

**Dosis- Wirkungsbeziehung einer Interferon beta Therapie auf
die endogene Interferon beta Produktion
am Beispiel einer Therapie mit Interferon beta 1a 22 µg versus
22 µg/44 µg**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von
Christian Dornes
aus Kaiserslautern

Gießen 2011

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Oschmann
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Banat

Tag der Disputation: 30. November 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Geschichtlicher Hintergrund (J.M.S. Pearce 2005).....	1
1.2 Epidemiologische Daten:	2
1.3 Klinik der Multiplen Sklerose:	3
1.4 Diagnosefindung und Diagnostik:.....	6
1.4.1 Magnetresonanztomographie (MRT).....	6
1.4.2 Liquor- Diagnostik:	7
1.4.3 Evozierte Potentiale (EP)	8
1.4.4 Diagnosefindung anhand der McDonald- Kriterien und Patientensurveillance durch den EDSS- Score.....	8
1.5 Therapie.....	11
1.5.1 Azathioprin (Imurek®).....	12
1.5.2 Interferon- Therapie	12
1.5.3 Glatriameracetat (Copaxone®)	14
1.5.4 Mitoxantron.....	14
1.5.5 Immunglobuline	14
1.5.6 Neuere Therapieoptionen	15
1.5.7 Therapie des akuten Schubes	16
1.6 Pathogenese der Multiplen Sklerose	16
1.7 Zytokine:	19
1.7.1 Allgemein.....	19
1.7.2 Interferon beta und gamma	20
1.7.3 Tumornekrosefaktor alpha sowie der Tumornekroserezeptor I und II	21
1.7.4 Interleukin 4 und Interleukin 4 Rezeptor	23
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Material und Methode:	25
2.1. Allgemeines.....	25
2.2. Patientenkollektiv	25
2.3. Methodik	27
2.3.1 Leukozytengewinnung	27
2.3.2 RNA- Isolation	28
2.3.3 cDNA- Synthese (Reverse Transkriptionsreaktion):.....	28

2.3.4 Quantitative PCR (Real- Time PCR) unter Verwendung eines externen Standards, sowie PBDG als Housekeeping- Gen.....	30
2.4. Statistische Auswertung:	43
3. Ergebnisse:	44
3.1. Klinische Daten	44
3.1.2 Anzahl der Schübe vor und während der Therapie sowie Entwicklung der mittleren Schubrate	46
3.1.3 Entwicklung des EDSS Scores.....	48
3.2. Immunprofil	51
3.2.1 Interferon gamma	51
3.2.2 TNF- Rezeptor 1.....	51
3.2.3 TNF- Rezeptor 2.....	53
3.2.4 Interleukin 4	54
3.2.5 Interleukin 4 Rezeptor	55
3.2.6 Interferon beta	56
4. Diskussion	58
5. Summary/Zusammenfassung	68
6. Abbildungsverzeichnis	72
7. Literaturverzeichnis.....	73
8. Anhang	92

1. Einleitung

Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), Synonym: Encephalomyelitis disseminata, ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems, bei der die Markscheiden der Axone demyelinisiert werden.

1.1 Geschichtlicher Hintergrund (J.M.S. Pearce 2005)

Erste pathologische Beschreibungen über das Krankheitsgeschehen in Form von makroskopischen Entmarkungsherde im Bereich der Pons und des Großhirnmarkes wurden 1837 durch den englischen Pathologen Sir Robert Carswell (1793- 1857) sowie durch den französischen Professor für pathologische Anatomie Jean Cruveilhier (1791- 1874) im Jahre 1835 erhoben. Cruveilhier skizzierte als Erster auch die Krankengeschichte einer Patientin, bei welcher post mortum auch die oben genannten Läsionen gefunden wurden. Generell war die MS- Forschung im 19. Jahrhundert ein Wettkampf zwischen englischen und französischen Neurowissenschaftlern.

Namensgeber der Multiplen Sklerose, die anfänglich als „le sclerose en plaques“ bezeichnet wurde, war Jean- Marie Charcot (1867-1931). Charcot lieferte auch die ersten histo- pathologischen Ergebnisse. Er dokumentierte die typischen Myelinscheidendefekte bei normal erhaltenem Axon. Er beschrieb die für die MS typischen periventrikulären Entmarkungsherde, die „sklerosierten Plaques“ (Charcot). Ferner unterschied er zwischen einer cephalischen, einer spinalen und einer cephalospinalen Form.

Vervollständigt wurde das histo- pathologische Geschehen bei der MS durch James Dawson an Hand von Gold- und Silberfärbungen. Er gab die viel beachtete Arbeit „The Histology of Disseminated Sclerosis“ heraus.

Erste autobiographische Krankheitsbeschreibungen von einer Patientin stammen aus dem Jahre 1847 von Augustus D’Este sowie „The Journal of a Disappointed Man“, in dem Bruce Frederick Cumming (1889-1919) seine Krankengeschichte beschrieb.

1.2 Epidemiologische Daten:

Die Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch- entzündliche ZNS- Erkrankung in Europa.

Die Prävalenz der Multiplen Sklerose, sprich die Anzahl der an MS erkrankten Personen, beträgt in Deutschland für das Jahr 2008 130-170 Erkrankte pro 100 Tausend Einwohner; die Inzidenz (Anzahl der Menschen, die neu an MS erkrankt sind) für Deutschland wird im Jahre 2008 auf 1 -3,2 Neuerkrankte auf 100 Tausend geschätzt. In Deutschland leben rund 80 bis 100 Menschen insgesamt pro 100 Tausend, die an Multipler Sklerose erkrankt sind (Daten von www.atlasofms.org). Frauen sind 2,5 mal häufiger betroffen als Männer (72% versus 28%) (Flachenecker et al. 2008). Das durchschnittliche Patientenalter beträgt $34,8 \pm 10,7$ Jahre.

Die Inzidenz der MS- Erkrankung ist, ausgehend vom Äquator, mit jedem Breitengrad zunehmend (Jacob A. Brody 1972). Eine genetische Disposition als auch Umweltfaktoren scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen. Immigrationsstudien konnten diesbezüglich zeigen, dass die Inzidenz für Erwachsene aus Hochrisikogebieten durch Wegzug in Niedrigrisikogebiete weiterhin höher ist als die von Erwachsenen, die dem Niedrigrisikogebiet entstammen. Im Gegenzug ist aber die Erkrankungsrate durch den Wegzug nun geringer als vorher.

In Zwillingsstudien konnten genetische Prädispositionen ausgemacht werden. Demnach ist die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen deutlich höher (21-40%) als bei zweieiigen Zwillingen (www.quellenhof.de/multiple-sklerose/multiple-sklerose-epidemiologie.php).

Besonders entscheidend für das Einwirken der Umweltfaktoren auf das Krankheitsentstehen sind die ersten beiden Lebensdekaden (Gale and Martyn 1995). Hier werden vor allem CMV- und EBV- Infektion in Zusammenhang gebracht (Lünemann et Münz, 2007). Bestimmte HLA – Marker wie HLA-DRB1+1501 und –DQB1+0602 sollen mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit einhergehen (Olerup et al. 1991).



Abb. 1: geographische Verteilung der MS. (www.quellenhof.de)

1.3 Klinik der Multiplen Sklerose

Wie schon oben erwähnt ist die Multiple Sklerose eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems. Als Hauptangriffspunkt dienen hierbei die Myelinscheiden der Axone, welche durch ortsanständige Mikroglia zerstört wird. Das Axon bleibt hierbei anfänglich erhalten. Gesteuert wird die Autoimmunreaktion von peripheren, initial sich nicht im ZNS befindlichen T-Lymphozyten. Die Liquorschranke ist normalerweise nicht für periphere Leukozyten permeabel. Durch Adhäsionsmoleküle und Zytokine, gelangen die T- Lymphozyten sowie die durch die T- Zellen aktivierten B- Zellen durch die nun permeable Liquorschranke in das ZNS.

Früher wurde angenommen, dass sich die Erstersymptome einer MS als Charcot Trias (Intensionstremor, Nystagmus und skandierende Sprache) oder als Trias von Marburg (temporale Abblassung der Papillen, Paraspastik und fehlende Bauchhautreflexe) manifestieren.

Der klinische Alltag hat jedoch gezeigt, dass dies nur auf ganz wenige Fälle zutrifft. Das Charakteristikum der MS- Symptomatik sind die multilokulären Funktionsstörungen des ZNS, die in Schüben und mit Remissionen auftreten (Delank et al. 2006).

Hierbei stehen vor allem folgende Symptome im Vordergrund: Pyramidenbahnzeichen, Paresen, Störungen der Hirnnervenfunktion. Hervorzuheben ist die Trigeminalneuralgie sowie die Neuritis nervi optici. Letztere ist bei vielen Patienten neben Parästhesien oder Dysästhesien eines der ersten Symptome einer MS- Erkrankung (Rae- Grant et al. 1999, Söderström et al. 2003). Ferner treten je nach Stadium der Erkrankung Störungen des vegetativen Nervensystems (Blasen- und Mastdarmstörungen sowie sexuelle Funktionsstörungen) sowie Einschränkungen der Kognition sowie der Psyche (Depressionen und Fatigue) auf.

Die Multiple Sklerose wird heute in drei Verlaufsformen unterschieden (McAlpine 1972). Die schubförmig remittierende Form (im englischen Sprachraum als Relapsing-remitting (RR-) MS bezeichnet), bei der sich die aktuelle Beschwerdesymptomatik entweder vollständig oder partiell zurückbilden kann, ist die häufigste Form.

Die RR- Verlaufsform geht häufig in eine sekundär progressive (SP- MS) Verlaufsform über. Hierbei kommt es meist nicht zu einer Regredienz der aktuellen Schubsymptomatik. Patienten mit einem primärschubförmigen Krankheitsverlauf entwickeln nach 11-15 jähriger Krankheitsdauer zu 58%, und nach über 25 jähriger Krankheitsdauer zu 89% eine sekundär chronisch- progrediente Verlaufsform (Weinshenker et al., 1989).

Die primär progressive MS ist dadurch gekennzeichnet, dass bei ca. 50% der Patienten keine Schübe ausgelöst werden. Viel mehr treten bei dieser Verlaufsform entweder immer neue Symptome zu den schon bestehenden auf, oder es kommt zu einer chronischen Verschlechterung der schon bestehenden Symptomatik (Lublin et al. 1996, Tremelett et al. 2009). Ein Diagnostikleitfaden wurde 2004 von Thompson veröffentlicht.

Davon abzugrenzen ist das klinisch isolierte Syndrom. Es zeichnet sich dadurch aus, dass die ersten klinischen Symptome einer MS zwar schon vorhanden sind, die apparative Diagnostik (MRT, Liquor, VEP) noch nicht durchgeführt worden ist bzw. negativ verläuft.

Folgende prozentuale Verteilung wurde für Deutschland durch das MS- Register erhoben. Demnach litten 55% an der schubförmig remittierenden Verlaufsform, 32% an der sekundär progredienten Verlaufsform. Bei 9% wurde eine primär chronisch progrediente MS festgestellt (Flachenecker et al. 2008).

MS-Verlaufsform	betroffene Patienten [%]	Verlaufsschema
<i>relapsing-remitting</i> (RR-MS)	55% der MS-Patienten	
<i>secondary progressive</i> (SP-MS)	32% der MS-Patienten	
<i>primary progressive</i> (PP-MS)	9% der MS-Patienten	

Abb. 2: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose. (Virley; NeuroRx, Vol. 2, No. 4, 2005)

Unterschiedliche Studien (u.a. Weinshenker et al. 1989, Hawkins and McDonnell 1999) fanden heraus, dass es good risk und high risk Faktoren beim Krankheitsverlauf gibt. Good- Risk- Faktoren sind u.a. weibliches Geschlecht, geringe Schubrate, lange schubfrei Zeit vor allem zwischen dem Erstschub und dem Nachfolgeereignis sowie eine partielle oder komplette Remission nach jedem Schubereignis. Ferner sind die Erstsymptome wie Optikusneuritis oder sensible Defizite eher einem benignem Krankheitsverlauf zuzuordnen. Auch der initale EDSS- Ausgangswert spielt eine Rolle. Es konnte auch gezeigt werden, dass die RR- MS mit einer hohen Schubrate schneller in eine sekundär progrediente Form übergeht, als diejenige mit einer geringeren Schubrate. Weitere Faktoren für einen ungünstigen Krankheitsverlauf sind männliches Geschlecht, hohes Alter bei Erstdiagnosestellung sowie die primär progrediente Multiple Sklerose.

1.4 Diagnosefindung und Diagnostik:

Zur Diagnosefindung ist eine ausführliche Anamnese zu erheben sowie eine gute klinisch- neurologische Untersuchung durchzuführen. Bei Anamneseerhebung muss nach vorherigen Schüben, Symptomen sowie deren Dauer gefragt werden. Bei der neurologischen Untersuchung sind vor allem auf Gesichtsfeldausfälle, Dysästhesien, herabgesetzte bzw. gesteigerte Reflexe zu achten. Ferner sind Gang- und Koordinationsprüfungen durchzuführen.

Neben den Anamnese und körperlicher Untersuchung kommt zur Diagnosefindung die (apparative) Diagnostik zum Einsatz (Mallam et al. 2009).

1.4.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie ist ein Verfahren zur Erzeugung von Schnittbildern in einer frei wählbaren Raumebene ohne Verwendung von Röntgenstrahlen (Reiser et al. 2003). Bei der MRT- Bildgebung wird zwischen einer T1- (Spin- Gitter- Relaxationszeit) und T2- (Spin- Spin- Relaxationszeit) Wichtung unterschieden. In der T1- Bildgebung erscheint Fett hypertens (hell) und Wasser hypotens (dunkel), in der T2- Wichtung reziprok. Durch die Einführung der MRT- Diagnostik konnte die Dauer bis zur Diagnosestellung von 7,2 a auf 0,5 a reduziert werden.

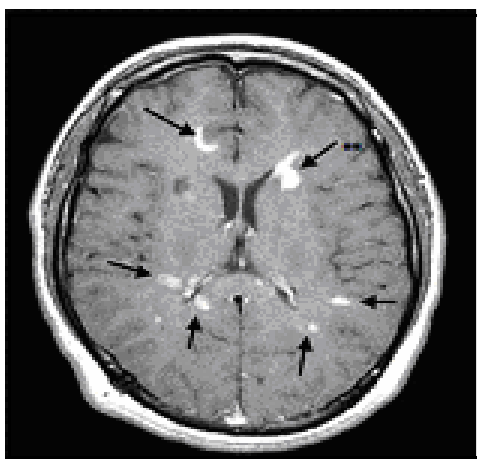


Abb. 3: Typische MS- Herde in der MRT. ** Hypertense Herde in der T2- Wichtung. Modifiziert nach www.mpg.de/411200/zoom.jpeg

In der MS- Diagnostik spielt vor allen die T2 Sequenzen eine wichtige Rolle. Hierbei werden die für die MS- typischen periventrikulären Läsionen als hypertens sichtbar.

Durch Kontrastmittelgabe (Gadolinium) kann eine Störung der Blut- Hirnschranke, wie sie meist im akuten Schub auftritt, erfasst werden (McDonald et al. 2001), (Miller DH et al. 2004).

1.4.2 Liquor- Diagnostik:

Die Liquordiagnostik nimmt einen weiteren Stellenwert in der Diagnosestellung der Multiplen Sklerose ein. Wichtigster pathologischer Parameter hierbei ist das Auftreten von sog. oligoklonalen Banden im Liquor von MS- Patienten. Dies trifft auf ca. 95% aller MS- Patienten zu (Andersson et al., 1994).

Unter oligoklonalen Banden versteht man das Auftreten von Immunglobulinen meistens von Typ IgG, die stets von nur einer einzigen B- Zelle oder deren Klone produziert werden (O' Connor et al., 2001).

Oligoklonale Banden sind zwar typisch für die Multiple Sklerose nicht jedoch spezifisch. Sie können entweder bei anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. systemischen Lupus erythromatosus) oder bei entzündlichen ZNS- Erkrankung (bakterieller oder viraler Genese) auftreten (Villar et al., 2005)

Oligoklonale Banden sind Ausdruck einer gestörten Funktion der Blut- Hirn- Schranke. Diese ist normalerweise nicht für periphere Leukozyten permeabel. Durch entzündliche Prozesse kommt es jedoch zu Lücken in der Blut- Hirn- Schranke entweder durch den auslösenden Prozess selbst (Bakterium, Virus, Autoantikörper) oder durch Zytokine, die von peripheren T- Zellen produziert werden. Durch den Kontakt mit dem Antigen wandelt sich der in das ZNS migrierte, spezifische B- Lymphozyt in eine Plasmazelle um und sezerniert nun monoklonales Immunglobulin erst vom Typ Ig M als Erstimmunantwort später vom Typ Ig G.

Folgender Standard zur Bestimmung der oligoklonalen Banden wurde durch Freedman et al. 2005 festgelegt:

1. Isoelektrische Fokussierung zum Auftrennen der Proteine
2. Anschließende Immunfixation (oligoklonale Banden?)
3. Ergebnisse der kompletten Liquorausarbeitung müssen vorliegen (Glukose, Laktat, Eiweiß, Gesamtzellzahl, ggf. Zelldifferenzierung)
4. Albumin- Quotient (Schrankenstörung vorhanden j/n)
5. ggf. Leichtkettenanalyse

6. Qualitätskontrolle

7. Re- Punktion falls die Liquorergebnisse negativ ausfallen, obwohl weiterhin klinisch der hochgradige Verdacht einer Multiplen Sklerose besteht.

Der typische Liquorbefund bei MS- Patient besteht aus einer autochtonen (eigenen) Immunglobulinproduktion (IgG- Index nach Delpech und Lichtblau $> 0,7$), einer normwertigen oder erhöhten Gesamtzellzahl, die aber kleiner 50 Zellen/ μ l Liquor sein muss. Nach Zelldifferenzierung zeigt sich eine Pleozytose aus Monozyten und Lymphozyten. In den meisten Fällen sind oligoklonale Banden nachweisbar.

1.4.3 Evozierte Potentiale (EP)

Mit evozierten Potentialen prüft man die Leitfähigkeit von Nervenfasern.

Hierzu wird entweder ein Sinnesorgan oder eine periphere Nervenfasern gereizt und hierbei das ausgelöste elektrische Potenzial in der Area des ZNS gemessen, welche dem Sinnesorgan oder Nerv zugeordnet ist.

Bei der multiplen Sklerose spielen vor allem die visuellen EPs (VEP) eine Rolle. Die VEPs (Latenzzeit und Amplitudenausschlag) geben Hinweise auf Funktionsstörungen im Bereich der Sehbahn und der Sehrinde.

Als visuelle Reize werden entweder repetitive Lichtblitze oder eine schwarze– weiß schachbrettmusterte Tafel mit Kontrastumkehr dargeboten.

Bei Gesunden liegt die Latenzzeit zwischen Retinareizung und kortikaler Reizung 100 Millisekunden. Bei MS- Kranken hingegen ist die Latenzzeit verlängert und/ oder die Amplitude verkleinert.

1.4.4 Diagnosefindung anhand der McDonald- Kriterien und Patientinsurveillance durch den EDSS- Score

Ein erster Leitfaden zur Diagnosefindung der multiplen Sklerose wurde 1983 von Poser et al. entworfen. In diesen flossen die Ergebnisse der Liquoruntersuchungen (oligoklonalen Banden j/n) und der VEPs ein. Trotz alledem war die Diagnosesicherung sehr schwierig, da es nicht *das* pathognomonische Krankheitsbild

oder *den* Diagnosebefund gab, was nur eindeutig bei der MS aufzufinden wäre (McDonald et al. 2001). Erst durch die Bildgebung mittels MRT was es möglich gewesen schneller die Diagnose zu stellen.

McDonald et al. erweiterten deshalb die Guidelines um die Ergebnisse der MRT-Diagnostik. Demnach wurden auch die Kriterien für einen Schub und die Zeit zwischen den Schüben definiert. Der Schub ist gekennzeichnet durch das 24 stündige Andauern der für die MS- typischen Symptome. Davon abzugrenzen ist der Pseudoschub ausgelöst durch Fieber oder virale Infekte. Das Uthoff- Phänomen beschreibt die klinische Verschlechterung der neurologischen Symptomatik durch Hitze- oder Wärmeeinwirkung. Die Zeit zwischen den Schüben muss größer gleich 30 Tage betragen.

2005 wurden die Mc Donald- Kriterien revidiert und um die Leitliniendiagnostik des klinisch isolierten Syndroms ergänzt (Polman et al. 2005). Ferner wurden die MRT-Kriterien für die Darstellung von ZNS- Kriterien sowie der räumlichen Dissemination überarbeitet (Barkhof et al. 2003; Barkhof et al. 1997).

Schübe/ Klinik	Klinisch nachweisbare Läsionen	Zur Diagnose benötigte Zusatzuntersuchungen
Zwei oder mehr	Zwei oder mehr	Keine; der klinische Befund reicht aus
Zwei oder mehr	Eine	Örtlich verteilte Läsionen im MRT oder Liquoranalyse positiv und mindestens zwei MS- typische Läsionen im MRT oder weiterer klinischer Schub
Ein Schub	Zwei oder mehr	Zeitlich versetzt auftretende Läsionen im MRT oder zweiter klinischer Schub
Ein Schub mit nur einem Symptom	Eine	Läsionen örtlich verteilt im MRT oder zwei oder mehr mit MS vereinbare MS- Läsionen und positiver Befund im Liquor sowie zeitliche Verteilung (im MRT oder durch einen zweiten Schub)

Von Anfang an chronisch-progredienter Verlauf mit Verdacht auf MS	Langsame neurologische Verschlechterung vereinbar mit MS	Ein Jahr Krankheitsprogression und zwei der folgenden Kriterien: a) c- MRT positiv (neun T2-Läsionen oder vier oder mehr T2 Läsionen mit positiven VEP) b) Spinales MRT positiv (zwei oder mehr herdförmige T2 Läsionen) c) Liquoranalyse positiv
---	--	---

Tabelle 1: Mc Donald Kriterien nach Mc Donald et al 2001, Polmann et al 2005

EDSS- Score:

Zur besseren Überwachung des Krankheitsverlaufes wurde von Kurtzke et al.1983 der EDSS- Score (extended disability status scale) entworfen.

