

**Proteinexpression der an der Signaltransduktion durch TNF $\alpha$   
beteiligten Proteine FADD, TRADD, TRAF2 und RIP in  
humanen Leukozyten bei Patienten mit schubförmiger  
Multipler Sklerose**

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

vorgelegt von Anyka Beckmann

aus Lingen (Ems)

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie

-Neurologische Klinik-

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

des Universitätsklinikums Gießen & Marburg GmbH

Standort: Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med P. Oschmann

Gutachter: Prof. Dr. med. P. Oschmann

Gutachter: Prof. Dr. med. T. Acker

Tag der Disputation: 24. Juli 2014

## **Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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 sowie ethische und datenschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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 übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wird, wurde als solches kenntlich gemacht.“

Anyka Beckmann

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Multiple Sklerose</b>	<b>1</b>
1.1.1. Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose	1
1.1.2. Klinik: Symptome und Verlaufsformen der MS	3
1.1.3. Diagnostik	4
1.1.4. Therapie der Multiplen Sklerose	6
1.1.4.1. Betainterferone	8
1.1.5. Die Pathogenese der Multiplen Sklerose	9
1.1.5.1. Immunpathogenese	10
<b>1.2. Die Tumornekrosefaktor (TNF)/ TNF-Rezeptor (TNFR)-         Superfamilie</b>	<b>16</b>
1.2.1. Das Zytokin TNF $\alpha$	18
1.2.2. Struktureller Aufbau der TNF-Rezeptoren 1 und 2	19
1.2.3. Signaltransduktion durch TNF $\alpha$ : Apoptose und Inflammation	21
1.2.3.1. Signalübertragung durch TNFR1	21
1.2.3.2. Signalübertragung durch TNFR2	23
1.2.4. Das Adaptormolekül TRADD	24
1.2.5. Die TRAF-Familie und TRAF2	25
1.2.6. RIP: Die receptor interacting Kinase	26
1.2.7. FADD und die Induktion von Apoptose über TNFR1 und Fas	27
<b>1.3. Rolle der TNF/TNFR-Superfamilie bei der Multiplen Sklerose</b>	<b>28</b>
<b>1.4. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>31</b>
2.1.1. Chemikalien, Lösungen und Puffer	31
2.1.2. Antikörper	31
2.1.3. Geräte und Sonstiges Material	32
2.1.4. Auswertungssoftware	33
<b>2.2. Patienten und Probanden</b>	<b>34</b>
<b>2.3. Methoden</b>	<b>35</b>

---

2.3.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie_____	35
2.3.1.1	Forwardscatter, Sidescatter und Fluoreszenz	36
2.3.1.2	Extrazelluläre Messung_____	37
2.3.1.3	Intrazelluläre Messung_____	38
2.3.2	Leukozytenseparation aus Vollblut_____	39
2.3.3	Bestimmung der Zellzahl_____	40
2.3.4	Differenzierung von Leukozytensubpopulationen_____	40
2.3.5	Intrazelluläre Markierung der Proteine TRADD, TRAF2 und FADD in Leukozyten_____	41
2.3.6	Intrazelluläre Markierung zur Detektion der Expression des Proteins RIP in Leukozyten_____	45
<b>2.4.</b>	<b>Darstellung der Ergebnisse_____</b>	<b>46</b>
<b>2.5.</b>	<b>Quantitative Auswertung_____</b>	<b>47</b>
<b>2.6.</b>	<b>Statistische Auswertung_____</b>	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse_____</b>	<b>50</b>
<b>3.1.</b>	<b>Etablierung des intrazellulären Nachweises der Protein- expression von FADD, TRADD und TRAF2 mittels Durch- flusszytometrie_____</b>	<b>54</b>
3.1.1	Allgemeine Optimierung des Methodenprotokolls_____	54
3.1.2	Reproduzierbarkeit: Intra-Assay und Inter-Assay-Präzision	51
<b>3.2</b>	<b>Etablierung des intrazellulären, durchflusszytometrischen Nachweises des Adaptorproteins RIP_____</b>	<b>54</b>
3.2.1	Oberflächenmarkierung_____	54
3.2.2	Einfluss der Methanolkonzentration auf die Oberflächenmarkierung_____	55
3.2.3	Untersuchung des Einflusses der Konzentration von Paraformaldehyd auf die Messung von RIP und der Oberflächenmarker_____	56
3.2.4	Reproduzierbarkeit_____	57
<b>3.3</b>	<b>Patientenstudie_____</b>	<b>58</b>

3.3.1	Strukturvergleich der demographischen Daten_____	58
3.3.2	Korrelationsprüfungen_____	60
3.3.2.1	Einfluss des Alters auf die Proteinexpression der analysierten Parameter_____	61
3.3.2.2	Einfluss der Krankheitsdauer und der Krankheitsaktivität (EDSS, Progressionsindex) auf die Expression der analysierten Parameter_____	62
3.3.3	Die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2 im Vergleich zwischen untherapierten MS-Patienten und Gesunden_____	66
3.3.4	Einfluss einer Interferon Beta–Therapie auf die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2_____	73
<b>4.</b>	<b>Diskussion_____</b>	<b>77</b>
<b>4.1.</b>	<b>Etablierung der durchflusszytometrischen Methode_____</b>	<b>78</b>
<b>4.2.</b>	<b>Patientenstudie_____</b>	<b>80</b>
4.2.1.	Bewertung des Studiendesigns und der demographischen Daten_____	80
4.2.1.1.	Betrachtung des Alters zwischen den vier Kollektiven_____	82
4.2.1.2.	Betrachtung der Krankheitsaktivität anhand EDSS und Progressionsindex sowie der Krankheitsdauer bezüglich der drei Gruppen der Erkrankten_____	82
4.2.2.	Vergleich gesunder Probanden mit untherapierten MS-Patienten_____	83
4.2.3.	Die Expression von FADD bei untherapierten Patienten im Vergleich mit Gesunden_____	85
4.2.4.	TRADD im Vergleich zwischen untherapierten Patienten mit gesunden Probanden_____	87

4.2.4.1. Könnte TRADD ein möglicher Verbindungspunkt in der Pathogenese der MS und einer EBV Infektion sein?___	89
4.2.5. Die Expression von TRAF2 im Vergleich zwischen untherapierten und Gesunden_____	92
4.2.6. Einfluss einer Interferontherapie auf die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2_____	93
<b>4.3. Ausblicke_____</b>	<b>95</b>
<b>5. Zusammenfassung/ Summary_____</b>	<b>97</b>
<b>6. Literaturverzeichnis_____</b>	<b>99</b>
<b>7. Anhang_____</b>	<b>123</b>
7.1. Graphiken_____	123
7.2. EDSS-Score_____	135
<b>8. Danksagung_____</b>	<b>136</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	activating-protein-1
APC	Allophycocyanin
APRIL	A PRoliferation-Inducing Ligand
BAFF	B cell activating factor
BENEFIT	BEtaferon in Newly Emerging multiple sclerosis For Initial Treatment
BEYOND Study	Betaferon Yielding Outcomes of a New Dose
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	Cluster determinants/ Cluster of differentiation
CHAMPS-Studie	Controlled High Risk Subjects Avonex Multiple Sclerosis Prevention Study
CIS	clinical isolated syndrom
CRD	cysteinreiche Domäne
DD	death domain/ Todesdomäne
DED	Death effector Domain
DISC	death inducing signalling complex
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale nach J.F.Kurtzke
et al.	und andere
ETOMS	Ealry Treatment Of Multiple Sclerosis
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	FAS-Associateed-DeathDomain
FITC	Fluoreszenzisothiocyanat
FS	Funktionssysteme
FSC	Forwardscatter

---

g	Gravitationsbeschleunigung
HHV	Humanes Herpes Virus
HLA	Human leukocyte Antigen
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenös
IAP	Apoptose-Inhibitoren
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IFNB	Interferon Beta
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
JNK	Jun-N-terminalen Kinase
Kap.	Kapitel
Li-Heparin	Lithiumheparin
LMP-1	virales latentes Membranprotein-1
LT	Lymphotoxin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MEKK	MAP kinase kinase kinase
memTNF	transmembranes TNF
MeOH	Methanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	MS functional composite
MSTCG	multiple sclerosis consensus group
MSTKG	Multiple Sklerose Konsensus Gruppe
MW	Mittelwert
n	Strichprobenumfang
NEMO	<u>NF-<math>\kappa</math>B essential</u> modulator
NF $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NIK	NF- $\kappa$ B inducing kinase

---

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PeRCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Progressionsindex
PLAD	Preligand assembly domain
PML	Promyeloisches Leukämieprotein
PP-MS	primär chronisch progrediente MS
PRISMS	Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RANK	Receptor Activator of NF-κB
REGARD	REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing Disease
MS	
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RIP	Receptor Interacting Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RR-MS	schubförmig remittierende MS
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SODD	Silencer of death domains
SP-MS	sekundär chronisch progrediente MS
SSC	SidewardScatter
STAT-1	Signal transduction and transcription protein
Tab.	Tabelle
TACE	TNFα-Converting enzyme
TCR	T cell receptor
TGF	Transforming Growth Factor

TIM	TRAF-interacting motifs
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	TNF-Receptor-Associated-DeathDomain
TRAF2	TNF-Receptor-Associated-Factor
V	Verdünnungsfaktor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEP	Visuell evozierte Potentiale
VK	Variationskoeffizient
Z	Zellzahl
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **1. Einleitung**

## **1.1 Multiple Sklerose**

### **1.1.1 Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) ist in Mitteleuropa eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters. Es handelt sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) mit unterschiedlicher Ausprägung von Demyelinisierung und axonalem Schaden. Nach heutigem Wissensstand wird sie zu den Autoimmunkrankheiten gezählt. Der Verlauf der MS ist sehr variabel und durch symptomatische Läsionen (Plaques) im ZNS und progrediente neurologische Störungen gekennzeichnet. Trotz neuerer Therapieansätze in den letzten Jahren bleibt sie bei der weißen Bevölkerung eine der häufigsten Ursachen für eine Behinderung (Norsworthy, 2000). Aufgrund des häufigen Auftretens dieser Erkrankung, des frühen Krankheitsbeginns und des meist mit erheblichen alltagsrelevanten Behinderungen einhergehenden chronischen Krankheitsverlaufes ist die weitere Erforschung der Pathogenese und Ätiologie aus medizinischer und sozialer Sicht von großem Interesse.

Die Inzidenz der Multiplen Sklerose wird in Mitteleuropa mit 3-7 Erkrankten, die Prävalenz mit 30-60 pro 100.000 Einwohner angegeben. Etwa 8% der Patienten, die in einer Neurologischen Klinik in unseren Breitengraden behandelt werden, leiden an einer MS (Poeck und Hacke, 2006). Allein in Deutschland sind etwa 120.000-150.000 Menschen betroffen (Hein et al., 2000). Bei der Mehrzahl der Patienten manifestiert sich die Multiple Sklerose zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Bis heute ist die Ätiologie der Multiplen Sklerose nicht bekannt, man geht von einer multifaktoriellen Genese aus. Die weltweite Verteilung der MS wurde durch mehrere hundert epidemiologische Untersuchungen ermittelt (Kurtzke, 1993). Betrachtet man die globale Verteilung, so fällt ein Zusammenhang zwischen Breitengrad und Prävalenz auf. Da sie mit größerer Häufigkeit bei der kaukasischen weißen Bevölkerung auftritt (Kurtzke et al., 1979), scheinen neben geographischen auch genetische Faktoren eine Rolle zu spielen. Für die Beteiligung genetischer Faktoren sprechen Familien- und Zwillingsstudien: In Familienstudien fand sich bei einem von 6 MS-Patienten (13-19%) zumindest ein

ebenfalls an MS erkrankter Familienangehöriger, außerdem zeigten Familienangehörige von MS-Patienten ein bis zu fünfzigfach erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung an Multipler Sklerose zu erkranken (Sadovnick 1981; Sadovnick 1988; Sommer et al., 1996). In Zwillingsstudien zeigte sich eine Konkordanzrate von 30% für monozygote und von 3% für dizygote Zwillinge (Sommer et al., 1996).

Weitere genetische Untersuchungen zeigten wie bei anderen Autoimmunerkrankungen einen Zusammenhang mit bestimmten Haplotypen des MHC-(Major Histocompatibility Complex)-Komplexes. So fand man bei Kaukasiern eine Assoziation zwischen den Haplotypen HLA-DRB1\*15 und HLA-DQB1\*6 des humanen Leukozytenantigens Klasse II (HLA-II) und einer MS-Prädisposition (Haines et al., 1996; Oksenberg und Hauser, 1997). HLA-DR15 und HLA-DQ6 gehen mit einem zwei- bis vierfach erhöhtem Risiko für die Manifestation einer MS bei der weißen Bevölkerung einher (Olerup und Hillert, 1991). Weiterhin spielen Suszeptibilitätsvarianten im Interleukin-7 Gen sowie im Interleukin-2 Gen und andere eine Rolle (Klotz und Wiendl, 2012). Alle diese identifizierten Gene sind aber aufgrund ihrer Überlappung mit weiteren Autoimmunerkrankungen am ehesten als genetische Suszeptibilität gegenüber Autoimmunerkrankungen zu sehen (Klotz und Wiendl, 2012).

Obwohl Familien- und Zwillingsstudien für eine genetische Komponente in der Genese der Multiplen Sklerose sprechen, kann die geographische Verteilung nicht allein durch eine solche erklärt werden. Für die Beteiligung exogener Umweltfaktoren an der Pathogenese der MS sprechen Migrationsstudien, in denen gezeigt wurde, dass Menschen, die vor dem 15. Lebensjahr aus einem Gebiet mit hohem Erkrankungsrisiko in eines mit niedrigem emigrierten, das Risiko des neuen Landes annahmen, wohingegen Menschen, die nach dem 15. Lebensjahr umsiedelten, das Risiko ihres Herkunftslandes behielten (Dean und Kurtzke, 1971; Kurtzke et al., 1995). Eine Reihe von Umweltfaktoren, darunter Impfungen und Toxine, wurde diskutiert. Ein Zusammenhang zwischen einer Hepatitisimpfung und einer MS konnte nicht bestätigt werden (Zipp et al., 1999). Des Weiteren wird immer wieder eine infektiöse Genese der MS vermutet. Im Gespräch sind Viren wie das Masernvirus, Herpesviren, insbesondere HHV6 und das Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie Chlamydia pneumoniae u.a. (Meinl, 1999).

Neue Erkenntnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen der Genese der MS und einer EBV-Infektion. Dabei scheint EBV ein infektiöser Erreger zu sein, der viele der

epidemiologischen Daten der MS erklären könnte (Ascherio und Munger, 2007). Mehrere Studien zeigten, dass eine späte EBV-Infektion ein höheres Risiko für die Entwicklung einer MS mit sich bringt (Haahr et al., 1995; Thacker et al., 2006) und, dass die EBV-Reaktivierung mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren scheint (Wandinger et al., 2000). Epidemiologische Studien scheinen einen Zusammenhang zwischen klinisch aufgetretener infektiöser Mononukleose und einer erhöhten Prädisposition für eine MS aufzuweisen (Ramagopalan et al., Zaadstra et al., 2008). Es sind eine höhere EBV-Seropositivität und höhere EBV-Antikörper-Titer im Serum von MS-Patienten als bei gesunden Probanden gefunden worden (Bagert, 2009). Zudem fand man in Studien, dass eine erhöhte Immunreaktivität früh im Verlauf einer MS auftritt und nicht etwa eine Folge der Erkrankung ist (DeLorenze et al., 2006). Ein klarer Beweis für einen infektiösen Erreger fehlt jedoch weiterhin.

### **1.1.2 Klinik: Symptome und Verlaufsformen der MS**

Klinische Charakteristika der MS sind sich wiederholende Schübe, Befall verschiedener Anteile des ZNS und eine progrediente Behinderung im Verlauf der Erkrankung (Mumenthaler und Mattle, 2006). Ein akuter Schub ist definiert als ein oder mehrere neu oder erneut aufgetretene Krankheitszeichen mit einer Dauer von mehr als 24 Stunden und anschließender Remission, die subjektiv berichtet oder durch die neurologische Untersuchung objektiviert werden können. Der Abstand zum vorangegangenen Schub muss mindestens 30 Tage betragen. Die neurologischen Defizite dürfen nicht durch Infekte, das Uhthoff-Phänomen, Begleiterkrankungen und Erschöpfung erklärbar sein (Schmidt und Hoffmann, 2002). Aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten für die Lokalisation von Läsionen im Gehirn ist die Multiple Sklerose durch eine multifokale Symptomatik gekennzeichnet: entsprechend ihrer Lage können die Läsionen die unterschiedlichsten neurologischen Defizite verursachen.

Zur Quantifizierung des Schweregrades des neurologischen Defizits, wurden verschiedene Skalen entwickelt:

Eine der am häufigsten in Studien verwendete ist die Expanded disability status scale (EDSS) nach Kurtzke (1983): acht Funktionssysteme (Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, Vegetativum, Visuelles System, Psychische/ kognitive Funktionen) werden nach standardisierter neurologischer Untersuchung durch

Punktvergabe einzeln bewertet und anschließend wird unter Berücksichtigung dieser Teilsysteme der klinische Gesamtzustand auf einer Skala zwischen 0 (normaler neurologischer Befund) und 10 (Tod durch MS) beschrieben. Eine weitere Skala ist der „MS functional composite“ (MSFC), der die wesentlichen klinischen Dimensionen wie Arm- und Beinfunktion sowie die kognitive Beeinträchtigung umfasst und auf drei einfach schnell durchführbaren, quantitativen Untersuchungen beruht (Schmidt und Hoffmann, 2002).

Beim Krankheitsverlauf lassen sich drei Hauptformen unterscheiden. International anerkannt ist die Differenzierung zwischen einem schubförmig remittierenden (RRMS), einem sekundär chronisch progredienten (SPMS) und einem primär chronisch progredienten Verlauf (PPMS) (Lublin und Reingold, 1996). Der schubförmig remittierende Verlauf ist durch rezidivierende Schübe mit nachfolgender Remission/Teilremission ohne Verschlechterung zwischen zwei Schüben gekennzeichnet. Etwa 80-85% der Patienten leiden an einem schubförmig remittierenden Verlauf, nach 10-15 Jahren gehen jedoch etwa die Hälfte der Verläufe in einen sekundär chronisch progredienten, der eine mehr oder weniger langsam schleichende Verschlechterung der Symptomatik beinhaltet, über (Flachenecker und Hartung, 1996). Ein primär chronisch progredienter Verlauf (PPMS) findet sich lediglich in 10-15% der Fälle (Cottrell et al., 1999); dieser Verlauf geht von Krankheitsbeginn an mit einer zunehmenden Verschlechterung der Symptomatik einher.

### **1.1.3 Diagnostik**

Aufgrund der vielfältigen Symptomatik der Multiplen Sklerose ist eine Diagnosestellung nicht immer ganz einfach. Aus diesem Grund wurden standardisierte Diagnosekriterien entwickelt. Die lange geltenden Diagnose-Kriterien nach Poser (1983) wurden aufgrund neuerer apparativer Möglichkeiten und hier insbesondere durch die Fortschritte in der Kernspintomographie praktisch durch die McDonald-Kriterien (2001) ersetzt. Die McDonald-Kriterien von 2001 haben sich mittlerweile im klinischen Alltag bewährt und wurden 2005 in revidierter Form (Tab.1-1) herausgegeben (Polman et al., 2005).

Klinische Präsentation (Schübe)	Objektivierbare klinische Läsionen	Weitere erforderliche Kriterien
2 oder mehr	2 oder mehr	Keine; klinische Evidenz ausreichend
2 oder mehr	1	– räumliche Dissemination im MRT ODER – positiver Liquorbefund (Nachweis oligoklonaler Banden bzw. eines erhöhten Liquor-IgG-Index) und zwei oder mehr MS-typische Läsionen im MRT ODER – weiterer klinischer Schub an anderer Lokalisation
1	2 oder mehr	– zeitliche Dissemination im MRT ODER – weiterer klinischer Schub
1	1	– räumliche Dissemination im MRT oder zwei oder mehr MS-typische Läsionen im MRT mit pos. Liquorbefund UND – zeitliche Dissemination im MRT oder weiterer klin. Schub
0 (primär chronisch-progredienter Verlauf)	1	Revision 2005: Kontinuierliche Progression über ein Jahr, pro- oder retrospektiv, und zwei von folgenden Kriterien: – mindestens neun zerebrale T2-Läsionen oder mindestens vier zerebrale T2-Läsionen und positive VEPs – zwei fokale spinale T2-Läsionen – positiver Liquorbefund

Tab 1-1: Diagnosekriterien nach McDonald et al., 2001 (Revision 2005 nach Polman et al.)

Die Diagnose erfolgt demnach unter Betrachtung der klinischen Symptomatik (Anzahl der Schübe), der bildgebenden Diagnostik, des Liquorbefundes und der Visuell Evozierten Potenziale (VEP). Bei konsequenter Anwendung der revidierten McDonald-Kriterien kann somit schon nach Auftreten einer ersten klinischen Symptomatik (engl.: clinically isolated syndrome (CIS)) die Diagnose einer MS bereits ab 31 Tagen nach Auftreten der Initialsymptomatik gestellt werden (Cursiefen und Mäurer, 2007) und ein schneller Therapiebeginn gewährleistet werden. Die McDonald-Kriterien (2001) weisen jedoch darauf hin, dass die vorliegenden Symptome „durch nichts besser als durch das Vorliegen einer MS“ erklärt werden können sollten, so dass bei jedem klinisch isoliertem Syndrom immer Differentialdiagnosen wie z.B. eine Borreliose, Sarkoidose, Vaskulitiden oder andere seltenere Krankheiten ausgeschlossen werden müssen. Diese Kriterien wurden 2010 erneut revidiert (Polman et al. 2011) und vereinfachten vor allem die kernspintomographischen Kriterien um eine noch frühere Diagnose zu ermöglichen (siehe Tab 1-2; Mäurer, 2011). Mittlerweile ist auch die Rede von einem

radiologisch isolierten Syndrom, wobei hierbei noch nicht welcher der optimale Zeitpunkt für eine Therapie ist (Klotz und Wiendl, 2012).

Tab. 1 MRT-Kriterien zur örtlichen und zeitlichen Disseminierung; nach [1].		
	2005	2010
<b>örtliche Disseminierung</b>	3 der folgenden 4 Punkte treffen zu: <ul style="list-style-type: none"> <li>● eine Gd-anreichernde Läsion oder <math>\geq 9</math> T2-Läsionen</li> <li>● <math>\geq 1</math> infratentorielle Läsion</li> <li>● <math>\geq 1</math> juxtakortikale Läsion</li> <li>● <math>\geq 3</math> periventriculäre Läsionen (spinal = infratentoriell, spinale Läsionen werden zu den <math>\geq 9</math> T2-Läsionen hinzugezählt)</li> </ul>	$\geq 1$ T2-Läsion in mindestens 2 der 4 Regionen: <ul style="list-style-type: none"> <li>● periventriculär,</li> <li>● juxtakortikal,</li> <li>● infratentoriell</li> <li>● spinal (symptomatische Hirnstamm-/spinale Läsionen werden nicht mitgezählt)</li> </ul>
<b>zeitliche Disseminierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Nachweis einer neuen Gd-anreichernden Läsion mindestens 3 Monate nach dem ersten klinischen Ereignis</li> </ul> <b>oder</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Nachweis einer neuen T2-Läsion zu einem beliebigen Zeitpunkt nach einer Referenz-Aufnahme, die mind. 30 Tage nach dem ersten klinischen Ereignis erfolgte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● gleichzeitiger Nachweis asymptomatischer Gd-anreichernder und nicht-anreichernder Läsionen in einer Untersuchung</li> </ul> <b>oder</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Nachweis einer neuen T2-Läsion und /oder Gd-anreichernder Läsion in einem Follow-up-MRT (unabhängig vom zeitlichen Abstand zwischen den Untersuchungen)</li> </ul>

Tab. 1-2: Revidierte MRT Kriterien nach Polmann 2011 (Mäurer 2011)

### 1.1.4 Therapie der Multiplen Sklerose

Prinzipiell lässt sich bei der Therapie der Multiplen Sklerosen zwischen der symptomatischen Therapie, der akuten Therapie im Schub und der Intervalltherapie (Basistherapie und Therapieeskalation) unterscheiden (Abb. 1-3). Bei bisher nicht vollkommen verstandener Pathogenese der MS gibt es keine direkte kausale Therapie. Die Hauptziele der durchgeführten Therapien beruhen auf möglichst vollständiger Rückbildung der Symptome während eines Schubes, prophylaktischer Therapie zur Reduktion der Schubrate und einem möglichst Geringhalten des Behinderungsgrades. Ziel der symptomatischen Therapie ist die Verbesserung der Lebensqualität des Patienten, die Erhaltung seiner Selbstständigkeit und Vermeidung einer möglichen Behinderung und beinhaltet die medikamentöse Therapie von Symptomen sowie die nicht-medikamentöse Therapie in Form von regelmäßiger physiotherapeutischer und ggf. psychotherapeutischer Behandlung.

Indikation	CIS <sup>1</sup>	RRMS <sup>1</sup>		SPMS <sup>1</sup>		
Eskalations- therapie			1. Wahl – Fingolimod <sup>4</sup> – Natalizumab <sup>4</sup>	2. Wahl – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) <sup>5</sup>	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
	Basistherapie	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c.	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. (– Azathioprin) <sup>2</sup> (– IVIg) <sup>3</sup>		– Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) <sup>5</sup>	– Mitoxantron (– Cyclophosphamid) <sup>5</sup>
Schub- therapie	2. Wahl		– Plasmaseparation			
	1. Wahl		– Methylprednisolonpuls			

<sup>1</sup> = Substanzen in alphabetischer Reihenfolge. Die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens).  
<sup>2</sup> = Zugelassen, wenn IFN-β nicht möglich ist oder unter Azathioprin-Therapie ein stabiler Verlauf erreicht wird.  
<sup>3</sup> = Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.  
<sup>4</sup> = Fingolimod und Natalizumab haben neben der Zulassung zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung Therapie-naiver Patienten bei mindestens 2 behindernden Schüben mit Krankheitsprogression binnen der letzten 12 Monate und mindestens einer Gd+-Läsion bzw. einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT.  
<sup>5</sup> = Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunerkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren.

**Abb. 1-1: Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose (DGN-Leitlinien der Therapie bei Multipler Sklerose 2012)**

Als Standardtherapie im akuten Schub gilt die Stoßtherapie mit intravenösen Glukokortikoiden, die eine antiinflammatorische, antiödematöse und immunsuppressive Wirkung besitzen, die Produktion von Zytokinen und Entzündungsmediatoren inhibieren und des Weiteren eine Apoptose in T-Lymphozyten induzieren (Leussink et al., 2001). Durch die Kortison-Stoßtherapie kommt es zur beschleunigten Rückbildung von frischen Entzündungsherden und zum Abklingen der Schubsymptomatik (Andersson und Goodkin, 1998). Bei Therapieresistenz stellt die Plasmapherese eine Alternative dar (Weinshenker, 1999; MSTCG, 2004).

In der Basistherapie der Multiplen Sklerose des schubförmig-remittierenden Verlaufstyps spielen immunmodulatorische Substanzen eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen die Beta-Interferone und das Co-Polymer Glatirameracetat als Mittel der ersten Wahl, für die in mehreren multizentrischen, randomisierten und plazebokontrollierten Studien gezeigt werden konnte, dass sie signifikant die Schubrate, die Schwere der Schübe und die in der MRT (Magnetresonanztomographie) nachweisbare Krankheitsaktivität reduzieren (IFNB Multiple Sclerosis study group, 1993; Jacobs, 1996; PRISMS-Studie, 1998; Johnson et al., 1995; Comi et al., 2001b). Zudem zeigte sich die Wirksamkeit schon bei Erstmanifestation (Jakobs et al., 2000; Comi G., 2001a); für Avonex<sup>®</sup> und Rebif<sup>®</sup> belegen die CHAMPS- und ETOMS-Studien, für Betaferon die BENEFIT-Studie, dass ein früher Therapiebeginn schon beim CIS den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen kann und dass das Auftreten einer

klinisch manifesten MS signifikant verzögert wird (Miller, 2004). Für den sekundär chronisch progredienten Verlauf sind die Präparate Betaferon<sup>®</sup> und Rebif<sup>®</sup> zugelassen, wobei ein Behandlungserfolg hier wahrscheinlicher ist bei noch deutlich vorhandener klinischer (Schübe) und kernspintomographisch nachweisbarer (gadoliniumanreichernde Läsionen im MRT) Krankheitsaktivität (McFarland and IFNB-1B SPMS Study Group, 2000; MSTKG, 2006). Bei der primär chronisch progredienten MS können Cortisonstoßtherapien versucht werden (Cursiefen und Mäurer, 2007). Bei Unverträglichkeit und Kontraindikationen für Interferone und Glatirameracetat stehen als Mittel der zweiten Wahl in der Basistherapie Immunglobuline und Azathioprin zur Verfügung. Bei ansteigender und/ oder unveränderter Schubrate mit schlechter Remission unter einer der Basistherapien, MR-tomographisch fassbarem deutlichem Progress mit Anzeichen der Floridität sowie bei akzeleriert progredientem Verlauf mit zunehmender Einschränkung der Gehfähigkeit ist die Indikation für eine Eskalationstherapie mit Natalizumab (seit 2006 zugelassen) Mitoxantron oder Cyclophosphamid gegeben (Hartung et al., 2002; Frischholz und Rieckmann, 2006).

Aktuell werden orale Immuntherapeutika getestet. Dabei ist 2011 das orale Fingolimod zugelassen worden, das in der Eskalationstherapie angewandt wird. Empfehlungen entsprechen dabei denen der Natalizumabtherapie (Korn und Meuth, 2011).

### 1.1.4.1 Beta-Interferone

Die Beta-Interferone gehören zur Familie der Zytokine und werden vom Körper als Antwort auf virale Infekte sezerniert. Bei der MS wirken sie im Sinne einer Immunmodulation und beeinflussen sowohl die Aktivierung von Immunzellen als auch deren Wechselwirkung untereinander (Frischholz und Rieckmann, 2006). Betainterferone modifizieren die Zytokinproduktion zugunsten antiinflammatorischer Zytokine (Interleukin (IL)10 und 4) und die Inhibierung inflammatorischer (wie z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)). Sie haben eine Wirkung auf die T-Zellproliferation und Migration, auf die Bluthirnschranke und die Produktion von Adhäsionsmolekülen. Es sind drei rekombinante Interferon- $\beta$ -Präparate in der MS-Therapie zugelassen, die sich hinsichtlich ihrer Dosierung und Applikationsform unterscheiden: Interferon- $\beta$ -1b,

Betaferon<sup>®</sup>, s.c., jeden zweiten Tag; Interferon- $\beta$ -1a, Avonex<sup>®</sup>, i.m., einmal wöchentlich; Interferon- $\beta$ -1a, Rebif<sup>®</sup>, s.c., 3x wöchentlich).

### 1.1.5 Die Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose galt lange als typische ausschließlich entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Die Pathogenese beinhaltet inflammatorische und apoptotische Vorgänge im ZNS (Kornek und Lassmann, 2003; Barnett und Prineas, 2004). Man geht von einer autoimmunen Genese durch Autoimmunreaktion gegen Autoantigene der Myelinscheiden aus. Dafür sprechen vor allem die Assoziation mit dem HLA-II-Komplex, die autochthone Antikörperproduktion im Liquor und die Induzierbarkeit eines MS-ähnlichen Krankheitsbildes im Tiermodell der EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis). Zudem wurden in Blut und Liquor von MS-Patienten autoreaktive T-Lymphozyten nachgewiesen, welche gegen Myelin und Nichtmyelinantigene des ZNS gerichtet sind (Hohlfeld et al., 1995; Martin und McFarland, 1995). Histopathologische Untersuchungen belegen, dass außerdem schon früh im Krankheitsverlauf eine axonale Schädigung auftritt und diese gut mit dem Grad der Krankheitsaktivität korreliert (Ferguson, 1997; Trapp, 1998).

