

Aus der Abteilung Neurologie
des Zentrums Neurologische Medizin
in der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Spezifität der systemischen und intrathekalen Immunantwort
bei der Infektion mit dem humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1)**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
in der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

von
Bernd Kitze

Göttingen 2001

INHALTSVERZEICHNIS

0.	ABKÜRZUNGEN, KURZBEZEICHNUNGEN UND NOMENKLATUR	6
1.	EINLEITUNG	9
1.1.	Eigenschaften des humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1)	10
1.1.1.	Übertragung, Zelltropismus und Virusnachweis	10
1.1.2.	Struktur des retroviralen Genoms und Regulation der Genexpression in HTLV-1 infizierten CD4+ T-Lymphozyten	13
1.1.3.	Auswirkungen der HTLV-1 Infektion auf das Immunsystem	15
1.1.4.	Epidemiologie der HTLV Infektionen	16
1.1.5.	Spektrum der HTLV assoziierten Erkrankungen	17
1.2.	Die HTLV-1 assoziierte Myelopathie / tropische spastische Paraparese (HAM/TSP)	18
1.2.1.	Symptome, klinische und neurophysiologische Untersuchungsbefunde	18
1.2.2.	Neuropathologie von HAM/TSP	20
1.2.3.	Molekularbiologische und immunologische Charakteristika von HAM/TSP	21
1.3.	Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunantwort gegen HTLV-1	24
2.	ZIELSETZUNG UND VORGEHEN	27
3.	PATIENTEN, PROBENMATERIAL UND METHODEN	28
3.1.	Patienten: Ethnische Herkunft, Art der Erkrankungen und untersuchte Proben	28
3.2.	Immunchemische Untersuchungen von Liquor und Serum	31
3.2.1.	Grundprogramm der Liquoranalytik	31
3.2.2.	Enzymimmunoassay für Antikörper gegen HTLV-1 infizierte Zellen	32

3.2.3. Differenzierung der HTLV-1 Antikörper mittels Radioimmunpräzipitation	33
3.2.4. Enzymimmunoassay unter Verwendung synthetischer Peptide	34
3.2.5. Intrathekale Synthese von Antikörpern gegen HTLV-1 Antigene und synthetische Peptide	36
3.3. HLA Typisierung und Identifikation der HLA Haplotypen	37
3.4. Charakterisierung antigenspezifischer CD4+ T-Lymphozyten	38
3.4.1. Isolierung und Selektion	38
3.4.2. Untersuchung der Feinspezifität und der T-Zell Epitope	41
3.4.3. Untersuchung der HLA Restriktion	41
3.4.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis der proviralen HTLV-1 Integration in T-Zell Linien	42
3.5. Analyse von Sequenzhomologien der immundominanten Epitope	43
3.6. Auswertungen	44
4. ERGEBNISSE	46
4.1. Spezifität der intrathekalen und systemischen humoralen Immunantwort gegen HTLV-1 Proteine	46
4.1.1. Bindung von Antikörpern an Antigene der HTLV-1 infizierten Zell Linie MT-2	46
4.1.2. Radioimmunpräzipitation von HTLV-1 Antigenen durch Antikörper im Liquor und Serum	50
4.1.3. Feinspezifität der humoralen Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene	53
4.2. Lineare B-Zell Epitope der intrathekalen Immunantwort gegen HTLV-1	55
4.2.1. Feinspezifität der humoralen Immunantwort bei HTLV-1 Infizierten mit und ohne HAM/TSP	57
4.2.2. Vergleich von intrathekalen und systemischer humoraler Immunantwort	58
4.2.3. Veränderung der spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese im Verlauf von HAM/TSP	60

4.2.4.	Antikörper gegen synthetische Peptide von HTLV-1 tax und rex	63
4.3.	Korrelation von HLA Haplotypen und intrathekaler Immunantwort	63
4.4.	Das HTLV-1 Transmembranglykoprotein gp21 als CD4+ T-Zell Antigen	66
4.5.	Besonderheiten der immundominanten T-Zell Epitope des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21	69
4.6.	Provirale Integration des HTLV-1 Retrovirus in T-Zell Linien	73
5.	DISKUSSION	74
5.1.	Besonderheiten der HTLV-1 Infektion und der assoziierten neurologischen Erkrankungen	74
5.2.	Charakteristika der intrathekalen und systemischen humoralen Immunantwort bei HAM/TSP	77
5.3.	Pathogenetische Bedeutung der spezifischen, durch B-Lymphozyten vermittelten Immunantwort	79
5.4.	Pathogenetische Bedeutung der spezifischen, durch CD4+ T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort	81
5.4.1.	HLA Restriktion und T-Zell Epitope	81
5.4.2.	Kooperation von CD4+ T- Lymphozyten mit B-Lymphozyten	84
5.4.3.	Bedeutung der CD4+ T-Zell Funktionen bei experimentellen, Virusinfektionen	86
5.5.	Das HTLV-1 Transmembranglykoprotein gp21	87
5.5.1.	Struktur und Funktion des HTLV-1 Transmembranglykoproteins	87
5.5.2.	Immundominante Epitope in Bezug zu Struktur und Funktion des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21	89
5.5.3.	Verteilung von B- und T-Zell Epitopen des HTLV-1 gp21 und Vergleich mit anderen Antigenen	91
5.5.4.	Betrachtungen zur Phylogenese der retroviralen Hüllproteine und der Immunantwort des Wirtsorganismus	94

5.6.	Vergleich mit anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS	95
5.6.1.	HIV-1 assoziierte Erkrankungen des Rückenmarks	95
5.6.2.	Multiple Sklerose	96
5.6.3.	Immunpathogenetische Mechanismen im ZNS	99
6.	ZUSAMMENFASSUNG	100
7.	LITERATURVERZEICHNIS	102

0. ABKÜRZUNGEN, KURZBEZEICHNUNGEN UND NOMENKLATUR

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> (erworbenes Immunschwächesyndrom)
APC	<i>Antigen-presenting cells</i> (antigenpräsentierende Zellen)
ATL	<i>Adult T-cell lymphoma</i>
ASI	Antikörper-Spezifitätsindex
AVIRE	<i>Avian reticuloendotheliosis virus</i>
BAEVM	<i>Baboon endogenous virus</i>
BIV	<i>Bovine immunodeficiency virus</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> (Algorithmus zur Berechnung von Homologien in Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen)
BLV	<i>Bovine leukemia virus</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Gruppen von Zelloberflächenmolekülen)
CDR	<i>Complementarity determining regions</i> (komplementaritätsbestimmende Regionen von Antikörpern oder T-Zell Rezeptoren, die Kontakt zu den Epitopen des Antigens haben)
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
cv	<i>Coefficient of variation</i> (Variationskoeffizient)
DIF	<i>Data interchange format</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i> (Enzymimmunoassay)
env	Retrovirale Sequenz für Oberflächen- und Transmembranproteine (<i>envelope glycoproteins</i>)
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> (Fragment des Antikörpermoleküls, das kein Antigen bindet, aber einen Liganden für Rezeptoren darstellt)
FENV	<i>Feline endogenous virus</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i>
FOAMV	<i>Human spumaretrovirus (foamy virus)</i>
g	Gravitationsbeschleunigung auf der Erde (anschauliches Maß für die Zentrifugalbeschleunigung bei der Zentrifugation)
gag	Retrovirale Sequenz für Matrix- und Kapsidproteine (<i>group antigens; core proteins</i>)
HAM/TSP	<i>HTLV-1 associated myelopathy / tropical spastic paraparesis</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
HIV-2	<i>Human immunodeficiency virus 2</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HSWB	<i>High salt washing buffer</i> (Puffer zum Auswaschen nicht an Protein-G-Sepharose gebundener Immunkomplexe)
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i>
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i> (auch HTLV-I abgekürzt)
HTLV-2	<i>Human T-lymphotropic virus 2</i> (auch HTLV-II abgekürzt)
IFA	Immunfluoreszenzassay
Ig	Immunglobulin

IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
IU	<i>International unit</i> (internationale Einheit)
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LSEB	<i>Low salt extraction buffer</i> (Puffer zur Extraktion von markierten Virusantigenen)
LSWB	<i>Low salt washing buffer</i> (Puffer zum Auswaschen nicht an Protein-G-Sepharose gebundener Immunkomplexe)
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
m	<i>mean</i> (Mittelwert)
MBP	<i>myelin basic protein</i> (basisches Myelinprotein)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLV	<i>Murine leukemia virus</i>
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
MOG	Myelin/Oligodendrozyten-Glykoprotein
MPMV	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>
mRNS	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MS	Multiple Sklerose
MT-2	HTLV-1 infizierte Zell Linie aus Nabelschnurlymphozyten
n	Variable für Anzahl
NFkB	Nukleärer Faktor kappa B
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK	<i>natural killer (cells)</i> (natürliche Killerzellen)
p	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit bei Verwerfen der Arbeitshypothese
PAA	<i>Particle agglutination assay</i> (Partikelagglutinationsassay)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Lymphozyten und Monozyten aus dem peripheren Blut)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (auf physiologischen pH und physiologische Osmolarität eingestellte, mit Phosphat gepufferte Lösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pol	Retrovirale Sequenz für die reverse Transcriptase, RNase H und Integrase
pX	Sequenz am 3'-Ende des proviralen HTLV Genoms, die u.a. für die tax- und rex-Proteine kodiert
rex	HTLV Protein, das die Anreicherung von mRNS unterstützt, die nicht dem " <i>splicing</i> " unterworfen wurde und zur Bildung von retroviralen Enzymen und Strukturproteinen führt
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (Radioimmunpräzipitationsassay)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Zellkulturmedium
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion nach Herstellung einer komplementären DNS aus RNS mittels reverser Transkriptase
sd	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidelektrophorese
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
STLV	<i>Simian T-cell lymphotropic virus</i>
SU	<i>Surface glycoprotein</i> (Oberflächenglykoprotein)
tax	HTLV Protein, das die Expression retroviraler und zellulärer Proteine durch Transaktivierung fördert
TE	TRIS-Chlorid/EDTA-Puffer

Th1	<i>T helper type 1</i> (CD4+ T-Lymphocyten, die eine zellvermittelte Immunantwort stimulieren)
Th2	<i>T helper type 2</i> (CD4+ T-Lymphocyten, die eine humorale Immunantwort stimulieren)
TM	<i>Transmembrane glycoprotein</i> (Transmembranglykoprotein)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Tumornekrosefaktor)
TRE	<i>tax responsive element</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WBA	<i>Western blot assay</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Die Nomenklatur immunologischer Abkürzungen und Begriffe richtete sich nach der deutschen Übersetzung des immunologischen Lehrbuches von Janeway und Travers (1995), die virologischen Abkürzungen nach Haller und Mertens (1999).

1. EINLEITUNG

Zu Beginn der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurde am "*National Institute of Health*" der Vereinigten Staaten von Amerika durch die Arbeitsgruppe um Robert C. Gallo ein Retrovirus aus den Lymphozyten eines Patienten mit einem kutanen T-Zell Lymphom isoliert (Poiesz et al. (1980), Reitz et al. (1981)). Das erste bekannte menschliche Retrovirus wurde später "*human T-lymphotropic virus 1*" (HTLV-1) genannt. In den folgenden Jahren zeigten verschiedene Untersuchungen, daß Retroviren Erkrankungen sowohl des Nervensystems als auch des Immunsystems verursachen können. Die neurologischen Komplikationen des erworbenen Immunschwächesyndroms (AIDS) wurden von Snider et al. (1983) beschrieben. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, daß das Murine Leukämie Virus (MLV) in bestimmten Mäusestämmen entweder Lymphome oder eine neurologische Erkrankung mit Lähmung der hinteren Extremitäten hervorrief (Pal et al. (1983)).

HTLV-1 wurde zunächst als Ursache eines in Japan charakterisierten Lymphoms, des adulten T-Zell Lymphoms ("*adult T-cell lymphoma*"; ATL) (Uchiyama et al. (1977), Miyoshi et al. (1982)), identifiziert. Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten auch Patienten mit chronisch progredienten spastischen Paraparesen auf Antikörper gegen HTLV-1. Das Syndrom der spastischen Paraparese tritt in den Tropen und Subtropen häufig auf (Montgomery et al. (1964)) und wurde deswegen tropische spastische Paraparese (TSP) genannt. In verschiedenen, für HTLV-1 endemischen Gebieten wurde etabliert, daß das Auftreten chronisch progredienter spastischer Paraparesen mit der HTLV-1 Infektion zusammenhängt (Gessain et al. (1985), Rodgers-Johnson et al. (1985), Osame et al. (1986)). Die neue klinische Entität wurde nun HTLV-1 assoziierte Myelopathie / tropische spastische Paraparese (HAM/TSP) genannt (Osame (1990)) und lenkte das Interesse von klinisch tätigen Neurologen, Neuroimmunologen und Virologen auf das Retrovirus HTLV-1 und seine molekularbiologischen und immunologischen Besonderheiten. Seitdem entwickelten sich zahlreiche neue Erkenntnisse über das klinische Spektrum der HTLV-assozierten Erkrankungen, über die Epidemiologie von HTLV-1 und HTLV-2 Infektionen, über die besonderen molekularbiologischen Eigenschaften von HTLV, die Virus-Zell- und Virus-Immunsystem-Interaktionen und letztendlich über die Pathogenese einer neurologischen Erkrankung, die durch eine persistierende retrovirale Infektion hervorgerufen wird.

1.1. Eigenschaften des humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1)

In der Systematik der Virus Klassifikation gehört HTLV-1 zur Familie der *Retroviridae* (Retroviren) und zusammen mit HTLV-2, den verschiedenen T-lymphotropen Viren der Affen ("*simian T-lymphotropic virus*"; STLV) und dem bovinen Leukämie Virus (BLV) zu einem eigenen Genus, das Deltaretrovirus (van Regenmortel (2000)) bzw. die HTLV-BLV Gruppe genannt wurde (Coffin et al. (1995)). Die HTLV-BLV Gruppe ist durch eine zusätzliche Sequenz pX am 3'-Ende der proviralen Desoxyribonukleinsäure (DNS) charakterisiert, pX kodiert die regulatorischen Proteine tax und rex (Seiki et al. (1983)). Elektronenmikroskopisch hat das Retrovirus HTLV-1 eine Ähnlichkeit mit den Typ C Retroviren der Säugetiere, z.B. den Mäuse Leukämie Viren ("*murine leukemia virus*"; MLV) (Poiesz et al. (1980)), obwohl es einem anderen Genus zugeordnet wird (Coffin et al. (1995)). Das Retroviruspartikel hat einen Durchmesser von 110 bis 140 nm (Koralnik (1996)). Es besteht aus einer Hülle und einem Kern, der 2 Kopien des retroviralen RNS Genoms enthält, sowie die Enzyme reverse Transkriptase (RT) und Integrase (Koralnik (1996)). Die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen der retroviralen Hüllglykoproteine zeigt, daß HTLV-1 und HTLV-2 im Vergleich zu allen anderen Retroviren (einschließlich BLV, MLV, den humanen Immundefizienzviren und Spumaretroviren) in der Evolution eine eigenständige Entwicklung vollzogen haben (Abbildung 1). Ein wichtiger Unterschied im Vergleich zu den anderen humanpathogenen Retroviren, den humanen Immundefizienzviren ("*human immunodeficiency virus*"; HIV), wird an dem Stammbaum der retroviralen Hüllproteine (Abbildung 1) deutlich: Die Hüllproteine der HTLV Isolate unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Aminosäuresequenz, d.h. sie sind stark konserviert, während die HIV Isolate eine erhebliche Variation der Aminosäuresequenz zeigen.

1.1.1. Übertragung, Zelltropismus und Virusnachweis

Wie der Name "*human T-cell lymphotropic virus*" besagt, treten Infektionen mit HTLV-1 und HTLV-2 nur beim Menschen auf. Die HTLV-1 Infektion wird beim Stillen von der infizierten Mutter auf den Säugling übertragen (Hino 1990). Weiterhin gibt es die Übertragung beim Geschlechtsverkehr, häufiger vom Mann auf die Frau als umgekehrt (Kajiyama et al. (1986)). In den vergangenen Jahrzehnten kam es zu einer nennenswerten Übertragung von HTLV-1 durch Bluttransfusionen (Osame et al. (1990)) und durch intravenösen Drogengebrauch (Schwebke et al. (1994)).

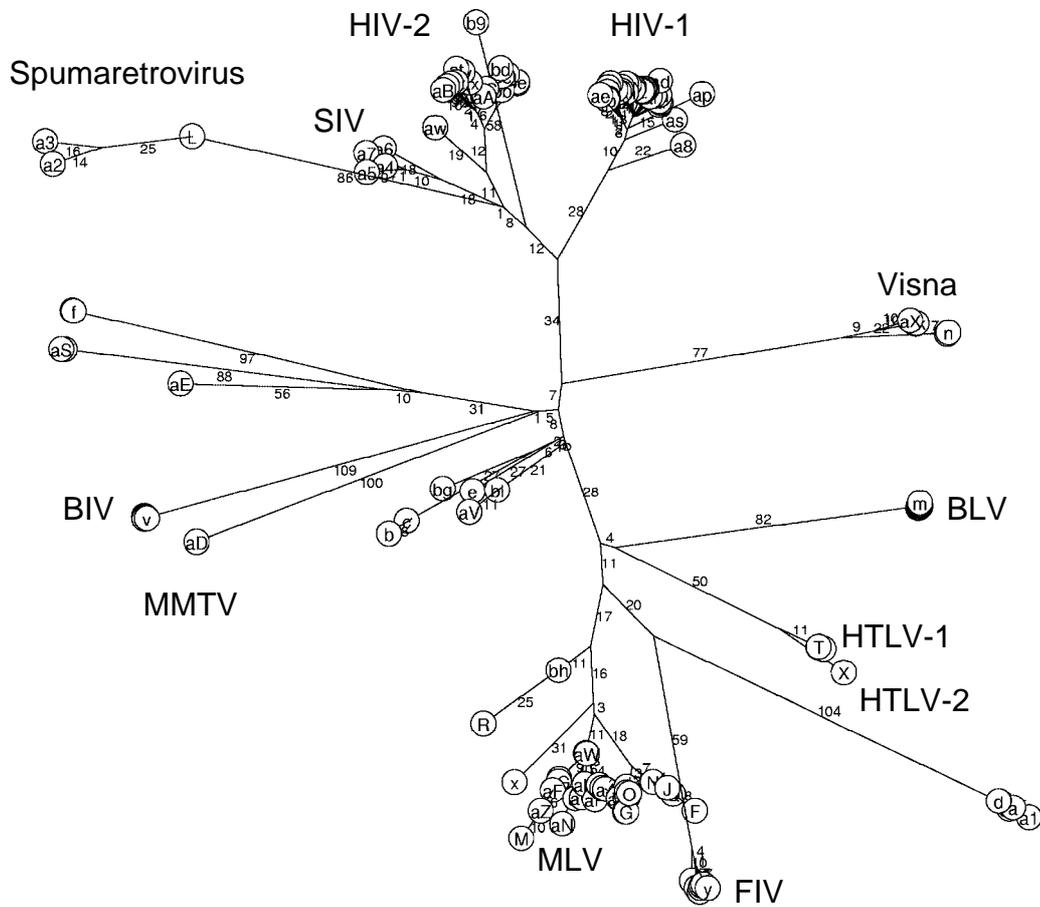


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Aminosäuresequenz der retroviralen env Proteine, die in der SWISS-PROT Datenbank verfügbar sind. Die Abkürzungen der verschiedenen Retroviren sind im Abkürzungsverzeichnis aufgelistet.

Nach Exposition mit HTLV-1 kann es entweder zu einer persistierenden Infektion oder zu einer vorübergehenden Infektion mit folgender Viruselimination kommen. Säuglinge, die nur kurze Zeit von ihren HTLV-1 positiven Müttern gestillt wurden, waren selten mit HTLV-1 infiziert (Hino (1990)). In immunologischen Studien fanden Nishimura et al. (1994), daß es bei HTLV-1 exponierten Individuen eine zelluläre Immunantwort gegen HTLV-1 gab, obwohl die untersuchten Individuen für HTLV-1 sowohl negativ in der Serologie als auch in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) waren. Diese Daten implizieren, daß der

menschliche Organismus bei einer geringen HTLV-1 Exposition die virusinfizierten Zellen eliminieren und die chronisch persistierende HTLV-1 Infektion verhindern kann.

HTLV-1 infiziert *in vivo* überwiegend CD4+ T-Lymphozyten (Miyoshi (1991)). Wie bei der HIV-Infektion stellen die lymphatischen Organe das Reservoir des Retrovirus dar (Jacobson et al. (1997), Kazanji et al. (2000)). Die Übertragung der HTLV-1 Infektion ist *in vitro* praktisch nur von infizierten Lymphozyten auf andere Lymphozyten möglich, d.h. durch engen Zellkontakt (Miyoshi (1991)). Es gibt Hinweise dafür, daß ein Anteil von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen infiziert sind (Hoffman et al. (1992), Koyanagi et al. (1993), Ali et al. (1993)). Einzelne humane Tumorzell Linien, die aus unterschiedlichen Geweben stammen, können experimentell mit HTLV-1 infiziert werden. Die Transformation dieser Zellen scheint aber eine essentielle Voraussetzung für die experimentelle Infektion mit HTLV-1 zu sein, da nicht transformierte Zellen aus den entsprechenden Geweben nicht infiziert werden können (Miyoshi (1991)).

Um eine persistierende Infektion mit HTLV-1 im menschlichen Organismus nachzuweisen, werden in erster Linie serologische Methoden angewandt. Durch Immunfluoreszenzassays (IFA), Partikelagglutinationsassays (PAA) und Enzymimmunoassays (EIA) werden Antikörper nachgewiesen, die mit fixierten infizierten Zellen oder gereinigten HTLV-1 Antigenen reagieren. Aufgrund der hohen Homologie von HTLV-1 und -2 können diese Tests nicht zwischen einer HTLV-1 und einer HTLV-2 Infektion unterscheiden, sie liefern auch eine relevante Zahl falsch positiver Ergebnisse (Constantine et al. (1992), Lal und Heneine (1996)). Zur Bestätigung werden deshalb weitere serologische Tests hinzugezogen: *Western Blot* Assays (WBA) oder Radioimmunpräzipitationsassays (RIPA). Der Nachweis von mehreren Antikörperspezifitäten, die mit Kern- und Hüllantigenen von HTLV-1 reagieren, erlaubt bei diesen Bestätigungstests den zweifelsfreien Nachweis einer HTLV Infektion (Constantine et al. (1992), Fleischer et al. (1999)).

Das Problem der Differenzierung einer HTLV-1 von einer HTLV-2 Infektion bei den genannten immunchemischen Tests bleibt jedoch bestehen. In neuerer Zeit wurden EIAs mit HTLV-1 oder HTLV-2 spezifischen synthetischen Peptiden und WBAs mit rekombinanten HTLV-1 oder HTLV-2 Proteinen entwickelt, die die serologische Differenzierung zwischen HTLV-1 und HTLV-2 Infektionen erlauben (Lal und Heneine (1996)).

Die Alternative zu immunchemischen Verfahren ist der molekularbiologische Nachweis von HTLV-1 bzw. HTLV-2 DNS mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), nachdem die DNS aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) extrahiert wird. HTLV-1 und HTLV-2 spezifische Sequenzen werden durch separate Amplifikation mittels Typ-spezifischer Primer unterschieden. Als Alternative können im ersten Schritt in der PCR auch sogenannte Konsensus Primer verwendet werden, im zweiten Schritt werden HTLV-1 und HTLV-2 spezifische Sequenzen mittels Typ-spezifischer Sonden oder aufgrund der Spaltung durch ein Restriktionsenzym definiert (Lal und Heneine (1996)).

1.1.2. Struktur des retroviralen Genoms und Regulation der Genexpression in HTLV-1 infizierten CD4+ T-Lymphozyten

Das provirale Genom von HTLV-1 ist 9032 Basenpaare lang (Seiki et al. (1983)). Wie bei allen intakten exogenen Retroviren finden sich "*long terminal repeats*" (LTR) am 5'- und 3'-Ende des proviralen Genoms, dazwischen liegen die Gene für die Kernproteine („*group antigens*“; gag), für die retroviralen Enzyme Protease (pro), reverse Transcriptase (RT), RNAse H und Integrase (pol) und für die Hüllglykoproteine (env). Diese essentielle Struktur des proviralen Genoms weist eine Modifikation bei den Retroviren der HTLV-BLV-Gruppe auf: Am 3'-Ende gibt es eine kodierende Sequenz mit 4 Leserahmen, die pX genannt wird (Seiki et al. (1983)). Diese Region kodiert für die regulatorischen Proteine tax p40 und rex p27, sowie weitere Proteine (p12, p27, p13 und p30), deren Funktion bisher ungeklärt ist (Nagashima et al. (1986), Brady (1996), Derse et al. (1999)). Tax p40 transaktiviert virale und bestimmte zelluläre Promotoren, so daß deren Aktivität in der infizierten Zelle beeinflußt wird. Rex p27 unterstützt die Anreicherung von mRNS, die nicht dem "*splicing*" unterworfen wurden (Brady (1996)). Auf diese Weise sorgt rex p27 dafür, daß sowohl genomische retrovirale RNS als auch mRNS für die Translation von gag, pro, pol und env Proteinen zur Bildung von Viruspartikeln bereit gestellt wird (Gazzolo et al. (1999)).

Die kodierenden Sequenzen von HTLV-1 und HTLV-2 zeigen eine Homologie von etwa 60 % (Shimotohno et al. (1985)). Die Größe und strukturelle Organisation der proviralen Genome der beiden HTLV Viren sind sehr ähnlich. Unterschiedliche HTLV-1 Isolate zeigen im allgemeinen einen sehr hohen Homologiegrad der Hüllproteine von etwa 97 %, nur wenige Varianten weichen jedoch

deutlich ab, z.B. Isolate aus Melanesien, die nur eine Homologie von 92 % besitzen (Gessain et al. (1991)).

Bei einzelnen HTLV-1 infizierten Individuen wurden Lymphozyten isoliert und die proviralen HTLV-1 Sequenzen kloniert und sequenziert. Die Sequenzen mehrerer Klone von einem einzelnen Individuum (d.h. intra-individuell) und die Sequenzen von verschiedenen Individuen (d.h. inter-individuell) wurden verglichen. Die intra-individuelle Variabilität von HTLV-1 pol und env Sequenzen war gering, wie Wattel et al. (1995) bei jeweils 100 Klonen von 2 HTLV-1 infizierten Individuen zeigte. Im Kontrast dazu war die intra-individuelle Nukleotid-Variabilität der HTLV-1 pX Region erheblich und sogar höher als die Variabilität der Klone von Isolaten aus verschiedenen Individuen (Niewiesk et al. (1994)). Dies könnte dafür sprechen, daß in einem infizierten Individuum zahlreiche Mutanten der HTLV-1 pX Gene entstehen, aber nur wenige der HTLV-1 pX Varianten auf andere Individuen übertragen werden. HTLV-1 Isolate kann man demnach ebenso wie andere Retroviren und RNS Viren als Quasispezies betrachten (Holland et al. (1992)). Die Unterschiede der HTLV-1 Sequenzen zwischen verschiedenen Individuen bleiben gering (Wattel et al. (1995), Niewiesk et al. (1994), Niewiesk et al. (1995), Nishimura et al. (1993)), da wahrscheinlich nur konservierte provirale Sequenzen zur Infektion anderer Individuen fähig sind (Nishimura et al. (1993)). Dies wird unterstützt durch die Untersuchungen von Niewiesk et al. (1995), die zeigten, daß die meisten HTLV-1 pX Varianten funktionell defekt waren. Das mutierte tax Protein konnte die Expression retroviraler und zellulärer Proteine nicht transaktivieren und wurde von zytotoxischen T-Lymphozyten, die spezifisch für das Wildtyp tax waren, nicht erkannt (Niewiesk et al. (1995), Suzuki et al. (1996)). HTLV-1 pX Provirus Mutanten wurden auch im ZNS bei 3 Autopsien von HAM/TSP Patienten gefunden (Kira et al. (1994)).

Ein bedeutender Prozentsatz zirkulierender Lymphozyten von HTLV-1 Trägern ist infiziert, in der Größenordnung von 5 bis 20 %, je nach angewandter Methodik (Kubota et al. (1993), Hashimoto et al. (1998)). Frisch entnommene Blutlymphozyten exprimierten jedoch nur bei 4 von 9 HTLV-1 Trägern, die nicht an ATL erkrankt waren, HTLV-1 pX RNS (Kinoshita et al. (1989)), d.h. die HTLV-1 infizierten Zellen sind zumeist phänotypisch unauffällig. Die Expression von HTLV-1 Antigenen durch zirkulierende HTLV-1 infizierte Lymphozyten ist offensichtlich *in vivo* sehr gering, aber nach Blutentnahme und ca. 3 Tagen in Kultur findet man eine deutliche Expression der viralen Proteine (Kannagi et al. (1994), Tochikura et al. (1985)). Aufgrund dieses Phänomens postulierten

Kannagi et al. (1994), daß es einen Faktor im menschlichen Plasma gibt, der die Expression von HTLV-1 Antigenen in zirkulierenden Lymphozyten hemmt. An HTLV-1 infizierten Lymphozyten zeigten Tochikura et al. (1985), daß HTLV-1 spezifische Antikörper *in vitro* die Expression von HTLV-1 Antigenen in den Lymphozyten supprimierten.

Es ist wahrscheinlich, daß die Funktionen von HTLV-1 tax für verschiedene Befunde verantwortlich sind, die bei Patienten mit HTLV-1 assoziierten Erkrankungen gefunden werden. Das tax Protein mit seinen Auswirkungen auf die Expression zellulärer und retroviraler Gene ist bisher nur bei der HTLV-BLV Gruppe von Retroviren gefunden worden. Die Translation des tax Proteins wie auch die des rex Proteins erfolgt aus der HTLV-1 pX RNS, die aus einem zweifachen „*splicing*“ des proviralen Transkripts hervorgeht (Brady (1996)). Diese RNS ist die stabilste Form der viralen RNS. Die molekularen Mechanismen der Transaktivierung retroviraler und zellulärer Gene durch HTLV-1 tax sind in vielen Einzelheiten bekannt (Brady (1996)). HTLV-1 tax bindet an mehrere Transkriptionsfaktoren, u.a. an die CREB- und NFkB-Familien von Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise wird indirekt ihre Bindung an bestimmte DNS Sequenzen gefördert (Matthews et al. (1992)), die "*tax-responsive elements*" (TRE) genannt werden. TRE finden sich sowohl im proviralen Genom von HTLV-1 als sogenannte "*21-base pair repeats*" in der LTR Region als auch in Promotor Regionen verschiedener zellulärer Gene. Durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wird die Expression der entsprechenden Gene beeinflusst, in den meisten Fällen im Sinne einer Transaktivierung und in wenigen Fällen im Sinne einer Transinhibition (Übersicht in: Kitze und Brady (1997)). Die betroffenen zellulären Gene (z.B. Interleukin 2 (Il-2), Il-3, Il-2 Rezeptor alpha, „*nerve growth factor*“ (NGF), HLA Klasse I und II, β -Polymerase, Zellzyklus Protein p21 u.a.) haben wichtige Funktionen für die Zell-Proliferation und -Differenzierung, aber auch für die Apoptose von Zellen. Mehrere transaktivierte Proteine beeinflussen die Lebensdauer von Lymphozyten, andere haben einen potentiellen Effekt auf Zellen des ZNS, z.B. NGF und Vimentin.

1.1.3. Auswirkungen der HTLV-1 Infektion auf das Immunsystem

Die HTLV-1 Infektion löst nicht nur eine humorale und zelluläre Immunantwort aus (siehe: Abschnitt 1.3.), die Infektion der CD4+ T-Lymphozyten selbst hat verschiedene Auswirkungen auf das Immunsystem. Einzelne HTLV-1 infizierte

T-Lymphozyten Klone zeigen ein erhöhtes Maß an Proliferation (Hoellsberg et al. (1992)). HTLV-1 infizierte CD4+ T-Lymphozyten haben weitere Eigenschaften, die mit den regulatorischen Funktionen der durch HTLV-1 pX kodierten Proteine tax und rex zusammenhängen. Sie beeinflussen die Expression viraler und zellulärer Proteine bzw. die retrovirale Replikation (Koralnik (1996), Brady (1996)). Die oligoklonale Expansion von HTLV-1 infizierten CD4+ T-Lymphozyten wird auf die Funktion dieser Proteine zurückgeführt.

Die Auswirkungen von HTLV-1 tax auf infizierte Lymphozyten sind komplex, da als Folge der Transaktivierung zellulärer Gene weitere zelluläre Proteine exprimiert werden. Wichtige Beispiele sind Adhäsionsmoleküle, z.B. L-Selectin und CD44, die auf HTLV-1 infizierten Lymphozyten vermehrt sind (Tatewaki et al. (1995), Uchiyama (1997), Matsuoka et al. (2000)) und costimulierende Proteine (Freeman et al. (1992)). Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf HTLV-1 infizierten Lymphozyten kann die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen und die Infiltration ins Gewebe fördern (Springer (1994)). Dieser Effekt wurde dafür verantwortlich gemacht, daß HTLV-1 infizierte Lymphozyten in das Rückenmark einwandern und dort eine Myelitis hervorrufen (Ijichi et al. (1993)).

1.1.4. Epidemiologie der HTLV Infektionen

HTLV-1 Infektionen und deren assoziierte Erkrankungen werden weltweit in bestimmten Endemiegebieten gefunden: in Südjapan, in der Karibik, in Zentral- sowie Südamerika und in Afrika (Ijichi und Osame (1995)). Die weltweit höchste Prävalenz findet sich in der Präfektur Kagoshima in Südjapan, dort haben ca. 15 % der Bevölkerung Antikörper gegen HTLV-1 (Osame et al. (1987)). Endemische HTLV-1 und HTLV-2 Infektionen fanden sich auch bei bestimmten ethnischen Gruppen einer Region, z.B. einzelnen Indianerstämmen Südamerikas (Fujiyoshi et al. (1995)). Ethnische Gruppen mit endemischer HTLV-2 Infektion sind selten (Ijichi und Osame (1995), Fujiyoshi et al. (1995)), bei Drogenabhängigen breitet sich aber HTLV-2 deutlich schneller als HTLV-1 aus (Schwebke et al. (1994)). In Deutschland sind HTLV Infektionen sehr selten (Schwarzfischer et al. (1991), Fleischer et al. (1999)). Einzelne HTLV-1 assoziierte Erkrankungen sind in Deutschland beschrieben worden, wobei die Patienten zum Teil aus bekannten Endemiegebieten stammten (Kitze et al. (1992), Ellerbrok et al. (1998)).

1.1.5. Spektrum der HTLV assoziierten Erkrankungen

Die HTLV-1 assoziierten Erkrankungen treten bei Individuen auf, bei denen eine lebenslang persistierende HTLV-1 Infektion der CD4+ T-Lymphozyten vorliegt. Der Verlauf der Erkrankungen ist chronisch. Auch wenn die proviralen Sequenzen, die exprimierten zellulären Proteine und die funktionellen Eigenschaften der HTLV-1 infizierten T-Lymphozyten Klone nur teilweise bekannt sind, so ist es doch wahrscheinlich, daß deren Eigenschaften das klinische Bild bestimmen, d.h. ob der Patient eine neoplastische oder eine entzündliche Erkrankung etwa im ZNS, in den Augen oder den Gelenken entwickelt. Das Spektrum der Erkrankungen, die mit der HTLV-1 Infektion assoziiert werden, ist groß: chronische Bronchitis, interstitielle Pneumonie, Fibrose der Lungen, Sicca Syndrom, Katarakt, Uveitis, Arthropathie, Diabetes und Thyreoiditis (Yamaguchi (1994), Nakagawa et al. (1995)). Wahrscheinlich können auch Myositiden durch HTLV-1 hervorgerufen werden (Morgan et al. (1989)).

Die häufigste neurologische Erkrankung, die durch HTLV-1 hervorgerufen wird, HAM/TSP, wurde in allen HTLV-1 Endemiegebieten gefunden (Ijichi und Osame (1995)). Die Inzidenz bei HTLV-1 Trägern wurde auf weniger als 1 % geschätzt (Kaplan et al. (1990)). Das adulte T-Zell Lymphom tritt bei HTLV-1 Trägern mit einer vergleichbaren Inzidenz auf (Takatsuki et al. (1992)). Es gibt Patienten, die sowohl an HAM/TSP als auch an ATL leiden (Furukawa et al. (1995)). HAM/TSP beginnt jedoch in der Regel in einem niedrigeren Lebensalter (Takatsuki et al. (1992), Furukawa et al. (1995), Nakagawa et al. (1995)). HAM/TSP ist bei Frauen häufiger als bei Männern (Nakagawa et al. (1995)), während an ATL mehr Männer erkranken (Takatsuki et al. (1992), Yamaguchi (1994)). Die Unterschiede der klinischen Erkrankungen und ihr seltenes Auftreten bei HTLV-1 Infizierten bewirkten, daß bei den Erkrankten sowohl nach HTLV-1 Varianten als auch nach besonderen immungenetischen Merkmalen gesucht wurde. Bei relativ konservierten Sequenzen der Retrovirusproteine (s.o.) konnte keine strikte Assoziation von HAM/TSP oder ATL mit bestimmten HTLV-1 Varianten gefunden werden (Komurian et al. (1991)), ein häufigeres Auftreten von HAM/TSP bei einzelnen Varianten erscheint aber möglich (Renjifo et al. (1995)).

HAM/TSP ist als gut charakterisierte neurologische Erkrankung etabliert (Tabelle 1; Osame (1990)). Auch bei ATL gibt es in 9 % der Fälle eine Beteiligung des ZNS, am häufigsten als Lymphomzellinfiltration der Leptomeningen (Takatsuki et al. (1996)). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bestehen geringe

Kenntnisse über neurologische Erkrankungen, die durch HTLV-2 induziert werden. 4 Fälle von HTLV-2 assoziierten neurologischen Erkrankungen wurden berichtet, deren klinisches Bild HAM/TSP sehr ähnlich ist (Lehky et al. (1996)).

1.2. Die HTLV-1 assoziierte Myelopathie / tropische spastische Paraparese (HAM/TSP)

Die diagnostischen Kriterien von HAM/TSP sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Bedeutsam ist, daß häufig neben den 8 neurologischen Kardinalkriterien zusätzliche neurologische, internistische und ophthalmologische Befunde erhoben werden, die im Zusammenhang mit der HTLV-1 Infektion stehen.

