

Forscher der Johns Hopkins Universität entdecken Verursacherprotein der transversen Myelitis: IL-6 löst regional selektive Schädigung des Rückenmarks aus

Adam I. Kaplin, Deepa M. Deshpande, Erick Scott, Chitra Krishnan, Jessica S. Carmen, Irma Shats, Tara Martinez, Jennifer Drummond, Sonny Dike, Mikhail Pletnikov, Sanjay C. Keswani, Timothy H. Moran, Carlos A. Pardo, Peter A. Calabresi, Douglas A. Kerr

Forscher des Projekts RESTORE (das TM Center und das MS Center) an der Johns Hopkins Universität haben ein einzelnes Molekül entdeckt, das transverse Myelitis (TM) verursacht, eine Autoimmunkrankheit des zentralen Nervensystems. TM ist eine fokale entzündliche Erkrankung des Rückenmarks und gehört zu einem ganzen Spektrum neuroinflammatorischer Erkrankungen, die durch abrupte neurologische Defizite gekennzeichnet sind, die mit Entzündung, Demyelinisierung und axonalem Schaden zusammenhängen. TM kann als Bestandteil einer multifokalen Erkrankung des zentralen Nervensystems (z.B. der Multiplen Sklerose), einer multisystemischen Erkrankung (z.B. systemischem Lupus erythematoses) oder als isolierte idiopathische Erscheinung auftreten. Obwohl die Mehrheit der TM-Patienten einen einzelnen Anfall erleiden, entwickeln 15 bis 30 % der Patienten später eine Multiple Sklerose. TM entwickelt sich rapide und ohne Vorwarnung und führt in der Regel zu einer dauerhaften Behinderung, die sich als fortdauernder Schwächezustand, als Lähmung von Beinen und Armen, als Funktionsstörung von Blase, Darm und der Sexualorgane, als Empfindungsstörungen bis hin zu Schmerzzuständen, Spastizität, Fatigue und Depression äußern kann. Unsere Untersuchung konzentrierte sich auf idiopathische TM-Patienten gemäß der 2002 vom TM Consortium Working Group publizierten Kriterien. (Transverse Myelitis Consortium Working Group. 2002. Proposed diagnostic criteria and nosology of acute transverse myelitis [review]. *Neurology*. 59:499).

Wir haben die diffundierbaren Immunanomalien im Liquor idiopathischer TM-Patienten untersucht und dabei die Rolle des Proteins IL-6 bei der Verursachung dieser Krankheit identifiziert. Wir konnten auch zeigen, dass die IL-6-Spiegel bei TM-Patienten dramatisch erhöht sind. Die Untersuchung wird in der Oktoberausgabe des *Journal of Clinical Investigation* (J. Clin. Invest. doi: 10.1172/JCI25141. <http://www.jci.org>) publiziert.

Das Johns Hopkins TM Center ist das einzige „Center of Excellence“ auf der Welt, das sowohl medizinische Betreuung von TM-Patienten als auch Forschung auf dem Gebiet der TM leistet. Wir behandeln sowohl Kinder als auch Erwachsene, die unter TM leiden. Das JHTMC wendet bei der Behandlung und Forschung über TM einen multidisziplinären Ansatz an. Auf diese Weise sind wir in der Lage, Ressourcen und Perspektiven über alle Fachbereichsgrenzen hinweg einzubeziehen, um diese Erkrankung besser zu verstehen und zu behandeln. Kürzlich schlossen sich TM Center und MS Center an der Johns Hopkins Universität zusammen, um gemeinsam das Projekt RESTORE zu bilden. Wir konzentrieren uns darauf, die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen neuroimmunologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems zu erkunden. Wir können viel lernen aus dem Versuch, die Ähnlichkeiten und Unterschiede dieser Erkrankungen besser zu verstehen. Die Konzentration auf Forschung und klinische

Englische Originalfassung

Kaplin, A. et al.: *Johns Hopkins Researchers Discover Key Protein Linked To Transverse Myelitis: IL-6 Induces Regionally Selective Spinal Cord Injury*, *Transverse Myelitis Association Journal*, Vol 1, Jan. 2006, S. 13 - 16

Behandlung sowie der umfassende und inter-disziplinäre Behandlungs- und Forschungsansatz haben sich als sehr fruchtbar für die wichtigen Erkenntnisse erwiesen, die aus dieser Untersuchung gewonnen werden können.

