., 1999; Van Noort et al., 2000).

So wird angenommen, dass die Exposition mit dem Epstein-Barr Virus zu einer fehlgerichteten Immunantwort des Wirts auf Autoantigene speziell im ZNS führt, wie z.B. gegen das alpha-B-Crystallin oder das basische Myelinprotein (MBP) (Alotaibi et al., 2004).

Gleichzeitig weisen Alotaibi et al. (2004) jedoch darauf hin, dass das Epstein-Barr Virus nicht das einzige Virus aus der Familie der Herpesviridae ist, welches mit der Multiplen Sklerose-Erkrankung assoziiert wird. So wurde von Ablashi et al. (1998) auch dem Humanen Herpesvirus Typ 6 (HHV6) eine Rolle in der Ätiologie der MS zugeschrieben, vor allem bestätigt durch die Anwesenheit von HHV6-Genom im ZNS-Gewebe und die erhöhten Antikörper-Titer sowohl im Liquor als auch im peripheren Blut von erwachsenen MS-Patienten. Gleichzeitig, so Cuomo et al. (1995), führe eine Infektion mit dem Humanen Herpesvirus 6 (HHV6) der Variante A (nicht B) zu einer Aktivierung des EBV-Genoms in EBV-infizierten B-Zell-Linien. Hierbei kommt es zu einer Expression des sog. ZEBRA-EBV Gens mit anschließender Replikation des Virus. Dabei reguliert das HHV6 die ZEBRA Gen-Transkription durch ein cyclisches AMP-responsive element (CRE) hoch, welches in dem ZEBRA Promoter (ZP) lokalisiert ist (Flamand et al., 1996). So wird auf diese Weise das latente EB-Virus aktiviert. Der Besitz dieses CRE, über welches unter den

Viren u.a. auch die Retroviren verfügen, eröffnet eine Bandbreite von möglichen Interaktionen zwischen verschiedenen Viren, was die Annahme unterstreicht, dass das Zusammentreffen einer multiplen viralen Exposition zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Rolle im Hinblick auf die Entstehung der Multiplen Sklerose spielt.

Swanborg et al. (2003) weisen auf die Schwierigkeit hin, dass fast 100% der untersuchten Population bereits im Alter von zwei Jahren HHV6 infiziert sind und hier zukünftig versucht werden sollte, mittels molekularer Methoden, wie bspw. der PCR, den replikativen, bzw. den latenten Status von HHV6 genauer zu analysieren. Studien beschreiben aber auch eine nicht 100%ige Seropositivität von HHV6 bei MS-Patienten (Soldan et al., 1997; Martin et al., 1997).

Nachgewiesen ist ferner, dass die EBV-transformierten lymphoblastoiden Zell-Linien (LCL's) neben EBV auch HTLV-1, HIV und andere Retroviren beheimaten können (Yamamoto et al., 1982; Lai et al., 1989).

Aufgrund der nicht signifikanten serologischen Unterschiede in der Positivität von HSV, VZV und hCMV bei unseren Probanden gegenüber der Kontrollgruppe ist daraus zu schließen, dass man bei den MS-erkrankten Kindern und Jugendlichen nicht von einer generell erhöhten Virus-Anfälligkeit ausgehen kann.

Die Beobachtung von Alotaibi et al. (2004), in deren pädiatrischer Fall-Kontroll-Studie die gesunden Kontrollprobanden weitaus mehr seropositiv dem Herpes-Simplex-Virus gegenüber waren als die MS-Patientengruppe (90% versus 55%, $p = 0,003$), konnten wir nicht bestätigen. Es zeigte sich in unseren Ergebnissen vielmehr eine leichte Erhöhung von 5% in der HSV-Seropositivität bei den MS-Patienten, was jedoch kein signifikantes Ergebnis ist.

Von Martin (1981) wurde die Hypothese vertreten, dass insbesondere die HSV1-Immunität schützend gegen die Multiple Sklerose-Erkrankung wirke.

Wenn wir also annehmen, dass die Folge einer viralen Exposition im Kindesalter eine Rolle in der Pathobiologie der Multiplen Sklerose spielt, so kann die Überlegung gemacht werden, dass die pädiatrischen MS-Patienten die EBV-Infektion durchmachen ohne den nach Martin (1981) schützenden Vorteil einer frühen HSV1-Infektion.

Casetta und Granieri (2000) vertreten die Ansicht, dass generell durchgemachte Infektionen im frühen Kindesalter einen schützenden Effekt auf die MS haben, wobei spätere Expositionen mit gleichen infektiösen Agentien bei schon ausgereiftem Immunsystem das Risiko der MS-Erkrankung erhöhen.

Wenngleich bei unseren Untersuchungsgruppen nur geringe Unterschiede bezüglich der geografischen Herkunft bestehen, so ist es unwahrscheinlich, einzig diese Tatsache für den signifikanten Unterschied der EBV-Serologie verantwortlich zu

machen.

Nach Cepok et al. (2005) kann die Rolle des Epstein-Barr Virus in der MS-Erkrankung auf folgende Weise erklärt werden:

- 1) Das EB-Virus persistiert in einer Nische im ZNS und wird dort periodisch reaktiviert. Gliazellen, die das EBV-Oberflächenantigen CD21 zu tragen scheinen, welches durch Interaktion mit dem Virus als EBV-Rezeptor fungiert, können unter bestimmten Umständen vom Virus infiziert werden (Menet et al., 1999). Da EBV-RNA bislang mittels Hybridisierungsmethoden noch nicht in den MS-Entmarkungsherden des ZNS entdeckt werden konnte, spricht diese Tatsache eigentlich gegen eine permanente ZNS-Infektion (Hilton et al., 1994).
- 2) Das Virus mag sich periodisch von den infizierten B-Zellen während der aktiven MS in das ZNS-Gewebe ausbreiten, was dort zu einer lokalen antiviralen Immunantwort führt. In diesem Falle würde das EBV nur während eines bestimmten Zeitpunktes, nämlich während eines aktiven neuen Krankheitsschubes, im ZNS aufzuweisen sein.
- 3) Die EBV-Infektion peripherer B-Zellen mag eine kreuzreagierende Autoimmunantwort gegen Antigene des ZNS triggern. Die Reaktivierung des Virus in infizierten B-Zellen vermag eine Autoimmunantwort im ZNS auszulösen, bei der auch der HLA-Komplex involviert ist.

Von *in vivo* Tierexperimenten ist das Konzept bestätigt, dass eine Kreuzreaktivität viraler Antigene mit autoreaktiven T-Zellen experimentelle autoimmune Enzephalomyelitiden (EAE) induzieren kann (Ufret-Vincenty et al., 1998; Gold et al., 2000).

Aus den ausgeführten Aussagen lässt sich folgerichtig der Schluss ziehen, daß das Epstein-Barr Virus mit der Fähigkeit zu einer lebenslangen Persistenz in immunkompetenten B-Zellen und der dadurch gegebenen Voraussetzung, periodisch reaktiviert werden zu können, alle Merkmale in sich vereint, eine anhaltende kreuzreagierende Autoimmunantwort auszulösen zu können (Cepok et al., 2005).

Ferner untersuchte die Gruppe Cepok et al. (2005) die T-Zell-Dominanz in den ZNS-Läsionen erwachsener MS-Patienten und fand eine signifikant erhöhte CD8 T-Zellrespons gegenüber EBV in latent infizierten B-Zellen sowohl im ZNS-Gewebe als auch im cerebrospinalen Liquor (Babbe et al., 2000; Jacobsen et al., 2002; Cepok et al., 2005).

Schon seit einigen Jahren, in denen man immer wieder Beweise für ein komplexes Zusammenspiel zwischen infektiösen Auslösern und dem Krankheitsausbruch der Multiplen Sklerose fand, wird die Multiple Sklerose zunehmend als eine T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit verstanden, wobei das basische Myelinprotein

hierbei als Zielantigen in der Autoimmunogenese eine wichtige Rolle spielt (Wandinger et al., 2000). Ferner wird in diesem Zusammenhang die Aktivierung von enzephalitogenen autoreaktiven T-Zellen im peripheren Immunsystem durch verschiedene virale oder bakterielle Peptide als ein kritisches Ereignis für die Induktion einer Autoimmunkrankheit des ZNS erachtet. Dabei scheint die Induktion von T-Zellen, spezifisch für das Myelin-Antigen, nicht nur durch Antigene, die von der Struktur Ähnlichkeit mit dem Myelin-Epitop haben, ausgelöst werden zu können, sondern genauso auch durch pathogene Antigene, die keine Sequenzhomologie zu dem normalen Autoantigen zeigen. Darüber hinaus scheinen mikrobielle Antigene sogar stärkere Liganden für eine autoreaktive T-Zellantwort darzustellen als immundominante eigene Peptide (Wandinger et al., 2000; Kesselring, 2005). Nicht jede effektive Kreuzreaktion zwischen virusspezifischen und autoimmunem T-Zellen ist notwendigerweise pathogen, denn eine Krankheitsauslösung hängt auch stark davon ab, welche Epitope auf dem jeweiligen Protein erkannt werden (Kesselring, 2005).