1.2.1. Symptome, klinische und neurophysiologische Untersuchungsbefunde

Die häufigsten Symptome bei HAM/TSP sind eine spastische Paraparese und Blasenfunktionsstörungen (Nakagawa et al. (1995)). Seltener Symptome sind Sensibilitätsstörungen der Beine, Obstipation, Rückenschmerzen und Tremor der Hände (Nakagawa et al. (1995)). Die Befunde weisen darauf hin, daß der Schwerpunkt der neuropathologischen Veränderungen im thorakalen Rückenmark liegt. Mittels Kernspintomographie ließ sich nachweisen, daß Veränderungen aber auch im Gehirn zu finden sind (Nakagawa et al. (1995)). Zusätzlich konnte durch neurophysiologische Untersuchungen gezeigt werden, daß auch das periphere Nervensystem betroffen ist (Arimura et al. (1989)). HAM/TSP Patienten können an einer Reihe von internistischen Begleiterkrankungen leiden (siehe: Tabelle 1).

Tabelle 1: Richtlinien für die Diagnose von HAM/TSP.

Empfehlungen der "*Scientific Group on HTLV Infections and its Associated Diseases, Regional Office for the Western Pacific of the World Health Organization*", Kagoshima, 10. bis 15. Dezember 1988. Zusammengefaßt nach Osame (1990).

Klinische Befunde

Auftreten meist im Erwachsenen-, seltener im Kindesalter; meist sporadisch, manchmal familiär; Frauen häufiger betroffen. Erkrankungsverlauf meist schleichend, selten akut.

Typische neurologische Befunde:

1. Spastische Paraparese mit proximaler Betonung; meist langsame Progredienz, manchmal mit Stillstand nach einer Phase der Progredienz
2. Blasenentleerungsstörung meist schon zu Beginn der Erkrankung; im weiteren Verlauf häufig Obstipation.
3. Paraesthesien der unteren Extremitäten
4. Lumbago-ähnliche Beschwerden
5. Einschränkung des Vibrationsempfindens an den Füßen
6. Hyperreflexie und Pyramidenbahnzeichen an den unteren Extremitäten
7. Hyperreflexie; positives Trömner- und Hoffmann-Zeichen an den oberen Extremitäten
8. gesteigerter Masseterreflex bei einige Patienten

Seltener neurologische Befunde:

Ataxie, Atrophie des Nervus opticus, Schwerhörigkeit, Nystagmus, andere Hirnnervenausfälle, Tremor der Hände, verminderter Achillessehnenreflex.

Sehr selten epileptische Anfälle, hirnorganische Psychosyndrome oder Demenz

Andere neurologische Befunde und Syndrome, die mit HAM/TSP assoziiert sein können:

Muskuläre Atrophie, Faszikulationen, Polymyositis, periphere Neuropathie, kraniale Neuropathie, Meningitis, Enzephalopathie

Nicht-neurologische Syndrome:

Alveolitis, Uveitis, Sjogren Syndrom, Arthropathie, Vaskulitis, Ichthyosis, Kryoglobulinämie, monoklonale Gammopathie, ATL

Laborbefunde

HTLV-1 Antikörper oder Antigene im Blut und Liquor

Gelappte Lymphozyten ("*flower-like lymphocytes*") im Blut und/oder Liquor

Gering- bis mittelgradig erhöhte Proteinkonzentration im Liquor

Leichte lymphozytäre Pleozytose

Isolation von HTLV-1 aus dem Blut und / oder Liquor

1.2.2. Neuropathologie von HAM/TSP

Die neuropathologischen Veränderungen bei HAM/TSP sind im Bereich des thorakalen Rückenmarks am stärksten ausgebildet (Abbildung 2) und umfassen eine mononukleäre Zellinfiltration, Zerstörung des Myelins und der Axone sowie eine astrozytäre Gliose (Iwasaki (1990), Umehara et al. (1993)). Weiterhin wird eine Infiltration und Verdickung der Meningen gefunden. Die meisten infiltrierenden Zellen sind CD4+ T-Lymphozyten, CD8+ T-Lymphozyten und Makrophagen (Umehara et al. (1993)). Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Infiltration mit CD4+ T-Lymphozyten ab, dies korreliert mit der Abnahme der HTLV-1 proviralen DNS Kopien im thorakalen Rückenmark (Kubota et al. (1994)).

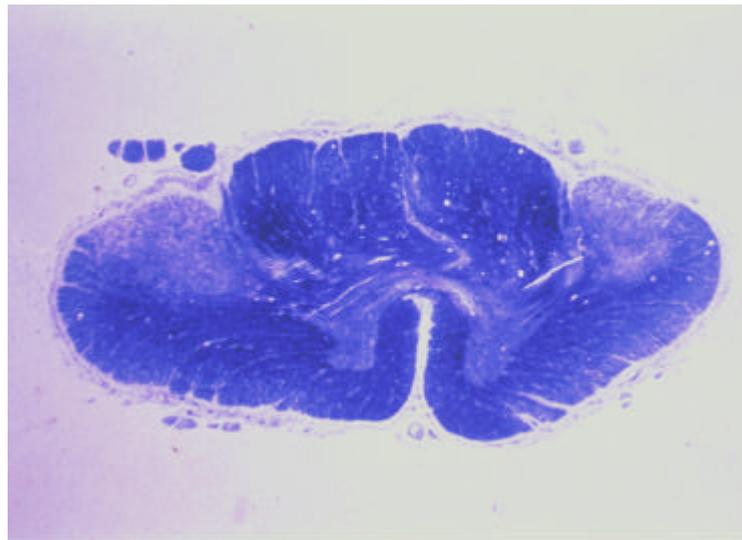


Abbildung 2: Symmetrische Demyelinisierung in den Seitensträngen des thorakalen Rückenmarks bei einem Patienten mit HAM/TSP (Klüver-Barrera Färbung). Herrn Prof.M.Osame (Abteilung für Innere Medizin III, Universität Kagoshima / Japan) danke ich für die Abbildung.

Ijichi et al. (1993) vermuten, daß die Prädilektion der Entzündung auf die arterielle Blutversorgung des thorakalen Rückenmarks zurückzuführen ist: In diesem Bereich wird ein verlangsamter Fluß in den Arteriolen und Kapillaren angenommen, und die HTLV-1 infizierten Lymphozyten könnten aufgrund der

erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen vermehrt ins Gewebe infiltrieren. Die arterielle Versorgung des thorakalen Rückenmarks ist tatsächlich komplex, sie erfolgt über multiple Zuflüsse aus den Arteriae vertebrales, den Arteriae subclaviae und den Arteriae intercostales aus der Aorta descendens. In regional unterschiedlichem Maß speisen diese Gefäße die 3 längsverlaufenden Arterien des Rückenmarks, die Arteria spinalis anterior sowie die beiden Arteriae spinales posteriores (Duus (1983), Afifi und Bergman (1998)). Das obere Drittel des Thorakalmarkes ist besonders häufig betroffen von vaskulären Myelopathien (Afifi und Bergman (1998)).

In den letzten Jahren entwickelte sich ein wissenschaftlicher Disput über die Frage, welche Zellen im ZNS durch HTLV-1 infiziert sind. Durch in situ Hybridisierung konnte die Infiltration mit HTLV-1 infizierten CD4+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Hara et al. (1994), Moritoyo et al. (1996), Matsuoka et al. (1998)). Die infiltrierenden HTLV-1 infizierten T-Lymphozyten nehmen allerdings im Verlauf der Erkrankung ab (Kubota et al. (1994)). Es ist noch umstritten, ob auch Zellen des ZNS, z.B. die Astrozyten, mit HTLV-1 infiziert sind (Lehky et al. (1995)).

Die Untersuchung der infiltrierenden Lymphozyten im Rückenmark ergab weitere Aufschlüsse über mögliche Pathomechanismen. Hara et al. (1994) untersuchten im Rückenmarksgewebe bei HAM/TSP T-Lymphozyten Rezeptor "*rearrangement patterns*" und "*complementarity determining region 3*" (CDR3) Sequenzen, d.h. jene Sequenzen des T-Lymphozyten Rezeptors, die die spezifische Antigenbindung bestimmen. Sie fanden überraschend häufig Sequenzen, die auch in Plaques bei Multiple Sklerose (MS) Patienten vorkommen. Levin et al. (1997) isolierten aus dem Rückenmark eines HAM/TSP Patienten T-Lymphozyten, die eine zytotoxische Effektorfunktion gegen HTLV-1 pX Proteine zeigten.

1.2.3. Molekularbiologische und immunologische Charakteristika von HAM/TSP

Schon in den ersten klinischen Studien, die das Krankheitsbild HAM/TSP definierten, fiel auf, daß atypische Lymphozyten und HTLV-1 spezifische Antikörper im Liquor nachweisbar waren (Osame et al. (1987)) und daß eine intrathekale Synthese von Immunglobulinen vorlag (Gessain et al. (1988), Link et al. (1989)). Diese Befunde waren die erste Evidenz, daß HTLV-1 infizierte

Lymphozyten, die häufig atypische Kerne aufweisen, in das ZNS einwandern und daß HAM/TSP eine entzündliche Erkrankung ist. Die neuropathologischen Befunde bestätigten dies (Iwasaki (1990), Umehara et al. (1993)). Auch wenn zur Zeit noch unklar ist, ob eingewanderte CD4+ T-Lymphozyten oder vielleicht auch Astrozyten im ZNS infiziert sind, so ist nicht zu bezweifeln, daß HTLV-1 Antigene im ZNS exprimiert werden (Lehky et al. (1995), Moritoyo et al. (1996)).

Der Anteil HTLV-1 Provirus infizierter CD4+ T-Lymphozyten im Blut ist bei Patienten mit HAM/TSP höher als bei HTLV-1 Trägern ohne neurologische Erkrankung (Yoshida et al. (1989), Kubota et al. (1993)). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die infizierten T-Lymphozyten nicht polyklonal, sondern oligoklonal sind (Furukawa et al. (1992), Wattel et al. (1995)). Durch die Untersuchung der retroviralen Integrationsorte im Genom der infizierten Lymphozyten mittels PCR konnten Wattel et al. (1995) 5 bis 20 unterschiedliche, expandierte T-Lymphozyten Klone sowohl bei HAM/TSP Patienten als auch bei HTLV-1 Trägern ohne neurologische Erkrankungen nachweisen. Die Vermehrung HTLV-1 infizierter T-Lymphozyten im Blut von HAM/TSP Patienten (Yoshida et al. (1989), Kubota et al. (1993)) ist somit überwiegend auf die Expansion dieser wenigen T-Lymphozyten Klone zurückzuführen, und nur zu einem geringen Teil auf die Übertragung des Retroviruspartikels auf weitere T-Lymphozyten (Wattel (1999)). Lehky et al. (1998) konnten mittels eines adaptierten Antikörpers gegen den Il-2 Rezeptor (anti-Tac) die Anzahl zirkulierender HTLV-1 infizierter Lymphozyten bei HAM/TSP Patienten reduzieren. Die Oligoklonalität (Wattel et al. (1995)) und der erhöhte Anteil HTLV-1 infizierter T-Lymphozyten bei HAM/TSP Patienten (Yoshida et al. (1989), Kubota et al. (1993), Furukawa et al. (1992), Eiraku et al. (1998)) kann auch die geringere Heterogenität der HTLV-1 pX Sequenzen bei Patienten mit HAM/TSP im Vergleich zu asymptomatischen HTLV-1 Trägern (Niewiesk et al. (1994)) erklären.

Folgende Besonderheiten der persistierenden HTLV-1 Infektion und des Auftretens einer neurologischen Erkrankung sind somit etabliert:

- die oligoklonale Expansion von HTLV-1 infizierten CD4+ T-Lymphozyten
- das Einwandern der infizierten CD4+ T-Lymphozyten ins ZNS
- die Expression von retroviralen Proteinen im ZNS
- die gesteigerte Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene innerhalb und außerhalb des ZNS

Bei HAM/TSP besteht also eine krankheitstypische Konstellation: erhöhte Anzahl HTLV-1 infizierter T-Lymphozyten im Blut und gesteigerte zelluläre und humorale Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene (Gessain und Gout (1992), Wucherpfennig et al. (1992), Shinzato et al. (1993), Nowak und Bangham (1996), Nagai et al. (1998)). Die Eigenschaften der T-Lymphozyten Klone (Usuku et al. (1990), Wattel et al. (1995)), die Regulation der retroviralen und zellulären Genexpression durch HTLV-1 tax (Brady (1996)) sowie immun-genetische Faktoren (Usuku et al. (1988), Sonoda et al. (1996), Jeffery et al. (1999)) könnten zusätzlich für die Krankheitsentstehung bedeutsam sein.

Der Nachweis der Expression von HTLV-1 tax im ZNS durch Moritoyo et al. (1996) und Lehky et al. (1995) hat wie die früheren Arbeiten an Blutlymphozyten von Kinoshita et al. (1989), Kannagi et al. (1994) und Tochikura et al. (1985)) eine grundsätzliche Bedeutung: Die Expression retroviraler Proteine ist in den im Blut zirkulierenden infizierten Lymphozyten vermindert (Tochikura et al. (1985), Hanon et al. (2000)), nach deren Passage der Blut-Hirn-Schranke wird die Expression jedoch deutlich nachweisbar (Matsuoka et al. (1998), Moritoyo et al. (1999)). Wahrscheinlich ist die Konzentration von Faktoren, die die Expression retroviraler Proteine hemmen, im ZNS niedriger ist als im Blut (Kannagi et al. (1994)). Dies trifft ohne Zweifel auf die Konzentrationen anti-retroviraler Antikörper zu (Nakamura et al. (1991), Kitze et al. (1995)). Die Expression des HTLV-1 tax Proteins im ZNS kann verschiedene Auswirkungen haben:

Tax transaktiviert sowohl retrovirale als auch zelluläre Gene in infiltrierenden Lymphozyten und beeinflusst deren immunregulatorische Funktionen (Übersicht in: Kitze und Brady (1997)).

Tax und andere retrovirale Genprodukte werden zu Zielantigenen einer Immunreaktion im ZNS (Levin et al. (1997), Hanon et al. (2000)).

Tax kann die Genexpression von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen beeinflussen, falls tax von infizierten Zellen freigesetzt wird (Dhib Jalbut et al. (1994)).

HTLV-1 ist kein zytozides Retrovirus. HTLV-1 infizierte Zellen sind aufgrund tax-induzierter Mechanismen gegenüber Apoptose refraktär (Hoellsberg (1999)), und das HTLV-1 tax Protein stimuliert die Proliferation der infizierten T-Lymphozyten (Grassmann et al. (1999)). Somit ist es wahrscheinlich, daß immunpathologische Mechanismen zur Zerstörung der Myelinscheiden und Axone führen. 2 unterschiedliche Konzepte werden diskutiert (Hoellsberg und

Hafler (1995), Osame et al. (1999)):

Das erste basiert auf Autoimmunität (Oger und Dekaban (1995)). Die gestörte Immunregulation führt zu einer zellulären (Nagai et al. (1996)) und humoralen (Levin et al. (1998)) Immunantwort gegen ZNS Autoantigene.

Das zweite Konzept geht von einer spezifischen Immunantwort gegen retrovirale Antigene aus, die von HTLV-1 infizierten Zellen im ZNS exprimiert werden. Diese sind entweder Astrozyten (Lehky et al. (1995)) oder eingewanderte HTLV-1 infizierte Lymphozyten, wobei die Zerstörung von Myelinscheiden und Axonen im Rahmen einer "bystander" Schädigung erfolgt (Ijichi et al. (1993)).

1.3 Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunantwort gegen HTLV-1

Zahlreiche Untersuchungen wurden bei HTLV-1 Infizierten durchgeführt, um die spezifische Aktivierung des Immunsystems zu charakterisieren. Antikörper im Serum wurden untersucht (Chen et al. (1989), Ida et al. (1991), Inoue et al. (1992), Palker et al. (1989)), auch im Liquor wurden spezifische Antikörper nachgewiesen (Gessain et al. (1988), Ceroni et al. (1988), Grimaldi et al. (1988), McLean et al. (1989), Link et al. (1989), Jacobson et al. (1990 a), Nakamura et al. (1991)). B-Zell Epitope der HTLV-1 Proteine sind in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden (Chen et al. (1989), Ida et al. (1991), Nakamura et al. (1991), Jacobson et al. (1991), Inoue et al. (1992), Desgranges et al. (1994), Lal et al. (1994)).

Antivirale zytotoxische T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut (Jacobson et al. (1990 b), Jacobson et al. (1991), Kannagi et al. (1992), Daenke et al. (1996)), aus Liquor (Elovaara et al. (1993)) und aus einer Rückenmarksbiopsie (Levin et al. (1997)) isoliert. Zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten erkannten das HTLV-1 tax Protein (Jacobson et al. (1990b), Kannagi et al. (1992), Niewiesk et al. (1995)), und CD4+ (Helfer) T-Lymphozyten reagierten gegen das Oberflächenglykoprotein gp46 (Jacobson et al. (1991)).

Untersuchungen des Liquors gaben Aufschluß über relevante Zielantigene bei HAM/TSP Patienten: Nakamura et al. (1991) fanden vermehrte Antikörper

gegen das Transmembranglykoprotein gp21 von HTLV-1, Elovaara et al. (1993) eine besonders hohe Frequenz von zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten gegen das HTLV-1 tax Protein.

Für die im Blut zirkulierenden HTLV-1 tax spezifischen zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten fanden Elovaara et al. (1993) Unterschiede zwischen HAM/TSP Patienten und gesunden HTLV-1 Trägern, Daenke et al. (1996) konnten diesen Befund nicht bestätigen. Von beiden Autoren wurden Kranke untersucht, die HLA A2 positiv waren und eine spezifische Immunantwort gegen HTLV-1 tax aufwiesen (Jacobson et al. (1990 b)). Der HLA Phänotyp A2 ist jedoch bei Patienten mit HAM/TSP im Vergleich zu gesunden HTLV-1 Trägern nicht erhöht (Sonoda et al. (1996)), sondern vermindert (Jeffery et al. (1999)).

Eine weitere HLA Assoziation bei HAM/TSP betrifft das HLA Klasse II Antigen DR1, bzw. nach der neueren molekulargenetischen Nomenklatur (Apple und Erlich (1996), Bodmer et al. (1999)) den häufigen HLA Genotyp DRB1*0101, der bei HAM/TSP vermehrt und bei ATL vermindert gefunden wurde im Vergleich zu gesunden HTLV-1 Virusträgern (Sonoda et al. (1996)). In einer Untersuchung von großen Gruppen erkrankter und nicht erkrankter HTLV-1 Virus-träger zeigten Jeffery et al. (1999), daß die Wahrscheinlichkeit, an HAM/TSP zu erkranken, durch HLA DRB1*0101 verdoppelt wird. Weiterhin wurden Zusammenhänge zwischen der antiviralen Immunantwort und bestimmten HLA Haplotypen bei HAM/TSP Patienten beschrieben (Usuku et al. (1988)). Diese Daten legen nahe, daß immungenetische Faktoren, die im HLA Komplex kodiert sind, einen Einfluß darauf haben, ob eine persistierende HTLV-1 Infektion zu einer ZNS Erkrankung führt.

Die HTLV-1 assoziierte Myelopathie / tropische spastische Paraparese stellt eine chronisch entzündliche ZNS Erkrankung dar, bei der die molekularbiologischen Eigenschaften des Erregers und seine zellbiologischen Wechselwirkungen bereits gut charakterisiert sind. Somit bietet HAM/TSP 2 wichtige Vorteile für neuroimmunologische Untersuchungen: Erstens ist das auslösende Agens im Gegensatz zu der häufigsten chronisch entzündlichen ZNS Erkrankung, der Multiplen Sklerose, bekannt. Zweitens spielen opportunistische Begleitinfektionen im Gegensatz zur HIV Infektion kaum eine Rolle. In Deutschland ist HAM/TSP zwar selten (Kitze et al. (1992)), in tropischen und subtropischen Ländern stellt sie jedoch ein wichtiges Problem der klinischen Neurologie dar (Osame (1990)). Weiterhin kann an dieser entzündlichen ZNS Erkrankung die pathophysiologische Bedeutung von Liquorveränderungen studiert werden.

Die diagnostische Liquoranalytik wurde maßgeblich an der Neurologischen Klinik in Göttingen vorangetrieben (Felgenhauer (1982), Reiber und Felgenhauer (1987), Reiber und Lange (1991), Felgenhauer und Reiber (1992)). Bei HAM/TSP eröffnen sich nun Erkenntnismöglichkeiten über die Beziehungen zwischen einer persistierenden Virusinfektion, entzündlichen Liquorveränderungen und neuroimmunologischen Mechanismen.

2. ZIELSETZUNG UND VORGEHEN

Die Ziele der vorgelegten Arbeit bestanden darin, die Spezifität der systemischen und intrathekalen Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene zu charakterisieren und die pathophysiologische Bedeutung der intrathekalen Immunantwort aus einer neuroimmunologischen Perspektive zu analysieren.

Die eigenen Untersuchungen befaßten sich zunächst mit dem Nachweis systemisch und intrathekal gebildeter virusspezifischer Antikörper. Im ersten Schritt wurden HTLV-1 spezifische Antikörper des Isotyps Immunglobulin G (IgG) identifiziert, die an infizierte Zellen banden. Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob IgG-Antikörper die verschiedenen HTLV-1 Proteine erkannten. Im dritten Schritt wurde die Feinspezifität der IgG-Antikörper für immundominante, lineare B-Zell Epitope charakterisiert. Darauf aufbauend, wurde die Feinspezifität der B-Zellen bei HTLV-1 Trägern mit und ohne HAM/TSP verglichen und die Veränderungen der spezifischen Immunantwort im Verlauf von HAM/TSP analysiert.

Um den Einfluß immungenetischer Faktoren zu erfassen, wurde die humorale Immunantwort mit den HLA Haplotypen der HAM/TSP Patienten in Beziehung gesetzt. Das essentielle Bindeglied zwischen der bekannten HLA Klasse II Assoziation von HAM/TSP (DR1 bzw. DRB1*0101) und der B-Zell Aktivierung stellt die CD4+ T-Zell Aktivierung dar. Diese wurde exemplarisch an CD4+ T-Lymphozyten Linien untersucht, die aus dem Blut von HLA DR1 (DRB1*0101) positiven Individuen isoliert und spezifisch durch Peptide des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21 stimuliert wurden.

Die bekannten molekularbiologischen und immunologischen Besonderheiten der HTLV-1 Infektion und die eigenen Daten über die Spezifität der systemischen und intrathekalen Immunantwort wurden in einem immunpathologischen Modell der Erkrankung HAM/TSP integriert. Darüberhinaus wurden die neuroimmunologischen Veränderungen bei HAM/TSP verglichen mit den Befunden bei 2 anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS, der Multiplen Sklerose und den HIV-1 assoziierten Rückenmarkserkrankungen.

3. PATIENTEN, PROBEN UND METHODEN

Die eigenen Untersuchungen der humoralen Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene erfolgten in 3 Abschnitten an Proben von HAM/TSP Patienten aus verschiedenen Endemiegebieten: Erstens wurden bei HAM/TSP Patienten aus dem Iran und aus Brasilien IgG-Antikörper gegen HTLV-1 Antigene im Liquor und Serum quantifiziert. Zweitens wurde die Bindung von IgG-Antikörpern an verschiedene HTLV-1 Antigene unter Verwendung von Proben aus Brasilien nachgewiesen. Drittens wurde die Feinspezifität der IgG-Antikörper gegen lineare Epitope von HTLV-1 Antigenen an Proben aus Japan untersucht. In Anbetracht der aufeinander folgenden Projekte und der begrenzten Volumina der Proben wurden die Untersuchungen nicht an denselben Proben durchgeführt (Tabelle 2). Diese Projekte wurden in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen in Rio de Janeiro, Brasilien (Dr. Puccioni-Sohler) und Kagoshima, Japan (Prof. Osame, Prof. Sonoda) durchgeführt. In einem weiteren Projekt wurden CD4+ T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von HAM/TSP Patienten aus Kagoshima isoliert und untersucht.

3.1. Patienten: Ethnische Herkunft, Art der Erkrankungen und untersuchte Proben

2 HAM/TSP Patienten stammten aus dem Iran und waren nach Deutschland emigriert, 18 lebten in Brasilien und 39 in Südjapan. In Tabelle 2 sind die Herkunft der Patienten, die untersuchten Proben und die durchgeführten Untersuchungen zusammengefaßt. Alle Proben wurden aus diagnostischen Gründen in der Neurologischen Klinik der Universität Göttingen, der Neurologischen Klinik der Bundesuniversität Rio de Janeiro oder in der Abteilung für Innere Medizin III der Universität Kagoshima abgenommen. Die wissenschaftlichen Untersuchungen wurden nach ausführlicher Information der Patienten und deren Zustimmung durchgeführt. Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen fanden im Kontext von Forschungsprojekten in Rio de Janeiro und Kagoshima statt. Im Text wird auf Bezüge zu den einzelnen Forschungsprojekten hingewiesen.

Tabelle 2: Patienten mit HAM/TSP sowie HTLV-1 positive und negative Kontrollen, deren Liquor- und Serumproben im Rahmen der eigenen Untersuchungen zur Spezifität der systemischen und intrathekalen humoralen Immunantwort gegen HTLV-1 mittels verschiedener Methoden analysiert wurden.

Geburtsland	Erkrankungsgruppe	HTLV-1 Serologie		Untersuchungen (Publikation)
		Positiv (Anzahl)	Negativ (Anzahl)	
Deutschland	MS	0	135	IFA, RIPA (Schneider et al. (1987))
Deutschland	MS	0	9	EIA, RIPA, PCR
Iran	HAM/TSP	2	0	EIA, RIPA, PCR
Iran	Angehörige von HAM/TSP	1	1	EIA, RIPA, PCR
Iran	MS	0	2	EIA (Kitze et al. (1992))
Brasilien	HAM/TSP	18	0	MT-2 Zell-EIA, RIPA
Brasilien	andere neurologische Erkrankungen	0	17	MT-2 Zell-EIA (Kitze et al. (1995))
Süd-japan	HAM/TSP	39	0	PAA, Peptid-EIA, HLA (n=32)
Süd-japan	mögliche HAM/TSP	6	0	PAA, Peptid-EIA
Süd-japan	andere neurologische Erkrankungen	15.	11	PAA, Peptid-EIA (Kitze et al.(1996a), Kitze et al. (1996b))

Tabelle 3: Diagnosen der HTLV-1 seropositiven Patienten ohne sichere HAM/TSP. Bei Patienten mit möglicher HAM/TSP konnte zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht sicher entschieden werden, ob die klinische Symptomatik auf die HTLV-1 Infektion oder eine andere, gleichzeitig vorliegende Erkrankung zurückzuführen war.

Gruppe	Patient	Diagnosen
<i>Seropositive Kontrollpatienten ohne klinische Hinweise auf HAM/TSP</i>		
	1	Hirnmetastase bei Bronchialkarzinom
	2	Okuläre Myasthenie
	3	Verdacht auf ATL, HTLV-1 assoziierte Bronchopneumonie
	4	Amyotrophe Lateralsklerose
	5	Choreatiforme Bewegungsstörung
	6	Hereditäre motorische sensible Neuropathie Typ II
	7	Vaskulitis mit Neuropathie und vaskulärer Enzephalopathie
	8	Epilepsie
	9	Sarkoidose
	10	Intrazerebrale Blutung
	11	Prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
	12	ATL
	13	Myasthenia gravis
	14	Zerebelläre Ataxie
	15	Neuropathie
<i>HAM/TSP möglich, aber andere Erkrankung als Ursache der spastischen Paraparese vorhanden</i>		
	1	Zervikale Myelopathie
	2	Verknöcherung des hinteren Längsbandes
	3	Sjogren Syndrom
	4	Morbus Behcet
	5	Amyotrophe Lateralsklerose
	6	Akute Querschnittsmyelitis

In Kagoshima standen auch Kontrollgruppen zur Verfügung, die in Tabelle 3 dargestellt sind. Nur diesem Endemiegebiet mit hoher Prävalenz der HTLV-1 Infektion (Osame et al. (1987)) war es möglich, Proben von Infizierten, aber nicht an HAM/TSP Erkrankten zu untersuchen. Alle Proben aus Kagoshima wurden vorab in Japan mit dem kommerziellen Partikelagglutinationsassay (PAA) SERODIA auf Antikörper gegen HTLV untersucht.

3.2. Immunchemische Untersuchungen von Liquor und Serum

3.2.1. Grundprogramm der Liquoranalytik

In allen Liquor- und Serumproben wurden immunchemisch mittels eines Behring-Nephelometers und der kommerziell erhältlichen Nephelometriessays (Behring) die Konzentrationen von Albumin und IgG bestimmt. Die Auswertung der Daten richtete sich nach den von Reiber und Felgenhauer (1987) publizierten empirischen Grundlagen für die Blut-Liquor-Schrankenfunktion für Albumin und die Bestimmung einer intrathekalen Synthese von IgG. Da Albumin nur außerhalb des ZNS, d.h. in der Leber, synthetisiert wird, kann der Liquor/Serum-Konzentrationsquotient für Albumin als Parameter der Blut-Liquor-Schrankenfunktion angesehen werden (Reiber und Felgenhauer (1987)). Es ist aber zu berücksichtigen, daß auch eine Störung des Liquorflusses, z.B. im Subarachnoidalraum des Spinalkanals, zum Anstieg des Albumins und anderer Plasmaproteine führt (Reiber (1994)). Unterschiedliche hydrodynamische Radien bedingen eine unterschiedliche Filtration in den Liquor (Felgenhauer et al. (1976)), so daß sich für die einzelnen Plasmaproteine unterschiedliche Konzentrationsquotienten mit relativ begrenzten inter-individuellen Variationen ergeben. Wird für ein Kollektiv von Patienten mit nicht-entzündlichen ZNS Erkrankungen der Zusammenhang der Konzentrationsquotienten für Albumin und IgG bestimmt, so zeigt sich eine hohe Korrelation (Reiber und Felgenhauer (1987)). Dies ist die Basis für die Etablierung von Normalbereichen für die Konzentrationsquotienten (Reiber und Felgenhauer (1987), Reiber (1994)).

3.2.2. Enzymimmunoassay für Antikörper gegen HTLV-1 infizierte Zellen

Für diese Experimente wurde die Zell Linie MT-2 verwendet, die ursprünglich durch Kultivierung von Lymphozyten aus Nabelschnurblut mit HTLV-1 infizierten Lymphozyten einer ATL Patientin gewonnen worden war (Miyoshi et al. (1981)). Diese Zell Linie exprimiert relativ große Mengen von HTLV-1 Antigenen (Schneider et al. (1984)) und bildet HTLV-1 Viruspartikel (Miyoshi et al. (1981)).

Die Methodik des Enzymimmunoassays (EIA) unter Verwendung von MT-2 Zellen ist ausführlich beschrieben (Kitze et al. (1995)). Um Aussagekraft und Grenzen des Verfahrens zu verdeutlichen, soll hier das Prinzip kurz dargestellt werden: MT-2 Zellen wurden in gekühlter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; 120 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, pH 7,2) dreimal gewaschen und sorgsam resuspendiert, so daß die Konzentration der Zellsuspension 10⁶ Zellen pro ml entsprach. Von der Suspension wurden 100µl (entsprechend 10⁵ MT-2 Zellen) in jede Kavität einer EIA-Platte mit flachen Böden (Immuno-plate II, NUNC) pipettiert. Die ganze EIA-Platte wurde bei 200 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand aus den Kavitäten abgesaugt wurde, wurden die adhärierenden MT-2 Zellen in den Kavitäten mit Methanol für 5 Minuten fixiert und nach Entfernen des Methanols getrocknet. Zum späteren Gebrauch wurde ein Teil der beschichteten EIA-Platten bei -20°C eingefroren.

Die weitere Durchführung des EIA richtete sich nach den Vorschriften von Reiber und Lange (1991) und Felgenhauer und Reiber (1992). Die Quantifizierung von MT-2 bindenden Antikörpern erfolgte dementsprechend in folgenden Schritten: Inkubation der EIA-Platte mit Proben (Standards, verdünnte Liquores, verdünnte Sera), Inkubation mit einem verdünnten Meerrettich-Peroxidase-markierten Antiserum gegen menschliches IgG und Farbreaktion von Ortho-Phenylendiamin-Hydrochlorid durch enzymatische Spaltung von H₂O₂.

Der Verdünnungspuffer für die Proben und das Meerrettich-Peroxidase-markierte Antiserum enthielt: 2 g Rinderserumalbumin (Sigma), 2 g Tween 20 (Serva), 3 g Milchpuder, 200 µl Antifoam A (Sigma), 10 mg Bromphenolblau (Merck) und 100 mg Thimerosal (Serva) in 1 l PBS (120 mM NaCl, 17 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, pH 7,2). Zwischen den einzelnen Schritten des EIA wurden jeweils dreimal Waschvorgänge mit Waschpuffer (PBS mit Detergens Tween 20 (Serva) in der Konzentration von 0.2 % V/V) durchgeführt. Auf diese Weise wurden die nicht an die EIA-Platte gebundenen Reagenzien entfernt. Als

zweiter Antikörper wurde ein gereinigtes Meerrettich-Peroxidase-markiertes Antiserum gegen die Gammakette von menschlichem IgG (Sigma) verwendet, so daß nur spezifische Antikörper vom Typ IgG, nicht aber andere Immunglobulinklassen erfaßt wurden.

Die Farbreaktion wurde photometrisch quantifiziert, ihr Ausmaß war abhängig von der gebundenen Peroxidase und entsprach somit der Menge an IgG-Antikörpern, die an die fixierten MT-2 Zellen gebunden waren (Abbildung 4). Mittels eines HTLV-1 positiven Serums wurde eine Referenzkurve erstellt.

3.2.3. Differenzierung der HTLV-1 Antikörper mittels Radioimmunpräzipitation

Die Radioimmunpräzipitation von HTLV-1 Antigenen durch IgG-Antikörper im Serum und Liquor folgte weitgehend der beschriebenen Methode (Schneider et al. (1984), Schneider et al. (1987)). Das Verfahren wurde jedoch in zweierlei Hinsicht modifiziert:

Anstatt Protein-A-Sepharose wurde Protein-G-Sepharose verwendet, um nur die Immunkomplexe zu präzipitieren, die IgG-Antikörper enthielten (Björck und Kronvall (1984)).

Die Serumproben wurden soweit verdünnt, daß ihre IgG-Konzentration der des zugehörigen Liquors entsprach (Felgenhauer et al. (1985), Neumann et al. (1990)). Auf diese Weise konnte semiquantitativ festgestellt werden, ob das IgG des Liquors mehr Antikörper gegen einzelne Virusantigene enthielt als das IgG des Serums.

Die Durchführung der Versuche wird im folgenden dargestellt: $1,2 \times 10^7$ MT-2 Zellen wurden mit 2 mCi ^{35}S -Methionin/Cystein (NEN) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die markierten Proteine wurden aus den gewaschenen und sedimentierten MT-2 Zellen in 800 μl des Puffers LSEB extrahiert ("*low salt extraction buffer*": 0,14 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol (Serva), 2 mM Phenylmethylsufonylfluorid (Calbiochem), 0,5 % V/V NP-40 (Fluka)). Nach Zentrifugation (8000 g, 4°C , 5 Minuten) wurde der Überstand, der die extrahierten zellulären und retroviralen Proteine enthielt, in 100 μl Volumina aliquotiert und bei -80°C eingefroren für die später durchzuführenden Immunpräzipitationen.

Jeder einzelne Ansatz der Immunpräzipitationen bestand aus 10 µl MT-2 Lysat (s.o.), 10 µl verdünnter Serum- oder Liquorprobe bzw. Positiv- oder Negativkontrolle, sowie 30 µl Reaktionspuffer (1 Volumen LSEB, 2 Volumen PBS, 0,2 mg/ml Ovalbumin (Sigma)). Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jedem Ansatz 20 µl Protein-G-Sepharose (Pharmacia) hinzugegeben, die zuvor zweimal in Reaktionspuffer gewaschen worden war. Die Ansätze wurden nun bei 4°C 30 Minuten lang unter kontinuierlicher Durchmischung inkubiert, um die Immunkomplexe an Protein-G-Sepharose zu binden. Im Anschluß wurden die nicht gebundenen Antigene bei 4°C dreimal mit 500 µl HSWB pro Ansatz ("*high salt washing buffer*": 20 mM TRIS-HCl (Serva) pH 7,6 , 0,5 mM NaCl (Merck), 1 mM EDTA (Merck), 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (Merck), 0,5 % (V/V) NP-40 (Fluka), 30 % (w/v) Saccharose (Merck)) und zweimal mit 500 µl LSWB pro Ansatz ausgewaschen ("*low salt washing buffer*": 10 mM TRIS-HCl (Serva) pH 7,6 , 10 mM NaCl). Nach der letzten Zentrifugation für 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute in einer Eppendorf-Zentrifuge wurde der Überstand vollständig abgesaugt. Die Immunkomplexe wurden durch Erhitzung auf 96°C von der Protein-G-Sepharose gespalten und die Protein-G-Sepharose durch Zentrifugation abgetrennt. Die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der präzipitierten, ³⁵S-markierten MT-2 Antigene erfolgte nach einem Standardverfahren (Laemmli (1970), Schneider et al. (1984)), die Gele wurden autoradiographisch nach etwa viertägiger Exposition der Röntgenfilme (Kodak) ausgewertet.

3.2.4. Enzymimmunoassay unter Verwendung synthetischer Peptide

Der EIA mit synthetischen Peptiden unterschied sich grundsätzlich nicht von dem EIA von Reiber und Lange (1991), sowie dem in Abschnitt 3.2.2. dargestellten Verfahren (Kitze et al. (1996a)). Die verwendeten Puffer sind ebenfalls in Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

Im Hinblick auf die Verwendung synthetischer Peptide, die definierten linearen HTLV-1 Sequenzen entsprachen (Tabelle 4) ergaben sich jedoch offene Fragen: Es mußte davon ausgegangen werden, daß die Quantität der Peptidbindenden Antikörper erheblich niedriger sein würde als die an virusinfizierte Zellen (siehe: Abschnitt 3.2.2.) oder an ein Gemisch von viralen Proteinen (Reiber und Lange (1991)) bindenden Antikörper. Es konnte auch nicht vorausgesehen werden, ob die unspezifische Bindung von IgG an die EIA-Platten

niedriger sein würde als die spezifische Bindung an die Peptide, mit denen die EIA-Platten beschichtet wurden.