Grad	Beschreibung
0.0	Normale neurologische Untersuchung (Grad 0 in allen funktionellen Systemen)
1.0	Keine Behinderung, minime Abnormität in einem funktionellen System (d.h. Grad 1)
1.5	Keine Behinderung, minime Abnormität in mehr als einem FS* (mehr als einmal Grad 1)
2.0	Minimale Behinderung in einem FS (ein FS Grad 2, andere 0 oder 1)
2.5	Minimale Behinderung in zwei FS (zwei FS Grad 2, andere 0 oder 1)
3.0	Mässiggrade Behinderung in einem FS (ein FS Grad 3, andere 0 oder 1) oder leichte Behinderung in drei oder vier FS (3 oder 4 FS Grad 2, andere 0 oder 1), aber voll gehfähig.
3.5	Voll gehfähig, aber mit mässiger Behinderung in einem FS (Grad 3) und ein oder zwei FS Grad 2; oder zwei FS Grad 3; oder fünf FS Grad 2 (andere 0 oder 1)
4.0	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während ca. 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
4.5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. Ganztägig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität, benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
5.0	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen (z. B. ganztägig zu arbeiten ohne besondere Vorkehrungen). (Ein FS Grad 5, übrige 0 oder 1;

	oder Kombination niedrigerer Grade, die aber über die Stufe 4.0 geltenden Angaben hinausgehen).
5.5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität zu verunmöglichen (FS Äquivalente wie Stufe 5.0)
6.0	Bedarf intermittierend, oder auf einer Seite konstant, der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene) um etwa 100 m ohne Rast zu gehen. (FS-Äquivalente: Kombinationen von mehr als zwei FS Grad 3 plus)
6.5	Benötigt konstant beidseits Hilfsmittel (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 20 m ohne Rast zu gehen (FS-Äquivalente wie 6.0)
7.0	Unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als 5 m zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt den Rollstuhl selbst und transferiert ohne Hilfe (FS-Äquivalente Kombinationen von mehr als zwei FS Grad 4 plus, selten Pyramidenbahn Grad 5 allein)
7.5	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl (FS-Äquivalente wie 7.0)
8.0	Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden; pflegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme (FS-Äquivalente Kombinationen meist von Grad 4 plus in mehreren Systemen)
8.5	Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege möglich (FS-Äquivalente wie 8.0)
9.0	Hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen, meist Grad 4 plus)
9.5	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen von fast lauter Grad 4 plus)
10.0	Tod infolge MS

Tabelle 2: EDSS-Score zur Einordnung der Behinderungsgrade der MS (www.emed-ms.de)

1.5 Therapie

Durch die Einführung der Mc Donald Kriterien konnte schneller und effektiver die Diagnose Multiple Sklerose gestellt werden. Dadurch war auch eine schnellere Therapieeinleitung möglich. Dennoch ist die Pathogenese der MS immer noch unklar, obwohl es mittlerweile verschiedenste Hypothesen gibt (siehe Kapitel Pathogenese der MS), so dass eine kausale medikamentöse Therapie immer noch nicht möglich ist.

1.5.1 Azathioprin (Imurek®)

Erstes Medikament in der Therapie der MS war neben Cortison Azathioprin (Imurek®), ein Immunsuppressivum. Azathioprin ist ein Purinanalogen sowie ein Prodrug. Es wird durch die Verstoffwechselung in der Leber in die aktive Form, 6- Mercaptopurin, überführt. Die Wirkung von Imurek® stellt sich allerdings erst nach 2 wöchiger kontinuierlicher Einnahme ein. Gehemmt werden vor allem CD8 pos. T- Lymphozyten, NK- Zellen sowie B- Lymphozyten (Dayton et al. 1991; Elion 1993).

1.5.2 Interferon- Therapie

Ein Novum in der Therapie war die Erstzulassung im Jahre 1998 des Interferon betas. Die Zulassung beschränkte sich anfangs nur für die RR- MS.

Aktuell sind drei Präparate auf dem deutschen Markt erhältlich: zu einem das Interferon beta 1b (Betaferon®; Dosierung 250µg (entsprechen 8 Mio IE) subkutan jeden zweiten Tag), sowie Interferon beta 1a (Rebif® 22µg/44µg drei mal pro Woche subcutan und Avonex® 30µg einmal pro Woche intramuskulär).

Interferon beta 1b (chemische Formel: C₉₀₈H₁₄₀₈N₂₄₆O₂₅₃S₆) wird rekombinant (E. coli) hergestellt und hat Mittelgewicht von 18,5 kD. Der Unterschied zu Interferon beta 1a besteht darin, dass an der 17. Stelle der Aminosäuresequenz die Aminosäure Cystein mit Serin ausgetauscht wurde. Ferner ist Interferon beta 1b nicht carboxyliert. Die Herstellung von Interferon beta 1a (chemische Formel: C₉₀₈H₁₄₀₈N₂₄₆O₂₅₂S₇) erfolgt durch Zellkulturen. Meist ist dies eine Zelllinie von Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, in die das humane Interferon beta transferiert wurde. Es hat ein mittleres Gewicht von 22,5 kD und ist glykosyliert. Avonex® ist mit dem humanen Interferon beta komplett identisch.

Die Wirksamkeit aller oben aufgeführten Beta- Interferone konnte durch mehrere verblindete und randomisierte Studien Klasse I (MSTKG 1999, 2002 und 2006) bewiesen werden. Durch die Applikation von Interferon beta (s.c. oder i.m.) kam es zu einer Verringerung der Schubrate als auch einer Stabilisierung, teilweise auch zu einer Verbesserung des EDSS- Scores. Diese Daten gelten allerdings nur für die RR- MS- Form.

Allerdings konnte durch die EVIDENCE- und INCOMIN- Studie belegt werden, dass die mehrmalige Gabe von Interferon beta 1a 44 µg (EVIDENCE) bzw. Interferon beta 1b (INCOMIN) einen besseren Wirkungseffekt hat als die nur einmal wöchentliche Gabe von Avonex® 30 µg.

Hinsichtlich der Dosierung von Interferon beta 1a 22 µg vs. Interferon beta 1a 44 µg einmal wöchentlich ergaben sich in der PRISMS- Studie keine nennenswerte klinische Vorteile zugunsten der höheren Dosierung (Fredmann MS et al. 2005). Bei der 22µg-Gruppe traten aber signifikant hochtitrige Spiegel von neutralisierenden Antikörper auf.

Zu den häufigsten Nebenwirkungen einer Interferon beta Therapie zählen:

1. Grippale Symptome (Myalgien, Arthralgien, Fieber und Schüttelfrost)
2. Anstieg der Leberwerte bis hin zur Interferon induzierten Hepatitis
3. Blutbildveränderungen (Lymphopenie)
4. lokale Hautreaktionen bis hin zu Nekrosen
5. Depression (Steigerung der Inzidenz durch Dosiserhöhung)

Die bisher ausgewerteten Langzeitstudien konnten retrospektiv keine Langzeitschäden durch eine kontinuierlich durchgeführte Interferon beta- Therapie zeigen. Bisher konnte keine teratogene Wirkung nachgewiesen werden. Dennoch wird die Kontrazeption bei Frauen im gebärfähigen Alter empfohlen (Fertl et al. 2008).

Mittlerweile ist die Interferon beta Therapie (Interferon beta 1a und Betaferon) für die SP- MS sowie das klinisch isolierte Syndrom ausgeweitet worden, aufgrund positiver Ergebnisse aus verschiedenen Studien (SPECTRIMS (SP-MS) sowie ETOMS und CHAMPS bzw. BENEFIT (CIS)).

Die genaue pharmakologische Wirkweise ist immer noch nicht ganz völlig geklärt. Folgende Überlegungen werden als die am wahrscheinlichsten angesehen (Arnason et al. 1994, Hartung et al. 1996):

1. Hemmung der T- Zellausreifung
2. Steigerung der Aktivität von T- Zellsuppressorzellen
3. Inhibierung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF alpha, IFN gamma)
4. Induktion von antiinflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-10 und TGF-β)
5. Verminderung der Expression von Adhäsionsmolekülen und HLA- Klasse II- Antigenen
6. Herabsetzen der Monozytenaktivität sowie deren Enzymaktivität
7. Stabilisierung der Bluthirnschranke

1.5.3 Glatriameracetat (Copaxone®)

Glatriameracetat ist ein Copolymer aus den linksdrehenden Aminosäuren: Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Tyrosin (GLAT) in einem bestimmten molekularen Verhältnis. GLAT ist vom Aufbau dem humanen myelobasischen Protein sehr ähnlich. Im Tiermodell der EAE konnte nachgewiesen werden, dass es einen inhibitorischen Effekt auf das Autoimmungeschehen hat (Teitelbaum et al. 1971). Die Wirkweise liegt darin, dass GLAT an die HLA- Rezeptoren von antigenpräsentierenden Zellen bindet, die normalerweise Myelin-reaktive T- Zellen aktivieren (Teitelbaum et al. 1988).

In einer Phase II Studie konnte gezeigt werden, dass die doppelte Dosierung (40mg täglich subkutan vs 20mg täglich subkutan) hinsichtlich des Out- comes der normalen Dosierung überlegen war (MSTKG 2006).

Das Nebenwirkungsprofil von GLAT umfasst neben den typischen Hautreaktionen und Lymphknotenschwellungen auch die sog. systemische Post-Injektions-Reaktion mit Herzrasen, Flush, Schweißausbrüchen. Hinsichtlich der Langzeitnebenwirkungen ergaben sich keine schwerwiegenden Ereignisse.

1.5.4 Mitoxantron

Mitoxantron ist ein Anthrazyklin, welches durch Wechselwirkungen mit der Topoisomerase zu DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche führt. Es ist ein Chemotherapeutikum was vornehmlich in der Behandlung von Malignomen und Leukämien (AML; HAM- Schema) eingesetzt wird. Die Wirkweise in der MS- Therapie wird hauptsächlich in der Hemmung der B- Zell Proliferation bzw. Differenzierung gesehen (Fidler et al. 1986). Da Anthrazykline kardiotoxisch wirken, muss vor der ersten Applikation sowie intermittierend ein transthorakales Echo durchgeführt werden. Die kumulative Gesamtdosis beträgt 140mg/m² Körperoberfläche. Mitoxantron findet dann Anwendung, wenn es trotz Interferontherapie zu einem Krankheitsprogress kommt.

1.5.5 Immunglobuline

Immunglobuline spielen in der heutigen MS- Therapie nur noch eine ungeordnete Rolle (MSTKG 2006).

1.5.6 Neuere Therapieoptionen

Natalizumab:

Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen α_4 - Integrin. α_4 - Integrin erkennt das sogenannte very late Antigen 4 (VLA- 4) auf zahlreichen Immunzellen. Durch die Blockierung von VLA- 4 durch Natalizumab, können nun Lymphozyten nicht mehr mit ihrem VLA-4 an das VCAM der Endothelzellen der Blut- Hirn-Schranke binden und werden somit an der Migration in das Hirngewebe gehindert. Natalizumab ist kontraindiziert bei der gleichzeitigen Gabe von Interferon beta. In der SENTINEL- Studie (Natalizumab plus Avonex) drei Patienten an einer progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) erkrankten, zwei davon tödlich. (MSTKG 2006).

Natalizumab ist für folgende Patientengruppen zugelassen (MSTKG 2006):

1. bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität trotz Interferonbehandlung
2. unbehandelte Patienten mit mindestens zwei schweren Schüben pro Jahr

Nebenwirkungsprofil: Opportunistische Infektionen und Lymphopenie. Bislang wurden 121 Fälle einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie unter einer Natalizumab- Monotherapie gezählt (Stand März 2011).

B- Zell und T- Zell gerichtete Multiple- Sklerose- Therapie:

Aufgrund der EAE- Tiermodelle wurde lange Zeit angenommen, dass vor allem T- Lymphozyten im Mittelpunkt der Pathogenese der Multiplen Sklerose stehen (Gold et al. 2006). Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass B- Gedächtniszellen (CD 20 und CD 27 positiv) bei MS- Patienten fehlreguliert sind, so dass aktivierte T- Zellen mehr aktiv sein können (Duddy et al. 2007), (Fillatreau et al 2002). Das ZNS bietet den B- Zellen optimale Differenzierungsmöglichkeiten, u.a. durch die BAFF- (B- Zell aktivierender Faktor) und APRIL- (a proliferation-inducing ligand) Produktion durch Astrozyten (Kalled et al. 2005), (Meinl et al. 2006). Durch die kontinuierliche Stimulierung kommt es v. a. in den Meningen zur Ausbildung von Pseudofollikeln mit Keimzentren. Diese Follikel wurden bei SP- MS- Patienten nachgewiesen.

Aufgrund dessen wurden verschiedene Studien mit dem CD 20- Antikörper Rituximab (Mabthera®) durchgeführt. Eine von Hauser et al. veröffentlichten Phase II- Studie konnte zeigen, dass es bei den Patienten, die Rituximab erhielten, zu einem Rückgang der kontrastmittel aufnehmenden Läsion kam. Während im Placebo- Arm neue Läsionen detektierbar waren (Hauser et al. 2008).

Rituximab ist ein chimärer Antikörper der aus den Ovarialzellen des chinesischen Hamsters gewonnen wird. Unter Rituximab- Therapie treten vor allem opportunistische Infektion und PML sowie eine Infusionsreaktion während der Rituximab- Gabe bestehend aus Schüttelfrost, Fieber, Hypotonie auf.

In Tierversuchen werden bereits Rezeptorblocker von BAFF und APRIL getestet.

Ebenfalls in der klinischen Prüfung ist der T- Zell gerichtete CD 52 Antikörper Alemtuzumab (Gold et al. 2009).

1.5.7 Therapie des akuten Schubes

In der Therapie des akuten Schub ist weiterhin eine Hochdosis Cortisonstoßtherapie Mittel der ersten Wahl (1000mg Methylprednisolon Tag 1-3)(Andersson et al. 1998; MSTKG 1999, 2002 und 2006). Die Stoßtherapie sollte nach Ausschluss eines Pseudoschubes nach spätestens fünf besser nach drei Tagen nach Auftreten der ersten klinischen Symptome (Visusverlust, Parese, Dysästhesien) durchgeführt werden. Falls nach 3 Tagen der Schub persistiert, sollte die Stoßtherapie auf fünf Tage ausgeweitet werden.

1.6 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Wie schon eingangs erwähnt, ist die multiple Sklerose eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, bei der es in Folge einer initialen Entzündungsreaktion zu einer Schädigung der Myelinscheide mit nachfolgender kompletter Demyelinisierung, Axonverlust sowie Gliose in dem betroffenen Areal (MS- Läsion) kommt (Brück et al. 2003). Die Ätiologie der Krankheitsentstehung ist immer (noch) unklar, wobei es in letzter Zeit interessante Ansatzpunkte gibt.

Die These, dass die multiple Sklerose eine Autoimmunerkrankung sei, wurde anhand es EAE- Modells (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) postuliert. Bei diesem Modell wurden Mäusen und Affen das myelin basic protein (MBP) - welches von

einigen Modellen als das krankheitsauslösende Antigen angesehen wird- appliziert. Die Versuchstiere entwickelten nach kurzer Latenzzeit MS- typische Symptome (Rivers et al. 1933), (Gold et al. 2006). Ob man das EAE- Tiermodell wirklich mit der humanen multiplen Sklerose vergleichen kann, bleibt immer noch ungeklärt (Hafler 2004).

Mittlerweile gibt es vier verschiedene Modelle durch welchen Mechanismus die Demyelinisierung hervorgerufen wird (Lucchinetti et al., 2000; Lassmann et al., 2001; Kornek und Lassmann, 2003):

- a) Makrophagen/ direkt T-Zell vermittelt durch Ausschüttung von Metalloproteasen, NO, freie Sauerstoffradikale (Uccelli et al. 2003), (Giovannoni et al 2001) (Hedegaard et al. 2008).
- b) Durch plasmazell- produzierte Antikörper v.a. MBP mit nach folgender Komplementaktivierung sowie T- Zell vermittelter Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia. Folgende T- Zell- Autoantigene in der Pathogenese der MS wurden bisher entschlüsselt (aus Visconti et al 2003):
 - Myelin basic protein (MBP)
 - Myelin-associate oligodendrocytic basic protein (MOBP)
 - Oligodendrocyte-specific protein (OSP)
 - Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)
 - Proteolipid protein or lipophilin (PLP)
 - Myelin-associated glycoprotein (MAG)
 - $\alpha\beta$ -Crystallin
 - Heat shock protein (HSP) 65
 - Heat shock protein (HSP) 70
 - 2', 3' Cyclic nucleotide phosphodiesterase
 - S-100
 - Transaldolase
- c) Distale Oligodendrogliopathie hervorgerufen entweder durch MAG (Myelin-Assoziiertes- Glykoprotein) Antikörper oder aber durch eine T- Zell vermittelte Vaskulitis.
- d) Primäre Oligodendrozytendystrophie mit sekundärer Demyelinisierung, ein nicht apoptotisch vermittelter Untergang von Oligodendrozyten. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt.

Modell c) und d) beziehen sich auf den Oligodendrozytenstoffwechsel, (wahrscheinlich hypoxisch bedingter Zelltod).

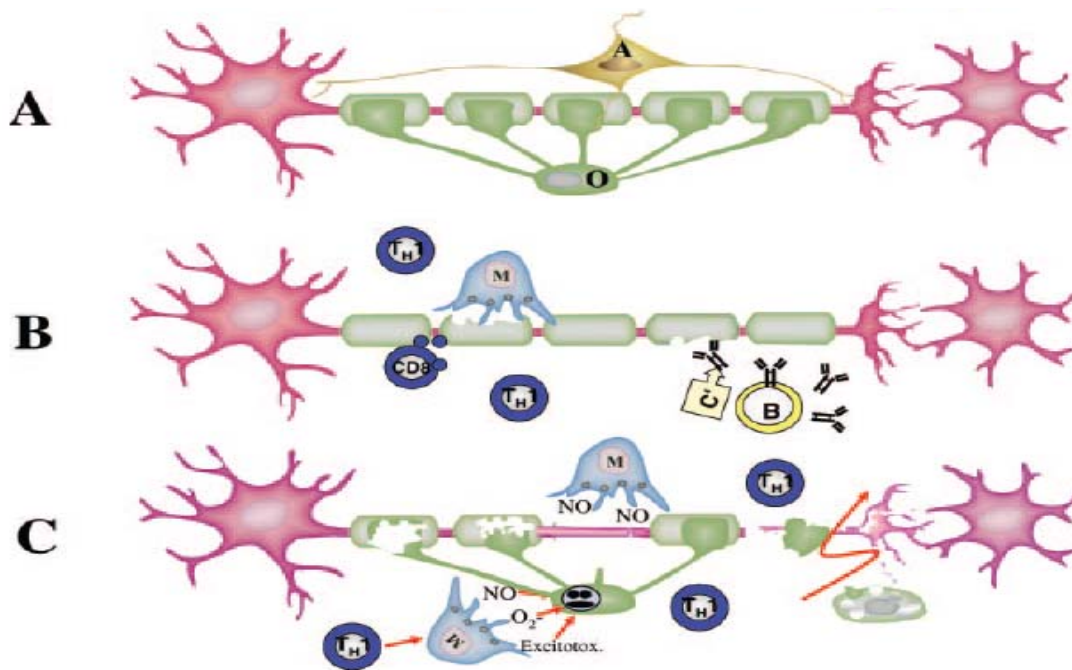


Abb.4: Pathologie der MS nach Lassmann et al. 2003

Bei all diesen vier Modellen steht die T- Zell- Antwort, insbesondere die der CD 4 positiven TH1- Zellen, am Anfang des Pathomechanismus. Der Erstkontakt mit dem Antikörper, wenn wir vom gängigsten Modell (Modell B nach Lassmann et al.) der Krankheitsentstehung ausgehen, findet in der Peripherie durch antigenpräsentierende Zellen (z.B. Langerhanszellen oder Makrophagen) statt, da zu diesem Zeitpunkt die Blut- Hirn- Schranke noch funktionsfähig ist. Im Rahmen einer zurückliegenden Infektion (siehe unten) werden die Antigene von Viren oder Bakterien durch antigenpräsentierende aufgenommen, an MHC- Klasse II Moleküle gebunden und an der Oberfläche präsentiert. Die durch das spezifische Antigen aktivierten CD 4 pos. T- Zellen können nun durch Interaktion mit den Adhäsionsmolekülen des Endothels der Bluthirnschranke (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, PECAM-1, urokinase activator- Rezeptor) in das zentrale Nervensystem migrieren (Greenwood et al. 2002). Besonders leicht überwindbare Stellen im ZNS sind die Plexus choroidei, wo der Liquor cerebrospinalis gebildet wird- deshalb auch die typischen periventrikulären Läsionen. Ferner werden durch die Zell- Zell- Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle und CD4 pos. Zelle Zytokine ausgeschüttet, welche die T- Zellen zur Proliferation (Interleukin 1) sowie zur Sekretion weiterer Zytokine (Interferon gamma, Interleukin 4) aktivieren. Je nach Interleukinausschüttung kommt es bei den CD 4 pos. Zellen zu einer

Differenzierung in TH1 oder TH2- Zellen. So fördern zum Beispiel Interferon gamma und v. a. IL 12, welches von Natural- Killer- Zellen produziert wird, die Ausbildung von TH1 Zellen und hemmen die Bildung von TH2- Zellen. Interleukin 4 wiederum hemmt die Bildung von TH1 Zellen. Für TH2- Zellen gilt das gleiche nur konträr (IL 4 fördert die TH2- Bildung usw.). Bei der MS ist das Ungleichgewicht auf der TH1- Seite (gesteigerte Interferon gamma Produktion mit nachfolgender Makrophagen- und Mikrogliahyperaktivität mit Zerstörung der Oligodendrozyten). Zur Aufrechterhaltung der Entzündungsprozesses tragen vor allem die B-Lymphozyten bei, welche initial das gleiche Antigen den T- Zellen, wie die antigen-präsentierenden Zellen auf ihrer Oberfläche an MHC Klasse II gebundenen Molekülen, präsentieren. Durch die Zell-Zell- Interaktion kommt es zu einem Immunglobulinsubklassen- Switch sowie der Ausdifferenzierung von Plasmazellen. Ferner tragen der Tumornekrosefaktor alpha, welcher von Makrophagen sezerniert wird, ebenfalls zum (intermettierenden) Entzündungsprozess bei (Archelos et al. 2000).

Schon 1972 vertrat Brody im Lancet die These einer möglichen viralen Ätiologie bei der MS- Entstehung. Es konnte in vielen verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Epstein- Barr- Virus mit im Zusammenhang stehen könnte, das sog. Epstein- Barr- Paradoxon (Ascherio et al. 2007).

Das Epstein- Barr- Virus (EBV) ist ein DNA- Virus aus der Gruppen der human Herpes- Viren. Bei einer Infektion mit EBV kann es durch das „Epstein- Barr nukleäres Antigen“ (EBNA) zu einer Kreuzantigenbildung kommen, dem sog. Mimikry; in diesem Fall das myelinbasiische Protein (Ascherio et al. 2007, Lünemann et al. 2007, Lünemann et al. 2008). Eine Kreuzantigenreaktion konnte auch beim human Herpesvirusnummer 6 nachgewiesen werden (Tejada-Simon et al. 2003). Kinder, die an neurotrope Kinderkrankheiten wie Masern, Mumps, Röteln oder Kinderlähmung erkrankt waren, haben kein erhöhtes MS- Risiko (Bager et al. 2004).

1.7 Zytokine:

1.7.1 Allgemein

Als Zytokine werden Botenstoffe verstanden mit denen Zellen miteinander bzw. untereinander kommunizieren können. Zytokine sind niedermolekulare Glykoproteine (15-25kD), die in pikomolaren Konzentration sezerniert werden und vorwiegend

parakrin (in der Nähe des Wirkortes) oder autokrin (bei der produzierenden Zelle direkt) wirken. Die heterogene Gruppe der Zytokine wird von den unterschiedlichsten Zelltypen wie z. B. von T- und B- Lymphozyten, Makrophagen aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten produziert.

Zytokine können die Differenzierung von Zellen entweder inhibieren oder aber auch fördern. Ferner wirken sie dadurch entzündungshemmend oder –fördernd, antiinfektiös, antiproliferativ oder immunregulatorisch (Thomson et al. 1994).

Zur Familie der Zytokine werden Chemokine (z. B. alle Interleukine, sowie der Granulozyten- Makrophagen- Colonie- stimulierender Faktor), Interferone, die Immunglobulinsuperfamilie, sowie die Tumornekrosefamilie gezählt.