Pathologisch kennzeichnend für die MS sind disseminiert auftretende Entmarkungsherde (Plaques), die typischerweise periventrikulär zu finden sind. Makroskopisch erkennt man die Plaques als grau- bis graurosafarbene Läsionen, die bis zu mehrere Zentimeter groß sein können und mehr oder weniger gut abgrenzbar sind (Genain und Hauser, 1997). Mikroskopisch ist das histologische Bild vom Alter und der Aktivität des Prozesses abhängig. Man unterscheidet akute, chronisch akute und chronisch stumme Läsionen, je nach zeitlichem Verlauf und Progredienz. Relativ junge aktive Herde zeigen neben einer Demyelinisierung die Infiltration mononukleärer Zellen, vor allem Makrophagen und T-Lymphozyten, weniger B-Lymphozyten und Plasmazellen (Adams et al., 1989; Hartung, 1993). In über längere Zeit bestehenden, chronischen Läsionen finden sich relativ zellarme gliöse Gewebe (Allen, Kirk, 1997). Die Arbeiten von Lucchinetti et al. (1996; 2000) verweisen auf Unterschiede bei Demyelinisierungsprozessen und in der Oligodendrozyten-Pathologie in MS-Plaques. Bei ihren Untersuchungen mithilfe immunpathologischer Methoden zeigte sich eine deutliche Heterogenität in den Mustern der Entmarkung verschiedener Patienten, was

für unterschiedliche pathogenetische Vorgänge spricht. Vier histopathologische Muster der Entmarkung bei MS-Patienten lassen sich aufgrund ihrer Eigenschaften in Bezug auf Inflammation, Antikörperablagerung und Oligodendrozyten-dystrophie differenzieren (Lucchinetti et al., 2000).

### 1.1.5.1 Immunpathogenese

Man geht davon aus, dass sich die Pathogenese der Multiplen Sklerose aus einer inflammatorischen Phase und einer neurodegenerativen Phase zusammensetzt. So können Schübe als das klinische Korrelat von akuter Entzündung und Demyelinisierung im ZNS angesehen werden, wohingegen die chronische Demyelinisierung, Gliose und der Axonverlust ein Korrelat für die klinische Progression der Erkrankung darstellen (Frohmann et al., 2005).

Ein Großteil der Erkenntnisse in der Erforschung der pathogenetischen Grundlagen der Multiplen Sklerose beruht auf dem Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Die EAE ist eine T-Zell-vermittelte entzündliche Erkrankung des ZNS mit unterschiedlicher Ausprägung von Demyelinisierung, die durch Immunisierung in empfänglichen Tieren ausgelöst wird (Hemmer et al., 2006). Aktivierte T-Zellen bewirken durch zusätzliche Aktivierung von Mikrogliazellen und unter Rekrutierung von Monozyten eine Entzündungsreaktion und Demyelinisierung im ZNS. B-Zellen spielen eine untergeordnete Rolle für die Induktion der EAE, jedoch können Antikörper gegen Myelin-Protein (MOG) die Demyelinisierung verstärken (Linington et al., 1988). Die Autoimmunreaktion gegen Myelinantigene wird zurückgeführt auf eine Kreuzreaktivität gegen Proteine von Bakterien oder Viren (nach einem stattgefundenen Infekt) und gegen körpereigene Proteine, die zur Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen führt (Fujinami und Oldstone, 1985; Wucherpfennig und Strominger, 1995; Hemmer, 1997). Ausschlaggebend für die Entwicklung einer schubförmig remittierenden und einer chronischen EAE ist das „Epitope Spreading“. Das Epitope Spreading beschreibt einen Prozess, der zur Bildung von weiteren autoreaktiven T-Zellen führt, die, nachdem die T-Zellen zunächst nur gegen einige wenige Epitope gerichtet waren, nun gegen weitere, zusätzliche Myelin-Epitope gerichtet sind (Lehmann, 1993). Basierend auf dem Tiermodell der EAE wurde die Multiple Sklerose lange Zeit ebenfalls als ausschließlich T-Zell-medierte Erkrankung

angesehen, bei der es zu sekundärer Makrophagen-Anschoppung und Demyelinisierung kommt. Bestätigt werden konnten diese Vermutungen durch mehrere Untersuchungen, die zeigten, dass CD (Cluster of differentiation)<sup>4+</sup>-Th1-Zellen eine entscheidende Rolle bei der MS spielen (Laman, 1998). Da aber therapeutische Maßnahmen häufig im Tiermodell erfolgreich waren, jedoch bei der humanen Erkrankung versagten oder sogar zur Verschlechterung des Krankheitsverlaufes führten, wird für die Multiple Sklerose eine komplexere Pathogenese vermutet und der Forschungsschwerpunkt konzentriert sich nun wieder mehr auf das Verständnis der humanen Form der Erkrankung (Hohlfeld und Wiendl, 2001).

### *Die Bedeutung von Blut-Hirn-Schranke und Adhäsionsmolekülen:*

Die das Gefäßlumen auskleidenden Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sind durch so genannte „Tight Junctions“ eng miteinander verbunden, zusätzlich stabilisieren Astrozytenausläufer den Zellverband (Kniesel und Wolburg, 2000). Die Durchwanderung der BHS wird durch das Multi-Step-Modell beschrieben. Aktivierte T-Lymphozyten werden mit dem Blutstrom angeschwemmt, verringern ihre Geschwindigkeit und rollen mit losem Kontakt am Endothel entlang. Auf diese Weise sind die Entzündungszellen für chemotaktische Reize aus dem ZNS besser zugänglich. Die in der entzündlichen Phase gebildeten Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) führen zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM (vascular cell adhesion molecule) und ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecule) (Brosnan et al., 1995; Lee und Benveniste, 1999) und MHC-II-Molekülen auf Endothelzellen und Astrozyten (Traugott, 1987; Vass und Lassmann, 1990). Die aktivierten T-Zellen bilden Integrine (z.B.  $\alpha$ 4-Integrin) und exprimieren CD4 auf ihrer Zelloberfläche. Integrine und CD4 sind in der Lage, VCAM bzw. MHC-II zu binden (Steinman, 2001a). So wird die Transmigration durch das Endothel in das Hirnparenchym oder den Liquorraum- unter Beteiligung weiterer Moleküle - wie z.B. Metalloproteasen- ermöglicht. In der Regel ist VCAM in den Blutgefäßen des Gehirns wenig exprimiert; in Tiermodellen und bei MS-Patienten findet man jedoch eine erhöhte Konzentration (Frohmann, 2005).

Autoreaktive T-Lymphozyten, die gegen Myelin-Bestandteile gerichtet sind, finden sich nicht nur bei MS-Patienten, sondern auch im Blut und Liquor von gesunden Kontrollgruppen (Hohlfeld et al., 1995), führen bei Gesunden jedoch nicht zu einer

pathologischen Reaktion. Ein Erklärungsversuch ist, dass entweder das Expressionsniveau des Autoantigens bei gesunden Personen zu gering ist, oder, dass zusätzlich ein anderer Faktor vorliegen muss, wie z.B. eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (Barker und Billingham, 1977; Guerder et al., 1994). Hinzu kommt, dass die Penetration autoreaktiver T-Lymphozyten in das ZNS allein noch keine Entzündungsreaktion bewirkt. Vielmehr muss es nach Überwinden der BHS zur Reaktivierung von T-Lymphozyten kommen. Diese erneute Aktivierung erfolgt durch Antigen-präsentierende Zellen des ZNS (Mikrogliazellen oder Astrozyten), welche die entsprechenden antigenen Epitope (Myelinbestandteile) zusammen mit MHC-II-Molekülen präsentieren. Nach Wiedererkennung ihrer Zielantigene und anschließender Proliferation setzen die eingewanderten autoreaktiven T-Lymphozyten Zytokine frei, sodass es in den entzündlichen MS-Plaques wiederum zu einer Hochregulation von Zytokinen kommt (Cannella und Raines, 1995). Durch diese Zytokine wird eine Entzündungskaskade ausgelöst, in die weitere T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems mit einbezogen werden. Zytokine induzieren die Produktion von NO (ein freies Radikal, das ein Mediator bei Autoimmunerkrankungen ist und zum durch Mikrogliazellen bedingten Untergang von Oligodendrozyten führt) und Osteopontin durch Makrophagen, Mikrogliazellen und Astrozyten, sodass es durch das Zusammenwirken von Antikörpern, Komplementsystem, NO und TNF $\alpha$  sowie B- und T-Zellen zur Demyelinisierung kommt (Steinman, 2001a).

*Die Bedeutung von Lymphozyten, Zytokinen und Antikörpern:*

**T-Lymphozyten** lassen sich in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen unterteilen. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen Antigene, die durch den MHC-II-Antigen-Komplex von antigenpräsentierenden-Zellen präsentiert werden. Durch die Ausbildung des MHC-Antigen-TCR-(T cell receptor)-Komplexes werden sie aktiviert und differenzieren sich unter dem Einfluss verschiedener Mediatoren entweder in Th1- oder in Th2-Zellen, die ihrerseits ein unterschiedliches Zytokinprofil aufweisen (Seder und Paul, 1994): Th1-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine, vor allem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sowie Interleukin-2 (IL-2) und Lymphotoxin (LT / TNF- $\beta$ ). Sie sind an der Abwehr intrazellulärer Krankheitserreger und Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ beteiligt (Crucian et al., 1996; Oksaranta et al., 1996; Olsson, 1995a).

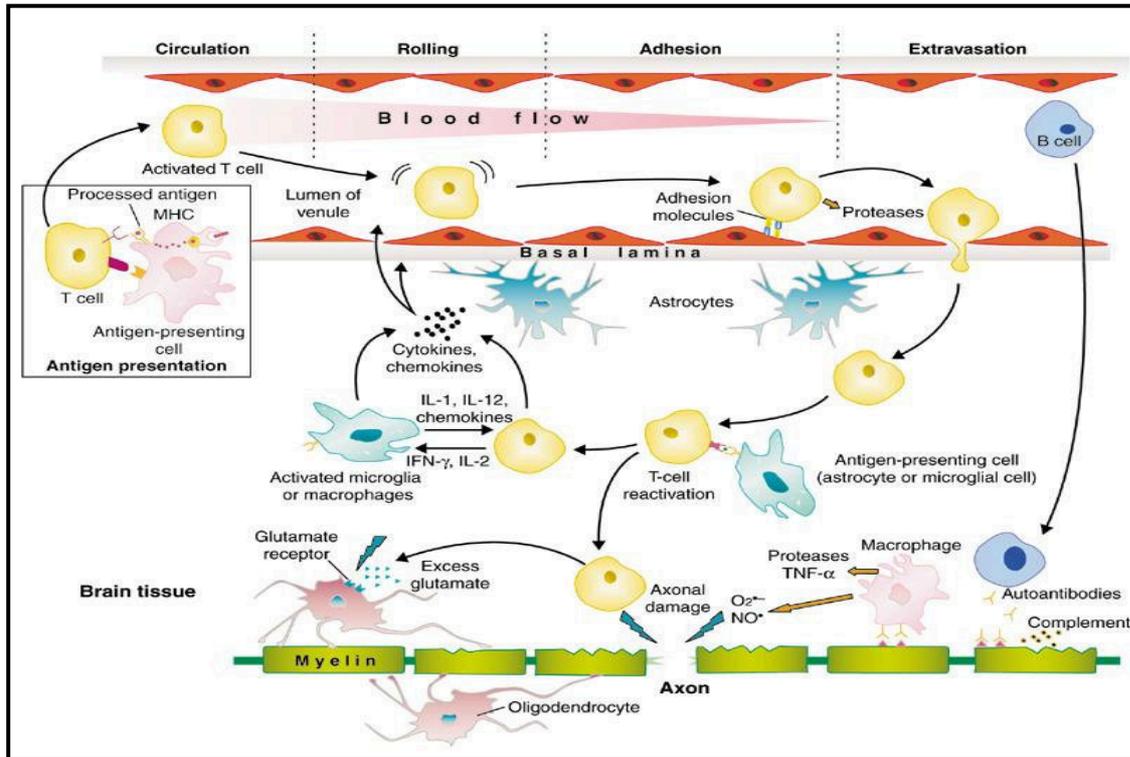


Abb. 1-2: Ein Modell der Pathogenese der Multiplen Sklerose. (nach Baranzini, Hauser in Genome Biology, 2002)

Im ZNS führen sie zu einem gesteigerten Einstrom von Entzündungszellen und zu einer Aktivierung von Makrophagen und Mikrogliazellen. Th2-Zellen sezernieren antiinflammatorische Zytokine wie die Interleukine IL-4, -5, -10 und -13 und TGF (Transforming Growth Factor)-β und regulieren die humorale Immunantwort, indem sie die Expansion und Immunglobulinsekretion von B-Lymphozyten induzieren. Außerdem sind sie an Hypersensitivitätsreaktionen vom Soforttyp und der Bekämpfung von Parasiten beteiligt (Navikas und Link, 1996). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass Zytokine eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS spielen, wobei die Th1-Zytokine eher eine Krankheitsprogression und die Th2-Zytokine eher eine Verbesserung der klinischen Symptomatik zu bewirken scheinen (Navikas und Link, 1996; Olsson, 1995a). Dass die Th2-Zytokine für die Reparatur und Regeneration förderlich sind, wurde durch Experimente belegt, die zeigten, dass TGF-β und IL-10 mit der Reparatur der Läsionen und dem Ende der Entzündungsaktivität korrelieren (Olsson, 1995b). Das gleichzeitige Auftreten proinflammatorischer wie regulatorischer Zytokine in aktiven Läsionen kann ein Hinweis darauf sein, dass bei der MS demyelinisierende und reparative Prozesse nebeneinander ablaufen. CD8<sup>+</sup>-Zellen

(zytotoxische T-Zellen) erkennen im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup>-Zellen Moleküle der MHC-I-Klasse, die von allen kernhaltigen Zellen präsentiert werden. CD8<sup>+</sup>-Zellen sind in der Lage, Zytokine zu produzieren, jedoch haben sie vor allem eine direkte zytotoxische Wirkung. In MS-Läsionen lassen sich sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten finden. Dabei sind CD4<sup>+</sup>-Zellen vor allem perivaskulär lokalisierbar und CD8<sup>+</sup>-Zellen im Zentrum und am Rand einer Läsion (Gay et al., (1997). Lange Zeit galten ausschließlich CD4<sup>+</sup>-Zellen als die entscheidenden T-Zellen bei der MS. Neure Untersuchungen belegen jedoch zunehmend die Bedeutung von CD8<sup>+</sup>-Zellen als mögliche Effektoren in der Pathogenese der MS (Steinman, 2001b; Hemmer, 2002; Lassmann und Ransohoff, 2004). Bitsch et al. (2000) zeigten eine Assoziation der Anzahl von Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-Zellen mit der Axonschädigung in Läsionen. Auch wurde nachgewiesen, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für Oligodendrozyten und Neurone direkt zytotoxisch sein können (Jurewicz et al., 1998; Medana et al., 2000). Aus diesem Grund wird vermutet, dass der Beginn der MS durch CD4<sup>+</sup>-Zellen initiiert wird, aber das Ausmaß des Schadens und die Chronifizierung und Progression durch CD8<sup>+</sup>-Zellen vermittelt sein könnte (Friese und Fugge, 2005).

Neben T-Lymphozyten lassen sich auch **B-Lymphozyten** und Monozyten in MS-Läsionen finden. Die Bedeutung von B-Lymphozyten in der Pathogenese der MS wurde lange Zeit vernachlässigt, da sie bei der EAE eine geringere Rolle spielt. Jedoch zeigen neueste Erkenntnisse, dass sich B-Zellen in ektopischen, intrameningealen lymphatischen Folikeln und in Läsionen der weißen Substanz ansammeln und, dass eine beachtliche Zahl dieser B-Zellen EBV-infiziert sind. Auf dem Boden dieser Funde ist es gerechtfertigt und von großem Interesse die B-Zell-vermittelten Mechanismen weiter zu untersuchen (Franciotta et al., 2008). Bestehende Therapieformen zeigen einen Einfluss auf die B-Zellen. Besonders das seit langem in der Therapieeskalation verwendete Mitoxantron hat einen antiproliferativen Effekt auf B-Zellen und kann zudem direkt deren Zelltod bewirken (Chan et al., 2005). Zudem konnte eine kürzlich durchgeführte Studie mit dem monoklonalen, gegen CD20-gerichteten Antikörper Rituximab, der zu einer Depletion von B-Lymphozyten führt, eine Reduktion von aktiven Läsionen im MRT aufzeigen und somit die Vermutung unterstützen, dass B-Zellen aktiv an der Entwicklung akuter Läsionen bei der schubförmig remittierenden MS beteiligt sind (Hauser et al., 2008). Außerdem sprechen für eine B-Zell-Beteiligung die in 90% bei

MS-Patienten nachweisbaren oligoklonalen Banden im Liquor, die auf eine autochthone IgG-Produktion durch Plasmazellen hinweisen und einen wichtigen diagnostischen Marker in der Diagnosestellung der MS darstellen. Des Weiteren finden sich Plasmazellen in hoher Anzahl in chronischen Läsionen (Prineas, 1978; Mallison, 1991) und Autoantikörper gegen Myelinproteine und andere Antigene in MS-Plaques und im Liquor sind beschrieben worden (Genain et al., 1999; Cross et al., 2001), wobei nicht geklärt ist, ob sie an der Entwicklung der pathologischen Veränderungen beteiligt sind oder lediglich als Antwort auf bereits entstandenen Gewebeschaden sezerniert werden (Cross et al., 2001). Histopathologische Analysen zeigten, dass Antikörper eine wichtige Rolle beim Beginn der Plaque-Bildung spielen könnten und bei gesicherter MS an Demyelinisierung beteiligt sind (Gay und Esiri, 1991; Breij et al., 2008; Franciotta et al. 2008).

Weiterhin werden neben demyelinisierenden auch remyelinisierende Eigenschaften durch B-Lymphozyten vermutet (Duddy und Bar-Or, 2006). B-Zellen bilden z.B. BDNF (brain derived neurotrophic-factor), ein Zytokin mit sowohl proinflammatorischen als auch re-generatorischen Eigenschaften im ZNS (Kerschensteiner et al., 1999) und auch Antikörper können anstatt dem Gewebe zu schaden die Regeneration unterstützen (Rodriguez et al., 1990).

### *Neurodegeneration:*

Die axonale Schädigung bei der MS ist in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt. Neben pathologischen Untersuchungen konnte der Axonverlust auch im MRT dargestellt werden (Evangelou et al., 2000). Man geht mittlerweile davon aus, dass Axonschäden für die anhaltenden neurologischen Defizite der MS verantwortlich sind (Trapp, 1998; Bitsch et al., 2000; Bjartmar und Trapp, 2001). Ein axonaler Schaden tritt schon in frühen Stadien der Erkrankung auf (Trapp, 1998). Mögliche Pathomechanismen für die Entstehung des Axonverlusts werden zur Zeit erforscht und beinhalten folgende Ansätze: Zum einen kann es während einer akuten entzündlichen Episode durch Entzündungsmediatoren (Proteasen, Zytokine, freie Radikale), Neurotoxine (z.B. N-Methyl-D-Aspartat / NMDA) und eine lokale Druckwirkung durch Ödembildung im Sinne eines Kollateralschadens zur zusätzlichen direkten Schädigung von Axonen kommen (Kapoor et al., 2003). Weiterhin zeigen neuere Untersuchungen, dass aktivierte T-Zellen Neurone direkt attackieren und

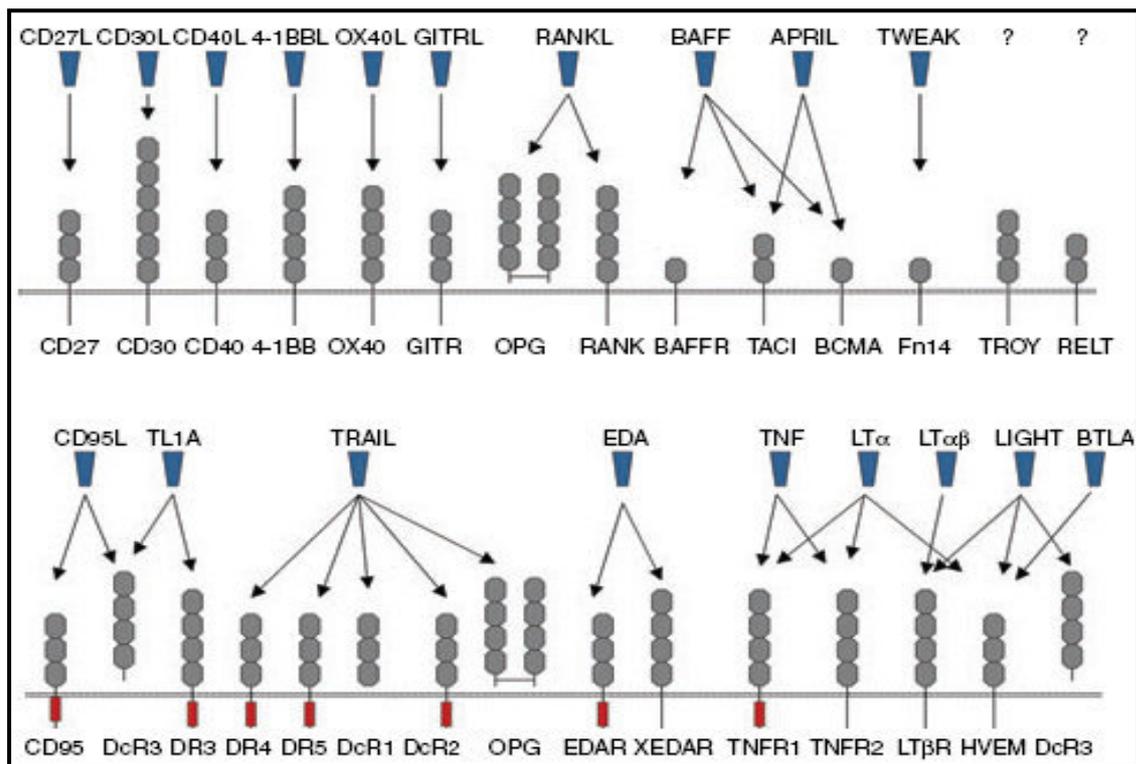
dadurch schädigen können (Guliani et al., 2003; Nitsch et al., 2004). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise für indirekte Mechanismen, die für eine neurodegenerative, nichtentzündliche Komponente bei der MS sprechen: Aufgrund des Verlustes der trophischen Unterstützung nach der Demyelinisierung kann es durch den Verlust des schützenden Myelins, durch eine Fehlfunktion von Mitochondrien und durch Freisetzung von Glutamat und NO zur axonalen Degeneration kommen (Griffiths et al., 1998; Lappe-Siefke et al., 2003).

### **1.2 Die Tumornekrosefaktor (TNF) / TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie**

Die TNF / TNFR-Superfamilie beinhaltet eine Gruppe von Molekülen, die eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems spielt. Die ersten Moleküle, die vor etwa 40 Jahren identifiziert wurden, waren Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  / Kachektin) und Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ / TNF- $\beta$ ) (Granger et al., 1969; Helson et al., 1975; Aggarwal et al., 1996). Mittlerweile sind bis zu 40 weitere Ligand- und Rezeptor-Mitglieder dieser Familie bekannt (s. Anhang). Dabei handelt es sich um ein Zytokinsystem, das viele entscheidende biologische Funktionen steuert; unter anderem ist es an entscheidenden Effekten bei der Kontrolle von Inflammation und Immunantwort von Infektionskrankheiten beteiligt, außerdem hat es eine ausschlaggebende Bedeutung in der Organogenese vor allem des Lymphsystems (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Auf der anderen Seite können einige Mitglieder dieser Familie, vor allem TNF- $\alpha$ , an schädigenden Wirkungen wie Sepsis, Fieber-Syndromen, Kachexie und Autoimmunkrankheiten beteiligt sein.

Bei allen Mitgliedern der TNFR-Familie handelt es sich um Typ-II-Transmembranproteine, die in der Regel in ihrer aktiven Form als Trimere vorliegen (Peschon et al., 1998). Sie unterscheiden sich in ihren extrazellulären Oberflächen, wodurch eine Rezeptorspezifität gewährleistet wird (Eck et al., 1989; Loetscher et al., 1993; Fesik, 2000). Ein typisches Kennzeichen aller TNFR-Mitglieder sind multiple, extrazelluläre cysteinreiche Domänen (CRDs), die sich in bestimmten Abständen wiederholen (so genannte Pseudorepeats) und sich je nach Rezeptor in ihrer Anzahl

unterscheiden. Die Cystein-Reste bilden stabile Disulfid-Bindungen aus, die die Struktur der Rezeptoren beeinflussen (Smith et al., 1994). Durch Bindung der Liganden an spezifische Regionen der extrazellulären Bereiche kommt es zur Aktivierung der Rezeptoren und zur Signaltransduktion. Die Signaltransduktion erfolgt dabei nicht direkt, sondern über die Rekrutierung weiterer intrazellulärer Adaptor-Proteine. Aufgrund ihrer Signaltransduktions-Eigenschaften lassen sich die Mitglieder der TNFR-Superfamilie in drei größere Subgruppen einteilen (Dempsey et al., 2003). Die erste Gruppe ist durch so genannte „Todesdomänen“ (Death Domains, abgekürzt DD) am intrazellulären Ende des jeweiligen Rezeptors gekennzeichnet. Dazu gehören TNFR1, CD95/FAS/Apo1, DR3, DR4 und DR5. Die zweite Gruppe, die nicht DD-tragende Gruppe, ist durch TIMs (TRAF-interacting motifs) gekennzeichnet und diese Rezeptoren interagieren direkt mit TRAF2. TNFR2, CD30, CD40, RANK (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B), Ox40 und andere Rezeptoren gehören zu dieser Gruppe (siehe Abb.1-6). Eine dritte Gruppe ohne bestimmte Region interagiert mit den intrazellulären Regionen (DD/ TIMs) der anderen Rezeptoren. In letzter Zeit wird der TNF/TNFR-Superfamilie immer mehr Bedeutung bei Abwehr, Inflammation, Apoptose, Autoimmunität und Organogenese beigemessen und die Erkenntnisse auf diesem Gebiet stellen neue Möglichkeiten für Therapieansätze vor allem bei Autoimmunkrankheiten, Osteoporose und Tumorerkrankungen dar (Hehlgans und Pfeffer, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die Adaptorproteine TNF-Receptor-associated-DD (TRADD), Fas associated DD (FADD), TNF-Receptor associated factor 2 (TRAF2) und Receptor-interacting-protein (RIP) untersucht. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren 1 und 2.



**Abb.1-3: TNF/TNFR-Superfamilie.** TNF-verwandte Liganden (blau) und ihre Interaktionen (Pfeile). Extrazelluläre Oberflächen sind als graue, intrazelluläre death domains als rote Zylinder dargestellt. Alle nicht DD-tragenden Rezeptoren übermitteln die Signale über TRAF-Moleküle (nach Hehlhans, Pfeffer, 2005).

### 1.2.1 Das Zytokin TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. Es ist bekannt, dass es das Überleben von Zellen, den Zelltod und das Wachstum regulieren kann (Tracey und Cerami, 1993) und somit bei vielen wichtigen Funktionen in der Pathophysiologie von Immunzellen sowie Nicht-Immunzellen eine Rolle spielt (Kollias und Kontoyiannis, 2002). TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen, aber auch von vielen anderen Zellen wie T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Zellen des neuronalen Gewebes freigesetzt (Wajant et al., 2003). Es wird als Antwort auf Infektionen und immunologische Reize ausgeschüttet. In der Regel wird TNF- $\alpha$  als überwiegend proinflammatorischer Mediator angesehen, der fakultativ apoptotische Reaktionen auslösen kann; es zeigt hierbei eine bemerkenswerte funktionelle Dualität: so ist es sowohl an Regeneration und Proliferation als auch an Destruktion von Gewebe beteiligt (Wajant et al., 2003).

Zunächst liegt TNF- $\alpha$  als transmembranes, homotrimeres Protein vor (memTNF), kann aber durch proteolytische Spaltung durch die Metalloprotease TNF-alpha-converting-enzyme (TACE) in die lösliche Form sTNF umgewandelt werden (Black et al., 1997). Über die Bindung der beiden transmembranen Rezeptoren TNFR1 und 2 (siehe unten) transduziert TNF- $\alpha$  seine Signale und hat die Aufgabe, physiologische Homöostase und Immunregulation aufrechtzuerhalten. Dabei sind Höhe, Zeitpunkt und Dauer der TNF- $\alpha$ -Aktivität von ausschlaggebender Bedeutung für die Immunantwort. Veränderungen dieser Faktoren führen zu Veränderungen der TNFR-vermittelten Aktivität, die sowohl proinflammatorisch, immunaktivierend oder immunsuppressiv ausfallen kann (Kollias und Kontoyiannis, 2002). Eine fehlregulierte TNF- $\alpha$ -Produktion charakterisiert viele der Autoimmunkrankheiten wie z.B. Rheumatoide Arthritis, chronisch-entzündliche Darmkrankheiten, systemischer Lupus Erythematoses und Multiple Sklerose. Ein weiterer Mechanismus, über den TNF- $\alpha$  einen organspezifischen Schaden vermitteln kann, ist die direkte Beeinflussung der Differenzierung, Proliferation und des Zelltodes vieler Zelltypen, die nicht zu den Immunzellen zählen, aber dennoch von entscheidender Bedeutsamkeit für diese Prozesse sind. Typische Beispiele sind direkte Effekte von TNF- $\alpha$  auf die Physiologie von Synoviozyten (Kontoyiannis und Kollias, 2000), das Epithel des Intestinaltraktes (Piguet et al., 1998), die B-Zellen des Pankreas (Benoist, Mathis, 1997) und die Physiologie von Oligodendrozyten (Robbins et al., 1987; Selmaj, Raine, 1988). Diese Zelltypen stellen wiederum relevante Zielzellen in der Pathogenese der entsprechenden Autoimmunkrankheiten dar. Die vielfältigen Effekte der Signalvermittlung durch TNF- $\alpha$  zeigen, dass ein besseres Verständnis dieser Mechanismen neue Möglichkeiten für das Eingreifen in das TNF/TNFR-System ermöglichen.

### 1.2.2 Struktureller Aufbau der TNF-Rezeptoren 1 und 2

Die Mitglieder der TNF-Familie üben ihre biologischen Funktionen über Interaktionen mit den verwandten membranständigen Rezeptoren (TNF-Rezeptor-Familie) aus (Locksley et al., 2001). TNF- $\alpha$  (wie auch LT- $\alpha$ ), sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form, kann prinzipiell an zwei Rezeptoren binden, den 55kDa-TNF-Rezeptor 1 (TNFR1; CD120a; p55/60) und den 75kDa-TNF-Rezeptor 2 (TNFR2; CD120b; p75/80). Dabei kann der Rezeptor TNFR2 nur durch membrangebundenes

TNF- $\alpha$  vollständig aktiviert werden, TNFR1 jedoch durch die membranöse und die lösliche TNF-Form (Grell et al., 1995; Grell et al., 1998). Die Ursache dafür ist bislang ungeklärt, jedoch könnten unterschiedliche Halbwertszeiten, und damit eine unterschiedliche Stabilität, des Rezeptor-Ligand-Komplexes daran beteiligt sein (Grell et al., 1995; Grell et al., 1998). TNFR1 und TNFR2 enthalten beide vier extrazelluläre CRDs und bilden längsförmige Strukturen, die mit dem trimeren Liganden interagieren können. Man geht mittlerweile davon aus, dass es unabhängig von einer Ligandenbindung zu einer Homotrimerisierung einzelner Rezeptormoleküle kommt. Die dafür verantwortliche Region in den CRDs wird PLAD (Preligand assembly domain) genannt (Chan et al., 2000). Diese Region ist nicht identisch mit der Region für die Ligandenbindung, aber entscheidend bei der Bindung des Liganden und der darauf folgenden Rezeptoraktivierung (Chan et al., 2000). Beide Rezeptoren können wie das membrangebundene TNF durch proteolytische Spaltung von der Oberfläche gelöst werden und in löslicher Form vorkommen (Wallach et al., 1991; Hehlhans und Mannel, 2002). Dabei behalten sie die Fähigkeit, ihre Liganden zu binden. Dieser Vorgang stellt einen zellulären Mechanismus dar, der es ermöglicht, die Rezeptorantwort zu kontrollieren und der Rezeptorstimulierung durch den Liganden entgegenzuwirken (Dermott et al., 1999; Hehlhans und Mannel, 2002). Für TNFR2 ist bekannt, dass die proteolytische Spaltung wie bei membranständigem TNF durch die TACE (TNF $\alpha$ -Converting enzyme) erfolgen kann (Solomon et al., 1999), für den TNFR1 ist das entsprechende Enzym bisher noch nicht bekannt.

Obwohl beide Rezeptoren in der Regel auf den meisten Zelltypen zusammen exprimiert werden können (Kinouchi et al., 1991), scheint es so, dass die Verteilung von TNFR1 weiter verbreitet ist und dass TNFR1 von den meisten Gewebetypen exprimiert wird. Die TNFR2-Expression hingegen ist begrenzter und stärker reguliert und ist eher auf Immunzellen beschränkt, findet aber auch auf Endothelzellen und neuronalem Gewebe statt (Wajant et al., 2003). Die beiden TNF-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Affinität zu TNF- $\alpha$  und in ihren intrazellulären Signaltransduktionswegen. Der TNFR1-Rezeptor zählt zur ersten Gruppe der TNFR-Superfamilie, der Death Domain tragenden Gruppe (Tartaglia, 1993; Dempsey et al., 2003). Über die DD können weitere Proteine rekrutiert werden und es kann sowohl Apoptose als auch Inflammation ausgelöst werden. TNFR2 hingegen kann nur den über TRAF-Moleküle vermittelten Signalweg

aktivieren. Der TNFR2 interagiert direkt mit TRAF-Molekülen und zählt zur zweiten großen Gruppe der Superfamilie (Dempsey et al., 2003).