Einen konkreten Hinweis auf einen möglichen pathogenetischen Mechanismus von EBV bei der Multiplen Sklerose lieferten Wucherpfennig und Strominger (1995), indem sie zeigten, dass die während des lytischen, d.h. replikativen Zyklus des Virus exprimierte EBV-DNA-Polymerase die Fähigkeit hat, spezifische T-Zell-Klone gegen das basische Myelin Protein (BMP) zu aktivieren. Durch die periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen ist dadurch eine Rolle für EBV auch ohne direkten Erregernachweis in MS-Läsionen denkbar.

Wenn man nun die immunvermittelte Myelin-Destruktion der aktiven MS-Erkrankung als einen Antikörper-abhängigen Prozess versteht, so ist gleichfalls die Bildung von Antikörpern, welche mit den neuroglialen Antigenen während der Immunantwort gegen das EB-Virus kreuzreagieren, von zentraler Bedeutung (Bray et al., 1992).

Wenig ist bisher bekannt über den genauen physiologischen Stimulus, der zu der Reaktivierung einer latenten EBV-Infektion führt. Vom Lymphgewebe der oropharyngealen Mukosa können virale EBV-Reaktivierungen ausgehen. So lässt sich spekulieren, dass zusätzliche Infektionen bei MS-Erkrankten einen stimulatorischen Effekt auf eine EBV-Reaktivierung ausüben. Dass Multiple Sklerose-Patienten durch Triggerung viraler oder bakterieller Infekte meist neue Krankheitschübe erfahren, ist bekannt. Auch konnten aktive virale EBV-Replikationen und erhöhte Titer während akuter MS-Schübe festgestellt werden (Wandinger et al., 2000; Ascherio et al., 2001).

Nun stellt sich die Frage, warum nicht alle EBV-seropositiven Individuen eine Auto-

immunkrankheit speziell des ZNS entwickeln. Auf der einen Seite spielen hierbei Unterschiede in der Affinität und der stimulierenden Potenz des spezifischen trimolekularen Komplexes der T-Zelle, bestehend aus T-Zell-Rezeptor, HLA-Molekül und autoantigenen Peptiden, eine Rolle. Dieser Komplex bildet einen wesentlichen Grundpfeiler der pathogenetischen Interaktion von Genen (HLA), Umwelt (Peptid) und Immunsystem (T-Zell-Rezeptor). Auf der anderen Seite mag auch die erhöhte funktionelle Aktivität von autoreaktiven T-Zellen im Verlauf der Immunantwort gegen EBV bei MS-Patienten als ein Resultat des genetisch determinierten Histokompatibilitäts-Typs und des genannten T-Zell-Rezeptor Repertoires von Bedeutung sein (Wandinger et al., 2000; Kesselring, 2005).

Es könnte argumentiert werden, dass serologisch nachweisbare EBV-Reaktivierungen mehr die Begleiterscheinung der Immunstörung während eines Schubes der MS-Erkrankung sind als deren wirkliche Ursache.

Dagegen spricht in unserem Falle die serologische Evidenz eines bereits vor dem Krankheitsausbruch existenten EBV-Infektions-Musters mit dem Ausschluss einer bestehenden Primärinfektion.

Auch Levin et al. (2005) berichten, dass die EBV-Antikörper-Titer unter den erwachsenen MS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen bereits fünf oder mehr Jahre vor Ausbruch der MS-Erkrankung signifikant erhöht waren. Dies bestätigt die Annahme, dass die erhöhte Antikörper-Response gegen EBV weniger eine Konsequenz der Multiplen Sklerose als vielmehr ein frühes Geschehen in dem pathologischen Prozess ist, der zur Demyelinisierung und schließlich zu dem klinischen Bild der Erkrankung führt.

Auch Studien aus Schweden an erwachsenen MS-Patienten bestätigten einen signifikant erhöhten EBNA1 Titer fünf oder mehr Jahre vor Ausbruch der Erkrankung (Sundström et al., 2004), wobei das Ergebnis nicht für anti-VCA-IgG bestätigt werden konnte.

Lycke et al. (1996) stellten fest, dass in der Gruppe von erwachsenen MS-Patienten, welche mit Acyclovir (einem Nukleosid-Analogon, welches selektiv die Replikation von Herpesviren durch Inhibition der viralen DNA-Polymerase hemmt) behandelt wurden, eine signifikante Reduktion der MS-Schübe nachzuweisen war. Auch Bech et al. (2002) konnten nach Valacyclovir-Behandlung eine Besserung der Krankheitsaktivität wahrnehmen. Als wirkungslos hingegen zeigte sich die Therapie bei der RR-MS (relapsing-remitting) Form. Dennoch ist die Wirksamkeit einer antiviralen Therapie, abhängig von der MS-Form, vereinbar mit der Hypothese, dass ein Virus oder mehrere Viren aus der Gruppe der Herpesviridae bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose involviert sind (Lycke et al., 1996).

Levin et al. (2005) weisen darauf hin, dass sich das Muster der Antikörper-Antwort auf EBV, welches bei untersuchten MS-Patienten beobachtet wurde, grundsätzlich unterscheidet von dem, welches man bspw. bei immunsupprimierten oder an chronisch infektiöser Mononukleose erkrankten Patienten findet. Bei letzteren sind vor allem erhöhte EBNA2-Titer bei gleichzeitig erniedrigten EBNA1-Titern charakteristisch (Lennette et al., 1993).

Derart auffällige Antikörpermuster von erhöhten VCA-IgG- und anti-EBNA1-IgG-Titern schon vor Ausbruch der Erkrankung, wie sie in unseren Ergebnissen zu finden waren, führten zur Aufklärung der EBV-Assoziation mit dem Morbus-Hodgkin sowie dem Nasopharynx-Karzinom (De-Thé, 1982; Mueller et al., 1989), wobei bei letzterem vor allem erhöhte VCA-IgA-Titer in der serologischen Beurteilung von Bedeutung sind (Chien et al., 2001). Ausschließlich erhöhte VCA-IgG-Titer konnten auch in der EBV-assoziierten Pathogenese des Burkitt-Lymphoms gefunden werden (de Thé et al., 1978).

Wie schon erwähnt, werden Mehrfach-Infektionen, die in früher Kindheit durchgemacht werden, mit einer Verringerung des Risikos für eine Multiple Sklerose in Verbindung gebracht. Gleiche Infektionen zu einem späteren Zeitpunkt des Lebens aber werden für ein weitaus höheres Risiko verantwortlich gemacht (Levin et al., 2005; Ponsonby et al., 2005, Ascherio, 2007). Diese Hypothese, oft als „Hygiene-Hypothese“ bezeichnet, beruft sich auf den Zusammenhang von Autoimmunkrankheiten, allergischen Erkrankungen und dem Lebens- bzw. Hygienestandard (Bach, 2002). Nach der „Hygiene-Hypothese“ unterstützen Infektionen und der Kontakt zu Allergenen in den ersten Lebensjahren die Entwicklung des Immunsystems und reduzieren die Gefahr, später an Autoimmunkrankheiten oder Allergien zu erkranken. Als Bestätigung dieser Hypothese kann man u.a. das erhöhte Risiko von Multipler Sklerose bei Patienten mit durchgemachter infektiöser Mononukleose als Manifestation einer späten EBV-Primärinfektion in der Anamnese betrachten (Hernán et al., 2001). Auch die Tatsache der sehr geringen MS-Prävalenz in Entwicklungsländern bei niedrigem Hygienestandard und dadurch im Allgemeinen oftmals früher Exposition von Infektionen bestätigen diese Hypothese. Nach dieser Hypothese müssten Kinder und Jugendliche ohne durchgemachte EBV-Infektion ein deutlich erhöhtes MS-Risiko tragen. Dem ist jedoch nicht so, wie kürzlich die Studie von Alotaibi et al. (2004) zeigen konnte. Hier ist bewiesen worden, dass Kinder mit serologischem Nachweis einer bereits länger zurückliegenden EBV-Infektion ein 8fach erhöhtes MS-Risiko im Vergleich zu Kindern haben, die EBV-seronegativ sind.

So wird deutlich, dass die allgemeine Version der „Hygiene-Hypothese“ nicht hin-

reichend die Ätiologie der Multiplen Sklerose zu erklären vermag. Aus diesem Grund schlugen Levin et al. (2005) als Differenzierung zu der „Hygiene-Hypothese“ die „EBV Variante der Hygiene-Hypothese“ vor, um damit sehr klar zu machen, dass für die MS-Erkrankung im Hinblick auf eine mögliche virale Pathogenese gänzlich andere Bedingungen erfüllt sein müssen.

Weitere epidemiologische Studien, die EBV im Zusammenhang mit dem Auftreten von Lupus Erythematodes bei Erwachsenen untersuchten (James et al., 2001; Gross et al., 2005), weisen darauf hin, dass das Virus generell als ein potenter Risiko-Faktor für den Formenkreis der Autoimmunkrankheiten in Frage kommt.