Für jedes Zytokin gibt jeweils einen spezifischen Zytokinrezeptor, wobei verschiedene Interaktionen zwischen Rezeptor und nicht passendem Liganden beschrieben worden sind. Der Rezeptor ist ein Kommunikationsbindeglied zwischen der Außenwelt der Zelle sowie dem Nukleus der Zelle. Die Rezeptordichte als auch die Zytokinproduktion sind voneinander abhängig und unterliegen einer je nach Zytokinesekretion einer Up- oder Downregulation. Einige Autoren sehen nicht das Ungleichgewicht zwischen TH1/ TH2- Zellen zu gunsten von TH1 als entscheidende Rolle in der Krankheitsentstehung der MS, sondern viel mehr das Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen Zytokinen (IFN- gamma und TNF alfa) und antiinflammatorischen Chemokinen (IL- 10, IFN- beta, LT- alfa) (Navikas et al. 1996).

Folgende Zytokine spielen in der Pathogenese der multiplen Sklerose eine Rolle (Navikas et al. 1996), (Öznci et al. 2002) und wurden in dieser Arbeit untersucht:

1.7.2 Interferon beta und gamma

Interferone werden in zwei Klassen unterteilt. Interferon alpha, beta und omega werden als Typ I- Interferone bezeichnet, da sie größtenteils immunmodulatorisch, antiviral und antiproliferativ wirken (Rudick und Ransohoff 1996). Interferon gamma ist der einzigste Vertreter der Typ II- Interferone.

Interferon beta wird auch als Fibroblasten- Interferon bezeichnet, da es von virusinfizierten Fibroblasten produziert wird. Die Bildung von Interferon beta kann auch durch IL-1, IL- 2, und TNF induziert werden. Es ist ein ca. 20 kD schweres Glykoprotein und bindet an den gleichen Rezeptor wie Interferon alpha.

Interferon gamma: IFN gamma wird zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt, welches von TH1- Zellen, antigenpräsentierenden Zellen und NK- Zellen sezerniert wird (Schroder et al. 2004). Es dient physiologischer Weise der Makrophagenaktivierung, der Steigerung der MHC- I- Molekülexpression auf der Oberfläche von Monozyten und APZ sowie der vermehrten Aufschüttung von IL- 12, einem weiteren proinflammatorischen Zytokin. Werden TH0- Zellen mit IFN gamma stimuliert, differenzieren sie zu TH1- Zellen aus (Janeway et al. 1994). Ferner hemmt es die Bildung von TH2- Zellen, welche das humorale Immunsystem (Komplementsystem, Zytokinhemmung) kontrollieren.

Panitch et al. konnten 1984 zeigen, dass eine intravenöse Applikation von IFN gamma einen neuerlichen Schub bei MS- Patienten ausgelöst wurde. In einer Studie von Vartanian et al. 1995 wurde eine Apoptose von Oligodendrozyten durch IFN gamma direkt ausgelöst.

Der Rezeptor von IFN gamma ist CD 119.

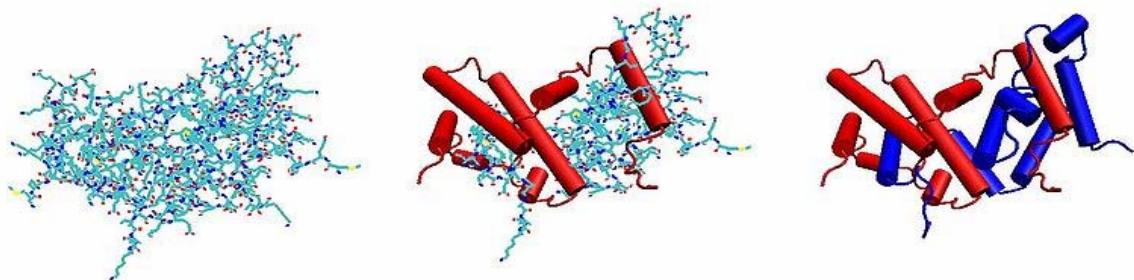


Abb. 5: Line and cartoon representation of a IFN- γ dimer (Thiel et al. 2000)

1.7.3 Tumornekrosefaktor alpha sowie der Tumornekroserezeptor I und II

Der Tumornekrosefaktor ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, welches vorwiegend von Makrophagen und NK- Zellen sezerniert wird. Es wird im ZNS auch von Astrozyten und Mikroglia produziert (Thomson et al. 1994). Es hat je nach Zielorgan unterschiedliche physiologische Wirkung. Im Thalamus wird durch das Vorhandensein von TNF alpha eine Verstellung der Solltemperatur nach oben eingeleitet, so dass Fieber entsteht, sowie das Cortisol- Releasing- Hormon ausgeschüttet mit dem Ziel einer erhöhten Cortisolserumkonzentration. In der Leber

kommt es durch die TNF alpha Einfluss zur Ausschüttung der Akutphase- Protein wie z. B. CRP und Ferritin. Ferner sorgt es bei Granulozyten, welche dem unspezifischen Immunsystem zugeordnet werden, zu einer leichteren Migration in die Peripherie durch eine Up- Regulation von VCAM- 1 und ICAM-1 (Barten et al. 1994). Makrophagen zeigen unter TNF alpha- Einfluss eine vermehrte phagozytotische Aktivität sowie eine gesteigerte Ausschüttung von Interleukin 1 sowie Prostaglandinen.

Der Effekt von TNF alpha wird möglicherweise durch Anwesenheit von IFN gamma potenziert und umgekehrt. Erhöhte TNF alpha Spiegel konnten während eines Schubes sowohl im Liquor als auch im Serum von MS- Patienten nachgewiesen werden (Rieckmann et al. 1995).

Die beiden wichtigsten Rezeptoren in der Gruppe der TNF- Superfamilie ist der TNF R1 (CD 120a) sowie der TNF R2 (CD 120b). Der TNF R1 befindet sich auf jeder kernhaltigen Zelle, während der TNF R2 jedoch nur auf Zellen der weißen Zellreihe vorkommt. Ihre jeweilige Wirkung auf die Zelle unterscheidet sich jedoch erheblich.

Beim **TNF R1** sind nach dessen Aktivierung drei Signalwege bekannt. Alle 3 Signalwege beginnen mit der Dissoziation von TRADD, einen Adaptorprotein, von TNF R1.

Je nach Aktivierungsgrad des Rezeptors durch TNF alpha, wird nun einer folgenden drei Signalwege eingeschlagen:

1. Signalweg (der Häufigste): Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) über TRAF 1 und 2 (TNF- Rezeptor assoziierter Faktor). NF- κ B ist verantwortlich für Entzündungsreaktionen, Zelldifferenzierung sowie für die Produktion von anti- apoptotischen Faktoren, die den unten aufgeführten dritten Signalweg unterbinden. Eine fehlregulierte, erhöhte NF- κ B- Produktion geht mit Autoimmunerkrankungen und Sepsis einher.

2. Signalweg: Aktivierung der Transkriptionsfaktors JNK (c-Jun N-terminal kinases), welcher zur T- Zelldifferenzierung und eine pro- apoptotische Wirkung hat.

3. Signalweg: Dieser führt über die Aktivierung der Cystein-Protease- Caspase 8 zum Zelltod. Dieser Signalweg spielt jedoch meistens eine untergeordnete Rolle. Meist wird die Caspase 8 durch die Anwesenheit von NF- κ B gespalten. Ein weitaus effektiver Weg zur programmierten Apoptose ist der Fas- Weg nach dem der TNF R6 aktiviert wurde.

Der **TNF R2** hingegen besitzt keine „Todesdomäne“ und ist für die Immunmodulation (B- Zell- Reifung etc.) verantwortlich. Signalweg hierfür ist unter 1. aufgeführt. Ferner konnte gezeigt werden, dass über die Aktivierung von TNF R2 es zur einer

Oligodendrozytenproliferation mit anschließender Remyelinisierung kommt (Arnett et al. 2001), (Sharief 1998). Eine völlige Rekonstitution wurde bisher aber noch nie nachgewiesen, da die Axone selbst schon durch die chronische Entzündungsreaktion bereits Schäden in ihrer funktionale Struktur (Ausbildung von Zell- Zell- Kontakten zwischen Nervenfasern und Oligodendrozyt) aufweisen (Chang et al. 2001).

1.7.4 Interleukin 4 und Interleukin 4 Rezeptor

Interleukin 4 wirkt in erster Linie immunmodulatorisch. Es wird von antigenpräsentierenden Zellen und Mastzellen sezerniert und lässt TH0- Zellen zu TH2- Zellen heranreifen und hemmt gleichzeitig die Bildung von TH1- Zellen (Morel and Oris 1998). Unter dem Einfluss von IL- 4, welches im folgenden von den TH2- Zellen produziert wird, erfolgt ein Immunglobulinswitch von IgM zu IgG und IgE sowie die Aufreifung von antigenspezifischen, juvenilen B- Lymphozyten zu Plasmazellen (Fujihashi et al. 1993). Sein immunmodulatorischer Effekt beruht auch darauf die Phagozytose von Makrophagen zu hemmen und die Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren wie IFN gamma und TNF alpha sowie von gewebsschädigenden Noxen wie Metalloproteasen zu verhindern (Hart 1989). Außerdem führt Interleukin 4 in ausreichend hoher lokaler Konzentration zu einer Apoptose von Makrophagen und Monozyten (Magan et al. 1994). Auch wurde nachgewiesen, dass Interleukin 4 das CD 14 auf Makrophagen downreguliert, was letztendlich zu einer verminderten Aktivierbarkeit führt (Lauener et al. 1990). Ein Mangel von IFN beta könnte ebenfalls zur Pathogenese der MS beitragen (Retzlaff et al. 2003).

Eine unverhältnismäßige hohe Ausschüttung von Interleukin verlagert das Gleichgewicht zwischen TH1- und TH2- Zellen zugunsten der TH2- Zellen. Erhöhte IL- 4 Spiegel weisen z. B. Allergiker und Patienten, die an einer Autoimmunerkrankung leiden, auf. So dass dem Interleukin 4 in der Pathogenese der MS eine Janusgestalt zugeschrieben kann/muss.

Der IL- 4 Rezeptor weist einen hohen Genpolymorphismus auf (Hackstein et al. 2001). Bestimmte IL- 4 Rezeptormutationen (R551) sollen mit der PP- MS assoziiert sein. Die Daten hierfür waren jedoch nicht signifikant dazu (Hackstein et al. 2001).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zahlreiche klinische Studien zeigten, dass Interferon β - Präparate die Grundaktivität der RR- MS- Erkrankung stabil halten oder senken können, so dass es letztendlich zu einer geringeren Schubrate, als auch zu einer Verlangsamung der Progredienz der Erkrankung kommt (Befundkonstanz der MRT- Bildgebung, Stabilisierung des EDSS- Scores).

Da es bei MS- Patienten im klinischen Alltag große interindividuelle Unterschiede hinsichtlich Krankheitsverlauf und Ansprache auf eine immunmodulatorische Therapie gibt, sollte im Immunprofil von untherapierten und therapierten Patienten nach möglichen Ursachen gesucht werden.

Findet eine Verschiebung des Th1/Th2- Gleichgewichtes zu Gunsten einer gesteigerten Th2- Antwort statt (Theorie 1)?

Oder wird mit Hilfe einer Interferon beta Therapie die Dysbalance zwischen Interferon gamma und beta ausgeglichen (Theorie 2)?

Desweiteren sollten die Auswirkungen einer Interferon beta- Therapie (Interferon beta 1a 22 μ g gegen 22 μ g/44 μ g) im Sinne einer Dosis- Wirkungsbeziehung auf das Genexpressionsmuster und das klinische Erscheinungsbild von MS- Patienten dargestellt werden. Durch die kontinuierliche Gabe von exogenem Interferon beta wird eine physiologische Downregulation von endogenem Interferon beta m- RNA Transkription vermutet, wie dies bereits für viele andere Hormone (z.B. Cortison, Thyroxin etc.) bekannt ist.

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 12 Monaten, bzw. das Interferon beta 1a 22 μ g/44 μ g über 24 Monaten, beobachtet.

In peripheren Leukozyten wurde alle 3 Monate die m- RNA- Menge von folgenden Parametern gemessen: Interleukin 4, Interleukin 4 Rezeptor, Interferon beta und gamma, TNF- Rezeptor 1 und 2, sowie PBDG als Housekeeping (siehe Kap. 2) bestimmt.

Die Bestimmung der klinischen Daten (mittlerer Schubrate, EDSS- Score) erfolgte ebenfalls alle 3 Monate in unserer MS- Sprechstunde.

2. Material und Methode:

2.1. Allgemeines

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde ein Immunprofil von therapierten und untherapierten MS- Patienten erstellt. Hierzu wurde den Patienten der MS-Sprechstunde vierteljährlich während der Routineblutentnahme aus einer peripheren Vene zusätzlich Edta- Blut sowie Serum zu Studienzwecke entnommen und in einer Biodatenbank bei – 40 °C eingelagert. Nach ausführlicher Aufklärung der Patienten über Ablauf und Ziele der Studie erfolgte bei Zustimmung eine Unterzeichnung der schriftlichen Einverständniserklärung vor Studienbeginn.

Für dieses Projekt lag auch ein positives Votum der Ethikkommission (Antrag 60/99) des FB Medizin der Justus- Liebig- Universität Gießen vor.

2.2. Patientenkollektiv

Kollektiv	Unbehandelt	Interferon beta 1a 22µg	Interferon beta 1a 22/44µg	Signifikanz
Gruppenumfang (n=)	16	17	17	ns
Frauen / Männer	15 / 1	15 / 2	13 / 4	ns
Durchschnittsalter [y]	48,77 ± 7,61	46,36 ± 7,33	45,59 ± 8,56	ns
Alter bei Erstdiagnose	31,37 ± 6,03	33,71 ± 8,45	32,33 ± 5,88	ns
Alter zu Studienbeginn (T0) [y]	37,85 ± 7,90	37,63 ± 6,92	36,01 ± 8,24	ns
Dauer der MS [y]	17,40 ± 6,30	13,27 ± 4,14	12,64 ± 6,74	p<0,01
EDSS	1,34 ± 0,91	1,97 ± 1,55	1,79 ± 1,60	ns
Schübe in den letzten 2 Jahren	2,50 ± 1,21	2,12 ± 0,99	2,59 ± 1,32	ns
MS-Form	RRMS	RRMS	RRMS	

Tabelle 3: Patientenkollektiv

Es wurden insgesamt 50 Patienten untersucht, die alle sicher an der schubförmigen MS-Form erkrankt waren. Das klinisch isolierte Syndrom oder die PP- MS galten als Ausschlusskriterium.

Die unbehandelte Gruppe sowie die Interferon beta 1a 22µg- Gruppe wurde über 12 Monate beobachtet. Hierbei wurden insgesamt pro Patient fünf Blutentnahmen durchgeführt (T0= Blutentnahme vor Therapiebeginn; T2- T5 während der Therapie).

Ebenso wurden im Rahmen des vierteljährlichen Besuches in der MS-Spezialsprechstunde die in die Studie eingeschlossenen Patienten von einem Neurologen klinisch untersucht und der jeweilige aktuelle EDSS- Score ermittelt. Die Schubrate wurde aus den stationären Aufenthalten bestimmt bzw. aus den Ambulanzarztbriefen der MS- Sprechstunde.

2.3. Methodik

Bei dieser Arbeit wurden drei verschiedene Labormethoden angewendet, zum einen die RNA-Isolation aus peripheren Leukozyten, die Synthese von cDNA aus der isolierten RNA sowie die quantitative Bestimmung der cDNA mit dem Lightcycler der Firma Roche.

Die Isolierung von leukozytärer RNA erfolgt in mehreren Arbeitsschritten mittels QIAamp RNA Blood Mini Kit®:

2.3.1 Leukozytengewinnung

Wie Eingangs erwähnt, fand während unserer MS-Sprechstunde die Entnahme von 2,5 ml EDTA-Blut durch qualifiziertes Personal statt.

1,5 ml dieses EDTA- Blutes werden in einem RNase freien 15ml Röhrchen mit 7,5ml EL-Puffer versetzt, damit die im Vollblut enthaltenen Erythrozyten lysierten. Die Lyse der Erythrozyten erfolgt in der Regel 10-15 min auf Eis. Die nun durchsichtige, himbeergelee- farbige Suspension wird bei 400 x g und 4°C 10 min lang zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht am Boden des Röhrchen ein Pellet bestehend aus Leukozyten und Resterythrozyten. Der Überstand wird verworfen. In einem zweiten Waschschritt erfolgt schließlich die makroskopische Entfernung aller Erythrozyten. Dazu wird 3 ml des oben erwähnten Erythrozytenlysis Puffer auf das Pellet gegeben. Das Pellet wird vorsichtig mit dem Vortexer vom Boden gelöst und wieder für 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Die Leukozyten liegen nach der Zentrifugation wieder als Pellet vor und der Überstand wird wiederum verworfen, erst grob und zum Schluss nach vorheriger kurzer Zentrifugation mittels Pipette vollständig entfernt. Dies ist nötig, da sich der eventuell noch vorhandene Überstand durch Verunreinigung negativ auf die RNA- Isolation auswirken könnte.

Die Lyse der Leukozyten erfolgt mit 600 µl RLT-Puffer (enthält 350 µl Mercaptoethanol). Das entstandene Lysat wurde bei - 86°C eingefroren und gelagert.

2.3.2 RNA- Isolation

Das eingefrorene Lysat wird bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend im QIAshredder während einer zwei minütigen Zentrifugation ($20.000 \times g$) homogenisiert. Das gewonnene Lysat wird mit 600 μ l 70%-igem Ethanol versetzt. 600 μ l des Lysat-Ethanol- Gemisches wird nun auf eine Silica- Membran Säule, welche die RNA bindet, aufgebracht und für 15 sec. bei $> 8000 \times g$ zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit den übrigen 600 μ l auf die selbige Membransäule wiederholt, da das Fassungsvermögen eines Tubes nur 700 μ l beträgt.

Der Durchfluss wird ebenfalls verworfen. Der erste Waschgang erfolgt mit 350 μ l RW1- Puffer und einer 15 sekündigen Zentrifugation bei $> 8000 \times g$. Der Durchlauf wird erneut entfernt. Um die jeweiligen DNA- Reste oder Verunreinigungen zu beseitigen wird ein DNA- Verdau durchgeführt. Dazu wird ein Gemisch aus 10 μ l DNase und 70 μ l RDD- Puffer auf die Säulen aufgebracht und für 15 min inkubiert (Ansatz für DNase: Pulver mit 550 μ l Wasser versetzen).

Nach dieser Inkubationszeit erfolgt eine erneute Waschung mit 350 μ l RW1- Puffer und 15 sec. Zentrifugation ($> 8000 \times g$). Der Durchlauf wird verworfen.

Mit jeweils 500 μ l RPE- Puffer (bei Neuanbruch des Puffers, diesen mit dem mitgelieferten Ethanol vermischen) werden die Säule erneut nacheinander zweimal gewaschen. Die erste Waschung bei 15 sec Zentrifugation ($> 8000 \times g$); die zweite bei max. Zentrifugendrehzahl und 3 min Laufzeit. Der Durchlauf wird jeweils verworfen. Die Säule wird nun auf ein 1,5 ml Eppendorf überführt und mit 50 μ l Rnase- freiem Wasser versetzt, welches mittig auf die Membran aufgetragen wird. Nach einminütiger Inkubationszeit wird die Säule wieder zentrifugiert (1 min 15 sec bei $> 8000 \times g$). Dieser Durchlauf enthält jetzt die gewonnene RNA.

2.3.3 cDNA- Synthese (Reverse Transkriptionsreaktion):

Die cDNA- Synthese erfolgt in speziellen PCR- Tubes im PCR- Thermalcycler PCR-sprint von Hybaid.

Zuerst werden 9,5 μ l der zuvor gewonnen RNA mit 1 μ l Oligo dT₁₂₋₁₈ versetzt, für 20 Sekunden bei 3000 rpm und 10° C zentrifugiert. Dabei erhält man 4 Ansätze pro Probe (50 μ l Ausgangsmenge der RNA).

Die Proben werden nun für 10 min bei 70° C (Programm RT1) im Thermalcycler inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Proben auf Eis abgekühlt.

Anschließend werden 9,5 µl Mastermix zu dem ausgekühlten RNA- Oligo dt- Mix pipettiert.

Für die Ansetzung des Mastermixes benötigt man Reagenzien, die bei Zimmertemperatur vollständig aufgetaut wurden:

4 µl 5 x Reactionbuffer (1 x)

2 µl DTT (0,1M)

2 µl dNTP- Mix (0,5 µM each Nukleotid)

0,5 µl Rnase- Inhibitor (20 U)

1 µl SuperScript Rtase (200U)= Enzym für die reverse Transkription

Dieser Ansatz hat nun eine Gesamtmenge von 20 µl, welcher nun wieder für 20 Sekunden bei 3000 rpm 10° C herunterzentrifugiert wird.

Im Programm RT2 im Thermalcycler erfolgt nun die eigentliche reverse Transkriptionsreaktion.

Dieses Programm läuft in folgenden Schritten ab:

10 min 35° C= Inkubationszeit

60 min 42° C= cDNA- Synthese

5 min 95° C= Denaturierung des Enzyms

Hold 4°C= Lagerungstemperatur

Nach Ablauf der Synthese werden die Proben bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -18° C eingefroren.

Prinzip der Reversen- Transkription:

Von Ross et al. und Verma et al. wurden 1972 die ersten Protokolle zur Synthese von copy- DNA (cDNA) entwickelt. Diese cDNA stellt eine Kopie der eigentlichen mRNA da und ist bei Weitem weniger anfällig gegen äußere Einflüsse als mRNA.

Es muss jedoch dabei beachtet werden, dass nicht jedes Genprodukt in der cDNA gefunden werden kann, da diese nur eine Momentaufnahme der aktuellen Kernaktivität

wiederspiegelt, bzw. sich die unterschiedlichen Zelltypen von ihrer Genaktivität unterscheiden.

In unserem ersten Arbeitsschritt der cDNA- Synthese wurden die RNA mit Oligo dT₁₂₋₁₈ versetzt. Dies dient zum einen dazu, dass nur die RNA markiert wird, die einen Poly-A Schwanz am 3' Ende aufweist (und die komplementierende Base zu A ist T), zum anderen aber auch als Primer für die Reverse Transkriptase. Diese synthetisiert nun beginnend vom 3' Ende der mRNA die cDNA. Die nun die Sequenz in 5' nach 3' Richtung codiert.

Die meisten Reversen Transkriptasen (RTase) besitzen noch eine Rnase- Aktivität, die die mRNA in kleinere Stränge spaltet und so die cDNA- Synthese verringert. Durch Zugabe des Rnase- Inhibitors wird nur noch eine geringe Restaktivität beobachtet.

Bei der Denaturierung (5 min bei 95° C) wird die RT-ase zerstört und die mRNA-cDNA- Matrize voneinander getrennt. Die Einfachstrang- DNA wird in Doppelstrang DNA umgewandelt.

2.3.4 Quantitative PCR (Real- Time PCR) unter Verwendung eines externen Standards, sowie PBDG als Housekeeping- Gen

Benutzt wurde das Lightcycler FastStart DNA Master Hyb-Probe kit der Firma Roche.

Mit der Real- Time PCR wurden folgende Parameter untersucht: IL- 4 und IL- 4 Rezeptor, IFN beta und gamma, TNF R1 und R2 sowie PBGD als Housekeeping- Gen.

Als Reagenzien wird ein Mastermix, den Standard des zu messenden Parameters, H₂O, zu messenden Patienten cDNA- Proben benötigt.

Die Reagenzien werden vor Benutzung bei Raumtemperatur aufgetaut und herunterzentrifugiert. Zu beachten ist, dass das LightCycler FastStart Enzym (1a) in den LightCycler FastStart Reaction Mix Hyb-probe (1b) pipettiert werden muss.