### 1.2.3 Signaltransduktion durch TNF- $\alpha$ : Apoptose und Inflammation

#### 1.2.3.1 Signalübertragung durch TNFR1

Durch die Bindung von TNF- $\alpha$  an TNFR1 sind prinzipiell zwei Signalwege möglich: Die Induktion von Apoptose und die Vermittlung von Inflammation und Überleben der Zelle. Micheau und Tschopp (2003) vermuteten, dass die zwei verschiedenen Signaltransduktionswege, die durch TNFR1 aktiviert werden können, über die Bildung zweier verschiedener Komplexe zustande kommen. Dabei wird der erste Komplex an der Zellmembran aus TNFR1, TRADD, RIP, TRAF2 und dem I $\kappa$ B-Kinase-(IKK)-Komplex geformt und ist für die Aktivierung von nuclear factor-(NF)- $\kappa$ B und der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) verantwortlich. Der zweite Komplex entsteht durch Internalisierung von TNFR1 und Bindung von TRADD, FADD und der Kaspasen 8/10 und führt zu apoptotischen Vorgängen (Micheau und Tschopp, 2003; Schneider-Brachert et al., 2004). Zunächst liegt der Rezeptor in trimerer Form (siehe oben) vor. So genannte silencer of death domains (SODDs) verhindern die ligandenunabhängige Aktivierung, indem sie die DD des Rezeptors binden. Durch Aktivierung des Rezeptors nach Bindung von TNF- $\alpha$  dissoziieren die SODDs von der Todesdomäne und die Rekrutierung des zyttoplasmatischen Adaptor-Moleküls TRADD wird ermöglicht (Hsu et al., 1995; Jiang et al., 1999). Somit kann TRADD über seine „Todesdomäne“ (DD) an die intrazelluläre DD des TNFR1-Rezeptors binden (Chen und Goeddel, 2002). TRADD stellt einen Knotenpunkt in der Signalübertragung dar, da es als Plattform für die Rekrutierung der weiteren Adaptormoleküle TRAF2 und RIP sowie FADD dient und den Aufbau der jeweiligen Komplexe ermöglicht (Hsu et al., 1996a; Hsu et al., 1996b). Die Bindung von TRAF2 und RIP an TRADD führt zur Rekrutierung weiterer Adaptormoleküle und darüber zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Stanger et al., 1995; Hsu et al., 1996b). NF- $\kappa$ B zählt zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die Inflammation, Immunantwort und nicht apoptotische Antworten regulieren (Karin und Lin, 2002) In TRAF2- und RIP-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass TRAF2

für die Rekrutierung und RIP für die Aktivierung des IKK-Komplexes verantwortlich ist (Devin et al., 2000; Devin et al., 2001).

Neben der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges induziert TNF- $\alpha$  durch TNFR1 auch über mehrere weitere Adaptormoleküle und Signalwege die Aktivierung der c-Jun-Kinase (JNK) und die Induktion von MAPK(mitogen-activated protein kinase) und darüber die Aktivierung von AP-1 (activating-protein-1) (Yeh et al., 1997). Über TRAF2-defiziente Zellen konnte gezeigt werden, dass TRAF2 essentiell für diese Signalwege durch TNFR1 ist (Yeh et al., 1997). Die AP-1 Proteine spielen eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen inklusive Proliferation, Differenzierung und Induktion sowie bei der Vorbeugung von Apoptose (Chang, Karin, 2001).

Wie andere Rezeptoren der Subgruppe 1 der TNFR-Superfamilie, trägt der TNFR1 eine intrazelluläre Todesdomäne, über die der programmierte Zelltod induziert werden kann. Dazu wird, wie bereits erwähnt, der TNFR1 internalisiert und bindet TRADD, das wiederum FADD und die Prokaspasen 8/10 rekrutiert. Weitere Moleküle, die Bestandteil dieses Komplexes sind, sind TRAF2 und RIP. In der Folge wird eine Kaspasenkaskade induziert, an deren Ende die Kaspase 3 aktiviert wird und zur Apoptose führt (Micheau und Tschopp, 2003). Das Gleichgewicht der verschiedenen Signalwege wird an vielen Stellen reguliert, dazu gehören die Expression von Rezeptor bzw. Ligand, lösliche Rezeptorkomplexe und antiapoptotische Ligandeninduktion (Krippner-Heidenreich et al., 2002). In der Regel kommt es nach TNF-Bindung an TNFR1 zu Aktivierung des NF- $\kappa$ B und JNK-Signalweges. TNFR1 scheint apoptotische Vorgänge nur dann zu vermitteln, wenn die Proteinsynthese gebockt ist. Die antiapoptotischen Faktoren scheinen NF- $\kappa$ B-abhängig reguliert zu werden (Wang et al., 1998; Karin und Lin, 2002). Die Kontrolle der TNFR1-medierten Induktion von Apoptose wird über das Herunterregulieren von Kaspasen gesteuert, dazu werden Apoptose-Inhibitoren (IAPs) exprimiert (Roy et al., 1997).

Unter anderem ist z.B. c-FLIP ein NF- $\kappa$ B regulierter Apoptose-Inhibitor, der an die Death effector domain von FADD (siehe unten) binden kann, und so über die Inaktivierung der Prokaspase 8 eine Apoptose verhindert (Krueger et al., 2001; Thome und Tschopp, 2001).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der membranständige Komplex 1 des TNF-Rezeptors 1 innerhalb von Minuten in cholesterin- und sphingolipidreiche Plasmamembran-Mikrodomänen (lipid rafts) transloziert und dies essentiell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges ist (Legler et al., 2003).

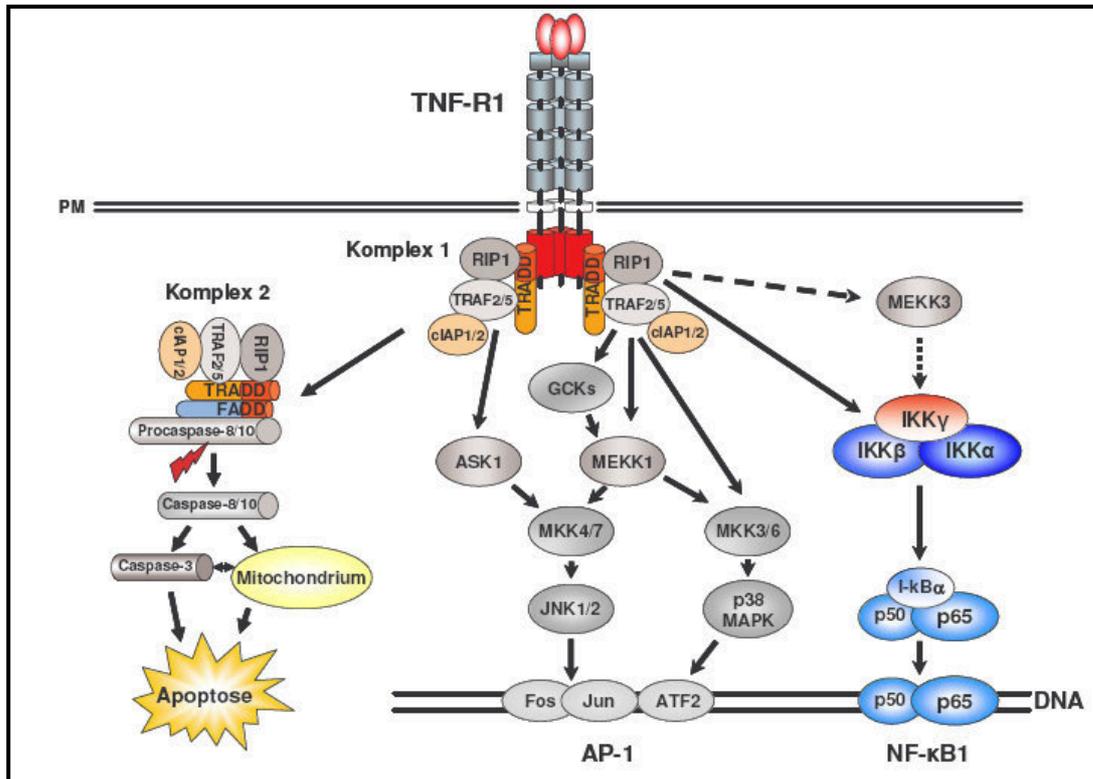


Abb. 1-4: Der Signalweg des TNF-Rezeptors 1. Apoptose und Inflammation (nach Schneider, 2005).

Doan et al. (2004) zeigten des Weiteren, dass der TNF-Rezeptor jedoch sowohl in lipid rafts als auch in so genannten „nonraft“ Fraktionen zu finden ist, und vermuteten, dass die „lipd rafts“ einen weiteren Mechanismus darstellen, durch den die entsprechenden Signaltransduktionwege gesteuert werden könnten. Insgesamt scheint die Signaltransduktion der einzelnen Wege jedoch um ein Vielfaches komplizierter und wird bis heute noch nicht vollständig verstanden.

### 1.2.3.2 Signalübertragung durch TNFR2

Die Signalübertragung durch TNFR2 ist weniger gut verstanden als die durch TNFR1. TNFR2 ist ein typisches Mitglied der nicht DD-tragenden Untergruppe der TNFR-Superfamilie und bindet direkt TRAF2 über sein zytoplasmatisches Ende. Die

Signalkaskade, die durch TRAF2-Bindung an TNFR2 ausgelöst wird, ist der durch TNFR1 ausgelösten relativ ähnlich. Durch TNF- $\alpha$  Bindung kommt es zur Rekrutierung von TRAF2 und auch von RIP und führt ebenso zur NF- $\kappa$ B und MAPK-Aktivierung. Diese ähnlichen Abläufe bei der Signaltransduktion beider Rezeptoren deuten auf eine wichtige Interaktion zwischen den TNF-Rezeptoren hin (Reinhard et al., 1997; Jupp et al., 2001). TNFR2 galt lange lediglich als „Liganden-Bereitsteller“ für TNFR1 (Tartaglia et al., 1993). Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass TNFR2 neben dem inflammatorischen Signalweg die über TNFR1 vermittelte apoptotische Kaskade verstärken kann. Einige Studien zeigten, dass die Stimulation von TNFR2 mit agonistischen Antikörpern in einigen Zellen ausreichend ist, um den Zelltod zu induzieren (Grell et al., 1993; Bigda et al. 1994; Meldvedev et al., 1994). Man geht dabei davon aus, dass eine Signaltransduktion über TNFR2 zur Bildung von endogenem TNF- $\alpha$  und damit zur Aktivierung von TNFR1 führt (Grell et al., 1999). Zusätzlich kann die Aktivierung von TNFR2 über einen TRAF2-abhängigen intrazellulären Mechanismus zu einem stark vermehrten TNFR1 induzierten Zelltod führen (Weiss et al., 1997; Declercq et al., 1998; Chan, Leonardo, 2000). Fotin-Mleczek et al. (2002) zeigten, dass die Stimulation von TNFR2 zu einer starken Rekrutierung von zytosolischem TRAF2 führt, und vermuteten, dass TNFR1 und TNFR2 um intrazelluläres TRAF2 konkurrieren. Dadurch wäre dann die Konzentration an zytosolischem TRAF2, das für den TNF-Rezeptor1 verfügbar ist, verringert und könnte so zur Verschiebung des Gleichgewichts und zur Apoptose-Kaskade führen.

### 1.2.4 Das Adaptormolekül TRADD

TRADD (TNF-Receptor associated-DD) ist ein aus 312 Aminosäuren aufgebautes 34kDa-Protein, mit einer C-terminalen Todesdomäne. TRADD interagiert über seine DD mit TNFR1 und wird in allen untersuchten humanen Geweben in geringen Mengen exprimiert (Hsu et al., 1995). Die Todesdomäne von TRADD hat eine hohe Homologie zu den Todesdomänen von FADD (Chinnaiyan et al., 1995) und RIP (Stanger et al., 1995). Über Interaktionen kann TRADD sowohl RIP als auch FADD binden (Hsu et al., 1996a; Hsu et al., 1996b).

TRADD wird neben seiner wichtigen Rolle in der Signaltransduktion durch den TNF-Rezeptor-1 außerdem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des viralen latenten

Membranproteins-1 (LMP-1) des EBV-Virus zugeschrieben. EBV maskiert über die LMP1 Bindung an TRADD die proapoptotischen Eigenschaften von TRADD und vermittelt Zell-Überleben und Wachstum (Schneider et al., 2008). Über seinen N-Terminus kann TRADD LMP-1 sowie die TRAF-Moleküle binden (Kieser et al., 1999; Inoue et al., 2000). Über die Rekrutierung von TRAF2 kommt es zu Aktivierung des NF- $\kappa$ B und JNK Signalweges (siehe oben).

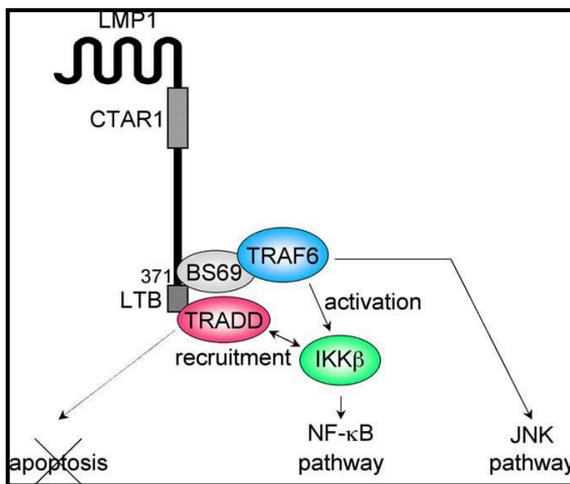


Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Rolle von TRADD im durch die Bindung von TRADD an LMP1 induzierten nicht apoptotischen Signaltransduktionsweg des EBVs (Schneider et al., 2008).

Des Weiteren ist TRADD an Prozessen im Zellkern beteiligt. TRADD kann in den Zellkern translozieren und ist dort in nukleären Strukturen, den PML (Promyeloisches Leukämieprotein)-Nuklearkörperchen, zu finden und kann über bislang unklare Vorgänge eine p53-abhängige Apoptose induzieren (Morgan et al., 2002). Eine weitere nukleäre Funktion ist die Interaktion von TRADD mit STAT (Signal transduction and transcription protein ) 1- $\alpha$  und die dadurch verursachte Beeinflussung der Interferon- $\gamma$  Signaltransduktion (Wesemann et al., 2004).

### 1.2.5 Die Familie der TRAF-Moleküle und TRAF2

Bisher sind 6 typische TRAF-Moleküle der TRAF-Protein-Familie bei Säugetieren bekannt, von denen alle bis auf TRAF4 an der Signaltransduktion der TNFR-Superfamilie beteiligt sind (Chung et al., 2007). Charakteristisch für TRAF-Moleküle ist ihre C-terminale TRAF-Domäne. Über die TRAF-Domäne wird die Rezeptorbindung und die Interaktion mit einer Vielzahl an Adaptor- und

Signalmolekülen vermittelt. Außerdem können die TRAF-Moleküle über diese Domäne mit weiteren TRAF-Molekülen interagieren (Au und Yeh, 2007).

TRAF2 (TNF-associated factor 2) ist ein 56kDA Protein und wurde durch „yeast two-hybrid screening“ über seine Interaktion mit dem C-terminalen Ende des TNF-R2 entdeckt (Rothe, 1995). Über die Bindung der C-terminalen TRAF-Domäne an das N-terminale Ende von TRADD interagiert TRAF2 mit TNF-R1 (Hsu et al., 1996a). In der Regel interagiert TRAF2 aber direkt mit vielen Rezeptoren der nicht DD-tragenden Subgruppe der TNFR-Superfamilie über so genannte TIMs (siehe oben). Folgende Rezeptoren der TNFR-Superfamilie rekrutieren TRAF2 zur Signaltransduktion und aktivieren entweder den NF- $\kappa$ B oder JNK Signalweg: TNF-R2, CD40, CD30, CD27, Ox 40, LT $\beta$ -R, RANK, Troy und einige andere (Au und Yeh; 2007). Eine entscheidende Rolle spielt TRAF2 in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges (siehe Kapitel 1.2.3.1). Neben der bereits beschriebenen Rekrutierung des IKK-Komplexes ist TRAF2 an der Ubiquitinierung von TRAF2 und RIP beteiligt; ein weiterer wichtiger Vorgang für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Lee et al., 2004). Neben dem klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg konnte gezeigt werden, dass TRAF2 auch an einem alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg beteiligt ist, der überwiegend in B-Zellen gefunden wird (Grech et al., 2004). Der alternative Weg ist abhängig von der Aktivierung von NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) und IKK $\alpha$ . Vor allem bei der Signaltransduktion durch CD40 konnten TRAF2-knockout-B-Zellen einen Hinweis für die inhibierende Wirkung von TRAF2 auf diesen alternativen Weg geben (Grech et al., 2004). Über die Interaktion mit verschiedenen MAP-Kinasen, wie z.B. MEKK1 und ASK1, ist TRAF2 in der Lage, den JNK-Weg zu aktivieren (Yuasa et al., 1998; Baud et al., 1999; Hoeflich et al., 1999).

### **1.2.6 Die rezeptorinteragierende Kinase: RIP**

RIP ist ein 76 kDa-Protein, das aus 671 Aminosäuren besteht und zuerst über seine Interaktion mit dem Fas-Rezeptor entdeckt wurde (Stanger et al., 1995). An seinem C-terminalen Ende trägt RIP eine DD, über die es zur Induktion von programmiertem Zelltod führen kann. Das N-terminale Ende enthält ca. 300 Aminosäuren, die homolog zu Serin/Threonin- sowie Thyrosin-Kinasen sind. Somit hat RIP im Gegensatz zu TRADD, TRAF2 und FADD enzymatische Aktivität. Des Weiteren trägt RIP eine besondere, innen liegende intermediäre Domäne, über die TRAF2 gebunden werden

kann. Hsu et al. (1996b) zeigten, dass RIP sowohl mit TRADD und TNFR1 über die DD interagieren kann, als auch mit TRAF-Molekülen über seine N-terminale und intermediäre Domäne. RIP ist in der Lage, sowohl die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (siehe oben) als auch den programmierten Zelltod zu induzieren. Dabei sprechen neuere Erkenntnisse dafür, dass in der Aktivierung des nekrotischen Zelltodes durch RIP ein System involviert ist, das ROS (reactive oxygen species) genannt wird (Zheng et al., 2006). Der programmierte Zelltod, durch DD-tragende Rezeptoren induziert, beinhaltet beides: Apoptose und nicht-apoptotische Mechanismen (Nekrose-ähnlicher Zelltod), und für TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass es unterschiedliche Wege des programmierten Zelltodes triggern kann (Holler et al., 2000; Jaattela und Tschopp, 2003; Chan et al., 2003; Maianski et al., 2003). Zu den Liganden, die in der Lage sind, über die Aktivierung ihrer Rezeptoren eine RIP-abhängige Induktion nekrotischer Signalwege auszulösen, zählen FasL, TNF und TRAIL (Holler et al., 2000). Obwohl RIP eine eigene DD besitzt, scheint es für seine Interaktion mit dem TNF-Rezeptor 1 auf TRADD angewiesen zu sein (Hsu et al., 1996b); Zheng et al. (2006) hingegen zeigten, dass nach TNF- $\alpha$ -Stimulierung TRADD und RIP zum Rezeptor rekrutiert werden, und vermuteten, dass beide um die Bindung an TNFR1 konkurrieren. So könnten Modifikationen von TRADD und RIP innerhalb des TNFR1 Signalkomplexes zur Regulation der Signaltransduktion beitragen (Zheng et al., 2006).

### **1.2.7 FADD und die Induktion von Apoptose über TNFR1 und Fas**

FADD ist ein 23kDA schweres Protein, sein C-terminales Ende trägt eine DD und das N-terminale eine Domäne, die Death effector Domain (DED) genannt wird. Über die DD interagiert FADD mit weiteren DD-tragenden Rezeptoren und Adaptormolekülen. Es gibt Hinweise dafür, dass alle Todesrezeptoren, die bisher untersucht wurden, von der DED Domäne des FADD-Moleküls abhängig sind (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1996; Varfolomeev et al., 1998; Zhang et al., Yeh et al., 1998; Kischkel et al., 2000). FADD erhielt seinen Namen über die Interaktion mit dem Fas Rezeptor. Es konnte mittels Immunopräzipitation gezeigt werden, dass FADD in der Signaltransduktion von Fas und DR3 unter Rekrutierung der Kaspasen 8 und 10 einen so genannten „death inducing signalling complex“ (DISC) bildet. Man geht davon aus, dass der Fas-DISC ein supramolekularer Komplex ist, der aus mehreren trimeren Fas-

Komplexen gebildet wird (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Rezeptorgebundenes FADD kann über seine DED mehrere Pro-Kaspasen 8 und 10 rekrutieren. Die Prokaspasen werden durch Dimerisierung aktiviert und durch autoproteolytische Spaltung in die aktive Form, die Kaspasen 8 und 10, gebracht (Boatright et al., 2003; Donepudi et al., 2003). Diese wiederum führen zur Rekrutierung weiterer Kaspasen, insbesondere der Kaspase 3, und zur Ausführung der letzten Schritte der Apoptose (Barnhart et al., 2003). TNFR1 hingegen kann, trotz DD, nur unter Rekrutierung des Adaptormoleküls TRADD mit FADD interagieren (Hsu et al., 1996a; Zheng et al., 2006). Wie bereits in Kapitel 1.2.3.1 näher erläutert, kommt es durch Internalisierung von TNFR1 zur Bildung des Komplexes 2 (Micheau und Tschopp, 2003) und erst dann zur Rekrutierung der Prokaspasen und weiteren Signaltransduktionsschritte.

### **1.3 Die Rolle der TNF-Superfamilie bei der Multiplen Sklerose**

Bisher wird die Rolle der TNFR-Signaltransduktion in der Multiplen Sklerose noch wenig verstanden. Bekannt ist, dass sich im peripheren Blut und im Liquor von MS-Patienten erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  finden und dass diese mit dem Grad der Krankheitsprogression korrelieren (Sharief et al., 1991; Maimone et al., 1991). Des Weiteren findet man TNF- $\alpha$  in aktiven MS-Läsionen im Gehirn (Hofmann et al., 1989) und ein direkter zytotoxischer Effekt von TNF- $\alpha$  auf Oligodendrozyten sowie ein proliferativer Effekt auf Astrozyten konnte gezeigt werden (Selmaj und Raines, 1988; Selmaj et al., 1990). Im Tiermodell der EAE bestätigte sich der Einfluss von TNF- $\alpha$ : eine Behandlung mit TNF- $\alpha$  führte zu einer verstärkten Krankheitsaktivität (Kuroda und Shinamoto, 1991) und eine Neutralisierung von TNF- $\alpha$  konnte die Tiere vor der Entwicklung einer EAE schützen (Ruddle et al., 1990; Selmaj et al., 1991; Baker et al., 1994). Auf dieser Basis wurde vermutet, dass die Neutralisierung von TNF- $\alpha$  auch bei der MS die Progression der Erkrankung vermindern oder zumindest aufhalten könnte. Klinische Studien mit TNF-Inhibitoren wie die Lenercept-Studie zeigten entgegen der Erwartungen eine geringe Wirksamkeit und führten in einem Großteil der Fälle zur Aktivierung des Immunsystems und Exazerbation des Krankheitsverlaufes (The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group, 1999). Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass TNF- $\alpha$  bei der MS neben proinflammatorischen schädigenden

Wirkungen auch an immunsuppressiven und reparativen Vorgängen beteiligt ist. Aus diesem Grund ist es interessant, die Signaltransduktion durch TNF- $\alpha$  und seine Rezeptoren näher zu verstehen.

Die Signaltransduktion durch TNFR1 spielt in der EAE eine entscheidende Rolle für die T-Zell-Apoptose (Bachmann et al., 1999). Eine Reduktion der Apoptose in Leukozyten führt zu einer verlängerten Lebensdauer von Leukozyten, insbesondere autoreaktiver T-Zellen, und somit zu einer vermehrten Migration dieser Zellen in das ZNS und damit einhergehend einer längeren Persistenz der Inflammation (Gomes et al., 2003). Arnett et al. (2001) zeigten eine duale Rolle für TNF- $\alpha$  bei Demyelinisierung und Remyelinisierung. Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zur Hochregulierung von TNFR1 und TNFR2 in Oligodendrozyten. Dabei führt die Signaltransduktion über TNFR1 zur Apoptose von Oligodendrozyten und über TNFR2 zu Remyelinisierung und Regeneration (Arnett et al., 2001; Hövelmeyer et al., 2005). Bei der MS scheint die Apoptose eine duale Rolle zu spielen; auf der einen Seite ist sie essentiell für die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen, auf der anderen Seite bewirken Immunzellen im ZNS einen Gewebeschaden über die Induktion von Zelltod in Neuronen und myelinproduzierenden Oligodendrozyten (Gold et al., 1997; Zipp 1999; Krammer, 2000).

Über das Verhalten von FADD, TRADD, TRAF2 und RIP bei der MS ist bisher wenig bekannt. In einer Studie unserer Forschungsgruppe wurden mittels real time PCR die Unterschiede zwischen RR-MS, SP-MS und PP-MS sowie einer Gruppe gesunder Probanden in der Gen-Expression der Parameter FADD, TRADD, TRAF2 und RIP untersucht (Reuss et al., 2007). Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied für TRAF2 und FADD im Vier-Gruppen-Vergleich. Zudem konnte man sehen, dass TRAF2 und FADD bei RR-MS vermehrt exprimiert wurden. Aus diesem Grund war es interessant auf diesem Gebiet weitere Nachforschungen zu treffen und auch auf Proteinebene die Unterschiede in den einzelnen Leukozytensubpopulationen zu untersuchen.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl man bis heute viele Erkenntnisse in der Pathogenese der Multiplen Sklerose gewonnen hat, ist sie immer noch nicht vollkommen verstanden. Thema der

vorliegenden Arbeit ist das Zytokinsystem der TNF-/ TNFR-Superfamilie und die Signaltransduktion durch TNF- $\alpha$  über seine beiden TNF-Rezeptoren bei Patienten mit Multipler Sklerose; insbesondere geht es um die Proteinexpression der Adaptormoleküle FADD, TRADD, TRAF2 und RIP in Leukozyten des peripheren Blutes. Wie zuvor bereits ausführlich beschrieben, ist das detaillierte Verständnis der Signaltransduktion durch TNF- $\alpha$  insbesondere aufgrund des Therapieversagens der TNF-Inhibitoren interessant geworden. Ein besseres Verständnis dieser Signalwege bei der MS könnte von diagnostischer Relevanz sein und neue Therapieansätze aufzeigen.

Basierend auf den zuvor durchgeführten Arbeiten in unserer Abteilung ergab sich folgende Aufgabenstellung:

1. Zunächst einmal die Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Messung der intrazellulären Proteinexpression der Adaptormoleküle FADD, TRADD, TRAF2 und RIP in Leukozyten, die aus peripherem Blut gewonnen werden. Dabei sollte die Methode der Durchflusszytometrie gewählt werden, da sie im Gegensatz zum Western Blot quantitative Aussagen ermöglicht.
2. Extrazelluläre Färbung der Oberflächenmarker CD3, CD14 und CD19 zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen und Zuordnung der intrazellulär gemessenen Proteinexpressionen.
3. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode Anwendung der durchflusszytometrischen Methode an verschiedenen Kollektiven:
  - a. Zum einen bei untherapierten MS-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Probanden.
  - b. Zum anderen bei mit Interferon-Beta therapierten MS-Patienten im Vergleich zu untherapierten Patienten. Da der vollständige Wirkmechanismus der Beta-Interferone noch nicht bekannt ist, ist es interessant den Einfluss der Interferontherapie auf diese Parameter zu erfassen. Dazu wurden Patienten gewählt, die über unterschiedlich lange Zeiträume mit Interferon- $\beta$  behandelt wurden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

#### 2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Fetales Kälber Serum	HyClone, Bonn
Ficoll-Paque <sup>™</sup> Plus	GE Healthcare, München
CELL Permeabilization Reagents Fix & Perm <sup>®</sup>	Caltag Laboratories, Invitrogen, Karlsruhe
D-PBS-GIBCO	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Fluka, Steinheim
NaN <sub>3</sub>	Fluka, Steinheim
Paraformaldehyd	Fluka, Steinheim
Trypanblau (...%)	Sigma-Aldrich, München

#### **FACS-Puffer**

2,5% Fetales Kälber Serum

0,1% NaN<sub>3</sub>

In PBS bei pH 7,2–7,4, Sterilfiltration mit 0,45 µm Filter

#### **Reagenzien für das Durchflusszytometer**

FACS Clean Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Flow Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Rinse Becton Dickinson, Heidelberg

#### 2.1.2 Antikörper

##### **Oberflächenmarker/ Monoklonale Antikörper**

CD3-PerCP	T-Lymphozyten	Becton	Dickinson,
Heidelberg			
CD14-PerCP	Monozyten/ Makrophagen	Becton	Dickinson,
Heidelberg			

CD19-APC	B-Lymphozyten	Becton	Dickinson,
Heidelberg			
CD45-FITC	alle hämatopoetischen Zellen	Beckman-Coulter,	Krefeld

### Intrazelluläre Markierung

FADD:	Polyklonaler Antikörper, rabbit Ig (Immunglobulin G) (sc-5559), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TRADD:	Polyklonaler Antikörper, rabbit IgG (sc-7868), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TRAF2:	Polyklonaler Antikörper, rabbit IgG (sc-7187), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Sekundärantikörper:	Goat anti-rabbit IgG-FITC (sc-2012), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Isotypkontrolle:	Chrompurerabbit-IgG (#011-000-003), Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
RIP:	Polyklonaler Antikörper, rabbit IgG (#4926), Cell Signaling Technology, Boston, USA
Alexa Fluor®488	F (ab') <sub>2</sub> fragment goat anti-rabbit IgG (H+L), Invitrogen, München

### 2.1.3 Geräte und sonstiges Material

#### Geräte

Durchflusszytometer	FACS-Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Heizrührer	IKA, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assitent, Sondheim
pH-Meter	Schott Geräte, Mainz
Vortexer	IKA, Staufen
Waage	Fischer, Goslar
Zentrifugen:	
1) Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
2) Rotixa	Hettich, Tuttlingen

### Sonstiges Material

15ml Tubes	Becton Dickinson, Heidelberg
Blutentnahmesystem	
Eppendorgefäße	Eppendorf, Hamburg
Monovette Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten(5ml, 10ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen (10ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter,0,45 µm Filter	Sartorius, Göttingen

### 2.1.4 Auwertungssoftware

Cellquest 3.1	Becton Dickinson, Heidelberg
---------------	------------------------------

### 2.2 Patienten und Probanden

Untersucht wurden die Unterschiede in der Proteinexpression der Parameter FADD, TRAF2 und TRADD bei Patienten mit Multipler Sklerose. Es wurden insgesamt 31 Patienten (29 weibliche und 2 männliche) der Neurologischen Universitätsklinik Gießen, die nach den erweiterten McDonald-Kriterien an einer MS erkrankt sind, in die Studie aufgenommen. Die Patienten wurden in der Poliklinik der Neurologischen Klinik betreut und im Rahmen einer dreimonatigen Routineuntersuchung regelmäßig neurologisch untersucht. So konnten unter anderem Behinderungsgrad, Anzahl der Schübe und Arzneimittelnebenwirkungen sorgfältig dokumentiert werden. Alle Patienten wurden zur Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und gaben ihre Einverständniserklärung. Die Studie wurde unter dem Ethikvotum AZ0806 durchgeführt.

*Studiendesign:* Es handelt sich um eine Querschnittstudie; von den untersuchten Patienten und Probanden wurde jeweils nur zu einem bestimmten Zeitpunkt Blut abgenommen.

Das erste Kollektiv besteht aus Patienten, die an einem schubförmig remittierenden Verlauf der Multiplen Sklerose leiden und zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Therapie erhielten. Als Kriterium hierfür gilt Folgendes: Die Patienten haben über 3 Monate keine Cortisontherapie erhalten, länger als 6 Monate keine Interferon-, Copaxone-, Immunglobulin- oder sonstige Basistherapie und noch nie eine Chemotherapie mit Mitoxantron oder Cyclophosphamid.

Das zweite Kollektiv besteht aus Patienten, die zwischen 6 und 15 Monaten mit Interferon Beta therapiert sind.