Die EIA-Platten wurden mit synthetischen Peptiden in einer Konzentration von 1 µg pro ml PBS beschichtet. In jeder Versuchsserie wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen alle Probenverdünnungen auf einer unbeschichteten Platte getestet wurden. Die Probenverdünnungen für Liquor waren 1:5 und 1:50 und für Serum 1:1000 und 1:10 000. Wie beim MT-2 Zell EIA wurde ein für humanes IgG spezifischer, Peroxidase-beladener Antikörper als zweiter Antikörper (Biosource) verwendet. Referenzkurven wurden mit Standardseren erstellt, die für das jeweilige synthetische Peptid im EIA eine hohe Farbreaktion gezeigt hatten (Abbildung 8). So konnte für jede Probe, Liquor oder Serum, im Hinblick auf jedes getestete Peptid die Konzentration der bindenden Antikörper in willkürlichen Einheiten des Referenzserums angegeben werden.

Tabelle 4: Synthetische Peptide von HTLV-1 env, gag, tax und rex Aminosäuresequenzen, gegen die IgG-Antikörper im EIA nachgewiesen wurden.

HTLV-I Protein	Aminosäure-nummern	Sequenz*
gag p19	100-130	PPPPSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL
	100-119	PPPPSSPTHDPDSDPQIPP
	119-130	PPYVEPTAPQVL
gag p24	131-160	PVMHPHGAPPNHRPWQMKDLQAIKQEVSPA
	288-317	GLPEGTPKDPILRSLAYSANKECQKLLQA
env gp21	332-352	GGITGSMSLASGKSLLEHVDKD
	350-386	VDKDISQLTQAIKVNHNKLLKIAQYAAQNRRLDLLF
	382-403	LDLLFWEQGLCKALQEQRFP
	458-488	LAGPCILRQLRHLPSRVRYPHYSLIKPESSL
env gp46	20- 49	GDYSPSCCTLTIGVSSYHSPGNPAQPVCS
	136-160	TKKPNRNGGGYYSASYSDPGSLKCPYL
	175-199	FLNTEPSQLPPTAPPLLPHSNLDHI
	197-216	DHILEPSIPWKSLLTLVQL
	213-236	LVQLTLQSTNYTCIVCIDRASLST
	235-254	STWHVLYSPNVSPSSSSTP
	253-282	TPLLYPSLALPAPHLTLPFNWTHCFDPQIQ
	277-292	CFDPQIQAIVSSPCHN
	288-317	PCHNSLILPPFSLSPVPVPTLGSRRRAVPVA
tax p40	106-125	LQAMRKYSPPFRNGYMEPTLG
	316-335	PISLLFNEKEADDNDHEPQI
	331-350	HEPQISPGGLEPPSEKHFRE
	336-353	SPGGLEPPSEKHFRETEV
rex p27	1- 20	MPKTRRRPRRSQRKRPTPW
	46- 65	TGAPSLGDYVRPAYIVTPYW
	76- 95	TPSMDALSAQLYSSLSLDSP

* Buchstabenkodierung für Aminosäuren

3.2.5. Intrathekale Synthese von Antikörpern gegen HTLV-1 Antigene und synthetische Peptide

Wenn eine intrathekale Synthese von virusspezifischen IgG-Antikörpern im Rahmen eines entzündlichen ZNS Prozesses vorliegt, kann ihr Liquor/Serum-Konzentrationsquotient gleich oder größer als der des gesamten IgG sein (Felgenhauer und Reiber (1992), Reiber und Lange (1991)). Es wurde ein Antikörper-Spezifitätsindex (ASI; Felgenhauer und Reiber (1992)) bestimmt, wobei der Konzentrationsquotient des virusspezifischen IgG durch den des gesamten IgG geteilt wurde. Für HTLV-1 spezifische Antikörper der Klasse IgG lautet die Formel:

$$\text{ASI} = \frac{\text{Q IgG (HTLV-1)}}{\text{Q Gesamt-IgG}} = \frac{\frac{\text{IgG (HTLV-1) im Liquor}}{\text{Gesamt-IgG im Liquor}}}{\frac{\text{IgG (HTLV-1) im Serum}}{\text{Gesamt-IgG im Serum}}}$$

Der ASI ist theoretisch gleich 1, soweit keine intrathekale virusspezifische Antikörpersynthese vorliegt (s.o.). Der tatsächlich bestimmte ASI hängt allerdings von der Präzision der immunochemischen Bestimmungen ab, die in die Berechnung eingehen. Reiber und Lange (1991) haben vorgeschlagen, in Fällen einer intrathekalen Synthese von Gesamt-IgG den empirisch ermittelten Q IgG (lim) einzusetzen, der die obere Grenze des Normalbereiches der IgG-Quotienten als Funktion des Albumin-Quotienten darstellt. Durch diese Modifikation erhöht sich die diagnostische Sensitivität der Methode (Reiber und Lange (1991)). Es ergeben sich folgende Fälle:

(1) $\text{ASI} < 1 + x$

---> Keine intrathekale Synthese von HTLV-1 spezifischen Antikörpern

(2) $\text{ASI} > 1 + x$

---> Nachweis einer intrathekalen Synthese von HTLV-1 spezifischen Antikörpern

(x hängt von der Präzision der immunochemischen Bestimmungen ab und muß empirisch bestimmt werden)

Bei diesem Verfahren der Auswertung muß berücksichtigt werden, daß das Ergebnis eine qualitative Aussage darstellt, ob intrathekale Antikörper gebildet werden oder nicht (Reiber und Lange (1991)). Die Höhe des Index erlaubt nur beschränkte Aussagen über die Quantität der intrathekalen Antikörperproduktion, die mittels zusätzlicher methodischer Ansätze ermittelt werden kann (Conrad et al. (1994), Reiber et al. (1998)).

3.3. HLA Typisierung und Identifikation der HLA Haplotypen

In den hier dargestellten Untersuchungen konnte auf Daten der HLA Haplotypen von HAM/TSP Patienten zurückgegriffen werden, die von Usuku et al. (1988) und Sonoda et al. (1992) zunächst mittels spezifischer Antisera im *National Institute of Health* Mikrozytotoxizitätstest (Terasaki und McClelland (1964), Kissmeyer et al. (1969)) und durch Familienanalysen bei HAM/TSP Patienten gewonnen wurden.

Das Prinzip des Mikrozytotoxizitätstests soll kurz dargestellt werden: Aus dem Blut der zu untersuchenden Individuen werden Zellen isoliert, die HLA Klasse I Antigene auf der Zelloberfläche tragen (T-Zellen) und Zellen die HLA Klasse II Antigene tragen (B-Zellen). Die T-Zellen werden mit standardisierten HLA A, B und C Antisera inkubiert, die B-Zellen mit HLA DR und DQ Antisera. Nach Zugabe von Kaninchen Komplementfaktoren wird die Anzahl der lysierten mononukleären Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt und daraus abgeleitet, welchen HLA Phänotyp die Individuen besitzen. Die Kriterien der Zuordnung zu HLA A, B, C, DR und DQ Spezifitäten richtete sich nach der Nomenklatur des 11. Internationalen Histokompatibilität Workshops (Bodmer et al. (1992)). Die HLA Typisierung von Angehörigen der Patienten erlaubte die Identifizierung der Haplotypen.

Mittels molekularbiologischer Methoden wurden HTLV-1 infizierte Patienten HLA typisiert im Rahmen eines internationalen HLA Workshops unter Leitung von Prof.S.Sonoda (<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~hla/hla.html>; siehe auch: Jeffery et al. (1999), Manns et al. (1998)). Durch diese molekularbiologischen Untersuchungen wurden die serologischen HLA Daten bestätigt, erweitert und im Rahmen des internationalen HLA Workshops präsentiert. Für die hier dargestellten immunologischen Untersuchungen war es möglich, diese HLA Daten zu verwenden.

3.4. Charakterisierung antigenspezifischer CD4+ T-Lymphozyten

3.4.1. Isolierung und Selektion

Die Methode der Isolierung von menschlichen antigenspezifischen CD4+ T-Lymphozyten in Mikrokulturen (als Alternative zu den zuvor häufig verwendeten "*bulk cultures*") wurde erstmals 1986/87 in der Klinischen Forschungsgruppe für Multiple Sklerose der Max-Planck-Gesellschaft in Würzburg entwickelt (Kitze et al. (1988), Pette et al. (1990), Wekerle (1998)) und seitdem in verschiedenen immunologischen Labors weltweit angewandt und modifiziert. Das Prinzip der Methodik orientiert sich an den sogenannten "*limiting dilution assays*" (Henry et al. (1980)), die die Abschätzung der Häufigkeit von antigenspezifischen Lymphozyten in einer Zellsuspension erlauben (Wekerle (1998)).

Die Mikrokulturtechnik wurde hier angewandt und weiterentwickelt, um sowohl von nicht HTLV-1 Infizierten als auch von HAM/TSP Patienten CD4+ T-Lymphozyten Linien zu isolieren und zu charakterisieren. Für diese Experimente wurden Individuen ausgesucht, die HLA DR1 bzw. HLA DRB1*0101 positiv waren. Bei den HTLV-1 infizierten Individuen mußte die besondere Problematik berücksichtigt werden, daß ein Teil der CD4+ T-Lymphozyten HTLV-1 als Provirus integriert hatte und dadurch besondere Wachstumseigenschaften besaß (siehe: Abschnitte 1.1.2. und 1.1.3. der Einleitung).

Für die Anwendung der Mikokulturmethode mußten 4 Voraussetzungen erfüllt sein. Erstens wurde eine große Anzahl von Mikrokulturen streng separat gehalten, ohne daß Zellen aus der einen in die andere Kultur gelangen konnten. Zweitens wurden alle Faktoren aus dem Medium entfernt, die ein unspezifisches Lymphozytenwachstum unterstützten. Drittens wurde eine Vorauswahl nach 2 bis 3 Runden der Stimulation durch Antigen und antigenpräsentierende Zellen (APC) und Propagation in II-2 haltigem Medium getroffen, um diejenigen Mikrokulturen zu identifizieren, die antigen-abhängig proliferierten ("*split well technique*"). Viertens mußte zuverlässig antiseptisch gearbeitet werden, da jede Kontamination den ganzen Versuchsansatz, der etwa 1 bis 2 Monate dauerte, gefährdete.

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut, d.h. Lymphozyten und Monozyten, wurden durch standardisierte Dichtegradientenzentrifugation mittels kommerziell erhältlicher Dichtegradientenmedien von Granulozyten und Erythrozyten getrennt. Die mononukleären Zellen wurden nach mehreren

Waschschritten mit PBS schließlich in Kulturmedium resuspendiert: RPMI mit Zusätzen von Penicillin, Streptomycin (jeweils von Sigma) und mit 5 % V/V normalem humanem Serum, das zur Komplementfaktorinaktivierung für 30 Minuten bei 56°C erhitzt worden war. Dieser Zellsuspension wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten 8 HTLV-1 gp21 Peptide jeweils in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt. Die Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten (Nunc) ausgesät, und zwar 25 x 10³, 50 x 10³, 100 x 10³ und 200 x 10³ PBMC in jeweils 100 µl von dem oben angegebenen Kulturmedium pro Kavität. In jedem Experiment wurden mindestens 200 Mikrokulturen in dieser Art begonnen.

Tabelle 5: Synthetische Peptide von HTLV-1 env gp21, die zur Stimulation und Selektion humaner T-Lymphozyten verwendet wurden.

HTLV Peptid	Aminosäuren	Sequenz*
sp332	332-352	GGITGSMSLASGKSLLEVDKD
sp343	343-363	GKSLLEVDKDISQLTQAIVK
sp350	350-386	VDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLLF
sp378	378-398	NRRGLDLLFWEQGGGLCKALQE
sp382	382-403	LDLLFWEQGGGLCKALQEQRFP
sp400	400-426	CRFPNITNSHVPILQERPPLENRVLTG
sp426	426-448	GWGLNWDLGLSQWAREALQTGIT
sp458	458-488	LAGPCILRQLRHLPSPRVRYPHYSLIKPESSL

* Buchstabenkodierung für Aminosäuren

4 Tage nach Beginn der Mikrokulturen wurde Il-2 (Takeda) dem Medium in einer Endkonzentration von 1 IU/ml hinzugefügt. Im weiteren Verlauf wurden die Mikrokulturen alle 2 bis 4 Tage in Abhängigkeit von ihrer Proliferation mit frischem Il-2 haltigen Kulturmedium versorgt, und zwar für insgesamt 2 Wochen nach Kulturbeginn. Am Tag 14 wurden die Mikrokulturen in den Zellkulturplatten zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde PBS durch Kulturmedium (s.o.) ohne Il-2 ersetzt. Um die Proliferation der HTLV-1 gp21 spezifischen T-Lymphozyten selektiv zu stimulieren, wurden antigen-präsentierende Zellen und die 8 synthetischen Peptide des HTLV-1 gp21

hinzugegeben. Als antigenpräsentierende Zellen dienten in HLA DR1 DQ5 übereinstimmende PBMC, die von einem HTLV-1 PCR-negativen und HTLV-1 seronegativen Donor gewonnen und mit Mitomycin C (Sigma) behandelt worden waren, um zu verhindern, daß die darin enthaltenen Lymphozyten proliferierten. Erneut wurde nach 4 Tagen Il-2 hinzugegeben und die Mikrokultur für die folgenden 10 Tage mit Il-2 haltigem Medium versorgt.

Am Tag 28 wurden die Mikrokulturen dreimal mit PBS gewaschen und in frischem Kulturmedium ohne Antigen und ohne Il-2 resuspendiert. 2 APC Suspensionen wurden (wie oben beschrieben) aus HLA DR1 DQ5 identischen, Mitomycin-behandelten PBMC vorbereitet: Die erste Zellsuspension wurde mit den 8 HTLV-1 gp21 Peptiden (Endkonzentration 1 µg/ml für jedes Peptid), die zweite Zellsuspension ohne Antigen vorinkubiert. Diese APC Suspensionen wurden in neue Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten streifenförmig verteilt, so daß jeweils Antigen-exponierte APC und nicht exponierte APC in ihren Kavitäten benachbart waren. Nun wurde jede einzelne Mikrokultur in 2 gleiche Teile getrennt: Die eine Hälfte wurde inkubiert mit Antigen-exponierten APC, die andere Hälfte zur Kontrolle mit nicht exponierten APC („*split well assay*“). Die zweigeteilten Mikrokulturen wurden nun für 4 Tage inkubiert, bevor eine Selektion vorgenommen wurde: Nur die Mikrokulturen wurden als positiv bewertet, die ausschließlich ein Wachstum in Gegenwart von Antigen zeigten, aber keine Proliferation ohne Antigen.

Die ausgewählten Mikrokulturen wurden durch mehrere Zyklen von antigen-spezifischer Aktivierung und Proliferation in Il-2 haltigem Medium expandiert, so daß schließlich T-Zell Linien vorlagen mit einer gesamten Zellzahl von 10^6 bis 10^7 T-Lymphozyten. Alle etablierten T-Zell Linien zeigten in der Immunfluoreszenz einen CD4+ CD3+ Phänotyp. Da die Mikrokulturen initial mit unterschiedlichen Zellzahlen (25×10^3 , 50×10^3 , 100×10^3 und 200×10^3 PBMC) begonnen worden waren, konnte die Häufigkeit antigenspezifischer Zellen geschätzt werden (Henry et al. (1980)).

In den unten beschriebenen Experimenten wurde die Proliferation der T-Zell Linien systematisch getestet, wobei 10^4 Zellen der einzelnen Linien in Mikrotiterplatten von 96 Kavitäten mit rundem Boden in Triplikaten eingesät wurden, jeweils unter definierten experimentellen Bedingungen. Als antigenpräsentierende Zellen wurden HLA DR1 DQ5 identische PBMC verwendet (2×10^5 pro Kavität), die zuvor mit Mitomycin C behandelt worden waren (s.o.). Am dritten Tag des Proliferationsassays wurde 1 µCi ^3H -Thymidin (spezifische Aktivität 25

Ci/mmol) hinzugegeben. Nach weiteren 16 Stunden wurde die in die DNS der proliferierenden Zellen inkorporierte Aktivität nach Adsorption der DNS an Filterplättchen, Trocknen der Filter und Zugabe von Szintillationsflüssigkeit mit einem Betacounter quantifiziert.

3.4.2. Untersuchung der Feinspezifität und der T-Zell Epitope

Da die T-Lymphozyten Linien durch Stimulation mit 8 verschiedenen synthetischen Peptiden des HTLV-1 env gp21 Proteins expandiert worden waren, mußte zunächst getestet werden, gegen welches der 8 Peptide jede einzelne Zell Linie reagierte. Zusätzliche synthetische Peptide einer Länge von 15 Aminosäuren wurden verwendet, die die gesamte Aminosäuresequenz des HTLV-1 env Proteins umfaßten und jeweils um 5 Aminosäuren verschoben waren (Yamano et al. (1997)). Zur genaueren Charakterisierung eines T-Zell Epitops wurden 6 synthetische Peptide synthetisiert mit einer Länge von 15 Aminosäuren und einer Verschiebung von einer Aminosäure. Diese synthetischen Peptide wurden mit Hilfe von Frau K.Ikeda, M&S Techno Systems, Osaka/Japan, synthetisiert und mittels HPLC gereinigt.

Die synthetischen Peptide wurden in den angegebenen molaren Konzentrationen eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein kommerziell erhältliches, rekombinantes HTLV-1 p21 Protein (HTLV-1 rp21 326-433), das den Aminosäuren 326 bis 433 des nativen HTLV-1 env gp21 entsprach (Intracel Corporation). Durch die Verwendung dieser Positivkontrolle sollte darüberhinaus gezeigt werden, daß nach Antigenverarbeitung („*antigen processing*“) des rekombinanten Proteins durch die antigenpräsentierenden Zellen spezifische T-Lymphozyten aktiviert wurden.

3.4.3. Untersuchung der HLA Restriktion

Kommerziell verfügbare monoklonale Antikörper, die vor Verwendung dialysiert worden waren, wurden in verschiedenen Verdünnungen mit den antigenpräsentierenden Zellen inkubiert, bevor die APC zur antigenspezifischen Stimulation von T-Zell Linien verwendet wurden. Folgende monoklonale Antikörper fanden Verwendung: anti-HLA-ABC (DAKO), anti-HLA-DR, anti-HLA-DQw1/3,

anti-HLA-DP (Becton-Dickinson).

3.4.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis der proviralen HTLV-1 Integration in T-Zell Linien

Aus Zellsuspensionen (PBMC oder über mehrere Passagen kultivierte T-Zell Linien) wurde nach einem Standardverfahren DNS isoliert (Davis et al. (1994)). Die gereinigte DNS wurde in TE-Puffer (10 mM TRIS-Cl, pH 7,4 , 0,1 mM EDTA) gelöst und die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Proben wurden bei -30°C eingefroren, falls sie nicht sofort in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht wurden.

In der PCR wurden zum Nachweis zellulärer DNS Primer für das Myelin/Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) Gen und zum Nachweis proviraler HTLV-1 DNS Primer für das tax Gen verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: In der PCR verwendete Primer zum Nachweis zellulärer DNS und proviraler HTLV-1 DNS.

Gen	Primer	PCR-Produkt	Referenz
<u>MOG</u>		323 bp	Kitze (unveröffentlicht)
	MOG5 5'-CAG TTC AGA GTG ATA GGA CC-3'		
	MOG6 5'-GCC TCC TCT TGG TAA GAA TG-3'		
<u>HTLV-1 tax</u>		160 bp	Heneine et al. (1992)
	SK43 5'-TGG ATA CCC CGT CTA CGT GT-3'		
	SK44 5'-GAG CTG ACA ACG CGT CCA TCG-3'		

Etwa 200 ng DNS der verschiedenen Zell Linien wurde in jeden PCR Ansatz eingesetzt. Die übrigen Reagenzien der PCR und die Primer (25 pmol pro Ansatz) wurden entsprechend der Vorschrift des kommerziell erhältlichen TaKaRa PCR Kits (TaKaRa) hinzugegeben. Vor der Zugabe der Taq-DNS-Polymerase wurden die Ansätze für 5 Min. bei 96°C erhitzt. Die im Thermozykler durchgeführte PCR umfaßte 30 Zyklen: 30 Sek. bei 96°C ("*denaturing*"), 30 Sek. bei 55°C ("*annealing*") und 90 Sek. bei 72°C ("*primer extension*"). Die PCR-Produkte wurden nach einem Standardverfahren im Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Davis et al. (1994)).

3.5. Analyse von Sequenzhomologien der immundominanten Epitope

Die empirisch ermittelten Aminosäuresequenzen der immundominanten T-Zell und B-Zell Epitope wurden einer Homologiesuche unterzogen. Daraus können sich Hinweise auf ein "*molecular mimicry*" (Übereinstimmung von Aminosäuresequenzen in Viren bzw. Bakterien mit Sequenzen von sogenannten Autoantigenen; Oldstone (1987)) oder auf Homologien der HTLV-1 Sequenzen mit entsprechenden Sequenzen anderer Retroviren ergeben. Mittels des "*basic local alignment search tool*" (BLAST; Altschul et al. (1990)), das über das Internet am "*National Center for Biotechnology Information*" der Vereinigten Staaten von Amerika angewendet werden kann, wurden in der Datenbank SWISS-PROT homologe Aminosäuresequenzen gesucht. Die Ergebnisse der Suche sind beispielhaft in den entsprechenden Tabellen 14 und 15 dargestellt, wobei nur Sequenzen mit hoher Homologie berücksichtigt wurden. Einerseits wurde in der SWISS-PROT Datenbank nach Aminosäuresequenzen bekannter Proteine gesucht, andererseits wurde die GeneBank Datenbank EST ("*expressed sequence tags*") nach exprimierten Sequenzen durchsucht.

Um eine Übersicht über die Verwandtschaft der retroviralen env Proteine zu erhalten, wurden alle in der SWISS-PROT Datenbank verfügbaren retroviralen env Aminosäuresequenzen im Hinblick auf homologe Sequenzen untersucht und ein evolutionärer phylogenetischer Stammbaum (Abbildung 1) erstellt. Dabei wurden die von Smith und Waterman (1981) beschriebenen und von Gonnet et al. (1992) weiterentwickelten Algorithmen verwendet. Im Prinzip handelt es sich um eine Berechnung des phylogenetischen Stammbaumes nach der Methode der kleinsten Quadrate (Gonnet (1994)). Diese Analyse

wurde möglich durch die an der Eidgenössisch Technischen Hochschule Zürich ("*Computational Biochemistry Research Group*") über das Internet zugänglichen Rechenprogramme zur Erfassung von homologen Sequenzen und zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume.

3.6. Auswertungen

Zu jedem untersuchten Patienten lagen zahlreiche Daten vor: Diagnose, Datum der Probengewinnung, HLA Haplotypen, Albumin und IgG in Liquor und Serum, Konzentration der IgG-Antikörper in Liquor und Serum gegen zahlreiche synthetische Peptide in willkürlichen Einheiten, intrathekale virusspezifische Antikörpersynthese etc.. Diese Daten wurden verschlüsselt in eine *dBase IV* Datenbank (DOS Programm, Version 1.5; Borland International) mit Eingabemaske und Berechnung abgeleiteter Variablen (z.B. des Antikörper-Spezifitätsindex) eingegeben, um die Auswertung zu erleichtern.

Die *dBase IV* Datensätze konnten zur statistischen Analyse direkt in die Statistikpakete *Systat* (DOS Programm, Version 5.0; Systat Inc.) oder *Statistica* (Version 5.5A für *Windows*; StatSoft Inc.) übernommen werden. Die Anwendung statistischer Tests richtete sich nach den von Armitage und Berry (1994) und Glantz (1998) dargestellten Prinzipien und den Handbüchern der genannten Programme. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Zunächst wurde bei jedem Patienten festgestellt, ob gegen einzelne synthetische HTLV-1 Peptide im Serum spezifische IgG-Antikörper und nach Auswertung der Liquor/Serum-Paare eine intrathekale IgG-Synthese vorlagen (qualitative Analyse; siehe: Abschnitte 3.2.4. und 3.2.5.). Da sich in keiner der untersuchten Patientengruppen vergleichbare Muster der erkannten synthetischen HTLV-1 Peptide zeigten (siehe: Abschnitt 4.2.1.), wurde bei jedem einzelnen Patienten die Anzahl der synthetischen Peptide bestimmt, für die spezifische IgG-Antikörper im Serum oder eine intrathekale IgG-Synthese nachweisbar waren. Bei der weiteren statistischen Analyse dieser nichtparametrischen Daten (d.h. Anzahlen) wurden die Patientengruppen mit dem Kruskal-Wallis- oder Mann-Whitney-U-Test analysiert, d.h. im Hinblick auf die Anzahl der synthetischen HTLV-1 Peptide pro Patient, für die spezifische IgG-Antikörper im Serum nachgewiesen wurden oder für die eine intrathekale Synthese von IgG-Antikörpern vorlag. Da es sich um kleine Stichproben handelte, wurde beim

Mann-Whitney-U-Test nur das sogenannte „exakte p“ berücksichtigt, das das Programm *Statistica* errechnete. Zum Vergleich von 4 Gruppen (Abschnitt 4.2.1; Tabelle 9) wurde im Anschluß an den Kruskal-Wallis-Test ein Paarvergleich mit multiplen Mann-Whitney-U-Tests unter Anwendung der Holm-Prozedur (Holm (1979)) durchgeführt.

Bei der quantitativen Analyse kontinuierlicher Variablen wurde zunächst mit dem Lilliefors-Test geprüft, ob die Daten normalverteilt waren, gegebenenfalls auch nach logarithmischer Transformation. Normalverteilte Daten wurden mit dem ANOVA analysiert. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis- oder dem Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Die initiale graphische Auswertung und Darstellung erfolgte mit dem Programm *Sigmaplot* (DOS Programm, Version 4.1; Jandel Corporation), nachdem die *dBase IV* Datensätze in das "*Data Interchange Format*" (DIF) umgewandelt worden waren. Zur Verbesserung des Layouts und der Einbindung in den Text wurden die Graphiken mit dem Programm *Sigmaplot for Windows* (Version 4.0; Jandel Corporation) nachgearbeitet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Spezifität der intrathekalen und systemischen humoralen Immunantwort gegen HTLV-1 Proteine

4.1.1. Bindung von Antikörpern an Antigene der HTLV-1 infizierten Zell Linie MT-2

Die HTLV-1 infizierte, transformierte Zell Linie MT-2 bildet relativ kontinuierlich die verschiedenen Virusantigene, die env, gag und tax Proteine. Aus diesem Grund ist die Zell Linie besonders gut geeignet, um HTLV-1 spezifische Antikörper zu binden, die dann z.B. mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden können. In einer früheren Untersuchung (Schneider et al. (1987)) wurde diese Linie in einem indirekten Immunfluoreszenzassay verwendet (Abbildung 3). Die Abbildung 3 demonstriert, daß unter den experimentellen Bedingungen des IFA im wesentlichen eine zytoplasmatische Anfärbung der MT-2 Zellen nachgewiesen wurde und daß eine Anfärbung der Zellkerne nicht zu beobachten war, was bereits von Miyoshi et al. (1981) gezeigt worden war. Die fehlende Anfärbung der Zellkerne wirkte sich auch günstig auf die Spezifität des IFA aus, da relativ häufig auch bei gesunden Versuchspersonen mit antinukleären Antikörpern zu rechnen ist.

Um die Konzentrationen der an MT-2 bindenden Antikörper in Liquor und Serum mittels eines EIA zu bestimmen, wurden die experimentellen Bedingungen des IFA zugrunde gelegt. MT-2 Zellen wurden in Mikrotiterplatten fixiert und die an die Zellen bindenden Antikörper im EIA nachgewiesen. Die Methodik des MT-2 EIA erwies sich als geeignet, um HTLV-1 spezifische Antikörper zu quantifizieren. Mittels des EIA konnten Antikörper bis zu einer Verdünnung von ca. 1:30 000 in HTLV-1 positiven Serumproben nachgewiesen werden (Abbildung 4). Dies war ausreichend, um auch Antikörper im Liquor nachzuweisen, die meist bei 1:100 bis 1:1000 der entsprechenden Serumkonzentration lagen.

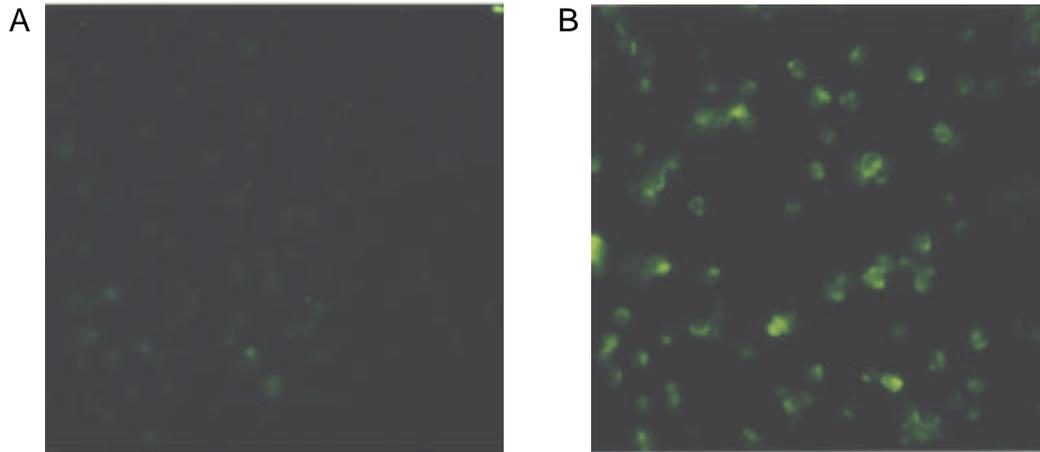


Abbildung 3: Indirekter Immunfluoreszenzassay unter Verwendung der HTLV-1 infizierten Zell Linie MT-2. Nach Fixierung mit Methanol wurden die MT-2 Zellen mit einem positiven Kontroll-Serum (B; japanischer Patient mit ATL) und mit einem negativen Patientenserum (A; deutscher MS Patient) inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein FITC-konjugiertes, anti-human-IgG Antiserum verwendet. Typisch ist die zytoplasmatische Anfärbung der MT-2 Zellen mit dem HTLV-1 positiven Serum (B). Positiv- und Negativkontrollen wurden mit identischer Belichtung aufgenommen.

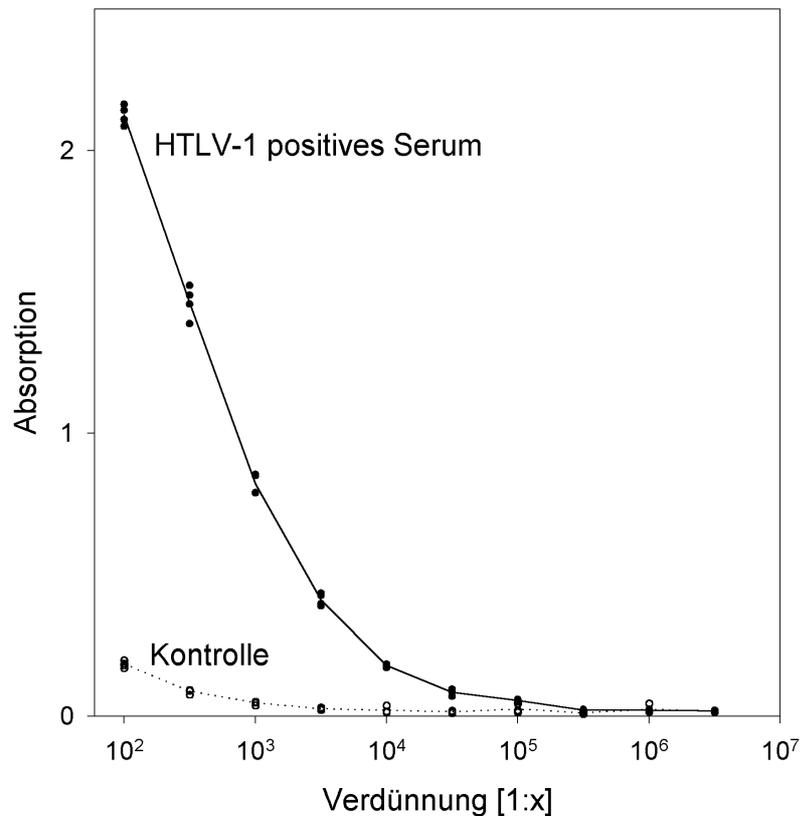


Abbildung 4: Verdünnungskurven eines HAM/TSP Serums (HTLV-1 positives Serum) und eines HTLV-1 negativen Serums (Kontrolle) im MT-2 Zell-EIA in einem repräsentativen Experiment. Es wurden jeweils 4 Einzelbestimmungen pro Verdünnungsschritt durchgeführt.

Die Liquor- und Serumproben von 18 HAM/TSP und 17 HTLV-1 seronegativen Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (einschließlich 6 MS Patienten) aus Brasilien wurden mit dem MT-2 Zell-EIA untersucht. An 2 Serien von HTLV-1 seropositiven und -negativen Proben wurde die Sensitivität und Spezifität der Methodik überprüft (Tabelle 7). Es zeigte sich eine gute Differenzierung der positiven und negativen Proben anhand der Absorption im MT-2 Zell-EIA.

Tabelle 7: Absorptionen im MT-2 Zell-EIA. Seren von HTLV-1 negativen und positiven Patienten, die zuvor mit einem kommerziellen EIA, WBA bzw. PCR untersucht worden waren (Kitze et al. (1992), Puccioni-Sohler (1994)), wurden in der Verdünnung 1:3000 getestet, um die Spezifität und Sensitivität der Methodik zu überprüfen.

Experiment	HTLV-1 pos./neg.	Zahl	Absorption im MT-2 EIA (Bereich)
I	pos.	18	0,051 - 0,462
	neg.	2	0,014 - 0,017
II	pos.	4*	0,137 - 0,522
	neg.	17	0,004 - 0,032

* Die 4 seropositiven Proben waren auch im Experiment I getestet worden.

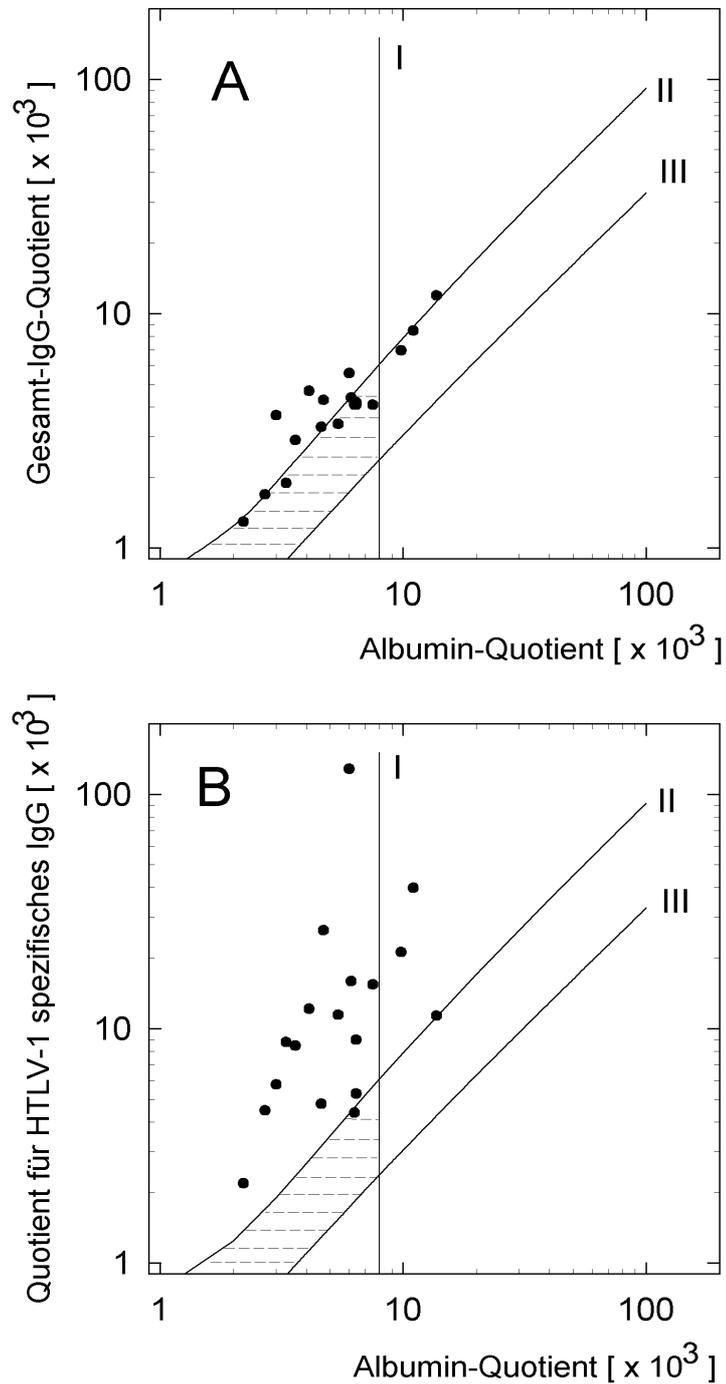


Abbildung 5: Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten für das gesamte IgG (A) und HTLV-1-spezifisches IgG (B) im Verhältnis zum Albumin Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten bei 18 brasilianischen HAM/TSP Patienten. Die Kurven I, II und III begrenzen den Normalbereich, der durch unterbrochene horizontale Linien markiert ist (berechnet nach Reiber und Felgenhauer (1987)).

Zunächst wurden die Absorptionen aller brasilianischen Seren bei einer Verdünnung 1:3000 verglichen, um die Unterschiede zwischen HTLV-1 positiven und negativen Seren im MT-2 Zell-EIA zu charakterisieren (Tabelle 7). Dann wurden die Konzentrationen von Albumin, Gesamt-IgG und HTLV-1 spezifischem IgG (in willkürlichen Einheiten eines positiven Standardserums) für jedes Liquor/Serum Paar der HAM/TSP Patienten bestimmt. Die Konzentration im Liquor wurde durch die des Serums geteilt, wie im Abschnitt 3.2.5. dargestellt. Abbildung 5 stellt im Quotientendiagramm die Quotienten des Gesamt-IgG (Abbildung 5 A) und des MT-2 bindenden IgG (Abbildung 5 B) in Abhängigkeit von den Albuminquotienten dar. Dieser Auswertung lagen die von Reiber und Felgenhauer (1987) empirisch ermittelten Normalbereiche für diese Konzentrationsquotienten zugrunde. 5 der 18 HAM/TSP Patienten hatten nach dieser Auswertung eine intrathekale Synthese des Gesamt-IgG. Der Anteil von Patienten mit einer intrathekalen Immunglobulinsynthese erhöhte sich deutlich, wenn das MT-2 bindende IgG bestimmt wurde: 15 von 18 Patienten bildeten intrathekal IgG-Antikörper, die an die MT-2 Zell Linie banden. MT-2 bindende IgG-Antikörper werden also sowohl systemisch als auch intrathekal bei HAM/TSP Patienten gebildet.