Im JHTMC werden mehr TM-Patienten behandelt als in jeder anderen medizinischen Einrichtung der Welt. Im Rahmen der Behandlung von TM-Patienten hörten wir regelmäßige Klagen über Konzentrations- und Gedächtnisstörungen. Die Behandlungserfahrung hat uns auch gelehrt, dass Depression ein gängiges Symptom einer TM ist. IL-6 spielt eine Rolle bei affektiven Störungen und Konzentrationsschwierigkeiten. Es liegen auch indirekte Hinweise dafür vor, dass ein erhöhter IL-6-Spiegel die neuronalen Schädigungen bei Alzheimer, Parkinson, HIV-Enzephalopathie, MS, Depression und kognitiven Beeinträchtigungen verstärkt. Dadurch stellten wir uns die Frage, ob IL-6 nicht auch eine Rolle im Krankheitsverlauf der TM spielen könnte. IL-6 ist ein chemischer Botenstoff, den Zellen des Immunsystems verwenden um miteinander zu kommunizieren. IL-6 ist ein Glykoprotein-Zytokin (ein Protein, das von den Zellen des lymphatischen Systems abgesondert wird, die Aktivität anderer Zellen beeinflusst und für die Kontrolle entzündlicher Reaktionen von Bedeutung ist). Wir stellten die Hypothese auf, dass Zytokine eine wichtige Rolle als Verursacher der TM spielen und untersuchten die diffundierbaren Anomalien im Liquor einer Gruppe von TM-Patienten mit Hilfe eines Zytokin-Antikörper-Reihe.

Wir begannen die Untersuchung mit der Analyse von 42 inflammatorischen Proteinen (Zytokine) im Liquor von TM-Patienten und gesunden Personen. Die sechs TM-Patienten in unserer Untersuchung waren vor der Liquorentnahme keiner immunmodulierenden Therapie (mit Steroiden) unterzogen worden. Die Kontrollgruppe umfasste acht Patienten. Wir stellten fest, dass der IL-6-Spiegel im Liquor der TM-Patienten während der akuten anfänglichen Phase selektiv, konsistent und dramatisch erhöht ist. Die IL-6-Spiegel im Liquor, über die wir in unserer Studie berichten, gehören zu den höchsten (bis zu 4,209 pg/ml) über die, unabhängig von der Krankheit, jemals bei Menschen berichtet wurde. Wir stellten auch fest, dass die IL-6-Spiegel bei den TM-Patienten direkt mit den Markern für Gewebeschädigung und mit der Schwere der Paralyse korrelierten. Schließlich, und in Einklang mit den aus der Gewebeschädigung gewonnenen Hinweisen, bestand eine direkte Korrelation zwischen dem IL-6-Spiegel und andauernden Beeinträchtigungen, die bei einer Nachuntersuchung nach 6 Monaten anhand der erweiterten Beeinträchtigungsskala EDSS gemessen wurden. Der Funktionalitätsstatus (EDSS-Punktezahlen in der akuten Phase und bei der Nachuntersuchung) wurde von Neurologen festgestellt, die keine Kenntnis der Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen hatten. Das EDSS ist eine weit verbreitete neurologische Funktionsskala. Unsere Untersuchung demonstrierte, dass je schwerer der Anfall ist, desto höher sind die IL-6-Spiegel und desto größer die Wahrscheinlichkeit langfristiger und andauernder klinischer Behinderungen durch akute neuronale Schädigung.