Zum Vergleich der in der Literatur anderer Arbeitsgruppen gefundenen EBV-seropositiven Ergebnisse bei erwachsenen MS-Patienten soll folgende tabellarische Übersicht dienen:

	<u>MS-Patienten:</u>	<u>Kontrollen:</u>
Sumaya et al. (1980)	155/157 (99%)	75/81 (93%)
Bray et al. (1983)	309/313 (99%)	363/406 (89%)
Larsen et al. (1985)	93/93 (100%)	8/93 (84%)
Sumaya et al. (1985)	104/104 (100%)	99/104 (95%)
Munch et al. (1997)	137/138 (99%)	124/138 (90%)
Ascherio et al. (2001)	141/144 (99%)	66/288 (92,4%)

Tabelle 4. Übersicht der EBV-Serologie von MS-Patienten und Kontrollgruppen im Vergleich aus der Literatur

Untersucht wurde bei diesen Studien auf anti-EBNA1-IgG, wobei die Signifikanz der EBNA1-Seropositivität der MS-Gruppe (99-100%) gegenüber der Kontrollgruppe (84-95%) deutlich erkennbar ist.

Ein ähnlicher Vergleich durch Fall-Kontroll-Studien für pädiatrische „early-onset“ MS-Patienten ist noch nicht gegeben.

Rückblickend lässt sich von unserer ausgehenden Fragestellung zusammenfassen, dass wir bei unseren pädiatrischen „early-onset“ MS-Patienten eine 100%ige EBV-Seropositivität nachweisen konnten. Die gleichzeitige serologische Bestätigung, dass keine EBV-Primärinfektion vorliegt, ist Beweis, dass die pädiatrischen Patienten bereits vor Ausbruch der Multiplen Sklerose mit dem Epstein-Barr Virus

infiziert gewesen sind.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Epstein-Barr Virus in der Ätiologie der Multiplen Sklerose im Kindes- und Jugendalter eine Rolle spielt, deren mögliche Ausmaße aber immer noch nicht hinreichend geklärt sind. Durch die noch sehr geringe Zahl an Studien von EBV und Multipler Sklerose bei pädiatrischen Patienten wären hier, ausblickend für die Zukunft zur Validierung der Ergebnisse weiterführende Untersuchungen mit noch größerem Patientenkollektiv zur Assoziation des Virus mit der MS-Erkrankung, sehr wünschenswert. Ferner wäre es interessant, den serologische Verlauf der EBV-Antikörper-Titer sowohl vor Krankheitsausbruch als auch während der Erkrankung durch weitere Arbeiten zu verfolgen, um eventuelle serologische Veränderungen und Titer-Erhöhungen während eines Krankheitsschubes genauer zu analysieren und dadurch einen möglichen direkten Zusammenhang von EBV-Reaktivierung und Krankheitsaktivität bei pädiatrischen Patienten in Longitudinalstudien aufzeigen zu können.

So mag der weiteren Forschung auf dem Gebiet der EBV-Assoziation mit der Multiplen Sklerose bei Kindern und Jugendlichen zukünftig weiterführende Ergebnisse gelingen, insbesondere auch, was die T-Zellantwort und mögliche Kreuzreaktionen mit EBV-spezifische Antigenen anbelangt. So mag dadurch ein immer besseres Verständnis der viralen Bedeutung, speziell für das Epstein-Barr Virus und dessen pathogenetische Zusammenhäng für die Ätiologie der Multiplen Sklerose entstehen.

Letztendlich auch für den Zweck, neue Therapieansätze zu finden; möglicherweise schon im Vorfeld durch Impfungen prophylaktische Maßnahmen zu treffen oder durch immunologische Interventionen, die in die Virus-Wirt Interaktion eingreifen, die Autoimmunantwort auf das Epstein-Barr Virus beeinflussen zu können.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems mit einer bislang unklaren Ätiologie. Epidemiologische Studien sprechen für eine Assoziation zwischen Epstein-Barr Virus (EBV)-Infektionen und der MS im Erwachsenenalter. Kinder und Jugendliche, die im Vergleich zu Erwachsenen weniger Infektionen durchgemacht haben, sind eine optimale Studienpopulation, um Infektionserkrankungen als Kokatoren für die Entstehung einer MS zu untersuchen. Ziel dieser Studie war es, die Seroprävalenz und Reaktivität von Anti-EBV-Antikörpern bei Kindern und Jugendlichen mit "early-onset" MS im Vergleich zum Serostatus von anderen Herpesviren zu untersuchen.

73 pädiatrische Patienten mit "early-onset" MS (48 Mädchen und 25 Jungen, Altersmedian 15 Jahre, Spannweite 8–23 Jahre) wurden in dieser Studie untersucht. Die untersuchten Blutproben wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gewonnen und mit den 77 Proben von Kontrollprobanden mit ungefähr gleicher Alters- und Geschlechtsverteilung verglichen. Fünf verschiedene EBV-Seromarker (Anti-EBNA1-IgG, Anti-VCA-IgG, Anti-EA-IgG, -IgM and -IgA Antikörper) sowie IgG-Antikörper gegen das humane Herpesvirus 1 und 2 (HSV), das Varicella-Zostervirus (VZV) und das humane Zytomegalievirus (hCMV), wurden bestimmt.

Alle pädiatrischen MS-Patienten waren EBV-seropositiv, nachweisbar durch die Positivität für VCA-IgG (73/73, 100%). Dieses Ergebnis wurde durch den Nachweis von anti-EBNA1-IgG, einem späteren Serokonversionsmarker, für den alle bis auf einen MS-Patienten positiv waren, bestätigt (72/73 MS-Patienten oder 98,7% anti-EBNA1-IgG-positiv). Im Gegensatz hierzu waren die gesunden Kinder und Jugendlichen in nur 72% der Fälle EBV-seropositiv (56/77 Kontrollen anti-VCA-IgG und 55/77 anti-EBNA1-IgG-positiv) ($\chi^2 = 23,2$, $p < 0,001$ für Anti-VCA-IgG und $\chi^2 = 21,4$, $p < 0,001$ für Anti-EBNA1-IgG). Es waren keine primären EBV-Infektionen bei den MS-Patienten festzustellen. VCA-IgG- und EBNA1-IgG-Antikörpertiter waren in der Gruppe der MS-Patienten signifikant erhöht ($p < 0,001$). Keine Unterschiede zeigten sich im Serostatus für HSV, hCMV oder VZV der beiden Gruppen.

Die nachgewiesene 100%-ige EBV-Seropositivität bei den untersuchten Kindern und Jugendlichen mit "early-onset"-MS und das Fehlen einer primären EBV-Infektion belegen, dass die Patienten bereits vor der Entwicklung einer Multiplen Sklerose-Erkrankung mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert gewesen sind. Dieses Resultat spricht für die Hypothese, dass das Epstein-Barr Virus eine Rolle in der Ätiologie der Multiplen Sklerose im Kindes- und Jugendalter spielt.

6. Abkürzungsverzeichnis

ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AHEM	Akute hämorrhagische Enzephalomyelitis
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Anti-	Antikörper gegen
AOMS	adult onset MS - Multiple Sklerose mit Erkrankungsbeginn im Erwachsenenalter
BL	Burkitt-Lymphom
CFS	chronic fatigue Syndrome
CP-MS	chronisch-progressive MS
CRE	cyclic responsive element - zyklisches responsives Element
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DMT	Disease Modifying Therapy – krankheitsmodifizierende Therapie
DNA (DNS)	Desoxyribonukleinsäure
EA	Early Antigen
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EBER	Epstein-Barr kodierte RNA
EBNA	Epstein-Barr Nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EOMS	early onset MS - Multiple Sklerose mit frühem Erkrankungsbeginn
FAM	Farbstoff (6-Carboxy-Fluorescein)
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
g	Erdbeschleunigung
Gp	Glykoprotein
HA	heterophile Antikörper
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HTLV	Humanes T-Zell lymphotropisches Retrovirus
IFN	Interferon

IM	Infektiöse Mononukleose
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
LT	Lymphotoxin
MA	Membranantigen
MBP	myelin basic protein - Basisches Myelinprotein
MDEM	Multiphasische disseminierte Enzephalomyelitis
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
mtDNA	mitochondriale DNA
NMO	Neuromyelitis Optica
NO	Stickoxid
NPC	Nasopharynxkarzinom
O.D.	optische Dichte
OHL	orale Haarleukoplakie
PBMC	peripheral blood mononuclear cells - Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTLD	posttransplant proliferative disease - Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
RNA	Ribonukleinsäure
RQ-PCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction – “real-time quantitative” Polymerase-Kettenreaktion
RR-MS	relapsing remitting MS
SP-MS	secondary progressive MS – sekundär progressive MS
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zellrezeptor
VCA	viral capsid antigen – Virales Kapsid Antigen
VIC	Farbstoff (halogeniertes Fluoresceinderivat)
VZV	Varizella-Zoster-Virus
XLP	X-linked lymphoproliferative Syndrome – X-gekoppelte lymphoproliferative Erkrankung
ZEBRA	Z EBV replication activator
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zp	Zebra promoter