4.1.2. Radioimmunpräzipitation von HTLV-1 Antigenen durch Antikörper im Liquor und Serum

Der MT-2 Zell-EIA ließ zunächst die Frage offen, welche MT-2 Antigene durch die Antikörper im Liquor und im Serum gebunden werden. Es könnte sich sowohl um virus-kodierte als auch zell-kodierte Antigene handeln. Zur Differenzierung der IgG-Antikörperspezifitäten wurde ein RIPA mit Hilfe radioaktiv markierter MT-2 Proteine durchgeführt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels Protein-G-Sepharose präzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt, um die gebundenen, ³⁵S -markierten Antigene zu identifizieren. Dies geschah anhand der bekannten Molekularmassen der präzipitierten Proteine, was auf die Spezifität der IgG-Antikörper hinwies.

Abbildung 6 zeigt die Verdünnungsreihe eines HTLV-1 positiven Serums von 1:10 bis 1:3000. Neben unspezifischen Banden, die in allen Verdünnungen unverändert sichtbar waren, zeigten sich Banden, die den bekannten HTLV-1 gag und env Antigenen zuzuordnen waren und bei höheren Verdünnungen schwächer wurden. Dennoch waren diese typischen Banden auch bei einer Verdünnung von 1:3000 noch gut sichtbar.

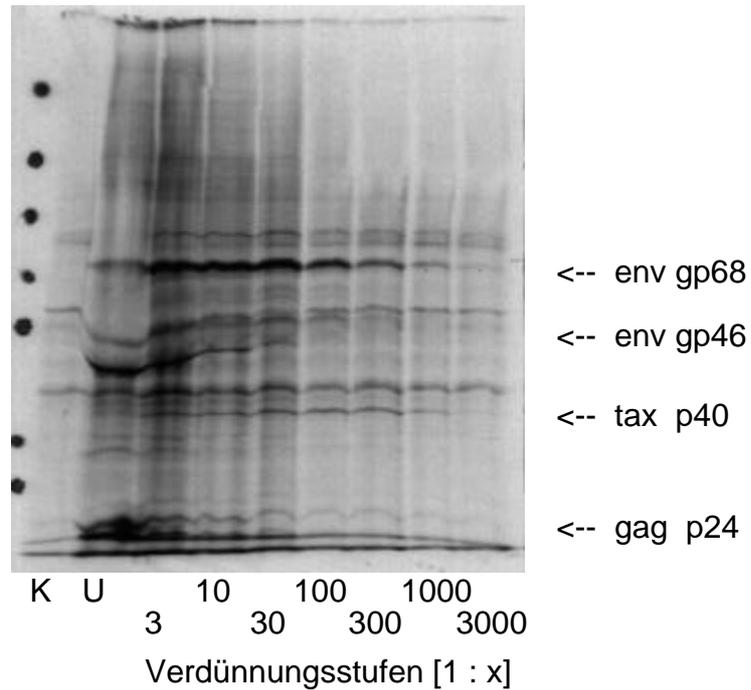


Abbildung 6: Ein HTLV-1 positives Serum wurde unverdünnt (U) und in Verdünnungsstufen von 1:3 bis 1:3000 im RIPA eingesetzt. Nach Inkubation mit den Antikörpern in den Proben wurden die resultierenden Immunkomplexe mittels Protein-G-Sepharose präzipitiert und in der SDS-PAGE (Gradientengel 9 - 16 %) aufgetrennt. Die ³⁵S-radioaktiv markierten HTLV-1 Proteine waren als typische Banden für env gp68, env gp46, tax p40 und gag p24 bis zu einer Verdünnung von 1:3000 sichtbar. Zusätzlich fanden sich unspezifische Banden, die sich auch bei einem HTLV-1 negativen Kontrollserum (K) zeigten.

Auffällig war auch eine Bande, die bei einem Molekulargewicht von etwa 40 000 Dalton lag (Abbildungen 6 und 7), dem tax Protein p40 entsprechend. Mit dem RIPA war es darüberhinaus möglich, in 1 : 1000 verdünnten Serumproben noch das typische Bandenmuster der Antikörper gegen HTLV-1 gag, env und tax Antigene zu erkennen. Bei dieser Verdünnung eines Serums entspricht die IgG-Konzentration etwa der des Liquors.

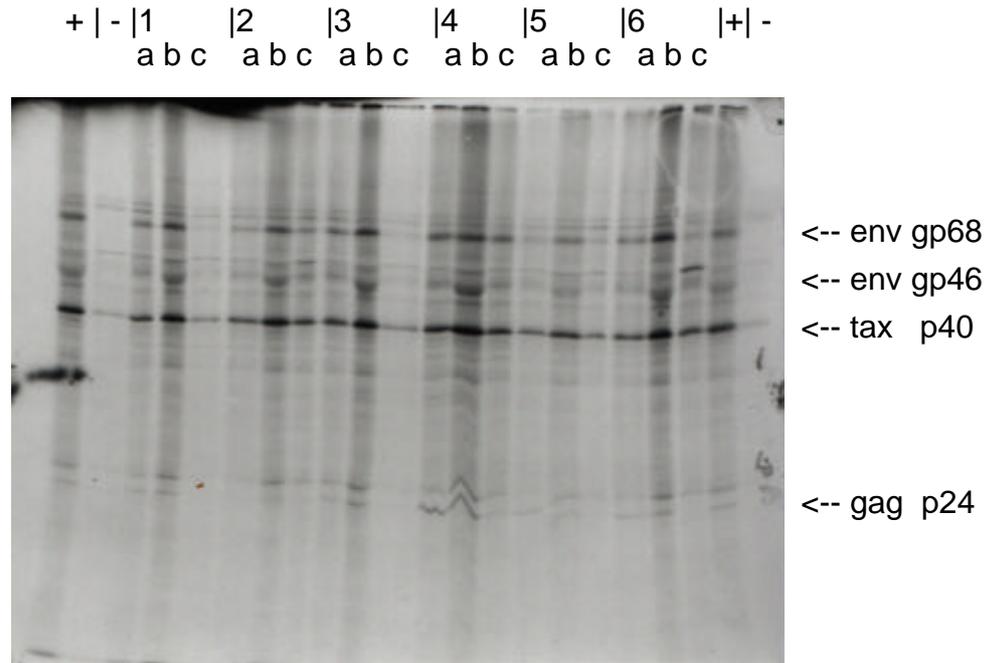


Abbildung 7: ³⁵S-radioaktiv markierte HTLV-1 Proteine aus MT-2 Zellen wurden durch IgG-Antikörper in Liquor und Serum gebunden, die Immunkomplexe mittels Protein-G-Sepharose präzipitiert und in der 16 % SDS-PAGE getrennt. Aufgetragen wurden ein HTLV-1 positives Kontrollserum (markiert +; HAM/TSP Patient aus dem Iran), ein HTLV-1 negatives Serum (markiert -) und Liquor sowie Serum von 6 HAM/TSP Patienten aus Brasilien (markiert **1** bis **6**). Bei jedem der 6 HAM/TSP Patienten wurden 3 Immunpräzipitationen durchgeführt:

- (a) unverdünnter Liquor
- (b) 1:10 verdünntes Serum
- (c) Die IgG-Konzentration des Serums wurde durch entsprechende Verdünnung der IgG-Konzentration des zugehörigen Liquors (a) angeglichen.

Wenn die Liquores und Serumverdünnungen der einzelnen Patienten mit gleicher IgG-Konzentration verglichen werden (jeweils (a) und (c)), so zeigt sich, daß die Banden der durch den Liquor präzipitierten HTLV-1 Proteine sich meist deutlicher darstellen.

Die RIPA Analyse der HAM/TSP Proben aus Brasilien zeigte folgende Ergebnisse (Abbildung 7):

In allen Liquor und Serum Proben konnten sowohl HTLV-1 env als auch gag spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

Die Banden der auf Liquor IgG-Konzentration verdünnten Serumproben waren im Vergleich zu den Liquores häufig schwächer.

Auch für 2 der 3 Probenpaare, bei denen keine erhöhten ASIs im MT-2 Zell-EIA

festgestellt worden waren, waren die Liquor-Banden im RIPA deutlicher als die Serum-Banden (Abbildung 7). Bei Anwendung ausreichend empfindlicher immunchemischer Methoden konnten also sowohl im Liquor als auch im Serum IgG-Antikörper gegen verschiedene HTLV-1 Antigene und bei der Mehrzahl der HAM/TSP Patienten (17 / 18) eine humorale Immunantwort innerhalb des ZNS nachgewiesen werden.

4.1.3. Feinspezifität der humoralen Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene

Auf der Basis von zahlreichen, in der Literatur beschriebenen humanen B-Zell Epitopen der HTLV-1 env und gag Proteine wurde ein Enzymimmunoassay mit synthetischen Peptiden entwickelt (Tabelle 2). Dafür mußte die etablierte Nachweismethode einer erreger-spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese (Reiber und Lange (1991), Felgenhauer und Reiber (1992)) modifiziert werden. Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Experiment: eine EIA-Mikrotiterplatte nach der Farbreaktion.

Für diese Untersuchungen wurden Proben HTLV-1 positiver und negativer Patienten aus Kagoshima verwendet (Tabelle 2). Die Auswahl der synthetischen Peptide anhand der Literatur erwies sich in der Tat als sinnvoll, da nur bei seropositiven Patienten Antikörper gegen diese Peptide nachgewiesen werden konnten. Die Absorptionen aller PAA seronegativen Proben (n=11) lagen im Bereich der Kontrollen (d.h. der EIA- Mikrotiterplatten ohne Beschichtung mit synthetischen Peptiden).

Eine weitere Beobachtung erwies sich für die Anwendung der Methode als vorteilhaft: Die unspezifische Bindung des IgG an die EIA-Platten war relativ gering (Abbildung 8). Darüberhinaus zeigten die HTLV-1 negativen Proben in den mit synthetischen Peptiden beschichteten Kavitäten in der Regel eine geringere Absorption als in den unbeschichteten Kavitäten, d.h. die unspezifische Bindung von IgG an die EIA-Platten wurde durch die Beschichtung mit synthetischen Peptiden blockiert. Somit war der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen ein synthetisches Peptid einfach: Nur wenn die Absorption in den beschichteten Kavitäten eindeutig höher lag als in den unbeschichteten, waren IgG-Antikörper gegen das jeweilige Peptid vorhanden (Abbildung 8).

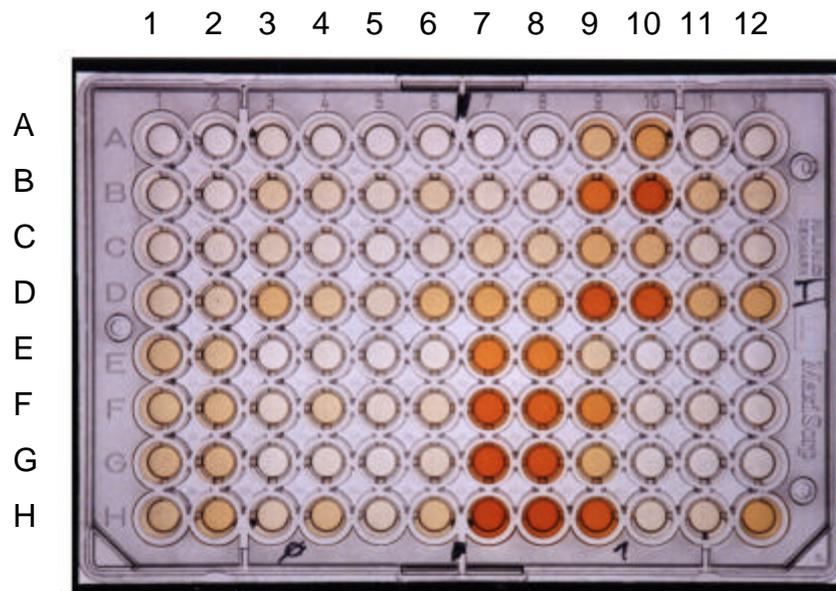


Abbildung 8: Enzymimmunoassay zur Bestimmung peptid-spezifischer IgG-Antikörper, Ergebnis eines repräsentativen Experimentes nach Farbreaktion und vor Messung der Absorptionen.

Die linke Seite der Platte (Reihen 1 - 6) ist unbeschichtet und zeigt die unspezifische Bindung von IgG. Die rechte Seite (Reihen 7 -12) wurde mit dem Peptid HTLV-1 p19 100-130 beschichtet. Reihen 1 und 2 sowie 7 und 8 stellen serielle Verdünnungen eines positiven Standardserums dar: 1:100 (in 1H, 2H, 7H und 8H), 1:316, 1:1000, 1:3160, 1: 10 000, 1:31 600 und 1: 100 000 (in 1B, 2B, 7B und 8B). 1A, 2A, 7A und 8A sind Nullwerte, d.h. Verdünnungspuffer ohne Proben.

In den Reihen 3 bis 6 sowie 9 bis 12 sind an entsprechenden Stellen verdünnte Proben aufgetragen (Liquor 1:5 oder 1:50; Serum 1:100 oder 1:1000). Beispielsweise ist die Probe 9H eindeutig positiv gegenüber der Kontrolle 3H (ohne Peptidbeschichtung). Die Farbintensität der Probe 10H ist aber im Vergleich mit der Kontrolle 4H geringer, so daß hier der Nachweis spezifischer Antikörper für HTLV-1 p19 100-130 negativ ist.

Bei Verwendung von synthetischen Peptiden wird ein bedeutend kleinerer Anteil HTLV-1 spezifischer Antikörper nachgewiesen als mit einem EIA, der auf gereinigten Virusantigenen (Reiber und Lange (1991), Felgenhauer und Reiber (1992)) oder einer virusinfizierten Zell Linie (siehe: Abschnitt 4.1.1.) basiert. Für den EIA mit synthetischen Peptiden mußte also ein eigener "cutoff" für den Antikörper-Spezifitätsindex empirisch ermittelt werden (Tabelle 8; Kitze et al. (1996a)). Der Variationskoeffizient (cv) der nephelometrischen Bestimmung des Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten für das Gesamt-IgG betrug etwa 10 %,

des EIA für das peptid-spezifische IgG etwa 30 %. Legt man eine Streuung der Meßwerte um den erwarteten Wert des Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten Q von jeweils dem Zweifachen des Variationskoeffizienten zugrunde, so ergibt sich bei der nephelometrischen Bestimmung des IgG eine Variation von 0,8 x Q bis 1,2 x Q , bei dem Peptid-EIA 0,4 x Q bis 1,6 x Q. Da beide Meßverfahren in die Berechnung des Antikörper-Spezifitätsindex eingehen, läßt sich für die obere Grenze ein Wert von 1,2 x 1,6 = 1,92 abschätzen. Deshalb wurde für den Antikörper-Spezifitätsindex im Peptid-EIA ein "cutoff" von 2,0 festgelegt.

Tabelle 8: Bestimmung der Inter-Assay-Präzision in der Nephelometrie und im EIA mit synthetischen Peptiden als Basis für die "cutoff" Festsetzung des Antikörper-Spezifitätsindex.

Der Koeffizient der Variation ("*coefficient of variation*"; cv) ergibt sich aus dem Quotienten von Mittelwert (m) und Standardabweichung (s): $cv = s / m$ (Feldkamp und Smith (1987)). Die Variationskoeffizienten für den Albumin- und IgG-Quotienten wurden aus den Einzelwerten berechnet.

Methodik	Parameter	Meßwerte [n]	Variationskoeffizient [%]

Nephelometrie			
	Albumin im Liquor	10	14
	Albumin im Serum	10	8
	Albumin-Quotient	10	14
	IgG im Liquor	10	10
	IgG im Serum	10	8
	IgG-Quotient	10	10

EIA für HTLV-1 p19 100-130 spezifisches IgG			
	Liquor	40	10
	Serum	40	20
	Quotient	40	31

4.2. Lineare B-Zell Epitope der intrathekalen Immunantwort gegen HTLV-1

In diesem Abschnitt wird die intrathekale Synthese von IgG-Antikörpern gegen env und gag Epitope bei HTLV-1 Infizierten mit und ohne HAM/TSP gegenübergestellt. Es wird die Quantität der intrathekalen Immunantwort abgeschätzt, der

Verlauf der Antikörper-Spezifitätsindizes verfolgt und die intrathekale Synthese von IgG-Antikörpern gegen synthetische Peptide von HTLV-1 tax und rex analysiert (bisher nicht publizierte Daten).

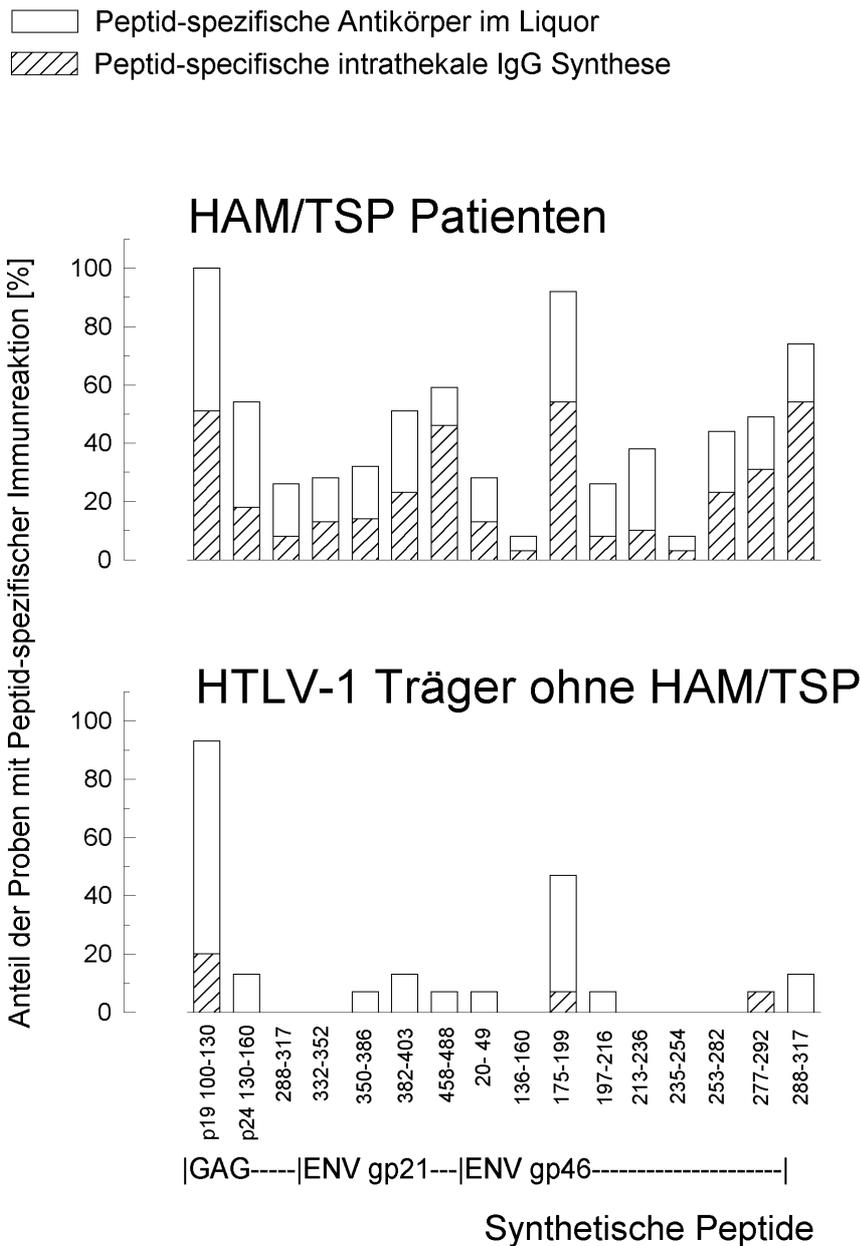


Abbildung 9: Anteil der HAM/TSP Patienten (oben) und HTLV-1 infizierten Patienten ohne HAM/TSP (unten) jeweils in % , die eine intrathekale Synthese gegen einzelne HTLV-1 env und gag synthetische Peptide zeigen und bei denen sich spezifische Antikörper im Liquor nachweisen lassen.

Tabelle 9: Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese gegen synthetische Peptide von HTLV-1 env und gag bei seropositiven und seronegativen Patientengruppen.

Gruppen	Zahl der Patienten mit intrathekalen IgG-Synthese gegen 1 oder mehr Peptide*	Durchschnittliche Anzahl erkannter Peptide**
HAM/TSP (n=39)	31***	3,6***
HAM/TSP möglich (n=6)	1	0,7
HTLV-I Träger ohne HAM/TSP (n=15)	3	0,3
HTLV-1 seronegative Patienten (n=11)	0	0

* Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe mit mindestens einem Antikörper-Spezifitätsindex größer als 2,0

** Die Anzahl aller Antikörper-Spezifitätsindizes, die größer als 2,0 waren, wurde durch die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe geteilt

*** Die 4 Patientengruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis Tests verglichen, wobei die Zahl der erkannten Peptide als abhängige Variable diente. Die Unterschiede der Gruppen waren signifikant ($p < 0,0001$). Beim Paarvergleich mit multiplen Mann-Whitney-U-Tests entsprechend der Holm-Prozedur (Holm (1979)) unterschied sich die HAM/TSP Gruppe von den seronegativen Patienten ($p=0,000013$), den HTLV-1 Trägern ohne HAM/TSP ($p=0,000021$) und den seropositiven Patienten mit möglicher HAM/TSP ($p=0,016$).

4.2.1. Feinspezifität der humoralen Immunantwort bei HTLV-1 Infizierten mit und ohne HAM/TSP

Tabelle 9 zeigt das Vorkommen einer intrathekalen Synthese von peptid-spezifischen IgG-Antikörpern bei den verschiedenen Patientengruppen. Die Patienten mit eindeutiger HAM/TSP unterschieden sich signifikant von der Gruppe der HTLV-1 Infizierten ohne HAM/TSP: Die HAM/TSP-Gruppe wies eine höhere Anzahl von Reaktivitäten gegen synthetische HTLV-1 gag und env Peptide auf (Tabelle 9, Abbildung 9). Mit anderen Worten: Die HTLV-1 Infizierten, die eine chronisch progrediente ZNS Erkrankung entwickelt hatten, wiesen eine heterogene intrathekale Immunantwort gegen multiple Epitope auf. Nicht die Immunreaktion gegen *ein* bestimmtes Zielantigen oder *ein* Epitop war assoziiert mit dem Auftreten der Erkrankung, sondern eine Vielfalt intrathekal gebildeter Antikörper (Abbildung 9).

4.2.2. Vergleich von intrathekaler und systemischer humoraler Immunantwort

Die Berechnung des ASI für Antikörper gegen definierte Antigene bzw. Epitope erlaubt nur eine begrenzte Aussage über die Quantität der intrathekalen Antikörperproduktion (siehe: Abschnitt 3.2.5.). Es kann bei HAM/TSP davon ausgegangen werden, daß die Konzentrationsquotienten des Gesamt-IgG nicht deutlich erhöht sind bzw. in der Mehrzahl der Fälle im Normalbereich liegen (Abbildung 5 A). Dennoch muß berücksichtigt werden, daß bei vorgegebenem Konzentrationsquotienten des Gesamt-IgG die Serumkonzentration der HTLV-1 spezifischen Antikörper in die Berechnung des ASI eingeht (vergleiche Abschnitt 3.2.5): Bei niedriger Konzentration der Antikörper im Serum führen hohe Konzentrationen im Liquor zu hohen ASI-Werten, die auf ein großes Quantum intrathekal gebildeter Antikörper hinweisen. Bei hohen Konzentrationen im Serum könnte aber eine minimale intrathekale Synthese übersehen werden.

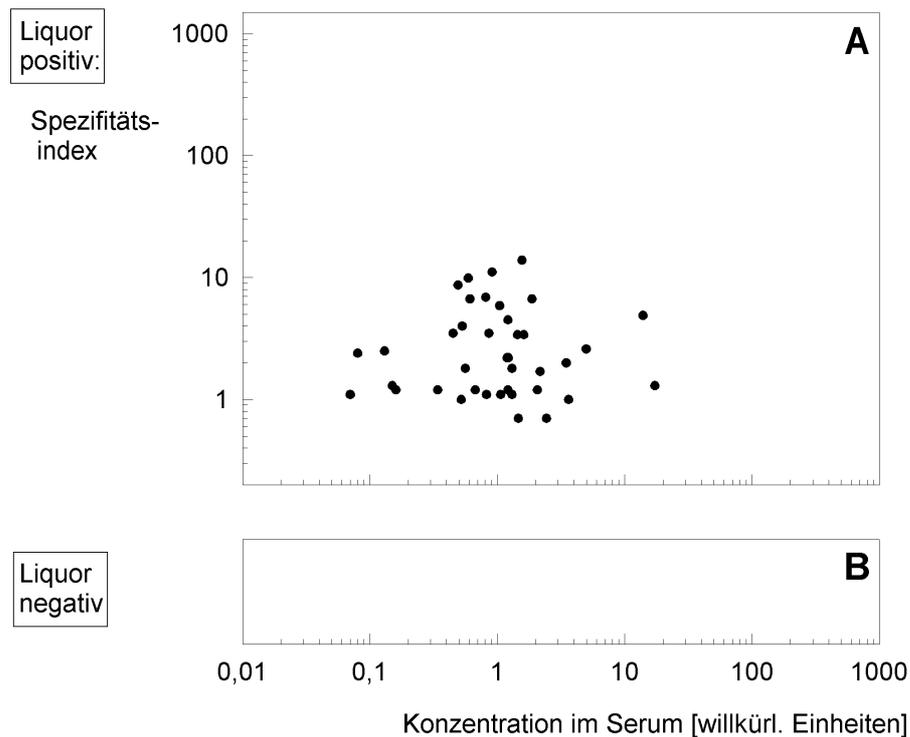


Abbildung 10: Vergleich von intrathekaler und systemischer humoraler Immunantwort gegen das synthetische Peptid HTLV-1 gag p19 100-130 . 39 HAM/TSP Patienten wurden in 2 Gruppen unterteilt: Patienten mit (A) und ohne (B) peptid-spezifische IgG-Antikörper im Liquor. In der ersten Gruppe (A) wurde der errechnete Antikörper-Spezifitätsindex gegen die Konzentration der Antikörper im Serum in willkürlichen Einheiten eines positiven Referenzserums aufgetragen. Bei den Patienten mit negativem Liquor (B) wurden ausschließlich die Serumkonzentrationen angegeben.

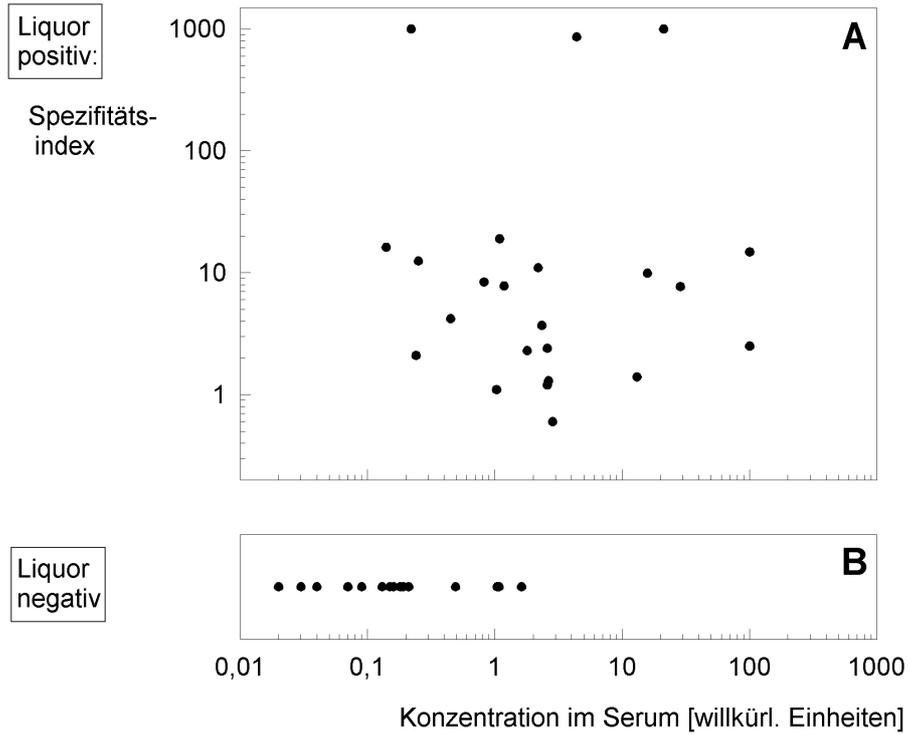


Abbildung 11: Vergleich von intrathekaler und systemischer humoraler Immunantwort gegen das synthetische Peptid HTLV-1 env gp21 458-488 . Zur Art der Darstellung vergleiche Abbildung 10.

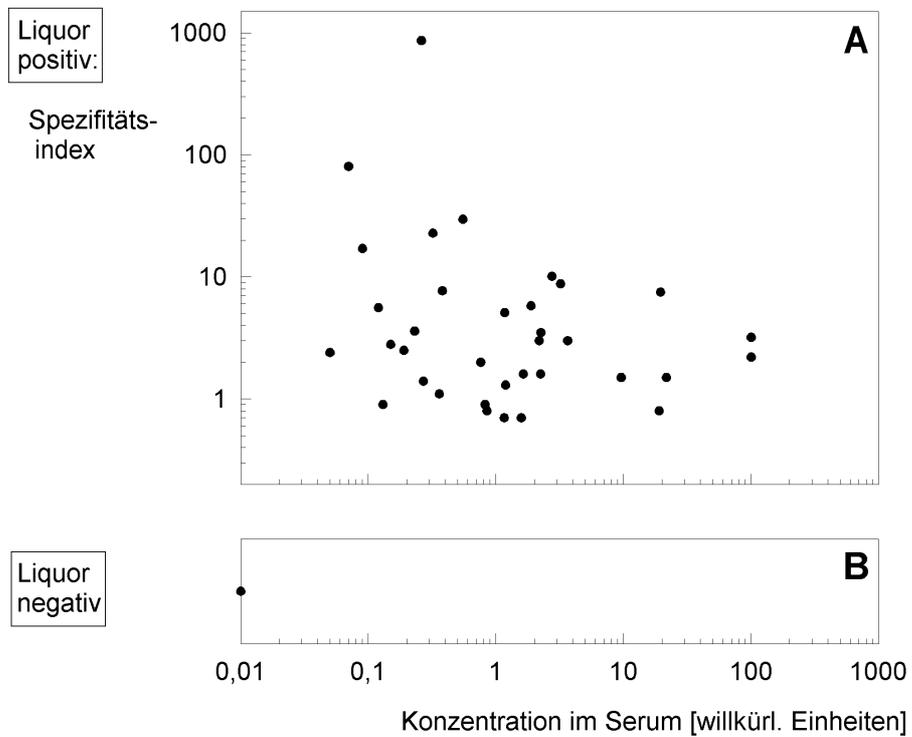


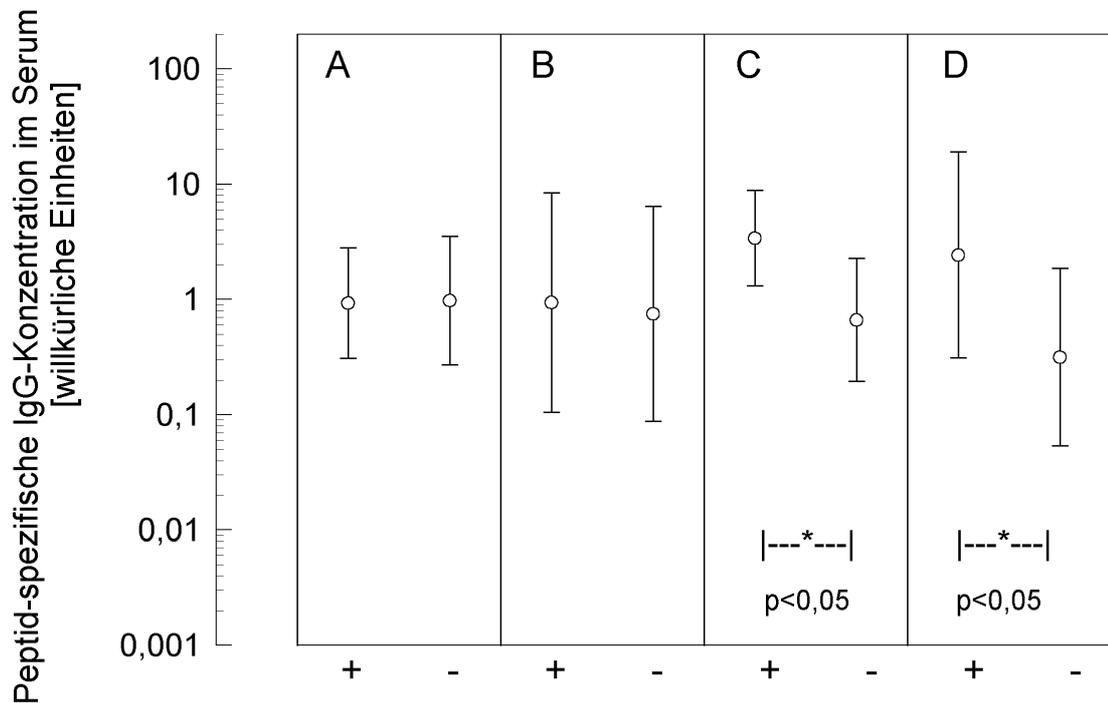
Abbildung 12: Vergleich von intrathekaler und systemischer humoraler Immunantwort gegen das synthetische Peptid HTLV-1 env gp46 175-199 . Zur Art der Darstellung vergleiche Abbildung 10.

Aus diesen Gründen wurden für 3 synthetische Peptide die im Serum gemessenen Konzentrationen (in willkürlichen Einheiten im Vergleich zu einem positiven Standardserum) in Bezug gesetzt zur Höhe der errechneten Antikörper-Spezifitätsindizes (Abbildungen 10 bis 12). Die ausgewählten Peptide stellten repräsentative Fälle immundominanter Peptide dar: Antikörper gegen HTLV-1 p19 100-130 konnten bei fast allen HTLV-1 Infizierten sowohl im Liquor als auch im Serum nachgewiesen werden (Abbildungen 9 und 10). Antikörper gegen HTLV-1 gp21 458-488 und gegen gp46 175-199 wurden hingegen gehäuft bei Patienten mit HAM/TSP nachgewiesen (Abbildungen 9, 11 und 12).

Eine intrathekale Synthese von peptid-spezifischen IgG-Antikörpern wurde bei niedrigen und auch bei hohen Serumkonzentrationen gefunden (Abbildungen 10 bis 12). Abbildung 13 zeigt, daß es nicht bei allen synthetischen Peptiden einen systematischen Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer intrathekalen Synthese und den Serumkonzentrationen der IgG-Antikörper gab, d.h. zwischen der Antikörperbildung innerhalb und außerhalb des zentralen Nervensystems. Nur bei 2 von 16 Peptiden, HTLV-1 env gp21 350-386 und 458-488, gab es einen signifikanten Unterschied der Serumkonzentrationen bei HAM/TSP Patienten mit und ohne intrathekale Synthese von peptid-spezifischen Antikörpern: Die Patienten mit einer intrathekalen Synthese von Antikörpern gegen diese 2 Peptide hatten auch signifikant höhere Serumkonzentrationen der Antikörper (Abbildung 13).

4.2.3. Veränderung der spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese im Verlauf von HAM/TSP

Bei 7 HAM/TSP Patienten aus Kagoshima waren mehrere Liquor- und Serumproben im Krankheitsverlauf gewonnen worden, die im EIA mit synthetischen Peptiden analysiert wurden. In Tabelle 10 sind die Antikörper-Spezifitätsindizes im Verlauf von 2 bis 56 Monaten angegeben. Bei 5 Patienten zeigten sich nur geringe, bei 2 von ihnen deutlichere Veränderungen der Antikörper-Spezifitätsindizes im Verlauf der Erkrankung, wobei sich für alle Peptide eine relativ synchrone Veränderung darstellte (Tabelle 10). Die ausgeprägten Veränderungen der ASIs bei 2 Patienten konnten nicht auf eine immunmodulatorische Therapie zurückgeführt werden (Usuku K, Kagoshima, persönliche Mitteilung).



Intrathekale IgG-Synthese gegen 4 synthetische HTLV-1 Peptide

Abbildung 13: Bei den synthetischen HTLV-1 Peptiden (A) gag p19 100-130, (B) env gp46 175-199, (C) env gp21 350-386 und (D) env gp21 458-488 wurden die peptid-spezifischen IgG-Konzentrationen (willkürliche Einheiten im Vergleich mit einem Standardserum) im Serum bei 2 Untergruppen von HAM/TSP Patienten (Gesamtzahl n=39) mit (+) und ohne (-) intrathekale IgG-Synthese gegen das jeweilige Peptid verglichen. Nur bei 2 von insgesamt 16 Peptiden fanden sich signifikante Unterschiede der Serumkonzentrationen der peptid-spezifischen Antikörper bei HAM/TSP Patienten mit und ohne intrathekale Synthese gegen das jeweilige Peptid (env gp21 350-386, ANOVA: p=0,008; env gp21 458-488, ANOVA: p=0,002). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur 2 von 14 synthetischen Peptiden (gag p19 100-130 und env gp46 175-199) ohne signifikante Unterschiede dargestellt.

Tabelle 10: Antikörper-Spezifitätsindizes bei 7 HAM/TSP Patienten im Verlauf von 2 bis 57 Monaten. Aufgetragen sind die Spezifitätsindizes von Antikörpern gegen 16 HTLV-1 gag und env Peptiden (siehe auch Tabelle 4), falls Antikörper gegen das jeweilige synthetische Peptid nachweisbar waren.