In ein drittes Kollektiv werden Patienten eingeschlossen, die länger als 15 Monate mit Interferon Beta therapiert wurden.

Die an der Studie teilnehmenden MS-Patienten waren in einem Alter zwischen 22 und 55 Jahren, der EDSS-Score lag zwischen 0 und 3,5.

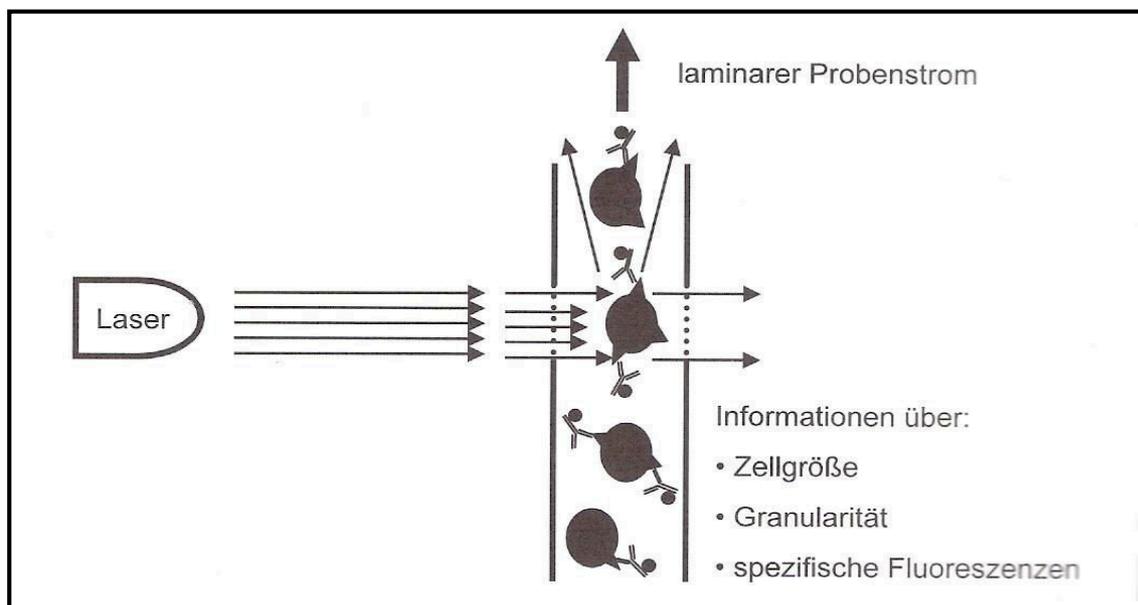
Außerdem wurden 10 weibliche, gesunde Probanden untersucht. Sie waren zwischen 35 und 56 Jahren.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer, je nach Ausstattung auch „Fluorescence Activated Cell Sorter“ oder „Fluorescence Activated Cell Scanner“ (FACS) genannt, ist ein Messsystem, das ermöglicht, auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften sowie Fluoreszenzen zu erfassen. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen, und auch kleinere Partikel, aufgrund ihrer Größe und Granularität sowie ihrer molekularen Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden können.

Ein Durchflusszytometer besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System (inklusive Laser) und der Elektronik. Während der Messung werden die Zellen in eine dünne Kapillare gesaugt, so dass ein laminarer Strom einzelner Zellen entsteht. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet und ist Voraussetzung für die Erfassung einer Einzelzelle durch den Laser.

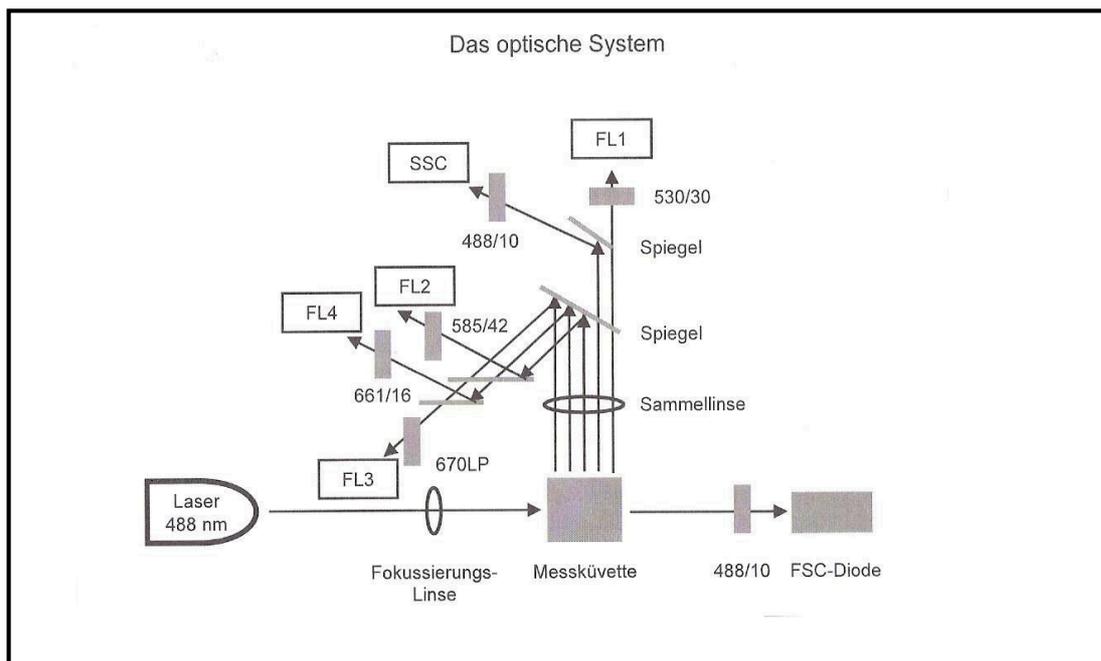


**Abb.2-1: Prinzip einer durchflusszytometrischen Messung:** Die Abbildung zeigt markierte Zellen, die innerhalb eines laminaren Probenstroms einzeln am Laser vorbeigeleitet werden. Nach Einstrahlung monochromatischen Lichts des Lasers kommt es zur Emission von Streustrahlung und Fluoreszenzlicht, die Aussagen über Zellgröße, Granularität und spezifische Fluoreszenzen geben (nach Luttmann et al., 2004).

Das optische System umfasst neben dem Laser mehrere Linsen, Spiegel und Filter, die das Licht bündeln, so dass dieses in einer Messküvette auf die zu untersuchenden Zellen oder Partikel trifft. Je nach Art des Lasers wird monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgesendet. Durch Auftreffen des Lichtes auf eine Zelle kommt es zur Lichtstreuung und bei entsprechender Fluoreszenzmarkierung zur Emission von Fluoreszenzlicht. Photodetektoren messen die gestreute bzw. emittierte Lichtintensität und wandeln die optischen Signale in elektronische Signale um. Dadurch wird die Übermittlung an einen Computer zur Analyse der Daten ermöglicht.

### 2.3.1.1 Forwardscatter, Sidescatter und Fluoreszenz

Charakteristisch für die unterschiedlichen Zellarten sind ihre Größe und Granularität. Außerdem können mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern weitere Aussagen über die molekulare Beschaffenheit der Zellen gemacht werden.



**Abb.2-2: Das optische System eines Durchflusszytometers:** Ein Laser sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge aus. Dieses wird fokussiert und trifft in einer Messküvette auf den Probenstrom. Das Licht wird gestreut (FSC/SSC). Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht verschiedener Wellenlänge, das durch ein System aus Spiegeln und Filtern nach Wellenlängenbereichen getrennt wird (FL1-FL4) (nach Luttmann et al., 2004).

Das von den Zellen gestreute Laserlicht wird im Durchflusszytometer mit Hilfe des Forwardscatters (FSC/ Vorwärtsstreulicht) sowie mit Hilfe des Sidescatters (SSC/

Seitwärtsstreulicht) detektiert. Dabei korreliert der Forwardscatter mit der Größe der Zellen und wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen (zwischen 0 und 10°). Der Sidescatter wird in 90° zum einfallenden Licht gemessen und ist proportional zur Zellkomplexität und -granularität.

Durch direkte oder indirekte Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff können spezifischere Aussagen über Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Eigenschaften der Zellen getroffen werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch das monochromatische Licht eines Lasers (Argon-Ionen-(488 nm) bzw. Helium-Neon-Laser (633 nm)) angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge (je nach Fluoreszenzfarbstoff). Daraus ergeben sich charakteristische Absorptions- und Emissionsspektren für die unterschiedlichen Fluorochrome. Das emittierte Licht wird durch Photomultiplier verstärkt und über Photodetektoren erfasst.

Der in dieser Arbeit verwendete FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) ist in der Lage, zwischen Emissionsspektren von vier verschiedenen Fluorochromen zu differenzieren, nämlich die der Fluorochrome Allophycocyanin (APC) Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (R-PE), sowie Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fluorochrome verwendet:

Alexa Fluor 488:	entsprechend FITC	
APC:	Absorptionsmaximum	650nm; Emissionsmaximum 660nm;
	Anregungswellenlänge	595/633/635/647nm
FITC:	Absorptionsmaximum	495nm; Emissionsmaximum
		519nm;
	Anregungswellenlänge	488nm
PerCP:	Absorptionsmaximum	482nm; Emissionsmaximum 678nm;
	Anregungswellenlänge	488nm/532nm

### 2.3.1.2 Extrazelluläre Markierung

Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich extrazelluläre Oberflächeneigenschaften und intrazelluläre molekulare Eigenschaften einer Zelle zu beschreiben. Hierzu werden

zum Nachweis bestimmter molekularer Strukturen spezifische Antikörper verwendet. Die Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichnet.

Die extrazelluläre Markierung ermöglicht die Detektion zellulärer Oberflächenantigene. Aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften ist es möglich, Zellen bestimmten Subpopulationen zuzuordnen. Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten der Markierung: die direkte und die indirekte. Bei der direkten Markierung wird ein fluoreszenzmarkierter Antikörper eingesetzt, der ein bestimmtes Antigen spezifisch bindet. Diese Methode ist die einfachste Art der Markierung, da ihr Versuchsablauf durch wenige Inkubations- und Waschschrte relativ unkompliziert durchzuführen ist. Die indirekte Markierung hingegen erfordert mehrere Schritte. So erfolgt zunächst die Inkubierung mit einem primären Antikörper. Dieser ist spezifisch für das zu untersuchende Antigen, jedoch nicht fluoreszenzmarkiert. Erst nach darauf folgenden Waschschrten wird ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper, der den primären Antikörper bindet, hinzugegeben. Die indirekte Markierung dient der Signalverstärkung vor allem bei geringen Konzentrationen des zu untersuchenden Antigens.

### 2.3.1.3 Intrazelluläre Markierung

Die intrazelluläre Messung ist aufwendiger als die extrazelluläre. Jede intrazelluläre Messung besteht aus drei grundlegenden Schritten:

- 1) Fixierung der Zellen
- 2) Permeabilisierung der Zellmembran
- 3) Antikörpermarkierung intrazellulärer Antigene

Die Fixierung der Zellen ist die Voraussetzung für die anschließende Permeabilisierung. Sie gewährleistet für einen gewissen Zeitraum die Stabilität der zu untersuchenden molekularen Strukturen. Paraformaldehyd dient in den meisten Fällen der Fixierung.

Die Permeabilisierung ermöglicht dem Antikörper in das Innere der Zelle zu gelangen und das entsprechende Antigen zu binden. Substanzen zur Permeabilisierung der Zellmembran sind z.B. Saponine, Methanol, Ethanol und TritonX-100. Des Weiteren sind von verschiedenen Firmen Fixierungs- und Permeabilisierungs-Kits erhältlich. Zum Nachweis der intrazellulären Antigene wird häufiger die indirekte Markierung angewandt. Bei der indirekten Markierung gibt man, wie oben bereits erwähnt, nach

Zugabe des primären unmarkierten Antikörpers einen markierten Sekundärantikörper hinzu. Entscheidend ist, dass zwischen der Zugabe des Primärantikörpers und der des Sekundärantikörpers eine ausreichende Anzahl von Waschschritten durchgeführt wird, um eine unspezifische Färbung zu vermeiden.

Die intrazelluläre Messung kann mit der extrazellulären Messung gekoppelt werden. Zunächst erfolgt dann die Zugabe der Oberflächenantikörper, darauf der normale Ablauf der intrazellulären Markierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Durchflusszytometrie genutzt, um Leukozyten, insbesondere Lymphozyten und Monozyten, aus humanem peripherem Blut zu untersuchen. Es wurden extrazelluläre Markierungen zur Differenzierung von Leukozytensubpopulationen und intrazelluläre Markierungen der Antigene TRADD, FADD und TRAF2 durchgeführt. Auf diese Weise konnten quantitative Aussagen über die Expression der Proteine getroffen werden und den unterschiedlichen Zellpopulationen zugeordnet werden.

### **2.3.2 Leukozytenisolierung aus peripherem Blut**

Mittels Ficoll-Separation werden die Leukozyten aus dem Vollblut separiert. Das Prinzip der Ficoll-Separation basiert auf Dichteunterschieden. Das Ficoll-Hypaque (ein synthetisches Polysaccharid) hat eine höhere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber die Dichte ist geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten, so dass diese Zellen nach Zentrifugation das Ficoll-Medium passieren und in der untersten Schicht verbleiben. Thrombozyten haben eine noch geringere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und verbleiben im Plasma. Zwischen Ficoll und Plasma bildet sich eine Interphase in der sich Lymphozyten und Monozyten befinden. Somit lassen sich Lymphozyten und Monozyten aus der Interphase isolieren.

#### Versuchsaufbau:

Es werden zunächst eisgekühlte Heparinblutproben mit PBS (Phosphat buffered saline) 1:2 verdünnt. 5 ml des verdünnten Blutes werden auf 5 ml Ficoll-Paque-Gradienten geschichtet und anschließend mit 2400rpm bei Raumtemperatur, ohne Bremse für 30 min zentrifugiert (Universal 32R, Hettich). Die dabei entstehende Interphase wird in ein

Extraröhrchen pipettiert und mit 2 ml PBS aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1800 rpm und Raumtemperatur über 10 min wird der Überstand abpipettiert und das entstandene Pellet in 1ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wird mit FACS-Puffer auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt und die Zellsuspension auf Eis gelagert.

### 2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wird ein Hematozytometer nach Neubauer verwendet sowie Trypanblaulösung zur Vitalitätsbestimmung. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Aufnahme von Trypanblau in tote Zellen. Aufgrund der veränderten Membraneigenschaften toter Zellen im Vergleich zu lebenden ist die Diffusion des Färbemittels in das Zellinnere möglich. Tote Zellen zeigen daher ein blaues Zytoplasma. Aufgrund der Toxizität von Trypanblau auf lebende Zellen sollte die Bestimmung der Zellzahl möglichst rasch erfolgen.

#### Versuchsaufbau:

Der Zellresuspension werden 10 $\mu$ l entnommen, die mit 40  $\mu$ l PBS verdünnt werden. Die verdünnte Zellsuspension und die Trypanblaulösung werden zu gleichen Teilen gemischt (Endverdünnung: 1:10) und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach folgender Formel:

- $Z \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$
- $Z$  = mittlere Zellzahl aus den vier Großquadranten
- $V$  = Verdünnungsfaktor (= 10)

### 2.3.4 Differenzierung von Leukozytensubpopulationen

Die einfachste Art, bestimmte Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie zu differenzieren, ist die direkte Markierung von zellspezifischen Oberflächenantigenen. Zur Differenzierung zwischen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten wurden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper gegen CD3 (Anti-CD3-PercP) für T-, CD19 (Anti-CD19-APC) für B-Lymphozyten und CD14 (Anti-CD14-PercP) für Monozyten verwendet. Der Oberflächenmarker CD45 ist auf allen hämatopoetischen Zellen vorhanden.

### Versuchsaufbau:

100µl der zuvor mittels Ficoll-Separation hergestellten Resuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen) werden mit jeweils 10µl des entsprechenden Oberflächenmarkers für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert.

### **2.3.5 Intrazelluläre Markierung der Proteine FADD, TRAF2 und TRADD in Leukozyten**

#### Versuchsaufbau:

Zunächst werden Leukozyten mittels Ficollseparation (s.o.) isoliert und die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. 100 µl der Resuspension werden je Ansatz nach dem Pipettierschema (Tab.2-1) mit jeweils 10 µl des entsprechenden Oberflächenmarkers für 30 min auf Eis inkubiert.

#### **Fixierung**

Ohne dazwischen stattfindende Waschschrte wird zu jedem Ansatz 100µl der Reagenz A der Fix & Perm<sup>®</sup> CELL Permeabilization Reagents hinzugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Daraufhin wird bei 1400 rpm, 4°C und einer Abbremsung von 3 für 6 min zentrifugiert (Rotixa, Hettich-Zentrifuge), der Überstand ausgeschlagen und das Pellet in 300µl FACS-Puffer resuspendiert und wiederum zentrifugiert (dies entspricht einem Waschschrte).

#### **Permeabilisierung und indirekte intrazelluläre Markierung**

Das Pellet wird nun mit dem Primärantikörper (Verdünnung = 1:100) und 100 µl der Reagenz B der Fix & Perm<sup>®</sup> CELL Permeabilization Reagents für 20 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgen 2 Waschschrte mit FACS-Puffer und darauf die Färbung mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung = 1:100) plus 100 µl Reagenz B bei einer Inkubation im Dunkeln für 20 min bei Raumtemperatur (RT). Nach zwei weiteren Waschschrten wird das Pellet in 200 µl FACS-Puffer für die durchflusszytometrische Messung resuspendiert.

#### **Isotypkontrolle**

Zur Quantifizierung der unspezifischen Färbung wird bei jeder Messung eine Isotypkontrolle durchgeführt. Dabei wird ein Antikörper mit dem gleichen

Isotypenaufbau verwendet, der für das zu untersuchende Protein nicht spezifisch ist, aber mit demselben Sekundärantikörper markiert wird.

In dieser Arbeit wird Chrompurerabbit IgG als Isotypkontrolle für alle drei Proteine verwendet.

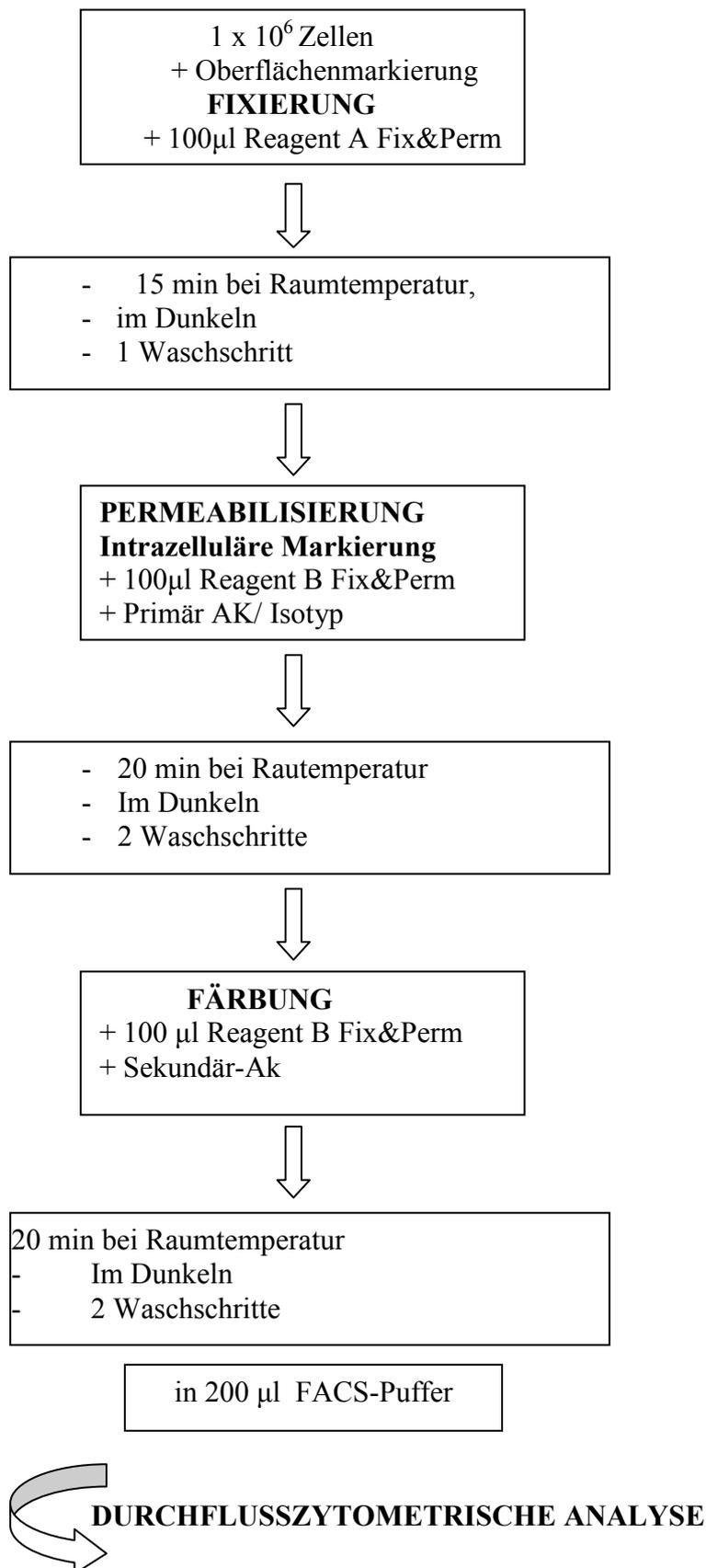
### **Positivkontrolle**

Es empfiehlt sich, eine oder mehrere Positivkontrollen mitzuführen, d.h. Antikörper oder Antikörperkombinationen und Zellen, deren Resultat bekannt ist. Als Positivkontrollen wurden in der vorliegenden Arbeit CD45-FITC-markierte Leukozyten verwendet.

Ansätze	CD3	CD19	CD14	CD45	Isotyp	TRAF2	TRADD	FADD	SEK- 17
1	10µl	-	-	-	1µl	-	-	-	1µl
2	10µl	-	-	-	-	1µl	-	-	1µl
3	10µl	-	-	-	-	-	1µl	-	1µl
4	10µl	-	-	-	-	-	-	1µl	1µl
5	-	10µl	-	-	1µl	-	-	-	1µl
6	-	10µl	-	-	-	1µl	-	-	1µl
7	-	10µl	-	-	-	-	1µl	-	1µl
8	-	10µl	-	-	-	-	-	1µl	1µl
9	-	-	10µl	-	1µl	-	-	-	1µl
10	-	-	10µl	-	-	1µl	-	-	1µl
11	-	-	10µl	-	-	-	1µl	-	1µl
12	-	-	10µl	-	-	-	-	1µl	1µl
13	-	-	-	10µl	-	-	-	-	1µl

Tab.2-1: Pipettierschema, nach dem für jeden Patienten/Probanden vorgegangen wurde.

Abb.2-3: Flussdiagramm des entwickelten Methodenprotokolls für die intrazelluläre Messung der Expression von TRADD, FADD und TRAF2



### 2.3.6 Intrazelluläre Markierung zur Detektion der Expression des Proteins RIP in Leukozyten

#### Versuchsaufbau:

Die Leukozytenisolierung erfolgt mittels Ficoll-Separation, die Zellzahl wird auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. Die Oberflächenmarkierung wird wie oben beschrieben durchgeführt. Je Ansatz werden 10  $\mu$ l des entsprechenden Oberflächenmarkers zu 100  $\mu$ l Resuspension gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert.

Darauf folgt die Fixierung, Permeabilisierung und Intrazelluläre Markierung:

#### **Fixierung**

Zu den mit Oberflächenmarkern inkubierten Leukozyten ( $1 \times 10^6$  Zellen) werden ohne dazwischen stattfindende Waschschrte 100  $\mu$ l 3%-iges Formaldehyd gegeben, bei 37°C für 10 min fixiert und anschließend auf Eis für eine Minute abgekühlt. Daraufhin folgt eine Zentrifugation bei 1400rpm, 4°C, Bremse 3 für 6 min.

#### **Permeabilisierung**

Das Zellpellet wird in 60%igem Methanol resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, anschließend folgen 2 Waschschrte mit jeweils 300  $\mu$ l FACS-Puffer und einer Zentrifugation mit 1400 rpm, 4°C, Bremse 3 für 6 min.

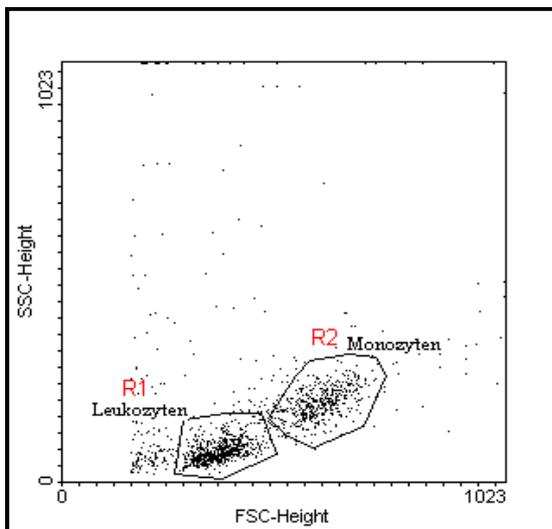
#### **Intrazelluläre indirekte Markierung**

Die Zellen werden für 10 min in 100  $\mu$ l FACS-Puffer geblockt, danach erfolgt die Zugabe des Anti-RIP-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100 und die Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min. Daraufhin folgen zwei Waschschrte und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor<sup>®</sup>488F(ab')<sub>2</sub>fragment of goat anti-rabbit IgG in einer Verdünnung von 1:1000 für 30 min bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren Waschschrten wird das Pellet in 200  $\mu$ l für die durchflusszytometrische Analyse resuspendiert.

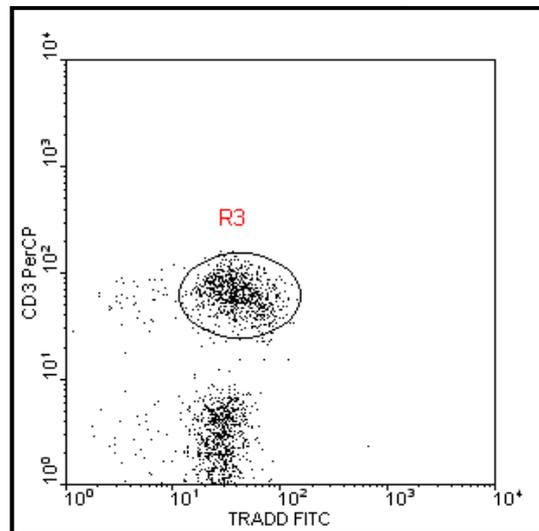
## 2.4 Darstellung der Ergebnisse

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden mit Hilfe der geräteeigenen Software CellQuest 3.1 (Becton Dickinson) dargestellt und ausgewertet. Die gängigsten Darstellungen der Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind der Histogramm-Typ und der DotPlot. In dieser Arbeit wurde durchgehend die korrelierte Zweiparameterdarstellung (DotPlot) verwendet.

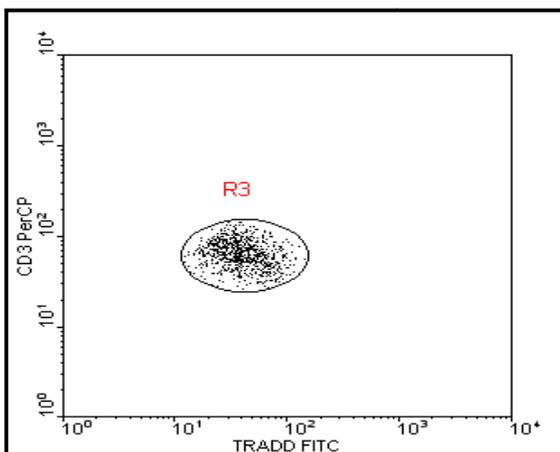
### Beispiel der Darstellungs-/Auswertungsweise:



**Abb.2-4: Korrelierte Zweipunktendarstellung von Leukozyten, die mit Ficoll-Separation gewonnen wurden:** Jeder Punkt im Dot Plot entspricht einer Zelle und wird durch zwei Parameter (FSC Abszisse und SSC Ordinate) entsprechend ihrer morphologischen Eigenschaften (individuelles Streulichtmuster) beschrieben. Auf diese Art und Weise ist die Differenzierung in Lymphozyten und Monozyten möglich. R1=Leukozyten, R2 = Monozyten .



**Abb.2-5: Die Abbildung zeigt die Expression von TRADD und CD3 in/auf Lymphozyten:** Die x-Achse zeigt die FITC-Fluoreszenz, die y-Achse die PerCP-Fluoreszenz, in R3 befinden sich alle Zellen, die CD3 und TRADD positiv sind, unterhalb, die Zellen, die nur TRADD positiv sind, aber nicht CD3. gated wurden nur Zellen, die in R1 der Abb.2-4 liegen.



**Abb.2-6: TRADD-Expression in CD3+ - Leukozyten.** Die Abbildung zeigt nur noch die CD3 positiven Lymphozyten, die auch TRADD exprimieren.

Ein DotPlot demonstriert anhand einer zweidimensionalen Darstellung die Relation zweier verschiedener Zelleigenschaften. Sowohl die x-Achse als auch die y-Achse repräsentieren Lichtintensitäten. Dabei wird jede Zelle durch einen Punkt dargestellt und jeder Punkt dementsprechend durch zwei Werte beschrieben. Eine Region ist eine Population von Zellen, die in Bezug auf zwei Kriterien gewisse Eigenschaften erfüllt, und damit auf dem Bildschirm als Bereich in Form einer Fläche im Dotplot dargestellt werden kann. In der Region R3 in der Abb. 2-4 liegen z.B. alle Zellen, die zur Population der CD3 und TRADD positiven Zellen gehören.

### 2.5 Quantitative Auswertungen

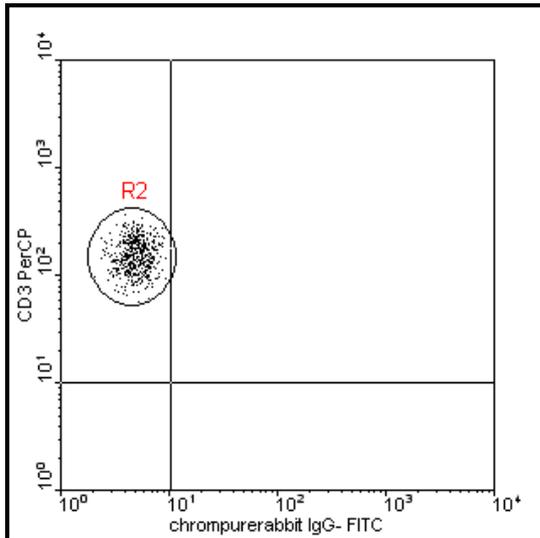
Die quantitative Bestimmung der Expression von TRADD, TRAF2 und FADD wurde anhand der durchflusszytometrisch gemessenen Fluoreszenzintensitäten ausgewertet. Die Fluoreszenzintensitäten entsprechen aufgrund der logarithmischen Achsenskalierung dem von dem Softwareprogramm Cellquest im DotPlot ermittelten geometrischen Mittelwerten (x-GeoMean) der Punktwolken. Aufgrund der individuellen Unterschiede der Leukozytenmorphologie und der damit einhergehenden unterschiedlichen Messeinstellungen des FACS-Gerätes war keine direkte Vergleichbarkeit der Werte gegeben. Um die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Studienteilnehmer dennoch zu gewährleisten, wurde nach folgender Formel die relative Fluoreszenzintensität berechnet:

Relative Fluoreszenzintensität (Rfi):

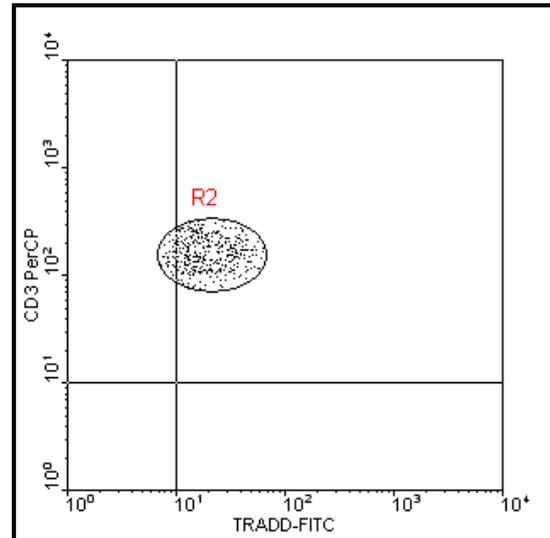
$$Rfi = \frac{xGeoMeanProtein - xGeoMeanIsotyp}{xGeoMeanCD45FITC - xGeoMeanIsotyp} \times 1000$$

Die gemessene Fluoreszenzintensität von TRADD, TRAF2 bzw. FADD wurde durch die unspezifische Fluoreszenz des Isotypes korrigiert und durch die ebenfalls korrigierte Positivkontrolle geteilt. Definitionsgemäß wird dabei die Isotypkontrolle gleich null und die Positivkontrolle gleich 1000 gesetzt.