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.	Darstellung der mutmaßlichen <i>in vivo</i> Interaktion zwischen dem Epstein-Barr Virus und seiner Wirtszelle	7
Abb. 2.	Prinzip der „Real-time“ quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (RQ-PCR) durch Ausnutzung der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase.....	39
Abb. 3.	Zum longitudinalen Verlauf der EBV-Diagnostik.....	42
Abb. 4.	Darstellung der Ergebnisse als Box-Whisker-Plots.....	51
Tabelle 1.	Auswahl der Differentialdiagnosen zur Multiplen Sklerose.....	20
Tabelle 2.	Übersicht über die Altersverteilung von MS-Patienten und deren Kontrollgruppe.....	35
Tabelle 3.	Serologische Ergebnisse in der Übersicht.....	53
Tabelle 4.	Übersicht der EBV-Serologie von MS-Patienten und Kontrollgruppe im Vergleich aus der Literatur.....	62

8. Literaturverzeichnis

1. Ablashi, D.V., Lapps, W., Kaplan, M., Whitman, J.E., Richert, J.R. und Pearson, G.R. Human herpesvirus-6 infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Multiple sclerosis* 1998; **4**: 490-496
2. Agrawal, S.M. und Yong, V.W. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007; **79**:99-126
3. Ahrens, N., Salama, A. und Haas, J. Mycophenolate-mofetil in the treatment of refractory multiple sclerosis. *J Neurol* 2001; **248**:713-714
4. Alotaibi, S., Kennedy, J., Tellier, R., Stephens, D. und Banwell, B. Epstein-Barr Virus in Pediatric Multiple Sclerosis. *JAMA* 2004; **291**:1875-1879
5. Ascherio, A. und Munch, M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 2000; **11**:220-224
6. Ascherio, A., Munger, K.L., Lennette, E.T., Spiegelmann, D., Hernan, M.A., Olek, M.J., Hankinson, S.E. und Hunter, D.J. Epstein-Barr Virus Antibodies and Risk of Multiple Sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001; **286**:3083-3088
7. Ascherio, A. und Munger, K.L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol.* 2007; **61**:288-99
8. Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt S., Ravid, R. und Rajewski, K. Clonal expansions of CD8+ T-cells dominate the T-cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; **192**:393-404
9. Bach, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; **347**:911-920
10. Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Simoncini, L., Sarasani, A., Comoli, P., Maccario, R., Fiocchi, R. und Gerna, G. High Levels of Epstein-Barr Virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative Disorders. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:613-9
11. Banwell, B.L. Pediatric Multiple Sclerosis. *Current Neurol Neuroscience Rep* 2004; **4**: 245-252
12. Batchelor, J.R. Immunological and genetic aspects of multiple Sclerosis. New York: Churchill-Livingston Verlag, 1985:281-300
13. Bauer, H.J. Multiple sclerosis in Europe. Symposium Report. *J Neurol* 1987; **234**:195-206
14. Bauer, H.J., Hanefeld, F. und Christen, H.J. Multiple sclerosis in early childhood. *Lancet* 1990; **336**:1190
15. Baumruker, T., Billich, A. und Brinkmann, V. FTY720, an immunomodulatory sphingolipid mimetic: translation of a novel mechanism into clinical benefit in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007; **16**:283-289

16. Bech, E., Lycke, J., Gadeberg, P., Hansen, H.J., Malmestrom, C., Andersen, O., Christensen, T., Ekholm, S., Haahr, S., Hollsberg, P., Bergstrom, T., Svennerholm, B. und Jakobsen, J. A randomized, double-blind, placebo-controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in MS. *Neurology* 2002; **58**:7-8
17. Beer, S. und Kesselring, J. Steroidtherapie bei multipler Sklerose. *Schweiz Med Wschr* 1991; **121**:961-969
18. Bell, W.E. und McCormick, W.F. Neurologic infections in children. *Major Probl Clin Pediatr* 1981; **12** (2nd Ed):1-709
19. Benoist, C. und Mathis, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2001; **2**:797-801
20. Bjartmar, C. und Trapp, B.D. Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurotox Res.* 2003; **5**:157-64
21. Boissy, A. und Fox, R.J. Current treatment options in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol.* 2007; **9**:176-86
22. Bray, P.F., Bloomer, C., Salmon, V.C, Bagley, M.H. und Larsen, P. Epstein-Barr Virus Infection and Antibody Synthesis in Patients with multiple Sclerosis. *Arch Neurology* 1983; **40**:406-408
23. Bray, P.F., Culp, K.W., McFarlin, D.E., Panitch, H.S., Torkelson, R.D. und Schlicht, J.P. Demyelinating disease after neurologically complicated primary Epstein-Barr virus infection. *Neurology* 1992; **42**:278-282
24. Bray, P.F., Luka, J., Bray, P.F., Culp, K.W. und Schlicht, J.P. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* 1992; **42**:1798-1804
25. Burkitt, D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Brit J Surg* 1958; **46**:218-223
26. Burkitt, D. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br med J* 1962; **2**:1019-1023
27. Burkitt, D. A childrens cancer dependent on climatic factors. *Nature* 1962; **194**:232-234
28. Callan, M.F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G.S., Wilson, J.D., O'Callaghan, C.A., Steven, N., McMichael, A.J. und Rickinson, A.B. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo. *J Exp Med* 1998; **187**:1395-1402
29. Casetta, I. und Granieri, E. Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. *J Neurovirol* 2000; **6** (Suppl 2):147-151
30. Cepok, S., Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Stei, S., Büssow, K., Sommer, N. und Hemmer, B. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005; **115**:1352-1360
31. Chien, Y.C., Chen, J.Y., Liu, M.Y., Yang, H.I., Hsu, M.M., Chen, C.J. und Yang, C.S. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med* 2001; **345**:1877-1882
32. Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; **343**:481-492

33. Compston, A. und Coles, A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2002; **359**:1221-1231. Erratum in: *Lancet* 2002; **360**:648
34. Cuomo, L., Angeloni, A., Zompetta, C., Cirone, M., Calogero, A., Frati, L., Ragona, G. und Faggioni, A. Human herpesvirus 6 variant A, but not variant B, infects EBV-positive B lymphoid cells, activating the latent EBV genome through a BZLF-1-dependent mechanism. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; **11**:1241-1245
35. Daikoku, T., Kudoh, A., Fujita, M., Sugaya, Y., Isomura, H. und Tsurumi, T. In vivo dynamics of EBNA1-oriP interaction during latent and lytic replication of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem.* 2004; **279**:54817-54825
36. Dale, R.C., de Sousa, C., Chong, W.K., Cox, T.C., Harding, B. und Neville, B.G. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain* 2000; **123**:2407-2422
37. Dale, R.C. und Branson, J.A. Acute disseminated encephalomyelitis or multiple sclerosis: can the initial presentation help in establishing a correct diagnosis? *Arch Dis Child* 2005; **90**:636-639.
38. Dean, G., Grimaldi, G., Kelly, R. und Karhausen, L. Multiple sclerosis in southern Europe. I: Prevalence in Sicily 1975. *J Epidemiol Community Health* 1979; **33**:107-110
39. De-Thé, G., Day, N.E., Geser, A., Lavoue, M.F., Ho, J.H., Simons, M.J., Sohler, R., Tukei, P., Vonka, V. und Zavadova, H. Seroepidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study- a review. *IARC Sci Publ* 1975; (11Pt 2):3-16
40. De-Thé, G., Geser, A., Day, N.E., Tukei, P.M., Williams, E.H., Beri, D.P., Smith, P.G., Dean, A.G., Bronkamm, G.W., Feorino, P. und Henle, W. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's Lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 1978; **274**:756-761
41. De-Thé, G. Epidemiology of Epstein-Barr virus and associated diseases in man. In: Roizman B, ed. *The Herpesviruses: Volume 1*. New York, NY: Plenum Press; 1982:25-103
42. Domingues, R.B., Kuster, G.W., Lanes, F. und Callegaro, D. Recurrent neuro-myelitis optica with diffuse central nervous system involvement: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; **62**:543-546
43. Duquette, P., Murray, T.J., Pleines, J., Ebers, G.C., Sadovnik, D., Weldon, P., Warren, S., Paty, D.W., Upton, A. und Hader, W. Multiple sclerosis in childhood: clinical profile in 125 patients. *J Pediatr* 1987; **111**:359-363
44. Ebers, G.C. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: Avebury, A., McKhann, G., McDonald, I., eds. *Diseases of the Nervous System*. Pennsylvania. W.B. Saunders Company, 1986:1268-1281
45. Epstein, M.A. und Barr, Y.M. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* 1964; **1**:252-253
46. Epstein, M.A., Achong, B.G. und Barr, Y.M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; **1**:702-703
47. Evans, A.S. und Niedermann, J.C. Epstein-Barr virus. In: Evans, A.S. ed. *Viral infections of humans. Epidemiology and control*, 3rd edn. New York and London: Plenum Book Company, 1989:263-95