Patient	Monat*	Nachweis der intrathekalen IgG-Synthese für synthetische HTLV-1 Peptide (Antikörper-Spezifitätsindex)**															
		gag p19		--gag p24--		-----env gp21-----				-----env gp46-----							
		100 -130	131 -160	288 -317	332 -352	350 -386	382 -403	458 -488	20 -49	136 -160	175 -199	197 -216	213 -236	235 -254	253 -282	277 -292	288 -317
1	0 26 57	4,5 7,1 3,0	2,7 2,7 5,9	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	1,3 3,1 1,7	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	3,3 8,9 2,7
2	0 2 38	6,9 10,3 97,5	17,1 11,8 59,7	7,4 2,4 2,2	42,9 9,7 1,0	- - -	14,5 7,4 8,8	12,5 6,6 13,6	12,0 6,3 6,3	164,5 21,9 94,3	22,8 9,4 19,4	- - -	19,7 6,6 6,9	6,9 2,4 1,0	22,1 4,9 7,2	- - -	50,5 31,4 114,1
3	0 12	- -	- -	- -	- -	- -	- -	1,3 2,5	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
4	0 19	4,0 4,7	2,1 1,5	- -	- -	- -	1,9 2,4	- -	- -	- -	17,1 26,1	- -	- -	- -	- -	8,8 62,2	6,3 10,9
5	0 33	3,5 5,1	2,7 9,4	- -	- -	5,8 22,4	5,1 9,4	859,3 85,7	- -	- -	2,5 3,9	- -	- -	- -	- -	1,6 2,4	2,8 3,9
6	0 44	6,7 1,4	15,6 1,3	- -	11,0 1,0	15,0 2,5	26,2 2,8	990,0 4,7	5,7 1,2	- -	7,5 2,4	7,3 1,0	6,3 0,4	- -	4,4 1,4	4,2 1,4	21,1 3,0
7	0 12	4,9 7,1	2,0 3,2	7,3 8,0	2,7 2,9	6,6 4,5	5,2 1,0	7,7 4,2	3,2 1,0	- -	2,2 1,7	1,9 3,8	2,4 1,9	- -	3,3 1,0	4,8 7,1	2,2 1,7

* Monat 0 bedeutet: Lumbalpunktion zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

** Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Antikörper-Spezifitätsindizes nur dann angegeben, wenn sich zumindest an einem Zeitpunkt der Liquorentnahme ein Index größer 2,0 ergeben hat als Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese.

4.2.4. Antikörper gegen synthetische Peptide von HTLV-1 tax und rex

Bei 28 Patienten mit HAM/TSP wurden die IgG-Antikörper gegen lineare Sequenzen der regulatorischen HTLV-1 Proteine tax und rex (Lal et al. (1994)) im Liquor und Serum bestimmt. Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse. Wie bei den HTLV-1 Strukturproteinen gag und env ergaben sich bei den Patienten eine humorale Immunantwort gegen mehrere Sequenzen und deutliche inter-individuelle Unterschiede. Kein einzelnes Peptid war immundominant bei allen HAM/TSP Patienten.

Tabelle 11: Systemische und intrathekale humorale Immunreaktion bei 28 HAM/TSP Patienten aus Südjapan gegen 4 synthetische HTLV-1 tax und 2 HTLV-1 rex Peptide.

Synthetische Peptide	Nachweis von IgG-Antikörpern im Serum (Anzahl der Patienten)	Intrathekale Synthese von IgG-Antikörpern (Anzahl der Patienten)
<u>HTLV-1 tax</u>		
106-125	10	5
316-335	15	10
331-350	19	13
336-353	18	14
<u>HTLV-1 rex</u>		
1- 20	14	7
46- 65	5	1

4.3. Korrelation von HLA Haplotypen und intrathekaler Immunantwort

Etablierte Daten über HLA Haplotypen bei HAM/TSP Patienten ("*HAM/TSP associated haplotypes*"; Usuku et al. (1988)) wurden zugrunde gelegt. Es war gezeigt worden, daß Patienten mit folgenden HAM/TSP assoziierten Haplotypen eine besonders starke humorale und zelluläre Immunantwort gegen HTLV-1 Antigene aufwiesen (Usuku et al. (1988)): A24Cw7B7DR1DQ5, A2Cw7B7DR1DQ5, A24Cw-B52DR15DQ6, A11Cw1B54DR4DQ4 und A24Cw1B54DR4DQ4. Die Analyse von HLA Haplotypen erfolgte unter der

Fragestellung, ob der HLA Komplex eine pathogenetische Bedeutung für die Erkrankung hat, ohne daß einzelne Krankheits-assoziierte Allele identifiziert wurden (Hall und Bowness (1996)).

Für die hier dargestellten Untersuchungen konnten nur HAM/TSP Patienten untersucht werden, da nur diese HLA typisiert worden waren (Tabelle 2). 2 Untergruppen von HAM/TSP Patienten wurden verglichen, solche mit und ohne die beschriebenen HAM/TSP assoziierten HLA Haplotypen. Es fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die Anzahl der synthetischen Peptide, für die im Serum IgG-Antikörper und für die eine intrathekale IgG-Synthese nachweisbar war (Tabelle 12).

Eine weitere Analyse wurde durchgeführt, um den Einfluß von HLA DR1 (HLA DRB1*0101), das eine Assoziation mit HAM/TSP aufweist (Jeffery et al. (1999)), auf die intrathekale Synthese von IgG-Antikörpern gegen synthetische Peptide von HTLV-1 gag und env bei HAM/TSP Patienten zu erfassen. Dazu wurden die HLA typisierten HAM/TSP Patienten in 2 Gruppen aufgeteilt: Patienten mit HLA DR1 (n=11) und ohne HLA DR1 (n=21) (Abbildung 14). Die 11 HLA DR1 positiven Patienten hatten eine intrathekale Synthese im Durchschnitt gegen 3,7 synthetische Peptide (von 16), während die 21 HLA DR1 negativen Patienten im Durchschnitt gegen 2,9 synthetische Peptide eine intrathekale Immunantwort aufwiesen. Es gab keine Antikörperspezifität, die ausschließlich einer der beiden Gruppen zugeordnet war (Abbildung 14). Bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ergab sich für die Anzahl der erkannten Peptide weder bei der systemischem ($p=0,531$) noch bei der intrathekalen ($p=0,815$) Immunantwort ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen.

Tabelle 12: Häufigkeit des Nachweises von IgG-Antikörpern gegen HTLV-1 gag und env Peptide im Serum und intrathekale Synthese von spezifischen Antikörpern in Relation zu HAM/TSP assoziierten HLA Haplotypen.

HTLV-1 Protein	Synthetisches Peptid (Aminosäuren Nummer)	HAM/TSP Patienten mit HAM/TSP-assozierten Haplotypen (n=20)		HAM/TSP Patienten ohne HAM/TSP-assozierten Haplotypen (n=12)	
		Serum positiv [%]	Intrathekale Synthese [%]	Serum positiv [%]	Intrathekale Synthese [%]
gag p19	100-130	100	55	100	33
gag p24	131-160	90	15	58	0
	288-317	40	10	25	0
env gp21	332-352	65	15	33	0
	350-386	42	16	17	0
	382-403	60	30	67	0
env gp46	458-488	70	65	42	17
	20- 49	25	15	42	0
	136-160	10	0	17	0
	175-199	95	55	100	50
	197-216	25	5	17	0
	213-236	70	10	50	0
	235-254	20	0	17	0
	253-282	55	25	33	17
	277-292	65	30	42	25
	288-317	85	60	83	42

|-----|
p=0,017 *

|-----|
p=0,040 *

* Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der Anzahl erkannter synthetischer Peptide pro Patient in beiden Gruppen („exaktes“ p)

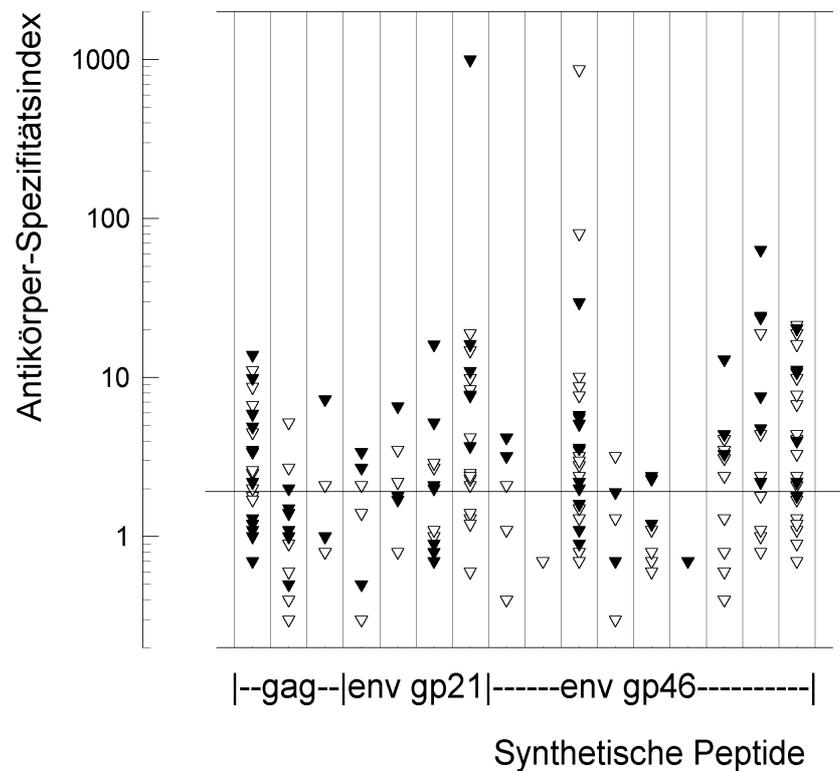


Abbildung 14: Nachweis der intrathekalen Synthese gegen 16 HTLV-1 env und gag Peptide bei HAM/TSP Patienten in Abhängigkeit von HLA DR1. 32 HAM/TSP Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: 11 Patienten, die HLA DR1 positiv waren (ausgefüllte Dreiecke), und 21 Patienten, die HLA DR1 negativ waren (offene Dreiecke). HLA DR 1 positive HAM/TSP Patienten zeigten relativ häufiger eine intrathekale Synthese, im Durchschnitt gegen 3,7 von 16 synthetische Peptiden, während die 21 HLA DR1 negativen Patienten im Durchschnitt gegen 2,9 synthetische Peptide eine intrathekale Immunantwort aufwiesen. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,815$).

4.4. Das HTLV-1 Transmembranglykoprotein gp21 als CD4+ T-Zell Antigen

Bei 4 HLA DR1 positiven HAM/TSP Patienten und einem seronegativen Individuum konnten CD4+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden, die mit synthetischen Peptiden des HTLV-1 gp21 Proteins spezifisch reagierten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Feinspezifität der T-Zell Linien gegen HTLV-1 env gp21 Peptide von HLA DR1(DRB1*0101) positiven PBMC Spendern.

Donor	HLA Klasse II		T-Zell Linie	HLA Restriktion*	Proliferation in Gegenwart von HTLV-1 gp21 Peptiden [cpm]**								
	DRB1	DQB1			Kein Antigen	332	343	350	378	382	400	426	458
Seronegative Kontrolle	0101 1301	0501 0603	BK1C11	NU	306	283	260	307	<u>17607</u>	<u>4153</u>	257	258	<u>5149</u>
			BK2C7	NU	964	909	904	746	718	630	<u>22689</u>	570	616
			BK4E5	NU	316	282	291	272	287	368	<u>7146</u>	188	414
			BK4G11	NU	317	364	262	275	<u>3954</u>	<u>771</u>	347	329	323
HAM/TSP	0101 0405	0501 0401	910/6C5	NU	406	451	380	470	<u>1785</u>	626	390	239	433
			910/6F9	NU	883	620	687	721	<u>4279</u>	<u>2199</u>	<u>5917</u>	1254	1116
			910/8G7	DRB1*0101	376	257	204	401	<u>34848</u>	<u>8186</u>	<u>1965</u>	366	347
			910/5E5	NU	606	752	706	755	466	<u>11108</u>	<u>4590</u>	<u>10813</u>	798
			910/5C9	NU	1074	1291	1005	1066	<u>3854</u>	1382	<u>4168</u>	591	489
HAM/TSP	0101	0501	6D3	NU	1679	<u>4139</u>	2058	1905	2790	1475	2477	1888	1572
HAM/TSP	0101	0501	NB89	DRB1*0101	825	725	684	624	1523	1354	<u>2147</u>	648	2015
			NC9	DRB1*0101	78	121	96	98	<u>5052</u>	<u>691</u>	125	135	105
HAM/TSP	0101	0501	TG7	DRB1*0101	119	103	120	142	<u>3472</u>	<u>869</u>	<u>239</u>	172	235

* Abkürzung: NU = nicht untersucht.

** ³H-Thymidin-Inkorporation, Mittelwert von Dreifachbestimmungen. Signifikante Resultate sind unterstrichen, d.h. der Stimulationsindex war größer als 2,0 .

Die Häufigkeit antigenspezifischer CD4+ T-Lymphozyten in der Gesamtheit der eingesetzten PBMC („precursor frequency“) (Henry et al. (1980), Wekerle (1998)) ließ sich durch Anwendung der Mikrokulturtechnik mit unterschiedlichen initialen Zellzahlen abschätzen: Bei einem nicht homozygoten DR1 positiven HAM/TSP Patienten reagierte 1 aus 6×10^4 PBMC mit den eingesetzten HTLV-1 env gp21 Peptiden, während bei dem seronegativen Donor 1 von 10^6 PBMC mit den Peptiden reagierte (Kitze et al. (1998)).

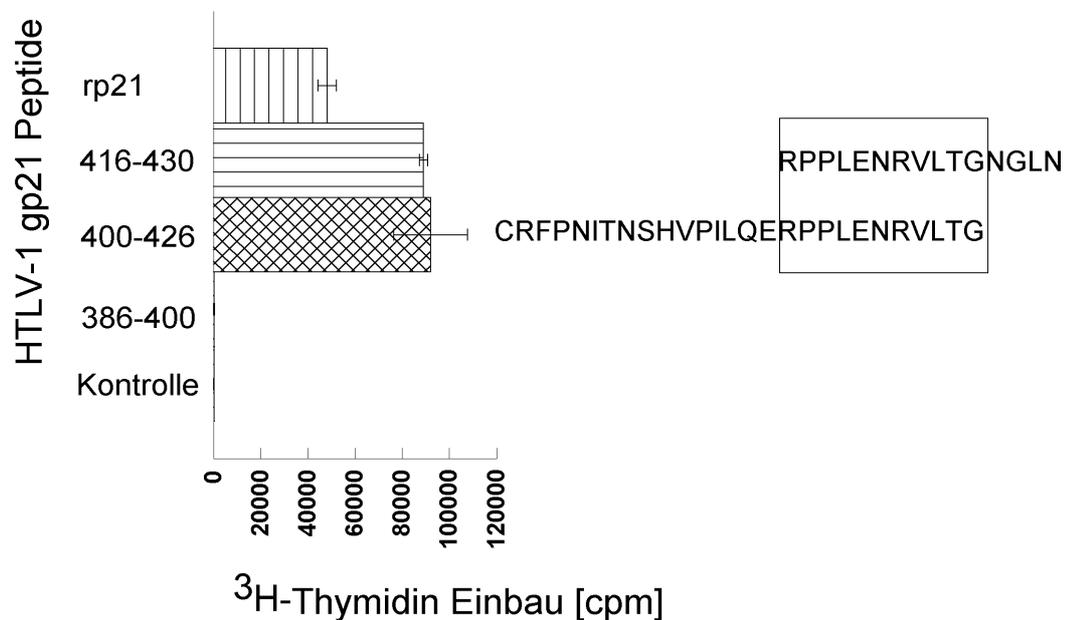


Abbildung 15: Proliferationsassay der Zell Linie BK/2C7 mit verschiedenen Peptiden von HTLV-1 env gp21.

Die Zell Linie reagiert gegen das rekombinante HTLV-1 rp21 326-433 und die beiden Peptide HTLV-1 gp21 416-430 und 400-426 mit überlappenden Sequenzen. Das Peptid 386-400 (FWEQGGGLCKALQEQC) und 4 weitere Peptide mit der Länge von 15 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuresequenz 396 bis 425 des HTLV-1 env gp21 (396-410, 401-415, 406-420 und 411-425; aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt) induzierten keine proliferative Reaktion. Die Konzentrationen aller Peptide betrug 1000 nmol/l. Als Kontrolle diente der Puffer, in dem die Peptide gelöst wurden.

4.5. Besonderheiten der immundominanten T-Zell Epitope des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21

2 immundominante CD4+ T-Zell Epitope (HTLV-1 env Sequenzen 378-398 und 400-426; Tabelle 13) wurden genauer analysiert, um die essentielle Größe der Epitope zu charakterisieren. CD4+ T-Zell Linien spezifisch für die immundominanten Epitope reagierten auch mit dem rekombinanten HTLV-1 Peptid rp21 326-433 (vergleiche Abbildung 15), d.h. das rekombinante Peptid wurde nach Antigenverarbeitung durch die antigenpräsentierenden Zellen von den CD4+ T-Zell Linien erkannt.

Für das eine immundominante T-Zell Epitop (HTLV-1 env Sequenz 400-426) konnte die minimal notwendige Aminosäuresequenz eingegrenzt werden, um eine Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten zu ermöglichen (Abbildung 15). Hier entsprach das T-Zell Epitop der Sequenz HTLV-1 env gp21 416 bis 426 (RPPLENRVLTG), d.h. es war 11 Aminosäuren lang. Auch bei einer Konzentration des Antigens von 10 nmol/l wurde die T-Zell Proliferation sowohl durch das rekombinante Protein HTLV-1 rp21 als auch durch das synthetische Peptid HTLV-1 gp21 400-426 signifikant stimuliert (in Abbildung 15 nicht dargestellt).

Für das andere immundominante Epitop (HTLV-1 env 378-398) konnte die essentielle Sequenz auf 10 Aminosäuren eingegrenzt werden (LFWEQGGLCK; Abbildung 16). Allerdings zeigte sich, daß überlappende synthetische Peptide des HTLV-1 gp21 in unterschiedlichem Maße die Proliferation von CD4+ T-Lymphozyten stimulierten (Abbildung 16). Synthetische Peptide, die eine N-terminal verlängerte Sequenz aufwiesen, führten bei einer um den Faktor 1000 geringeren molaren Konzentration des Peptids zu einer entsprechenden Proliferation der CD4+ T-Lymphozyten (Abbildung 16). Diese besonders immunogenen Peptide mit verlängerter N-terminaler Sequenz wurden in einer Konzentration von weniger als 1 nmol/l von den spezifischen T-Zell Linien erkannt. Ein Peptid, das die essentielle Sequenz, eine C-terminale Verlängerung, aber keine N-terminale Verlängerung aufwies, wurde von der spezifischen T-Zell Linie erst ab einer Konzentration von etwa 100 nmol/l signifikant erkannt (Abbildung 16).

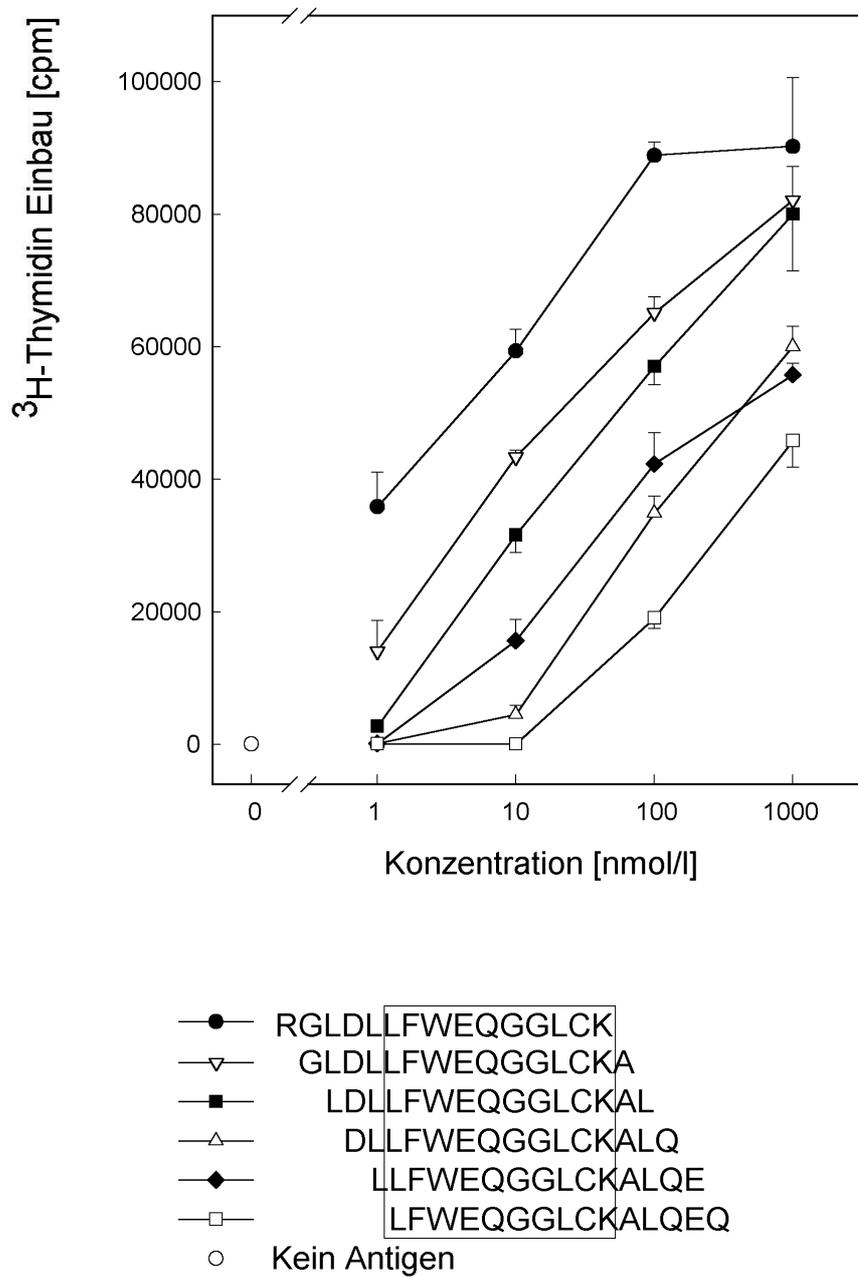


Abbildung 16: Eine immundominante antigene Determinante des HTLV-1 gp21 wurde mittels synthetischer Peptide eingegrenzt, die aus jeweils 15 Aminosäuren bestanden und um eine Aminosäure in der Ausgangssequenz (HTLV-1 gp21 380 - 399) verschoben waren. Dabei zeigte sich, daß eine N-terminale Verlängerung des Peptids die Proliferation von T-Zellen deutlich steigerte.

Die Homologie-Suche im Hinblick auf ähnliche Sequenzen in zellulären Proteinen und den env Proteinen anderer Retroviren zeigte, daß die nachgewiesenen immundominanten T-Zell Epitope relativ konserviert waren, d.h. eine hohe Homologie innerhalb der Retrovirus Genera aufwiesen (Tabelle 14). Die erste für die T-Zellen immundominante Sequenz zeigte eine überaus deutliche Homologie sowohl der essentiellen Sequenz des Epitops als auch der N-terminalen Verlängerung, die für die T-Zell Proliferation wichtig ist, mit entsprechenden Sequenzen der anderen Mitglieder der HTLV-BLV Gruppe, der MLV-verwandten Viren und der Typ D Retrovirus Gruppe, aber nicht mit der Lentivirus-Gruppe, der Säugetier Typ B Oncovirus Gruppe und der Spumaretrovirus Gruppe. Hingegen waren die Homologien für das zweite immundominante T-Zell Epitop weniger verbreitet: deutliche Homologien mit HTLV-1 und STLV, aber nur geringe Homologien mit BLV, mit MLV-verwandten Viren und der Typ D Retrovirus Gruppe (Tabelle 14). Darüberhinaus fanden sich auch Homologien zu sogenannten "*expressed sequence tags*", d.h. Homologien zu menschlichen, exprimierten Sequenzen bisher unbekannter Funktion, die möglicherweise Ausdruck einer Expression von endogen retroviralen Sequenzen sind (Tabelle 15).

Tabelle 14: Homologe retrovirale Sequenzen des HTLV-1 Transmembran-glykoproteins gp21, die den Aminosäuren 377 bis 396 (Sequenz 1) und 413 bis 427 (Sequenz 2) entsprechen. Neben den nah verwandten Retroviren der HTLV-BLV-Gruppe wurden Sequenzen von Vertretern aus 5 anderen Säugetier-Retrovirus Genera berücksichtigt (Van Regenmortel et al. (2000), Coffin et al. (1995)). Die deutlichen Homologien der immundominanten CD4+ T-Zell Epitope des HTLV-1 gp21 sind unterstrichen.

Retrovirus Protein*	Sequenz 1	Sequenz 2
Deltaretrovirus (HTLV-BLV Gruppe)		
HTLV-1 gp21	QNRRLDLL <u>FW</u> EQG <u>GLCKAL</u>	LQERPPLENRVL <u>TGW</u>
HTLV-2 gp21	QNRRLDLL <u>FW</u> EQG <u>GLCKAI</u>	LQERPPLEKRVI <u>TGW</u>
STLV gp21	QNRRLDLL <u>FW</u> EQG <u>GLCKAL</u>	LQERPPLENRVL <u>TGW</u>
BLV gp30	QNRRLD <u>WLYIRL</u> GFQSLCPTI	LGDLQPLSQRVSTDWQW
Alpharetrovirus (MLV-verwandte Viren)		
FENV p15	QNRRLDLL <u>FL</u> QEG <u>GLCAAL</u>	LRERFKQRQKLFESQQGW
MLV p15	QNRRLDLL <u>FL</u> KEG <u>GLCAAL</u>	LRERTLQRQKLFESSQGW
AVIRE gp22	QNRRLDLL <u>TAE</u> EQG <u>GICLAL</u>	LQEDLLARKRALYDNPLW
Betaretrovirus (Typ D Retrovirus Gruppe)		
BAEVM p20	QNRRLDLL <u>TAE</u> EQG <u>GICLAL</u>	LQEELERRRKDLASNPLW
MPMV gp20	QNRRLDLL <u>TAE</u> EQG <u>GICLAL</u>	LQDDLERRRRQLIDNPFW
Gammaretrovirus (Säugetier Typ B Onkovirus Gruppe)		
MMTV gp32	Keine Homologien	Keine Homologien
Lentivirus		
HIV-1 gp41	Keine Homologien	Keine Homologien
HIV-2 gp41	Keine Homologien	Keine Homologien
Spumavirus		
FOAMV gp48	Keine Homologien	Keine Homologien

* Abkürzungen der Sequenzen der retroviralen Transmembran-glykoproteine in der SWISS-PROT Datenbank (siehe auch: Abkürzungen, Kurzbezeichnungen und Nomenklatur).

Tabelle 15: Homologe Sequenzen im Vergleich mit einer immundominanten Sequenz 1 des HTLV-1 env gp21 Proteins (377-396). Die GeneBank EST Datenbank wurde durchsucht. Die Nukleotidsequenz der kodierenden Stränge wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt.

Sequenz*	Herkunft der mRNS	Sequenzen
Q82234	HTLV-1 env gp21	QNRRLDLL <u>FW</u> EQG <u>GLCKAL</u>
T95945	Fetale Leber und Milz	QNRRLDMLTAAQGGICLAL
T92103	Fetale Leber und Milz	QNRRLDLLTVEKGGLCIFL
R24496	Plazenta	QNRRLDLLTAEKGGLCIFL
H53521	Fetale Leber und Milz	QNRRLDLLTAEKGGLCIFL
R32560	Plazenta	QNRRLDLLTAEKGGLCIFL
R66837	Plazenta	QNRRLDLLTAEKGGLCIFL
R67128	Plazenta	QNRRLDLLTAEKGGLCIFL
R71049	Plazenta	QNRRLDLLTAEKGGLCIFX

* GeneBank "accession number"

4.6. Provirale Integration des HTLV-1 Retrovirus in T-Zell Linien

Die untersuchten T-Zell Linien wurden von HTLV-1 infizierten und nicht infizierten Individuen mittels des beschriebenen Mikrokulturansatzes isoliert. Es konnte dabei nicht sicher davon ausgegangen werden, daß es sich um T-Zell Klone handelte. Da eine relativ hohe Anzahl von Lymphozyten im peripheren Blut von HAM/TSP Patienten die provirale Integration des Retrovirus enthält, wurden einige der isolierten HAM/TSP T-Zell Linien auf die Infektion mit HTLV-1 untersucht. Dies geschah mit Hilfe einer HTLV-1 spezifischen PCR.

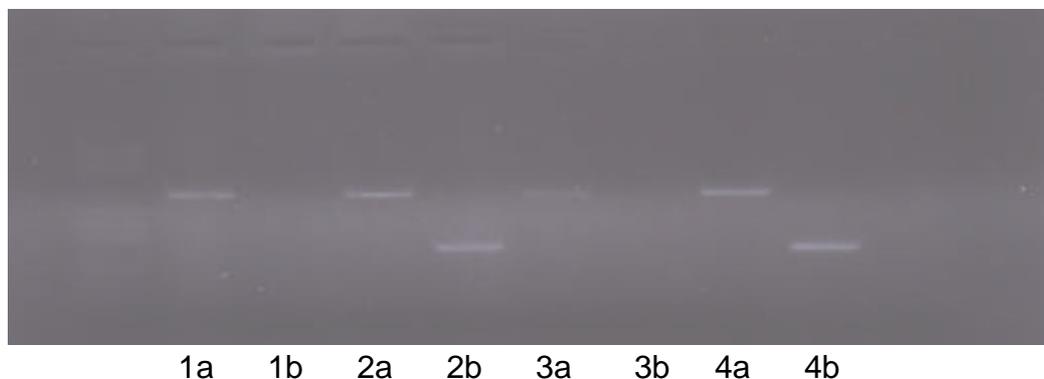


Abbildung 17: HTLV-1 Infektion von T-Zell Linien. Aus 4 T-Zell Linien wurde die DNS isoliert und das Vorhandensein des zellulären Gens MOG (jeweils in den Bahnen **1-4 a**: MOG Primer S1 und A1) und HTLV-1 proviraler DNS (jeweils in den Bahnen **1-4 b**: HTLV-1 tax Primer SK43 und SK44) mittels PCR untersucht: Die peripheren mononukleären Blutzellen eines nicht HTLV-1 infizierten Individuums (1a, 1b; Negativkontrolle) und die HAM/TSP Zell Linie 910/E10 (3a, 3b) enthalten zelluläre DNS mit der MOG-Sequenz (1a, 3a), aber keine provirale HTLV-1 tax DNS (1b, 3b). Die antigenspezifische HAM/TSP T-Zell Linie 910/8G7 (2a, 2b) und die Zell Linie MT-2 (4a, 4b; Positivkontrolle) enthalten sowohl zelluläre DNS mit der MOG-Sequenz (2a, 4a) als auch provirale HTLV-1 tax DNS (2b, 4b).

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Einige der mit der Mikrokulturtechnik isolierten T-Zell Linien eines einzelnen HAM/TSP Patienten waren HTLV-1 infiziert (z.B. die Linie 910/8G7), andere jedoch nicht infiziert (z.B. die Linie 910/E10). Bedeutsam ist weiterhin, daß die HTLV-1 infizierte T-Zell Linie 910/8G7 eine deutliche Proliferation nur in Gegenwart des Antigens zeigte (Tabelle 13).

5. DISKUSSION

5.1. Besonderheiten der HTLV-1 Infektion und der assoziierten neurologischen Erkrankungen

Entzündliche Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die durch virale Infektionen ausgelöst werden, bleiben trotz erheblicher Fortschritte in der Pathogeneseforschung und der Fortentwicklung diagnostischer und therapeutischer Methoden weltweit eine wissenschaftliche und klinische Herausforderung (Johnson (1998)). Das Spektrum der menschlichen Erkrankungen reicht von akut verlaufenden, vital bedrohlichen Enzephalitiden durch das weit verbreitete, im Organismus latent persistierende Herpes-simplex-Virus bis zu chronischen Meningoenzephalitiden, die in seltenen Fällen Jahre nach einer Masern- oder Rötelninfektionen auftreten.

Die regional relevanten Virusinfektionen und deren ZNS Folgeerkrankungen variieren, abhängig von epidemiologischen Gegebenheiten, wie z.B. den Übertragungswegen, den hygienischen Verhältnissen, den Lebensweisen der Menschen, den verfügbaren Impfstoffen etc.. Im Hinblick auf Erkrankungen des ZNS stellt gegenwärtig allein die HIV Infektion mit ihren zahlreichen neurologischen Komplikationen ein pandemisches Problem dar (Johnson (1998)). Die in dieser Arbeit dargestellte Infektion mit dem bereits länger bekannten Retrovirus HTLV-1 ist dagegen bisher auf wenige endemische Gebiete der Kontinente verteilt. Im Vergleich zu HIV führt die HTLV-1 Infektion nur bei einer Minderheit der Infizierten zu vital bedrohlichen Erkrankungen, und das Spektrum der Erkrankungen ist weniger vielfältig. Opportunistische Begleitinfektionen sind darüberhinaus selten. In den verschiedenen HTLV-1 Endemiegebieten tritt die assoziierte Erkrankung HAM/TSP mit ähnlichen klinischen Symptomen auf (Osame (1990)).

Durch diese Gegebenheiten sind die Bedingungen für eine pathogenetisch orientierte Erforschung des Zusammenhangs von Virusinfektion und ZNS Erkrankung besonders günstig. Die weltweite, wenn auch auf endemische Foci beschränkte Ausbreitung führt wissenschaftliche Arbeitsgruppen aus verschiedenen Ländern zusammen, so daß eine grundlegende Frage Beachtung findet: Welche besonderen Bedingungen können für die Krankheitsentwicklung verantwortlich gemacht werden bei Menschen, die in ihrer Lebensweise und in ihrem Erbgut geringe Übereinstimmungen aufweisen (Osame (1990), Sonoda et al.

(1996), Jeffery et al. (1999)). Bisher gibt es in der Literatur wenige Beispiele für den Zusammenhang von Genen des HLA Komplexes und menschlichen Infektionserkrankungen (Muller et al. (1993), Sonoda et al. (1996), Jeffery et al. (1999)). Es wird jedoch postuliert, daß HLA Assoziationen für immunpathologische Prozesse im Verlauf von Infektionserkrankungen bedeutsam sind (Hall und Bowness (1996)).

Die HTLV-1 Infektion ist eine lebenslang persistierende, nicht zytozide, retrovirale Infektion von CD4+ T-Lymphozyten des Menschen mit komplexen Auswirkungen auf das Immunsystem durch die gesteigerte Expression von Zytokinen, MHC Antigenen, Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen. Das ZNS wird nach einer Latenzzeit von Jahrzehnten betroffen (Nakagawa et al. 1995)). In diesem Sinne kann HAM/TSP als eine "*slow virus*" Erkrankung betrachtet werden, bei der immunpathologische Prozesse für die Schädigung des ZNS verantwortlich gemacht werden (Hoellsberg und Hafler (1995), Osame et al. (1999)). Im Rahmen der klinischen Diagnostik gewonnene Proben des peripheren Blutes und des Liquors erlauben weitergehende wissenschaftliche Untersuchungen, deren Ergebnisse einen Beitrag zum Verständnis der Immunpathogenese leisten können.

HTLV-1 bzw. ein verwandtes Retrovirus wurden zu Unrecht zum Erreger der Multiplen Sklerose deklariert (Koprowski et al. (1985)). Eigene Untersuchungen zeigten, daß keine HTLV-1 spezifischen Antikörper bei Patienten mit MS nachweisbar waren (Schneider et al. (1987), Kitze et al. (1992)). Die Hypothese einer viralen Ätiologie der MS bleibt bisher umstritten (Johnson (1998)). Dennoch ist ein Vergleich von Befunden bei MS und HAM/TSP bedeutsam, obwohl die immunpathologischen Prozesse bei beiden Erkrankungen komplex sind (Wekerle (1998); siehe auch: Abschnitt 5.6.2.). Dabei wird die Frage aufgeworfen, ob es generelle neuroimmunologische Mechanismen gibt, die bei entzündlichen ZNS Erkrankungen infektiöser oder autoimmuner Genese wirksam werden, die chronische Entzündung aufrechterhalten und zur Schädigung von Axonen und Markscheiden beitragen (siehe: Abschnitt 5.6.3.).

Die grundsätzlichen Rechte der kranken Menschen verbieten eingreifende, potentiell schädliche Untersuchungen, die nur der wissenschaftlichen Erkenntnis dienen. Diese Gegebenheiten bei der Erforschung von menschlichen Erkrankungen werden durch *in vitro* Experimente oder durch Tierversuche an Mäusen oder Ratten umgangen. Die virologische und immunologische Erforschung der Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV), die

an verschiedenen Mäusestämmen durchgeführt wurde, hat sich als herausragendes Paradigma erwiesen (Zinkernagel und Doherty (1974), Oxenius et al. (1998)). Die am LCMV Mausmodell etablierten grundlegenden immunologischen Mechanismen gelten auch für virale Erkrankungen des Menschen mit Variationen, die im Einzelnen definiert werden müssen (Abschnitt 5.4.3).

Tabelle 16: Unspezifische und HTLV-1-spezifische Veränderungen bei Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis.