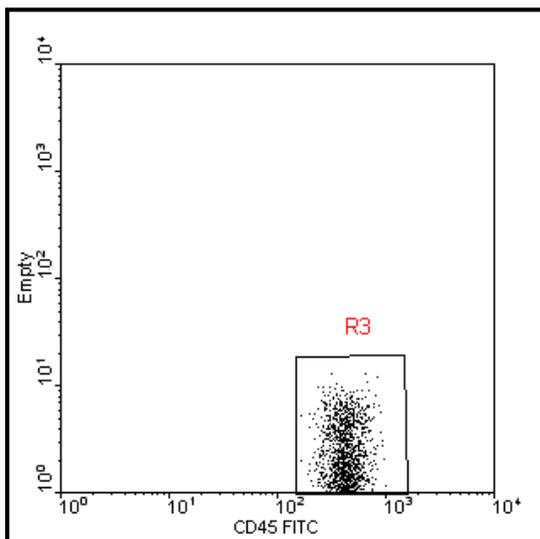
**Beispiel der Rfi-Berechnung für die TRADD Expression in CD3+-Leukozyten:**



**Abb. 2-7: Isotypkontrolle** :  
xGeoMean=3,6



**Abb.2-8: TRADD-Expression in CD3+-Lymphozyten** xGeoMean=19,7



**Abb. 2-9: Positivkontrolle**  
xGeoMean =425,2

Berechnung laut Formel:

$$Rfi = \frac{19,7 - 3,6}{425,2 - 3,6} \times 1000 = 38,19$$

## **2.6 Statistische Auswertungen**

Zur Bestimmung der Intra-Assay und Inter-Assay-Präzision wurde der Variationskoeffizient verwendet. Dieser ist mathematisch definiert als:

$$V = \frac{SD}{MW} \times 100; \quad \text{SD= Standardabweichung; MW=Mittelwert}$$

Die statistischen Auswertungen der Patientenstudie erfolgten durch das Institut für Statistik der Universitätsklinik Gießen.

Zur Datenbeschreibung wurden der Stichprobenumfang (n), der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) angegeben.

Für die im Rahmen der Patientenstudie durchgeführten Tests wurden folgende statistischen Verfahren verwendet:

- Median-Test, Kruskal-Wallis-Test, Fisher Exakt Test: zur Überprüfung der Strukturgleichheit der Gruppen bei der Homogenitätsprüfung.
- Spearman Korrelationskoeffizient: zur Prüfung des Einflusses des Alters, der Krankheitsaktivität und der Krankheitsdauer auf die Proteinexpression der neun zu untersuchenden Parameter.
- Der Wilcoxon Rang Test, der Median Test und der Kruskal Wallis Test zur Untersuchung eines Unterschiedes in der Proteinexpression zwischen Untherapierten MS-Patienten und gesunden Probanden.
- Die Multiple Regression zur Prüfung eines signifikanten Unterschiedes und Einflusses der Dauer einer Interferontherapie auf die Proteinexpression.
- Median Test im paarweisen Vergleich zur Prüfung eines Einflusses einer Therapie auf die Expression der zu untersuchenden Proteine.

Folgende Bezeichnungen wurden für die Benennung der Signifikanzen verwendet:

$p \leq 0,05$  signifikant

$p > 0,05$  nicht signifikant

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Etablierung des intrazellulären Nachweises der Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2 mittels Durchflusszytometrie**

Eine der Aufgaben dieser Doktorarbeit bestand in der Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur quantitativen Detektion der intrazellulären Proteine TRADD, TRAF2 und FADD in Leukozyten des peripheren Blutes.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Expression bestimmter mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Proteine einer Zelle. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der zu untersuchenden Proteine durch extrazelluläre Oberflächenmarkierung gleichzeitig einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können. Für die Leukozytenisolierung aus peripherem Vollblut mittels Ficoll-Separation sowie für die Oberflächenmarkierung von CD3, CD14 und CD19 wurden bereits etablierte Verfahren angewandt (Bauer, 2002). Für die intrazelluläre Markierung war das Protokoll für Durchflusszytometrie für die Fix & Perm-Reagenzien der Firma Caltag Laboratories der Ausgangspunkt. Basierend auf der Kombination der beiden Protokolle konnte eine einheitliche Methode für alle drei Parameter entwickelt und optimiert werden.

##### **3.1.1 Allgemeine Optimierung des Methodenprotokolls**

Durch Variation der Konzentration des Antikörpers, der Anzahl von Waschschritten zwischen den Antikörperinkubationen, der Inkubationszeit und der Temperatur wurde letztendlich das in Kapitel 2.3 dargestellte Versuchsprotokoll entwickelt. Um eine Eigenfluoreszenz der verwendeten Antikörper auszuschließen, wurde der Versuch nur unter Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers Anti-TRADD, Anti-TRAF2 und Anti-FADD durchgeführt. Dabei wurde jeweils keine Fluoreszenz gemessen. Außerdem wurde der Versuch ohne Zugabe des primären Antikörpers durchgeführt, d.h. nur unter Zugabe des sekundären Antikörpers, um eine mögliche unspezifische Färbung durch den sekundären Antikörper zu detektieren. Hierbei zeigte sich jeweils ebenfalls kein Signal. Zudem wurde bei jeder Messung eine Isotypkontrolle durchgeführt um die jeweilige unspezifische Färbung zu erfassen.

Auch wurde ein Versuch durch Blocken mit Ziegen Serum durchgeführt, um mögliche unspezifische Färbungen zu reduzieren. Außer einer Verlängerung der Durchführung konnte jedoch kein positiver Effekt erzielt werden, sodass im weiteren Verlauf auf diesen Schritt verzichtet wurde.

### **3.1.2 Reproduzierbarkeit: Intra-Assay und Inter-Assay-Präzision**

Damit die Methode später an einem Patientenkollektiv angewendet werden konnte und um dabei die Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten, war es wichtig, die Reproduzierbarkeit der Methode zu testen. An verschiedenen Tagen wurde Blut von unterschiedlichen Personen abgenommen und nach dem entwickelten Protokoll untersucht. Quantitativ wurde die Reproduzierbarkeit der intrazellulären, durchflusszytometrischen Messung der Parameter TRADD, TRAF2 und FADD anhand der Intra-Assay-Präzision (Varianz innerhalb eines Versuchsansatzes) und Inter-Assay-Präzision (Varianz zwischen unabhängigen Versuchsansätzen) getestet. Die Präzisionen wurden für alle Variablen, die in der Patientenstudie gemessen werden sollten, bestimmt. Für die Intra-Assay-Präzision wurden für alle zu untersuchenden Parameter Dreifachansätze im Durchflusszytometer gemessen. Für die Inter-Assay-Präzision wurden die in der Intra-Assay-Präzision untersuchten Parameter außerdem noch in zwei weiteren zeitlich unabhängigen Experimenten untersucht. Die Datenauswertung erfolgte anhand der Standardabweichung, des arithmetischen Mittelwertes sowie des Quotienten dieser beiden Werte, des so genannten Variationskoeffizienten (VK). Dabei sollte der Variationskoeffizient unter 20% liegen, um von einer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sprechen (Austin und McIntosh 2000; Nomura et al. 2000). Bis auf den Parameter TRAF2, für den der VK für CD3<sup>+</sup> Leukozyten jedoch auch unterhalb der 20%-Grenze lag, wurden für die Intra-Assay-Präzision jeweils Werte unter 10% gemessen (siehe Tab. 3-1). Für die Inter-Assay-Präzision wurden höhere Variationskoeffizienten gemessen, die zum Teil über der bzw. um die 20%-Grenze lagen, jedoch immer unter 30% (Tab. 3-2).

<b>Intra-Assay-Präzision</b>			
	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>VK [%]</b>
<b>1) TRAF2 in CD3<sup>+</sup> - Zellen</b>	12,2	1,7	14,0
<b>2) TRAF2 in CD19<sup>+</sup> - Zellen</b>	5,8	0,2	4,1
<b>3) TRAF2 in CD14<sup>+</sup> - Zellen</b>	24,5	0,95	3,9
<b>4) TRADD in CD3<sup>+</sup> - Zellen</b>	19,1	0,9	4,5
<b>5) TRADD in CD19<sup>+</sup> - Zellen</b>	16,1	1,2	7,6
<b>6) TRADD in CD14<sup>+</sup> - Zellen</b>	23,9	2,3	9,7
<b>7) FADD in CD3<sup>+</sup> - Zellen</b>	42,0	2,7	6,4
<b>8) FADD in CD19<sup>+</sup> - Zellen</b>	21,7	1,1	5,1
<b>9) FADD in CD14<sup>+</sup> - Zellen</b>	54,4	5,1	9,4

**Tab. 3-1: Normierte Varianz (Variationskoeffizient) innerhalb eines Versuchsansatzes (Intra-Assay-Präzision).** Die Versuchsansätze 1-9 wurden als Triplet angelegt und im Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind der arithmetische Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und der daraus berechnete Variationskoeffizient (VK).

<b>Inter-Assay-Präzision</b>			
	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>VK [%]</b>
<b>1) TRAF2 in CD3<sup>+</sup> - Zellen</b>	10,6	1,4	13,4
<b>2) TRAF2 in CD19<sup>+</sup> - Zellen</b>	6,6	1,1	16,3
<b>3) TRAF2 in CD14<sup>+</sup> - Zellen</b>	21,4	3,4	15,7
<b>4) TRADD in CD3<sup>+</sup> - Zellen</b>	19,9	2,1	10,6
<b>5) TRADD in CD19<sup>+</sup> - Zellen</b>	13,4	2,9	21,5
<b>6) TRADD in CD14<sup>+</sup> - Zellen</b>	26,4	2,4	9,3
<b>7) FADD in CD3<sup>+</sup> - Zellen</b>	36,3	7,9	21,7
<b>8) FADD in CD19<sup>+</sup> - Zellen</b>	20,9	3,3	15,6
<b>9) FADD in CD14<sup>+</sup> - Zellen</b>	41,8	11,7	28,0

**Tab. 3-2: Normierte Varianz (Variationskoeffizient) innerhalb eines Versuchsansatzes (Intra-Assay-Präzision).** Die Versuchsansätze 1-9 wurden an drei verschiedenen Tagen wiederholt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind der arithmetische Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und der daraus berechnete Variationskoeffizient (VK).

## 3.2 Etablierung des intrazellulären, durchflusszytometrischen Nachweises des Adaptorproteins RIP

Neben der in Kapitel 3.1 beschriebenen Etablierung der Messung von TRADD, TRAF2 und FADD sollte anfangs auch noch die Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Messung eines vierten Parameters, des RIP, erfolgen. Der Ausgangspunkt für die Etablierung einer Methode des intrazellulären Nachweises der Expression von RIP mittels Durchflusszytometrie war das Protokoll für Durchflusszytometrie der Firma Cell Signaling.

### 3.2.1 Oberflächenmarkierung

Bei der Durchführung des Versuches nach dem Protokoll der Firma Cell Signaling konnte bei einer 90%-igen Methanol-Konzentration – das Methanol dient dabei der Permeabilisierung - zwar eine deutliche Signalintensität für RIP, jedoch keine Signalintensitäten für die Oberflächenmarker CD3, CD14 und CD19 gemessen werden. Daher wurde der Einfluss des Zeitpunktes der Inkubation sowie die Konzentration des Antikörpers auf die Oberflächenmarkierung untersucht. Durch Variation des Zeitpunktes der Inkubation und durch Erhöhung der Konzentration des Oberflächenmarkers ließ sich jedoch ebenfalls keine nachweisbare Signalintensität für die Oberflächenmarker erzielen.

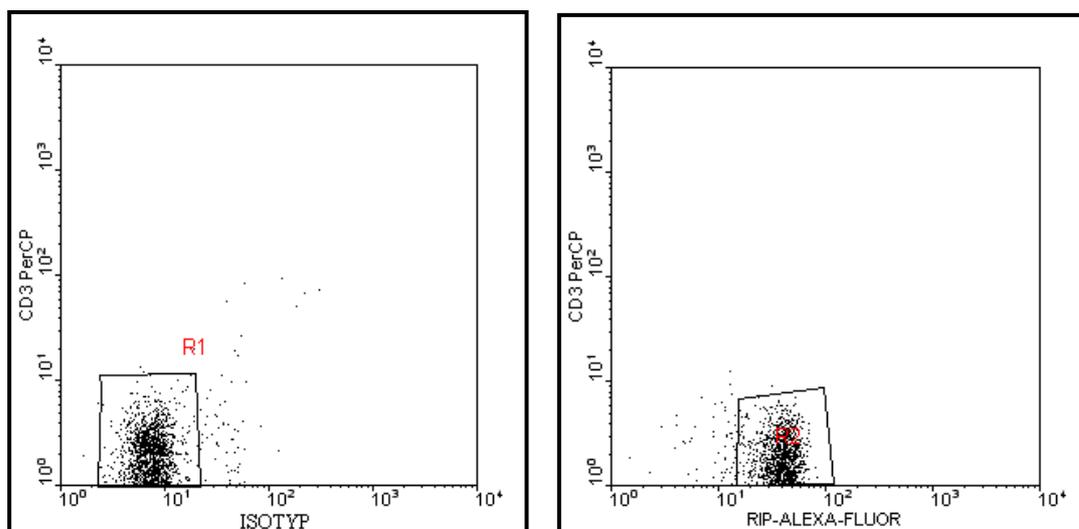


Abb. 3-1 und 3-2: RIP-Expression im Vergleich zum Isotyp. Keine Fluoreszenzintensität für CD3.

### 3.2.2 Einfluss der Methanolkonzentration auf die Oberflächenmarkierung

Da bei der Permeabilisierung der Zellen mit 90%-igem Methanol zwar die Färbung von RIP gelang, aber keine Oberflächenmarkierung, wurde der Einfluss der Methanolkonzentration auf die Oberflächenmarker untersucht. Dass die Methanolbehandlung ein Problem für die Oberflächenmarkierung ist, wurde in mehreren Studien beschrieben (Krutzik und Nolan, 2003; Chow et al., 2005). Chow et al. (2001; 2005) zeigten, dass beste Ergebnisse für eine intrazelluläre Proteinexpression bei einer Methanol-Konzentration von 90% erzielt wurden. Die Signalintensität des Oberflächenmarkers CD3 stieg an, wenn die Methanolkonzentration reduziert wurde (Chow et al., 2005). Montag und Lotze (2006) beschrieben zufrieden stellende Ergebnisse für die Detektion sowohl der Oberflächenmarkierung als auch intrazellulärer Epitope bei einer Methanolkonzentration von 75%, Chow et al. (2005) bei einer Methanolkonzentration von 50%.

Um eine optimale Fluoreszenzintensität bei gleichzeitig zufrieden stellender Oberflächenmarkierung für die Expression von RIP in CD3-positiven Leukozyten zu erhalten, wurde der Versuch mit Methanol-(MeOH)-Konzentrationen zwischen 90 und 50% durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mit abnehmender MeOH-Konzentration die CD3-Signalintensitäten deutlich stiegen, bei jedoch gleichzeitiger Abnahme der RIP-Intensität. Abb. 3-3 bis 3-10 zeigt die Ergebnisse für die CD3- und die RIP-Expression im Vergleich zum Isotyp bei MeOH-Konzentrationen von 90%, 70%, 60% und 50%. Zuletzt wurde eine Methanolkonzentration von 60% übernommen, die einen ausreichenden Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität des Isotyps und des RIP gewährleistete.

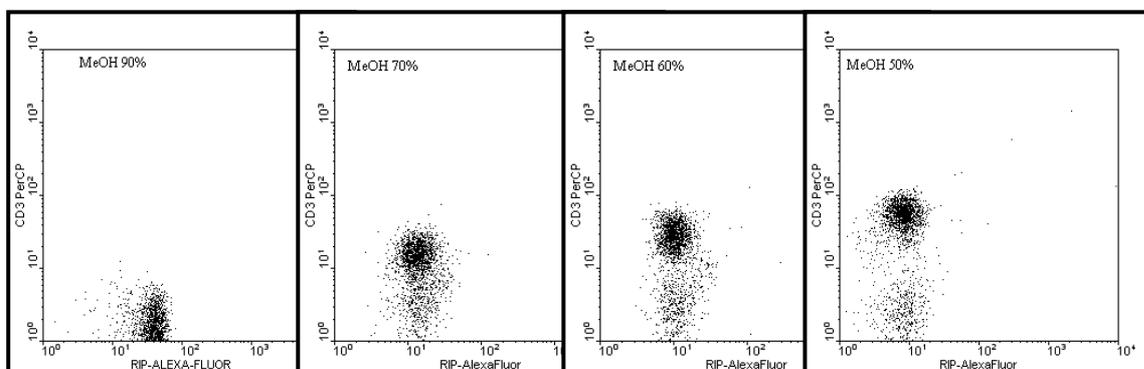


Abb. 3-3 bis 3-6: Expression von RIP und Oberflächenmarker CD3 bei abnehmender MeOH-Konzentration (90%, 70%, 60%, 50%). (PFA 3% ig).

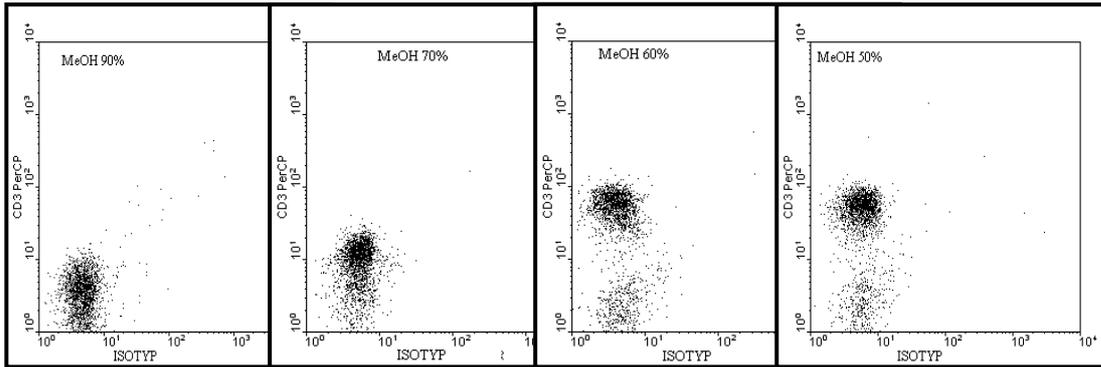


Abb. 3-7 bis 3-10: Isotypkontrolle bei abnehmender MeOH-Konzentration. (PFA 3% ig).

MeOH (%)	xGeoMean	xGeoMean
	Isotyp	RIP
90	7,3	18,5
70	5,5	13,9
60	4,0	10,2
50	5,7	8,4

Tab. 3-3: Protein-expression von RIP in CD3<sup>+</sup> - Leukozyten bei abnehmender MeOH-Konzentration, dargestellt anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität mit Darstellung der Werte der Isotypkontrolle.

### 3.2.3 Untersuchung des Einflusses der Konzentration von Paraformaldehyd auf die Messung von RIP und der Oberflächenmarker

Um einen möglichen Einfluss der Fixierung auf die Fluoreszenzintensität von RIP und die Oberflächenmarker zu untersuchen, wurde der Versuch mit 1%--, 2%- und 3%-igem Paraformaldehyd (PFA) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine optimale Konzentration von PFA von 3% bei einer MeOH-Konzentration von 60% (siehe Abbildung 3-11 bis -14)

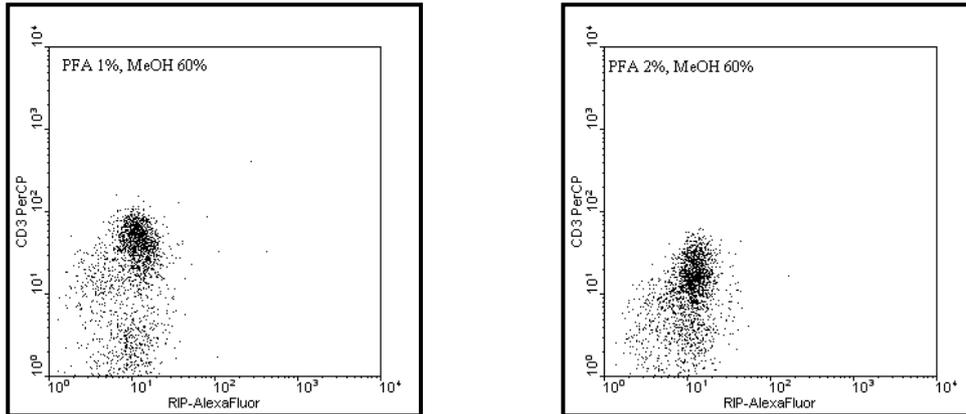


Abb. 3-11 und 3-12: RIP-Expression in CD3<sup>+</sup> - Leukozyten MeOH-Konzentration 60%, PFA 1% bzw. 2%.

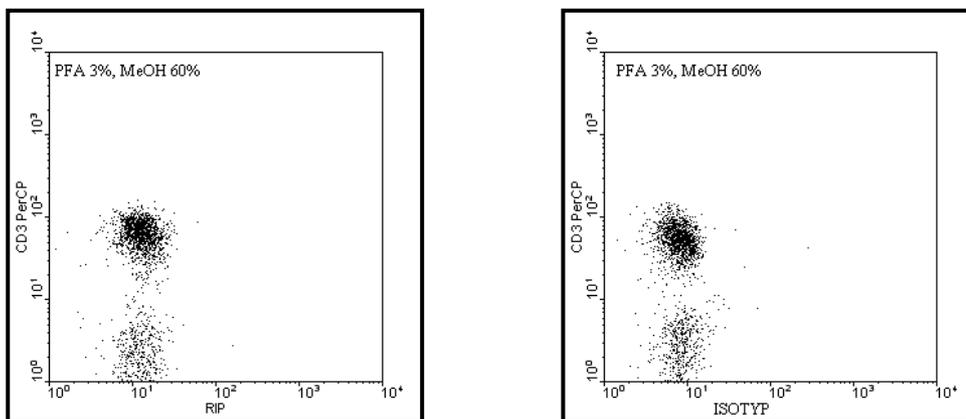


Abb.3-13 und 3-14: RIP-Expression in CD3<sup>+</sup> - Leukozyten im Vergleich zum Isotyp bei PFA Konzentration von 3% und MeOH-Konzentration von 60%.

### 3.2.4 Reproduzierbarkeit

An verschiedenen Tagen wurde teilweise eine deutliche RIP-Expression, aber teilweise auch gar kein Unterschied der RIP-Signalintensität im Vergleich zum Isotyp gemessen. Da das Experiment jeweils bei gleichem Versuchsaufbau durchgeführt wurde, konnte nicht von einer Reproduzierbarkeit gesprochen werden, sodass im Weiteren keine Patientenstudie bezüglich RIP durchgeführt wurde.

---

### 3.3 Patientenstudie

#### 3.3.1 Strukturvergleich der demographischen Daten

Da es sich um eine offene Studie handelt, war eine exakte Anpassung in Bezug auf Alter und Geschlecht der Patienten bzw. gesunden Probanden zwischen den Gruppen nicht möglich. Zudem unterschieden sich die MS-Patienten hinsichtlich EDSS, Krankheitsdauer und Anzahl der Schübe in den letzten 24 Monaten vor Blutentnahme. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Strukturvergleich der demographischen Daten zwischen den Kollektiven durchgeführt:

Es wurden ausschließlich MS-Patienten in die Studie aufgenommen, die an einem schubförmig remittierenden Verlauf litten. Da lediglich zwei Männer (Tab. 3-6) während des gewählten Untersuchungszeitraumes in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurden diese ganz aus der weiteren statistischen Auswertung herausgenommen und letztendlich ausschließlich weibliche Probanden und MS-Patientinnen vom schubförmig remittierenden Verlauf untersucht.

Der Strukturvergleich der demographischen Daten zeigte, dass die vier Gruppen sich hinsichtlich des Alters, der Krankheitsdauer, des EDSS-Scores (und daraus berechnet sich der Progressionsindex) und der Schubanzahl in den letzten 24 Monaten nicht signifikant unterschieden (siehe Tab. 3-4 und 3-5): das Alter der untherapierten MS-Patienten lag im Durchschnitt bei 46,3 Jahren (Min/Max 37,0/55,0) und bei den gesunden Probanden bei 44,2 (Min/Max 35/56,0). Bei den therapierten Patienten betrug das Alter im Mittel 36,1 Jahre (Min/Max 22,0/51,0) bei den weniger als 15 Monate therapierten und 39,3 (Min/Max 29,0/54,0) bei den länger als 15 Monate Therapierten.

Die Krankheitsdauer betrug bei den untherapierten Patienten im Mittel 10,8 Jahre, bei den weniger als 15 Monate mit Interferon beta therapierten Patienten 5,4 Jahre und bei den länger als 15 Monate therapierten 8,2 Jahre. Die untherapierten Patienten hatten im Durchschnitt einen EDSS von 1,5, einen Progressionsindex von 0,3 und durchschnittlich 0,7 Schübe in 24 Monaten. Bei den weniger als 15 Monate therapierten Patienten betrug der EDSS 1,6 und der Progressionsindex 0,5. Bei den länger als 15 Monaten mit Interferon beta therapierten Patienten betrug der Progressionsindex im Durchschnitt 0,6, bei einem EDSS von durchschnittlich 2,4 und 1,3 Schüben in 24 Monaten.

	<b>Gesunde</b>	<b>Untherapierte MS-Patienten</b>	<b>Therapierte, Interferon &lt; 15 Monate</b>	<b>Therapierte, Interferon &gt; 15 Monate</b>
<b>n</b>	10	12	8	9
<b>Alter bei Blutentnahme (Jahre)</b>	44,2 ± 5,9	46,3 ± 6,6	36,1 ± 10,6	39,3 ± 8,5
<b>Krankheitsdauer (Jahre)</b>	-	10,8 ± 1,1	5,4 ± 0,01	8,2 ± 0,3
<b>EDSS</b>	-	1,5 ± 0,6	1,5 ± 1,5	2,4 ± 1,3
<b>Progressionsindex (EDSS/Krankheitsdauer)</b>	-	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,7	0,6 ± 0,5
<b>Schübe in den letzten 24 Monaten vor Therapiebeginn</b>	-	0,7 ± 0,5	1,0 ± 0,5	1,3 ± 1,2

Tab. 3-4: Strukturvergleich der Kollektive der untherapierten und der therapierten MS-Patientinnen und der Gesunden anhand der demographischen Daten. Dargestellt sind der MW (arithmetischer Mittelwert) und die SD (Standardabweichung).

Das Alter, die Krankheitsdauer, der EDSS und der Progressionsindex wurden mittels Kruskal- Wallis-Test und Mediantest verglichen (P-Werte siehe Tab.3-5); Für die Schubanzahl wurde der Fisher`s Exact Test angewandt und eine Wahrscheinlichkeit für das beobachtete oder ein extremeres Ereignis von  $p = 0,118$  berechnet und somit ebenfalls kein Hinweis für einen Zusammenhang mit der Proteinexpression gefunden.

<b>Variable</b>	<b>Kruskal-Wallis-Test</b>	<b>Mediantest</b>
<b>Alter</b>	$p = 0,049$	$p = 0,179$
<b>Krankheitsdauer</b>	$p = 0,231$	$p = 0,259$
<b>EDSS</b>	$p = 0,232$	$p = 0,329$
<b>Progressionsindex</b>	$p = 0,491$	$p = 0,193$

Tab. 3-5: Ergebnis der Vergleiche (p-Werte) für die vier Gruppen bezüglich Alter, Krankheitsdauer, EDSS und Progressionsindex.

	<b>Therapierte, Interferon &lt; 15Monate</b>	<b>Therapierte, Interferon &gt; 15Monate</b>
<b>n</b>	1	1
<b>Alter bei Blutentnahme (Jahre)</b>	51	48
<b>Krankheitsdauer (Jahre)</b>	1,0	8,0
<b>EDSS</b>	3,5	0,0
<b>Progressionsindex</b>	3,5	0,0
<b>Schübe in den letzten 24 Monaten/ vor Therapiebeginn</b>	1	1

Tab. 3-6: Demographische Daten für die Gruppe der therapierten Männer.

### 3.3.2 Korrelationsprüfungen

Unter der Annahme, dass die Expression der drei untersuchten intrazellulären Proteine in den unterschiedlichen Leukozytenpopulationen nicht nur durch das Vorliegen einer MS beeinflusst werden kann, sondern auch durch weitere Faktoren wie Alter, Geschlecht und Krankheitsaktivität, wurde neben dem Vergleich der demographischen Daten der verschiedenen Gruppen auch der potentielle Einfluss des Alters, der Krankheitsdauer und der klinischen Krankheitsaktivität (durch EDSS und Progressionsindex dargestellt) auf die Expression der neun immunologischen Variablen untersucht.

Die Korrelation wurde mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und des entsprechenden Signifikanzniveaus bestimmt. Dabei ist der Korrelationskoeffizient eine Maßzahl für die Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhanges. Ein Koeffizient von 0 steht für keine Korrelation, und ein Koeffizient von  $\pm 1$  zeigt eine lineare Korrelation. Demzufolge ist die Korrelationswahrscheinlichkeit umso höher, je näher die Werte des Koeffizienten an  $\pm 1$  liegen. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman entspricht dem nach Pearson, beruht jedoch nicht auf einem linearen

Zusammenhang der Messwerte, sondern auf Rangwerten. Er wird insbesondere bei kleinen Stichprobenumfängen angewendet, die nicht auf einer Quantifizierung linearer Zusammenhänge beruhen, sondern bei denen eine weitergefasste monotone Assoziation von Interesse ist (Sachs, 2006).

### **3.3.2.1 Einfluss des Alters auf die Proteinexpression der analysierten Parameter**

Um den Einfluss des Alters auf die Proteinexpression der untersuchten Parameter zu bestimmen, wurde für die Gruppe der gesunden Probanden anhand der statistischen Auswertungen der Korrelationskoeffizient nach Spearman und das Signifikanzniveau (der p-Wert) für die neun zu untersuchenden Parameter bestimmt.

Dabei konnte bei vorliegendem Stichprobenumfang keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression eines der neun Parameter und dem Alter festgestellt werden (zur Orientierung siehe Tab. 3-7). Da schon in der Gruppe der Gesunden kein Zusammenhang gefunden wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass auch bei den MS-Patienten kein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und dem Alter besteht.

<b><u>Einfluss des Alters auf die Expression der immunologischen Parameter bei Gesunden</u></b>	
<b>Korrelationsprüfung nach Spearman</b>	
Expression von TRAF2 in CD3 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.15854</b> p = 0.6618 n = 10
Expression von TRADD in CD3 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.42859</b> p = 0.2497 n = 9
Expression von FADD in CD3 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.18293</b> p = 0.6130 n = 10
Expression von TRAF2 in CD19 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.07927</b> p = 0.8277 n = 10
Expression von TRADD in CD19 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.03659</b> p = 0.9201 n = 10
Expression von FADD in CD19 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.16464</b> p = 0.6495 n = 10
Expression von TRAF2 in CD14 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.09147</b> p = 0.8016 n = 10
Expression von TRADD in CD14 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.05488</b> p = 0.8803 n = 10
Expression von FADD in CD14 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.04268</b> p = 0.9068 n = 10

**Tab. 3-7: Korrelationsprüfung nach Spearman: Alter und Proteinexpression bei Gesunden** (r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, p=Signifikanzniveau, n=Stichprobenumfang).

### 3.3.2.2 Einfluss der Krankheitsdauer und der Krankheitsaktivität (EDSS, Progressionsindex) auf die Expression der analysierten Parameter

Des Weiteren wurde der Einfluss der Krankheitsdauer und der Krankheitsaktivität der Multiplen Sklerose auf die Expression der analysierten Parameter bestimmt. Dazu

wurden anhand der statistischen Auswertungen der Korrelationskoeffizient nach Spearman und der p-Wert für das Kollektiv der untherapierten MS-Patienten bestimmt. Weder für die Krankheitsdauer, noch für den EDSS oder den Progressionsindex konnte bei dem vorliegenden Stichprobenumfang eine Korrelation mit der Expression der Proteine beobachtet werden (siehe Tab. 3-8).