48. Fadil, H., Kelley, R.E. und Gonzalez-Toledo, E. Differential diagnosis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007; **79**:393-422
49. Flamand, L. und Menezes, J. Cyclic AMP-responsive element-dependent activation of Epstein-Barr virus zebra promoter by human herpesvirus-6. *J Virol* 1996; **70**:1784-1791
50. Frank, D., Cesarman, E., Liu, Y.F., Michler, R.E. und Knowles, D.M. Posttransplantation lymphoproliferative Disorders Frequently Contain Type A and not Type B Epstein-Barr Virus. *Blood* 1995; **85**:1396-1403
51. Gaeta, A., Nazzari, C., Verzaro, S., Latte, M.C., Fabri, G., Scateni, S., Raggi, C., Lubrano, R. und Mancini, C. Early evidence of lymphoproliferative disorder: post-transplant monitoring of Epstein-Barr infection in adult and pediatric patients. *New Microbiol.* 2006; **29**:231-241
52. Galetta, S.L., Markowitz, C. und Lee, A.G. Immunomodulatory agents for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Intern Med* 2002; **162**:2161-2169
53. Gan, Y.J., Sullivan, J.L. und Sixbey, J.W. Detection of cell-free Epstein-Barr virus DNA in serum during acute infectious mononucleosis. *J infect Dis* 1994; **170**:436-439
54. Garrido, C., Levy-Gomes, A., Teixeira, J. und Temudo, T. Schilder's disease: two new cases and a review of the literature. *Rev Neurol* 2004; **39**:734-738
55. Ghezzi, A., Deplano, V., Faroni, J., Grasso, M.G., Liguori, M., Marrosu, G., Pozzilli, C., Simone, I.L. und Zaffaroni, M. Multiple sclerosis in childhood: clinical features of 149 cases. *Multiple sclerosis* 1997; **3**:43-46
56. Ghezzi, A., Bergamaschi, R., Martinelli, V., Trojano, M., Tola, M.R., Morelli, E., Mancardi, L., Gallo, P., Filippi, M., Zaffaroni, M., Comi, G. und Italian Devic's Study Group (IDESG). Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic's neuromyelitis Optica. *J Neurol* 2004; **251**:47-52
57. Ghezzi, A. Childhood-juvenile multiple sclerosis: clinical characteristics and treatment. *Expert Rev Neurother* 2005; **5**:403-411
58. Gold, R., Hartung, H.P. und Toyka, K.V. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000; **6**:88-91
59. Golden, G.S. und Woody, R.C. The role of nuclear magnetic resonance imaging in the diagnosis of MS in childhood. *Neurology* 1987; **37**:689-693
60. Gonsette, R.E. New immunosuppressants with potential implication in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2004; **223**:87-93
61. Greenfield, J.G. und Norman, R.M.: Demyelinating Diseases. In: Blackwodd, Mc Menemey, W., Meyer, A., Norman, R.M. und Russell, D.S. *Greenfield's Neuropathology* Arnold, London 1971
62. Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lennette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V. und Freese, U.K. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 1985; **313**:1564-1571
63. Gross, A.J., Hochberg, D., Rand, W.M. und Thorley-Lawson, D.A. EBV and systemic Lupus erythematosus: new perspective. *J Immunol* 2005; **174**:6599-6607

64. Haahr, S., Sommerlund, M., Moller-Larsen, A., Mogensen, S. und Andersen, H.M. Is multiple Sclerosis caused by a dual infection with Retrovirus and Epstein-Barr Virus? *Neuroepidemiology* 1992; **11**:299-303
65. Haahr, S. Plesner, A.M., Vestergaard, B.F. und Höllsberg, P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004; **109**:270-275
66. Haahr, S. und Höllsberg, P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol.* 2006; **16**:297-310
67. Hanefeld, F. Multiple sclerosis in childhood. *Curr Opin Neurol and Neurosurg* 1992; **5**:359-363
68. Hanefeld, F. Management of multiple sclerosis in children. *Eur J Neurology* 1998; **5** (Suppl 2):29-30
69. Hanefeld, F., Riemann, D. und Christen, H.-J. Die Multiple-Sklerose-Krankheit im Kindesalter. *Aktuelle Neuropädiatrie* 1997: 231-239
70. Hartung, H.-P., Gonsette, P., König, N., Kwiecinsky, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T. und the MIMIS Study Group. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized, multicentre trial. *Lancet* 2002; **360**:2018-2025
71. Hauser, S.L., Bresnan, M.J., Reinherz, E.L. und Weiner, H.L. Childhood multiple sclerosis: clinical features and demonstration of changes in t cell subsets with disease activity. *Ann Neurol* 1982; **11**:463-468
72. Hauser, S.L., Fleischnick, E., Weiner, H.L., Marcus, D., Awdeh, Z., Yunis, E.J. und Alper, C.A. Extended major histocompatibility haplotypes in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1989; **39**:275-277
73. Heckl, R.W. Multiple Sklerose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1994
74. Hengstman, G.J., Wesseling, P., Frenken, C.W. und Jongen, P.J. Neuromyelitis optica with clinical and histopathological involvement of the brain. *Mult Scler.* 2007; **13**:679-682
75. Henle, G. und Henle, W. Immunfluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 1966; **91**:1248-1256
76. Henle, G., Henle, W. und Diehl, V. Relation of Burkitt tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; **59**:94-101
77. Henle, G. und Henle, W. Observations on childhood infections with the Epstein-Barr virus. *J infect Dis* 1970; **121**:303-310
78. Hernán, M.A., Zhang, S.M., Lipworth, L., Olek, M.J. und Ascherio, A. Multiple Sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 2001; **12**:301-306
79. Hilton, D.A., Love, S., Fletcher, A. und Pringle, J.H. Absence of Epstein-Barr virus RNA in multiple sclerosis as assessed by in situ hybridisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; **57**:975-976
80. Hjalgrim, H., Askling, J., Rostgaard, K., Hamilton-Dutoit, S., Frisch, M., Zhang, J.S., Madsen, M., Rosdahlm N., Konradsen, H.B., Storm, H.H. und Melbye, M. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med.* 2003; **349**:1324-1332

81. Hoffmann, V., Schimrigk, S., Islamova, S., Hellwig, K., Lukas, C., Brune, N., Pohlau, D., Przuntek, H. und Muller, T. Efficacy and safety of repeated Intrathecal triamcinolone acetonide application in progressive multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2003; **211**:81-84
82. Hornef, M.W., Bein, G., Fricke, L., Steinhoff, J., Wagner, H.J., Hinderer, W., Sonneborn, H.H. und Kirchner, H. Coincidence of Epstein-Barr virus reactivation, cytomegalievirus infection, and rejection episodes on renal transplant recipients. *Transplantation* 1995; **60**:474-480
83. Houzen, H., Niino, M., Kikuchi, S., Fukazawa, T., Nogoshi, S., Matsumoto, H. und Tashiro, K. The prevalence and clinical characteristics of MS in northern Japan. *J Neurol Sci* 2003; **211**:49-53
84. Hunter, S.F. und Hafler, D.A. Ubiquitous pathogens: links between infection and autoimmunity in MS? *Neurology* 2000; **55**:164-165
85. Izquierdo, G., Lyon-Caen, O., Marteau, R., Martinez-Parra, C., Lhermitte, F., Castaigne, P. und Hauw, J.J. Early onset multiple sclerosis. Clinical study of 12 pathologically proven cases. *Acta Neurol Scand* 1986; **73**:493-497
86. Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N. und Hemmer, B. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002; **125**:538-550
87. James, J.A., Neas, B.R., Moser, K.L., Hall, T., Brunner, G.R., Sestak, A.L. und Harley, J.B. Systemic Lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum* 2001; **44**:1122-1126
88. Kanegane, H., Nomura, K., Miyawaki, T., and Tosato, G. Biological aspects of Epstein-Barr virus infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies. *Crit Rev in Oncol Hematol* 2002; **44**:239-249
89. Kesselring, J., Brandt, T., Cohen, R., Helmchen, H. und Schmidt, L.R. Multiple Sklerose. Verlag W. Kohlhammer, 4. Auflage, 2005
90. Khan, O.A., Zvartau-Hind, M., Caon, C., Din, M.U., Cochran, M., Lisak, D., Tselis, A.C., Kamholz, J.A., Garbern, J.Y. und Lisak, R.P. Effect of monthly intravenous cyclophosphamide in rapidly deteriorating multiple sclerosis patients resistant to conventional therapy. *Mult Scler* 2001; **7**:185-188
91. Khanna, R., Burrows, S.R. und Moss, D.J. Immune regulation in Epstein-Barr Virus-associated Diseases. *Microbiol Rev* 1995; **59**:387-405
92. Kuroiwa, Y. Neuromyelitis optica in: *Handbook of clinical Neurology*; hrsg. v. Koetsier, J.C.; Band 3; Elsevier Science; Amsterdam 1985:397-408
93. Kurtzke, J.F. Multiple sclerosis in time and space- geographic clues to cause. *J Neurovirol* 2000; **6** (Suppl 2):134-140
94. Kurul, S., Cakmakci, H., Dirik, E. und Kovanlikaya, A. Schilder's disease: case study with serial neuroimaging. *J Child Neurol* 2003; **18**:58-61
95. Lai, P.K., Li, X. und Volsky, D.J. Induction of Epstein-Barr virus in B-lymphoblastoid cells by human immunodeficiency virus type 1. *Int J Cancer* 1989; **43**:1104-1111