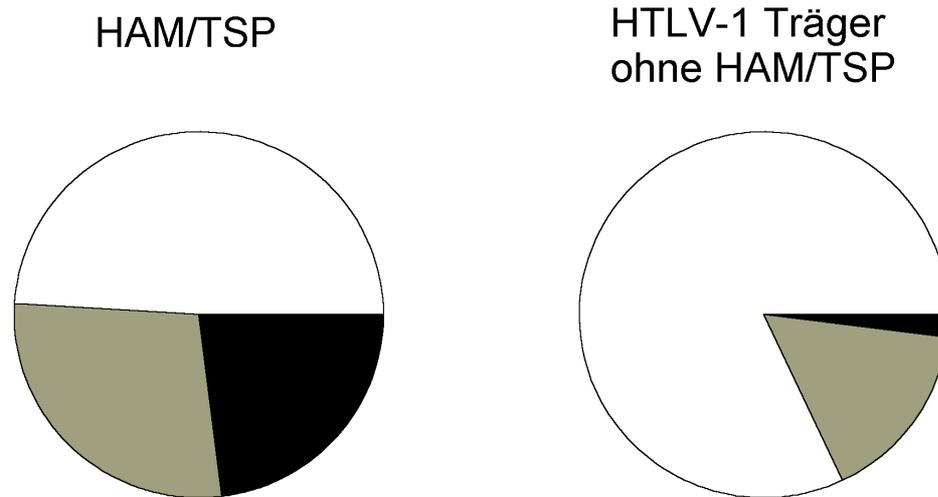
Untersuchung	Befunde bei HAM/TSP Patienten	Referenz
<u>Unspezifische Veränderungen</u>		
Zellzahl	erhöht bei 4 / 20	Puccioni-Sohler (1994)
Albumin Liquor/Serum-Quotient	erhöht bei 12 / 64	Kitze (unveröffentlicht)
Intrathekale IgG-Synthese	15 / 64	Kitze (unveröffentlicht)
Zusätzliche oligoklonale IgG-Banden im Liquor	19 / 20	Puccioni-Sohler (1994)
Intrathekale IgM-Synthese	1 / 18	Kitze (unveröffentlicht)
Intrathekale IgA-Synthese	3 / 22	Kitze (unveröffentlicht)
Erhöhtes Neopterin im Liquor	20 / 20	Nomoto et al. (1991)
<u>HTLV-1-spezifische Veränderungen</u>		
Lymphozyten mit gelappten Kernen	6 / 6	Osame et al. (1987)
HTLV-1 provirale DNS	13 / 13	Puccioni-Sohler et al. (1999)
Expression von HTLV-1 tax	7 / 7	Moritoyo et al. (1999)
Intrathekale Synthese von anti-HTLV-1 IgG-Antikörpern	19 / 20	Kitze et al. (1995)

5.2. Charakteristika der intrathekalen und systemischen humoralen Immunantwort bei HAM/TSP

Bei HAM/TSP werden im Liquor Veränderungen gefunden, die einen unspezifischen Hinweis für die chronische Entzündung darstellen (Tabelle 16). Diese Befunde unterscheiden sich nicht wesentlich von denen bei anderen chronisch-entzündlichen ZNS Erkrankungen, z.B der MS (Reiber et al. (1998), Wekerle (1998)).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Spezifität der systemischen und intrathekalen Immunantwort bei HAM/TSP Patienten. Es konnte mittels RIPA gezeigt werden, daß IgG-Antikörper im Serum und Liquor die verschiedenen HTLV-1 Proteine banden, hier gezeigt am Beispiel der HTLV-1 env, gag und tax Proteine. Die HTLV-1 spezifischen IgG-Antikörper wurden intrathekal synthetisiert (Abbildungen 5 und 7). Die eigenen Arbeiten konzentrierten sich auf HTLV-1 spezifische Antikörper der IgG-Klasse (Kitze et al. (1995), Kitze et al. (1996a)). Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Informationen über HTLV-1 spezifische Antikörper anderer Immunglobulinklassen (McLean et al. (1989), Verdier et al. (1993)). Generell wird IgM-Antikörpern allerdings gegenüber IgG- und IgA-Antikörpern in der Pathophysiologie von Virusinfektionen eine geringere funktionelle Bedeutung beigemessen (Cann (1997)).

Im Zell EIA und RIPA werden nicht denaturierte Antigene verwendet, die mit Antikörpern Antigen-Antikörper-Komplexe bilden (siehe: Harper (1998)). Deshalb erfaßten die dargestellten Untersuchungen mittels MT-2 EIA und RIPA einen Großteil *aller* HTLV-1 spezifischen IgG-Antikörper, d.h. Antikörper, die sowohl lineare als auch Konformationsepitope erkannten. Dagegen wurden bei der Analyse der Feinspezifität von HTLV-1 spezifischen IgG-Antikörpern mittels synthetischer Peptide nur lineare B-Zell Epitope berücksichtigt, die bekannten immunogenen Sequenzen von HTLV-1 env, gag, tax und rex Proteinen entsprachen. Diese Einschränkungen sind sicher bedeutsam, da bei manchen viralen Antigenen die Anzahl der Konformationsepitope überwiegt und diese oft auch für die Neutralisation hüllentragender Viren wichtig sind (Harper (1998)). Für das HTLV-1 Oberflächenglykoprotein gp46 ist beschrieben, daß Antikörper gegen Konformationsepitope quantitativ überwiegen (Hadlock et al. (1999)). Inoue et al. (1992) konnten allerdings zeigen, daß auch lineare Epitope der HTLV-1 env Proteine neutralisierende Eigenschaften hatten.



Immunreaktion gegen 16 synthetische HTLV-1 gag und env Peptide:

- Anteil synthetischer Peptide, gegen die keine IgG-Antikörper im Serum und Liquor nachgewiesen wurden
- Anteil synthetischer Peptide, gegen die IgG-Antikörper im Serum, aber keine intrathekale IgG-Synthese nachgewiesen wurden
- Anteil synthetischer Peptide, gegen die IgG-Antikörper im Serum und eine intrathekale IgG-Synthese nachgewiesen wurden

Abbildung 18: Für 16 bekannte immunogene Sequenzen von HTLV-1 gag und env wurden synthetische Peptide hergestellt, um die systemische und intrathekale humorale Immunantwort bei Patienten mit HAM/TSP (n=39) und HTLV-1 infizierten Patienten ohne HAM/TSP (n=15) zu untersuchen. HAM/TSP Patienten zeigten im Durchschnitt eine verbreiterte sowohl systemische als auch intrathekale Immunantwort.

Die Analyse der Feinspezifität von IgG-Antikörpern gegen 16 immunogene synthetische Peptide von HTLV-1 gag und env ergab ein unterschiedliches Muster der systemischen und intrathekalen Immunantwort bei HTLV-1 Trägern mit und ohne entzündliche ZNS Erkrankung, d.h. mit und ohne HAM/TSP: Die HTLV-1 Träger ohne HAM/TSP reagierten im Durchschnitt gegen eine kleinere Anzahl von Epitopen sowohl systemisch als auch intrathekal (Abbildung 18). Die intrathekale Immunantwort gegen ein HTLV-1 gag oder env Epitop war bei den HTLV-1 Trägern ohne HAM/TSP selten, während HAM/TSP Patienten bei einer Auswahl von 16 synthetischen Peptiden eine systemische Immunantwort gegen ca. 50% der Peptide und eine intrathekale Immunantwort gegen ca. 25%

der Peptide zeigten. Offensichtlich ist nicht die Immunreaktion gegen ein einzelnes Epitop mit der Erkrankung HAM/TSP assoziiert, sondern eine oligoklonale humorale Immunantwort sowohl systemisch als auch intrathekal (Tabelle 9 und Abbildung 9). Dies trifft auch auf die humorale Immunantwort gegen die regulatorischen HTLV-1 Proteine tax und rex zu (Tabelle 10). Bei einigen HAM/TSP Patienten wurden allerdings Hinweise für eine gesteigerte humorale Immunantwort gegen ein einzelnes Epitop gefunden (Abbildungen 11 und 12). Die Untersuchung der intrathekalen Immunantwort bei 7 HAM/TSP Patienten im Verlauf der Erkrankung (Tabelle 10) zeigte keine Hinweise für ein sogenanntes "*epitope spreading*" der IgG-Antikörper gegen HTLV-1 gag und env Epitope. "*epitope spreading*" wurde für T-Zell Reaktivitäten gegen ein Autoantigen (Lehmann et al. (1992)), aber bisher nicht für B-Zellen beschrieben.

5.3. Pathogenetische Bedeutung der spezifischen, durch B-Lymphozyten vermittelten Immunantwort

Bei der persistierenden HTLV-1 Infektion kommt es zur Bildung von Antikörpern mit hoher Affinität (Nakamura et al. (1992)). Zunächst zeigten die eigenen Untersuchungen mittels verschiedener immunchemischer Methoden, daß die B-Zell Immunantwort bei der HTLV-1 Infektion nicht auf einer polyklonalen Stimulation von B-Zellen beruht. Offensichtlich werden Antikörper gegen die verschiedenen HTLV-1 Proteine bzw. Glykoproteine bei allen getesteten HAM/TSP Patienten gebildet, aber bei den getesteten Individuen fand sich eine individuelle Selektion von Antikörpern gegen einzelne lineare B-Zell Epitope. Die inter-individuelle Vielfalt der humoralen Immunantwort kann bisher nicht vollständig durch bekannte immungenetische Faktoren erklärt werden: Der HLA DR1 Phänotyp (bzw. HLA DRB1*0101 Genotyp) bedeutet ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von HAM/TSP bei HTLV-1 Infizierten (Jeffery et al. (1999)), bei HLA DR1 positiven Patienten fanden sich jedoch keine exklusiven, systemisch oder intrathekal gebildeten Antikörperspezifitäten (Abbildung 14). Bei HLA DR1 positiven HAM/TSP Patienten gibt es jedoch eine Tendenz zu einer höheren Anzahl von intrathekal gebildeten Antikörperspezifitäten. Deutlicher wurde der Effekt des HLA Komplexes, als die von Usuku et al. (1988) erstmals beschriebenen HAM/TSP assoziierten HLA Haplotypen zugrunde gelegt wurden: Bei dieser Analyse zeigte sich eine systemische und intrathekale Immunantwort bei HAM/TSP Patienten mit den definierten HLA Haplotypen gegen eine größere Anzahl von B-Zell Epitopen (Tabelle 12).

Zunächst sind die nachgewiesenen Antikörper ein Hinweis auf die Präsenz von B-Zellen mit einer entsprechenden Spezifität des B-Zell Rezeptors (d.h. des Antikörpermoleküls an der Zelloberfläche) und deren Differenzierung zu Plasmazellen. Da eine intrathekale Antikörpersynthese nachgewiesen wurde, kann man auch davon ausgehen, daß die entsprechenden B-Zellen bzw. Plasmazellen in das Kompartiment des ZNS eingewandert sind.

Im Rahmen von funktionellen Untersuchungen der humoralen Immunantwort ist zunächst bedeutsam, ob die beschriebenen Antikörperspezifitäten neutralisierende Eigenschaften haben (Harper (1998)). Inoue et al. (1992) und Sagara et al. (1996) testeten verschiedene HTLV-1 env Peptide im Synzytium-inhibitionstest. Von den in den eigenen Untersuchungen getesteten synthetischen Peptiden (vergleiche: Tabelle 4) wiesen folgende Peptide Inhibitionsraten von über 30 % auf (Inoue et al. (1992)): env gp46 136-160, env gp46 175-199, env gp46 213-236, env gp46 277-292, env gp21 350-386 und env gp21 382-403. In Anbetracht erhöhter Zahlen HTLV-1 infizierter CD4+ T-Lymphozyten (Nagai et al. (1998)) und einer verstärkten zellulären und humoralen Immunantwort bei HAM/TSP ist es unwahrscheinlich, daß die neutralisierenden Eigenschaften der Antikörperspezifitäten funktionell *in vivo* bedeutsam sind. Der Nachweis neutralisierender Antikörper *in vitro* (Inoue et al. (1992), Desgranges et al. (1994), Sagara et al. (1996)) bedeutet also nicht, daß diese Antikörper auch *in vivo* eine neutralisierende Funktion haben.

Saarloos et al. (1995) wiesen die Komplementfragmente iC3b, C4d und Bb im Plasma von HAM/TSP Patienten nach, d.h. es kommt zu einer Komplementaktivierung über den klassischen Weg. Die Autoren postulierten, daß dieser Mechanismus zum Entzündungsgeschehen bei der Erkrankung beiträgt. Dieser Mechanismus impliziert auch, daß Antigen-Antikörper-Komplexe den klassischen Weg der Komplementaktivierung initiieren.

Ein weiterer möglicher Effektormechanismus der spezifischen Antikörper ist die sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC; Harper (1998)). Dabei werden antikörperbedeckte Zielzellen durch sogenannte „*natural killer*“ (NK) Zellen abgetötet. Die NK-Zellen besitzen Fc-Rezeptoren und können dadurch an den Fc-Teil des Antikörpers binden. Kuroki et al. (1992) zeigten, daß ein menschlicher monoklonaler IgG-Antikörper gegen das synthetische Peptid HTLV-1 env 187-193 eine ADCC gegenüber HTLV-1 infizierten Zellen stimulieren kann. Über ihren Fc-Rezeptor können auch Makrophagen Antigen-Antikörper Komplexe binden, phagozytieren und schließlich intrazellulär ab-

bauen (Harper (1998)). Für diesen Effektormechanismus gibt es bei der HTLV-1 Infektion zur Zeit keine experimentellen Belege.

Weitere, bisher hypothetische Effektormechanismen der HTLV-1 spezifischen Antikörper stellen die Penetration von Antikörpern (Alarcon-Segovia et al. (1996)) in die HTLV-1 infizierte Zelle und die Beeinflussung der Expression von HTLV-1 Proteinen dar (Tochikura et al. (1985)).

5.4. Pathogenetische Bedeutung der spezifischen, durch CD4+ T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort

Die HTLV-1 Infektion der CD4+ T-Lymphozyten führt nicht zur Elimination von CD4+ T-Zellen im Gegensatz zur Infektion mit HIV. Die HTLV-1 Infektion bedingt stattdessen eine oligoklonale Expansion von einzelnen CD4+ T-Zell Klonen (Wattel et al. (1995)). Die Funktion dieser Klone wird mit der Entstehung von verschiedenen entzündlichen Organerkrankungen in Verbindung gebracht, z.B. der HTLV-1 assoziierten Myelopathie, Uveitis oder Arthropathie. Bisher konnten Funktionen der HTLV-1 infizierten T-Zell Klone nur in wenigen Untersuchungen charakterisiert werden. Nagai et al. (1996) isolierten einen HTLV-1 infizierten T-Zell Klon, der mit einem ZNS Autoantigen spezifisch reagierte. Die in dieser Arbeit beschriebenen, HTLV-1 gp21 spezifischen T-Zell Linien, isoliert aus dem Blut von HAM/TSP Patienten, waren zum Teil ebenfalls HTLV-1 infiziert (Abbildung 17). Da es sich nicht um T-Zell Klone, sondern um T-Zell Linien handelte, kann bisher über die funktionelle Bedeutung der HTLV-1 Infektion bei diesen T-Zell Spezifitäten keine Aussage gemacht werden.

5.4.1. HLA Restriktion und T-Zell Epitope

Für das HLA DR1 (HLA-DRB1*0101) und andere HLA Klasse I und II Moleküle sind Sequenzmotive beschrieben worden, die nach Analyse der extrahierten, natürlichen Liganden oder nach Bindungsstudien mit künstlichen Peptiden (Hammer et al. (1994), Rammensee et al. (1995)) abgeleitet wurden. Am Beispiel des HLA DR1 konnte auch kristallographisch die besondere Bedeutung einzelner Aminosäuren bei der Bindung des Peptids an das HLA Molekül dargestellt werden (Brown et al. (1993)). Ohne auf die Besonderheiten der HLA DR1

Motive einzugehen, soll hier die Sequenz der beiden immundominanten Epitope von HTLV-1 env gp21 mit den etablierten Motiven verglichen werden. Im Bereich der Aminosäuren 385 bis 394 (LFWEQGGLCK), die als essentielle Sequenz eines der beschriebenen T-Zell Epitope etabliert wurde, ergeben sich nach den bekannten Prinzipien mehrere Übereinstimmungen (Tabelle 17). Es sind mehrere Möglichkeiten denkbar, wie dieses Peptid im peptidbindenden Spalt des HLA DR1 Moleküls liegen kann. Für das zweite immundominante T-Zell Motiv im Bereich der Aminosäuren 416 bis 427 (RPPLENRVLTGN) ergibt sich keine gute Übereinstimmung mit den etablierten Bindungsmotiven. Das Asparagin (N) an Position 427, das eine zusätzliche Ankerposition darstellen könnte (Tabelle 17), ist aufgrund der dargestellten Ergebnisse nicht zwingend erforderlich.

Tabelle 17: Das HLA DR1 Motiv (nach Rammensee et al. (1995)) und mögliche Ankerpositionen in 2 immundominanten HTLV-1 env gp21 T-Zell Epitopen.

		Relative Position									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Etablierte Aminosäuren		Y,V, L,F, I,A, M,W			L,A, I,V, M,N, Q		A,G, S,T, P			L,A, I,V, N,F, Y	
HTLV-1 env gp21 384 bis 395											
(L)	L	F	<u>W</u>	E	Q	G	G	L	C	K	(<u>A</u>)
	(L)	L	<u>F</u>	W	E	<u>Q</u>	G	<u>G</u>	L	C	K
		(L)	<u>L</u>	F	W	<u>E</u>	Q	<u>G</u>	G	L	C
			(<u>L</u>)	L	F	W	E	<u>Q</u>	G	G	<u>L</u>
HTLV-1 env gp21 416 bis 427											
R	P	P	<u>L</u>	E	N	R	V	L	T	G	(<u>N</u>)

Für das immundominante Epitop im Bereich des HTLV-1 gp21 385 bis 394 (LFWEQGGLCK) ergab sich eine weitere Besonderheit, die sowohl für experimentelle Untersuchungen des T-Lymphozyten Repertoires als auch für die pathophysiologische Beurteilung dieser Befunde bedeutsam ist: Hinreichend für die T-Lymphozyten Proliferation war zwar die Sequenz von 10 Aminosäuren LFWEQGGLCK, aber eine signifikant stärkere Proliferation wurde beobachtet, wenn die antigenpräsentierenden Zellen mit einem am N-terminalen Ende verlängerten Peptid inkubiert wurden (Abbildung 16). Vergleichbare Befunde wurden für ein tierexperimentelles Modell der CD4+ T-Zell Antwort gegen Fremdprotein berichtet (Carson et al. (1997)). Bei der HLA DR1 restringierten T-Zell Immunantwort gegen das Masernvirus Fusionsprotein fand sich ebenfalls eine verstärkte Aktivierung durch Peptide mit C-terminal und N-terminal verlängerten Sequenzen (Muller et al. (1996)). In einer kürzlich veröffentlichten Übersichtsarbeit faßten Moudgil et al. (1998) die verschiedenen Mechanismen zusammen, die dazu führen, daß C-terminal oder N-terminal verlängerte immunogene Peptide die CD4+ T-Zell Aktivierung hemmen oder fördern können. Der wichtigste Mechanismus scheint zu sein, daß die zusätzlichen N- oder C-terminalen Sequenzen sich günstig oder ungünstig auf die Anordnung der gesamten Sequenz im peptidbindenden Spalt des HLA Klasse II Moleküls auswirken können (Moudgil et al. (1998)), obwohl nur einzelne Aminosäuren des Epitops schließlich im peptidbindenden Spalt mit dem HLA Klasse II Molekül interagieren (Rammensee et al. (1995)). Für das andere immundominante Epitop (RPPLENRVLTG) fand sich keine vergleichbare Besonderheit im Hinblick auf das N-terminale Ende des Peptids (Abbildung 15).

Es ist bei der Interpretation der dargestellten Ergebnisse wichtig, daß CD4+ T-Lymphozyten die beiden immundominanten Motive erkannten, nachdem antigenpräsentierende Zellen sowohl mit kurzen synthetischen Peptiden als auch mit einem rekombinanten HTLV-1 rp21 inkubiert worden waren (Abbildung 15). Dies zeigt, daß beide HLA DR1 restringierten Epitope auch nach intrazellulärer Antigenverarbeitung ("*antigen processing*") des HTLV-1 rp21 durch die antigenpräsentierenden Zellen die spezifischen CD4+ T-Zellen aktivieren können.

5.4.2. Kooperation von CD4+ T- Lymphozyten mit B-Lymphozyten

In diesem Abschnitt werden die etablierten immunologischen Besonderheiten der Kooperation von CD4+ T- und B-Lymphozyten in Beziehung gesetzt zu den eigenen immunologischen Befunden bei der persistierenden HTLV-1 Infektion.

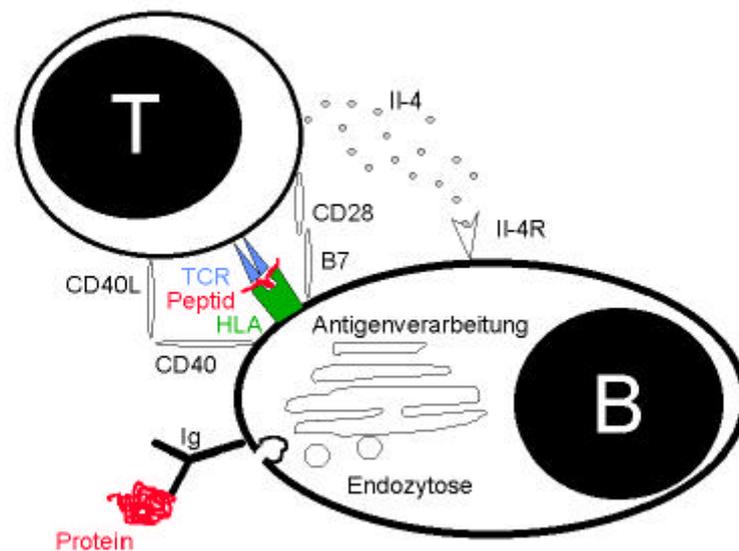


Abbildung 19: Bei der sekundären Immunantwort, z.B. im Rahmen einer persistierenden Virusinfektion, kooperieren antigenspezifische T- und B-Lymphozyten auf vielfältige Weise, was zur Aktivierung und Proliferation beider Zellen führt. B-Zellen nehmen das Antigen durch rezeptor-vermittelte Endozytose auf, bilden immunogene Peptide nach Antigenverarbeitung und präsentieren ein Peptid, das an das HLA Klasse II Molekül gebunden ist. Die T-Zelle erkennt das T-Zell Epitop des Peptids im Kontext des HLA Klasse II Moleküls und wird aktiviert. Darüberhinaus können verschiedene Oberflächenmoleküle auf den B- und T-Zellen miteinander interagieren. Es werden von beiden Zellen lösliche Faktoren gebildet, die zur Aktivierung sowohl von B- als auch von T-Zellen beitragen.

CD4+ T-Zellen stimulieren die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, die Sekretion von antigenspezifischen Immunglobulinen und den Immunglobulin-Isotypwechsel durch direkte Zell-Zell-Interaktionen ("*cognate help*") und durch zahlreiche Zytokine ("*non-cognate help*", "*bystander help*") (Melchers und

Andersson (1984)). Der Zellkontakt von T- und B-Zellen beeinflusst vor allem die Spezifität der humoralen Immunantwort. Die relevanten T- und B-Zell Epitope sind in der Regel kovalent gebunden in einem Molekül ("*intramolecular help*") oder liegen in Ausnahmefällen in verschiedenen Virusproteinen, die stabile Komplexe bilden ("*intermolecular help*") (Oxenius et al. (1998)). Die Abhängigkeit der humoralen Immunantwort von der CD4+ T-Zell Hilfe gilt für die meisten viralen Antigene mit Ausnahme von viralen Proteinen, die stark geordnete, polymere Strukturen bilden (Bachmann und Zinkernagel (1996)). Dies ist im Hinblick auf die HTLV-1 env Proteine unwahrscheinlich: Das env Vorläuferprotein gp68 ("*precursor protein*") liegt überwiegend als Dimer (Paine et al. (1994)) vor, das Transmembranlykoprotein gp21 nach der enzymatischen Spaltung des Vorläuferproteins als Trimer (Kobe et al. (1999)).

Lösliche Antigene mit B- und T-Zell Epitopen können an den Rezeptor von humanen B-Lymphozyten gebunden, durch Endozytose aufgenommen und nach Antigenverarbeitung ("*antigen processing*") als Peptide von HLA Klasse II Molekülen präsentiert werden, um die Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten zu induzieren (Lanzavecchia (1985)) (Abbildung 19). Diese Form der T-Zell / B-Zell Kooperation ist bei der sekundären Immunantwort und niedrigen Antigen Konzentrationen wirksam, da andere APC in dieser Situation weniger effektiv sind (Abbas et al. (1994)). Aktivierte B-Zellen sezernieren darüberhinaus eine Reihe von Zytokinen, die einen Einfluß auf die T-Zell Aktivierung und Proliferation haben (Pistoia (1997)).

Auch sezernierte Antikörper beeinflussen die T-Zell Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, daß ein für Tetanustoxoid spezifischer monoklonaler Antikörper die Präsentation verschiedener T-Zell Epitope des Tetanustoxoids sowohl fördern als auch hemmen konnte (Simitsek et al. (1995)). Darüberhinaus können lösliche Antikörper das Antigen binden, so daß die resultierenden Antigen-Antikörper-Komplexe über Fc-Rezeptoren in antigenpräsentierende Zellen, z.B. Makrophagen, aufgenommen werden. Auch dadurch wird die Antigenverarbeitung beeinflusst (Manca et al. (1988), Fournier et al. (1996)).

Für CD4+ T-Zellen ist die Antigenverarbeitung und -präsentation durch B-Zellen bei manchen Proteinen essentiell, bei anderen jedoch nicht (Constant et al. (1995b), Williams et al. (1998)). In den meisten Fällen gilt die Regel, daß die CD4+ T-Zell Aktivierung bei sehr niedrigen Antigenkonzentrationen durch antigenspezifische B-Zellen vermittelt wird und eine sogenannte Th2-Immunantwort, d.h. humorale Immunantwort, begünstigt (Constant et al. (1995a),

Oxenius et al. (1998)). Bei niedrigen Antigenkonzentrationen kann die T-Zell / B-Zell Kooperation eine Immunantwort gegen ein Antigen überhaupt erst ermöglichen bzw. aufrechterhalten (Abbas et al. (1994)). Diese Situation liegt wahrscheinlich bei der HTLV-1 assoziierten Myelopathie vor, bei der einzelne HTLV-1 infizierte CD4+ T-Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke durchdringen, HTLV-1 Proteine intrathekal exprimieren und dadurch eine lokale spezifische Immunantwort in Gang bringen. Die eigenen Daten zeigen, daß tatsächlich sehr niedrige molare Konzentrationen von Antigen ausreichend sind, um antigen-spezifische T-Lymphozyten zu aktivieren (Abbildungen 15 und 16).

5.4.3. Bedeutung der CD4+ T-Zell Funktionen bei experimentellen Virusinfektionen

Die Funktion der CD4+ T-Lymphozyten bei verschiedenen Virusinfektionen wurde von Oxenius et al. (1998) verglichen. Es gilt generell, daß bei jeder Virusinfektion die immunologischen Mechanismen im Einzelnen analysiert werden müssen. Oxenius et al. (1998) stellen 5 CD4+ T-Zell Effektorfunktionen heraus, die in unterschiedlichem Ausmaß bei verschiedenen Virusinfektionen beobachtet werden: 1. Unterstützung der B-Zell Aktivierung und des Immunglobulin-Isotypwechsels, 2. Sekretion von Lymphokinen, die weitere Zellpopulationen (z.B. die Makrophagen) beeinflussen, 3. Hypersensibilitätsreaktionen vom verzögerten Typ, 4. CD4+ T-Zell Zytotoxizität gegenüber virusinfizierten Zellen, 5. CD4+ T-Zell Unterstützung für die Aufrechterhaltung CD8+ T-Zell vermittelter Zytotoxizität. Der zuletzt genannte Mechanismus wird insbesondere bei persistierenden Virusinfektionen bedeutsam, bei denen durch die CD8+ T-Zell Zytotoxizität keine rasche Viruselimination möglich ist (Matloubian et al. (1994)).

Im Hinblick auf CD4+ T-Zell Funktionen beziehen sich fast alle untersuchten experimentellen Virusinfektionen bei Mäusen auf zytopathische Viren (Oxenius et al. (1998)), nur die Infektion mit LCMV kann als Modell für eine potentiell persistierende, nicht zytopathische Infektion betrachtet werden. Es existieren neurotrope LCMV Stämme (Battegay et al. (1993)). Am LCMV Mausmodell sind immunologische Experimente durchgeführt worden, die zeigten, daß die CD4+ T-Zell Antwort allein die Persistenz der LCMV Infektion nicht verhindern kann, daß CD4+ T-Zell defiziente Mäuse nur kurzfristig die Infektion kontrollieren können und daß CD8+ T-Zell defiziente Mäuse die Virusinfektion überhaupt

nicht oder nur verzögert begrenzen können (Oxenius et al. (1998)). Ein Schutz gegen die LCMV Reinfektion kann darüberhinaus durch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern bewirkt werden. Die effektive kurzfristige Kontrolle der LCMV Infektion ist somit allein von den CD8+ T-Zellen abhängig, für den langfristigen Schutz gegen die persistierende LCMV Infektion sind jedoch B-, CD4+ T- und CD8+ T-Zellen erforderlich. Neurologische Komplikationen der LCMV Infektion von Mäusen (akute Choriomeningitis oder "*chronic wasting disease*", d.h. chronischer Gewichtsverlust) entstehen durch immunpathogenetische Mechanismen, an denen neutralisierende Antikörper, CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen beteiligt sind. Das Auftreten der Komplikationen hängt sowohl vom LCMV Isolat als auch von immungenetischen Faktoren der Mäuse ab (Battegay et al. (1993), Zajak et al. (1996)).

5.5. Das HTLV-1 Transmembranglykoprotein gp21

5.5.1. Struktur und Funktion des HTLV-1 Transmembranglykoproteins

Die Struktur des Vorläuferglykoproteins HTLV-1 gp68 weist eine funktionelle Organisation auf, die den entsprechenden Vorläuferproteinen anderer Retroviren entspricht (Hunter und Swanstrom (1990)): Am N-terminalen Ende des Oberflächenproteins gp46 findet sich ein Signalpeptid, das für den Transport und die Translokation des Vorläuferglykoproteins HTLV-1 gp68 in das endoplasmatische Retikulum der infizierten Zelle erforderlich ist (Hunter und Swanstrom (1990), Delamarre et al. (1996), Carrington und Schulz (1996)). Nach der Reifung im Golgi Apparat und der Spaltung des Vorläuferglykoproteins zwischen den Aminosäuren 313 und 314 (Abbildung 20) durch eine zelluläre Protease bleiben die beiden Untereinheiten, das Oberflächenglykoprotein (SU) gp46 und das Transmembranglykoprotein (TM) gp21, nicht-kovalent assoziiert. Das Transmembranglykoprotein ist durch eine hydrophobe Region in der Zellmembran verankert und fixiert somit auch das Oberflächenglykoprotein gp46 an der Membran der infizierten Zelle bzw. an der Virushülle. Paine et al. (1994) zeigten, daß in Membranen HTLV-1 infizierter Zellen neben den gp46/gp21 Heterodimeren auch in geringerer Konzentration Oligomere verschiedener Größen vorliegen.

Das HTLV-1 Transmembranglykoprotein weist mehrere funktionelle Domänen auf, die in Abbildung 20 zusammengefaßt sind. Das N-terminal gelegene

sogenannte Fusionspeptid (Aminosäuren 314-339) wird für die Interaktion mit dem Oberflächenglykoprotein gp46 verantwortlich gemacht (Hunter und Swanstrom (1990), Paine et al. (1994)). Mit dem HTLV-1 Fusionspeptid homologe Aminosäuresequenzen von anderen Retroviren haben eine Funktion bei der Membranfusion (Rosenberg et al. (1997)). Diese Funktion wurde allerdings für das HTLV-1 Fusionspeptid bisher nicht experimentell belegt (Carrington und Schulz (1996)). Kobe et al. (1999) konnten für die Konformation des HTLV-1 TM kristallographisch zeigen, daß das hydrophobe N-terminale Fusionspeptid dem in der Membran liegenden hydrophoben Anker benachbart ist.

Weitere Regionen des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21 weisen konservierte Aminosäuresequenzen auf. Es wird angenommen, daß diese Bereiche funktionell wichtige Domänen darstellen. Schulz et al. (1992) beschrieben ein CxxxxxxCC Motiv bei C-Typ Retroviren, D-Typ Retroviren und HTLV sowie ein CxxxxxC Motiv bei Lentiviren. Auch diese Motive haben eine Bedeutung bei der Fusion des Retroviruspartikels mit der Zellmembran. Bei HTLV-1 entspricht diese Sequenz den Aminosäuren 393-401 des Transmembranglykoproteins gp21. Patarca und Haseltine wiesen bereits 1984 auf eine weitere konservierte Sequenz hin, die etwas weiter N-terminal im TM gelegen ist und den Aminosäuren 376-393 von HTLV-1 gp21 entspricht. Die Zugabe eines entsprechenden synthetischen Peptids zu *in vitro* stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen führte zu einer verminderten Expression von Interferon gamma, Il-2 und Il-12, sowie zu einer vermehrten Expression von Il-10 (Haraguchi et al. (1995a), Haraguchi et al. (1995b)). Damit scheint diese Sequenz immunmodulatorische Eigenschaften zu besitzen. Eine Region, die C-terminal vom Fusionspeptid liegt und das immunsuppressive Peptid einschließt (Abbildung 20), wurde von Delwart et al. (1990) als "*leucine zipper*" Sequenz (Aminosäuren 340-392) bezeichnet, d.h. in Abständen von 7 Aminosäuren findet sich meist Leucin, manchmal Isoleucin und seltener eine andere hydrophobe Aminosäure. Gallaher et al. (1989) und Delwart et al. (1990) postulierten, daß diese Primärstruktur die Bildung von Oligomeren der retroviralen TM Proteine fördert in der Form eines Reisverschlusses, eines sogenannten "*zipper*". Mutationen in dieser Region führen zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit der infizierten Zellen, Synzytien zubilden (Rosenberg et al. (1997)).

Die Sequenz zwischen den Aminosäuren 400 und 429 ist funktionell bedeutsam für die Infektion der Zelle nach Adsorption von HTLV-1 Viren (Jinno et al. (1999)). Die hydrophobe, in der Membran verankerte Region des HTLV-1 env gp21, liegt zwischen den Aminosäuren 438 bis 466. C-terminal davon findet

sich die zytoplasmatische Domäne des TM Proteins, über deren Funktion wenig bekannt ist. Wie die meisten zytoplasmatischen Domänen retroviraler TM enthält auch HTLV-1 gp21 ein YXXØ Motiv (Y, Tyrosin; X, irgendeine Aminosäure; Ø, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Valin oder Methionin), das für den intrazellulären Transport des Proteins und die Membranfusion funktionell bedeutsam sein soll (Berlioz Torrent et al. (1999)). Pique et al. (1993) fanden, daß die Expression der HTLV-1 env Proteine in manchen Zell Linien vermindert ist, wenn die Zellen ein defektes TM Protein ohne die zytoplasmatische Domäne exprimierten.

5.5.2. Immundominante Epitope in Bezug zu Struktur und Funktion des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21

In dieser Arbeit wurden immundominante lineare CD4+ T-Zell und B-Zell Epitope des HTLV-1 TM beschrieben. Im folgenden sollen die Sequenzen dieser linearen Epitope in Bezug gesetzt werden zu den bekannten strukturellen und funktionellen Eigenschaften des HTLV-1 Transmembranglykoproteins, und die Lokalisation der B- und T-Zell Epitope soll verglichen werden (Abbildung 20).

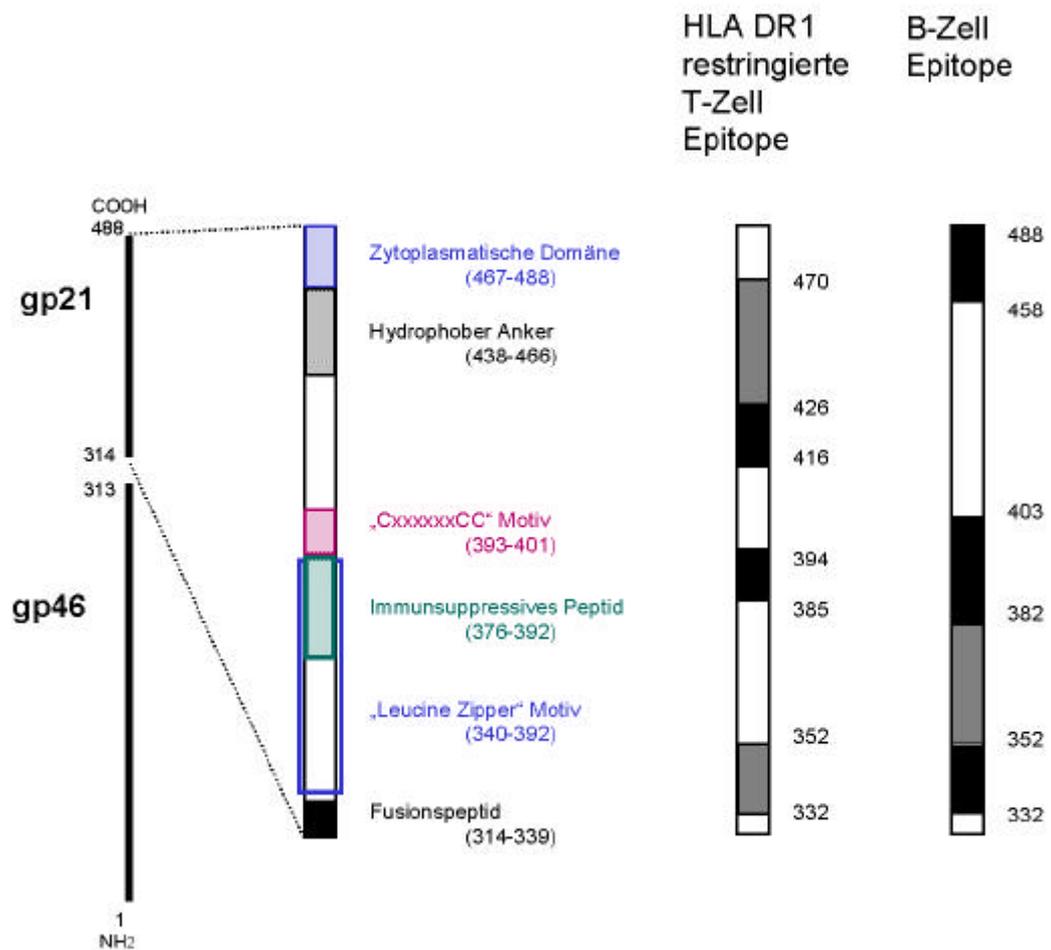


Abbildung 20: Funktionelle Domänen und konservierte Sequenzen des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21. Vergleich mit der Verteilung der etablierten linearen B- und T-Zell Epitope. Immundominante Epitope sind schwarz, alle anderen Epitope grau gekennzeichnet.

Als HLA DR1 restringiertes CD4⁺ T-Zell Epitop konnte eine besonders konservierte Sequenz identifiziert werden, die mit geringen Veränderungen der Aminosäuresequenz bei verschiedenen Retroviren außer HIV und MMTV vorkommt (Patarca und Haseltine (1984), Delwart et al. (1990) (Tabelle 14). Diese Sequenz schließt auch das immunsuppressive Peptid ein (Haraguchi et al. (1995b)). Die Sequenz ist bei HTLV-1 Infizierten, die eine immungenetisch determinierte Prädisposition zur Erkrankung an HAM/TSP haben, d.h. HLA DR1 positiv sind, eines der immundominanten T-Zell Epitope.