Mastermix- Ansatz für eine Lightcycler- Kapillare= 1 Probe/ Standard/ Negativkontrolle:

9,6 µl*	H ₂ O	
2,4 µl*	MgCl ₂	(4 mM)
1,0 µl	Primer F	(0,5 µM)
1,0 µl	Primer B	(0,5 µM)
1,0 µl	Hy- Probe 3'FL	(0,15 µM)
1,0 µl	Hy- Probe 5'LC640	(0,15µM)
2,0 µl	FastStart DNA- Master Hy-probes	(1µM)

* bei TNF R2 ändert sich der Ansatz für den Mastermix (statt 9,6 µl H₂O werden nur 8,8 µl pipettiert und statt 2,4 µl MgCl₂ werden 3,2 µl pipettiert).

Zu diesem Mastermix wird je nach Kapillare entweder 2 µl H₂O (dient als Negativkontrolle) oder 2 µl Standard bzw. 2 µl Patienten cDNA gegeben.

Pro Lightcycler- Lauf muss eine Position mit H₂O als Negativkontrolle und 2 Positionen (besser noch 3, um eventuelle Schwankungen des Standards ausgleichen zu können) mit Standard besetzt werden, um den Lauf validieren zu können. Insgesamt können 32 Positionen belegt werden, so dass nach Abzug von Kontrolle und Standard 28 Proben pro Lauf gemessen werden können.

Mit der Lightcycler- Software kann der Lauf im System abgespeichert und die Proben beschriftet werden. Außerdem ist noch die Negativkontrolle im Lauf zu markieren und die Standards sowie deren Konzentration auszuweisen. Alle Standards bis auf TNF- R2 haben eine Konzentration von 10E3 (TNF- R2 10E4).

Das Lightcycler –Programm verläuft je nach Parameter in folgenden Schritten:

Pre-incubation step: 95° C; 10 min

Zyklus:

- a) Denaturierung: 95° C, 10 sec.
- b) Annealing: 60° C, 10 sec.
- c) Elongation 72° C, 15 sec,

Das LightCycler- 2.0 System:

Das LightCycler System besteht aus einer PCR- Einheit, einem Fluorimeter und einer Lichtquelle (Wittwer et al 1997).

Die PCR- Einheit des LightCycler benutzt Luft zum Kühlen als auch zum Erhitzen es Kapillarinhaltes. Dabei wird Luft über einen Schlitz auf der Rückseite des Gerätes angesogen durch eine Heizspirale, die sich in der Mitte des LightCycler Karoussells befindet, erhitzt. Durch die geringe Wärmekapazität der Luft können Temperaturerhöhungen bzw. –erniedrigungen von bis zu 20° C pro Sekunde erreicht werden. Die Temperaturerniedrigung erfolgt durch einen hohen Flow der eingesaugten, nicht erhitzten Luft.

Die Temperaturübertragen von der Luft auf die Flüssigkeit geschehen ohne größere Zeitverzögerungen, da die Wände der Glaskapillare sehr dünn sind und Glas ein guter Wärmeleiter ist.

Die Lightcycler- Einheit bietet Platz für 32 Kapillare, die vor Beginn des Laufes auf eine Rotoreinheit gesteckt werden. Während der Messung bewegt sich der Rotor, so dass jede der 32 Kapillaren exakt auf der optischen Einheit des Systems platziert werden kann.

Die Quantifizierung der Proben erfolgt durch die Bestimmung der Fluoreszenz mit Hilfe eines Flurimeters. Das Flurimeter besteht aus einer blauen LED- Leuchte, die Licht von einer Wellenlänge von 470 nm aussendet, welches durch den Primer mit dem FC- Ende emittiert wird. Treffen nun FC-Ende sowie das LC- Ende der beiden Hyb- probes aufeinander, wird nun das LC-Ende ebenfalls zum fluoreszieren angeregt. Die LC- Fluoreszenz wird nun von der optischen Einheit detektiert. Die LC- Fluoreszenz ist somit ein Maß für die Gesamtmenge an aktuell vorhandenen Genkopien. Durch die optische Einheit, die Filter und die Glaskapillaren dauert die Messung pro Kapillare 20 ms.

Die optische Einheit des LightCyclers 2.0 ist ein 6- Kanal Photometer, welches Licht der Wellenlänge 530 nm, 560 nm, 610 nm, 640 nm, 670 nm und 705 nm detektiert.

Real-Time PCR:

Mit der normalen PCR- Technologie kann zwar eine Vervielfältigung von Genprodukten erfolgen. Die Endmenge des zu analysierenden Genproduktes ist jedoch unabhängig von der Ausgangsmenge (Kubista et al. 2006), (Aldape et al. 2002).

1992 wurde von Higuchi et al. ein PCR- System entwickelt, bei dem gleichzeitig eine Vervielfältigung des gewünschten Genproduktes sowie eine Detektion und Quantifizierung erfolgen kann. Pro Zyklus kann anhand der Fluoreszenz die aktuell vorhandene DNA- Menge gemessen werden.

Higuchi und seine Mitarbeiter statteten eine herkömmliche PCR- Maschine mit einer UV- Lichtquelle sowie einer CCD- Kamera aus. Als Fluoreszenzmittel diente Ethidiumbromid, welches beim Einbau in die Doppelstrang- DNA zu fluoreszieren beginnt.

Heute gibt es zwei unterschiedliche Ansätze, die entweder unspezifischer oder spezifischer Natur sind.

SYBR- Green one:

SYBR- Green ist unspezifischer Natur. Vorteile von SYBR- Green sind Kostengünstigkeit, die Universalität, da es unspezifisch in die Doppelstrang- DNA eingebaut wird, sowie die hohe Signalstärke, da mehrer SYBR- Green- Moleküle in die DNA eingebaut werden können. Nachteile ergeben sich daraus, dass man nicht zwischen Artefakten (Primerdoppelstränge an die sich auch SYBR- Green- Moleküle binden können) und ampliziertem Genprodukt wegen der nicht spezifischen Gensequenz unterscheiden kann. Eine Unterscheidung zwischen Artefakt und Genprodukt kann in der anschließenden Untersuchung der Schmelzkurven stattfinden. Das Prinzip hierbei ist dass jede DNA ihren spezifischen Melting- point (Schmelzpunkt) besitzt, bei dem die Hälfte der zu untersuchenden DNA zu zwei Einzelsträngen denaturiert.

Der melting point ist abhängig von der Sequenzlänge, dem GC- Gehalt, dem pH- Wert der Lösung wie deren Salzgehalt, v. a. des darin enthalten Magnesiumchlorids.

Die Bestimmung der Schmelzkurve wird im Anschluss an den PCR- Lauf durchgeführt. Hierzu erhöht das Lightcyclergerät schrittweise die Temperatur. Durch die Denaturierung der DNA nimmt die Fluoreszenz sprunghaft ab (SYBR- Green bindet nur an ds- DNA), was mittels Photometer gemessen wird, so dass man zwischen Artefakten und Genprodukt unterscheiden kann.

Hyb- probes:

Hyb- probes sind hochspezifische Hybridisierungssonden die an ausgewählte Bereiche der zu untersuchenden Gensequenz binden. Hyb- probes bestehen aus einer vorher bestimmten kleinen Oligonukleotidsequenz.

Man unterscheidet bei den Hyb- probes zwischen einem Donator (Reporter) und einem Akzeptor auch Quencher genannt. Der Donator und der Akzeptor enthalten an dem gegenseitig zugewandten Ende jeweils ein Fluorochrom (das kurzwellige Fluorescein am 3' Ende als Donator- Fluorochrom sowie das LC 640 red als Akzeptor- Fluorochrom am 5' Ende). Das Donator- Fluorochrom wird durch eine Lichtquelle, welches kurzwelliges Licht aussendet, zum Leuchten angeregt. Das nun fluoreszierende Donator- Fluorochrom überträgt nun strahlungsfrei die Energie auf das LC 640 red Molekül, welches nun Licht der Wellenlänge 640 nm emittiert, welches vom Fotometer des Lightcycler detektiert wird. Diesen Vorgang der strahlungsfreien Energieübertragung mittels Dipol- Dipol- Übertragung zwischen Fluorochromen wird als FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) bezeichnet. Der FRET kann nur stattfinden, wenn die Distanz zwischen den beiden Fluorochromen kleiner gleich 3 Nukleotide beträgt.

Die Hyb- probe Anlagerung erfolgt im Rahmen des Annealings. Die Messung der abgegebenen Fluoreszenz am Ende des Annealings. Freie Donatorsonden emittieren zwar auch Licht, was im Allgemeinen als Hintergrundfluoreszenz bezeichnet wird, ein FRET findet aber aufgrund der großen Distanzen nicht statt.

Die jeweiligen Hyb- probessequenzen der zu untersuchenden Gene wurden aus den Datenbanken NCBI PubMed und hrprd (Human Protein Reference Database) entnommen.

Primer:

Um eine PCR- Reaktion durchführen zu können, benötigt man eine so genannte Startsequenz, den Primer, die sich an die denaturierte DNA anlagert. Primer sind zwischen 17- 24 Nukleotide lang und binden hochspezifisch an das zu untersuchende Zielgen. Ferner besitzt ihr 3' Ende eine Hydroxy- Gruppe, welche die Taq Polymerase für ihre erste Verknüpfungsreaktion benötigt.

Je kleiner die Primersequenz ist, desto spezifischer bindet der Primer an die Zielgenregion. Um eine maximale Effektivität erzielen zu können, müssen unspezifische Primeranlagerungen vermieden werden.

Die ideale Primerlänge ist abhängig von dem Gehalt an Adenosin und Cytosin sowie von der jeweiligen Schmelztemperatur.

Beim Primerdesign sollte folgendes beachtet werden (nach Innis und Gelfand 1990):

- 1) optimale Primerlänge sollte 17- 28 Basenpaare betragen
- 2) der Gehalt von Guanin (G) und Cytosin (C) sollte 50-60% betragen
- 3) der Primer sollte am 3' Ende mit G oder C, oder GC bzw. CG enden
- 4) die Schmelztemperatur ist zwischen 55°C und 80°C anzustreben
- 5) ebenso Poly- C oder Poly- G Schwänze am 3' Ende vermieden werden, da dies zu Instabilitäten führt.
- 6) Die 3' Enden von Primer sollten nicht komplementär zu einander sein, um Primerdimere zu vermeiden.
- 7) Forward- und Backwardprimer sollten sich nicht den gleichen Abschnitt anlagern können, da dies ebenfalls zur Bildung von Primerdimeren führt.
- 8) Eine Komplementarität von 3'- und 5' Ende sind zu vermeiden, da dies die Bildung von sekundär Strukturen wie Haarnadelschleifen oder Homodimeren fördert.

Die jeweiligen Primersequenzen der zu untersuchenden Gene wurden aus den Datenbanken NCBI PubMed und hrprd (Human Protein Reference Database) entnommen.

Gen	Primer- Bezeichnung	Sequenz (in 5'-3' Richtung aufgeschrieben)	Frequenzlänge in Basenpaaren (bp)	Bindet von
PBGD (Porphobilinogen- Desaminase)	8Fa	tgc aac ggc gga aga aaa c	313	51- 69
	3,1R	ggc tcc gat ggt gaa gcc		346-363
	FL (hyb-probe)	agt gga cct ggt tgt tca ctc ctt gaa-FL		294-320
	LC (hyb-probe)	640-acc tgc cca ctg tgc ttc ctc ct		323-345
IL-4	F	tgc ctc caa gaa cac aac tga	227	237-257
	R	cca acg tac tct ggt tgg ctt		443-463
	FL	cct tct cat ggt ggc tgt aga act ggc-FL		372-395
	LC	640-agc aca gtc gca gcc ctg cag aag		398-420
IL-4 Rezeptor	F	cgt ctc cga cta cat gag cat ct	211	344-366
	i4R	cca cag gtc cag tgt ata gtt atc c		530-554
	FL	ttc tgc tct ccg aag ccc aca cgt-FL		372-395
	LC	640-atc cct gaa gaa caa cgg agg cgc		398-420
Interferon gamma	F	gca tcc aaa aga gtg tgg ag		392-411

	R	gca ggc agg aca acc att ac		627-642
	FL	tcc aac gca aag caa tac atg aac tc-FL	251	509-535
	LC	640-tcc aag tga tgg ctg aac tgt cg		536-549
Interferon beta	SE (F)	gcc gca ttg acc atc tat gag a		226-247
	as®	gag atc ttc agt ttc gga ggt aac	346	548-571
	FL	agc cag gag gtt ctc aac aat agt ctc at-FL		302-330
	LC	640-cca gcc agt gct aga tga atc ttg tct g		273-300
TNF R1	F2	gag aga tag tgt gtg tcc cca ag		398-421
	R2	caa tct ggg gta ggc aca a		860-879
	FL	cac ggt ccc att gag gca ga- FL	482	723-743
	LC	640-gct gca att gaa gca ctg gaa aag		698-722
TNF R2	S	gcg tgg cca gac cag ga		532-549
	R	cag gga tgg cca cca cgt ta		643-663

	FL	gga cgt tct cca aca cga ctt cat cc-FL	132	589-615
	LC	640-cgg ata ttt gca ggc ccc acc		616-637

Tabelle 4: Primer und Hyb- probe Sequenzen

Polymerase-Ketten-Reaktion

Durch die Erfindung der PCR im Jahre 1983 durch Mullis wurde die Biotechnologie revolutioniert (Mullis et al. 1983). Denn durch sie gelang es geringste DNA- oder auch RNA- Mengen in dem Maße zu vervielfältigen, um sie nachweisen zu können. Dazu beigetragen hat auch die Entdeckung der Taq- DNA- Polymerase. Ein Enzym des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*, welches auch bei Temperaturen von 100°C weiter funktionsfähig bleibt.

Durch spezifische Primer werden nur die DNA- oder RNA- Sequenzen repliziert, welche man auch detektieren möchte.

Ein PCR-Zyklus verläuft in der Regel in drei Schritten:

1. Denaturierung: Die Trennung der DNA-Doppelstranghelix erfolgt bei Temperaturen um 95°C. Die Denaturierung ist notwendig, da die Taq-Polymerase nur an DNA- Einzelstränge binden kann und diese auch nur in der 3' nach 5'- Richtung verlängern kann.
2. Annealing: Als Annealing wird die Bindung des Primers an die für den Primer spezifische DNA- Sequenz bezeichnet. Bei jeder PCR gibt es einen Vorwärtsprimer und einen Rückwärtsprimer. Der Vorwärtsprimer bindet an den 3'- 5' Strang und der Rückwärtsprimer an den 5' 3' Strang. Das Annealing findet bei Temperaturen zwischen 50°C und 75°C statt. Die Optimaltemperatur ist vom GC- Gehalt des Primer sowie von dessen Länge abhängig.

3. Polymerisation: Die DNA- Synthese verläuft bei Temperaturen um 70°C. Dabei dienen die Primer als Startpunkt für die hitzestabile Taq- Polymerase. Als Substrat dienen die vier Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP). Bei diesen Temperaturen kommt es nicht zu einer Primerablösung, da diese bei Erreichen der Temperatur schon von der Polymerase verlängert worden sind. In einer Minute Polymerisationszeit wird der Strang um ca. 2 kp verlängert. Nach einer Zeit von ca. 30 min sind etwa 10^5 Zielsequenzen vervielfältigt worden. Folgende Formel kommt dabei zum Einsatz zur Berechnung der Zykluszeit bzw. der Zielmolekülanzahl:

$$c_n = c_0(1+x)^n;$$

c_n = Konzentration der vervielfältigten DNA;

c_0 Ausgangskonzentration der DNA; n = Zyklusanzahl; x = Amplifikationsfaktor, wobei dieser kleiner gleich eins sein muss.

4. Denaturierung bei 95° C. Allgemein gilt: Anzahl der neu entstanden Kopien: 2^n .

Quantifizierung:

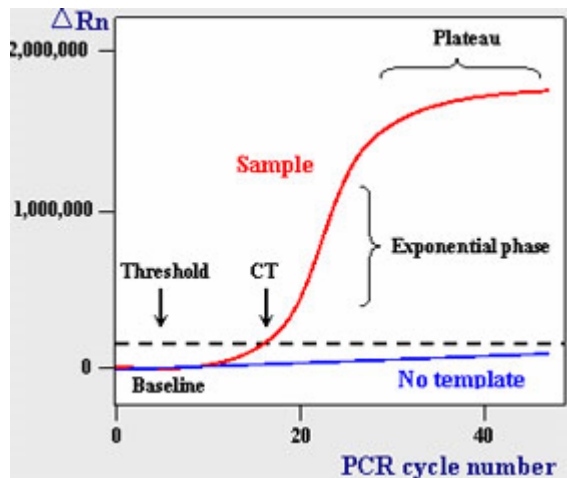


Abbildung 6: Quantifizierung der Real- time PCR; y- Achse: ΔRn Anzahl der DNA- Kopien in arbitrary units; x- Achse: Anzahl der PCR Zyklen (www.ionchannels.org/content/images/14-02.jpg)

Die Quantifizierung des Genproduktes verläuft sigmoidal.

Anfangs verläuft die PCR- Reaktion linear aufgrund der geringen Ausgangsmenge. Wird jedoch die Schwelle (Threshold) von 0,1 AU (arbitrary units) erreicht, nimmt die Kurve einen expotenziellen Verlauf. Der Ct- Wert (Cycle- Threshold) beschreibt den

Zyklus, an dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, bzw. enthalten alle eingesetzten Reaktionsgefäße am Ct- Werte die gleiche Menge an neu-synthetisierter DNA.

Zu Beginn eines Real- time PCR Laufes wird die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Diese entsteht durch die Lichtemission der Donorfluore der Hyb- probes bzw. durch den Einsatz von SYBR- Green I. Je mehr Genausgangsprodukte vorhanden sind, desto kleiner ist der Ct- Wert, desto schneller wird der steady state bzw. das Plateauphase erreicht. Gründe für die Plateauphase sind Produktfragment-hybridisierungen oder Substratverbrauch (Primer v. a.).

Bei der Real Time- PCR werden nicht die absoluten PCR- Genprodukte quantifiziert, sondern vielmehr der sigmoidale Verlauf der gesamten PCR- Reaktion. Als Richtwert dient der Ct- Wert, da zu diesem Zeitpunkt optimale Bedingungen herrschen und die Amplifizierung der Genprodukte exponentiell ansteigt.

Bei jedem PCR- Lauf werden bekannte Templatemengen, die sogenannten Standards, meist in der Mengengrößenordnung 10^3 bis 10^4 , mit detektiert. Jeder Standard weist einen spezifischen Ct- Wert auf. Anhand des Ct- Wertes des Standards lässt sich eine Standardkurve erstellen, aus der sich erschließen lässt, bei welchem Ct- Wert welche Genproduktmenge erzielt wird.

Ferner ist der Ct- Wert abhängig von der Ausgangsmenge an Templates.

Bei der Real- time PCR Auswertung unterscheidet man zwischen einer absoluten und relativen Quantifizierung (Livak et al. 2001).

Bei der absoluten Quantifizierung unter zu Hilfenahme einer Standardkurve, im Sinne einer Verdünnungsreihe, wird die vorhandene Genmenge berechnet.

Die relative Quantifizierung stellt die genaueste Form der Genexpressionsbestimmung dar, da sie die Expression des zu untersuchenden Gens mit der eines nichtregulierten Gens, dem sog. Housekeepinggen (HKG) s. u., vergleicht. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse (Rasmussen et al. 2001, Pfaffl et al. 2001).

Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf (Pfaffl et al. 2004).

Eine weitere Optimierung der relativen Quantifizierung erfolgt durch die Hinzunahme von Real- Time Effizienzen. Die Bestimmung der Real- Time Effizienz kann durch vier Methoden ermittelt werden (Pfaffl et al. 2004):

- 1) Berechnung anhand einer Verdünnungsreihe
- 2) Berechnung anhand des absoluten Fluoreszenzanstieges
- 3) Berechnung anhand mathematischer Algorithmen
- 4) Berechnung anhand des expotenziellen Modells

Als Grundlage der Methoden 2- 4 dient jeweils die typische Real- time Kurve.

In der hier vorliegenden Dissertation wurde die Effizienz anhand der Verdünnungsreihe nach folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgt über die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Ratio:

ΔC_T : C_T Zielgen- C_T Housekeepinggen

$\Delta\Delta C_T$: ΔC_T Probe- ΔC_T Standard

Ratio: $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Aus dem Effizienz- korrigierten Modell nach Livak et al. 2001 ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{P_{\text{Zielgen}}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{P_{\text{Referenzgen}}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Abb. 7: Effizienz- korrigiertes Modell nach Livak

Mit Hilfe der Light-Cycler 4.0/4.05 Software ergibt sich folgende Formel:

Ratio: Expression zu untersuchendes Gen : Expression Housekeepinggen

Housekeeping- Gen oder sog. Referenzgene:

Als Housekeeping- Gene bezeichnet man Gen, die nicht reguliert werden, d. h. unabhängig von äußeren und „inneren“ Einflüssen konstant transkribiert werden. In der Regel werden über Housekeepinggene Enzyme des Stoffwechsels, Proteine für das Zytoskelett, ribosomale RNA oder Histone kodiert (Wenzel et al. 1991).

Beispiele für Housekeeping- Gene sind Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin, Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) und rRNA. Wir verwendeten in dieser Arbeit PBGD als Housekeepinggen.

Standardkurve:

Wie bereits oben beschrieben worden ist, wurde in dieser Arbeit die Real- Time Effizienz mittels einer Verdünnungsreihe oder auch Standardkurven bestimmt, welche im Allgemeinen die gängigste Methode darstellt (Liu et al. 2002).

Einen linearen Zusammenhang zwischen Ct- Wert und dem Logarithmus der Standardkonzentration gibt die Standardkurve wieder.

Die Standardkurve beinhaltet meist 5 unterschiedliche Konzentrationen eines Standards. Die initiale Standardkonzentration beträgt in der Regel 10^6 und wird, in Form einer Verdünnungsreihe, auf 10^1 reduziert. Durch die Verdünnung des Standards kann über die Bestimmung der jeweiligen CT- Werte eine Eichgerade über die Formel: $y = m \cdot x + n$ erfolgen. Die Steigung m beschreibt dabei die Effizienz der PCR- Reaktion. Eine Effizienz von 100% hat die Steigung von -3,3 (Fronhoffs et al. 2002).

Die Validierung der CT- Wert sollte durch eine Mehrfachbestimmung erfolgen (Bustin 2000, Fronhoffs et al. 2002, Ferre 1992).

Durch Vergleich der Ct Werte der zu untersuchenden Proben mit der Standardkurve kann die Genausgangsmenge bestimmt werden.

2.4. Statistische Auswertung:

Für die statischen Auswertungen wurde das Programm Graph Pad Prism Version 4.02 verwendet.

Unterschiede zwischen stetigen Merkmalen wurden mit dem t- test, bei zwei verschiedenen Gruppen mit one- way ANOVA und dem Dunnett Post Test analysiert. Ein p- Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse:

3.1. Klinische Daten

Alle Patienten die in diese klinisch- experimentelle Studie eingeschlossen wurden, waren an einer RR- MS- Form erkrankt (McDonald et al. 2001). Falls die MS- Erkrankung in eine sekundär chronisch progrediente Form überging, wurde der jeweilige Patient aus der Studie ausgeschlossen.