96. Lalive, P.H., Perrin, L. und Chofflon, M. Neuromyelitis optica/Devic's syndrome: new perspectives. *Rev Med Suisse*. 2007; **3**:950-955
97. Lang, H.L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y. und Fugger, L. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002; **3**:940-943
98. Larsen, P.D., Bloomer, L.C. und Bray, P.F. Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 1985; **35**:435-438
99. Lassmann, H., Brück, W. und Lucchinetti, C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; **7**:115-121
100. Lassmann, H., Brück, W. und Lucchinetti, C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007; **17**:210-218
101. Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G.W. und Feuillard, J. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood*. 2006; **107**:2070-2078
102. Lennette, E.T., Rymo, L., Yadav, M., Masucci, G., Merk, K., Timar, L. und Klein, G. Disease-related differences in antibody patterns against EBV-encoded nuclear antigens EBNA 1, EBNA 2 and EBNA 6. *Eur J Cancer*. 1993; **29A**:1584-1589
103. Levin, L., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelmann, D. und Ascherio, A. Multiple sclerosis and Epstein-Barr Virus. *JAMA* 2003; **298**:1533-1536
104. Levin, L., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelman, D. und Ascherio, A. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. *JAMA* 2005; **293**:2496-2500
105. Li, Q., Spriggs, M.K., Kovats, S., Turk, S.M., Comeau, M.R., Nepom, B. und Hutt-Fletcher, L.M. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997; **71**:4657-4662
106. Libbey, J.E., McCoy, L.L. und Fujinami, R.S. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*. 2007; **79**:127-147
107. Liebowitz, D. Epstein-Barr virus and a cellular signalling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med* 1998; **338**:1413-1421
108. Ligers, A., Dyment, D.A., Willer, C.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G., Risch, N., Hillert, J. und Canadian Collaborative Study Groups. Evidence of linkage with HLA-DR in DRB1*15-negative families with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2001; **69**:900-903
109. Lindberg, C., Andersen, A., Vahlne, A., Dalton, M. und Runmarker, B. Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiol* 1991; **10**:62-65
110. Low, N.L. und Carter, S. Multiple Sclerosis in children. *Pediatrics* 1956; **18**:24-30

111. Lycke, J., Svennerholm, B., Hjelmquist, E., Frisen, L., Badr, G., Andersson, K.M., Vahlne, A. und Andersen, O. Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *J Neurol* 1996; **243**:214-224
112. Mader, I., Wolff, M., Niemann, G. und Kuker, W. Acute haemorrhagic encephalomyelitis (AHEM): MRI findings. *Neuropediatrics* 2004; **35**:143-146
113. Martin, J.R. Herpes simplex virus type 1 and 2 and multiple sclerosis. *Lancet* 1981; **2**:777-781
114. Martin, C., Enbom, M., Soderstrom, M., Fredrikson, S., Dahl, H., Lycke, J., Bergstrom, T. und Linde, A. Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand* 1997; **95**:280-283
115. Martyn, C.N., Cruddas, M., Compston, D. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; **56**:167-168
116. Matthews, W.B. Clinical aspects. In: Mathews, W.B., Acheson, E.D., Batchelor, R.J. und Weller, R.O.: *McAlpine's Multiple sclerosis*. Churchill Livingstone Verlag, Edinburgh, London 1985:49-233
117. Mazzarello, P., Poloni, M., Piccolo, G., Cosi, V. und Pinelli, P. Intrathecal methylprednisolone acetate in multiple sclerosis treatment: clinical evaluation. *Acta Neurol Belg* 1983; **83**:190-196
118. McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y. und Wolinsky, J.S. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; **50**:121-127
119. Menet, A., Speth, C., Larcher, C., Prodinger, W.M., Schwendinger, M.G., Chan, P., Jager, M., Schwarzmann, F., Recheis, H., Fontaine, M. und Dierich, M.P. Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol* 1999; **73**:7722-7733
120. Middeldorp, J.M., Brink, A., van den Brule, A.J. und Meijer, C.J. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; **45**:1-36
121. Miller, G. Epstein-Barr Virus. *Biology, Pathogenesis and Medical Aspects*. *Virology* 1990:1921-1958
122. Miller, D.H., Robb, S.A., Ormerod, I.E., Pohl, K.R., McManus, D.G., Kendall, B.E., Moseley, I.F. und McDonald, W.I. Magnetic resonance imaging and Demyelinating white matter diseases of childhood. *Dev Med Child Neurol* 1990; **32**:97-107
123. Miller, A. Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, 1998; **18**:309-316
124. Mueller, N., Evans, A., Harris, N.L., Comstock, G.W., Jellum, E., Magnus, K., Orentreich, N., Polk, B.F. und Vogelmann, J. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus: altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; **320**:689-695
125. Müller, R. Studies on disseminated sclerosis. *Acta Med Scand* 1949; **133**:1-214

126. Mullis, K.B. und Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**:335-350
127. Munch, M., Hvas, J., Christensen, T., Moller-Larsen, A. und Haahr, S. The implications of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis- a review. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1997; **169**:59-64
128. Munch, M., Hvas, J., Christensen, T., Moller-Larsen, A. und Haahr, S. A single subtype of Epstein-Barr virus in members of multiple sclerosis clusters. *Acta Neurol Scand* 1998; **98**:395-99
129. Munch, M., Riisom, K., Christensen, T., Moller-Larsen, A. und Haahr, S. The significance of Epstein-Barr virus seropositivity in multiple sclerosis patients? *Acta Neurol Scand* 1998; **97**:171-174
130. Munoz, N., Davidson, R.J., Withoff, B., Ericsson, J.E. und de-Thé, G. Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1978; **22**:10-13
131. Nalesnik, M.A. Clinicopathologic characteristics of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Recent Results Cancer Res* 2002; **159**:9-18
132. Ness, J.M., Chabas, D., Sadovnick, A.D., Pohl, D., Banwell, B., Weinstock-Guttman, B. und International Pediatric MS Study Group. Clinical features of children and adolescents with multiple sclerosis. *Neurology.* 2007; **68**(16 Suppl 2):37-45
133. Niedobitek, G., Herbst, H. und Young, L.S. Epstein-Barr virus and carcinomas. *Int J Clin Lab Res* 1993; **23**:17-24
134. Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H. und Young, L.S. EBV Infection in infectious mononucleosis: Virus Latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997; **182**:151-159
135. Nobel, E. Histologischer Befund in einem Falle von akuter multipler Sklerose. *Wien Med Wochenschr* 1912; **62**:2632
136. Noseworthy, J., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. und Weinshenker, B. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2000; **343**:938-952
137. Olson, J.K., Ercolini, A.M. und Miller, S.D. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005; **296**:39-53
138. Oppenheim, H. Zur Lehre von der multiplen Sklerose. *Berl Klin Wschr* 1896; **33**:184
139. Pfeiffer, E. "Drüsenfieber". *Jahrbuch Kinderheilkunde* 1889; **29**:257-264
140. Pinschewer, D.D., Ochsenbein, A.F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H. und Zinkernagel, R.M. FTY 720 Immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion and memory. *J Immunol* 2000; **164**:5761-5770
141. Pohl, D., Rostasy, K., Reiber, H. und Hanefeld, F. CSF characteristics in early-onset multiple sclerosis. *Neurology* 2004; **23**:1966-1967
142. Pohl, D., Rostasy, K., Gärtner, J. und Hanefeld, F. Treatment of early onset multiple sclerosis with subcutaneous interferon beta-1a. *Neurology* 2005; **64**:888-890