Englische Originalfassung

Kaplin, A. et al.: *Johns Hopkins Researchers Discover Key Protein Linked To Transverse Myelitis: IL-6 Induces Regionally Selective Spinal Cord Injury*, Transverse Myelitis Association Journal, Vol 1, Jan. 2006, S. 13 - 16

Wir fanden ein praktisch identisches Muster im Liquor aller TM-Patienten vor, die wir in dieser Weise untersuchten, d.h. einen dramatisch erhöhten IL-6-Spiegel. Die Einheitlichkeit dieses Musters war umso überraschender, als man TM lange Zeit als heterogene Erkrankung angesehen hatte und es daher zu erwarten gewesen wäre, dass auch die Zytokinstörungen diese Heterogenität reflektierten. Es sollte nicht vergessen werden, dass neuere nosologische Ansätze versuchen, die Erscheinungsformen der TM zu klassifizieren und bspw. zwischen monophasischer und wiederkehrender sowie zwischen idiopathischer und im Zusammenhang mit einer systemischer Erkrankung auftretender TM unterscheiden. Für diese Untersuchung haben wir uns auf Patienten mit idiopathischer TM beschränkt und Patienten mit einer bekannten systemischen entzündlichen Erkrankung ausgeschlossen. Diese Einschränkung kann dazu beigetragen haben, dass die Gruppe von Patienten eher gleichmäßig ist und relativ homogene Störungen des Immunsystems aufweist.

In der folgenden Phase unserer Untersuchung haben wir uns darauf konzentriert, die spezifischen Immunvorgänge zu identifizieren, die sich im Verlauf eines TM-Anfalls ereignen. Wir konnten verschiedene Proteine isolieren, die an diesem Prozess beteiligt waren, sowie die sequenzielle Aktivierung dieser Proteine, die schließlich zu den neuronalen Schäden und dem Zelltod im Rückenmark führt. IL-6 war nötig und ausreichend, um Zellschädigungen in Rückenmarksgewebe in Kultur durch Aktivierung der kaskadierenden Progression des Immunprozesses zu vermitteln. Unseres Wissens liefert diese Untersuchung zum ersten Mal den Nachweis, dass ein einzelnes Signalprotein (IL-6) als zentraler Vermittler der Gewebeschädigung in einer Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems dient. Wir beschreiben im Einzelnen den Signalpfad der IL-6-vermittelten Schädigung der Nervenzellen im Rückenmark, von den einzelnen Schritten des entzündlichen Anfalls bis zum resultierenden Zelltod.

Wir stellten fest, dass die IL-6-Produktion vornehmlich aus Astrozyten in und um den Entzündungsbereich stammte. Astrozyten sind Teil des zentralen Nervensystems (Gehirn und Rückenmark). Es ist bekannt, dass Astrozyten IL-6 als Antwort auf direkte Stimulation durch entzündungsfördernde Zytokine, virale und bakterielle Pathogene und Neurotransmitter produzieren. Was die ursprüngliche Biosynthese von IL-6 in den Astrozyten auslöst wird gegenwärtig untersucht, aber zu den potenziellen Kandidaten gehört die Immunreaktion auf eine Impfung oder auf eine vorangegangene Infektion, zu der auch Mechanismen wie molekulare Mimikry oder eine durch Superantigene vermittelte Entzündung gehören können. Warum bei manchen Individuen eine dramatische Erhöhung der IL-6-Spiegel zur pathophysiologischen Schädigung führt, die man bei TM sieht, ist nicht bekannt, aber die potenzielle Beteiligung von genetischen Unterschieden an der Produktion von IL-6 im ZNS ist bereits beschrieben worden.

Die primären Ziele der IL-6-vermittelten Zytotoxizität (Zellzerstörung) sind Oligodendrozyten und Axone. Die Oligodendrozyten helfen bei der Produktion der Myelin-

Schutzhülle, die Nervenzellen und Axone umhüllt. Durch die Erklärung einer Ursache, die sowohl für die Demyelinisierung als auch für die axonale Degeneration zutrifft, identifiziert unsere Untersuchung einen möglichen Mechanismus, der für autoimmun bedingte demyelinisierende Erkrankungen wie die TM verantwortlich sein könnte. Bei verwandten Erkrankungen wurde ebenfalls ein erhöhter IL-6-Spiegel im zentralen Nervensystem festgestellt. Die akute disseminierte Enzephalomyelitis ist, wie TM, eine monophasische, entzündliche Erkrankung des ZNS, die oft postinfektiös verläuft. Auf ähnliche Weise haben mehrere Berichte eine Beteiligung von IL-6 an der Pathogenese der MS vorgeschlagen.