In welchen Therapiearm (untherapiert, Interferon beta 1a 22µg, Interferon beta 1a 22 µg/44 µg) der Patient gelangte, entschied entweder der Krankheitsverlauf oder der Patient selbst (ausgeprägter Therapiewunsch, kein Behandlungswunsch).

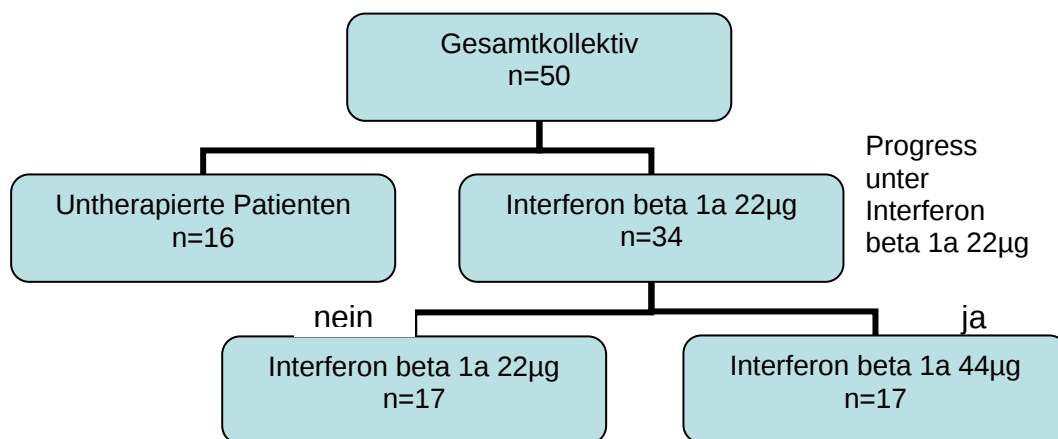


Abb 8: Aufsplittung des Patientenkollektives. Dosisescalation nach einem Jahr Interferon beta 1a 22 µg bei Krankheitsprogress. Diese Patienten wurden noch ein weiteres Jahr im Verlauf beobachtet. Als Progress wurde eine Zunahme der Schubrate oder des EDSS- Wertes definiert.

Tabelle 5 gibt einen Überblick der demographischen Daten der an der Studie teilnehmenden Patienten.

Kollektiv	Unbehandelt	Interferon beta 1a 22µg	Interferon beta 1a 22/44µg	Signifikanz
Gruppenumfang (n=)	16	17	17	ns
Frauen / Männer	15 / 1	15 / 2	13 / 4	ns
Durchschnittsalter [y]	48,77 ± 7,61	46,36 ± 7,33	45,59 ± 8,56	ns
Alter bei Erstdiagnose	31,37 ± 6,03	33,71 ± 8,45	32,33 ± 5,88	ns
Dauer der MS [y]	17,40 ± 6,30	13,27 ± 4,14	12,64 ± 6,74	p<0,01
EDSS vor Therapie-Beginn	1,34 ± 0,91	1,97 ± 1,55	1,79 ± 1,60	ns
Schübe in den letzten 2 Jahren	2,50 ± 1,21	2,12 ± 0,99	2,59 ± 1,32	ns
MS-Form	RRMS	RRMS	RRMS	

Tabelle 5: Patientenkollektiv

Das Durchschnittsalter des unbehandelten Kollektivs war mit 48,77 ± 7,61 Jahren am höchsten, gefolgt von der Interferon beta 1a 22 µg Gruppe mit 46,36 Jahren ± 7,33. Die Interferon beta 1a 22/44 µg Gruppe war im Schnitt 45,59 ± 8,56 Jahre alt.

Das Geschlechteranteil wies, wie zu erwarten, einen höheren Frauenanteil in allen drei Untergruppen auf.

Das Durchschnittsalter des Gesamtkollektivs bei Erstdiagnose einer Multiplen Sklerose betrug 32,47 Jahre. Die Interferon beta 1a 22/44 µg Gruppe repräsentierte fast diesen Mittelwert mit 32,33 ± 5,88 Jahren. Die Interferon beta 1a 22 µg Gruppe war im Schnitt mit 33,71 ± 8,45 Jahren älter; die Kontrollgruppe mit 31,37 ± 6,03 Jahren jünger als das Gesamtdurchschnittserkrankungsalter.

Die Kontrollgruppe war mit $17,40 \pm 6,30$ statistisch signifikant am längsten an der RR-Multiplen Sklerose erkrankt, wies aber im Gegenzug den geringsten EDSS-Ausgangswert mit $1,34 \pm 0,91$ auf.

Die Interferon beta 1a- Untergruppen unterschieden sich bezüglich ihrer Erkrankungsdauer nur geringfügig ($13,27 \pm 4,14$ Jahren Interferon beta 1a 22 µg vs. $12,64 \pm 6,74$ Jahren Interferon beta 1a 22/44 µg).

Der EDSS- Ausgangswert betrug bei den Interferon beta 1a 22 µg Patienten $1,97 \pm 1,55$, der der Interferon beta 1a 22/44 µg Patienten $1,79 \pm 1,60$.

Die Schubrate zwei Jahre vor Therapiebeginn war mit $2,50 \pm 1,21$ bei den untherapierten Patienten annähernd gleich der Schubrate der Interferon beta 1a 22/44 µg Patienten ($2,59 \pm 1,32$).

Die Patienten, welche Interferon beta 1a 22 µg erhielten, wiesen die geringste Schubrate mit $2,12 \pm 0,99$ auf.

3.1.2 Anzahl der Schübe vor und während der Therapie sowie Entwicklung der mittleren Schubrate

Die klinisch- neurologische Untersuchung am standardisierten EDSS- Score erfolgte jeweils routinemäßig vierteljährlich in unserer hiesigen MS- Sprechstunde durch erfahrene Neurologen. Ferner wurde hier nach Schubereignissen im letzten viertel Jahr gefragt.

Als mittlere Schubrate wurde der Mittelwert der Schübe pro Quartal der jeweiligen Patientenkohorte definiert.

	Interferon beta 1a 22µg	Interferon beta 1a 22µg/44µg	Kontrolle	Signifikanz
Schübe vor Therapie	36	44	40	ns
Mittlere Schubrate	$2,11 \pm 0,99$ (MW±SW)	$2,59 \pm 1,33$	$2,5 \pm 1,2$	ns
Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Studienbeginn	$4,33 \pm 5,71$ (MW±SW)	$3,81 \pm 3,61$	$6,47 \pm 6,31$	ns
Mittlere Schubrate pro Jahr vor Therapie	$0,49 \pm 12,68$	$0,68 \pm 15,34$	$0,38 \pm 12,69$	ns
Schübe während des Beobachtungszeitraumes von einem Jahr/zwei Jahren	11	17 unter Interferon beta 1a 22µg 8 unter Interferon beta 1a 44µg	4	$p < 0,01$

Mittlere Schubrate				
a) bei T1	0,23±0,24	0,11±0,33	0,00±0,00	
b) bei T2	0,00±0,00	0,35±0,49	0,00±0,00	
c) bei T3	0,00±0,00	0,23±0,44	0,06±0,25	
d) bei T4	0,11±0,39	0,41±0,50	0,19±0,35	
e) bei T5		0,23±0,44		
f) bei T6		0,11±0,33		
g) bei T7		0,11±0,33		
h) bei T8		0,11±0,33		
Mittlere Schubrate im Beobachtungszeitraum	0,34	1,54 1,10 unter Interferon beta 1a 22µg 0,44 unter Interferon beta 1a 44µg	0,25±0,60	p<0,05

Tabelle 6 zeigt die Entwicklung der Anzahl der Schübe bzw. der mittleren Schubrate vor und während der Therapie.

MW= Mittelwert; SW= Standardabweichung; T1-T8= vierteljährlicher Beobachtungszeitraum.

Fettunterlegter Zahlwerte bei T4 in der Interferon beta 1a® 22 µg/44 µg- Gruppe= hiernach Dosiseskalisierung auf 44 µg.

In Tabelle sechs ist die Entwicklung der Anzahl der Schübe bzw. der mittleren Schubrate dargestellt.

Die Interferon beta 1a 22/44 µg Gruppe weist signifikant mehr Schübe (p<0,01) als auch eine signifikant höhere Schubrate (p<0,05) im Beobachtungszeitraum auf als die Kontrollgruppe. Unterzieht man jedoch die Interferon beta 1a 22/44 µg- Kohorte einer Subgruppenanalyse, so zeigt sich nur noch eine Signifikanz während der Interferon beta 1a 22 µg Gabe mit p<0,05 (1,10 vs. 0,25) im Vergleich zur Kontrolle; jedoch nicht unter der Interferon 44 µg Gabe (0,44 vs. 0,25) (Abb. 9).

Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Kollektiven auf.

Gesamt betrachtet sank die jährliche mittlere Schubrate ohne Signifikanz in der Interferon beta 1a 22 µg- und in der Kontrollgruppe von 0,49 (Interferon beta 1a 22 µg) bzw. 0,38 (Kontrollgruppe) vor Therapiebeginn auf 0,33 (Interferon beta 1a 22 µg) bzw. 0,25 (Kontrolle) bei Ende des Beobachtungszeitraumes.

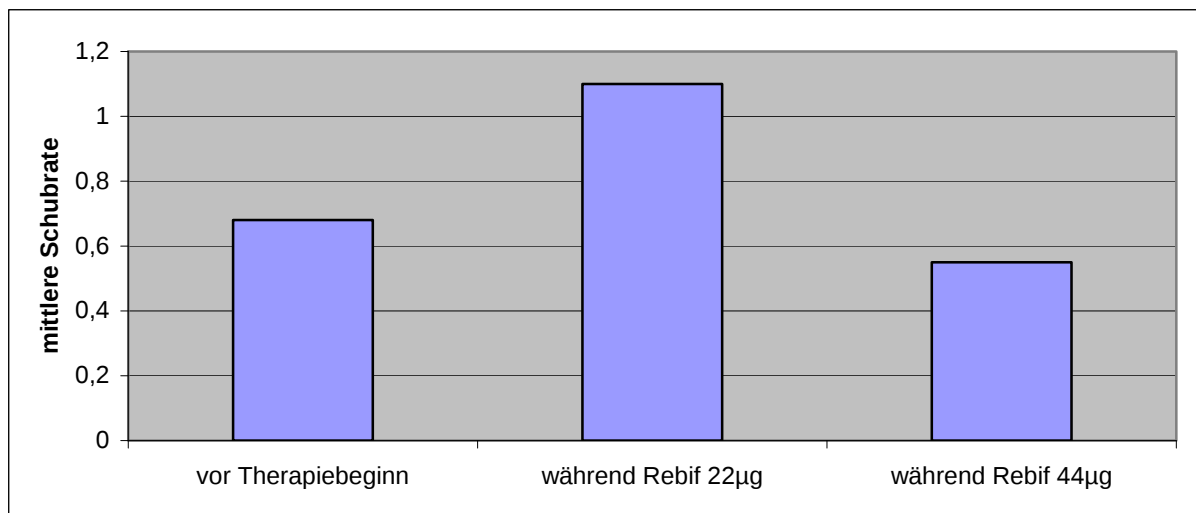


Abb. 9: Entwicklung der jährlichen mittleren Schubrate vor und während Interferon beta 1a 22 µg Gabe sowie nach einer Dosisescalation auf 44 µg.

3.1.3 Entwicklung des EDSS Scores

Zur klinischen Evaluation wurde ebenso der EDSS Score (0-10 Punkte) mit hinzugezogen. Ein EDSS von null Punkten steht für einen unauffälligen neurologischen Untersuchungsbefund, während zehn Punkte den Tod durch MS bedeuten. (Kurtzke et al. 1983). Für einen stabilen Krankheitsverlauf definierten wir ein Abweichung des Ausgangs- EDSS Wertes von $\pm 0,5$ Punkten.

Eine Verbesserung des Krankheitsbildes zeigt die Abnahme des EDSS- Wertes um ≤ 1 Punkt im Vergleich zum Ausgangswert. Eine Erhöhung des EDSS- Wertes von ≥ 1 Punkt im Vergleich zur Vor- /Erstuntersuchung stellt eine Krankheitsprogredienz dar.

	Interferon beta 1a 22µg	Interferon beta 1a 22µg/44µg	Kontrolle	Signifikanz
EDSS vor Therapiebeginn= T0	1,97±1,55 (MW±SW)	1,79±1,60	1,34±0,91	Ns
a) bei T1 b) bei T2 c) bei T3 d) bei T4 e) bei T5 f) bei T6 g) bei T7 h) bei T8	2,00±1,87 2,00±1,91 2,06±1,90 2,17±1,87	1,88±1,57 2,09±1,47 2,18±1,71 2,60±1,47 2,26±1,64 2,44±1,61 2,50±1,42 2,50±1,42	1,09±0,82 1,03±0,87 1,03±0,83 1,41±1,02	
Gesamt- EDSS Score im Beobachtungs- zeitraum	2,06±0,09	2,31±0,25	1,14±0,18	p<0,05
Progressionsindex bei T0 bei T4 bei T8	0,45 0,38	0,47 0,45 0,39	0,20 0,15	Ns
EDSS Score unter Interferon beta 1a 22µg Interferon beta 1a 44µg		2,18±0,30 2,43±0,11		

Tabelle 7: Entwicklung des EDSS (Extended Disability Status Scale) Scores vor, unter nach Therapiebeginn bzw. –eskalierung.

MW: Mittelwert, SW: Standardabweichung, T1- T8: EDSS- Mittelwert pro Quartal;
Fettunterlegter Wert= hiernach Beginn mit Interferon beta 1a 44 µg.

Insgesamt betrachtet zeigte sich hinsichtlich des EDSS- Scores ein stabiles klinisches Bild in allen drei Gruppen, da jede von ihnen eine EDSS Gesamtwertabweichung von ± 0,5 im Vergleich zum Ausgangswert aufwies (Interferon beta 1a 22 µg T0= 1,97; Gesamt- EDSS- Score im Beobachtungszeitraum T1-T8= 2,06±0,09; Interferon beta 1a 22 µg/44 µg T0= 1,79; T1-T8= 2,31; Kontrolle T0= 1,34; T1-T4= 1,14).

Unterzog man den EDSS- Verlauf in der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg Kohorte einer Subgruppenanalyse, so ergab sich ein EDSS- Wertanstieg von 0,81 (T0= 1,79; T4=

2,60), was, wenn den Wert auf eins aufrundet wurde, ein Krankheitsprogress bedeutete. Unter Interferon beta 1a 44 µg hält sich der EDSS- Wert stabil (T4 vs T8 $\pm$ 0,5). Interindividuelle Unterschiede zeigten sich bei Beobachtungsbeginn nur minimal. Bei Beobachtungsende hingegen fanden sich signifikante Unterschiede im End- EDSS- Wert zwischen der Interferon beta 1a 22/44 µg Gruppe und der Kontrollgruppe mit $p < 0,05$. Der EDSS- Endwert- Vergleich zwischen der Interferon beta 1a 22 µg Monogruppe und der Kontrollgruppe war mit $p = 0,06$ nur knapp nicht signifikant. Ferner wurde der Progressionsindex bestimmt. Der Progressionsindex gibt sich aus dem Quotienten des EDSS- Wertes und der Erkrankungsdauer (EDSS/Erkrankungsdauer). Dieser war in allen drei untersuchten Gruppen rückläufig. In der Interferon beta 1a 22/44 µg blieb dieser unter einer Interferon beta 1a 22 µg Therapie stationär. Nach Umstellung auf Interferon beta 1a 44 µg kam zu einem deutlichen Absinken des Progressionsindex.

3.2. Immunprofil

Neben der klinischen Surveillance wurden die Patienten auch einem Immunmonitoring mittels Real- PCR unterzogen. Der Zeitpunkt (Datum) der Blutentnahme sowie der klinischen Untersuchung war identisch.

Es wurde die m- RNA von proinflammatorische (Interferon gamma TNF Rezeptor 1 und 2) und antiinflammatorische Zytokine (Interleukin 4, Interleukin 4 Rezeptor) bestimmt, um eine mögliche Veränderung des Expressionsmusters unter einer immunmodulatorischen Therapie detektieren zu können. Außerdem wurden die Auswirkungen einer exogenen Therapie mit Interferon beta 1a auf die endogene Interferon beta Produktion im Sinne einer Dosis- Wirkungsbeziehung auf m- RNA untersucht.

3.2.1 Interferon gamma

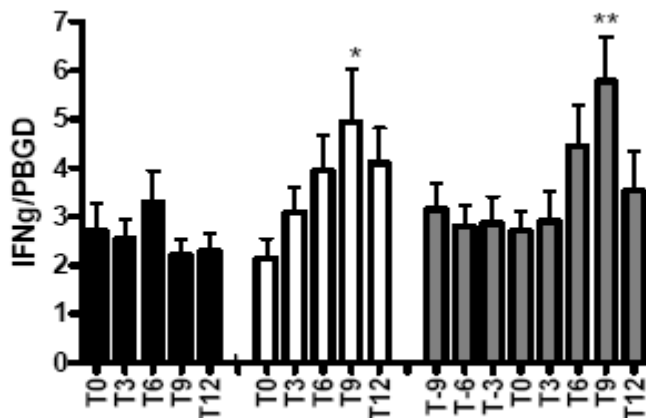


Abb. 10: Relative Genexpression von Interferon gamma. Angabe in Kopienanzahl

IFN gamma/PBGD. Schwarze Balken= Kontrollgruppe, weiße Balken Interferon beta 1a 22 µg, graue Balken 22 µg/44 µg. T0= Kopienanzahl vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe und Interferon beta 1a 22 µg) bzw. letzte Messung vor Dosiseskalation auf Interferon beta 1a 44 µg; T-9 Baseline der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg- Gruppe. T-6 – T 12 vierteljährliche Messzeiträume.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vgl. mit T0 bzw T-9.

Zu Beginn der Studie (T0- bzw. T-9- Wert) zeigte sich in allen drei Kohorten kein signifikanter Unterschied in der Kopieanzahl der m- RNA von Interferon gamma.

In der Kontrollgruppe zeigten sich über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede im m- RNA Expressionsmuster.

Die Kopienanzahl von Interferon gamma war in der Interferon beta 1a 22 µg Gruppe neun Monate nach Studienbeginn signifikant erhöht ($p < 0,05$ im Vergleich T9 vs T0). Die übrigen Messungen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede trotz eines messbaren Anstiegs.

In der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg Kohorte konnte 21 Monate nach Studienbeginn einen statistisch signifikanten Anstieg an m- RNA des Interferon gamma gemessen werden ($p < 0,01$; T9 vs T-9). Zu diesem Zeitpunkt erhielten die Patienten bereits 44 µg Interferon beta. Unter Interferon beta 1a 22 µg war die Kopienanzahl konstant, erst nach Eskalation kam es zu einer vermehrten Transkription von Interferon gamma.

3.2.2 TNF- Rezeptor 1

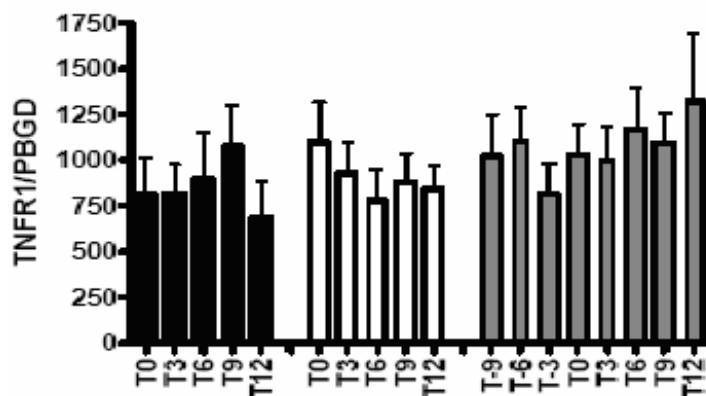


Abb. 11: Relative Genexpression des Tumornekrose Rezeptors 1. Angabe in Kopienanzahl TNFR1/PBGD. Schwarze Balken= Kontrollgruppe, weiße Balken Interferon beta 1a 22 µg, graue Balken 22 µg/44 µg. T0= Kopienanzahl vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe und Interferon beta 1a 22 µg) bzw. letzte Messung vor Dosiseskalation auf Interferon beta 1a 44 µg; T-9 Baseline der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg- Gruppe. T-6 – T 12 vierteljährliche Messzeiträume.

Die Kopienanzahl von TNFR1/PBGD war sowohl vor Studienbeginn als auch unter dem Beobachtungszeitraum weder signifikant erhöht noch erniedrigt in einzelnen Subgruppen.

In der Interferon beta 1a 22 µg Gruppe ließ sich nach Beginn mit einer immunmodulatorischen Therapie ein geringfügiger, wenn auch nicht statistisch messbar, Rückgang der Kopienanzahl TNFR1/PBGD erkennen im Vergleich zu den anderen Patientengruppen. Die Interferon beta 1a 22 µg/44 µg Gruppe hatte im Schnitt eine höhere Kopienanzahl, welche aber über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ konstant blieb.

3.2.3 TNF- Rezeptor 2

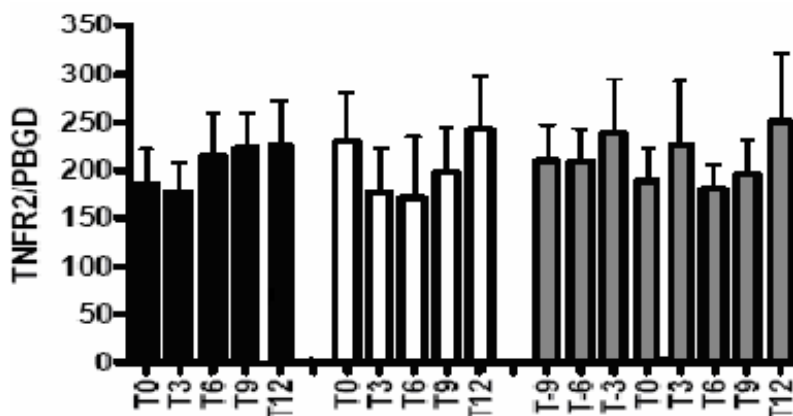


Abb. 12: Relative Genexpression des Tumornekrose Rezeptors 2. Angabe in Kopienanzahl TNFR2/PBGD. Schwarze Balken= Kontrollgruppe, weiße Balken Interferon beta 1a 22 µg, graue Balken 22 µg/44 µg. T0= Kopienanzahl vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe und Interferon beta 1a 22 µg) bzw. letzte Messung vor Dosiseskalation auf Interferon beta 1a 44 µg; T-9 Baseline der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg- Gruppe. T-6 – T 12 vierteljährliche Messzeiträume.

Abbildung 12 zeigt das relative Genexpressionsmuster des Tumornekrose Rezeptors 2. Hierbei konnte kein Unterschied in den Kopienanzahlen während einer Interferon beta Therapie festgestellt werden. Die Interferon beta 1a 22 µg Gruppe weist vor Therapiebeginn ein höheres Expressionslevel an TNF R2 auf. Ein halbes Jahr nach

Therapiebeginn zeigt sich ein erniedrigter TNFR2/PBGD Quotient, welcher allerdings im Verlauf wieder auf sein Aufgangsniveau ansteigt. Die 22 µg/44 µg Subgruppe zeigt einen schwankenden Verlauf. Die Kopienzahl blieb in der Kontrollgruppe konstant, stieg am gegen Ende des Beobachtungszeitraumes aber stetig an.