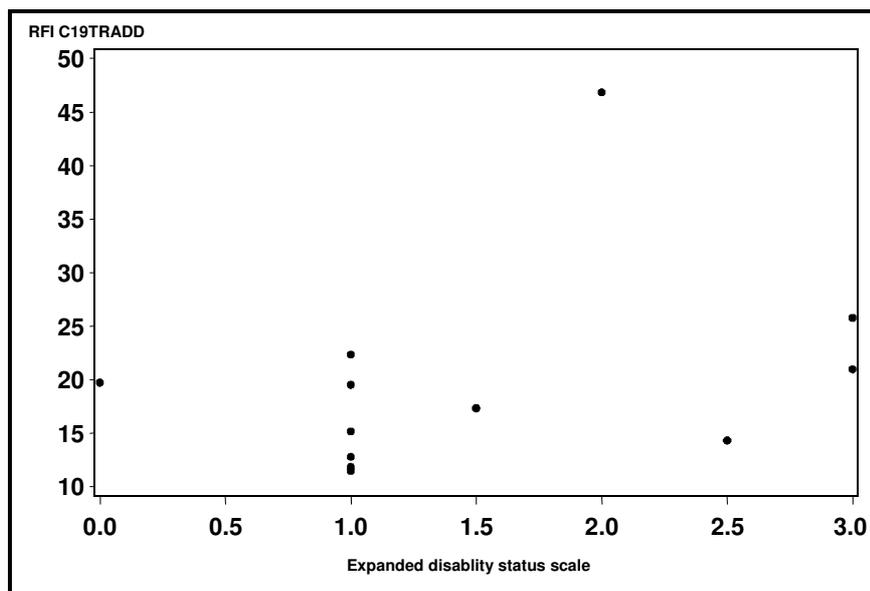
<b>Einfluss der Krankheitsdauer und Krankheitsaktivität auf die Expression der immunologischen Parameter bei untherapierten MS-Patienten</b>			
<b>Korrelationsprüfung nach Spearman</b>			
	<b>KD</b>	<b>EDSS</b>	<b>PI</b>
Expression von TRAF2 in CD3 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.33275</b> p = 0.2906 n = 12	<b>r = 0.26552</b> p = 0.4042 n = 12	<b>r = -0.04196</b> p = 0.8970 n = 12
Expression von TRADD in CD3 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.10508</b> p = 0.7452 n = 12	<b>r = 0.26926</b> p = 0.3974 n = 12	<b>r = 0.17483</b> p = 0.5868 n = 12
Expression von FADD in CD3 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.01824</b> p = 0.9601 n = 10	<b>r = 0.17516</b> p = 0.6284 n = 10	<b>r = -0.29697</b> p = 0.4047 n = 10
Expression von TRAF2 in CD19 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.11208</b> p = 0.7287 n = 12	<b>r = 0.34032</b> p = 0.2791 n = 12	<b>r = 0.11888</b> p = 0.7129 n = 12
Expression von TRADD in CD19 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.12259</b> p = 0.7043 n = 12	<b>r = 0.39642</b> p = 0.2020 n = 12	<b>r = 0.16084</b> p = 0.6175 n = 12
Expression von FADD in CD19 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.48632</b> p = 0.1541 n = 10	<b>r = -0.26599</b> p = 0.4576 n = 10	<b>r = -0.01818</b> p = 0.9602 n = 10
Expression von TRAF2 in CD14 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.26667</b> p = 0.4879 n = 9	<b>r = 0.24371</b> p = 0.5274 n = 9	<b>r = -0.16667</b> p = 0.6682 n = 9
Expression von TRADD in CD14 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = 0.03333</b> p = 0.9322 n = 9	<b>r = 0.12185</b> p = 0.7548 n = 9	<b>r = -0.26667</b> p = 0.4879 n = 9
Expression von FADD in CD14 <sup>+</sup> - Leukozyten	<b>r = -0.46429</b> p = 0.2939 n = 7	<b>r = -0.07412</b> p = 0.8745 n = 7	<b>r = -0.03571</b> p = 0.9394 n = 7

**Tab. 3-8: Korrelationsprüfung nach Spearman: Krankheitsdauer bzw. Krankheitsaktivität und Proteinexpression bei untherapierten MS-Patienten** (r=Korrelationskoeffizient nach Spearman, p=Signifikanzniveau, n=Stichprobenumfang).

Für keine der Variablen FADD, TRADD und TRAF2 in CD3<sup>+</sup> -, CD14<sup>+</sup> - und CD19<sup>+</sup> - Leukozyten konnte eine Korrelation mit dem EDSS, dem Krankheitsverlauf oder dem Progressionsindex gefunden werden.

Die Abbildungen stellen im Folgenden die Korrelation entsprechend der Daten der Tabelle 3-8 beispielhaft für die Proteinexpression von TRADD in CD19<sup>+</sup> - B-Lymphozyten in Bezug auf den EDSS bzw. den Progressionsindex und die Krankheitsdauer dar.

Abb. 3-15 zeigt die TRADD-Expression, dargestellt auf der y-Achse als relative Fluoreszenzintensität, durchflusszytometrisch in B-Lymphozyten bestimmt, im Vergleich zum EDSS und zeigt deutlich, dass keine Korrelation besteht, insbesondere verdeutlicht durch die unterschiedliche Proteinexpression von sechs Patienten mit einem EDSS von 1.



**Abb. 3-15: Scatter Plot: Proteinexpression von TRADD in CD19<sup>+</sup> - B-Zellen und EDSS bei untherapierten MS-Patienten.**

Abb. 3-16 und Abb. 3-17 zeigen die TRADD-Expression, dargestellt auf der y-Achse als relative Fluoreszenzintensität, durchflusszytometrisch in B-Lymphozyten bestimmt, im Vergleich zum Progressionsindex bzw. zur Krankheitsdauer.

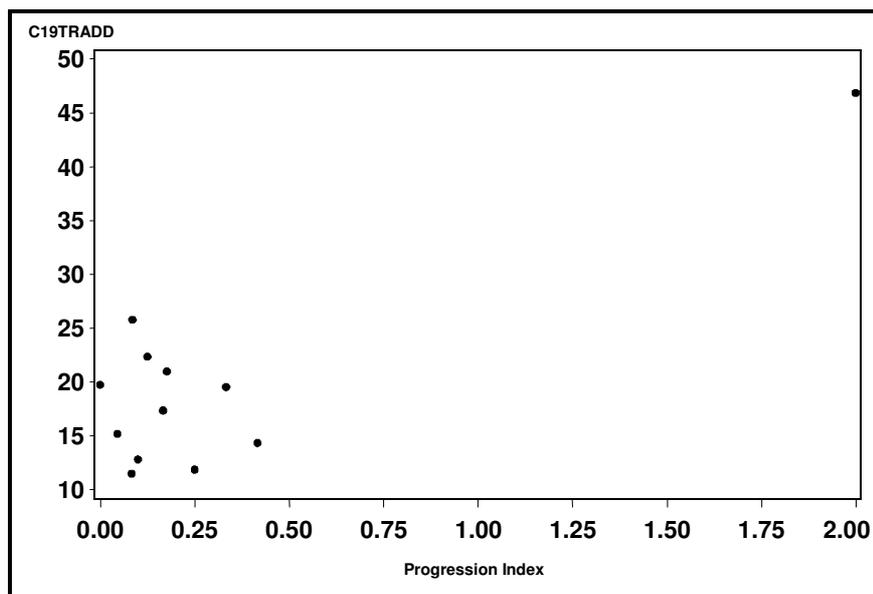


Abb. 3-16: Scatter Plot: Proteinexpression von TRADD in CD19<sup>+</sup> - B-Zellen und Progressionsindex bei untherapierten MS-Patienten.

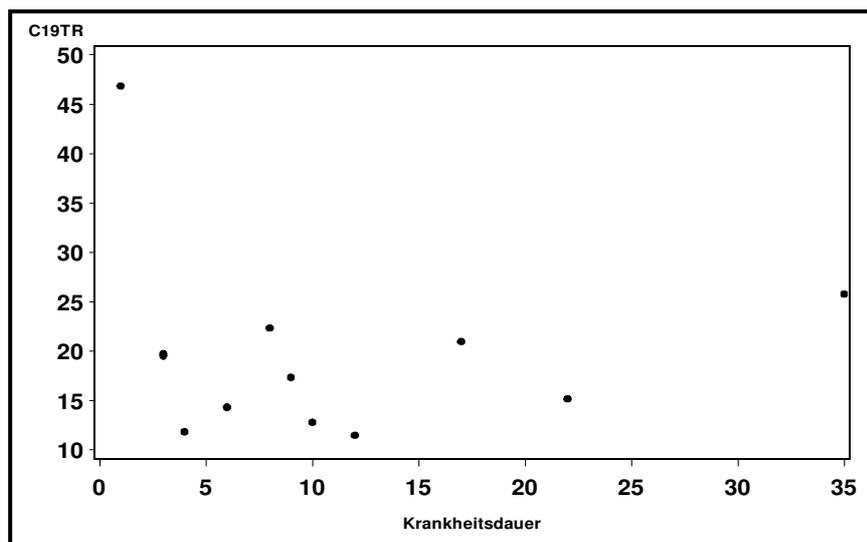


Abb. 3-17: Scatter Plot: Proteinexpression von TRADD in CD19<sup>+</sup> B-Zellen und Krankheitsdauer bei untherapierten MS-Patienten.

In einem weiteren Schritt wurde dann für die Gruppe der Untherapierten noch einmal die partielle Rangkorrelation bestimmt:

Unter Berücksichtigung eines möglichen Effektes der Krankheitsdauer und des EDSS wurde keine Korrelation des Alters mit den 9 Expressionsparametern gefunden. Ebenso konnte unter Berücksichtigung eines möglichen Effekts des Alters und des EDSS kein Einfluss der Krankheitsdauer auf die Expressionsparameter gefunden werden sowie

unter Berücksichtigung eines möglichen Effekts von Alter und Krankheitsdauer kein Einfluss des EDSS.

Entsprechend wurde für die Gruppe der Therapierten die partielle Rangkorrelation angewandt, um einen Einfluss des Alters auf die Expression der neun Parameter zu untersuchen und dabei den möglichen Effekt der Krankheitsdauer, des EDSS und der Therapiedauer zu berücksichtigen.

Analog wurde die Rangkorrelation für die Krankheitsdauer, den EDSS und die Therapiedauer unter Berücksichtigung des möglichen Effektes der jeweiligen anderen drei Parameter untersucht.

Ein Hinweis des Einflusses dieser Faktoren auf die Expression der zu untersuchenden Proteine konnte nicht gefunden werden (Siehe Anhang).

### **3.3.3 Die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2 im Vergleich zwischen untherapierten MS-Patienten und Gesunden**

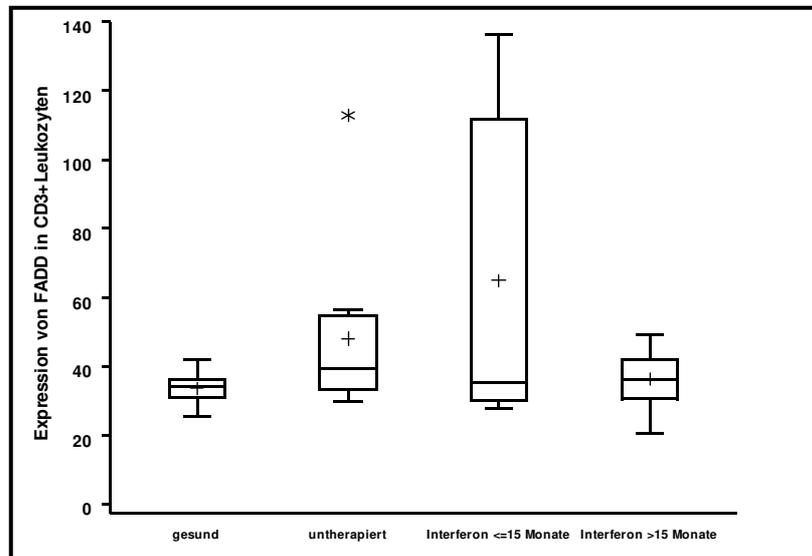
In der Patientenstudie wurden neun Parameter (die Expression von TRADD, FADD und TRAF2, jeweils in B- und T-Lymphozyten sowie in Monozyten) untersucht. Dabei wurden für die verschiedenen Gruppen der Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Fluoreszenzintensität, die über die durchflusszytometrisch gemessenen Fluoreszenzintensitäten ermittelt wurde (siehe Kap. 2.3.5), bestimmt. Daraufhin erfolgte ein Vergleich der Proteinexpression zwischen untherapierten MS-Patienten und einer Gruppe gesunder Kontrollpersonen.

Abbildung 3-18 bis 3-26 zeigt Box Plots für die Expression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf (Gesunde, Untherapierte und mit Interferon beta Therapierte). Auf die Expression der Proteine bei den mit Interferon beta Therapierten wird in Kapitel 3.4.2 näher eingegangen.

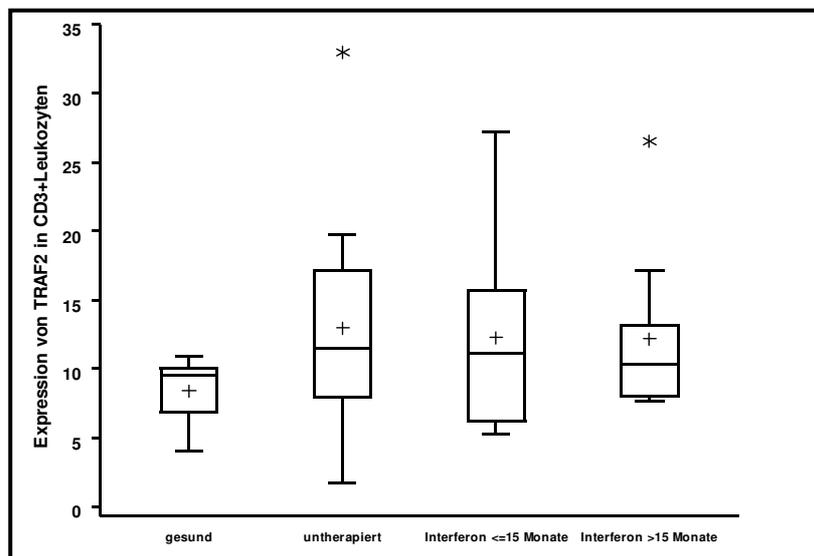
#### **Expression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Die deskriptive Statistik zeigte ein erhöhtes Expressionsniveau von TRAF2, TRADD und FADD in CD3<sup>+</sup>- Lymphozyten bei untherapierten MS-Patienten vom schubförmigen Verlauf im Vergleich zu gesunden Probanden; insgesamt zeigen die

gesunden Probanden zudem eine homogenere Verteilung der Expressionswerte (siehe Abb. 3-18 bis 3-20).



**Abb. 3-18:** Dargestellt ist ein Box Plot für die Expression von FADD (relative Fluoreszenzintensität) in T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf (Gesunde n=10, Untherapierte n=10, Interferon beta-Therapierte n=8 bzw. 9).



**Abb. 3-19:** Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von TRAF2 in T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde n=10, Untherapierte n=12, Interferon beta-Therapierte n=8 bzw. 9).

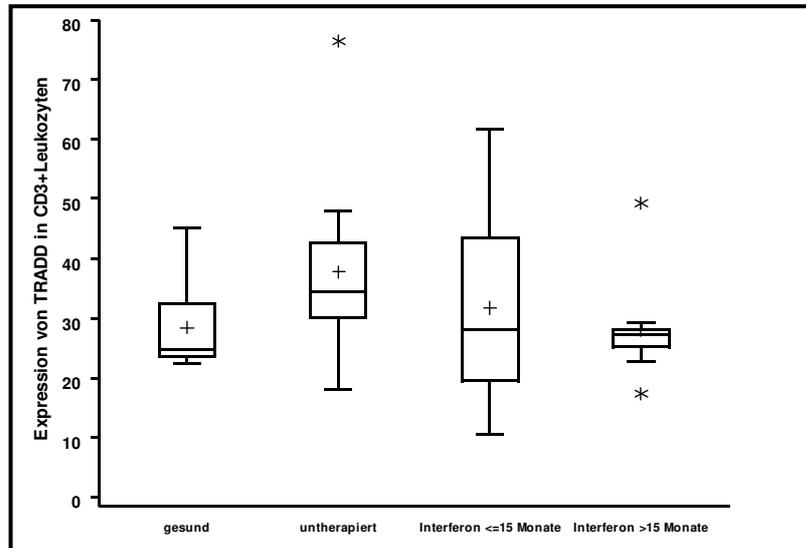


Abb. 3-20: Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von TRADD in T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde n=9, Untherapierte n=12, Interferon beta-Therapierte n=8 bzw. 9).

Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Rang-Test, der Kruskal-Wallis-Test und der Median-Test angewendet. Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Proteinexpression der zu untersuchenden immunologischen Variablen zwischen Gesunden und untherapierten MS-Patienten konnte weder für FADD, TRAF2 noch für TRADD in CD3+ T-Lymphozyten in einem der drei Tests gefunden werden.

### Expression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD14<sup>+</sup> - Monozyten

Für die Expression der Parameter FADD, TRAF2 und TRADD in Monozyten wurde für keine der drei Variablen ein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau zwischen Untherapierten und Gesunden gefunden. Hier wurde ebenfalls der Wilcoxon-Rang-Test, der Kruskal-Wallis-Test und der Median-Test angewandt. (siehe Abb. 3-21 bis 3-23).

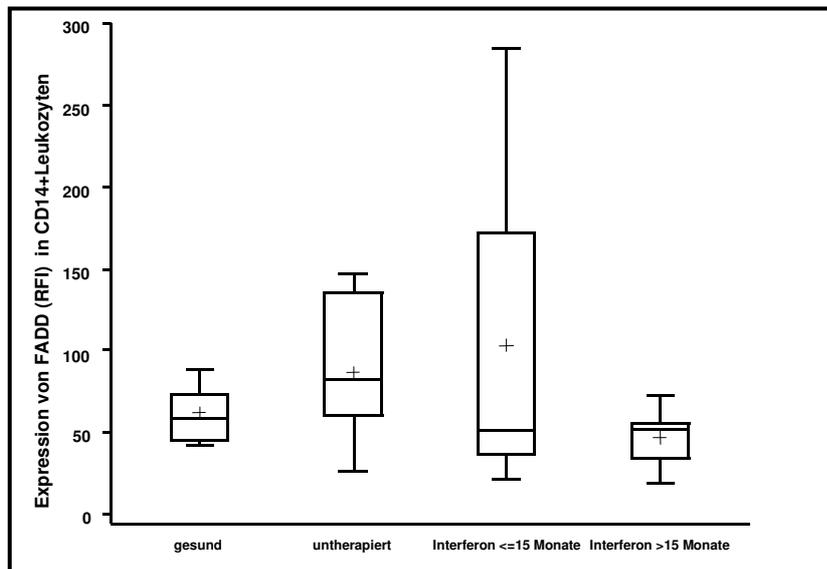


Abb. 3-21: Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von FADD in CD14<sup>+</sup>-Monozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde n=10, Untherapierte n=7, Interferon beta-Therapierte n=8 bzw. 9).

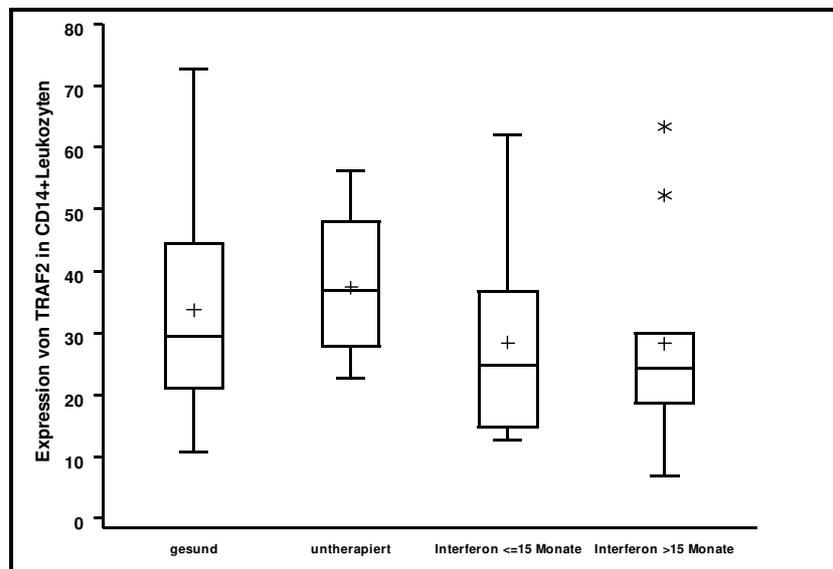


Abb. 3-22: Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von TRAF2 in CD14<sup>+</sup>-Monozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde n=10, Untherapierte n=9, Interferon beta-Therapierte n=8 bzw. 9).

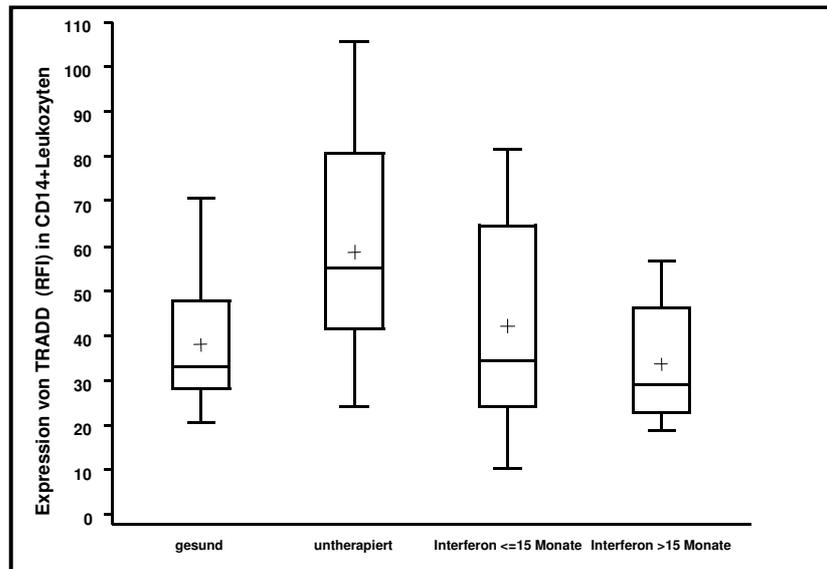


Abb. 3-23: Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von TRADD in CD14<sup>+</sup>-Monozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde n=10, Untherapierte n=9, Interferon beta-Therapierte n=8 bzw. 9).

### Expression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD 19<sup>+</sup> - B-Lymphozyten

Auch für die Expression der drei intrazellulären Proteine in B-Lymphozyten zeigte die deskriptive Auswertung wie in den T-Lymphozyten erhöhte Proteinexpressionen bei untherapierten MS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe der gesunden Probanden sowie eine homogenere Verteilung bei Gesunden (siehe Abb. 3-24 bis 3-26).

Für FADD fand sich der Hinweis auf einen signifikanten Unterschied im Wilcoxon Two Sample Test sowie im Kruskal-Wallis-Test für die Proteinexpression in CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten im Vergleich zwischen untherapierten MS-Patienten mit gesunden Probanden ( $p < 0,0185$  bzw.  $p < 0,0191$ ), dieser Unterschied konnte im Median-Test jedoch nicht bestätigt werden ( $p < 0,0812$ ).

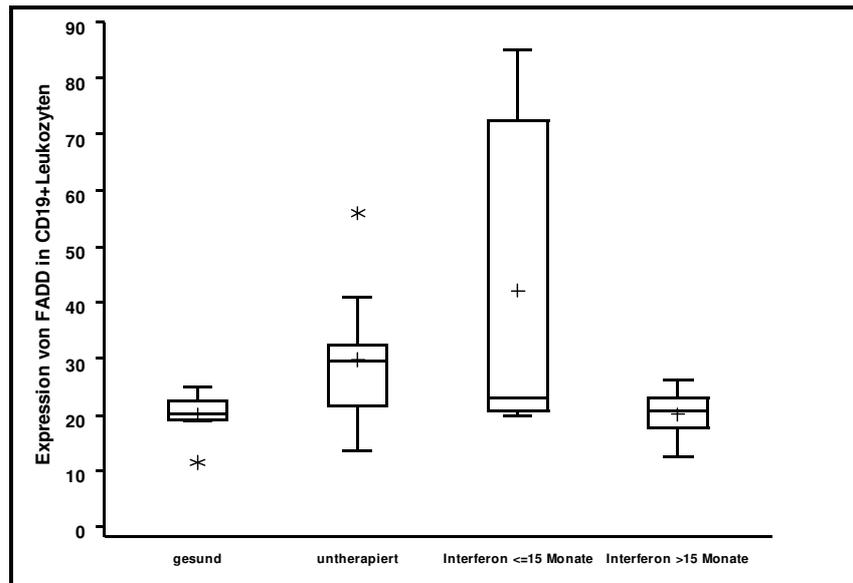


Abb. 3-24: Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von FADD in  $CD19^+$  - B-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde  $n=10$ , Untherapierte  $n=10$ , Interferon beta-Therapierte  $n=8$  bzw. 9).

Wie für die Expression von FADD konnte für TRAF2 in  $CD19^+$  - B-Lymphozyten im Wilcoxon Two Sample Test sowie im Kruskal-Wallis-Test der Hinweis auf einen signifikanten Unterschied in der Proteinexpression zwischen gesunden Probanden und untherapierten MS-Patienten bei einem p-Wert von 0,030 bzw. 0,0296 gefunden werden. Auch dieses wurde jedoch nicht im Median-Test bestätigt ( $p < 0,0943$ ).

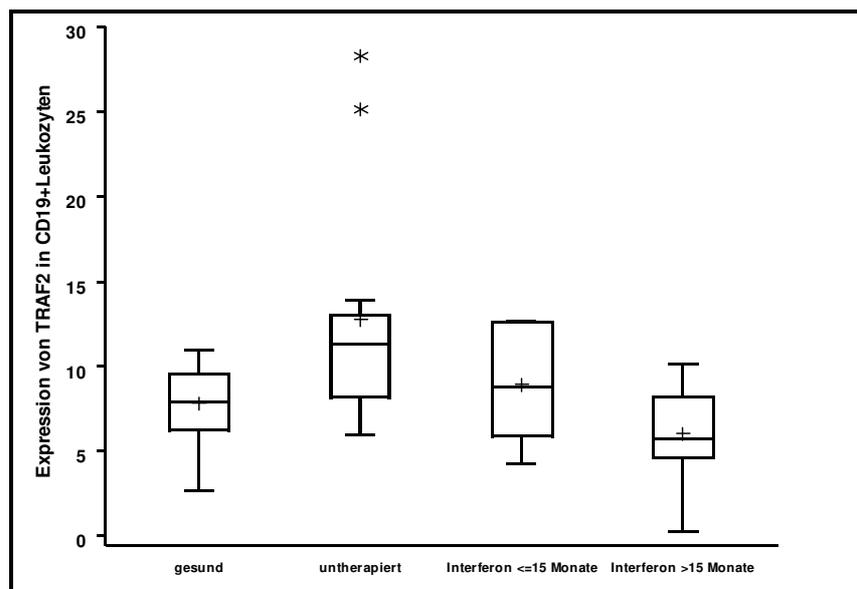
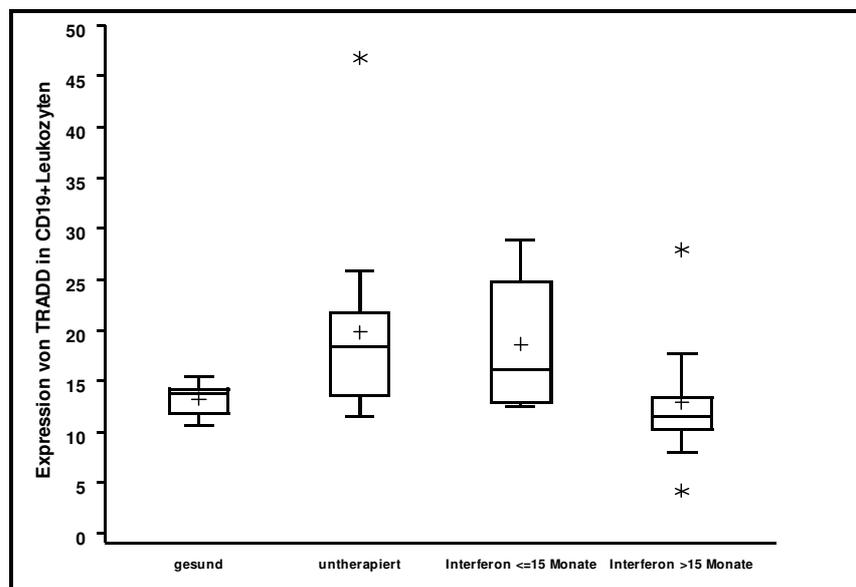


Abb. 3-25: Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von TRAF2 in  $CD19^+$  B-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. (Gesunde  $n=10$ , Untherapierte  $n=12$ , Interferon beta-Therapierte  $n=8$  bzw. 9).

Die Proteinexpression von TRADD in CD19<sup>+</sup> - B-Lymphozyten war im Vergleich von untherapierten RR-MS-Patienten mit gesunden Probanden bei Verwendung des Wilcoxon Two Sample Tests sowie des Kruskal-Wallis-Tests sowie des Median-Tests erhöht ( $p < 0,0206$  (Wilcoxon Two Sample Test),  $p < 0,0210$ , Kruskal-Wallis Test, bzw.  $0,0121$ , Median-Test; s. Abb. 3-26; Tab. 3-9), was auf einen Unterschied zwischen den Gruppen hindeutet.



**Abb. 3-26:** Box Plot für die Expression (relative Fluoreszenzintensität) von TRADD in CD19<sup>+</sup> - B-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Verlauf. Deutlicher Hinweis auf einen signifikanten Unterschied zwischen Gesunden und Untherapierten ( $p < 0,0210$ , Kruskal Wallis Test;  $p < 0,0121$ , Median Test). (Gesunde  $n=10$ , Untherapierte  $n=12$ , Interferon beta-Therapierte  $n=8$  bzw.  $9$ ).

Parameter	Gesunde – Untherapierte
FADD in CD3+ Lymphozyten	n.s
TRADD in CD3+ Lymphozyten	n.s
TRAF2 in CD3+ Lymphozyten	n.s
FADD in CD14+Lymphozyten	n.s
TRADD in CD14+ Lymphozyten	n.s
TRAF2 in CD14+ Lymphozyten	n.s
FADD in CD19+ Lymphozyten	n.s
TRADD in CD19+ Lymphozyten	<b>p = 0,0206 (Wilcoxon Two Sample Test)</b> <b>p = 0,0210 (Kruskal-Wallis Test)</b> <b>p = 0,0121 (Median Test)</b>
TRAF2 in CD19+ Lymphozyten	n.s

**Tab. 3-9: Auflistung der Signifikanzen zwischen Gesunden und Untherapierten für die neun Parameter.**

### 3.3.4 Einfluss einer Interferon beta–Therapie auf die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2

In einem zweiten Schritt sollte neben dem Vergleich untherapierter MS-Patienten mit einer Kontrollgruppe gesunder Probanden zudem der Einfluss einer Interferonbeta-Therapie auf die Expression der ausgewählten Proteine untersucht werden. Dazu wurden Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, die zum einen zwischen 6 und 15 Monaten und zum anderen zwischen 15 und 24 Monaten mit Interferon beta therapiert worden waren. Dabei wurde entweder das Präparat Betaferon oder das Präparat Rebif eingesetzt. Patienten, die mit Avonex therapiert wurden, sind nicht in die Studie eingeschlossen worden.

Mittels multipler Regression wurde für jeden der neun Parameter der Einfluss des Alters, der Therapiedauer, des EDSS-Wertes und der Krankheitsdauer auf die Proteinexpression getestet.

Mittels Multipler Regression konnte kein signifikanter Nachweis eines Einflusses der Therapiedauer mit Interferon auf die Expression der Parameter erbracht werden.

Da aber insbesondere auch der Vergleich der Proteinexpressionen zwischen Therapierten und Untherapierten Probanden von Interesse waren, erfolgte in einem weiteren Schritt ein Vergleich aller 4 Gruppen (Gesunde Probanden, Untherapierte MS-Patienten, weniger als 15 Monate und länger als 15 Monate Therapierte MS-Patienten) bezüglich der 9 Parameter. Da wir keinen Hinweis auf einen deutlichen Effekt von Alter, Krankheitsdauer, EDSS und Therapiedauer auf die Expressionsparameter gefunden haben (s. Korrelationsprüfung Kapitel 3.3.3.2) ist ein Vergleich möglich.

Wie den Boxplots zu entnehmen ist, kann nicht von einer gleichen Form der Wahrscheinlichkeitsverteilungen ausgegangen werden, sodass der Median Test zum Vergleich aller 4 Gruppen angewendet wurde.

Hierbei fanden sich Hinweise für globale Unterschiede für die Parameter CD3 und CD19 TRADD sowie für CD19 TRAF2 (Tab. 3-10).