Neuerdings wird IL-6 häufig in einer Doppelrolle gesehen, gleichzeitig schützend und schädigend. Im Gegensatz zur Ansicht, dass IL-6 lediglich schädlich auf das Nervensystem wirkt, haben mehrere Untersuchungen gezeigt, dass IL-6 auch schützend wirkt. Es ist möglich, dass IL-6 in niedriger Dosierung als nützlicher Neuroprotektor fungiert und in hohen Dosen destruktiv wirken kann. Die IL-6-Spiegel im ZNS eines Erwachsenen sind bei gesunden Individuen in der Regel niedrig oder nicht wahrnehmbar, steigen aber in Folge von Verletzung, Entzündung und ZNS-Erkrankung dramatisch an.

In der folgenden Phase unserer Untersuchung führten wir eine Reihe von Experimenten durch, mit denen wir überprüften, was wir durch Beobachtung und Analyse über die Rolle von IL-6 im entzündlichen und demyelinisierenden Prozess im Verlauf eines akuten TM-Anfalls gelernt hatten. Wir führten Experimente durch um festzustellen, ob unsere Beobachtungen in vitro (Experimente, die in einer künstlichen Umgebung durchgeführt werden, z.B. in Zellkulturen) und in vivo (Experimente, die in einem lebenden Organismus durchgeführt werden, z.B. in Ratten oder Mäusen) repliziert werden konnten. Sowohl die Zellkulturen als auch die Tierversuche bestätigten uns, dass erhöhte IL-6-Spiegel unmittelbar schädigend auf das Rückenmark wirken. Wir bestätigten jeden der aufeinanderfolgenden Schritte des kaskadierenden Entzündungsprozesses, ebenso wie die zentrale Rolle des IL-6 sowohl als Vermittler des Prozesses als auch als Ursache des eigentlichen Schadens an den Oligodendrozyten und dadurch Verursacher der Demyelinisierung. Wir konnten nachweisen, dass der Liquor von TM-Patienten zum Tod von Rückenmarkszellen in Zellkulturen führt und dass die Injektion von IL-6 in erwachsenen Ratten zur Lähmung führt. Bei Ratten, denen IL-6 intrathekal injiziert wurde, entwickelte sich progressive Schwäche mit Entzündung des Rückenmarks, Demyelinisierung und Axonschäden. Unter dem Mikroskop wies das Gewebe der Ratten, denen IL-6 injiziert worden war, Demyelinisierung und Axonschäden auf, Erscheinungen, die fast identisch zu denen menschlicher TM-Patienten waren.

Wir haben nachgewiesen, dass IL-6 sowohl nötig als auch ausreichend ist, um die Art von Rückenmarksschädigung zu vermitteln, die man bei TM-Patienten vorfindet. Wir liefern Nachweise, dass die Ziele der IL-6-vermittelten Schädigung Oligodendrozyten und Axone sind, was Demyelinisierung und Schäden an den Axonen verursacht.