143. Pohl, D., Krone, B., Rostasy, K., Kahler, E., Brunner, E., Lehnert, M., Wagner, H.J., Gartner, J. und Hanefeld, F. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*. 2006; **67**:2063-2065
144. Pohl D., Hennemuth I., von Kries, R. und Hanefeld F. Paediatric multiple sclerosis and acute disseminated encephalomyelitis in Germany: results of a nationwide survey. *Eur J Pediatr*. 2007; **166**:405-412
145. Pohl, D., Waubant, E., Banwell, B., Chabas, D., Chitnis, T., Weinstock-Guttman, B., Tenenbaum, S. und International Pediatric MS Study Group. Treatment of pediatric multiple sclerosis and variants. *Neurology*. 2007; **68**(16 Suppl 2):54-65
146. Ponsonby, A.L., Van der Mei, I., Dwyer, T., Blizzard, L., Taylor, B., Kemp, A., Simmons, R. und Kilpatrick, T. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2005; **293**:463-469
147. Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H. und Tourtellotte, W.W. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; **13**:227-231
148. Poser, C.M. The course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1985; **42**:1035
149. Poser, C.M., Goutieres, F., Carpentier, M.A. und Aicardi, J. Schilder's myeloclastic diffuse sclerosis. *Pediatrics* 1986; **77**:107-112 Erratum in: *Pediatrics* 1986; **78**:138
150. PRISMS Study Group. Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study of Interferon beta-1a in Relapsing Remitting MS. *Lancet* 2000; **352**:1498-1504
151. Pugliatti, M., Sotgiu, S. und Rosati, G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002; **104**:182-191
152. Renoux, C., Vukusic S., Mikaeloff Y., Edan G., Clanet M., Dubois B., Debouverie M., Brochet B., Lebrun-Frenay C., Pelletier J., Moreau T., Lubetzki C., Vermersch P., Roulet E., Magy L., Tardieu M., Suissa S., Confavreux C. und Adult Neurology Departments KIDMUS Study Group. Natural history of multiple sclerosis with childhood onset. *N Engl J Med*. 2007, **356**:2603-2613
153. Rickinson, A.B. und Kieff, E. Epstein-Barr Virus. *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996; **3rd** ed:2397-2446
154. Rostásy, K. Multiple sclerosis in children: clinical, diagnostic, and therapeutic aspects. *Int Rev Neurobiol*. 2007; **79**:269-279
155. Ruggieri, M., Avolio, C., Livrea, P. und Trojano, M. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: a review. *CNS Drug Rev*. 2007; **13**:178-191
156. Sadovnick, A.D. und Ebers, G.C. Epidemiology of Multiple Sclerosis: A Critical Overview. *Can J Neurol Sci* 1993; **20**:17-29
157. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**:487-491
158. Sawada, S. und Takei, M. Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. *Autoimmun Rev* 2005; **4**:106-110
159. Schilder, P. Zur Kenntnis der diffusen Sklerose. *Z Ges Neurol Psychiatr* 1912; **10**:1-60

160. Schmidt, M. Multiple Sklerose. Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart 1992
161. Schumacher, G. A., Beebe, G.W., Kebler, R.F., Kuland, L.T., Kurtzke, J.F., McDowell, F., Nagler, B., Sibley, WA, Tourtellotte, W.W. und Willmon, T.L. Problems of experimental trials of therapy of multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1965; **122**:552-568
162. Schuster, V. und Kreth, HW. Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. I. Pathogenesis, epidemiology and clinical aspects. *Eur J Pediatr* 1992; **151**:718-725
163. Schuster, V. und Kreth, H.W.: Epstein-Barr-Virus-Infektionen. In: Speer, C.P. und Gahr, M. Pädiatrie. 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2001:366-370
164. Schwarz, S., Mohr, A., Knauth, M., Wildemann, B. und Storch-Hagenlocher, B. Acute disseminated encephalomyelitis: a follow-up study of 40 adult patients. *Neurology* 2001; **56**:1313-1318
165. Sheremata, W., Brown, S.B., Curless, R.R. und Dunn, H.G. Childhood Multiple Sclerosis: a Report of 12 cases. *Ann Neurol* 1981; **10**:304
166. Silverstein, A., Steinberg, G. und Nathanson, M. Nervous system involvement in infectious mononucleosis. The heralding and- or major manifestation. *Arch Neurol* 1972; **26**:353-358
167. Simone, I.L., Carrara, D., Tortorella, C., Liguori, M., Lepore, V., Pellegrini, F., Bellicosa, A., Ceccarelli, A., Pavone, I. und Livrea, P. Course and prognosis in early-onset MS: comparison with adult-onset forms. *Neurology* 2002; **59**:1922-1928
168. Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. und Pagano, J.S. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal cells. *N Engl J Med* 1984; **310**:1225-1230
169. Soldan, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.C., Patnaik, M. und Jacobson, S. Association of human herpesviruses-6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997; **3**:1394-1397
170. Steinbrecher, A., Dichgans, J. und Martin, R. Diagnostik und Therapie der multiplen Sklerose. *Nervenheilkunde* 1995;180-188
171. Sumaya, C.V., Myers, L.W. und Ellison, G.W. Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1980; **37**:94-96
172. Sumaya, C.V., Myers, L.W., Ellison, G.W. und Ench, Y. Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1985; **17**:371-377
173. Sundström, P., Juto, P., Wadell, G., Hallmans, G., Svenningsson, A., Nyström, L., Dillner, J. und Forsgren, L. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004, **62**:2277-2282
174. Swanborg, R.H., Whittum-Hudson, J.A. und Hudson, A.P. Infectious agents and multiple sclerosis- are Chlamydia pneumoniae and human herpes virus 6 involved? *J Neuroimmunol* 2003; **136**:1-8

175. Tardieu, M. und Mikaeloff, Y. Multiple Sclerosis in Children. The international MS Journal 2004; **11**:36-42
176. Tenembaum, S., Chamoles, N. und Fejerman, N. Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. Neurology 2002; **59**:1224-1231
177. Tierney, R.J., Steven, N., Young, L.S. und Rickinson, AB. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. J Virol 1994; **68**:7374-7385
178. Troiano, R., Cook, S.D. und Dowling, P.C. Steroid therapy in multiple sclerosis. Point of view. Arch Neurol 1987; **44**:803-807
179. Tsai, M.L. und Hung, K.L. Multiple disseminated encephalomyelitis mimicking multiple sclerosis. Brain Dev 1996; **18**:412-414
180. Twu, C.W., Wang, W.Y., Liang, W.M., Jan, J.S., Jiang, R.S., Chao, J., Jin, Y.T. und Lin, J.C. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007; **67**:130-137
181. Ufret-Vincenty, R.L., Quigley, L., Tresser, N., Pak, S.H., Gado, A., Hausmann, S., Wucherpfennig, K.W. und Brocke, S. In vivo survival of viral antigen-specific T cells that induce experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 1998; **188**:1725-1738
182. Van der Knaap, M.S. und Valk, J: Magnetic Resonance of Myelin, Myelination and Myelin Disorders. 2. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1995:296-314
183. Van Lieshout, H.B., van Engelen, B.G., Sanders, E.A. und Renier, W.O. Diagnosing multiple sclerosis in childhood. Acta Neurol Scand 1993; **88**:339-343
184. Van Noort, J.M., Bajramovic, J.J., Plomp, A.C. und van Stipdonk, M.J. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2000; **105**:46-57
185. Van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., van Stipdonk, J.B., Persoon-Deen, C., Geutskens, S.B. und Van Noort, J.M. EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of α -B crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. J Immunol 1999; **162**:129-135
186. Vassallo, L., Elian, M. und Dean, G. Multiple sclerosis in southern Europe. II: Prevalence in Malta in 1978. J Epidemiol community Health 1979; **33**:111-113
187. Vento, S., Guella, L., Mirandola, F., Cainelli, F., Di Perri, G., Solbiati, M., Ferraro, T. und Concia, E. Epstein-Barr virus as a trigger for autoimmune hepatitis in susceptible individuals. Lancet 1995; **346**:608-609
188. Volpi, A. Epstein-Barr virus and human herpesvirus type 8 infections of the central nervous system. Herpes. 2004; **11** (Suppl 2):120A-127A
189. Wagner, H.J., Hornef, M., Middeldorp, J. und Kirchner, H. Characteristics of viral protein expression by Epstein-Barr virus infected B cells in peripheral blood of patients with infectious mononucleosis. Clin Diagn Lab Immunol 1995; **2**:696-699

190. Wagner, H.J., Henning, H., Jabs, W.J., Siekhaus, A., Wessel, K. und Wandinger, K.P. Altered Prevalence and reactivity of Anti-Epstein-Barr Virus Antibodies in Patients with Multiple Sclerosis. *Viral Immunology* 2000; **13**:497-502
191. Wagner, H.J., Munger, K.L. und Ascherio, A. Plasma viral load of Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *European J of Neurology* 2004; **11**:833-834
192. Wakei, S., Watanabe, Y., Ichiki, T., Watanabe, T., Numata, K., Tachi, N., Matsumoto, H. und Chiba, S. Childhood multiple sclerosis: MR images and clinical variations in four Japanese cases. *Brain Dev* 1994; **16**:52-56
193. Walling, D.M., Etienne, W., Ray, A.J., Flaitz, C.M. und Nichols, C.M. Persistence and transition of Epstein-Barr virus genotypes in the pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis.* 2004; **190**:387-395
194. Wandinger, K.P., Jabs, W., Siekhaus, A., Bubel, S., Trillenber, P., Wagner, H.J., Wessel, K., Kirchner, H. und Henning, H. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000; **55**:178-184
195. Warner, H.B. und Carp, R.I. Multiple Sclerosis Etiology- an Epstein-Barr Virus Hypothesis. *Medical Hypothesis* 1988; **25**:93-97
196. Weigel, G. Die multiple Sklerose im Kindes- und Jugendalter. Klinisches Bild und Verlauf. Med. Diss. Marburg, 1974
197. Weiner, H.L. und Cohen, J.A. Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Mult Scler* 2002; **8**:142-154
198. Weinshenker, B.G. und Ebers, G.C. The Natural History of Multiple Sclerosis. *Can J Neurol Sci* 1987; **14**:255-261
199. Weinshenker, B.G. Neuromyelitis optica is distinct from multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2007; **64**:899-901
200. Weiss, L.M., Strickler, J.G., Warnke, R.A., Purtilo, D.T. und Sklar, J. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; **129**:86-91
201. Weiss, L.M., Chang, K.L. und Hayashi, K. Epstein-Barr virus and Hodgkin's Disease. In: Osato, T., Takada, K., Tokunaga, M., editors. Epstein-Barr virus and human cancer: Gann monograph on cancer research number 45. Tokyo, Japan: Scientific Societies Press, 1998:161-172
202. Winfield, J.B., Shaw, M., Silverman, L.M., Eisenberg, R.A., Wilson, H.A. und Koffler, D. Intrathecal IgG-synthesis and blood-brain barrier impairment in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous dysfunction. *Am J Med* 1983; **74**:837-844
203. Wingerchuk, D.M., Hogancamp, W.F., O'Brien, P.C. und Weinshenker, B.G. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999; **53**:1107-1114
204. Wingerchuk, D.M. The clinical course of acute disseminated encephalomyelitis. *Neurol Res.* 2006; **28**:341-347
205. Wucherpfennig, K.W. und Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; **80**:695-705