3.2.4 Interleukin 4

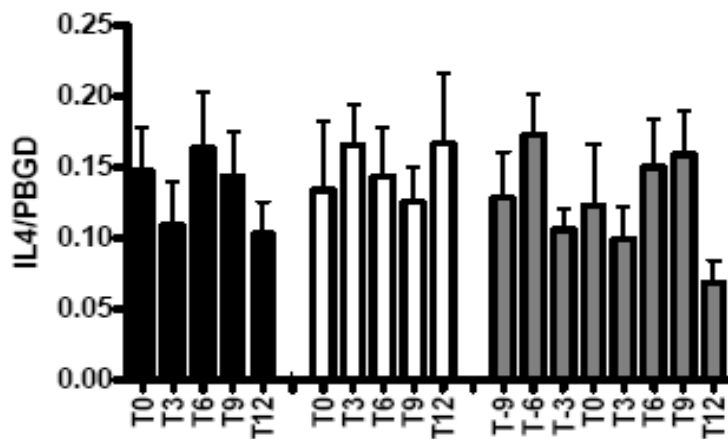


Abb. 13: Relative Genexpression von Interleukin 4. Angabe in Kopienanzahl

Interleukin 4/PBGD. Schwarze Balken= Kontrollgruppe, weiße Balken Interferon beta 1a 22 µg, graue Balken 22 µg/44 µg. T0= Kopienanzahl vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe und Interferon beta 1a 22 µg) bzw. letzte Messung vor Dosiseskalation auf Interferon beta 1a 44 µg; T-9 Baseline der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg- Gruppe. T-6 – T 12 vierteljährliche Messzeiträume.

In allen 3 Subgruppen (Kontrolle, Interferon beta 1a 22 µg, Interferon beta 1a 22 µg/44 µg) zeigte sich ein undulierendes Expressionsmuster von Interleukin 4.

3.2.5 Interleukin 4 Rezeptor

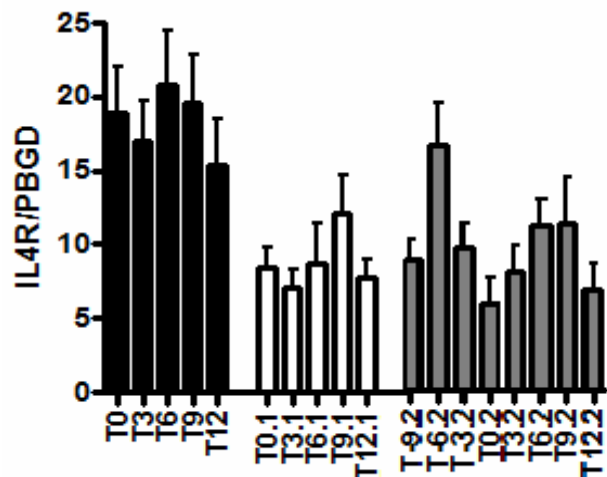


Abb. 14: Relative Genexpression des Interleukin 4 Rezeptors. Angabe in Kopienanzahl Interleukin 4 Rezeptor/PBGD. Schwarze Balken= Kontrollgruppe, weiße Balken Interferon beta 1a 22 µg, graue Balken 22 µg/44 µg. T0= Kopienanzahl vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe und Interferon beta 1a 22 µg) bzw. letzte Messung vor Dosisescalation auf Interferon beta 1a 44 µg; T-9 Baseline der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg- Gruppe. T-6 – T 12 vierteljährliche Messzeiträume.

In Abbildung 14 ist die Kopienanzahl des Interleukin 4 Rezeptors der einzelnen Kohorten aufgetragen. Es zeigte sich zwar keine statistische Signifikanz, dennoch weist die Kontrollgruppe eine höhere Expression auf als die Interferon beta 1a 22 µg Gruppe und die Interferon beta 1a 22 µg/44 µg.

Die Interferon beta 1a 22 µg/44 µg Gruppe zeigte jeweils nach Beginn bzw. nach einer Dosisescalation auf 44 µg Interferon beta einen Anstieg der Interleukin 4 Rezeptor mRNA Kopienanzahl. Allerdings kam es bei der Folgebestimmung jeweils zu einem Abfall der Kopienzahl.

Die Interferon beta 1a 22µg Gruppe wies eine konstante Kopienzahl mit fluktuierendem Verlauf gegen Ende des Beobachtungszeitraumes auf.

3.2.6 Interferon beta

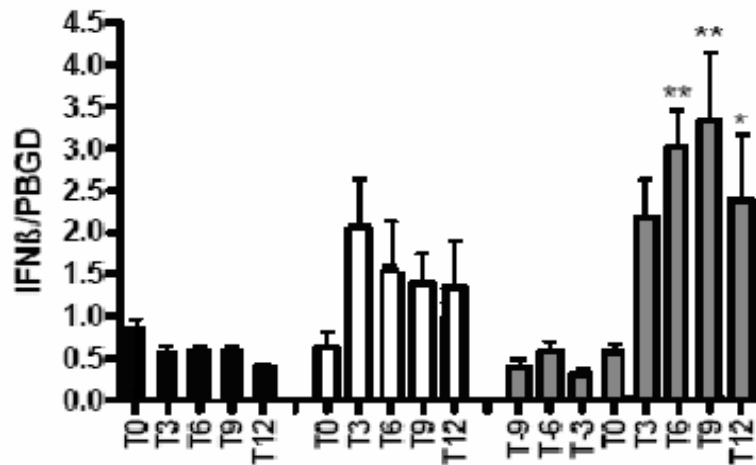


Abb.15: Relative Genexpression von Interferon beta. Angabe in Kopienanzahl

IFN beta/PBGD. Schwarze Balken= Kontrollgruppe, weiße Balken Interferon beta 1a 22 µg, graue Balken 22 µg/44 µg. T0= Kopienanzahl vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe und Interferon beta 1a 22 µg) bzw. letzte Messung vor Dosisescalation auf Interferon beta 1a 44 µg; T-9 Baseline der Interferon beta 1a 22 µg/44 µg- Gruppe. T-6 – T 12 vierteljährliche Messzeiträume.

*p<0,05; **p<0,01 vgl. mit T-9.

Die relative Genexpression von Interferon beta war während des gesamten Beobachtungszeitraumes in der Kontrollgruppe konstant niedrig.

Der Baselinewert der Interferon beta 1a 22 µg Gruppe war in etwa gleich hoch wie der der Kontrollgruppe. Nach Therapieeinleitung (T3 erste Messung nach Interferon beta 1a 22 µg Gabe) stieg die Expression um das vierfache an und blieb nach einem leichten Abfall an Zeitpunkt T6 dann konstant im Verlauf.

Die Interferon beta 1a 22 µg/44 µg war bezüglich des Interferon beta-Expressionsusters mit der Kontrollgruppe unter Interferon beta 1a 22 µg Gabe vergleichbar. Nach einer Dosisverdoppelung kam es zu einem signifikanten Anstieg der m- RNA Transkription mit p<0,01 zu den Zeitpunkten T6 und T9 (halbes bzw. dreiviertel Jahr nach Dosisescalation) bzw. mit p<0,05 ein Jahr nach Gabe von Interferon beta 1a 44 µg. Im interindividuellen Vergleich wies die Kontrollgruppe signifikant niedrigere endogene Interferon beta Spiegel auf als die Interferon beta 1a

22/44 µg ($p < 0,05$ T3 Kontrollgruppe vs. T9 Gruppe 22/44 µg). Der Unterschied zwischen Kontrollegruppe und der Interferon beta 22 µg Monogruppe war nur knapp nicht signifikant ($p = 0,07$ T3 Kontrollegruppe vs. T3 Gruppe 22 µg).

4. Diskussion:

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer unterschiedlichen Dosierung im Sinne einer Dosis- Wirkungsbeziehung am Beispiel von Interferon beta-1a 22 µg bzw. 22/44 µg auf das Immunprofil von RR- MS Patienten untersucht. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche immunologischen Mechanismen durch eine Interferontherapie unterdrückt oder stimuliert werden und somit den Krankheitsverlauf verlangsamen. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf den Wechselwirkungen zwischen exogenem und endogenem Interferon beta. Ferner sollte geklärt werden, warum große interindividuelle Unterschiede bei mit und ohne Interferon beta 1a behandelten MS- Patienten festgestellt werden.

Die Multiple Sklerose ist die häufigste Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems in der westlichen Welt sowie in Australien.

McAlpine unterteilte 1972 die MS aufgrund ihres Krankheitsverlaufes in eine schubförmige (Relapsing- remitting RR- MS), eine sekundär progrediente (SP- MS) sowie eine primär progrediente (PP- MS) Form. In den neuen Leitlinien wurde diese Einteilung durch das klinisch isolierte Syndrom (CIS) ergänzt (Lassmann et al. 2001, Miller et al. 2004).

Das klinische Bild einer Multiplen Sklerose ist durch multilokuläre Funktionsstörungen des ZNS gekennzeichnet (Delank et al. 2004).

Sensibilitätsstörungen, Gangstörungen oder eine (einseitige) Neuritis nervi opticii zählen zu den häufigsten Erstmanifestationen einer Multiplen Sklerose (Weinshenker et al. 1989). Unbehandelt kommt es in über 50% der Krankheitsfälle zu einer Progredienz des Krankheitsverlaufes. In mehreren Studien konnte die Wirksamkeit der Beta-Interferone belegt werden (MSTKG 1999, 2002 und 2006), bei denen es zu einer Verringerung der Schubrate als auch zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression kam. Aktuell sind drei Präparate auf dem deutschen Markt erhältlich: zu einem das Interferon beta 1b (Betaferon®; Dosierung 250µg (entsprechen 8 Mio IE) Applikationsform subkutan jeden zweiten Tag), sowie Interferon beta 1 a (Rebif® 22 µg/44 µg drei mal pro Woche subcutan und Avonex® 30µg einmal pro Woche

intramuskulär). Die Wirksamkeit des Interferon betas beruht auf einem immunmodulatorischen Effekt. Hierbei kommt u. a. zu einer Verlagerung von einer proinflammatorischen, Th1 gerichteten Antwort zu einer antiinflammatorischen Th2-Antwort bzw. einer immunologischen, physiologischen Balance zwischen Th1- und Th2-Antwort (Billau et al. 2004). Weitere molekulare Effekte der Beta- Interferone ist die Migration von autoreaktiven T- Zellen in das ZNS durch Stabilisierung der Bluthirnschranke zu unterbinden. Interferon beta führt zu einer Down- Expression des very late antigen 4 (VLA- 4). In unserer Arbeitsgruppe konnte ferner gezeigt werden, dass weitere gebundene Adhäsionsmoleküle wie cICAM- 1 und 3 (circulating inter-cellular adhesion molecule) und cVCAM-1 (circulating vascular cell adhesion molecule) unter einer immunmodulatorischen Therapie an der Endotheloberfläche herabreguliert sind bzw. ihre lösliche Form sICAM- 1 und 3 sowie sVCAM- 1 aufgrund eines Sheddings (Abspaltung der vormals an der Zelloberfläche gebundenen Adhäsionsmoleküle) sich vermehrt im Serum von therapierten MS- Patienten nachweisen ließen (Kraus et al. 2000; Tofighi J 2003)).

Interferon beta unterbindet die Aktivität von Makrophagen und hindert diese an einer Ausschüttung von NO und Metallixproteasen (Ponomarev et al. 2007), so dass eine Oligodendrozytenschädigung verhindert wird. Ferner bewirkt Interferon beta eine Downregulation von MHC Klasse II Molekülen sowie von HLA- DR (Genec et al. 1997).

Die These, dass die Multiple Sklerose eine Autoimmunerkrankung sei, wurde anhand des EAE (experimentelle autoimmun Enzephalomyelitis) Tiermodells aufgestellt.

Autoimmunreaktive T- Zellen stehen hierbei im Mittelpunkt der Krankheitsentstehung (Gold et al. 2006).

Anhand von histopathologischen Untersuchung konnten vier Arten der Demyelinisierung unterschieden werden. Muster I und II wird durch zelluläre (Muster I) und humorale (Muster II) Aktivierung des Immunsystems hervorgerufen. Muster III und IV zeigten Pathologika im Oligodendrozytenstoffwechsel ohne Nachweis einer Entzündungsaktivität (Endpunkt: hypoxischer Zellschaden) (Lucchinetti et al., 2000; Lassmann et al., 2001; Kornek und Lassmann, 2003).

All diesen vier Entzündungsmuster geht eine T- Zell Aktivierung voraus. CD4 positive T- Helferlymphozyten werden je nach Zytokinmusterproduktion in Th1 und Th2 Zellen unterschieden (Coffman und Mosmann, 1991). Th1 Helferzellen produzieren

proinflammatorische Zytokine wie Interferon gamma, Tumornekrosefaktor alpha und Interleukin 2. Th2- Zellen sezernieren antiinflammatorisches IL 4 und IL 10.

Martin et al. formulierten 1995 die Hypothese, dass die Multiple Sklerose durch eine gesteigerte Th1- Aktivität ausgelöst wird. Unterschiedliche Arbeitsgruppe konnten diese Th1- Dysbalance mit gesteigerter Interferon gamma und Tumornekrosefaktor-Produktion nachweisen und so die oben genannte These untermauern (Beck et al., 1988, Panitch et al., 1987). Aus neueren Erkenntnissen des EAE- Modells ist die Th1/Th2 Hypothese um sogenannte Th17 Zellen zu ergänzen. Diese IL- 17 produzierende T-Lymphozyten wurden in hoher Konzentration in frischen Läsionen der EAE nachgewiesen (Bettelli et al. 2007). Beim Menschen konnte diese Zellart bisher nicht nachgewiesen werden. Jedoch spricht vieles dafür, dass IL 17 mit als proinflammatorischer Botenstoff fungiert. Lock et al. fanden eine erhöhte IL 17 Expression in frischen MS- Läsionen (Lock et al. 2002). Interferon beta hemmt die Proliferation und Ausreifung von Th17 Zellen (Zhang et al. 2010, Ramgolam et al. 2010).

Als Folge der gesteigerten Interferon gamma Produktion kommt es zum einen zu einer vermehrten Differenzierung in Th1- Zellen sowie zur Makrophagenaktivierung (Dysbalance zwischen Interferon gamma und Interferon beta, zugunsten des Interferon gammas). Hierdurch kommt es zur direkten und indirekten Schädigung der Oligodendrozyten mit nachfolgender Demyelinisierung (Muster I und II nach Lassmann). Interferon gamma aktivierte Makrophagen produzieren vermehrt Tumornekrosefaktor alpha, welcher die Wirkung von Interferon gamma verstärkt. Zum anderen fördert es die Expression von Adhäsionsmolekülen des Endothels der Bluthirnschranke. Interferon gamma inhibiert direkt die antiinflammatorischen IL- 4 Signalkaskade (Yamamoto et al. 2004).

Im Rahmen der möglichen Therapieoptionen in den achtziger Jahren zeigte die Gabe von Interferon gamma eine massive Aggravierung des Krankheitsbildes (Panitch et al. 1987). Durch diese Beobachtung konnte gezeigt werden, dass dieses Interleukin mit als Hauptauslöser für neuerliche Schübe gilt. Zu mal sich eine Anreicherung von Th1 – Zellen und Interferon gamma in frischen MS- Läsionen finden lies (Traugott et al. 1988).

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass Interferon beta die Produktion von Interferon gamma und Tumornekrosefaktor alpha senken kann (Zang et al. 2000, Petereit et al. 1997). Dies konnte in der folgende Arbeit nicht nachgewiesen werden und

denkt sich so mit Ergebnissen anderer Studien, welche nur minimale Effekte von Interferon beta auf das Expressionsmuster von anti- und proinflammatorischen Zytokinen zeigten (Matusevicius et al. 1998).

Das m- RNA Expressionslevel von Interferon gamma blieb in der Kontrollgruppe im untersuchten Beobachtungszeitraum in dieser Arbeit konstant. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in der klinischen Beobachtung mittels EDSS- Score und Schubratenbestimmung wieder. Der EDSS- Score lag zu Beginn der Studie (T0) bei $1,34 \pm 0,91$ und bei Ende des Beobachtung (T4) bei $1,41 \pm 1,02$. Der mittlere EDSS- Score wies sogar eine geringe Verbesserung im Vergleich zum Ausgangswert auf ($1,34 \pm 0,91$ vs. $1,14 \pm 0,18$). Auch die jährliche Schubrate blieb mit $0,25 \pm 0,60$ im Beobachtungszeitraum im Vergleich zu Beginn mit $0,38 \pm 12,69$ konstant.

In den beiden behandelten Kollektiven hingegen fand sich eine statistisch signifikante Erhöhung von Interferon gamma m- RNA. Die Patientengruppe, welche $22 \mu\text{g}$ Interferon beta 1a über den gesamten Beobachtungszeitraum erhielt, zeigte 9 Monate nach Interferonbeginn einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu Studienbeginn mit $p < 0,05$. In der Eskalationsgruppe von $22 \mu\text{g}$ auf $44 \mu\text{g}$ kam es 3 Monate nach Dosisverdopplung auf Interferon beta 1a $44 \mu\text{g}$ zu einer signifikanten Erhöhung des Interferon gamma Expressionsmuster mit $p < 0,01$. Interessanterweise weist die Interferon beta 1a $22 \mu\text{g}/44 \mu\text{g}$ Gruppe eine annähernd gleiche Kopienanzahl zu Therapiebeginn auf wie die Kontrollgruppe. Die Interferon beta 1a Eskalationsgruppe zeigte aber hierunter einen deutlichen Krankheitsprogress mit einem Anstieg des EDSS- Scores von $1,79 \pm 1,60$ auf $2,60 \pm 1,47$ (Mittelwert unter Interferon beta 1a[®] $22 \mu\text{g}$ im Beobachtungszeitraum $2,18 \pm 0,30$) sowie eine Zunahme der mittleren Schubrate von $0,68$ auf $1,10$. Nach Dosiseskaltion kam es zu einer Verlangsamung des Krankheitsprogresses (EDSS am Beobachtungsende $2,50 \pm 1,42$ vs. $2,60 \pm 1,47$ vor Dosiseskaltation). Ferner sank die mittlere Schubrate von $1,10$ auf $0,44$.

Trotz signifikant erhöhter m- RNA Interferon gamma Level in der Interferon beta 1a $22 \mu\text{g}$ Monogruppe und der Eskalationsgruppe von $22 \mu\text{g}$ auf $44 \mu\text{g}$ kam es in beiden Gruppen zu keinem Krankheitsprogress. Dass hohe Interferon gamma m- RNA Spiegel bei Interferon beta behandelten Patienten Schübe auslösen, wurde in diesem Fall nicht beobachtet. Vielmehr sank sogar die Schubrate unter signifikant erhöhten m- RNA Level. Man kann daher folgern, dass eine Interferon beta Therapie zwar keinen supprimierenden Einfluss auf die Transkription von Interferon gamma hat, wohl aber

einen neutralisierenden Effekt auf der Proteinebene der Interferon beta/ gamma Interaktion.

Dennoch bleibt es weiterhin unklar, wie die Interferon beta- Interferon gamma Interaktion zu verstehen ist. Wandinger et al. fanden heraus, dass es unter einer Interferon beta- Therapie zu einer Upregulation von Th1- Zellmarker wie Interferon gamma kommt (Wandinger et al. 2001).

Neben Interferon gamma und IL- 17 zählen die Tumornekrose Faktoren alpha und beta zu den weiteren für die MS relevanten proinflammatorischen Zytokine. Der Tumornekrosefaktor alpha und beta binden jeweils an die gleichen Rezeptoren, dem TNF- RI und TNF RII. Die Wirkweise von TNF alpha und beta entspricht dem des Interferon gammas. Es erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten sowie von MHC Klasse I und II Molekülen auf dendritischen Zellen. TNF alpha und beta aktivierte Makrophagen sezernieren NO und Proteasen und weisen eine erhöhte Phagozytoseaktivität auf (Billiau et al. 2004).

Hingegen konnte im Rahmen des EAE- Modells gezeigt werden, dass durch die Gabe von TNF- Rezeptoren die Demyelinisierung inhibiert wird (Glabinski AR et al. 2004; Selmaj et al. 1995, Stoll et al. 1993). Die Liquorkonzentration vom löslichen TNF- Rezeptor I und II war bei Patienten, welche mit Interferon beta behandelt wurden, signifikant erhöht und zeigten ein progressionsfreies verlängertes Intervall (Perini et al. 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnten sowohl in der PCR (m- RNA Expressionsmuster) als auch im ELISA erhöhte signifikant erhöhte Konzentration von TNF- R II m- RNA bzw. sTNF- R II Konzentrationen bei Patienten, welche unter Interferon beta standen, gemessen werden. In der PCR- Methodik ließ sich ferner ein erniedrigtes TNF- RI Expressionsmuster nachweisen (Laske et al. 2001; Reuss et al. 2009). Bei beiden Arbeiten wurde eine Abnahme von MS- Läsionen in der MRT festgestellt. Terlizzese et al. konnten zeigen, dass die inhibitorische Wirkung der Rezeptoren dabei vermehrt über den TNF-II vermittelt wird (Terlizzese et al. 1996). Die Hochregulierung von TNF R II durch Interferon beta wird indirekt über das antiinflammatorische IL- 10 erzielt (Repa et al. 1999).

In dieser Arbeit konnten keine Interferon beta induzierten Veränderungen des Expressionsmusters von TNF R I und II verifiziert werden. Es fand sich sowohl beim TNF R I als auch beim TNF R II ein undulierender Verlauf in allen drei Gruppen. Eine Dosissteigerung schlug sich nicht auf das Expressionsmuster (erhöhte TNF R II- Produktion bzw. erniedrigte TNF R I- Produktion) nieder. Ursächlich hierfür könnte die

Probandenzahl, die Behandlungsdauer oder die Messzeitpunkte sein. Die Kontrollgruppe, welche den geringsten Krankheitsprogress zeigte, weist gegen Ende des Beobachtungszeitraumes eine erniedrigte, wenn auch nicht signifikante, TNF R- I Menge im Vergleich zu T0 auf.

In dieser Arbeit wurde ebenso der Einfluss von Interferon beta 1-a auf die antiinflammatorischen Zytokine IL- 4, IL 4 Rezeptor und endogenes Interferon beta untersucht. Interferon beta aktiviert vornehmlich eine Th2- gerichtete Antwort mit nachfolgender antiinflammatorischer Zytokinproduktion (Yong et al. 1998). IL- 4 wird von aktivierten Th2- Zellen gebildet. IL- 4 reguliert ein weites Spektrum an Immunantworten sowie die Hämatopoese. Ferner fördert es die Expression von MHC- Klasse II Molekülen. Im ZNS hingegen wurde eine Downregulation von MHC- Klasse II Molekülen beobachten (Chao et al. 1993).

Anhand des EAE- Tiermodells konnte dargestellt werden, dass EAE- Mäuse, welche einen Mangel von IL- 4 im ZNS aufwiesen, eine Exazerbation der EAE zeigten (Ponomarev et al. 2007). Eine Gentherapie mit IL4 produzierendem Herpes simplex Virus konnte die EAE stoppen (Butti et al. 2008).

IL- 4 fungiert als Inhibitor der NO- Synthase in Gliazellen (Paintlia et al. 2006). Als Folge der Inaktivierung des Peroxisomen- proliferierend- aktivierenden Rezeptors gamma durch IL- 4 kommt es zu einer niedrigeren NO- Ausschüttung durch Gliazellen (Gocke et al. 2009). IL- 4 hat somit einen schützenden Effekt auf Oligodendrozyten.

IL- 4 hemmt die Sekretion von TNF- alpha sowie die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM- 1 (Brodie et al. 1998). IL4- aktivierte dendritische Zellen im Plexus choroideus produzieren vermehrt antiinflammatorisches IL- 10

IL- 4 weist neurotrophe Eigenschaften aus. Awatsuji et al. fanden heraus, dass IL- 4 die Sekretion von NGF (nervcell growth factor) in Astrozyten fördert (Awatsuji et al. 1993).