Englische Originalfassung

Kaplin, A. et al.: *Johns Hopkins Researchers Discover Key Protein Linked To Transverse Myelitis: IL-6 Induces Regionally Selective Spinal Cord Injury*, Transverse Myelitis Association Journal, Vol 1, Jan. 2006, S. 13 - 16

Um zu testen, ob IL-6 mit den Zellschädigungen im Rückenmark lediglich korreliert oder ob es sie verursacht, haben wir Untersuchungen mit Rückenmarksquerschnitten von Ratten in Kultur unternommen. Wir fügten den Liquor eines TM-Patienten (mit einem IL-6 von 1,997 pg/ml) bzw. eines Mitglieds der Kontrollgruppe auf die Rückenmarksquerschnitte in der Kultur hinzu und untersuchten die resultierenden Auswirkungen auf die Zellen. Wir konnten feststellen, dass der Liquor des TM-Patienten den Tod der Rückenmarkszellen verursachte, der Liquor des Kontrollpatienten aber nicht. Daraus schließen wir, dass IL-6 notwendig für dieses Absterben ist. Die transverse Myelitis ist ein entzündlicher Anfall des Rückenmarks; Gehirn oder Optikusnerv sind nicht beteiligt. Wir postulierten, dass der Grund, warum die Erhöhung des IL-6-Spiegels nur das Rückenmark schädigt und nicht andere Bestandteile des Nervensystems, darin zu sehen ist, dass unterschiedliche Regionen des Nervensystems unterschiedlich auf das IL-6 reagieren. Der nächste Schritt unserer Untersuchung bestand darin, diese Hypothese zu testen. Wir hatten bereits festgestellt, dass IL-6 mit Vorliebe Oligodendrozyten und Axone schädigt. Die von IL-6 geschädigten Zielzellen verursachten eine Schädigung der Nervenzellen in den Rückenmarkskulturen.

Anschließend haben wir Tierversuche durchgeführt um die erzielten Ergebnisse zu untermauern. Dabei konnten wir feststellen, dass bei Injektion von IL-6 in die Zerebralventrikel (Hirnkammern) erwachsener Ratten die kaskadierende Entzündungsreaktion nicht in der gleichen Weise aktiviert wurde wie bei den Versuchen am Rückenmark. Als wir IL-6 in das Rückenmark erwachsener Ratten injizierten, wurde die Greifkraft ihrer Hinterläufe über einen Zeitraum von 8 Tagen progressiv schwächer. Am Ende der Untersuchung hatten die Ratten, denen IL-6 injiziert worden war, rund 50% der Kraft ihrer Hinterläufe verloren. Wir analysierten das spinale Nervengewebe und stellten Demyelinisierung und axonale Degeneration fest, darüber hinaus war die weiße Substanz im Rückenmark geschädigt während die graue Substanz weitgehend unbehelligt zu bleiben schien. Diese Krankheitserscheinungen der Ratten, denen IL-6 injiziert worden war, ähneln stark der axonalen Degeneration und Demyelinisierung, die man im Rückenmark von Patienten mit schweren und fatalen Fällen von TM sieht.

Wir führten weitere Experimente mit Zellkulturen durch, um unsere Hypothese über die regionale Verwundbarkeit des Rückenmarks gegen IL-6 im Verhältnis zum Gehirn zu testen. Niedrige IL-6-Dosierungen stellten offensichtlich einen Schutz gegen Zellschädigung dar, während höhere Dosen nur leichte Schädigungen des Hirngewebes verursachten. Dies steht in dramatischem Kontrast zu unseren Beobachtungen an Rückenmarkskulturen. Bereits geringe Dosen von IL-6 reichten aus um das Rückenmarksgewebe zu schädigen. Die Zellkulturexperimente bestätigten unsere Feststellung, dass IL-6 nicht für das gesamte Nervensystem schädlich ist, sondern vielmehr selektiv schädlich für das Rückenmark.

Frühere Studien sahen IL-6 sowohl an der Verhütung von Zelltod als auch in einer Verursacherrolle bei neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Die schützende oder

destruktive Rolle des IL-6 kann von der Dosierung und von regionalen Effekten abhängen. Wir haben beobachtet, dass IL-6 Zytotoxizität (Zellschädigung und -tod) vorzugsweise in der weißen Substanz des Rückenmarks auslöst, im Gegensatz zur grauen Substanz. Wir stellten ebenfalls fest, dass niedrige Dosierungen von IL-6 das Absterben von Zellen in Zellkulturen mit Gehirngewebe bewirkten, während eine höhere Dosierung geringe Auswirkung auf den Zelltod hatte. Im Gegensatz dazu konnten wir keine IL-6-Dosierung finden, die auf das Rückenmarksgewebe eine Schutzwirkung entfaltet hätte, während sich die höheren Dosierungen als extrem toxisch erwiesen.