Ein immundominantes B-Zell Epitop liegt im Bereich der Aminosäuren 458 bis 488, einer Sequenz des Transmembranglykoproteins, die teils in der Membran, teils in der zytoplasmatischen Domäne liegt (Abbildung 20). Die humorale Immunantwort ist also auch gegen ein B-Zell Epitop gerichtet, das nicht an der Zelloberfläche liegt. Ähnliches gilt für die B-Zell Immunantwort gegen HTLV-1 tax, ein Molekül, das nach der Proteinbiosynthese in den Zellkern transferiert wird (Semmes und Jeang (1992), Semmes und Jeang (1996)). Auch HTLV-1 tax sollte somit nur bei Zerstörung der infizierten Zelle frei werden. Die humorale Immunantwort gegen HTLV-1 env gp21 und tax p40 unterscheidet sich jedoch im zeitlichen Ablauf der Antikörperbildung nach der Infektion mit HTLV-1: Antikörper gegen gp21 werden bereits einige Wochen nach der Infektion nachgewiesen, während die Antikörper gegen tax erst nach Monaten gebildet werden (Chen et al. (1990), Manns et al. (1991)).

Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß es eine systemische und intrathekale humorale Immunantwort gegen Epitope gibt, die wahrscheinlich erst nach Lyse der infizierten Zellen für Antikörper zugänglich werden. Ein solches Szenario wäre möglich, wenn ins ZNS eingewanderte HTLV-1 infizierte Lymphozyten durch zytotoxische T-Lymphozyten (Umehara et al. (1994)), NK-Zellen (Kuroki et al. (1992)) oder Komplementaktivierung (Saarloos et al. (1995)) lysiert würden.

5.5.3. Verteilung von B- und T-Zell Epitopen des HTLV-1 gp21 und Vergleich mit anderen Antigenen

Die Verteilung von Epitopen des HTLV-1 Transmembranglykoproteins (Abbildung 20) wirft die Frage auf, ob B- und T-Zell Epitope benachbart sind oder nicht. Diese Frage kann auf der Basis der vorliegenden Daten bisher nur für HLA DR1 positive Individuen beantwortet werden. Die relevanten Epitope der B-Zellen und der CD4+ T-Zellen sind in teilweise überlappenden oder benachbarten Regionen des Transmembranglykoproteins gelegen (Abbildung 20).

Für 4 synthetische Peptide des HTLV-1 gp21 wurden sowohl die T-Zell Proliferation (Abschnitt 4.4.) als auch der spezifische Antikörpernachweis (Abschnitt 4.2.1.) durchgeführt. In Tabelle 18 sind die Daten zusammengefaßt, die aus den eigenen Untersuchungen (Kitze et al. (1996)), Yamano et al. (1997), Kitze et al. (1998)) abgeleitet sind.

Tabelle 18: Zelluläre und humorale Immunreaktion gegen lineare Epitope des HTLV-1 gp21 Proteins bei 2 HLA DR1 positiven HAM/TSP Patienten, bei denen sowohl die T-Zell Proliferation als auch peptid-spezifische IgG-Antikörper untersucht wurden. Zusätzlich wurden die Daten für alle getesteten HLA DR1 positiven Individuen in der vierten Spalte zusammengefaßt. Bei dieser Auswertung wurden nur die 4 synthetischen Peptide berücksichtigt, für die sowohl die T-Zell Proliferation als auch das Vorhandensein von spezifischen IgG-Antikörpern getestet wurde.

Untersuchung /Spezifität	HAM/TSP Patient 1 *	HAM/TSP Patient 2 *	Alle HLA DR1 positiven Patienten **
T-Zell Proliferation			
332 - 352		+	+
350 - 386			
382 - 403	+		++
458 - 488			+
IgG-Antikörper im Serum			
332 - 352	+		++
350 - 386	+	+	+
382 - 403	+		++
458 - 488	+		++

* "+" bedeutet: Reaktivität nachgewiesen.

** "+" bedeutet: Reaktivität bei einzelnen Individuen nachgewiesen. "++" bedeutet: Reaktivität bei der Mehrzahl der Individuen nachgewiesen (>50 %).

Im Hinblick auf den Nachweis von CD4+ T-Lymphozyten gegen einzelne Peptide müssen die in Tabelle 18 dargestellten Daten für 2 HLA DR1 positive HAM/TSP Patienten mit Vorsicht betrachtet werden: Aufgrund der begrenzten Anzahl von isolierten T-Zell Linien bei diesen Patienten (vergleiche Tabelle 13) könnten einzelne T-Zell Spezifitäten übersehen worden sein. Tabelle 18 zeigt deswegen auch eine Zusammenfassung aller nachgewiesenen linearen B- und T-Zell Epitope bei sämtlichen untersuchten HLA DR1 positiven HAM/TSP Patienten und einer seronegativen Kontrolle (vergleiche Tabelle 13; Kitz et al. (1996), Yamano et al. (1997), Kitz et al. (1998)). Zusammenfassend ist festzustellen, daß Sequenzen des HTLV-1 Transmembranglykoproteins, die lineare B-Zell Epitope enthalten, in der Regel auch immunogen für HLA DR1 restringierte T-Lymphozyten sind.

Das Phänomen der Überlappung von B- und T-Zell Epitopen wurde "*preferential pairing*" (Celada und Sercarz (1988)) oder "*non-random pairing*"

(Muller et al. (1993)) von B- und T-Zell Epitopen genannt. Muller et al. (1993) führten eine vollständige Untersuchung der humanen linearen B- und CD4+ T-Zell Epitope des Masernvirus Fusionsproteins durch. Die experimentell ermittelten T-Zell Epitope fanden sich überwiegend in Nachbarschaft von linearen B-Zell Epitopen des Fusionsproteins. Die für die Maus immundominanten Epitope des Influenza Hämagglutinins zeigten ebenfalls eine Überlappung von B- und CD4+ T-Zell Epitopen. Der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Epitope im Rahmen des "*antigenic drift*" verhinderte sowohl die Bindung von Antikörpern als auch die Aktivierung spezifischer CD4+ T-Lymphozyten (Graham et al. (1989)). Auch für ein Autoantigen, das basische Myelinprotein (MBP), fanden Wucherpfennig et al. (1997), daß die immundominanten B- und CD4+ T-Zell Epitope überlappten und daß durch den gerichteten Austausch einzelner Aminosäuren sowohl die Antikörperbindung als auch die T-Zell Aktivierung verhindert wurden. Auch beim HTLV-1 Oberflächenprotein gp46 wurden einzelne, benachbarte, menschliche B- und T-Zell Epitope beschrieben (Jacobson et al. (1991), Baba et al. (1995)).

Davidson und Watts (1989) zeigten, daß der initiale Schritt der B-Zell Rezeptor vermittelten Endozytose („*receptor-mediated endocytosis*“) die Aufnahme des Antigen-Antikörper-Komplexes ist und daß die Fragmentierung des Antigens von dem B-Zell Epitop des Antigens abhängt. Dieses wird durch den spezifischen Antikörper auf der Zelloberfläche, d.h. durch den B-Zell Rezeptor, erkannt. Rekombinante Proteine, die jeweils ein immundominantes B- und T-Zell Epitop des *Mycobacterium tuberculosis* 38kD Antigens in unterschiedlicher Anordnung enthielten, erwiesen sich nur dann als immunogen, wenn das B- und das T-Zell Epitop kovalent gebunden und in der dem nativen Protein entsprechenden Anordnung auf dem rekombinanten Molekül zu finden waren (DeSmet et al. (1994)). Die kovalente Bindung der B- und T-Zell Epitope und ihre benachbarte Lage begünstigt in den bisher beschriebenen Fällen die Immunreaktion gegen das jeweilige Antigen. Es gibt aber auch Ausnahmen von dieser Regel: Beim Torpedofisch Acetylcholinrezeptor gibt es ein immundominantes B-Zell Epitop und ein nicht benachbartes immundominantes T-Zell Epitop; Mäuse, die mit 2 einzelnen synthetischen Peptiden, jeweils dem B- und T-Zell Epitop entsprechend, am gleichen Injektionsort immunisiert wurden, bildeten sowohl eine humorale Immunantwort gegen das B-Zell Epitop als auch eine zelluläre Immunantwort gegen das T-Zell Epitop aus (Bellone et al. (1994)).

5.5.4. Betrachtungen zur Phylogenese der retroviralen Hüllproteine und der Immunantwort des Wirtsorganismus

Die 2 beschriebenen immundominanten HLA DR1 restringierten T-Zell Epitope des HTLV-1 Transmembrannglykoproteins gp21 liegen in Domänen, die bei einem Teil aller retroviralen TM konserviert sind (Doolittle et al. (1990), Hunter und Swanstrom (1990)) (Tabelle 14). Es liegt deshalb nahe anzunehmen, daß sich diese Sequenzen aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung in der Retrovirus-evolution nur geringfügig verändert haben. Das erste immundominante T-Zell Epitop (HTLV-1 env gp21 385-394 LFWEQGGGLCK) überlappt sowohl mit dem immunsuppressiven Peptid von HTLV-1 als auch mit dem „*leucine zipper*“ Motiv, das für die Bildung von Proteinkomplexen und für die Membranfusion bedeutsam sein soll (Abbildung 20). Das zweite immundominante T-Zell Epitop (HTLV-1 env gp21 416-426 RPPLNRLVLTG) liegt in einem Abschnitt der HTLV-1 gp21 Sequenz, deren Funktion weniger gut bekannt ist (Abbildung 20).

Die immundominante T-Zell Aktivierung durch die konservierte retrovirale Sequenz des TM hat für den Wirtsorganismus den Vorteil, daß damit eine Immunreaktion nicht nur gegen eine, sondern gegen mehrere retrovirale Spezies bzw. Genera wirksam ist (Tabelle 14). Weiterhin ist anzumerken, daß sich auch im menschlichen Genom Hinweise auf endogene retrovirale Sequenzen finden, die mit der beschriebenen HTLV-1 Sequenz eine deutliche Homologie aufweisen und die zumindest zeitweise in der Ontogenese exprimiert werden (Tabelle 15). Diese endogenen retroviralen Sequenzen kann man als Relikte früherer exogener retroviraler Infektionen auffassen (Lewin (1994)). Bedeutsam erscheint in diesem Zusammenhang die Frage, ob diese Sequenzen bei einem nicht mit dem HTLV-1 Virus infizierten Individuum immunogen sind. Die in Tabelle 13 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß auch ein nicht infiziertes Individuum spezifische T-Lymphozyten besitzt, die die immunogene HTLV-1 Sequenz erkennen. Bisher wurde allerdings experimentell nicht untersucht, ob diese T-Zell Linien auch die endogene retrovirale Sequenz erkennen. Andererseits ist es unwahrscheinlich, daß die homologen endogenen retroviralen Sequenzen in der frühen Ontogenese eine Toleranz induzieren. Die bisherigen Ergebnisse zeigten bei den HTLV-1 Infizierten im Vergleich mit einem nicht infizierten Individuum eine höhere Anzahl antigenspezifischer CD4+ T-Zellen, aber keine Unterschiede des T-Zell Repertoires (Tabelle 13).

5.6. Vergleich mit anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS

5.6.1. HIV-1 assoziierte Erkrankungen des Rückenmarks

Das Spektrum der neurologischen Komplikationen der HIV Infektion im Verlauf von AIDS ist vielfältig (Snider et al. (1983), Said et al. (1997)). An dieser Stelle sollen die bekannten Erkrankungen des Rückenmarks, die direkt oder indirekt durch die HIV-1 Infektion verursacht werden, diskutiert werden. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob diese Erkrankungen Ähnlichkeiten mit HAM/TSP aufweisen.

Selten tritt im Frühstadium der HIV-1 Infektion zum Zeitpunkt der Serokonversion eine akute Myelitis auf (Said et al. (1997)). Erkrankungen des Rückenmarks bei AIDS sind jedoch im späteren Verlauf der Erkrankung häufig, d.h. zwischen 10 und 46,5 % (Dal Pan et al. (1994), Shepherd et al. (1999)). Folgende Formen der Rückenmarkserkrankungen bei AIDS werden neuropathologisch differenziert und treten in abnehmender Häufigkeit auf (Henin et al. (1992)): erstens die vakuoläre Myelopathie; zweitens die HIV-1 Myelitis, die meist mit der HIV-1 Enzephalitis kombiniert ist (als HIV-1 Enzephalomyelitis); drittens Meningomyelitiden durch opportunistische Infektionen mit *Cryptococcus sp.*, *Toxoplasma sp.*, Cytomegalievirus oder JC Virus; viertens maligne B-Zell Lymphome. Die HIV-1 assoziierte vakuoläre Myelopathie und die HIV-1 Myelitis sollen im folgenden ausführlich diskutiert werden.

Die HIV-1 assoziierte vakuoläre Myelopathie wird sehr häufig bei der Autopsie von AIDS Patienten festgestellt (bis 31 %; Grafe und Wiley (1989)), auch wenn die Symptome und klinischen Befunde zuvor gering waren. Der Verlauf der Erkrankung ist schleichend und der Beginn oft schlecht festzulegen. Die häufigsten Symptome und pathologischen Befunde sind Paraparese, Hinterstrangataxie, gesteigerte Eigenreflexe und Störungen der Blasen- sowie Mastdarmfunktion. Typische neuropathologische Veränderungen sind Demyelinisierung und vakuoläre Veränderungen der Pyramidenbahn und der Hinterstränge des Rückenmarks, vor allem im thorakalen Bereich (Said et al. (1997)). In den vakuolären Veränderungen finden sich Ansammlungen von Makrophagen und vielkernigen Riesenzellen. Diese neuropathologischen Befunde besitzen eine Ähnlichkeit mit der funikulären Myelose. Ein Mangel an Vitamin B12 konnte jedoch als Ursache der HIV-1 assoziierten vakuolären Myelopathie ausgeschlossen werden (Keating et al. (1991)). Die Aktivierung von HIV-1 infizierten Makrophagen (Eilbott et al. (1989), Tan et al. (1995)) und deren Expression von

HIV Proteinen (Goudreau et al. (1996)) oder von Tumornekrosefaktor alpha (Tan et al. (1996)) wurden als pathophysiologische Mechanismen der vakuolären Myelopathie angesehen. Eine neuere Untersuchung zeigte, daß die antiretrovirale Therapie zur Remission der HIV-1 assoziierten vakuolären Myelopathie führen kann (Staudinger und Henry (2000)).

Die HIV-1 Myelitis unterscheidet sich neuropathologisch von der vakuolären Myelopathie: Es finden sich multiple entzündliche Infiltrate, zahlreiche HIV-1 positive perivaskuläre Riesenzellen und Mikroglia, sowie eine deutliche Expression von HIV-1 Proteinen (Henin et al. 1992), Said et al. (1997)). Der klinische Verlauf der HIV-1 Myelitis kann relativ rasch sein (Said et al. (1997)).

Der Nachweis intrathekal synthetisierter Antikörper gegen HIV-1 als Zeichen der ZNS Beteiligung gilt als diagnostisches Routineverfahren (Ackermann et al. (1986), Weber et al. (1987), Luer et al. (1988), Reiber und Lange (1991)). Über die Liquorveränderungen, die speziell bei den verschiedenen Arten der HIV-1 assoziierten Rückenmarkserkrankungen auftreten, sind differentialdiagnostisch relevante Daten bisher nicht publiziert.

Die dargestellten Rückenmarkserkrankungen bei der HIV-1 Infektion unterscheiden sich deutlich von HAM/TSP. Bei der HIV-1 assoziierten vakuolären Myelopathie findet sich ein schleichender Verlauf und eine verstärkte Ausprägung der neuropathologischen Veränderungen im thorakalen Rückenmark wie bei HAM/TSP, aber die Art der neuropathologischen Veränderungen und das häufige Auftreten bei den HIV-1 Infizierten stellen bedeutsame Unterschiede dar. Während bei HAM/TSP HTLV-1 infizierte CD4+ T-Lymphozyten das Rückenmark infiltrieren, finden sich bei der HIV-1 assoziierten vakuolären Myelopathie HIV-1 infizierte Makrophagen ohne ausgeprägte perivaskuläre Infiltrate. Die seltenere HIV-1 Enzephalomyelitis zeigt keine anatomische Präferenz für die Lokalisation der neuropathologischen Veränderungen im Rückenmark. Hier finden sich zahlreiche zelluläre Infiltrate mit HIV-1 infizierten Mikrogliazellen bzw. eingewanderten Makrophagen.

5.6.2. Multiple Sklerose

Bei den meisten MS Patienten verläuft die Erkrankung anfangs in Schüben und Remissionen, bei vielen entwickelt sich im späteren Verlauf eine sekundäre

Progredienz. Wenige MS Patienten zeigen bereits von Anfang an einen progredienten Verlauf wie bei HAM/TSP. Die klinischen Symptome der MS resultieren aus disseminierten Läsionen in der weißen Substanz des ZNS, die verschiedene neurofunktionelle Systeme betreffen können (z.B. Nervus opticus, Kleinhirn, Pyramidenbahn, sensibles System etc.). Selten ist das Rückenmark wie bei HAM/TSP überwiegend betroffen.

In neuropathologischen Untersuchungen von MS und HAM/TSP finden sich entsprechende histologische Veränderungen: perivaskuläre Infiltrate, Demyelinisierung und Axonverlust (Lassmann (1998), Iwasaki (1990)). Allerdings wurden die neuropathologischen Veränderungen bei beiden Erkrankungen bisher nicht systematisch verglichen.

Die typischen entzündlichen Liquorveränderungen bei MS und HAM/TSP bestehen aus oligoklonalen IgG-Banden im Liquor, die im Serum nicht gefunden werden (Tabellen 16 und 19). Bei HAM/TSP Patienten stellten sich viel häufiger als bei MS Patienten zusätzliche identische IgG-Banden im Liquor und Serum dar (Puccioni-Sohler (1994)). Bei beiden Erkrankungen sind eindeutige HLA Assoziationen beschrieben, allerdings für verschiedene HLA Klasse II Haplotypen und Allele: bei HAM/TSP für HLA DR1 DQ5 (HLA DRB1*0101) (Usuku et al. (1988), Jeffery et al. (1999)), bei MS für HLA DR15 DQ6 (HLA DRB1*1501) (Compston (1998)). Bei beiden Erkrankungen finden sich Hinweise für eine systemische Immunaktivierung: Bei HAM/TSP ist sie durch die persistierende HTLV-1 Infektion induziert (Ijichi et al. (1993)), während bei der MS eine variierende systemische Immunaktivierung beobachtet wird, die mit den Erkrankungsschüben korreliert (Rieckmann et al. (1994), Rieckmann et al. (1995)).

Bei der MS wurden zahlreiche Myelinproteine als potentielle Autoantigene getestet, wobei zumindest gegen die Proteine MBP und MOG eine häufige humorale und zelluläre Immunantwort nachweisbar ist (Wekerle (1998)). Darüberhinaus findet sich bei der MS eine intrathekale Synthese von Antikörpern gegen verschiedene Viren, am häufigsten gegen Masern-, Rubella- und Varizella-Zoster-Virus (Felgenhauer et al. (1985)). Dieser Nachweis hat diagnostische Relevanz, auch wenn die pathogenetische Bedeutung ungeklärt ist. Eine persistierende Virusinfektion konnte bei der MS bisher nicht reproduzierbar nachgewiesen werden (siehe Übersicht in: Johnson (1998)).

Weitere immunologisch relevante Parallelen von HAM/TSP und MS betreffen die Behandlung und die Assoziationen mit anderen immunopathologischen Erkrankungen. Sowohl für die MS als auch für HAM/TSP ist die Behandlung mit Typ-1 Interferonen etabliert: bei der MS mit Interferon beta (IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993)), bei HAM/TSP mit Interferon alpha (Izumo et al. (1996)). Bei beiden neurologischen Erkrankungen findet sich zusätzlich häufig eine Uveitis, bei HAM/TSP jedoch auch zahlreiche weitere Organmanifestationen der HTLV-1 Infektion (Tabelle 1). Offensichtlich sind MS und HAM/TSP chronisch entzündliche Erkrankungen des ZNS mit unterschiedlicher Ätiologie, im Hinblick auf die Immunpathogenese ergeben sich dennoch zahlreiche Parallelen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Zusammenfassung der immunologischen Besonderheiten von HAM/TSP und MS (Einzelheiten im Text).

Eigenschaft	HAM/TSP	MS
Neuropathologie	perivaskuläre Infiltration, Demyelinisierung, Axonverlust	perivaskuläre Infiltration, Demyelinisierung, Axonverlust
HLA Assoziation	DR1 DQ5 (DRB1*0101)	DR15 DQ6 (DRB1*1501)
Antigene	HTLV-1 Proteine, ZNS Proteine (bisher nicht identifiziert)	Myelinproteine (MBP, MOG etc.), Virusproteine (Masern, Röteln, etc.)
Entzündliche Liquorveränderungen	Oligoklonale IgG-Banden im Liquor und Serum mit zusätzlichen Banden im Liquor	Oligoklonale IgG-Banden im Liquor
Systemische Immunregulation	Aktivierung durch HTLV-1 infizierte T-Zellen	MS Schübe korrelieren mit systemischer Immunaktivierung
Immunmodulatorische Behandlung	Interferon alpha	Interferon beta
Assoziierte immunologische Erkrankungen	Uveitis, Arthropathie, Thyreoiditis, Pneumonie	Uveitis

5.6.3 Immunpathogenetische Mechanismen im ZNS

Für die neuroimmunologische Grundlagenforschung ist es eine Herausforderung, die immunpathologischen Mechanismen der chronisch entzündlichen ZNS Erkrankungen genauer zu charakterisieren. Vergleichbare Befunde bei MS und HAM/TSP (Tabelle 19) werfen zahlreiche Fragen auf, z.B. über die Persistenz entzündlicher Prozesse im ZNS oder die Rolle der CD4+ T-Lymphozyten und ihre Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems und des ZNS. Bisher ist nicht etabliert, welche der genannten immunologischen Besonderheiten für den chronischen Verlauf beider Erkrankungen bedeutsam ist.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß die spezifische humorale Immunreaktion bei HAM/TSP eine Vielfalt von Reaktivitäten aufweist und daß es sich dennoch nicht um eine polyklonale B-Zell Aktivierung handelt. Der Nachweis von CD4+ T-Lymphozyten, die die entsprechenden HTLV-1 Antigene im nanomolaren Konzentrationsbereich erkannten, führte zu dem Modell einer T-Zell / B-Zell Kooperation (Abbildung 19), die auch bei niedrigsten Konzentrationen des Antigens eine Immunantwort aufrechterhalten kann. In dieser Situation ist die Herkunft des Antigens, ob virus-kodiert oder zell-kodiert oder kreuzreagierend, unbedeutend. Bei der MS könnte eine vergleichbare Konstellation vorliegen (Wucherpfennig et al. (1997)).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Retrovirus HTLV-1 induziert eine Myelitis, die HAM/TSP genannt wird. Bei dieser chronisch entzündlichen Erkrankung des ZNS infiltrieren HTLV-1 infizierte CD4+ T-Lymphozyten das Rückenmark und exprimieren retrovirale Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei HTLV-1 infizierten Patienten die Spezifität der systemischen und intrathekalen Immunantwort gegen nicht denaturierte HTLV-1 Proteine untersucht. Durch die Anwendung eines Zell EIA in Kombination mit einem RIPA konnte gezeigt werden, daß bei HAM/TSP Patienten eine intrathekale Synthese gegen mehrere HTLV-1 kodierte Proteine vorliegt.

An HTLV-1 Infizierten mit und ohne HAM/TSP aus SüdJapan wurde die Feinspezifität der antiviralen IgG-Antikörpersynthese analysiert. Hier zeigte sich, daß das Auftreten der Erkrankung bei Virusträgern mit dem Nachweis multipler Antikörperspezifitäten korrelierte, d.h. erkrankte Individuen bildeten Antikörper gegen mehrere lineare B-Zell Epitope. Bei 16 ausgewählten synthetischen Peptiden, die immundominante Epitopen von HTLV-1 gag und env entsprechen, zeigten HAM/TSP Patienten eine intrathekale Antikörpersynthese gegen durchschnittlich 3,6 Peptide, während nicht erkrankte HTLV-1 seropositive Individuen gegen 0,3 Peptide reagierten. Antikörperspezifitäten gegen ein einzelnes Epitop der HTLV-1 env oder gag Proteine waren nicht mit dem Auftreten der Erkrankung korreliert, sondern die Vielzahl der Spezifitäten. In einzelnen Fällen konnten sehr hohe Antikörperkonzentrationen gegen immundominante lineare B-Zell Epitope im Liquor gemessen werden, die auf eine besonders hohe Menge intrathekal synthetisierter Antikörper dieser Spezifität hinwiesen, z.B gegen Epitope des retroviralen HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21. Auch die Analyse der Feinspezifität von IgG-Antikörpern gegen immundominante HTLV-1 tax und rex Sequenzen ergab kein einzelnes B-Zell Epitop, das bei allen HAM/TSP Patienten gefunden wurde.

Es galt für HTLV-1 Infizierte mit und ohne HAM/TSP, daß die intrathekal gebildeten Antikörperspezifitäten eine Teilmenge der im Serum nachgewiesenen Spezifitäten darstellten. Die HAM/TSP Patienten wiesen allerdings ein deutlich größeres Spektrum der Antikörperspezifitäten auf, sowohl systemisch als auch intrathekal. Bei dem Vergleich von intrathekalen Synthese und den Serumkonzentrationen von IgG-Antikörpern gegen einzelne immundominante Peptide zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Quantität der Serumantikörper und dem Nachweis der intrathekalen Synthese nur bei 2 immu-

dominanten B-Zell Epitopen des HTLV-1 gp21, nicht aber bei 14 anderen untersuchten B-Zell Epitopen.

Patienten mit sogenannten HAM/TSP assoziierten HLA Haplotypen wiesen eine humorale Immunantwort gegen eine größere Anzahl von B-Zell Epitopen auf als HAM/TSP Patienten ohne diese definierten HLA Haplotypen. Signifikante Unterschiede fanden sich jedoch nicht bei dem Vergleich von HAM/TSP Patienten mit und ohne HLA DR1.

Erstmals wurden HTLV-1 env gp21 spezifische, HLA DR1 restringierte CD4+ T-Zell Lymphozyten isoliert und charakterisiert. Die immundominanten CD4+ T-Zell Linien erkannten konservierte Sequenzen des HTLV-1 Transmembranglykoproteins gp21 und konnten durch Antigenkonzentrationen im nanomolaren Bereich aktiviert werden.

Im Hinblick auf die Immunpathogenese von HAM/TSP zeigten die eigenen Daten, daß sowohl die B-Zell als auch die T-Zell Immunantwort gegen mehrere Epitope gerichtet und daß die oligoklonale B-Zell Aktivierung mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert ist. CD4+ T-Zell Epitope des HTLV-1 gp21 wurden identifiziert, die im Vergleich zu den B-Zell Epitopen überlappende oder benachbarte Sequenzen darstellten. Aufgrund dieser Befunde wurde ein Modell der T-Zell / B-Zell Kooperation zur Aktivierung des Immunsystems bei niedrigen Antigenkonzentrationen vorgeschlagen, um die Persistenz der Immunantwort im ZNS im Verlauf von HAM/TSP zu erklären. Vergleichbare immunpathologische Mechanismen können auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS erwogen werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cellular and molecular immunology. 2. Auflage; W.B.Saunders Company, Philadelphia 1994

Ackermann R, Nekic M, Jürgens R (1986): Locally synthesized antibodies in cerebrospinal fluid of patients with AIDS. J Neurol 233, 140 - 141

Afifi AK, Bergman RA: Functional neuroanatomy. McGraw-Hill, New York 1998

Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Llorente L (1996): Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. Immunol Today 17, 163 - 164

Ali A, Patterson S, Cruickshank K, Rudge P, Dalgleish AG, Knight SC (1993): Dendritic cells infected *in vitro* with human T cell leukemia/lymphoma virus type-1 (HTLV-1); enhanced lymphocytic proliferation and tropical spastic paraparesis. Clin Exp Immunol 94, 32 - 37

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215, 403 - 410

Apple RJ, Erlich HA: HLA class II genes: structure and diversity; in: HLA and MHC. Genes, molecules and function; hrsg. v. Browning M, McMichael A; Bios Scientific Publishers, Oxford 1996, 97 - 112

Arimura K, Arimura Y, Yonenaga Y, Rosales RL, Osame M: Clinical electrophysiological findings in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM); in: HTLV-I and the nervous system. Neurology and Neurobiology, vol. 51; hrsg. v. Roman DC, Vernant JC, Osame M; Alan R.Liss, New York 1989, 245 - 250

Armitage P, Berry G: Statistical methods in medical research. 3. Auflage; Blackwell Scientific Publications, Oxford 1994

Baba E, Nakamura M, Ohkuma K, Kira J, Tanaka Y, Nakano S, Niho Y (1995): A peptide-based human T cell leukemia virus type I vaccine containing T and B cell epitopes that induces high titers of neutralizing antibodies. J Immunol 154, 399 - 412

Bachmann MF, Zinkernagel RM (1996): The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. Immunol Today 17, 553 - 558

Battegay M, Kyburz D, Hengartner H, Zinkernagel RM (1993): Enhancement of disease by neutralizing antiviral antibodies in the absence of primed antiviral cytotoxic T cells. Eur J Immunol 23, 3236 - 3241

Bellone M, Karachunski PI, Ostlie N, Lei S, Conti-Tronconi BM (1994): Preferential pairing of T and B cells for production of antibodies without covalent association of T and B epitopes. Eur J Immunol 24, 799 - 804

Berlioz Torrent C, Shacklett BL, Erdtmann L, Delamarre L, Bouchaert I, Sonigo P, Dokhelar MC, Benarous R (1999): Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol* 73, 1350 - 1361

Björck L, Kronvall G (1984): Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* 133, 969 - 974

Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 1991; in: HLA 1991 - Proceedings of the eleventh international Histocompatibility Workshop and Conference; hrsg. v. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T; Oxford University Press, Oxford 1992, 17 - 31

Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (1999): Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Vox Sang* 77, 164 - 191

Brady JN: Biology of HTLV-I: host cell interactions; in: Human T-cell lymphotropic virus type I; hrsg. v. Höllsberg P, Hafler DA; Wiley, Chichester 1996, 79 - 112

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33 - 39

Cann AJ: Principles of virology. 2. Auflage; Academic Press, San Diego 1997

Carrington CVF, Schulz TF: Virology of HTLV-I infection; in: Human T-cell lymphotropic virus type I; hrsg. v. Höllsberg P, Hafler DA; Wiley, Chichester 1996, 113 - 139

Carson RT, Vignali KM, Woodland DL, Vignali DA (1997): T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity* 7, 387 - 399

Celada F, Sercarz EE (1988): Preferential pairing of T-B specificities in the same antigen: the concept of directional help. *Vaccine* 6, 94 - 98

Ceroni M, Piccardo P, Rodgers Johnson P, Mora C, Asher DM, Gajdusek DC, Gibbs Jr CJ (1988): Intrathecal synthesis of IgG antibodies to HTLV-I supports an etiological role for HTLV-I in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol* 23, S188 - S191

Chen YA, Lee T, Samuel KP, Okayama A, Tachibana N, Miyoshi I, Papas TS, Essex M (1989): Antibody reactivity to different regions of human T-cell leukemia virus type 1 gp61 in infected people. *J Virol* 63, 4952 - 4957

Chen YM, Gomez Lucia E, Okayama A, Tachibana N, Lee TH, Mueller N, Essex M (1990): Antibody profile of early HTLV-I infection. *Lancet* 1990, II, 1214 - 1216

Coffin JM, Essex M, Gallo R, Graf TM, Hinuma Y, Hunter E, Jaenisch R, Nusse R, Oroszlan S, Svoboda J, Teich N, Toyoshima K, Varmus H: Family Retroviridae; in: *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; hrsg. v. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD; Arch Virol Suppl 10; Springer-Verlag, Wien 1995*, 193 - 204

Compston A: Genetic susceptibility to multiple sclerosis; in: *McAlpine's Multiple Sclerosis, 3. Auflage; hrsg. v. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H; Churchill Livingstone, London 1998*, 101 - 142

Conrad AJ, Chiang EY, Andeen LE, Avolio C, Walker SM, Baumhefner RW, Mirzayan R, Tourtellotte WW (1994): Quantitation of intrathecal measles virus IgG antibody synthesis rate: Subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 54, 99 - 108

Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K (1995a): Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 182, 1591 - 1596

Constant S, Schweitzer N, West J, Ranney P, Bottomly K (1995b): B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens *in vivo*. *J Immunol* 155, 3734 - 3741

Constantine NT, Callahan JD, Watts DM: *Retroviral testing: essentials for quality control and laboratory diagnosis. CRC Press, Boca Raton 1992*

Daenke S, Kermode AG, Hall SE, Taylor G, Weber J, Nightingale S, Bangham CRM (1996): High activated and memory cytotoxic T-cell responses to HTLV-1 in healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis. *Virology* 217, 139 - 146

Dal Pan GJ, Glass JD, McArthur JC (1994): Clinicopathologic correlations of HIV-1-associated vacuolar myelopathy: an autopsy-based case-control study. *Neurology* 44, 2159 - 2164

Davidson HW, Watts C (1989): Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes. *J Cell Biol* 109, 85 - 92

Davis L, Kuehl M, Battey J: *Basic methods in molecular biology. 2. Auflage; Appleton & Lange, East Norwalk/Connecticut 1994*

Delamarre L, Rosenberg AR, Pique C, Pham D, Callebaut I, Dokhelar MC (1996): The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13, S85 - S91

Delwart EL, Mosialos G, Gilmore T (1990): Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6, 703 - 706

Derse D, Shuh M, Hill S: Examining HTLV-1 gene function and expression with molecularly cloned proviruses; in: Molecular pathogenesis of HTLV-1. A current perspective; hrsg. v. Semmes OJ, Hammarskjöld ML; ABI Professional Publications, Arlington/Virginia 1999, 123 - 130

Desgranges C, Souche S, Vernant JC, Smadja D, Vahne A, Horal P (1994): Identification of novel neutralization-inducing regions of the human T cell lymphotropic virus type I envelope glycoproteins with human HTLV-I-seropositive sera. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 163 - 173

DeSmet KAL, Vordermeier HM, Ivanyi J (1994): A versatile system for the production of recombinant chimeric peptides. *J Immunol Methods* 177, 243 - 250

Dhib Jalbut S, Hoffman PM, Yamabe T, Sun D, Xia J, Eisenberg H, Bergey G, Ruscetti FW (1994): Extracellular human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein induces cytokine production in adult human microglial cells. *Ann Neurol* 36, 787 - 790

Doolittle RF, Feng DF, McClure MA, Johnson MS (1990): Retrovirus phylogeny and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol* 157, 1 - 18

Duus P: Neurologisch-topische Diagnostik: Anatomie, Physiologie, Klinik. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1983

Eilbott DJ, Peress N, Burger H, LaNeve D, Orenstein J, Gendelman HE, Seidman R, Weiser B (1989): Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3337 - 3341

Eiraku N, Hingorani R, Ijichi S, Machigashira K, Gregersen PK, Monteiro J, Usuku K, Yashiki S, Sonoda S, Osame M, Hall WW (1998): Clonal expansion within CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in human T lymphotropic virus type I-Infected individuals. *J Immunol* 161, 6674 - 6680

Ellerbrok H, Fleischer C, Salemi M, Reinhardt P, Ludwig WD, Vandamme AM, Pauli G (1998): Sequence analysis of the first HTLV-I infection in Germany without relations to endemic areas. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 1199 - 1203

Elovaara I, Koenig S, Brewah AY, Woods RM, Lehky T, Jacobson S (1993): High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med* 177, 1567 - 1573

Feldkamp CS, Smith SW: Practical guide to immunoassay method evaluation; in: Immunoassay - A practical guide; hrsg. v. Chan DW, Perlstein MT; Academic Press, San Diego 1987, 49 - 95

Felgenhauer K (1982): Differentiation of the humoral immune response in inflammatory diseases of the central nervous system. *J Neurol* 228, 223 - 237

Felgenhauer K, Reiber H (1992): The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig* 70, 28 - 37

Felgenhauer K, Schliep G, Rapic N (1976): Evaluation of the blood-CSF barrier by protein gradients and the humoral immune response within the central nervous system. *J Neurol Sci* 30, 113 - 128

Felgenhauer K, Schädlich HJ, Nekic M, Ackermann R (1985): Cerebrospinal fluid virus antibodies. A diagnostic indicator for multiple sclerosis? *J Neurol Sci* 71, 291 - 299

Fleischer C, Kücherer C, Michel P, Weise W, Stahl-Hennig C, Bodemer W, Hunsmann G, Pauli G (1999): Detection of rare cases of HTLV-I and -II infections and high numbers of HTLV-seroindeterminate results in Bavarian blood donors. *Infusionsther Transfusionsmed* 26, 328 - 334

Fournier P, Ammerlaan W, Ziegler D, Giminez C, Roubardin-Combe C, Fleckenstein BT, Wiesmuller KH, Jung G, Schneider F, Muller CP (1996): Differential activation of T cells by antibody-modulated processing of the flanking sequences of class II-restricted peptides. *Int Immunol* 8, 1441 - 1451

Freeman GJ, Lombard DB, Gimmi CD, Brod SA, Lee K, Laning JC, Hafler DA, Dorf ME, Gray GS, Reiser H, June CH, Thompson CB, Nadler LM (1992): CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J Immunol* 149, 3795 - 3801

Fujiyoshi T, Yashiki S, Fujiyama C, Kuwayama M, Miyashita H, Ohnishi H, Blank M, Zaninovic V, Blank A, Cartier L, Byrnes JJ, Harrington WJ, Miura T, Hayami M, Tajima K, Sonoda S (1995): Ethnic segregation of HTLV-I and HTLV-II carriers among South American native Indians. *Int J Cancer* 63, 510 - 515

Furukawa Y, Fujisawa J, Osame M, Toita M, Sonoda S, Kubota R, Ijichi S, Yoshida M (1992): Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood* 80, 1012 - 1016

Furukawa Y, Okadome T, Tara M, Niina K, Izumo S, Osame M (1995): Human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis with acute type of adult T-cell leukemia. *Intern Med* 34, 1130 - 1133

Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC (1989): A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5, 431 - 440

Gazzolo L, Riou P, Hamaia S, Casse H, Duc Dodon M: Involvement of Tax and Rex proteins in HTLV-1 pathogenesis; in: *Molecular pathogenesis of HTLV-1. A current perspective*; hrsg. v. Semmes OJ, Hammar skjöld ML; ABI Professional Publications, Arlington/Virginia 1999, 91 - 101

Gessain A, Gout O (1992): Chronic Myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med* 117, 933 - 946

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G (1985): Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985, II, 407 - 410

Gessain A, Caudie C, Gout O, Vernant JC, Maurs L, Giordano C, Malone G, Tournier-Lasserre E, Essex M, de The G (1988): Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 157, 1226 - 1234

Gessain A, Yanagihara R, Franchini G, Garruto RM, Jenkins CL, Ajdukiewicz AB, Gallo RC, Gajdusek DC (1991): Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7694 - 7698

Glantz SA: Biostatistik - EinFach für die Praxis. McGraw-Hill International Ltd., London 1998

Gonnet GH: New algorithms for the computation of evolutionary phylogenetic trees; in: *Computational Methods in Genome Research*; hrsg. v. Suhai S; Plenum Press, New York 1994, 153 - 161

Gonnet GH, Cohen MA, Benner SA (1992): Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256, 1443 - 1445

Goudreau G, Carpenter S, Beaulieu N, Jolicoeur P (1996): Vacuolar myelopathy in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins under the regulation of the myelin basic protein gene promoter. *Nat Med* 2, 655 - 661

Grafe MR, Wiley CA (1989): Spinal cord and peripheral nerve pathology in AIDS: the roles of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus. *Ann Neurol* 25, 561 - 566

Graham CM, Barnett BC, Hartlmayr I, Burt DS, Faulkes R, Skehel JJ, Thomas DB (1989): The structural requirements for class II (I-A^d)-restricted T cell recognition of influenza hemagglutinine: B cell epitopes define T cell epitopes. *Eur J Immunol* 19, 523 - 528

Grassmann R, Haller K, Rosin O, Ruckes T, Schmitt I, Semmes OJ, Jeang KT: Stimulation of the G1 to S-phase transition and T-cell proliferation by the tax protein of HTLV-1; in: *Molecular pathogenesis of HTLV-1. A current perspective*; hrsg. v. Semmes OJ, Hammar skjöld ML; ABI Professional Publications, Arlington/Virginia 1999, 37 - 41

Grimaldi LME, Roos RP, Devare SG, Casey JM, Maruo Y, Hamada T, Tashiro K (1988): HTLV-I associated myelopathy: oligoclonal immunoglobulin G bands contain anti-HTLV-I p24 antibody. *Ann Neurol* 24, 727 - 731

Hadlock KG, Rowe J, Fong SK (1999): The humoral immune response to human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope glycoprotein gp46 is directed primarily against conformational epitopes. *J Virol* 73, 1205 - 1212

Hall FC, Bowness P: HLA and disease: from molecular function to disease association; in: HLA and MHC: genes, molecules and function; hrsg. v. Browning M, McMichael A; Bios Scientific Publishers, Oxford 1996, 353 - 381

Haller OA, Mertens T: Diagnostik und Therapie von Viruserkrankungen. Urban & Fischer Verlag, München 1999

Hammer J, Nagy ZA, Sinigaglia F (1994): Rules governing peptide-class II MHC molecule interactions. *Behring Inst Mitt* 94, 124 - 132

Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR (2000): Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95, 1386 - 1392

Hara H, Morita M, Iwaki T, Hatae T, Itoyama Y, Kitamoto T, Akizuki S, Goto I, Watanabe T (1994): Detection of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA and analysis of T cell receptor V beta CDR3 sequences in spinal cord lesions of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Exp Med* 180, 831 - 839

Haraguchi S, Good RA, Day NK (1995a): Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today* 16, 595 - 603

Haraguchi S, Good RA, James-Yarish M, Cianciolo GJ, Day NK (1995b): Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3611 - 3615

Harper DR: *Molecular Virology*. 2. Auflage; Bios Scientific Publishers, Oxford 1998

Hashimoto K, Higuchi I, Osame M, Izumo S (1998): Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. *J Neurol Sci* 159, 67 - 72

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE (1992): Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II-seropositive individuals. *J Clin Microbiol* 30, 1605 - 1607

Henin D, Smith TW, De Girolami U, Sughayer M, Hauw JJ (1992): Neuro-pathology of the spinal cord in the acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol* 23, 1106 - 1114

Henry C, Marbrook J, Vann DC, Kodlin D, Wofsy C: Limiting dilution analysis; in: *Selected methods in cellular immunology*; hrsg. v. Mishell BB, Shiigi SM; W.H. Freeman and Company, San Francisco 1980, 138 - 152

Hino S: Maternal-infant transmission of HTLV-I: implication for disease; in: *Human retrovirology: HTLV*; hrsg. v. Blattner WA; Raven Press, New York 1990, 363 - 375

- Hoellsberg P (1999): Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 308 - 333
- Hoellsberg P, Hafler DA (1995): What is the pathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis ? *Ann Neurol* 37, 143 - 145
- Hoellsberg P, Wucherpfennig KW, Ausubel LJ, Calvo V, Bierer BE, Hafler DA (1992): Characterization of HTLV-I *in vivo* infected T cell clones . Il-2-independent growth of nontransformed T cells. *J Immunol* 148, 3256 - 3263
- Hoffman PM, Dhib-Jalbut S, Mikovits JA, Robbins DS, Wolf AL, Bergey GK, Lohrey NC, Weislow OS, Ruscetti FW (1992): Human T-cell leukemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. *Proc Natl Acad USA* 89, 11784 - 11788
- Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA (1992): RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176, 1 - 20
- Holm S (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6, 65 - 70
- Hunter E, Swanstrom R (1990): Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 157, 187 - 254
- Ida H, Kurata A, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Fukuda T, Nakamura T, Kusumoto Y, Berzofsky JA, Nagataki S (1991): Different B-cell responses to human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) envelope synthetic peptides in HTLV-I-infected individuals. *J Clin Immunol* 11, 143 - 151
- IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1995): Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 45, 1277 - 1285
- Ijichi S, Osame M (1995): Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): recent perspectives. *Intern Med* 34, 713 - 721
- Ijichi S, Izumo S, Eiraku N, Machigashira K, Kubota R, Nagai M, Ikegami N, Kashio N, Umehara F, Maruyama I, Osame M (1993): An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. *Med hypotheses* 41, 542 - 547
- Inoue Y, Kuroda N, Shiraki H, Sato H, Maeda Y (1992): Neutralizing activity of human antibodies against the structural protein of human T-cell lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 52, 877 - 880
- Iwasaki Y (1990): Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP). *J Neurol Sci* 96, 103 - 123
- Izumo S, Goto I, Itoyama Y, Okajima T, Watanabe S, Kuroda Y, Araki S, Mori M, Nagataki S, Matsukura S, Akamine T, Nakagawa M, Yamamoto I, Osame M (1996): Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multi-center, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46, 1016 - 1021

Jacobson S, Gupta A, Mattson D, Mingioli E, McFarlin DE (1990 a): Immunological studies in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol* 27, 149 - 156

Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci A, Koenig S (1990 b): Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348, 245 - 248

Jacobson S, Reuben JS, Streilein RD, Palker TJ (1991): Induction of CD4+ , human T lymphotropic virus type-1-specific cytotoxic T lymphocytes from patients with HAM/TSP. Recognition of an immunogenic region of the gp46 envelope glycoprotein of human T lymphotropic virus type-1. *J Immunol* 146, 1155 - 1162

Jacobson S, Krichavsky M, Flerlage N, Levin M (1997): Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: massive latent HTLV-I infection in bone marrow of HAM/TSP patients. *Leukemia* 11 Suppl 3, 73 - 75

Janeway CA, Travers P: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995

Jeffery KJM, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CRM (1999): HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3848 - 3853

Jinno A, Haraguchi Y, Shiraki H, Hoshino H (1999): Inhibition of cell-free human T-cell leukemia virus type 1 infection at a postbinding step by the synthetic peptide derived from an ectodomain of the gp21 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 73, 9683 - 9689

Johnson RT: *Viral infections of the nervous system*. 2. Auflage; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1998

Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K (1986): Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis* 154, 851 - 857

Kannagi M, Shida H, Igarashi H, Kuruma K, Murai H, Aono Y, Maruyama I, Osame M, Hattori T, Inoko H, Harada S (1992): Target epitope in the Tax protein of human T-cell leukemia virus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells. *J Virol* 66, 2928 - 2933

Kannagi M, Matsushita S, Shida H, Harada S (1994): Cytotoxic T cell response and expression of the target antigen in HTLV-I infection. *Leukemia* 8 Suppl 1, S54 - S59

Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS (1990): The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 3, 1096 - 1101

Kazanji M, Ureta-Vidal A, Ozden S, Tangy F, de Thoisy B, Fiette L, Talarmin A, Gessain A, de The G (2000): Lymphoid organs as a major reservoir for human T-cell leukemia virus type 1 in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): provirus expression, persistence, and humoral and cellular immune responses. *J Virol* 74, 4860 - 4867

Keating JN, Trimble KC, Mulcahy F, Scott JM, Weir DG (1991): Evidence of brain methyltransferase inhibition and early brain involvement in HIV-positive patients. *Lancet* 337, 935 - 939

Kinoshita T, Shimoyama M, Tobinai K, Ito M, Ito S, Ikeda S, Tajima K, Shimotohno K, Sugimura T (1989): Detection of mRNA for the tax1/rex1 gene of human T-cell leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5620 - 5624

Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Tateishi J, Akizuki S, Kishikawa M, Baba E, Nakamura M, Suzuki J, Nakamura T, Nakamura N, Yamamoto N, Goto I (1994): Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol* 36, 149 - 156

Kissmeyer NF, Svejgaard A, Hauge M (1969): The HL-A system defined with lymphocytotoxic and platelet antibodies in relation to kidney transplantation. *Transplant Proc* 1, 357 - 361

Kitze B, Brady JN (1997): Human T cell lymphotropic retroviruses: association with diseases of the nervous system. *Intervirology* 40, 132 - 142

Kitze B, Pette M, Rohrbach E, Städt D, Kappos L, Wekerle H (1988): Myelin specific T-lymphocytes in multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Neuroimmunol* 20, 237

Kitze B, Turner RW, Burchhardt M, Poser S, Hunsmann G, Weber T (1992): Differential diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy and multiple sclerosis in Iranian patients. *Clin Investig* 70, 1013 - 1018

Kitze B, Puccioni-Sohler M, Schäffner J, Rieckmann P, Weber T, Felgenhauer K, Bodemer W (1995): Specificity of intrathecal IgG synthesis for HTLV-1 core and envelope proteins in HAM/TSP. *Acta Neurol Scand* 92, 213 - 217

Kitze B, Usuku K, Izumo S, Nakamura M, Shiraki H, Ijichi S, Yashiki S, Fujiyoshi T, Sonoda S, Osame M (1996 a): Diversity of intrathecal antibody synthesis against HTLV-I and its relation to HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol* 243, 393 - 400

Kitze B, Usuku K, Yashiki S, Ijichi S, Fujiyoshi T, Nakamura M, Izumo S, Osame M, Sonoda S (1996 b): Intrathecal humoral immune response in HAM/TSP in relation to HLA haplotype analysis. *Acta Neurol Scand* 94, 87 - 93

Kitze B, Usuku K, Yamano Y, Yashiki S, Nakamura M, Fujiyoshi T, Izumo S, Osame M, Sonoda S (1998): Human CD4+ T lymphocytes recognize a highly conserved epitope of HTLV-1 env gp21 restricted by HLA DRB1*0101. *Clin Exp Immunol* 111, 278 - 285

Kobe B, Center RJ, Kemp BE, Pountourios P (1999): Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4319 - 4324

Komurian F, Pelloquin F, de The G (1991): *In vivo* genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J Virol* 65, 3770 - 3778

Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, Sandberg Wollheim M, Sheremata W A, Robert Guroff M, Saxinger CW, Feinberg MB, Wong Staal F, Gallo RC (1985): Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* 318, 154 - 160

Koralnik IJ: Structure of HTLV-I; in: Human T-cell lymphotropic virus type I; hrsg. v. Höllsberg P, Hafler DA; Wiley, Chichester 1996, 65 - 78

Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N (1993): *In vivo* infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25 - 33

Kubota R, Fujiyoshi T, Izumo S, Yashiki S, Maruyama I, Osame M, Sonoda S (1993): Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 42, 147 - 154

Kubota R, Umehara F, Izumo S, Ijichi S, Matsumuro K, Yashiki S, Fujiyoshi T, Sonoda S, Osame M (1994): HTLV-I proviral DNA amount correlates with infiltrating CD4+ lymphocytes in the spinal cord from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 53, 23 - 29

Kuroki M, Nakamura M, Itoyama Y, Tanaka Y, Shiraki H, Baba E, Esaki T, Tatsumoto T, Nagafuchi S, Nakano S, Niho Y (1992): Identification of new epitopes recognized by human monoclonal antibodies with neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities specific for human T cell leukemia virus type 1. *J Immunol* 149, 940 - 948

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685

Lal RB, Heneine W: Testing of human T-lymphotropic virus types I and II: serologic, virologic and molecular detection; in: Human T-cell lymphotropic virus type I; hrsg. v. Höllsberg P, Hafler DA . Wiley, Chichester 1996, 167 - 195

Lal RB, Giam C, Coligan JE, Rudolph DL (1994): Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *J Infect Dis* 169, 496 - 503

Lanzavecchia A (1985): Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314, 537 - 539

Lassmann H: Pathology of multiple sclerosis; in: McAlpine's Multiple Sclerosis, 3. Auflage; hrsg. v. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H; Churchill Livingstone, London 1998, 323 - 358

Lehky TJ, Fox CH, Koenig S, Levin MC, Flerlage N, Izumo S, Sato E, Raine CS, Osame M, Jacobson S (1995): Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann Neurol* 37, 167 - 175

Lehky TJ, Flerlage N, Katz D, Houff S, Hall WH, Ishii K, Monken C, Dhib-Jalbut S, McFarland HF, Jacobson S (1996): Human T-cell lymphotropic virus type II-associated myelopathy: clinical and immunological profiles. *Ann Neurol* 40, 714 - 723

Lehky TJ, Levin MC, Kubota R, Bamford N, Flerlage AN, Soldan SS, Leist TP, Xavier A, White JD, Brown M, Fleisher TA, Top LE, Light S, McFarland HF, Waldman TA, Jacobson S (1998): Reduction in HTLV-I proviral load and spontaneous lymphoproliferation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients treated with humanized anti-Tac. *Ann Neurol* 44, 942 - 947

Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE (1992): Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155 - 157

Levin MC, Lehky TJ, Flerlage AN, Katz D, Kingma DW, Jaffe ES, Heiss JD, Patronas N, McFarland HF, Jacobson S (1997): Immunologic analysis of a spinal cord-biopsy specimen from a patient with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurological disease. *N Engl J Med* 336, 839 - 845

Levin MC, Krichavsky M, Berk J, Foley S, Rosenfeld M, Dalmau J, Chang G, Posner JB, Jacobson S (1998): Neuronal molecular mimicry in immune-mediated neurologic disease. *Ann Neurol* 44, 87 - 98

Lewin B: *Genes*. Oxford University Press, Oxford 1994

Link H, Cruz M, Gessain A, Gout O, de The G, Kam Hansen S (1989): Chronic progressive myelopathy associated with HTLV-I: oligoclonal IgG and anti-HTLV-I IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum. *Neurology* 39, 1566 - 1572

Luer W, Poser S, Weber T, Jurgens S, Eichenlaub D, Pohle HD, Felgenhauer K (1988): Chronic HIV encephalitis - I. Cerebrospinal fluid diagnosis. *Klin Wochenschr* 66, 21 - 25

Manca F, Fenoglio D, Kunkl A, Cambiaggi C, Sasso M, Celada F (1988): Differential activation of T cell clones stimulated by macrophages exposed to antigen complexed with monoclonal antibodies. A possible influence of paratope specificity on the mode of antigen processing. *J Immunol* 140, 2893 - 2898

Manns A, Murphy EL, Wilks R, Haynes G, Figueroa JP, Hanchard B, Barnett M, Drummond J, Waters D, Cerney M, Seals JR, Alexander SS, Lee H, Blattner WA (1991): Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. *Blood* 77, 896 - 905

- Manns A, Hanchard B, Morgan OS, Wilks R, Cranston B, Nam JM, Blank M, Kuwayama M, Yashiki S, Fujiyoshi T, Blattner W, Sonoda S (1998): Human leukocyte antigen class II alleles associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection and adult T-cell leukemia/lymphoma in a Black population. *J Natl Cancer Inst* 90, 617-622
- Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R (1994): CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68, 8056 - 8063
- Matsuoka E, Takenouchi T, Hashimoto K, Kashio N, Moritoyo T, Higuchi I, Isashiki Y, Sato E, Osame M, Izumo S (1998): Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy tropical spastic paraparesis: double staining of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. *Acta Neuropathol* 96, 340 - 346
- Matsuoka E, Usuku K, Jonosono M, Takenouchi N, Izumo S, Osame M (2000): CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *J Neuroimmunol* 102, 1 - 7
- Matthews MH, Markowitz R, Dynan WS (1992): *In vitro* activation of transcription by the human T-cell leukemia virus type I tax protein. *Mol Cell Biol* 12, 1986 - 1996
- McLean BN, Rudge P, Thompson EJ (1989): Viral specific IgG and IgM antibodies in the CSF of patients with tropical spastic paraparesis. *J Neurol* 236, 351 - 352
- Melchers F, Andersson J (1984): B cell activation: Three steps and their variations. *Cell* 37, 715 - 720
- Miyoshi I: Biology of human T-cell leukemia virus (HTLV) infection; in: *The human retroviruses*; hrsg. v. Gallo RC, Jay G; Academic Press, San Diego 1991, 109 - 125
- Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y (1981): Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294, 770 - 771
- Miyoshi I, Taguchi H, Kubonishi I, Yoshimoto S, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Akagi T (1982): Type C virus-producing cell lines derived from adult T cell leukemia. *Gann Monogr Cancer Res* 28, 219 - 228
- Montgomery RD, Cruikshank EK, Robertson WB, McMenemey WH (1964): Clinical and pathological observations in Jamaican neuropathy. A report of 206 cases. *Brain* 87, 425 - 462
- Morgan OS, Rodgers Johnson P, Mora C, Char G (1989): HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 1989, II: 1184 - 1187
- Moritoyo T, Reinhart TA, Moritoyo H, Sato E, Izumo S, Osame M, Haase AT (1996): Human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy and tax gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Ann Neurol* 40, 84 - 90

Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, Tanaka Y, Kiyomatsu Y, Nagai M, Usuku K, Sorimachi M, Osame M (1999): Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 5, 241 - 248

Moudgil KD, Sercarz EE, Grewal IS (1998): Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. *Immunol Today* 19, 217 - 220

Muller CP, Handtmann D, Brons NH, Weinmann M, Wiesmuller KH, Spahn G, Wiesneth M, Schneider F, Jung G (1993): Analysis of antibody response to the measles virus using synthetic peptides of the fusion protein. Evidence of non-random pairing of T and B cell epitopes. *Virus Res* 30, 271 - 280

Muller CP, Ammerlaan W, Fleckenstein B, Krauss S, Kalbacher H, Schneider F, Jung G, Wiesmuller KH (1996): Activation of T cells by the ragged tail of MHC class II-presented peptides of the measles virus fusion protein. *Int Immunol* 8, 445 - 456

Nagai M, Yashiki S, Fujiyoshi T, Fujiyama C, Kitze B, Izumo S, Osame M, Sonoda S (1996): Characterization of a unique T-cell clone established from a patient with HAM/TSP which recognized HTLV-I-infected T-cell antigens as well as spinal cord tissue antigens. *J Neuroimmunol* 65, 97 - 105

Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CRM, Izumo S, Osame M (1998): Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* 4, 586 - 593

Nagashima K, Yoshida M, Seiki M (1986): A single species of pX mRNA of HTLV-I encodes trans-activator p40X and two other phosphoproteins. *J Virol* 60, 394 - 399

Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, Kubota H, Arimura K, Kawabata M, Osame M (1995): HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* 1, 50 - 61

Nakamura M, Kuroki M, Kira J, Itoyama Y, Shiraki H, Kuroda N, Washitani Y, Nakano S, Nagafuchi S, Anzai K, Tatsumoto T, Esaki T, Maeda Y, Niho Y (1991): Elevated antibodies to synthetic peptides of HTLV-I envelope transmembrane glycoproteins in patients with HAM/TSP. *J Neuroimmunol* 35, 167 - 177

Nakamura M, Itoyama Y, Kuroki M, Nakano S, Kondoh S, Nagafuchi S, Kira J, Ichinose I, Mitsugi K, Anzai K, Mori H, Fukui M, Okamura S, Niho Y (1992): Increase of peripheral B lymphocytes committed to the production of monoreactive and high affinity antibodies to HTLV-1 in patients with HAM/TSP. *J Neuroimmunol* 37, 35 - 45

Neumann B, Ritter K, Felgenhauer K (1990): Fine specificities of antibodies in sera and cerebrospinal fluid in herpes virus infections of the central nervous system as detected by the antigen variable immunoblot technique. *J Neuroimmunol* 28, 111 - 118

Niewiesk S, Daenke S, Parker CE, Taylor G, Weber J, Nightingale S, Bangham CRM (1994): The transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I is more variable within and between healthy carriers than patients with tropical spastic paraparesis. *J Virol* 68, 6778 - 6781

Niewiesk S, Daenke S, Parker CE, Taylor G, Weber J, Nightingale S, Bangham CRM (1995): Naturally occurring variants of human T-cell leukemia virus type I tax protein impair its recognition by cytotoxic T lymphocytes and the transactivation function of tax. *J Virol* 69, 2649 - 2653

Nishimura M, McFarlin DE, Jacobson S (1993): Sequence comparisons of HTLV-I from HAM/TSP patients and their asymptomatic spouses. *Neurology* 43, 2621 - 2624

Nishimura M, Kermode AG, Clerici M, Shearer GM, Berzofsky JA, Uchiyama T, Wiktor SZ, Pate E, Maloney B, Manns A, Blattner W, Jacobson S (1994): Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific T cell responses from seronegative and polymerase chain reaction-negative persons exposed to HTLV-I. *J Infect Dis* 170, 334 - 338

Nomoto M, Utatsu Y, Soejima Y, Osame M (1991): Neopterin in cerebrospinal fluid: A useful marker for diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurology* 41, 457

Nowak MA, Bangham CRM (1996): Population dynamics of immune responses to persistent viruses. *Science* 272, 74 - 79

Oger J, Dekaban G (1995): HTLV-I associated myelopathy: a case of viral-induced auto-immunity. *Autoimmunity* 21, 151 - 159

Oldstone MB (1987): Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819 - 820

Osame M: Review of WHO Kagoshima Meeting and Diagnostic Guidelines for HAM/TSP; in: *Human Retrovirology: HTLV*; hrsg. v. Blattner WA; Raven Press, New York 1990, 191 - 197

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M (1986): HTLV-I associated myelopathy. A new clinical entity. *Lancet* 1986, 1, 1031 - 1032

Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Tara M, Igata A (1987): Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia-like cells. *Ann Neurol* 21, 117 - 122

Osame M, Janssen R, Kubota H, Nishitani H, Igata A, Nagataki S, Mori M, Goto I, Shimabukuro H, Khabbaz R, Kaplan J (1990): Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol* 28, 50 - 56

Osame M, Ijichi S, Umehara F, Usuku K, Moritoyo T, Higuchi I, Nakagawa M, Arimura K, Izumo S: Pathological mechanisms of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP); in: *Molecular pathogenesis of HTLV-1. A current perspective*; hrsg. v. Semmes OJ, Hammarskjöld ML; ABI Professional Publications, Arlington/Virginia 1999, 161 - 167

Oxenius A, Zinkernagel RM, Hengartner H (1998): CD4+ T-cell induction and effector functions: a comparison of immunity against soluble antigens and viral infections. *Adv Immunol* 70, 313 - 367

Paine E, Gu R, Ratner L (1994): Structure and expression of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope protein. *Virology* 199, 331 - 338

Pal BK, Mohan S, Nimo R, Gardner MB (1983): Wild mouse retrovirus-induced neurogenic paralysis in laboratory mice. I. Virus replication and expression in central nervous system. *Arch Virol* 77, 239 - 247

Palker TJ, Tanner ME, Searce RM, Streilein RD, Clark ME, Haynes BF (1989): Mapping of immunogenic regions of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) gp46 and gp21 envelope glycoproteins with env-encoded synthetic peptides and a monoclonal antibody to gp46. *J Immunol* 142, 971 - 978

Patarca R, Haseltine WA (1984): Similarities among retrovirus proteins. *Nature* 312, 496

Pette M, Fujita K, Kitz B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, Wekerle H (1990): Myelin basic protein specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 40, 1770 - 1776

Pique C, Pham D, Tursz T, Dokhelar MC (1993): The cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type I envelope can modulate envelope functions in a cell type-dependent manner. *J Virol* 67, 557 - 561

Pistoia V (1997): Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 18, 343 - 350

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7415 - 7419

Puccioni-Sohler M: Immunologische Liquorparameter bei HTLV-I-assoziiierter Myelopathie. *Med. Diss. Göttingen* 1994

Puccioni-Sohler M, Rios M, Bianco C, Zhu SW, Oliveira C, Novis SA, Pombo de Oliveira MS (1999): An inverse correlation of HTLV-I viral load in CSF and intrathecal synthesis of HTLV-I antibodies in TSP/HAM. *Neurology* 53, 1335 - 1339

Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178 - 228

Reiber H (1994): Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) - a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 122, 189 - 203

Reiber H, Felgenhauer K (1987): Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 163, 319 - 328

Reiber H, Lange P (1991): Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 37, 1153 - 1160

Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C (1998): The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 4, 111 - 117

Reitz Jr MS, Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gallo RC (1981): Characterization and distribution of nucleic acid sequences of a novel type C retrovirus isolated from neoplastic human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 1887 - 1891

Renjifo B, Borrero I, Essex M (1995): Tax mutation associated with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. *J Virol* 69, 2611 - 2615

Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I, Albrecht M, Kitz B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Helwig A, Poser S (1994): Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology* 44, 2367 - 2372

Rieckmann P, Albrecht M, Kitz B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Helwig A, Poser S (1995): Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 37, 82 - 88

Rodgers-Johnson P, Gajdusek DC, Morgan OS, Zaninovic V, Sarin PS, Graham DS (1985): HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985, II, 1247 - 1248

Rosenberg AR, Delamarre L, Pique C, Pham D, Dokhela MC (1997): The ectodomain of the human T-cell leukemia virus type 1 TM glycoprotein is involved in postfusion events. *J Virol* 71, 7180 - 7186

Saarloos MN, Koenig RE, Spear GT (1995): Elevated levels of iC3b and C4d, but not Bb, complement fragments from plasma of persons infected with human T cell leukemia virus (HTLV) with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 172, 1095 - 1097

Sagara Y, Inoue Y, Shiraki H, Jinno A, Hoshino H, Maeda Y (1996): Identification and mapping of functional domains on human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope proteins by using synthetic peptides. *J Virol* 70, 1564 - 1569

Said G, Saimot AG, Tardieu M, Lacroix C: Neurological complications of HIV and AIDS. W.B.Saunders Company, London 1997

Schneider J, Yamamoto N, Hinuma Y, Hunsmann G (1984): Sera from adult T-cell leukemia patients react with envelope and core polypeptides of adult T-cell leukemia virus. *Virology* 132, 1 - 11

Schneider J, Kitze B, Hunsmann G, Wendler I, Kappos L (1987): Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses: negative serological results in 135 German patients. *J Neurol* 235, 102 - 104

Schulz TF, Jameson BA, Lopalco L, Siccardi AG, Weiss RA, Moore JP (1992): Conserved structural features in the interaction between retroviral surface and transmembrane glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 1571 - 1580

Schwarzfischer G, Schatzl H, Backer U, Weise W, von der Helm K, Deinhardt F (1991): HTLV-I antibody screening of blood donors. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 28, 29 - 31

Schwebke J, Calsyn D, Shriver K, Saxon A, Kleyn J, Oluoch Mitchell E, Olmstead L, Fisher LD, Krone M, Ashley R, Stamm W, Swenson P, Holmes KK (1994): Prevalence and epidemiologic correlates of human T cell lymphotropic virus infection among intravenous drug users. *J Infect Dis* 169, 962 - 967

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M (1983): Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 3618 - 3622

Semmes OJ, Jeang KT (1992): HTLV-I Tax is a zinc-binding protein: role of zinc in tax structure and function. *Virology* 188, 754 - 764

Semmes OJ, Jeang KT (1996): Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol* 70, 6347 - 6357

Shepherd EJ, Brettle RP, Liberski PP, Aguzzi A, Ironside JW, Simmonds P, Bell JE (1999): Spinal cord pathology and viral burden in homosexuals and drug users with AIDS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 2 - 10

Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen IS, Miwa M, Sugimura T (1985): Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3101 - 3105

Shinzato O, Kamihira S, Ikeda S, Kondo H, Kanda T, Nagata Y, Nakayama E, Shiku H (1993): Relationship between the anti-HTLV-1 antibody level, the number of abnormal lymphocytes and the viral-genome dose in HTLV-1-infected individuals. *Int J Cancer* 54, 208 - 212

Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C (1995): Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med* 181, 1957 - 1963

- Smith TF, Waterman MS (1981): Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147, 195 - 197
- Snider WD, Simpson DM, Nielsen S, Gold JWM, Metroka CE, Posner JB (1983): Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann Neurol* 14, 403 - 418
- Sonoda S, Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, Tanaka H, Eiraku S, Izumo S, Osame M (1992): Immunogenetic factors involved in the pathogenesis of adult T-cell leukemia and HTLV-I-associated myelopathy. *Gann Monogr Cancer Res* 39, 81 - 93
- Sonoda S, Fujiyoshi T, Yashiki S (1996): Immunogenetics of HTLV-I/II and associated diseases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13, S119 - S123
- Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301 - 314
- Staudinger R, Henry K (2000): Remission of HIV myelopathy after highly active antiretroviral therapy. *Neurology* 54, 267 - 268
- Suzuki J, Kira J, Baba E, Nakamura M, Koyanagi Y, Nakamura T, Kawano Y, Yamasaki K, Shirabe S, Hatano N, Hayashi K, Yamamoto N, Kobayashi T (1996): The association of antibodies against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) pX gene mutant products with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 173, 1115 - 1122
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Watanabe T, Mochizuki M, Kiyokawa T, Mori S, Miyata N (1992): Adult T-cell leukemia and HTLV-I related diseases. *Gann Monogr Cancer Res* 39, 1 - 15
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Matsuoka M: Adult T-cell leukemia; in: *Human T-cell lymphotropic virus type I*; hrsg. v. Höllsberg P, Hafler DA; Wiley, Chichester 1996, 219 - 246
- Tan SV, Guilloff RJ, Scaravilli F (1995): AIDS-associated vacuolar myelopathy. A morphometric study. *Brain* 118, 1247 - 1261
- Tan SV, Guilloff RJ, Henderson DC, Gazzard BG, Miller R (1996): AIDS-associated vacuolar myelopathy and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha). *J Neurol Sci* 138, 134 - 144
- Tatewaki M, Yamaguchi K, Matsuoka M, Ishii T, Miyasaka M, Mori S, Takatsuki K, Watanabe T (1995): Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 tax. *Blood* 86, 3109 - 3117
- Terasaki PI, McClelland JD (1964): Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204, 998 - 1007

Tochikura T, Iwahashi M, Matsumoto T, Koyanagi Y, Hinuma Y, Yamamoto N (1985): Effect of human serum anti-HTLV antibodies on viral antigen induction in *in vitro* cultured peripheral lymphocytes from adult T-cell leukemia patients and healthy virus carriers. *Int J Cancer* 36, 1 - 7

Uchiyama T (1997): Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol* 15, 15 - 37

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H (1977): Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. *Blood* 50, 481 - 492

Umehara F, Izumo S, Nakagawa M, Ronquillo AT, Takahashi K, Matsumuro K, Sato E, Osame M (1993): Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 52, 424 - 430

Umehara F, Nakamura A, Izumo S, Kubota R, Ijichi S, Kashio N, Hashimoto K, Usuku K, Sato E, Osame M (1994): Apoptosis of T lymphocytes in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy: a possible mechanism to control viral infection in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 617 - 624

Usuku K, Sonoda S, Osame M, Yashiki S, Takahashi K, Matsumoto M, Sawada T, Tsuji K, Tara M, Igata A (1988): HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: Comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann Neurol* 23, S143 - S150

Usuku K, Nishizawa M, Eiraku N, Osame M, Tabira T (1990): Autoproliferative and self-reactive T-cell lines from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Tohoku J Exp Med* 162, 243 - 253

van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB: *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; Academic Press, San Diego 2000

Verdier M, Bonis J, Leonard G, Dumas M, Denis F (1993): HTLV-1 antibody class and subclass distribution in African TSP and control populations. *J Neuroimmunol* 42, 117 - 120

Wattel E: Proliferation of HTLV-1-infected cells *in vivo*: pathogenic implications in leukemogenesis and neuropathogenesis; in: *Molecular pathogenesis of HTLV-1. A current perspective*; hrsg. v. Semmes OJ, Hammarskjöld ML; ABI Professional Publications, Arlington/Virginia 1999, 139 - 151

Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S (1995): Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 69, 2863 - 2868

Weber T, Büttner W, Felgenhauer K (1987): Evidence for different immune responses to HIV in CSF and serum ? *Klin Wochenschr* 65, 259 - 263

Wekerle H: Immunology of multiple sclerosis; in: McAlpine's Multiple Sclerosis, 3. Auflage; hrsg. v. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H; Churchill Livingstone, London 1998, 379 - 407

Williams GS, Oxenius A, Hengartner H, Benoist C, Mathis D (1998): CD4+ T cell responses in mice lacking MHC class II molecules specifically on B cells. Eur J Immunol 28, 3763 - 3772

Wucherpfennig KW, Höllsberg P, Richardson JH, Benjamin D, Hafler DA (1992): T-cell activation by autologous human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell clones. Proc Natl Acad Sci USA 89, 2110 - 2114

Wucherpfennig KW, Catz I, Hausmann S, Strominger JL, Steinman L, Warren KG (1997): Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. J Clin Invest 100, 1114 - 1122

Yamaguchi K (1994): Human T-lymphotropic virus I in Japan. Lancet 343, 213 - 216

Yamano Y, Kitze B, Yashiki S, Usuku K, Fujiyoshi T, Kaminagayoshi T, Unoki K, Izumo S, Osame M, Sonoda S (1997): Preferential recognition of synthetic peptides from HTLV-I gp21 envelope protein by HLA-DRB1 alleles associated with HAM/TSP (HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis). J Neuroimmunol 76, 50 - 60

Yoshida M, Osame M, Kawai H, Toita M, Kuwasaki N, Nishida Y, Hiraki Y, Takahashi K, Nomura K, Sonoda S, Eiraku N, Ijichi S, Usuku K (1989): Increased replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy. Ann Neurol 26, 331 - 335

Zajak AJ, Quinn DG, Cohen PL, Frelinger JA (1996): Fas-dependent CD4+ cytotoxic T-cell-mediated pathogenesis during virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 93, 14730 - 14735

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974): Restriction of *in vivo* T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248, 701 - 702

DANKSAGUNG

Diese Arbeit stellt eine Zusammenschau von eigenen neuroimmunologischen Untersuchungen über die HTLV-1 Infektion dar. Es sind zahlreiche Anregungen eingegangen, die der Referent seinen akademischen Lehrern Prof.Dr.K.Felgenhauer (Göttingen), Prof.Dr.H.Wekerle (Würzburg, München) und Prof.S.Sonoda (Kagoshima/Japan) verdankt. Durch ihre wissenschaftliche Unterstützung konnte sich im Laufe der Jahre aus den einzelnen Untersuchungen ein zusammenhängendes Projekt entwickeln. Prof.Dr.W.Bodemer (Göttingen, Tübingen) und Prof.M.Osame (Kagoshima/Japan) stellten technische und organisatorische Mittel zur Verfügung, ohne die einige Projekte nicht möglich gewesen wären.

Alle dargestellten Untersuchungen erfolgten in intensiver Zusammenarbeit mit zahlreichen Kolleginnen und Kollegen. Der Beitrag von folgenden Kolleginnen und Kollegen bei einzelnen Projekten und Veröffentlichungen war essentiell: Prof.Dr.T.Weber (Göttingen, Hamburg), Dr.J.W.Schäffner (Göttingen), Dr.M.Puccioni-Sohler (Göttingen, Rio de Janeiro/Brasilien), Dr.K.Usuku (Kagoshima/Japan), Dr.Y.Yamano (Kagoshima/Japan) und Dr.M.Nakamura (Fukuoka/Japan).

Ich bin Herrn Prof.Dr.G.Hunsmann dankbar, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, als Gastwissenschaftler in seiner Abteilung am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen experimentell zu arbeiten. Frau K.Ikeda (M&S Techno Systems, Osaka/Japan) hat bei der Herstellung und Reinigung synthetischer Peptide einen wichtigen Beitrag geleistet. Herr Prof.Dr.E.Brunner (Göttingen) und seine Mitarbeiter unterstützten mich bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ich möchte weitere Kolleginnen und Kollegen nennen, die sowohl in methodischer als auch inhaltlicher Hinsicht meine wissenschaftliche Entwicklung gefördert haben: Frau Prof.Dr.S.Poser (Göttingen), Frau Prof.Dr.H.Ehrenreich (Göttingen), Prof.Dr.H.Reiber (Göttingen), Prof.Dr.M.Mäder (Göttingen), Prof.Dr.H.Prange (Göttingen), Privatdozent Dr.P.Rieckmann (Göttingen, Würzburg), Privatdozent Dr.J.A.Richt (Giessen) und Prof.M.Yoshida (Tokyo/Japan).

Im Rahmen eines DFG Ausbildungsstipendiums (1986 bis 1987) erhielt ich meine neuroimmunologische Grundausbildung in der Klinischen Forschungsgruppe für Multiple Sklerose der Max-Planck-Gesellschaft in Würzburg (Leiter: Prof.Dr.H.Wekerle). Ein zweijähriger Forschungsaufenthalt (1994 bis 1995) im Center for Chronic Viral Diseases, Kagoshima/Japan, wurde von der Japanischen Regierung und der Europäischen Kommission ermöglicht.