Es gibt zwei Formen des IL- 4 Rezeptors, eine membrangebundene Form (140kDa) und eine lösliche Form (39kDa) (Mosley et al. 1989). Der lösliche Rezeptor (sIL- 4 R) entsteht durch proteolytische Spaltung (Shedding) der membranständigen Form (Gessner et al. 2000). Der IL- 4 Rezeptor wird von allen Zelllinien exprimiert.

Der lösliche IL- 4 Rezeptor wirkt antagonistisch zur eigentlichen IL- 4 Antwort. Der lösliche IL- 4 Rezeptor bindet freies IL- 4 (IL- 4 bindendes Protein) und steht somit nicht mehr zur Aktivierung des membranständigen Rezeptors zur Verfügung (Sato et al. 1993). Das Shedding wird durch Interferon gamma und TNF alpha und IL- 4

(Downregulation bei hohem IL- 4 Angebot) begünstigt. Demnach kommt es zu einer Abschwächung der IL- 4 Antwort bei hohen Konzentrationen von sIL- 4 R mit nachfolgender vermehrter Bildung von Interferon gamma. Niedrige sIL- 4 Rezeptor Spiegel bedingen eine verstärkte IL- 4 Antwort mit Inhibition der Interferon gamma Produktion.

In dieser Arbeit konnten keine erhöhten IL- 4 und IL- 4 Rezeptor m- RNA Expressionsmuster unter einer Therapie mit Interferon beta 1a festgestellt werden. Die immunologischen Wirkungen einer Dosiseskalation auf 44 µg spiegelten sich ebenfalls nicht in einem Anstieg der m- RNA von IL- 4 und IL- 4 R wieder. Interessanterweise zeigt die unbehandelte Gruppe eine deutlich höhere, wenn auch nicht statistisch signifikante, IL- 4 R Expression. Die rtPCR kann nicht zwischen dem membranständigen und dem löslichen Rezeptor unterscheiden. Ob die Kontrollgruppe aufgrund der relativ erhöhten IL- 4 R Expression einen ebenso guten Krankheitsverlauf vorweist wie Interferon beta behandelte Patienten, bleibt spekulativ. Anzunehmen wäre, dass die Kontrollgruppe eine gesteigerte IL 4 Antwort aufweist, da mehr membrangebundene IL 4- Rezeptoren zur Aktivierung zur Verfügung stehen. Durch diese gesteigerte IL- 4 Antwort kommt es im Folgenden zu einer Inhibition von Interferon gamma. Die Kontrollgruppe zeigte die niedrigsten m-RNA Transkripte von Interferon gamma in der rt- PCR- Messung. Patienten, welche bei Therapiebeginn einen niedrigen Interferon gamma level aufwiesen, waren die besseren Therapieresponder (Petereit et al. 2002).

Ferner wurde in dieser Arbeit die Auswirkungen von exogen zugeführten Interferon beta auf die endogene Interferon beta Produktion anhand des m- RNA Expressionslevels untersucht. Wir vermuteten ein Sistieren der endogenen Interferon beta Produktion, wie es auch unter einer Hormontherapie (Cortison, Thyroxin, Ovulationshemmer) zusehen ist.

Interferon beta wird auch als Fibroblasten- Interferon bezeichnet, da es von virusinfizierten Fibroblasten produziert wird. Die Bildung von Interferon beta kann auch durch IL-1, IL- 2, und TNF induziert werden. Es ist ein ca. 20 kD schweres Glykoprotein und bindet an den gleichen Rezeptor wie Interferon alpha.

Es wurde immer wieder postuliert, dass bei MS- Patienten ein Defekt in der endogenen Interferon beta Synthese vorliegt oder aber die Interferon beta Produktion nur bedingt auf äußere Reize (Virusinfektion) reagiert (Billau et al. 2004).

Von Billau et al. wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine kontinuierliche Interferon beta Therapie den Mangel an endogenem Interferon beta korrigiert, in dem das exogen zugeführte Interferon beta die endogene Produktion stimuliert (Billau et al. 2004). Niedrige Interferon- beta Spiegel sind essentiell für ein adäquate Zellantwort mit nachfolgender Interferon beta Produktion („the priming effect of Interferon- beta for its own production“ (Taniguchi et al. 2001)).

In dieser Arbeit konnte kein Sistieren der endogenen Interferon beta Produktion festgestellt werden. Sie zeigte eher genau das Gegenteil und untermauert so die obengenannte Hypothese von Billau. In beiden Patientenkollektiven kam es zu einem Anstieg der endogenen Interferon- beta Produktion. In der Interferon beta 1a 22 µg Gruppe konnte ein merklicher, wenn auch nicht statistisch signifikanter, Anstieg der Interferon beta Produktion drei Monate nach Therapiebeginn festgestellt werden mit nachfolgender konstanter Produktion. Klinisch imponierte eine leicht rückläufige mittlere Schubrate (0,49 vs. 0,34) sowie eine Stabilisierung des EDSS- Wertes (1,97 vs. 2,06).

Die Interferon beta 1a 22 µg/44 µg Gruppe zeigte bei der Gabe von Interferon beta 1a 22 µg weder ein immunologisches noch ein klinisches Ansprechen auf die Therapie. Erst nach Dosisverdopplung kam es zu einem signifikanten Anstieg der endogenen Interferon beta Produktion sechs, neun und 12 Monate nach Dosisescalation ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Bereits drei Monate nach der ersten Gabe von Interferon beta 1a 44 µg ließ sich eine deutliche Erhöhung an m- RNA Konzentration messen. Klinisch kam es zu einer Abnahme der jährlichen Schubrate sowie des EDSS- Scores.

Manche Autoren gehen bei MS- Patienten von einer Dysregulation im intrinsischen Interferon beta Signalweg aus (Yamaguchi et al. 2008).

In unserer Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, dass der Interferon regulierende Transkriptionsfaktor IRF- 7 unter einer Interferon beta Therapie hochreguliert ist, was im nachfolgenden zu einer gesteigerten endogenen Interferon beta Produktion führte (Ruess et al. 2007, Honda et. al 2005).

Bezüglich der klinischen und immunologischen Nichtansprache unter der Interferon beta 1a 22 µg Therapie im Patientenkollektiv 22 µg/44 µg sind 2 Möglichkeiten zu erwägen. Es kann sein, dass entweder die Interferon beta 1a -Dosis von 22 µg zu gering für eine Aktivierung des IRF- 7 Pathways war bei einem initial niedrigen endogenen Interferon beta Spiegel als Folge einer erhöhten Krankheitsaktivität, oder aber das Vorhanden von neutralisierenden Antikörpern (NAb). In fast allen Studien, welche u. a.

Unterschiede in der Wirksamkeit und das Vorhandensein von NABs bei Interferon beta 1a 22 µg vs. Interferon beta 1a 44 µg untersuchten, konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz der NAB- positiven Patienten in der Interferon beta 1a 22 µg- Gruppe signifikant höher war als in der Interferon beta 1a 44 µg bei gleicher Wirkung (Bertolotto et al. 2004). NABs wurden nicht bestimmt in dieser Arbeit. Es spricht vieles dafür, dass die erste Variante die Wahrscheinlichere sein dürfte, da die Interferon beta 1a 22 µg Mono- Patienten ein gute Ansprache nach 3 Monaten zeigten.

Die Kontrollgruppe zeigte trotz niedrigem Interferon- beta Spiegels keine klinische Verschlechterung. Eine Ursache hierfür ließ sich nicht eindeutig feststellen, womöglich liegt in der Kontrollgruppe eine Positivselektion vor.

Um zwischen Non- Respondern und Respondern einer Interferontherapie unterscheiden zu können, würde sich eine m-RNA Bestimmung des endogenen Interferons drei Monate nach Therapiebeginn anbieten.

Unsere ursprüngliche Hypothese, dass die endogene Interferon beta Produktion durch eine Interferon beta Therapie sistiert, konnte nicht belegt werden. Es zeigte sich überraschenderweise sogar eine signifikant gesteigerte Produktion von endogenem Interferon beta, welche dosisabhängig war.

Weshalb manche Patienten erst nach einer Dosisescalation auf 44 µg eine klinische und immunologische Ansprache zeigten, konnte nur zu einem Teil geklärt werden und zeigt wie groß die interindividuellen Unterschiede bei MS- Patienten sind. Am ehesten könnte dies mit einer erhöhten Krankheitsaktivität mit konsekutivem erniedrigtem endogenem Interferon beta Wirkspiegel zusammenhängen. Ursächlich für eine hohe Krankheitsaktivität könnte die Dysbalance zwischen Interferon gamma und beta sein. Die Interferon beta 1a 22/44 µg Patienten wiesen, wenn auch nicht statistisch signifikant, höhere Interferon gamma Spiegel vor Therapiebeginn auf. Die Interferon beta Dosis von 22 µg war zu gering, um zum einen die Dysbalance zwischen Interferon beta und gamma auszugleichen und zum anderen die Interferon gamma geblockte IRF- 7 Kaskade aufzuheben oder selbst zu aktivieren (Dosis- Wirkungsbeziehung).

Die Patienten, welche Interferon beta 1a 22 µg mono erhielten, hatten dem zu folge eine geringere Krankheitsaktivität (geringere Dysbalance zwischen Interferon beta und gamma), so dass nur eine geringe Dosis nötig war, um IRF- 7 zu aktivieren. Die Kontrollgruppe zeigte überraschenderweise keine Krankheitsprogression. Das Immunprofil der Kontrollgruppe zeigte bis auf die erhöhten Interferon beta

Expressionslevel in den behandelten Kollektiven keine Unterschiede. Die Kontrollgruppe wies allenfalls erhöhte Interleukin 4 Rezeptor Level sowie leicht erniedrigte Interferon gamma m- RNA Spiegel auf. Die geringe Krankheitsprogression beruht auf einer sich abwechselnden Interferon gamma und Interferon beta Interaktion mit nur geringer Entzündungsaktivität.

Die in der Literatur beschriebenen Effekte von Interferon beta eine Verlagerung des Th1/Th2 Gleichgewichtes zu gunsten einer Th2 Antwort mit nachfolgender Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL- 4 zu bewirken, konnte nicht verifiziert werden.

Erstaunlicherweise zeigten die behandelten Kollektive einen Anstieg des Schubparameters Interferon gamma. Dieses Ergebnis ist konträr zu den übrigen Studien, welche alle eine verminderte Interferon gamma Produktion aufzeigten. Dies könnte an unterschiedlichen Patientenkollektiven liegen oder dass unterschiedliche Untersuchungsmethoden (Messung auf m- RNA vs. Proteinebene) verwendet wurden.

Trotz des Anstieges von Interferon gamma kam zu keiner Krankheitsprogression. Der EDSS Score war stabil oder gar rückläufig.

Man kann davon ausgehen, dass endogenes Interferon beta zwar keine inhibierenden Einfluss auf die m- RNA Expression von Interferon gamma hat. Es gleicht wahrscheinlich auf Proteinebene das Gleichgewicht von Interferon gamma und beta aus und puffert die Interferon gamma Spitzen, welche wir gemessen hatten, ab.

Fazit:

Eine Interferon beta Therapie stimuliert die endogene Interferon beta Produktion. Die Dosis, welche zur Stimulation benötigt wird, ist abhängig von der initialen Ausgangsmenge von Interferon gamma. Patienten, welche initial nur eine geringe Menge von Interferon gamma m- RNA aufwiesen, sprachen immunologisch als auch klinisch gut auf die Dosierung von Interferon beta 1 a 22 µg an. Patienten mit initial hohen Interferon gamma zeigten immunologisch als auch klinisch keine Ansprache auf eine Interferon beta 1a 22 µg Therapie. Erst nach einer Dosisescalation auf 44 µg kam zu einer signifikant erhöhten endogenen Interferon beta Produktion und einem nachfolgenden klinischen Benefit. Diese Beobachtung unterstützt die These von Petereit et al 2002: „low Interferon gamma producers are better treatment responders“.

5. Summary/ Zusammenfassung

Multiple sclerosis is the most common chronic inflammatory disease of the CNS in the western world and Australia. Autoreactive T-cells, mostly attack myelobasic protein of oligodendrocytes, are held to be responsible for the disease. Consequently causes destruction of the myelin sheat, as well as axonal damage and sclerosis occurs.

According to the guidelines of the Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe, interferon beta biologics are used in the therapy of the relapsing remitting MS (Interferon beta 1a[®], Avonex[®], Betaferon[®]).

Numerous clinical studies showed a stable or less activity of disease by using interferon beta, resulting in a lower rate of relapses and a decelation of progress. (constant MRI status and EDSS-Score)

In this work, the interindividual differences according due to the immune profile and clinical appearance of untreated and interferon beta 1a medicated patients, should be shown.

Additionally the dose-effect relation of interferon beta therapy to the immune profile, especially to the endogene production of interferon beta, of patients medicated with interferon beta 1a 22 µg and interferon beta 1a 22 µg/44 µg, was analysed.

All in all 50 patients (16 un-treated, 17 interferon beta 1a 22 µg, 17 patients, showing a progress in disease by a one year of therapy with interferon beta 1a 22 µg and therefore were treatet with interferon beta 1a 44 µg) were observed for one or two years (interferon beta 1a 22 µg/44 µg). The patients were seen in a three month term in our MS-consultation for acquirement of blood samples and medical examination.

The immune monitoring was performed by real time PCR with sequence specific Hyb-probes. By real- time PCR the pro- inflammatory cytokine TNF R1, R2 and interferon gamma, as well as the anti- inflammatory cytokines IL4, IL4-R, and interferon beta were measured.

As a result there were no signifc differences in TNF R1 and R2, as well as in IL4 and IL4-R during the obervation period of one or two years measured in the controll group, the 22 µg group and the 22 µg/44 µg group.

The production of mRNA interferon beta was significant higher after a period of six and nine months after a change from interferon beta 1a 22 µg to interferon beta 1 a 44 µg; also in comparison to the control group and to the interferon beta 1a 22 µg group.

Also the interferon beta 1a 22 µg group showed a non significant rise of interferon beta after three month of treatment.

Previously other authors described effects of interferon beta on a shift to the Th1/Th2 balance in favour of a Th2 answer with successive release of anti- inflammatory cytokines like IL-4. This could not be verified in our work.

An interferon beta treatment stimulates the endogene production of interferon beta in human beings. The dose, necessary for stimulation, depends on the initial amount of interferon gamma. There was a good respond of treatment with interferon beta 1 a 22 µg by patients with initial low doses of interferon gamma m-RNA.

No response according to immunological and clinical changes were seen by patients with initial high interferon gamma levels and a treatment with interferon beta 1 a 22 µg. Just after a increase of the dosage to 44 µg a significant higher endogene beta production and a clinical benefit were observed.

Our study confirms the thesis of Petereit et al 2002: “Low interferon gamma producers are better treatment responders.”

An interferon beta treatment has no suppressive effect on the endogene interferon beta production in vivo, as we have seen in the hypothalamic- pituitary adrenal axis. The existing data show an agonistic effect.

Zusammenfassung:

Die Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch- entzündliche ZNS- Erkrankung in der westlichen Welt und Australien. Die Pathophysiologie beruht auf autoreaktiven T- Zellen, welche sich vornehmlich gegen das myelobasische Protein von Oligodendrozyten richten. Nachfolgend kommt zu einer Zerstörung der Myelinscheiden, Axonalschaden und sekundärer Sklerosierung.

In der Behandlung der schubförmigen multiplen Sklerose (relapsing remitting (RR)) werden, gemäß der Therapieleitlinien der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG), Interferon beta- Präparate (Rebif®, Avonex®, Betaferon®), eingesetzt.

Zahlreiche klinische Studien zeigten, dass Interferon b- Präparate die Grundaktivität der RR- MS- Erkrankung stabil halten oder senken können, so dass es letztendlich zu einer geringeren Schubrate, als auch zu einer Verlangsamung der Progredienz der Erkrankung kommt (Befundkonstanz der MRT- Bildgebung, Stabilisierung des EDSS- Scores).

In dieser Arbeit sollte zum einen die interindividuellen Unterschiede in Bezug auf das Immunprofil und die Klinik zwischen unbehandelten und mit Interferon beta 1a behandelten Patienten dargestellt werden.

Zum anderen wurde die Dosis- Wirkungsbeziehung einer Interferon beta Therapie auf das Immunprofil, insbesondere auf die endogene Interferon beta Produktion, von Interferon beta 1a 22 µg und Interferon beta 1a 22 µg/44 µg behandelten Patienten untersucht.

Es wurden insgesamt 50 Patienten (16 Pat. untherapiert; 17 Pat. Interferon beta 1a 22 µg, 17 Pat., welche unter einer einjährigen Therapie mit Interferon beta 1a 22 µg einen Krankheitsprogress zeigten und daraufhin eine Dosisverdopplung auf Interferon beta 1a 44 µg erhielten) über einen Zeitraum von einem Jahr bzw. zwei Jahren (Interferon beta 1a 22 µg/44 µg) beobachtet. Die Patienten wurden alle drei Monate in unsere hiesige MS- Sprechstunde zur Blutprobengewinnung und ärztlicher Untersuchung einbestellt.

Das Immunmonitoring erfolgte mit sequenz- spezifischen Hyb- probes mittels Real- Time- PCR.

Hierbei wurden zum einem die proinflammatorischen Zytokine TNF R1, R2 und Interferon gamma sowie die antiinflammatorischen Zytokine IL4, IL4 R, und Interferon beta gemessen.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede während des gesamten Beobachtungszeitraumes von einem bzw. zwei Jahren zwischen Kontrollgruppe, 22µg Gruppe, sowie der 22µg/44µg Gruppe bei folgenden gemessenen Parameter: TNF R1 und R2, sowie bei IL 4 und dessen Rezeptor.

Die m-RNA Interferon beta- Produktion war nach sechs und neun Monaten nach Wechsel von Interferon beta 1a 22 µg auf Interferon beta 1a 44 µg signifikant höher als zu Therapiebeginn (T 6 und T 9 (44µg) $p < 0,001$ vgl. mit T -9); ebenso im Vergleich zur Kontrollgruppe, dem Interferon beta 1a 22 µg- Kollektiv.

Die Interferon beta 1a 22 µg- Monogruppe zeigte ebenfalls 3 Monate nach Therapiebeginn einen, zwar nicht signifikanten, aber dennoch messbaren Anstieg von Interferon beta.

Die in der Literatur beschriebenen Effekte von Interferon beta eine Verlagerung des Th1/Th2- Gleichgewichtes zu Gunsten einer Th2 Antwort mit nachfolgender Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL- 4 zu induzieren, konnten nicht verifiziert werden.

Eine Interferon beta Therapie stimuliert die endogene Interferon beta Produktion. Die Dosis, welche zur Stimulation benötigt wird, ist abhängig von der initialen Ausgangsmenge von Interferon gamma. Patienten, welche initial nur eine geringe Menge von Interferon gamma m- RNA aufwiesen, sprachen immunologisch als auch klinisch gut auf die Dosierung von Interferon beta 1 a 22 µg an. Patienten mit anfänglich hohen Interferon gamma zeigten immunologisch als auch klinisch keine Ansprache auf eine Interferon beta 1a 22 µg Therapie. Erst nach einer Dosisescalation auf 44 µg kam es zu einer signifikant erhöhten endogenen Interferon beta Produktion und einem nachfolgenden klinischen Benefit. Diese Beobachtung unterstützt die These von Petereit et al 2002: „Low Interferon gamma producers are better treatment responders“.

Eine Therapie mit Interferon beta Präparaten hat somit keinen supprimierenden Effekt auf die endogene Interferon beta Produktion wie es bei anderen Hormonachsen bekannt ist (z. B. Cortison), sondern hat vielmehr eine agonistische Wirkung.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abbildungen:

Abb. 1	geographische Verteilung der MS	S. 3
Abb. 2	Verlaufsformen der MS	S. 5
Abb. 3	MS- Herde in der MRT	S. 6
Abb. 4	Pathologie der MS	S. 18
Abb. 5	Interferon gamma	S. 21
Abb. 6	PCR- Quantifizierung	S. 39
Abb. 7	Effizienz korrigiertes Modell nach Livak	S. 41
Abb. 8	Patientenkollektiv	S. 44
Abb. 9	Entwicklung der Schubrate	S. 48
Abb. 10	Interferon gamma	S. 51
Abb. 11	Tumornekrosefaktor Rezeptor R I	S. 52
Abb. 12	Tumornekrosefaktor Rezeptor R II	S. 53
Abb. 13	Interleukin 4	S. 54
Abb. 14	Interleukin 4 Rezeptor	S. 55
Abb. 15	Interferon beta	S. 56

Tabellen:

Tabelle 1	Mc Donald Kriterien	S. 10
Tabelle 2	EDSS- Score	S. 11
Tabelle 3	Patientenkollektiv	S. 26
Tabelle 4	Primer; Hyb- probes	S. 36- 38
Tabelle 5	Patientenkollektiv	S. 45
Tabelle 6	Schubrate	S. 47
Tabelle 7	EDSS- Score	S. 49

7. Literaturverzeichnis

Internetwebsites:

www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index

www.atlasofms.org

www.quellenhof.de/multiple-sklerose/multiple-sklerose-epidemiologie.php

Literatur:

1. Aldape K, Ginzinger DG, Godfrey TE, real- time quantitative polymerase chain reaction: a potential tool for genetic analysis in neuropathology. *Brain Pathol.* (2002) Jan;12(1): 54-66. Review
2. Anderson M, Alvarez-Cermenó J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Frederikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Gronning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhaes A, Massaro AR, Öhman S, Reiber H, Rönnbäck L, Schluep M, Schuller E, Sindic CJM, Thompson EJ, Trojano M, Wurster U, cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1994); 57: 897-902
3. Andersson PB, Waubant E, Gee L, Goodkin DE, multiple sclerosis that is progressive from the time of onset. *Arch Neurol.* (1999); 56: 1138-1142
4. Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP, the role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* (2000); 47: 694-706
5. Arnason BGW, Reder AT (1994), Interferons and multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* (1994); 6: 495–547
6. Arnett HA, Jeff Mason J, Mike Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, and Ting JPY, TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neuroscience* (2001); 4 (11): 1116-1122

7. Ascherio A and Munger KL, enviromental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol* (2007); 61: 288-299
8. Ascherio A and Munger KL, enviromental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* (2007);61: 504-513
9. Awatsuji H, Furukawa Y, Hirota M, Murakami Y, Nii S, Furukawa S, Hayashi K, Interleukin 4 and 5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes (1993); 34: 539-545
10. Bager P, Nielsen NM, Birhmann K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfart J, et al., childhood infections and risk of mulitple sclerosis. *Brain* (2004); 127(11): 2491-2497
11. Barkhof F, Brück W, De Groot CJ, Bergers E, Hulshof S, Geurts J, Polman CH, van der Valk, remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance. *Arch Neurol* (2003); 60: 1073-1081
12. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N and Valk J, comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversdion to clinically define multiple sclerosis. *Brain* (1997); 120: 2059-2069
13. Barten DM, Ruddle NH, vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunology* (1994); 51: 123-133
14. Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin J, increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand.* (1988);78(4): 318-323

15. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P and Sørensen PS, immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* (2004); 251: II/15-II/24
16. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK, Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007 Dec; 19(6): 652-7. Epub 2007 Sep 4
17. Billau A, Kieseier BC, Hartung HP, biologic role of interferon beta in multiple sclerosis. *J Neurol.* (2004); 251: II/10-II/14
18. Brody JA, epidemiology of multiple sclerosis and a possible virus aetology. *The Lancet* (1972); 300: 173-76
19. Brück W, Stadelmann C, Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci* (2003); 24: 265-267
20. Bustin SA absolute quantification of mRNA using real- time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* (2000); 25: 169- 193
21. Butti E, Bergami A, Recchia A, Brambilla E, Del Carro U, Amadio S, Cattalini A, Esposito M, Stornaiuolo A, Comi G, Pluchino S, Mavilio F, Martino G, Furlan R, IL4 gene delivery to the CNS recruits regulatory T cells and induces clinical recovery in mouse models of multiple sclerosis. *Gene Ther.* (2008); 15(7):504-15. Epub 2008 Jan 31
22. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD, premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* (2002); 346(3): 165-173
23. Chao CC, Molitor TW, Hu S, neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J. Immunology* (1993);151: 1473-1481
24. Coffman RL and Mosmann TR, CD4+ T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Res Immunology* (1991);142: 7-9

25. Dayton JS, Turka LA, Thompson CB, Mitchell BS, Comparison of the effects of mizoribine with those of azathioprine, 6-mercaptopurine, and mycophenolic acid on T lymphocyte proliferation and purine ribonucleotide metabolism. *Molecular Pharmacology* (1992);41(4): 671-676
26. Delank HW, Gehlen W, *Neurologie*. 11. Auflage 6; Thieme Verlag
27. Duddy M, Niino M, Adatia F et al., distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* (2007); 178: 6092-6099
28. Elion GB, the Pharmacology of Azathioprine. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1993); 685: 401-407
29. Ferre F, quantitative or semi- quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* (1992);2: 1- 9
30. Fertl E, Krichmayr M, Interferon-Beta-1a subkutan in der Behandlung der Multiplen Sklerose. *Wien Med Wochenschr* (2008); 158/3-4: 98-109
31. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ et al., B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* (2002); 3: 944-950
32. Flachenecker et al. Multiple- Sklerose- Register in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt* (2008); 7/105
33. Flachenecker P, Bihler I, Weber F, Gottschalk M, Toyka K and Rieckmann P, cytokine mRNA expression in patients with multiple sclerosis and fatigue. *Multiple Sclerosis* (2004); 10:165-169
34. Freedman MS et al., randomized study of once-weekly interferon beta-1a therapy in relapsing multiple sclerosis: three-year data from the OWIMS study. *Multiple Sclerosis* (2005); 11: 41–45

35. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Öhman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJM, Sellebjerg F and Tourtellotte WW, recommended standard of cerebrospinal fluid, analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* (2005); 62: 865-870
36. Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Brüning T, Koch B., Sachinidis A, Vetter u. Ko (2002), a method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative realtime reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* (2002);16: 99- 110
37. Gale CR and Martyn CN, migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*, (1995); 47/4-5: 425-448
38. Ganten D, Ruckpaul K *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 1 Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*, Springer- Verlag Berlin-Heidelberg (1997) ; S. 58-59, S.67-73
39. Genc K , Dona DL, Reder AT, increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy, *J. Clin. Invest.* (1997); 99: 2664–2671
40. Gessner A, Rollinghoff M, biologic functions and signalling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunology* (2000); 201: 285-307
41. Gocke AR, Hussain RZ, Yang Y, Peng H, Weiner J, Ben LH, Drew PD, Stuve O, Lovett-Racke AE, Racke MK,transcriptional modulation of the immune response by peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists in autoimmune disease. *J Immunol.* (2009) Apr 1;182(7): 4479-87
42. Gold R, Linington C, Lassmann H, understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal model: 70 years of merits and culprits in

- experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* (2006); 129:1953-1971
43. Gold R, Hartung HP, Hohlfeld R, et al., Therapie der Multiplen Sklerose mit monoklonalen Antikörpern. *Akt Neurol* (2009); 36: 334-344
 44. Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA, Sailer M, Lewellyn-Smith N, Thompson AJ, Thompson EJ, serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *Journal of Neurology* (2001); 6: 487-495
 45. Glabinski AR, Pokoca L, Tchorzewski H, Selmaj K (1991) Lymphotoxin production in multiple sclerosis patients. *Arch Immunol. Ther. Exp.* (1991);39:285-290
 46. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO, lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signaling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* (2002); 38(6):315–322
 47. Grunwald IQ, Kühn AL, Backens M, Shariat K, Kostopoulos P, Paganagiotou P, multiple Sklerose. *Der Radiologe* 2008; 48: 544- 552
 48. Fidler JM, Quinn de Joy S, Smith FR, Gibbons JJ, selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone treated mice. *J Neuroimmunol* (1986);136: 2747–2754
 49. Hackstein H, Bitsch A, Anette Bohnert, Hofman H, Weber F, Ohly A, Linington, Mäurer M, Poser S, Rieckmann P, Bein G, analysis of interleukin-4 receptor alpha chain variants in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* (2001); 113: 240-248
 50. Hafler DA, Multiple Sclerosis. *J Clin Invest* (2004/March); 113(6): 788-794

51. Hamamcioglu K and Reder AT, Interferon- beta regulates cytokines and BDNF: greater effect in relapsing than in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* (2007); 13: 459-470
52. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA, potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *PNAS* (1989); 10:3803-3807
53. Hartung HP, Kieseier B, targets for therapeutic action of interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann Neurol* (1996); 40:824–825
54. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J et al. for the HERMES Trial Group, B-cell depletion with Rituximab in relapsing- remitting multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* (2008); 358: 676-688
55. Hawkins SA, McDonnell GV, benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 148-152
56. Hedegaard C, Chen N, Sellebjerg F, Soerensen PS, Leslie GQ, Bendtzen K and Nielson H, autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP. *Immunology* (2008); 128: 451-461
57. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R, simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (1992) 413-7. New York
58. Honda K, Hideyuki Y, Takaoka A, Taniguchi T, Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int. Immunology* (2005); 11: 1367-1378
59. Innis MA, Gelfand DH. (1990) Optimization of PCRs. In: *PCR protocols. A guide to methods an applications*. Editors: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. San Diego, CA. Academic Press, Inc, Chapter (1990);1: 3-12

60. Janeway CA, Travers R, “Immunobiology. The Immune System in Health and Disease”. Oxford: Blackwell Scientific Publications (eds 1994)
61. Jilek S, Schluep M, Meylan P, Vingerhoets F, Guigbard L, Monney A, Kleeberg J, Le Goff G, Pantaleo G, Du Pasquier RA, strong EBV- specific CD 8+ T- cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain* (2008); 131(7): 1712-1721
62. John GR, Lee SC and Brosnan CF, cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *The Neuroscientist* (2003) 9: 10-32
63. Kallal SL, the role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immuno Rev* (2005); 204: 43-54
64. Kornik B, Lassmann H, neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Research Bulletin* (2003); 61: 321–326
65. Kraus J, Oschmann P, Engelhardt B et al., soluble and cell surface ICAM-3 in blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: influence of methylprednisolone treatment and relevance as markers for disease activity. *Acta Neurol Scand* (2000);101(2): 135-139
66. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* (2006);27: 95–125
67. Kurtzke JF, rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-1452
68. Laske C, Oschmann P, Tofighi J, Kühne BS, Diehl H, Bregenzer T, Kraus J, Bauer R, Chatzimanolis N, Kern A, Traupe H, Kaps M, induction of sTNF-R1 and sTNF-R2 by interferon beta-1b in correlation with clinical and MRI activity. *Acta Neurologica Scandinavica* (2001); 103: 105-113

69. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* (2001); 7: 115–121
70. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D, Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* (1990); 20: 2375 – 2381
71. Liu W and Saint DA, validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(2002); 294: 347–353
72. Livak KJ, Schmittgen TD, analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* (2001); 25: 402-408
73. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J et al Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* (2002); 8: 500–508
74. Lublin FD, Reingold SC, defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46: 907-911
75. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H, heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* (2000); 47: 707-717
76. Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H, distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* (1996); 6: 259-274
77. Lünemann JD, Jelcic I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, Münz C, EBNA1-specific T-cells from patients with multiple sclerosis cross

- react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* (2008); 205 (8): 1763-1773
78. Lünemann JD, Münz C, Epstein- Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2007); 7(3): 253-258
 79. Mallam E, Scolding N, the diagnose of MS. *International MS Journal* 2009; 16: 19-25
 80. Marrie, RA, Cutter, G, Tyry, T, Hadjimichael, O, Campagnolo, D, Vollmer, T. Changes in the ascertainment of multiple sclerosis. *Neurology* 2005; 65: 1066–1070
 81. Martin R, McFarland HF et al., immunological aspects of EAE and MS. A critical review. In: *Clin.Lab.Sci.*(1995); 32: 121-181
 82. Matuszevicius D, Kivisakk P, Navikas VV, Tian W, Soderstrom M, Fredrikson S, Link H, Influence of IFN-beta1b (Betaferon) on cytokine mRNA profiles in blood mononuclear cells and plasma levels of soluble VCAM-1 in multiple sclerosis, *Eur. J. Neurol.*(1998); 5: 265–275
 83. McAlpine D, Lumsden CE, Acheson ED, multiple sclerosis: a reappraisal, second edition. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1972: 83- 301
 84. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121–127
 85. Multiple Sklerose- Therapie- Konsensus-Gruppe (MSTKG) (1999) Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. *Nervenarzt* (1999); 70: 371–386

86. MSTKG. Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. Nervenarzt (2001); 72:150-157
87. MSTKG. Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose . Nervenarzt (2006); 77: 1506-1518
88. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R, B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment; migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. Ann Neurology (2006); 59: 880-892
89. Miller DH, Filippi M, Fazekas F et al. Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis. Ann Neurology 2004; 56: 273-278
90. Monteyne P and Sindic C, data on cytokine mRNA expression in CSF and peripheral blood mononuclear cells from MS patients as detected by PCR. Multiple Sclerosis (1998); 4: 143-146
91. Morel PA, Oris TB, crossregulation between Th1 and Th2 cells. Crit. Rev. Immunol. (1991); 18: 275-303
92. Mosely B, Beckman MP, March CJ, Idzerda RL, Gimple SD, Vanden Bos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J, Wignall J, Smith CM, Gallis B, Sims JE, Urdal DL; Widmer MB, Cosman D, Park LS, the murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane-bound forms. Cell (1989); 59:335
93. Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. (1986); 51 Pt 1: 263-73
94. Navikas V, Link H, Review: Cytokines and the pathogenesis of Multiple Sclerosis. Journal of Neuroscience Research (1996); 45: 322-333

95. O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA, the neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 2001; 21: 81-92
96. Olerup O, Hillert J, HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* (1991) Jul;38(1): 1-15
97. Özenci V, Kouwenhoven and Link H, cytokines in multiple sclerosis: methodological aspects and pathogenic implications. *Mult Scler* (2002); 8: 396-404
98. Panitch H et al., randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology* (2002); 59: 1496–1506
99. Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I and Sing AK, IL-4- induced Peroxisome Proliferator- Activated Receptor gamma activation inhibits NF- kB Trans Activation in Central Nervous System (CNS) Glial Cells and protects oligodendrocyte progenitors under neuroinflammatory disease conditions: Implication for CNS- demyelinating diseases. *The Journal of Immunology* (2006);176: 4385-4398
100. Panitch HS, Hirsch L, Schindler J, Johnson KP, treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* (1987); 37: 1097-1102
101. Pearce JMC, historical Descriptions of Multiple Sclerosis, the Stories of Augustus D'Este and the Journal of a disappointed Man. *European Neurology* (2005); 54: 49-53
102. Perini P, Tiberio M, Sivieri S, Facchinetti A, Biasi G, Gallo P Interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type I and II and soluble E-selectin serum levels in multiple sclerosis patients receiving

- weekly intramuscular injections of interferon beta-1a. *Eur Cytokine Netw* (2000); 11(1): 81-86
103. Petereit HF, Bamborschke S, Esse AD and Heiss WD, Interferon gamma producing blood lymphocytes are decreased by interferon beta therapy in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* (1997); 3: 180-18
 104. Petereit HF, Nolden S, Schoppe S, Bomborschke S, Pukrop R and Heiss WD, low interferon gamma producers are better treatment responders: a two-year follow-up of interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler* (2002); 8: 492-494
 105. Pfaffl MW, a new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* (2001); 29(9): e45
 106. Pfaffl MW, Hageleit M, validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* (2001); 23:275-282
 107. Polman CH, Reingold SC, Edan G et al., diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the “Mc Donald Criteria”. *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846
 108. Ponomarev ED, Katarzyna M, Tan Y and Dittel BN, CNX- derived Interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *The Journal of Neuroscience* (2007); 27(40): 10714-10721
 109. PRIMS Study Group PRIMS-4: Long- term efficacy of interferon- β - 1a in relapsing MS. *Neurology*(2001); 56: 1628- 1636
 110. PRIMS Study Group, randomised double- blind placebo- controlled study of interferon β - 1a in relapsing- remitting multiple sclerosis. *Lancet*(1998); 352: 1498- 1504

111. Rae- Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed JF, sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Multiple Sclerosis* (1999); 3(5): 179-183

112. Ramgolam VS, Markovic-Plese S, Interferon-beta inhibits Th17 cell differentiation in patients with multiple sclerosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. (2010); Jun;10(2): 161-7

113. Rasmussen R, quantification on the LightCycler. In: Meuer, S.; Wittwer, C.; Nakagawara, K. eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications* Springer Press (2001), Heidelberg; ISBN 3-540-66736, 21-34

114. Reiser M, Kuhn FP, Debus J. *Radiologie. Duale Reihe*. 1. Auflage 2004. Thieme Verlag.

115. Repa MHG, Schirijverb HM, van Lopikc T, Hintzend RQ, Roosa MTL, Adère H, Polmanb CH, Van Liera RAW, Interferon (IFN)- β treatment enhances CD95 and interleukin 10 expression but reduces interferon- γ producing T cells in MS patients. *Journal of Neuroimmunology* (1999); 96: 92-100

116. Retzlaff K, Kuehne BS, Frielinghaus P, Kraus J, Reuß R, Kaps M, Oschmann P, influence of Interferon-beta treatment on the mRNA expression of endogenous Interferon-beta in Multiple Sclerosis patients. Eingereicht bei *Neurology*.

117. Reuß R, Pohle S, Retzlaff K, Hemberger J, Oschmann P: Interferon beta-1a induces tumor necrosis factor receptor 1 but decreases tumor necrosis factor receptor 2 leukocyte mRNA levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* (2009); 16: 171-176

118. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Lür W, Helwig A, Poser S, Tumor necrosis factor- α messenger RNA expression in

- patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Annals of Neurology*(1995); 37(1): 82-85
119. Rivers T, Sprunt D, Berry G, observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis. *J Exp Med* (1933); 39-53.
 120. Ross C, Clemmesen KM, Svenson M, Sørensen PS, Koch- Henriksen N, Lange Skovgaard G, Bendtze K and the Danish Multiple Sclerosis Study Group, immunogenicity of Interferon- beta in Multiple Sclerosis Patients: Influence of Preparation, Dosage, Dose Frequency and Route of Administration. *Ann Neurol* (2000); 48: 706-712
 121. Ross J, Aviv H, Scolnick E, Leder P. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* (1972); 69: 264-268
 122. Rudick RA, Ransohoff RM, biologic effects of interferons: relevance to multiple sclerosis. *Mult Scler* (1995); 1:12-16 (Suppl 1)
 123. Rudick RA, Ransohoff RM, cytokine secretion by multiple sclerosis monocytes. Relationship to disease activity. *Arch Neurol* (1992); 49: 265-270
 124. Ruess M, Etablierung einer quantitativen RT- PCR zur Analyse der Genexpression der Transkriptionsfaktoren IRF- 3 und IRF- 7.
 125. Rudick RA, Ransohoff RM, Peppler R, Van Der Brug, Medendorp S, Lehmann P, Alam J, Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* (1996); 40: 618-627
 126. Sato TA, Widmer MB, Finkelman FD, Madani H, Jacobs CA, Grabstein KH and Maliszewski CR, recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *The Journal of Immunology* (1993);7: 2717-2723

127. Schluep M, van Melle G, Henry H, Städler C, Roth-Wicky B, Magistretti P, in vitro cytokine profiles as indicators of relapse activity and clinical course in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* (1998); 4: 198-202
128. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA, Interferon gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* (2004); 75: 163-189
129. Selmaj K, Raine C. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* (1995); 23: 339-346
130. Sharief MK, cytokines in multiple sclerosis: pro- inflammatio or pro remyelination? *Multiple Sclerosis* (1998); 4: 169-173
131. Söderström M, multiple sclerosis: rationale for early treatment. *Neurol Sci* (2003); 24: 298–300
132. Stoll G, Jung S, Jander S, van der Meide P, Hartung HP. Tumor necrosis factor-alpha in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* (1993);45 : 1277-1285
133. Stow J, Low PC, Offenhäuser C, Sangermani D, cytokkone scretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology* (2009); 214: 601-612
134. Taniguchi T, Takaoka A, a weak signal for strong responses:interferon alpha/beta revisited. *Nat Rev* (2001); 2: 379-386
135. Teitelbaum D, Aharoni R, Arnon R, Sela M, specific inhibition of thr T-cell response to myelin basic protein b the synthetic copolymer COP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988): 9724-9728

136. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M, suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Euro. J Immunology* (1971); 1: 242-248
137. Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ, cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* (2003); 53(2): 189–197
138. Terlizze M, Simoni P, Antonetti F, in vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF-receptor p75 (TBP II) versus TNF-receptor p55 (TBP I) against TNF α and TNF- β . *J Interferon and Cytokine research* (1996); 16: 1047-1053
139. Tofighi J (2003): Immunmonitoring von Patienten mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose unter Therapie mit Interferon-beta 1b (Betaferon[®])
140. Thompson A, overview of primary progressive multiple sclerosis (PPMS): similarities and differences from other forms of MS, diagnostic criteria, pros and cons of progressive diagnosis. *Multiple Sclerosis* 2004; 10: 2-7
141. Thomson A (ed, 1994), the Cytokine Handbook, 2nd Edition, London: Academic Press.
142. Traugott U, Lebon P, Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* (1988); 24: 243-251
143. Tremlett H, Zhao Y, Devonshire V, UBC Neurologists, natural history comparisons of primary and secondary progressive multiple sclerosis reveals differences and similarities. *Journal of Neurol.* 2009; 256: 374-81
144. Uccelli A, Pedemonte E, Narciso E, Mancardi G, biological markers of the inflammatory phase of multiple sclerosis. *Neurol Sci* (2003); 24: 271–274

145. Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K, Interferon gamma induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol. Med* (1995); 1: 732-742
146. Verma IM, Temple GF, Fan H, Baltimore D, *Nature New Biol.* (1972); 235: 163-166
147. Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC, early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal banding test. *Arch Neurol* 2005; 62: 574-577
148. Visconti A, Santucci S, Figà Talamanca T, Cannoni S, Ristori G, Salvetti M, physiopathology of multiple sclerosis. *Neurol Sci* (2003); 24: 287–S290
149. Wandinger KP, Stürebacher CS, Bielekova B, Detore G, Rosenwald A, Staudt LM, McFarland HF, Martin R, complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper one-associated marker genes. *Ann Neurol* (2001); 50: 349-357
150. Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC, the natural history of multiple sclerosis: a geographically based study I: clinical course and disability. *Brain* 1989; 112: 133–146
151. Wenzel A. *Lexikon der Gentechnologie.* 1991
152. Yamaguchi KD, Rudermann DL, Croze E, Wagner TC, Velichko S, Reder AT, Salamon H, IFN- β -regulated genes show abnormal expression in therapy-naïve relapsing–remitting MS mononuclear cells: Gene expression analysis employing all reported protein–protein interactions. *Journal of Neuroimmunology* (2008); 195: 116–120
153. Yamamoto S, Kobayashi I, Tsuji K, Nishi N, Muro E, Miyazaki M, Zaitzu M, Inada S, Ichimaru T and Hamasaki Y, upregulation of Interleukin- 4 Receptor by Interferon gamma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Bio* (2004); 31: 456-462

154. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G, Interferon β in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* (1998); 51: 682-689
155. Zang YC, Yang D, Jhong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zhang JZ, Immunoregulation and blocking antibodies induced by interferon beta treatment in MS, *Neurology* (2000); 55: 397–404
156. Zhang X, Markovic-Plese S, Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* (2010) Sep; 112(7): 641-5. Epub (2010) Jun 1. Review.
157. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F, investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* (2004); Vol. 32, No. 12

8. Anhang

Materialen, Geräte und Software/Betriebssysteme:

Blutentnahme:

Multifly, Butterfly	Sarstedt, Nürnberg
S-Monovette EDTA K	Sarstedt, Nürnberg
Softasept N	Braun, Melsungen
Vlieskompressen (5*5cm)	Fuhrmann, Much

Leukozytenisolierung:

Pipetten (5ml&10ml)	Falcon, Franklin Lakes (USA)
Pipetboy	Integra Bioscience
Cellstar (15ml)	Greiner bio-one, Hess.Oldendorf
1000 µl Pipettenspitzen	Biozym
Buffer EL	Qiagen, Hilden
Buffer RLT	Qiagen, Hilden
2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Universal 32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

RNA-Isolation/ cDNA-Synthese:

QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Wasser für Injektionszwecke	Fresenius-Kabi, Bad Homburg
RNase-Free DNase-Set	Qiagen, Hilden

SuperScript II Reverse Transcriptase

Invitrogen Carlsbad,
Canada

dNTP Master Mix

Eurogenetic, Köln

Oligo dT 12-18

Roche Molecular
Biochemical,
Mannheim

Rnase-Inhibitor

Promega, Heidelberg

Falcon Tube (50ml)

Falcon, Franklin
Lakes, USA

Pipettenspitzen (1000µl, 200µl, 20µl, 10µl)

Biozym

Pipetten (1000µl, 200µl, 20µl)

Gilson

Pipette (10µl)

Eppendorf

Reaktionsgefäße (600µl, 1000µl)

Biozym,

Hess. Oldendorf

PP-PCR-Gefäß

Greiner bio-one

PCR-Sprint-Thermalcycler

Quantitative PCR:

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe

Roche, Mannheim

LightCycler Capillaries

Roche, Mannheim

Primer, Sonden

Operon, Köln;

Tib Molbiol, Berlin

Light- Cycler

Roche, Mannheim

Computer, Vectra

Hewlett-Packard,

München

Drucker Desk Jet 895 Cxi

Hewlett-Packard,

München

Software: LightCycler® Software

Roche, Mannheim

Statistik:

Excel

Microsoft,

Unterschleißheim

GraphPad Prism

GraphPad Software,

La Jolla CA; USA

Publikationsverzeichnis:

C. Dornes, T. Thomas, K. Retzlaff, M. Kaps, F. Blaes, M. Berghoff, P. Oschmann

Eine Dosissteigerung von Interferon beta 1a 22µg auf 44µg erhöht die endogene Interferon beta- Produktion und verlangsamt dadurch den Progress der MS-Erkrankung.

Akt. Neurologie Sep. 2008; Jahrgang 35; Ausgabe S01.

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kaps danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Oschmann sowie Herrn Dr. T. Thomas sowie Frau K. Skodda für die Überlassung des Themas sowie die gewährte engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen, die bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen voran Kathrin Faltermeier und den Mitarbeitern des Liquorlabors insbesondere Frau H. Weißer- Fichtner für ihre Geduld, Unterstützung und Einarbeitung in die PCR- Methodik.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