Unsere Untersuchung hat uns zur Schlussfolgerung geführt, dass die regionalen entzündlichen Reaktionen, die bei den verschiedenen neuroimmunologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems auftauchen (MS, TM, Neuromyelitis optica und Optikusneuritis), durch örtlich begrenzte Reaktionen auf Zytokine, einschließlich IL-6, erklärt werden können. Die regionale Verwundbarkeit verschiedener Teile des zentralen Nervensystems (Hirn, Rückenmark und Optikusnerven) kann durch örtlich unterschiedliche Reaktionen auf IL-6 erklärt werden. Diese unterschiedliche Arten einer Reaktion können ein Teil der Antwort auf die Frage darstellen, warum verschiedene Autoimmunerkrankungen des Nervensystems verschiedene Regionen betreffen und unterschiedliche Symptome auslösen.

Wir konnten in dieser Studie feststellen, dass ein einzelnes Signalmolekül (IL-6) eine kritische Rolle im Verlauf einer TM spielt. Die Implikation dieser Erkenntnisse lautet, dass eine therapeutische Strategie, die in der Lage ist, diesen Signalpfad zu modulieren, den Verlauf der TM günstig beeinflussen kann. Unsere Arbeit liefert einen direkten Nachweis für eine inflammatorische Signalkaskade unter Proteinbeteiligung, die für Schäden an Axonen und Oligodendrozyten verantwortlich ist, und dadurch für die Demyelinisierung im Rückenmark. Da die Funktionsstörung des Rückenmarks eine der wesentlichen Determinanten der Behinderungen ist, die bei etlichen neurologischen Erkrankungen, darunter auch TM und MS auftritt, identifiziert die Beschreibung und Erklärung dieses Signalpfads wichtige therapeutische Ziele, um diese Behinderungen in Zukunft vermeiden zu können.

Das Verständnis dieses Signalpfads erlaubt es uns, unsere Forschungen fortzusetzen um spezifischere Ziele in Angriff zu nehmen, die es uns ermöglichen können, den Entzündungsschub zu unterbrechen und zu stoppen bevor das Rückenmark signifikanten Schaden erleidet. Diese Ergebnisse bekräftigen die Bedeutung einer frühen Diagnose und schneller Behandlung der TM und der anderen neuroimmunologischen Erkrankungen. Unsere Studie legt nahe, dass die Wahrscheinlichkeit eines positiveren Verlaufs der Krankheit umso größer ist, je früher Therapien zur Modulation der Entzündungsreaktion verabreicht werden können.

TM ist verwandt mit anderen Autoimmunerkrankungen des Nervensystems, einschließlich

Guillain-Barré-Syndrom (GBS), Multipler Sklerose (MS), Neuromyelitis optica (NMO), Optikusneuritis, und akuter disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM). Diese Untersuchung gibt uns daher möglicherweise einen ersten festen Ansatzpunkt für das Verständnis auch dieser Erkrankungen: wie sie miteinander in Verbindung stehen und wo die spezifischen Unterschiede liegen. Unsere Erkenntnisse werden daher nicht nur für TM-Patienten nützlich sein, sondern auch für Patienten, deren Behinderungen durch eine ganze Reihe anderer Autoimmunerkrankungen bedingt sind. Wir verwenden diese Erkenntnisse um die Entwicklung von zukünftigen diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Verbesserungen aktiv zu fördern.

Danksagung

Unsere Forschungstätigkeit wurde unterstützt von: The Transverse Myelitis Association, der Noel P. Rahn Fellowship, der Dana Foundation, der Miriam and Peter Haas Foundation, dem Katie Sandler Fund for Research an der Johns Hopkins University, von Bruce Downey, den Barr Laboratories und den National Institutes of Health.