<b>Variable</b>	<b>p-Wert Median-Test</b>
<b>TRAF2 in CD3<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.5790</b>
<b>TRADD in CD3<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.0311</b>
<b>FADD in CD3<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.5664</b>
<b>TRAF2 in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.0419</b>
<b>TRADD in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.0537</b>
<b>FADD in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.2079</b>
<b>TRAF2 in CD14<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.5840</b>
<b>TRADD in CD14<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.2549</b>
<b>FADD in CD14<sup>+</sup> Lymphozyten</b>	<b>0.1776</b>

**Tab. 3-10: Übersicht über den Vergleich der vier Gruppen bezüglich der neun Expressionsparameter. P-Wert: Mediantest.**

In einem weiteren Schritt wurden im paarweisen Vergleich jeweils zwei Gruppen mit Hilfe des Mediantestes verglichen. Das multiple Testen wurde hier mit Hilfe der Bonferroni-Holm Methode berücksichtigt.

Der paarweise Vergleich der vier Gruppen für die Expression von TRADD in CD3<sup>+</sup> Lymphozyten ergab Hinweise auf Unterschiede zwischen der Gruppe der Untherapierten verglichen mit den länger als 15 Monate therapierten Probanden, Tab 3-11:

	<b>P-Wert Median Test</b>
<b>Gesund vs Untherapiert</b>	0,2679
<b>Gesund vs Interferon&lt;15Monate</b>	0,8241
<b>Gesund vs Interferon &gt; 15 Monate</b>	0,6469
<b>Untherapiert vs Interferon &lt; 15 Monate</b>	0,3736
<b>Untherapiert vs Interferon &gt; 15 Monate</b>	<b>0,0046</b>
<b>Interferon &lt;15 Monate vs &gt; 15 Monate</b>	0,8241

Der paarweise Vergleich der vier Gruppen für die Expression von TRAF2 in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten ergab Hinweise auf Unterschiede zwischen der Gruppe der Untherapierten verglichen mit den länger als 15 Monate therapierten Probanden, Tab 3-12:

	<b>P Wert Median Test</b>
<b>Gesund vs Untherapiert</b>	0,0943
<b>Gesund vs Interferon&lt;15Monate</b>	1,000
<b>Gesund vs Interferon &gt; 15 Monate</b>	0,8137
<b>Untherapiert vs Interferon &lt; 15 Monate</b>	0,3736
<b>Untherapiert vs Interferon &gt; 15 Monate</b>	<b>0,0046</b>
<b>Interferon &lt;15 Monate vs &gt; 15 Monate</b>	0,2433

Der paarweise Vergleich der vier Gruppen für die Expression von TRADD in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten ergab Hinweise für Unterschiede zwischen der Gruppe der Gesunden

verglichen mit den Untherapierten (s.o.) sowie zwischen der Gruppe der Untherapierten verglichen mit den länger als 15 Monate therapierten Probanden, Tab 3-13:

	<b>P Wert Median Test</b>
<b>Gesund vs Untherapiert</b>	<b>0,0121</b>
<b>Gesund vs Interferon&lt;15Monate</b>	0,3566
<b>Gesund vs Interferon &gt; 15 Monate</b>	0,2579
<b>Untherapiert vs Interferon &lt; 15 Monate</b>	0,3736
<b>Untherapiert vs Interferon &gt; 15 Monate</b>	<b>0,0489</b>
<b>Interferon &lt;15 Monate vs &gt; 15 Monate</b>	0,2433

Aufgrund der Hinweise auf Unterschiede der Expressionen von TRADD und TRAF 2 in B-Lymphozyten wurden die Daten in einem letzten Schritt bezüglich eines Zusammenhanges der Expression von TRADD und TRAF2 in CD19 B-Lymphozyten mit der Schubhäufigkeit bei untherapierten und therapierten Frauen untersucht. Ein Hinweis auf einen Zusammenhang konnte nicht gefunden werden.

## **4. Diskussion**

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Analyse der Expression der Proteine FADD, TRADD, TRAF2 und RIP, die in der Signaltransduktion der TNF-Superfamilie eine wesentliche Rolle spielen und insbesondere an der Signaltransduktion des TNF- $\alpha$  über die TNF-Rezeptoren 1 und 2 beteiligt sind. Die komplexe Rolle von TNF- $\alpha$  in der Pathogenese der Multiplen Sklerose zeigte sich insbesondere in klinischen Studien mit TNF- $\alpha$ -Inhibitoren (z.B. Lenercept), die entgegen der Erwartungen zu einer Exazerbation des Krankheitsverlaufes führten (The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group, 1999).

Über die TNF- $\alpha$ -vermittelte Signaltransduktion werden Inflammation und Apoptose gesteuert (Hsu et al, 1996 a,b). In der Pathogenese der MS scheint ein Ungleichgewicht bzw. ein veränderter Ablauf dieser Transduktionswege vorzuliegen (Reuß et al., 2009). Die Apoptose spielt bei der MS eine duale Rolle: Zum einen werden autoreaktive T-Zellen beim Gesunden durch Apoptose eliminiert, bei der MS scheint hier eine Fehlregulation vorzuliegen. Eine Reduktion bzw. eine Resistenz gegenüber der Apoptose in Leukozyten führt zu einer verlängerten Lebensdauer von Leukozyten, insbesondere autoreaktiver T-Zellen aber auch autoreaktiver B-Zellen, und somit zu einer vermehrten Migration dieser Zellen in das ZNS und damit einhergehend einer längeren Persistenz der Inflammation (Gomes et al., 2003). Neben der über TNFR1-vermittelten Apoptose scheinen T-Zellen von MS-Patienten auch gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose resistenter zu sein als gesunde Individuen (Macchi et al., 1999; Pender, 1998; Segal und Cross, 2000).

Auf der anderen Seite führt eine Hochregulation der TNF-Rezeptoren in Oligodendrozyten bei der MS zu einer vermehrten Apoptose der Oligodendrozyten und damit zur Demyelinisierung (Arnett et al., 2001).

Über das Verhalten von FADD, TRADD, TRAF2 und RIP bei der MS ist bisher wenig bekannt. Erste Ergebnisse sind in unserer Forschungsgruppe erzielt worden. Mittels quantitativer PCR wurden die Expression von FADD, TRADD, TRAF2 und RIP in Leukozyten des peripheren Blutes bei Patienten mit RR-MS, SP-MS und PP-MS sowie einer Gruppe gesunder Probanden untersucht. Die Ergebnisse zeigten insbesondere eine erhöhte Genexpression von TRAF2 und FADD bei RR-MS-Patienten (Reuß et al., 2007).

Diese Ergebnisse sind Grundlage der vorliegenden Arbeit. Es sollte auch auf Proteinebene die Expression der vier Proteine in den einzelnen Leukozyten-Subpopulationen untersucht werden.

### **4.1 Etablierung der durchflusszytometrischen Methode**

Zunächst bestand die Aufgabe darin, eine geeignete Methode zur Detektion der intrazellulären Proteine FADD, TRADD, TRAF2 und RIP in Leukozyten des peripheren Blutes zu etablieren. Zur Auswahl standen unter anderen die Verfahren der Durchflusszytometrie und des Western Blots, die beide eine Detektion von Proteinen in der Zelle ermöglichen.

Die Durchflusszytometrie wurde gewählt, weil mit ihr die gleichzeitige Detektion von Proteinen sowohl auf der Zelloberfläche als auch in der Zelle möglich ist. Durch die gleichzeitige Markierung von extrazellulären und intrazellulären Proteinen ist es im Gegensatz zum Western Blot möglich zwischen bestimmten Zellpopulationen zu unterscheiden, sodass in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression der intrazellulären Proteine FADD, TRADD und TRAF2 durch Oberflächenmarkierung der Rezeptoren CD3, CD14 und CD19 den unterschiedlichen Zellpopulationen der Leukozyten zugeordnet werden konnte. Neben der Zellpopulationszuordnung und der Messung auf Einzelzellebene ist bei dieser Technik weiterhin die Analyse einer großen Zellzahl innerhalb kürzester Zeit von Vorteil. Im Gegensatz zum Western Blot sind zudem quantitative Aussagen möglich.

Nachteile der durchflusszytometrischen Methode stellte vor allem die durch die mehrfachen Inkubationen und Waschschriffe bedingte lange Versuchsdurchführung dar. Zum anderen musste das entnommene Blut immer sofort verarbeitet werden, sodass eine Lagerung der Proben über mehrere Tage nicht möglich war.

#### **Optimaler Versuchsaufbau und Abläufe**

Die Isolierung der Leukozyten aus peripherem Blut sowie die Oberflächenmarkierung von CD3, CD19 und CD14 wurden gemäß einem schon bestehenden Protokoll durchgeführt. Darauf aufbauend wurde das Protokoll modifiziert, um ebenfalls die intrazellulären Moleküle der TNF-Signaltransduktionskaskade zu detektieren.

Antikörperwahl: Bei allen Antikörpern wurden polyklonale gewählt, der Vorteil liegt insbesondere beim Nachweis sehr kleiner Moleküle mit wenigen Epitopen. Ein Nachteil ist eine gewisse Unspezifität durch Kreuzreaktionen.

Des Weiteren wurden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sekundärantikörper gewählt. Im Gegensatz zu direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern erreicht man so eine Signalverstärkung, insbesondere bei Detektion von Molekülen in der Zelle. Ein Nachteil der indirekten Markierung ist jedoch die erhöhte unspezifische Bindung.

Um eine unspezifische Bindung auszugleichen, wurde bei jeder Messung eine so genannte Isotypenkontrolle mitgeführt. Mittels der Isotypenkontrolle wird die unspezifische Bindung bestimmt und in die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität mit einbezogen.

Durch Variation verschiedener Parameter (wie z.B. Konzentration des Antikörpers, Waschschriffe etc.) konnte letztendlich ein optimales Methodenprotokoll für alle drei Parameter erstellt und erstmals eine durchflusszytometrische Methode zur Detektion der intrazellulären Proteine FADD, TRADD und TRAF2 in Leukozyten des peripheren Blutes entwickelt werden.

### **Reproduzierbarkeit**

Damit das entwickelte Methodenprotokoll schließlich für die geplante Patientenstudie angewendet werden konnte, musste auch die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse getestet werden. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde die Reproduzierbarkeit über die Ermittlung der biologisch (individuell-) und technisch bedingten Varianzen, die Intra-Assay-Präzision und die Inter-Assay-Präzision, kontrolliert. Damit Reproduzierbarkeit vorliegt, sollte der Variationskoeffizient unter 20% liegen (Austin und McIntosh, 2000; Nomura et al., 2000). Für die Intra-Assay-Präzision lagen die Werte deutlich unter 20%, und bis auf diejenigen für TRAF2 in CD3-Lymphozyten auch unter 10%. Für die Inter-Assay-Präzision wurden höhere Variationskoeffizienten bestimmt, die jedoch größtenteils unter 20% bzw. um 20% lagen. Lediglich für die FADD-Expression in CD14<sup>+</sup> - Leukozyten wurde ein VK von 28% bestimmt. Insgesamt lässt sich von einer Reproduzierbarkeit sprechen, höhere Variationskoeffizienten bei der Inter-Assay-Präzision können auf biologische Schwankungen an verschiedenen Tagen und nicht exakt dieselben

Untersuchungsbedingungen wie nicht zu beeinflussende Außentemperaturen zurückzuführen seien.

Zur Erhaltung der Reproduzierbarkeit wurde bei Messung der Patienten-Blutproben immer strikt nach dem entwickelten Methodenprotokoll vorgegangen. Alle Blutproben wurden immer innerhalb von 3 Stunden nach der Blutentnahme verarbeitet (Förster, 2004).

### **RIP**

Da neben TRADD, TRAF2 und FADD auch RIP eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion durch TNF- $\alpha$  spielt, sollte auch die Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Detektion dieses Proteins erfolgen. Der Antikörper wurde von der Firma Cell Signaling gewählt und es wurde nach dem beiliegenden Protokoll vorgegangen. Dabei konnte anfangs eine zufriedenstellende Signalintensität für RIP gemessen werden, jedoch bei einer Methanolkonzentration von 90% keine für die Oberflächenmarker, sodass es eine Zuordnung zur jeweiligen Zellpopulation nicht möglich gewesen ist. Chow et al. (2001; 2005) sowie Krutzik und Nolan (2003) beschrieben, dass die Methanolbehandlung ein Problem für die Oberflächenmarker darstellt. Aus diesem Grund wurden Methanolkonzentrationen zwischen 50 und 90% untersucht und es zeigte sich eine zufriedenstellende Signalintensität für RIP bei einer Konzentration von 60%. Mit abnehmender MeOH-Konzentration stiegen die CD3-Signalintensitäten deutlich, bei jedoch gleichzeitiger Abnahme der RIP-Intensität. Entsprechend verhielt es sich mit dem Isotyp. Insgesamt lag im Verlauf jedoch keine Reproduzierbarkeit dieses Experimentes vor. Aus zeitlichen Engpässen wurde in der Patientenstudie dann letztendlich nur die Proteinexpression der anderen Parameter FADD, TRADD und TRAF2 untersucht.

## **4.2 Patientenstudie**

### **4.2.1 Bewertung des Studiendesigns und der demographischen Daten**

Die neu etablierte durchflusszytometrische Methode sollte darauffolgend im Rahmen einer Patientenstudie angewendet werden. Da bisher wenig über die Bedeutung der

Parameter FADD, TRADD und TRAF2 in der Pathogenese der MS bekannt ist, war es zunächst einmal von Interesse, in einer Querschnittstudie untherapierte MS-Patienten mit gesunden Probanden zu vergleichen und zu untersuchen, ob die Parameter gegebenenfalls als Diagnose- oder Aktivitätsmarker einer MS dienen könnten. Des Weiteren wurde in einem zweiten Schritt ein möglicher Einfluss einer Therapie mit Interferon-beta auf die Expression der Proteine und gegebenenfalls die Eignung als Surrogatmarker eines Therapieerfolgs untersucht.

Alle in der Studie untersuchten Patienten wiesen einen schubförmig remittierenden Verlauf auf und erfüllten die in Kapitel 2.2 beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien. Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine offene, nicht randomisierte Querschnittstudie handelte, konnte eine vollständige Strukturgleichheit der unterschiedlichen Kollektive nicht gewährleistet werden, sodass im Nachhinein eine Homogenitätsprüfung durchgeführt wurde.

Da lediglich zwei Männer in dem gewählten Zeitraum in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurden diese letztendlich nicht in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Die RRMS ist die am häufigsten auftretende Form der MS und betrifft vor allem das weibliche Geschlecht.

Ein Problem der statistischen Auswertung stellte vor allem der relativ kleine Stichprobenumfang dar. In dem gewählten Zeitraum wurden alle Patienten, die sich in der MS-Sprechstunde der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen vorstellten und die Einschlusskriterien erfüllten, in die Studie eingeschlossen. Patienten im akuten Schub ( $\pm 3$  Monate) wurden nicht in die vorliegende Studie aufgenommen, da hierdurch ein Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine möglich ist und diese Fragestellung in einer eigenständigen Arbeit untersucht werden sollte. Da die Therapieempfehlungen mittlerweile schon bei Erstmanifestation den Beginn einer Basistherapie vorsehen (Jacobs et al., 2000; Comi et al., 2001a; Miller, 2004), waren die Bedingungen für die Rekrutierung untherapierter Patienten erschwert. Zudem mussten die Proben - wie bereits oben erwähnt - innerhalb von 3 Stunden nach Blutentnahme verarbeitet werden und bei etwaigen technischen Fehlern des Gerätes konnten die Ergebnisse nicht verwertet werden.

Letztendlich konnten jedoch 10 untherapierte Patienten, die die Einschluss- und Ausschlusskriterien erfüllten, in die Studie eingeschlossen werden.

### **4.2.1.1 Betrachtung des Alters zwischen den vier Kollektiven**

Mittels der Homogenitätsprüfung konnte kein Unterschied der vier Gruppen in Bezug auf das Alter gefunden werden. Da aber aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs das Vorliegen eines Unterschiedes nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, erfolgte in einem weiteren Schritt eine Korrelationsprüfung. Mithilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman konnte bei vorliegendem Stichprobenumfang gezeigt werden, dass das Alter keinen Einfluss auf die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2 in CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> und C19<sup>+</sup> Leukozyten zu haben scheint. Ebenso verhielt es sich in der Gruppe der Therapierten wo mittels partieller Rangkorrelation zusätzlich der Einfluss von Krankheitsdauer und EDSS berücksichtigt wurde.

Unterschiedliche Studien bezüglich verschiedener Komponenten der TNF-Signaltransduktionskaskade sowie der Signaltransduktion über FAS in Zellen des peripheren Blutes konnten keinen Einfluss des Alters auf die Expression dieser Parameter nachweisen (Gomes et al., 2003; Martino et al.; 1997), sodass man mutmaßen könnte, dass es sich bei den weiteren Beteiligten der Signaltransduktion kongruent verhält und somit gut mit dem vorliegenden Ergebnis vereinbar ist.

### **4.2.1.2 Betrachtung der Krankheitsaktivität anhand EDSS und Progressionsindex sowie der Krankheitsdauer bezüglich der drei Gruppen der Erkrankten**

Unter Anwendung der Korrelationsprüfung nach Spearman und der partiellen Rangkorrelation wurde ebenfalls der Einfluss der Krankheitsaktivität (gemessen an EDSS und Schubzahl bzw. Progressionsindex) und der Krankheitsdauer untersucht. Auch hier konnte kein signifikanter Hinweis auf einen Unterschied gefunden werden, was ebenfalls gut mit der in Kapitel 4.2.1.1 aufgeführten Studien vereinbar ist (Martino et al., 1997; Gomes et al.; 2003).

Wenn man die einzelnen Parameter in den unterschiedlichen Kollektiven genauer betrachtet, fällt allerdings auf, dass der Mittelwert des EDSS bei den länger als 15 Monaten therapierten Patienten z.B. deutlich höher ist als bei den untherapierten Patientinnen. Ähnlich verhält es sich mit dem Progressionsindex. Auf der anderen Seite ist die Krankheitsdauer bei den Untherapierten länger als bei den Therapierten. Eine geringere Krankheitsaktivität bei untherapierten ist auch aus anderen Studien bekannt,

und lässt sich am ehesten mit der Tatsache erklären, dass MS-Patienten mit einer geringeren Krankheitsaktivität sich eher gegen eine Therapie entscheiden und somit Patienten ohne Therapie eher eine längere Krankheitsdauer aufweisen (Visser und van der Zande; 2011). Ein signifikanter Unterschied ist in dieser Arbeit zwischen den Gruppen allerdings nicht zu finden, ebenso keine Korrelation mit der Expression der zu untersuchenden Parameter. Gut verdeutlicht wird die fehlende Korrelation mit den Expressionsparametern auch, wenn man die Scatter Plots im Ergebnisteil betrachtet (siehe Kapitel 3.3.2.2 bzw. Anhang), die sehr schön darstellen, dass bei fehlender Linearität die Expression der Parameter nicht von Alter oder Krankheitsaktivität und -dauer abhängt.

### **4.2.2 Vergleich gesunder Probanden mit untherapierten MS-Patienten**

In der Querschnittstudie wurde die Expression der Proteine FADD, TRADD und TRAF2 in CD3<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Leukozyten bei Gesunden und untherapierten RR-MS-Patienten untersucht. Da bisher wenig über die Expression dieser Parameter bei der MS bekannt ist, diente die Studie der Abklärung, ob MS-Patienten grundsätzlich eine andere Expression der untersuchten Proteine zeigen. Dies könnte zum einen einem besseren Verständnis der Pathogenese der MS dienen und zum anderen neue Möglichkeiten bei der Diagnosestellung aufweisen.

Zunächst erfolgte dabei die deskriptive statistische Auswertung der gemessenen Daten. Anhand der durchgeführten Homogenitäts- und Korrelationsüberprüfungen konnte belegt werden, dass die unterschiedlichen Proteinexpressionen zwischen Gesunden und Untherapierten nicht auf einer unterschiedlichen Altersstruktur der beiden Gruppen beruhen (siehe oben).

Die deskriptive Statistik der in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigte erhöhte mittlere Expressionswerte der drei untersuchten Proteine in T- und B-Lymphozyten bei Untherapierten im Vergleich zu gesunden Probanden, ein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied war aber lediglich für TRADD in CD19<sup>+</sup> B Lymphozyten zu finden.

Bei der Multiplen Sklerose liegt ein Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Inflammation mit Verschiebung zu Inflammation und Zellüberleben vor. Man geht

davon aus dass autoreaktive Lymphozyten, die gegen Apoptose in einem gewissen Maß resistent sind, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der MS spielen.

Generell wäre somit ein erhöhtes Expressionsniveau mit einer erhöhten inflammatorischen Aktivität bei RR-MS Patienten erklärbar. Lange bekannt ist eine vermehrte TNF alpha Expression im Serum und Liquor sowie in MS-Läsionen bei Patienten mit Multipler Sklerose (Sharief, 1991). Die Interaktion von TRADD mit TNFR1 ist TNF alpha abhängig (Hsu et al., 1996 a). Mittels Gadolinium Anreicherungen konnte kernspintomographisch bei RR-MS Patienten ohne akutem Schubereignis eine subklinisch erhöhte inflammatorische Aktivität nachgewiesen werden (Harris et al., 1991). Bei Inflammation und vermehrter TNF alpha Produktion kommt es zu einer vermehrten Aktivierung der TNF-Kaskade und damit unter anderen zur Rekrutierung der Adaptormoleküle TRADD, TRAF2 und auch FADD über TRADD. Der in dieser Arbeit erhobene Befund ist möglicherweise mit einer darauffolgenden vermehrten Expression der beteiligten Signaltransduktionskomponenten im Rahmen einer chronischen Inflammation zu vereinbaren.

Weiterhin fällt auf, dass bei den Gesunden ein insgesamt homogeneres Verteilungsmuster der Expressionen vorliegt. Martino et al. untersuchten 1997 im peripheren Blut die Expression von TNF alpha, TNFR1 und 2 auf mRNA Ebene sowie die löslichen Formen im Serum über ein Jahr. Dabei zeigte sich eine starke Fluktuation der Expressionen dieser Parameter auf mRNA Ebene im Verlauf der Erkrankung und einem Ansteigen bei vermehrter Krankheitsaktivität ohne signifikanten Unterschied in Hinsicht auf gesunde Vergleichsprobanden. Bei Gesunden fand sich diese Fluktuation nicht. Gut vorstellbar ist, dass es sich mit den Molekülen auf Proteinebene im weiteren Verlauf der Signaltransduktion ebenso verhält, dass auch die weiteren Proteine der TNF Signaltransduktionskaskade in den Leukozyten des peripheren Blutes bei MS Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung unterschiedlich stark exprimiert werden. Das könnte wiederum das inhomogenere Verteilungsmuster bei MS Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden erklären.

In den folgenden Kapiteln sollen die Funktionen und Expressionen der einzelnen Adaptormoleküle zwischen untherapierten und gesunden Probanden noch einmal im Einzelnen diskutiert werden.

### 4.2.3 Die Expression von FADD bei Untherapierten Patienten im Vergleich zu Gesunden

FADD ist ein 23kDA schweres Protein, über die „death domain“ interagiert FADD als Adaptormolekül mit weiteren DD-tragenden Rezeptoren und Adaptormolekülen. FADD führt nach Aktivierung der Signaltransduktion über die Rezeptoren Fas und DR3 unter Rekrutierung der Kaspasen 8 und 10 und Aktivierung weiterer Prokaspasen zur Apoptose, insbesondere bei Überexpression (Chinnaiyan et al., 1995; Bannhart et al., 2003). In der Signaltransduktion des TNFR1 hingegen ist die Rekrutierung des Adaptormoleküls TRADD für die Interaktion mit FADD essentiell und führt im Weiteren zur Aktivierung der Apoptosekaskade (Hsu et al., 1996a; Zheng et al., 2006). Reguliert werden die Abläufe über verschiedenste Mechanismen insbesondere über Apoptoseinhibitoren wie z.B. cFLIP (Krueger et al., 2003).

Neben seiner Apoptose auslösenden Funktion hat man eine weitere Anzahl an nicht apoptotischen Funktionen von FADD nachweisen können, unter anderem ist es an der Embryogenese, in der Hämatopoese und in der Tumorgenese involviert (Schinske et al., 2011). Dabei zeigten Schinske et al., dass hohe FADD Level in phosphorylierter Form in Tumorzellen mit einer gesteigerten Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren korrelieren. Diese Wege sind allerdings noch kaum verstanden.

Gomes et al. zeigten 2003, dass in den Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit schubförmig remittierendem Verlauf der MS insbesondere in CD4+T-Zellen eine Hochregulation der Genexpression von CD95 (FAS) und seinem CD95 ligand, die wiederum FADD in der weiteren Signaltransduktion rekrutieren, sowie dem Apoptoseinhibitor cFLIP zu finden ist und werteten dies im Sinne einer gestörten/resistenten Apoptose in den peripheren Zellen des Blutes bei RRMS Patienten.

In unserer Forschungsgruppe erfolgte auf mRNA Ebene (aus Leukozyten des peripheren Blutes isoliert), ein Vergleich der Genexpression von FADD zwischen Untherapierten und Gesunden, des Weiteren zwischen den verschiedenen Verlaufsformen der MS. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine gesteigerte Genexpression von FADD bei RRMS im Vergleich zu gesunden Probanden (Rühlmann, 2012). Auf der Ectrims wurde 2010 ein Poster präsentiert, das die Genexpression von FADD, TRADD, TNFR1, FAS und cFLIP bei Patienten mit RRMS im peripheren Blut beschreibt (Budde et al., 2010). Hier fand sich insbesondere eine Hochregulation der

RNA-Expression von FADD und TRADD im Schub sowie eine Verminderung der Expression von FAS und Caspase 8. Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression von FADD und Caspase 8 drei bis sechs Monate vor dem Schub. Auf Proteinebene beschrieben Seidi und Sharief 2002 eine Überregulation von Apoptoseinhibitoren (FLIP und Bcl-2) in B-Lymphozyten und werteten dies ebenso im Rahmen einer resistenten Apoptose, die dadurch wiederum autoreaktive B-Lymphozyten hervorrufen kann.

Auf Proteinebene finden sich bisher keine Studien bezüglich der Expression von FADD bei Multipler Sklerose. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von FADD in den untersuchten Leukozytensubgruppen zwischen Untherapierten und Gesunden gefunden werden. Allerdings ist ein Unterschied zwischen der Genexpression und letztendlich vorhandenen Proteinexpression durchaus denkbar, wenn man in Betracht zieht, dass mRNA (Ribonukleinsäure) aufgrund verschiedenster intra- und extrazellulärer Mechanismen nicht zwingend in Proteine translatiert werden muss (Reuß et al., 2009). Letztlich ist die Proteinebene allerdings entscheidend für die Funktionalität. Bei der MS besteht eine erhöhte Inflammation und resistente Apoptosefähigkeit (Bannhart et al., 2003; Gomes et al., 2003), sodass eine unveränderte Proteinexpression von FADD im Vergleich mit gesunden Probanden gut möglich ist, da FADD über die Interaktion mit weiteren Molekülen Apoptose induziert. Auf der anderen Seite fielen in dieser Arbeit in der deskriptiven Statistik generell leicht erhöhte Expressionswerte von FADD in den T- und B-Leukozytensubgruppen auf, sodass auch nicht auszuschließen ist, dass man bei einem höheren Stichprobenumfang möglicherweise doch einen Unterschied finden könnte. Im Schub beschrieben Budde et al. 2010 eine erhöhte RNA Expression von FADD beziehungsweise eine beginnende Hochregulation der Genexpression bereits drei bis sechs Monate vor dem Schub, dies könnte einer Gegenregulation im Rahmen der Inflammation entsprechen, aufgrund der gleichzeitigen vermehrten Expression von Apoptoseinhibitoren sind Zellen des peripheren Blutes bei RRMS Patienten allerdings dennoch resistent gegenüber der Apoptose (Budde et al., 2010; Seidi und Sharif, 2002). Unklar bleibt auch, ob eventuell oben erwähnte nicht-apoptotische Signalwege bei der Multiplen Sklerose eine Rolle spielen könnten. Weitere Untersuchungen der Rolle von FADD in der Pathogenese der MS sind auf jeden Fall von Interesse um die komplexe Rolle besser zu verstehen.

### 4.2.4 TRADD im Vergleich zwischen untherapierten und therapierten Probanden

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Forschungsgruppe, bei denen die Genexpression von FADD, TRADD, TRAF2 und RIP mittels quantitativer PCR untersucht wurde, zeigte sich in dieser Studie auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied in der Expression von FADD und TRAF2 zwischen verschiedenen Untergruppen, sondern für TRADD in B-Lymphozyten. Kritisch zu betrachten ist dabei das Problem des multiplen Testens, da bei Testen auf dem 5%-Niveau bei Mehrfachtestungen unabhängiger Variablen (in diesem Fall 9 unabhängige Variablen) das Risiko für ein falsch positives Ergebnis steigt. Interessant scheint jedoch die Tatsache zu sein, dass gerade die Proteinexpression von TRADD und dieses in B-Lymphozyten erhöht ist:

TRADD interagiert über seine DD mit dem TNFR1 und wird in allen untersuchten humanen Geweben in geringen Mengen exprimiert (Hsu et al., 1995). In der Signaltransduktion des TNFR1 stellt TRADD aufgrund seiner unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten die entscheidende Bifurkationsstelle zwischen Apoptose und Inflammation dar, die Bindung an den TNFR1 ist TNF abhängig (Hsu et al., 1996a). Somit ist TRADD das Adaptormolekül in der Entscheidung zwischen Apoptose und Inflammationsinduktion und verschaltet insbesondere die intrazellulären Antworten des TNFR1 (Hsu et al., 1996a).

Des Weiteren ist TRADD an Prozessen im Zellkern beteiligt. TRADD kann in den Zellkern translozieren und ist dort in nukleären Strukturen, den PML (Promyeloisches Leukämieprotein)-Nuklearkörperchen, zu finden und kann über bislang unklare Vorgänge eine p53-abhängige Apoptose induzieren (Morgan et al., 2002). Eine weitere nukleäre Funktion ist die Interaktion von TRADD mit STAT (Signal transduction and transcription protein) 1- $\alpha$  und die dadurch verursachte Beeinflussung der Interferon- $\gamma$  Signaltransduktion (Wesemann et al., 2004).

Bei der Multiplen Sklerose ist bekannt, dass eine vermehrte TNF alpha Konzentration im Serum vorliegt (Sharief et al., 1991). Bezüglich der TNF-Rezeptoren finden sich zum Teil kontroverse Studien, so zeigten Studien, dass lösliches TNFR im Serum von RRMS Patienten sich nicht von gesunden Probanden unterschied (Bilinska et al.; 2002); auf der anderen Seite konnten Martino et al. 1997 zwar keinen Unterschied im Vergleich mit gesunden Probanden in der Genexpression der TNF-Rezeptoren

nachweisen, allerdings aber eine unterschiedlich starke Expression im Laufe der Erkrankung. Reuß et al. zeigten 2009 wiederum eine Wirkung von Interferon-Beta auf die Genexpression der TNF-Rezeptoren bei RRMS Patienten (siehe Kapitel 4.2.7).

Bisher finden sich keine Studien, die das Verhalten von TRADD auf Proteinebene bei der MS untersucht hätten. In unserer Forschungsgruppe fand sich kein signifikanter Unterschied der TRADD Expression auf RNA-Ebene, die Gruppe um Budde et al. allerdings fand wie bereits oben erwähnt eine Hochregulation der Genexpression von TRADD während des Schubes und insgesamt eine Hochregulation von Genen, die Zellüberleben und Proliferation regulieren (Budde et al, 2010), sodass eine erhöhte Expression von TRADD auf Proteinebene auch in Remission durchaus denkbar ist. Dabei wäre eine vermehrte TRADD Expression in B-Lymphozyten mit einer vermehrten Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen vereinbar, was auch zu der Vorstellung einer gestörten bzw. resistenten Apoptose im Rahmen der RRMS passt (Gomes et al., 2003), das Fehlen von Apoptose und die vermehrte Aktivierung der proinflammatorischen Wege führt wiederum zu autoreaktiven B-Zellen, die wiederum T-Zellen aktivieren können. Interessant scheint dabei gerade auch zu sein, dass TRADD in B-Lymphozyten erhöht ist: Das Ergebnis dieser Arbeit unterstützt Ergebnisse aus neueren Untersuchungen, die mehr und mehr eine Bedeutung der B-Zellen aufweisen konnten und ein Umdenken in Bezug auf die Pathogenese der MS notwendig machen (Franciotta et al., 2008). Lange Zeit wurde die MS als ausschließlich T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen (Laman, 1998). B-Zell-Expansion und die Produktion oligoklonaler IgGs im Gehirn und Liquor wurden lediglich als Beweis für die immunvermittelte Genese der MS angesehen. Studien, die zu dem monoklonalen Antikörper Rituximab (gegen CD20 gerichtet) durchgeführt wurden und magnetresonanztomographisch eine Reduktion der aktiven zerebralen Läsionen zeigten, machten ein Umdenken in Bezug auf B-Zellen und die Pathogenese der MS notwendig. Rituximab führt zu einer Depletion von B-Lymphozyten (Hauser et al., 2008). Des Weiteren zählt die Beschreibung von B-Zell-Follikeln in den Meningen und perivaskulär bei MS-Patienten dazu, die zweimalig in Autopsiestudien nachgewiesen werden konnten und die die frühere Beschreibung von lymphoiden Strukturen in den MS-Plaques ausweitet (Serafini et al., 2004; Aloisis et al., 2006).