206. Yamamoto, N., Matsumoto, T., Koyanagi, Y., Tanaka, Y. und Hinuma, Y. Unique cell line harbouring both Epstein-Barr virus and adult T cell leukaemia virus, established from leukaemia patients. *Nature* 1982; **299**:367-369
207. Young, L.S. und Rickinson, AB. Epstein-Barr Virus: 40 Years on. *Nature Reviews Cancer* 2004; **4**:757-68

9. Anhang

9.1 Danksagung

Mein ganz besonderer und erster Dank an dieser Stelle gilt meinem Doktorvater und ausgezeichnetem Mentor Herrn PD Dr. H-J. Wagner zunächst einmal für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und darüber hinaus für seine stets konstruktive Unterstützung und Förderung während der ganzen Zeit der Arbeit an meiner Dissertation, für seine mich voranbringenden Anregungen und wertvollen Hinweise, seine Diskussionsbereitschaft, Offenheit und Begeisterung und sein großes und stetes Interesse am Werdegang meiner Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. P. Bucsky für die Erlaubnis der Durchführung meiner Arbeit danken, womit er auch einen wichtigen Grundstein für diese legte und zudem Rahmenbedingungen bot, denen letztlich auch das gute Gelingen der Arbeit zu verdanken ist.

Für die stets fachlich qualifizierte, überaus zuverlässige und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor der Universitätskinderklinik Lübeck gilt mein sehr großer Dank besonders Frau Jessica Richter, Frau Anja Sewe und Frau Christiane Stabs, deren Sorgfalt, Geduld und präzises Arbeiten bei der Hilfe von Arbeitsschritten eine unersetzliche Hilfe waren und ein mir immer währendes Vorbild bleiben!

Frau Dr. Daniela Pohl aus Göttingen danke ich zudem sehr herzlich für die Weitergabe wichtiger Daten und die guten anregenden fachlichen Diskussionen.

Einen weiteren sehr großen Dank für das zügige, sorgfältige und sehr qualifizierte Korrekturlesen meines Manuskriptes möchte ich an Frau Susanne Schreck aus Hamburg und Herrn Werner Forneberg aus Bremen richten, die mir mit ihrer Stellungnahme und Kritik, ihren Vorschlägen und Anregungen eine überaus große und sehr wesentliche Hilfe boten.

Nicht zuletzt gilt mein Dank insbesondere all denen, meiner Familie und meinen Freunden, die mir die Vollendung dieser Arbeit mit ihrer Unterstützung, ihrem Vertrauen in mich und ihren guten Ratschlägen ermöglicht haben.

9.2 Curriculum Vitae



Name: Sarah Magdalena Köllmann
geboren am: 02-06-1979 in Hamburg
Eltern: Dr. Jochem Köllmann, Kinderarzt
Dr. Thurid Köllmann, geb. Bell, Allgemeinärztin
Geschwister: Anna Köllmann, David Köllmann, Mathis Köllmann
Familienstand: ledig

Schulbildung und Praktika:

1986 – 1999 Rudolf-Steiner Privatschule, Hamburg
1999 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
08/1999 – 02/2000 Arbeit auf der Jagdfarm „Krumhuk“ in Namibia (Südwestafrika), im Bereich Landwirtschaft, Milchverarbeitung, Gäste,- und Kinderbetreuung, u.a.
02/2000 – 05/2000 Krankenpflegepraktikum in der Filderklinik (Filderstadt, Stuttgart) im Bereich allgem. Kinderheilkunde und Neonatologie
07/2000 – 09/2000 Zweimonatiges Hebammenpraktikum in Windhoek (Namibia)

Studium:

10/2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin in Marburg/Lahn
09/2002 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

08/2003	1. Teil der ärztlichen Prüfung
10/2003	Hochschulortwechsel und Fortsetzung des Studiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck (UKSH, Campus Lübeck)
01/2004	Beginn der Dissertation unter der Leitung PD Dr. H-J. Wagner in der pädiatrischen Abteilung des UKSH, Campus Lübeck
03/2006	2. Teil der ärztlichen Prüfung
06/2007	3. Teil der ärztlichen Prüfung
08/2007 – 12/2007	ärztliche Bereitschaftsdienste im Marienkrankenhaus Lübeck (Belegarztkrankenhaus mit den Abteilungen Innere, Chirurgie, Gynäkologie, HNO und Urologie, u.a.)
seit 01/2008	Assistenzärztin der Pädiatrie in der HELIOS-Klinik Plauen, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Leipzig

Famulaturen:

03/2003	Krankenhausfamulatur im Bereich Innere/-Kardiologie, Krankenhaus „Barmherzige Brüder“, Wien
09/2003	Praxisfamulatur im Bereich Pädiatrie, Hamburg
07/2004 - 09/2004	Krankenhausfamulatur im „Migori Hospital“, Kenia, Ostafrika, im Bereich Gynäkologie, Pädiatrie, Innere, Chirurgie
02/2005 – 03/2005	Famulatur in der Kinderchirurgie des UKSH, Campus Lübeck
07/2005 – 08/2005	Krankenhausfamulatur in der pädiatrischen Hämatologie/Onkologie im UKE, Hamburg

Praktisches Jahr:

04/2006 – 06/2006	1. Terial Wahlfach Pädiatrie: zwei Monate im „Hospital for Sick Children“ Toronto, Kanada, im Department of Infectious Diseases
06/2006 – 08/2006	1. Terial Wahlfach Pädiatrie: zwei Monate im UKSH, Campus Lübeck, (Onkologie & pädiatrische Notfallambulanz)

- | | |
|-------------------|--|
| 08/2006 – 12/2006 | 2. Tertiäre Chirurgie: „Spital Menziken“, Menziken, Schweiz |
| 12/2006 – 03/2007 | 3. Tertiäre Medizin: Ambulatory Medicine (Urgent Care Department), Gastroenterology und Hematology/Oncology an der UCSD MedSchool, VA Hospital, San Diego, Kalifornien |

Tätigkeiten während des Studiums:

- | | |
|-------------------|--|
| 3/2001-06/2003 | Studentische Sitz- sowie Nachtwachen in verschiedenen Abteilungen (inkl. Intensivpatienten Überwachung) der Uniklinik Marburg/Lahn |
| 2002 | Tutor des Neuroanatomiekurses für Vorkliniker als studentische Hilfskraft |
| 10/2003-06/2004 | Arbeit in der ambulanten häuslichen Krankenpflege als studentische Aushilfe im Raum Lübeck |
| 10/2004 – 09/2005 | Stud. Nachtwache im Krankenhaus Rotes Kreuz Lübeck |
- Während des gesamten Studiums Mitwirkung als 1. Geige in den Universitätsorchestern der Städte Marburg/Lahn und Lübeck

9.3 Kongressbeiträge und Publikationen

- Posterpräsentation auf dem 11. internationalen Epstein-Barr Virus-Kongress, 20.-25. September 2004 in Regensburg:

Wagner HJ, **Köllmann S**, Bucsky P, Hanefeld F, Pohl D.
„Association of Epstein-Barr virus infection with multiple sclerosis in pediatric patients”

- Posterpräsentation auf der 31. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, 21.-23. April 2005 in Erlangen:

Wagner HJ, Pohl D, **Köllmann S**, Bucsky P, Sperner J, Hanefeld F.
„Assoziation von Epstein-Barr Virus-Infektionen mit der Multiplen Sklerose bei pädiatrischen Patienten“

→ Dafür Erhalt eines Posterpreises von der Gesellschaft für Neuropädiatrie.

- Wagner HJ, Pohl D, **Köllmann S**, Bucsky P, Sperner J, Hanefeld F

„Association of Epstein-Barr virus infection with multiple sclerosis in pediatric patients”; *Neuropediatrics* 2005; **36**:167

- **Köllmann S**, Pohl D, Hanefeld F, Wagner HJ

„Zur Assoziation zwischen der Epstein-Barr Virusinfektion und der multiplen Sklerose im Kindes- und Jugendalter“, *Aktuelle Neuropädiatrie* 2005, Novartis Pharma Verlag, Nürnberg 2006; 341-346