B-Zellen scheinen dabei an viel mehr Schritten der MS-Erkrankung beteiligt zu sein wie Antigenerkennung, Präsentation gegenüber T-Zellen, T-Zellaktivierung und

Antikörperbildung (Hartung, 2009). Des Weiteren bilden B-Zellen kostimulierende Moleküle, die die T-Zelldifferenzierung bewirken, und setzen Zytokine frei, unter anderem TNF alpha, die Makrophagen und die weitere B Zell-Proliferation stimulieren (Hartung, 2009). Wichtig sind dabei auch weitere Mitglieder der TNF Superfamilie wie APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), BAFF (B cell activating factor) und CD40. Antikörper scheinen weiterhin neben der ihnen zugeschriebenen autoimmunen Pathogenität im Sinne einer Zerstörung des Gewebes auch eine entscheidende Rolle beim Beginn der Plaque-Bildung und bei der Demyelinisierung bei Patienten mit gesicherter MS zu haben (Gay und Esiri, 1991; Breij et al., 2008).

Eine weitere entscheidende Rolle spielt TRADD in der LMP1 Signaltransduktion des EBV, eine die B-Zellen betreffende Infektion (siehe Kapitel 4.2.4.1).

### **4.2.4.1 Könnte TRADD ein möglicher Verbindungspunkt in der Pathogenese der MS und einer EBV-Infektion sein?**

Das Adaptormolekül TRADD ist ein Knotenpunkt in der Signaltransduktion des TNFR1. Dabei kann es sowohl Apoptose als auch Inflammation und Überleben der Zelle induzieren. TRADD wird aber neben seiner wichtigen Rolle in der Signaltransduktion durch den TNF-Rezeptor-1 außerdem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des viralen latenten Membranproteins-1 (LMP-1), dem primären Onkogen des EBV-Virus, zugeschrieben. EBV maskiert über die LMP1 Bindung an TRADD die proapoptotischen Eigenschaften von TRADD und vermittelt Zell-Überleben und Wachstum (Schneider et al., 2008). Über seinen N-Terminus kann TRADD LMP-1 sowie die TRAF-Moleküle binden (Kieser et al., 1999; Inoue et al., 2000). Über die Rekrutierung von TRAF2 kommt es zu Aktivierung des NF- $\kappa$ B und JNK Signalweges.

Die Signaltransduktion über LMP1 ähnelt in vieler Hinsicht der Signaltransduktion des TNF-Rezeptor-1. Funktionell soll es dem CD40 Rezeptor, der auf B-Zellen exprimiert wird, entsprechen. Trotz vieler Ähnlichkeiten mit CD40 gibt es aber auch viele Übereinstimmungen mit dem TNFR1. Vor allem werden dieselben Signaltransduktionsmoleküle (TRAFs und RIP) rekrutiert. Während die TNFR1-Signaltransduktion inflammatorische Prozesse und Apoptose reguliert (Wajant et al.,

2003), ist LMP1 aber doch trotz vieler Ähnlichkeiten in der Signaltransduktionskaskade nicht in der Lage, Apoptose auszulösen (Schneider et al. 2008).

Die Identifikation ektopischer, des Weiteren mit EBV infizierter B-Zell-Follikel (Serafini et al., 2004), führte zu der Annahme, dass die MS möglicherweise die Manifestation einer gestörten Immunreaktion auf eine EBV-Infektion im ZNS darstellt. EBV ist einzigartig darin, dass es eine latente Infektion in B-Zellen hervorruft. Seit mehreren Jahrzehnten wurde immer wieder eine Assoziation von EBV mit der MS vermutet, konnte aber nie belegt werden und mögliche molekulare Mechanismen sind bisher unklar.

Die Infektiöse Mononukleose, das akute Krankheitsbild einer EBV-Infektion, geht mit einem hohen Risiko für eine Ersterkrankung an MS einher (Lindberg et al., 1991; Thacker et al., 2006). In den letzten Jahrzehnten zeigten seroepidemiologische Studien, insbesondere Studien bei an MS erkrankten Kindern, dass die EBV-Seropositivität (99% vs. 90-95% bei Erwachsenen und 83-99% vs. 42-72% bei Kindern) und der EBV-Antikörpertiter bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen erhöht sind (Wandinger et al., 2000; Alotaibi et al., 2004; Haahr et al., 2006; Pohl et al., 2006; Ascherio und Munger, 2007).

Um dieser Idee weiter nachzugehen, untersuchten Serafini et al. (2007) in einer Autopsiestudie EBV-Marker-Expressionen im ZNS von MS Patienten mit unterschiedlichen klinischen Verläufen. Dabei fanden sie anormale Akkumulationen von EBV-infizierten B-Zellen in den Meningen und perivaskulären Zonen in der weißen Substanz, unabhängig vom Stadium der MS. Diese waren MS-spezifisch, da dies nicht für andere Immunkrankheiten gefunden werden konnte. Die Anzahl der EBV-infizierten Zellen korrelierte dabei mit dem Grad der Inflammation im ZNS. Außerdem fanden sich erhöhte LMP1-Konzentrationen in den ektopischen B-Zellfollikeln bei MS-Patienten (Serafini et al., 2007). Dagegen konnten allerdings andere Studien keine EBV- Infektion in den Läsionen aufweisen (Willis, et al., 2009). Eine EBV-Infektion scheint eine MS nicht direkt auszulösen, wenn man die verschiedenen Altersspannen des Krankheitsbeginnes in Betracht zieht. Allerdings finden sich bei MS-Patienten signifikant erhöhte EBV-Titer im Serum, lange bevor die Erkrankung ausbricht (Barget et al., 2009), sodass eine Immunreaktion und nicht die Infektion mit dem EBV-Virus allein in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen könnte.

Autoimmunität könnte mittels vieler biologischer Effekte durch das Epstein-Barr-Virus ausgelöst werden: Latente und lytische EBV-Proteine sind potente Immunogene und lösen eine starke T- und B-Zell-Reaktion aus; EBV-spezifische Immunantworten könnten eine Kreuzreaktion mit Selbst-Antigenen auslösen und selbstreaktive B-Zellen retten; LMP1 induziert die Expression von B-Zell-Aktivierung über Faktoren wie TRADD, BAFF und APRIL (Niller et al, 2008, Schneider et al., 2008). TNF Rezeptor abhängige B-Zellen, die sich in lymphoidartigen Follikeln formieren, könnten einen optimalen Ort zur Expansion von pathologischen T-Zellen darstellen (Kurosaki, 2008).

In cerebralen ektopischen B-Zellfollikeln finden sich bei MS-Patienten erhöhte LMP1-Konzentrationen (Serafini et al., 2007). TRADD ist essentiell für das EBV um den NFκ-B-Weg zu aktivieren (Schneider et al., 2008). Viren sind in der Lage, molekulare und funktionelle Eigenschaften von Signalmolekülen der Zelle zu beeinflussen. So maskiert EBV über LMP1 die proapoptotischen Eigenschaften von TRADD und reguliert positiv die Proliferation und das Überleben der Zelle.

TRADD verlängert somit das Überleben von B-Zellen, so dass im Rahmen einer EBV-Infektion eine erhöhte Zahl an B-Zellen existiert. Vorausgesetzt, dass eine nennenswerte Zahl an MS Patienten existiert, die mit EBV infiziert ist, sollte eine erhöhte TRADD Expression ein B-Zell Überleben und Vermehrung zur Folge haben.

Generell penetrieren B-Zellen die Blut-Hirnschranke nicht. Im Rahmen einer Infektion allerdings schon (Serafini et al., 2007). Diese zelluläre Situation korreliert mit MRT Ergebnissen, die zeigen, dass auch in Remission eine entscheidende entzündliche Aktivität mittels Gadolinium Anreicherung gemessen werden kann (Harris et al., 1991).

Die Bedeutung einer erhöhten TRADD-Expression für die Multiple Sklerose kann durch diese Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Des Weiteren bleibt unklar, wie gegebenenfalls eine EBV-Infektion mit einer TRADD- Expressionserhöhung bei MS-Patienten in zeitlichem Zusammenhang stehen könnte bzw. ob ein sicherer kausaler Zusammenhang besteht. Besonders interessant ist jedoch, dass das Ergebnis dieser Arbeit mit einem Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und einer Erkrankung an Multipler Sklerose gut vereinbar wäre, mehr noch könnte TRADD auch ein wichtiger Mediator in diesem Prozess sein. Möglicherweise könnte TRADD damit auch einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

Diese Vermutungen bleiben spekulativ, weitere Untersuchungen sind für ein genaueres Verständnis notwendig. Von Interesse wäre z.B. zu analysieren, inwiefern eine Koexpression von TRADD und LMP1 in den B-Lymphozyten von MS-Patienten besteht.

### **4.2.5 Die Expression von TRAF2 im Vergleich zwischen Untherapierten und Gesunden**

TRAF2 (TNF-associated factor 2) ist ein 56kDA schweres Protein und wurde über seine Interaktion mit dem C-terminalen Ende des TNF-R2 entdeckt (Rothe, 1995). Eine entscheidende Rolle spielt TRAF2 in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges und führt hier zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Immun- und Imflammationantworten regulieren sowie Zellüberleben (siehe Kapitel 1.2.3.1). Neben dem klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg konnte gezeigt werden, dass TRAF2 auch an einem alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg beteiligt ist, der überwiegend in B-Zellen gefunden wird (Grech et al., 2004). Vor allem bei der Signaltransduktion durch CD40 konnten TRAF2-knockout-B-Zellen einen Hinweis für die Wirkung von TRAF2 auf diesen alternativen Weg geben (Grech et al., 2004). Dieser Weg spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von B- und T-Zellen. Über die Interaktion mit verschiedenen MAP-Kinasen, wie z.B. MEKK1 und ASK1, ist TRAF2 in der Lage, den JNK-Weg zu aktivieren (Yuasa et al., 1998; Baud et al., 1999; Hoeflich et al., 1999).

Bei der Multiplen Sklerosen ist bisher sehr wenig über die Expression von TRAF2 bekannt. In unserer Forschungsgruppe konnte bei untherapierten Patienten mit schubförmiger MS eine vermehrte Expression von TRAF2 auf RNA Ebene gefunden werden (Reuss et al., 2007). Auf Proteinebene finden sich bisher keine Studien zur Expression von TRAF2 bei MS Patienten. In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen Gesunden und Untherapierten gefunden werden. Allerdings scheinen die Expressionswerte tendenziell bei MS Patientinnen erhöht zu sein, dies kann aber statistisch nicht signifikant belegt werden. Unter Interferontherapie findet man jedoch Hinweise, dass nach längerer Therapie die Expressionswerte von TRAF 2 niedriger sind als bei untherapierten MS Patienten und denen von gesunden Probanden gleichen (siehe Kapitel 4.2.7), insbesondere in B-Zellen.

TRAF2 spielt eine bedeutende Rolle in der Auslösung von Inflammation, und interagiert neben den TNF-Rezeptoren über eine Reihe weiterer Rezeptoren. Dabei ist die jeweils aktivierte Signaltransduktionskaskade rezeptorspezifisch (Bishop, 2004).

Neben seiner wichtigen Rolle in der Signaltransduktion über TNFR1 und 2 wo es über die NF $\kappa$ B Aktivierung zur Inflammation und Überleben der Zellen kommt, interagiert TRAF2 unter anderem mit CD40, dessen Aktivierung wiederum zur Aktivierung von JNK führt. Insbesondere in B-Zellen führt dies z.B. zur Zytokinproduktion, wodurch wiederum T Zellen aktiviert werden (Bishop, 2004). Zudem ist bekannt, dass über eine NF $\kappa$ B-Aktivierung die Produktion von mehreren Apoptoseinhibitoren angeregt wird, sodass Apoptose unterdrückt wird (Karin und Lin, 2002). Die vermehrte Aktivierung der proinflammatorischen und proliferativen Signaltransduktionswege über TRAF2 wäre wiederum mit einer gestörten Apoptosefähigkeit bei der MS vereinbar (Gomes et al., 2003).

### **4.2.7 Einfluss einer Therapie mit Interferon beta auf die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2**

Bezüglich der Interferontherapie wurden MS-Patienten in die Studie eingeschlossen, die einen schubförmig remittierenden Verlauf der MS aufwiesen und zwischen 6 und 27 Monaten mit Interferon beta therapiert worden waren. Es wurde kein Unterschied zwischen Interferon beta-1a (Rebif; 22 bzw. 44 $\mu$ g, dreimal wöchentlich, s.c.) und Interferon beta-1b (Betaferon; 250 $\mu$ g, alle 2 Tage, s.c.) gemacht. Molekularbiologische Untersuchungen wiesen für Interferon beta-1b eine geringere Bioaktivität im Vergleich zu Interferon beta-1a auf, sodass Betaferon höher dosiert und häufiger gegeben werden muss als Rebif um eine gleiche Wirksamkeit zu erreichen (Antonetti et al., 2002). Die unterschiedliche in vivo-Wirksamkeit der beiden Präparate beruht auf geringen strukturellen Unterschieden. Direkte klinische Vergleiche der Wirksamkeit zwischen beiden Präparaten gibt es nicht, jedoch zeigten sowohl die REGARD (Rebif vs. Glatirameractate in Relapsing MS Disease)- als auch die BEYOND (Betaferon Yielding Outcomes of a New Dose)- Studie keinen Unterschied in der Wirksamkeit des jeweiligen Interferons im Vergleich zu Copaxone (Glatirameracetat) (Coyle et al., 2007; O'Connor et al., 2008). Daraus kann sicherlich nicht geschlossen werden, dass Rebif und Betaferon gleich wirksam sind. Da sie allerdings auch im klinischen Alltag als

gleichwertig angewandt werden, sind wir davon ausgegangen, dass auch die Wirksamkeit auf die Proteinexpression als gleichwertig gesehen werden darf. Das niedrig dosierte IFN beta-1a Präparat Avonex (30 µg, einmal wöchentlich, i.m.) ist in seiner Wirksamkeit sowohl Betaferon als auch Rebif unterlegen (Durelli et al., 2002; Panitch et al., 2002; Panitch et al., 2005; Barbero et al., 2006), sodass keine Patienten, die eine Avonex-Therapie erhielten, in die Studie aufgenommen wurden.

Mittels Multipler Regression wurde in einem ersten Schritt ein möglicher Einfluss der Dauer einer Interferon beta-Therapie auf die Proteinexpression von FADD, TRADD und TRAF2 untersucht. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte dabei nicht gefunden werden, sodass ein Einfluss der Dauer der Interferon- beta -Therapie nicht nachzuweisen war. Interessanter scheint allerdings der Vergleich der Proteinexpressionen zwischen therapierten und untherapierten Patienten, um einen möglichen Einfluss einer Interferontherapie auf die Proteinexpression der zu untersuchenden Proteine zu detektieren. Die Korrelationsprüfungen ergaben keine signifikanten Unterschiede der Gruppen in Bezug auf Krankheitsaktivität und -dauer sowie Alter der Patienten (siehe Kapitel 4.2.1).

In der deskriptiven Statistik zeigte sich für die Patienten, die länger als 15 Monate mit Interferon beta therapiert waren, für alle Parameter im Durchschnitt eine geringere mittlere Expression als für die untherapierten. Im Weiteren erfolgte daher noch einmal ein Vergleich aller vier Gruppen, der generell Hinweise auf Unterschiede in den Proteinexpressionen von TRADD und TRAF2 in CD19 sowie von TRADD in CD3 ergab. Im paarweisen Vergleich aller vier Gruppen konnten diese Hinweise auf Unterschiede in der Expression von TRADD in CD3<sup>+</sup> Lymphozyten sowie von TRADD und TRAF2 in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten zwischen den Gruppen der Untherapierten und der Gruppe der länger als 15 Monate mit Interferon Therapierten bestätigt werden. Des Weiteren fand sich neben einem Unterschied zwischen Untherapierten und den länger als 15 Monaten Therapierten wie zuvor schon beschrieben der Unterschied zwischen Gesunden und Untherapierten für die Expression von TRADD in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer zunächst erhöhten Expression bei Kranken und dann im Rahmen der Interferontherapie Normalisierung der Expressionen (kein Unterschied zwischen Gesunden und länger als 15 Monaten therapierten). Des Weiteren

ist es mit der Vorstellung, dass bei RRMS Patienten eine vermehrte Aktivierung der proinflammatorischen Signaltransduktionswege vorliegt und eine resistenter Apoptose in B und T Zellen bei MS Patienten zu finden ist, vereinbar. Zudem ist bekannt, dass Betainterferone zu einer Induktion von Apoptose in peripheren Immunzellen führen (Gniadek et al., 2003). Ein Einfluss der Interferontherapie auf die Expression der untersuchten Parameter ist daher denkbar, insbesondere, da in einer früheren Arbeit unserer Forschungsgruppe gezeigt werden konnte, dass Interferon beta-1a die Expression von TNFR1 aktiviert, aber die Expression des TNFR2s vermindert (Reuss et al., 2009), was wiederum für eine Verschiebung der Signaltransduktion in Richtung Apoptosewege spricht. Eine verminderte Expression von TRAF2 und TRADD nach einer Interferontherapie wäre gut mit einer Steigerung der entzündlichen Aktivität bei MS-Patienten vom schubförmig remittierenden Typ und therapiebedingter Normalisierung vereinbar, obwohl es für TRAF2 keinen signifikanten Unterschied zwischen Gesunden und Untherapierten gab, waren die Expressionen im Mittelwert in der deskriptiven Statistik erhöht gewesen. Hier könnte auch ein Wirkungsmechanismus der Interferone zu finden sein.

Untermauert werden diese Vermutungen durch eine Arbeit der Gruppe um Sharief et al., 2002, die zeigten, dass die Interferon beta Therapie in vitro eine Verminderung der Expression von Survivin, einem antiapoptotischen Protein, in T-Lymphozyten bewirkt und somit eine vermehrte Aktivierung der Apoptose zulässt. Des Weiteren ist mittlerweile bekannt, dass TRAIL (TNF-related apoptosis ligand), das Zellen für Apoptose empfänglicher macht, als Marker für die Ansprechbarkeit einer Interferon beta Therapie dienen kann (Zula et al., 2011). TRAIL ist ein weiteres Mitglied der TNF Superfamilie und Interaktionen mit den anderen Signaltransduktionsparametern der TNF Familie sind gut vorstellbar.

### 4.3 Ausblicke

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Patientenstudie stellt lediglich ein Pilotprojekt dar. Mit dem neu etablierten durchflusszytometrischen Protokoll sind weitere Studien möglich und bereits in der Forschungsgruppe der Neurologischen Klinik Gießen geplant bzw. werden bereits durchgeführt.

Ansätze sind dabei insbesondere das Verhalten der Proteine im akuten Schub und auch unter B-Zell-beeinflussenden Therapien zu untersuchen.

Von Interesse wäre zum anderen aber auch, wie oben bereits erwähnt, zu analysieren inwiefern eine Koexpression von TRADD und LMP1 in den B-Lymphozyten von MS-Patienten besteht, um eine mögliche kausale Rolle des TRADD weiter zu untersuchen.

Weiterhin könnte bei keinem wesentlichen Unterschied der Kollektive hinsichtlich der Klinik TRADD als Surrogatmarker der subklinischen Krankheitsaktivität und Therapieeffektivität dienen. In diesem Zusammenhang wäre wie bereits oben erwähnt eine Korrelation zwischen im Vergleich mit der Klinik sensitiveren MRT- und Laborparametern wie TRADD interessant.

## **5. Zusammenfassung**

Die komplexe Rolle von TNF- $\alpha$  in der Pathogenese der Multiplen Sklerose zeigte sich insbesondere in klinischen Studien mit TNF- $\alpha$ -Inhibitoren (Lenercept), die entgegen der Erwartungen zu einer Exazerbation des Krankheitsverlaufes führten. Aufbauend auf vorhergehenden Arbeiten unserer Forschungsgruppe wurde zur Detektion der intrazellulären Proteine FADD, TRAF2 und TRADD, die in der TNF-Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle spielen, in dieser Arbeit eine durchflusszytometrische Methode entwickelt. In einer anschließend durchgeführten Querschnittstudie zeigte sich ein Hinweis auf einen Unterschied im Sinne einer Erhöhung der Proteinexpression von TRADD in CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten bei untherapierten an schubförmiger MS erkrankten Patientinnen im Vergleich zu gesunden Probandinnen. Dieses Ergebnis unterstützt die Vorstellung, dass B-Lymphozyten in der Pathogenese der schubförmigen MS eine wichtige Rolle spielen, eine vermehrte Expression an TRADD in B-Lymphozyten ist mit einer vermehrten Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen vereinbar, was zur Vorstellung einer gestörten bzw. resistenten Apoptose im Rahmen der schubförmigen MS passt. Des Weiteren fanden sich Hinweise auf einen reduzierenden Einfluss einer Therapie mit Interferon beta auf die Expression der untersuchten Parameter, insbesondere von TRADD in CD3<sup>+</sup> und C19<sup>+</sup> Lymphozyten sowie von TRAF2 in CD19<sup>+</sup> Lymphozyten. Dies entspricht am ehesten einer therapiebedingt verminderten (anfänglich erhöhten) Entzündungsaktivität bei Patienten mit schubförmiger MS ohne klinisch akute Schubaktivität und ist vereinbar mit der bekannten Eigenschaft der Apoptoseinduktion der Betainterferone. Spekulativ, allerdings sehr gut vereinbar ist dieses Ergebnis zudem mit der Hypothese einer EBV-assoziierten Genese der MS, wobei ein kausaler Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht belegt werden kann. EBV maskiert über die Bindung von LMP1 an TRADD die proapoptischen Eigenschaften von TRADD und reguliert positiv die Proliferation und das Überleben der Zelle. So könnte die Interaktion zwischen LMP1 und TRADD eventuell eine molekulare Grundlage einer möglicherweise vorliegenden kausalen Verknüpfung beider Krankheiten darstellen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle der TNF Signaltransduktionskaskade in der Pathogenese der MS aufzuklären. Interessant wäre die Proteinexpressionen im akuten Schub aber auch eine Koexpression von LMP1 und TRADD in Leukozyten zu untersuchen.

### Summary

The complex role played by TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of Multiple Sclerosis was particularly manifest in clinical studies conducted with TNF- $\alpha$ -inhibitors (Lenercept), which contrary to expectations led to an exacerbation in the development of the disease. Based on studies previously conducted by our research group, a flow cytometric method was developed as part of this study in order to detect the intracellular proteins FADD, TRAF2 and TRADD, which play a significant part in the TNF signalling cascade. A cross-sectional study conducted thereafter revealed indication of a difference manifest in increased protein expression of TRADD in CD19<sup>+</sup> B-lymphocytes among female patients who had not undergone therapy and who were suffering from relapsing forms of MS in comparison to healthy test subjects. This result supports the perception that B-lymphocytes play an important role in the pathogenesis of relapsing MS, and that increased expression of TRADD in B-lymphocytes is consistent with enhanced activation of pro-inflammatory signalling pathways, which matches the perception of a disturbed, i.e. resistant apoptosis within the framework of relapsing MS. There were also indications for a reductive effect of therapy with Interferon beta on the expression of various analysed parameters, in particular on TRADD in CD3<sup>+</sup> and C19<sup>+</sup> lymphocytes and on TRAF2 in CD19<sup>+</sup> lymphocytes. This best matches a therapy-induced, reduced (initially increased) inflammation activity in patients with relapsing MS without any clinical relapsing activity and is consistent with the known property of apoptosis induction by beta interferon.

Although speculative, this result is also very consistent with the hypothesis of an EBV-associated genesis of MS, whereby the results of this study are unable to confirm any causal connection. By bonding LMP1 with TRADD, EBV masks the pro-apoptotic properties of TRADD and positively regulates the proliferation and survival of the cells. Hence, the interaction between LMP1 and TRADD could present a molecular basis for the possible causal link between these two diseases.

Further studies are necessary in order to clarify the role of the TNF signalling cascade in the pathogenesis of MS. It would be interesting to analyse protein expression within an ongoing relapse, but also a co-expression of LMP1 and TRADD in leucocytes.

## **6. Literaturverzeichnis**

- ADAMS CWM, POSTON RN, BUK SJ (1989) Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 92: 291-306
- AGGARWAL BB, SCHWARZ L, HOGAN ME, RANDO RF (1996) Triple helixforming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res* 56: 5156-5164
- ALGECIRAS-SCHIMNICH A, SHEN L, BARNHART BC ET AL. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell Biol.* 22: 207-220
- ALLEN IV, KIRK J (1997) The anatomical and molecular pathology of multiple sclerosis. In Russel WC (ed.) *Molecular biology of multiple sclerosis*, 9-22. John Wiley & Sons
- ALOISI F, PUJOL-BORELL R (2006) Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 6: 205-17
- ALOTAIBI S, KENNEDY J, TELLIER R, STEPHENS D, BANWELL B (2004) Epstein Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 291: 1875-1879.
- ANDERSSON PB, GOODKIN E (1998) Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review *J Neurol Sci*, 160:16-25
- ANTONETTI F, FINOCCHIARO O, MASCIA M, TERLIZZESE MG, JABER A (2002) A comparison of the biologic activity of the two recombinant IFN-beta preparations used in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Cytokine Res* 22: 1181-4.
- ARNASON B ET AL. (1995) The role of cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 45 (6):54-55
- ARNETT HA, MASON J, MARINO M, SUZUKI K, MATSUSHIMA GK, TING JPY (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocytes progenitors and remyelination. *Nature neuroscience* 4 (11): 1116 -1122.
- ASCHERIO A, MUNGER KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection, *Ann Neurol*, 61(4): 288-99
- AU PJ UND YEH WC (2007) Physiological Roles and Mechanisms of Signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol* 597: 32-47.

- AUSTIN EB, MCINTOSH Y (2000) Anti-D quantification by flow cytometry: a comparison of five methods. *Transfusion*, 40 (1): 77-83.
- BAGERT BA (2009) Epstein-Barr Virus in multiple sclerosis. *Curr Neurol. Neurosci Rep* 9(5): 405-10.
- BAGERT BA (2009) Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 9(5): 405-10.
- BAKER D, BUTLER D, SCALLON BJ, O'NEIL JK, TURK JL, FELDMANN M (1994) Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using miniclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur J Immunol* 24: 2040-2048
- BARANAZINI SE AND HAUSER SL (2002) Large-scale gene expression studies and the challenge of multiple sclerosis. *Genome Biology* 3(10): reviews 1027.1-1027.5
- BARBERO P, BERGUI M, VERSINO E ET AL. and the INCOMIN Trial study group (2006) Every other day interferon-beta 1b versus once weekly interferon beta 1a for multiple sclerosis (INCOMIN TRIAL)II: analysis of MRI responses to treatment and correlation with Nab. *Mult Scler* 12: 72-6.
- BARKER CF AND BILLINGHAM RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25, 1-54
- BARNETT MH, PRINEAS JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55: 458-468
- BARNHART BC, ALAPPAT EC AND PETER ME (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15: 185-193
- BAUD V, LIU ZG, BENETT B ET AL. (1999) Signaling of proinflammatory cytokines: Oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 13(10): 1297-1308
- BAUER R (2003) Zellgebundenes ICAM-1 auf Leukozyten im Blut bei Patienten mit schubförmigremittierender Multipler Sklerose – Natürlicher Verlauf und Einfluss einer Therapie mit Interferon-β-1b. Dissertation Universität Giessen.
- BENOIST C, MATHIS D (1997) Cell death mediators in autoimmune diabetes: no shortage of suspects. *Cell* 89: 1-3

- BIGDA J, BELETSKY I, BRAKEBUSCH C ET AL. (1994) dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med* 180: 445-460
- BISHOP GA (2004) The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Immunology* 4:775- 786
- BITSCH A, SCHUCHARDT J, BUNKOWSKI S ET AL. (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis: correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123: 1174 1183
- BJARTMAR C AND TRAPP BD (2001) Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 14: 271-278
- BLACK RA, RAUCH CT, KOZLOSKY CJ ET AL. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis-factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-733
- BOATRIGT KM, RENATUS M, Scott FL, SPERANDIO S, SHIN H, PEDERSEN IM, Ricci JE, EDRIS WA, SUTHERLIN DP, GREEN DR, SALVESEN GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11: 529–541
- BOLDIN MP, GONCHAROV TM, GOLTSEV YV AND WALLACH D (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803–815
- BREIJ EC, BRINK BP, VEERHUIS R (2008) Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63: 16-25
- BROSNAN CF, CANNELLA B, BATTISTINI L, RAINE CS (1995) Cytokine localisation in multiple sclerosis lesions: Correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 45 (6): S16-21
- BUDDE R, TIETZ S, THOMAS T, REUSS R, OSCHMANN P, BERGHOFF M (2010) mRNA expression of death receptors TNFR1 and FAS in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ectrim* October 15, 2010 URL: [http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT\\_ID=116265&XNSPRA CHE\\_ID=2&XNKONGRESS\\_ID=126&XNMASKEN\\_ID=900](http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=116265&XNSPRA CHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=126&XNMASKEN_ID=900)
- CANNELLA B, RAINES CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37: 424-435
- CHAN A, WEILBACH FX, TOYKA KV, GOLD R (2005) Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 139: 152-158

- CHAN FK AND LEONARDO MJ (2000) A crucial role for p80 TNFR2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30: 652-660
- CHAN FK, CHUN HJ, ZHENG L ET AL. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signalling. *Science* 288: 2351-2354
- CHAN FK, SHISLER J, BIXBY JG, FELICES M, ZHENG L, APPEL M, ORENSTEIN J, MOSS B, LEONARDO MJ (2003) A role for tumor necrosis factor-receptor 2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* 278: 51613-51621
- CHANG L, KARIN M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40
- CHARCOT JM (1868). *Histologie de la sclérose en plaques. Gaz. Hôpital (Paris)* 41:554
- CHEN G AND GOEDDEL DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635
- CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, TEWARI M AND DIXIT VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512
- CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, TEWARI M AND DIXIT VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512
- CHOW S, HEDLEY D, GROM P, MAGARI R, JACOBBERGER JW, SHANKEY TV (2005) Whole blood fixation and permeabilization with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. *Cytometry Part A* 67A: 4-17
- CHOW S, PATEL H, HEDLEY DW (2001) Measurement of MAP Kinase Activation by Flow cytometry using phosphor-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. *Cytometry* 46: 72-78
- CHUNG JY, LU M, YIN Q, WU H (2007) Structural Revelations of the TRAF2 Function in TNF Receptor signalling pathway. *Adv Exp Med Biol* 597: 93-113
- COMI G, FILIPPI M, BARKHOF F ET AL. (2001a) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet*. 2001;357:1576- 82

- COMI G, FILLIPI J, WOLINSKY J (2001b) European /Canadian multicenter, double blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden with relapsing multiple sclerosis. *Ann.Neurol.*49:290-297
- COMPSTON A (1998) Distribution of multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers G, Lassmann H., McDonald WI, Matthews B, WkerleH (Eds.): *McAlpines's multiple sclerosis*. Churchill Livingstone, London, 63- 100
- COTTRELL DA, KREMENCHUTZKY M, RICE GP ET AL. (1999) The natural history of multiple sclerosis: a geographic based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122:625-639
- COYLE PK, BARKHOF F, CHANG P ET AL. (2007) The REGARD trial: safety and immunogenicity from a randomized, assessor-blinded trial of interferon beta-1a and glatiramer acetate in relapsing remitting multiple sclerosis *Mult Scler* 13: (Suppl2) S 270.
- CROSS AH, TROTTER JL, LYONS J (2001) B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 112: 1-14
- CRUCIAN B, DUNNE P, FRIEDMAN H, RAGSDALE R, PROSS S, WIDEN R (1996) Detection of altered T helper 1 and T helper 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis utilizing intracellular cytokine detection by flow cytometry and surface marker analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:411-6.
- CURSIEFEN S, MÄURER M (2007) Diagnostik und Therapie der MS- Ein Update. *Der Neurologe und Psychiater*. 4: 32-36
- DEAN G, KURTZKE JF (1971) On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa, *Br Med J*, ii, 725-729
- DECLERCQ W, DENECKER G, FIERS W, VANDENABEELE P (1998) Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J.Immunol.* 161: 390-399
- DELORENZE GN, MUNGER KL, LENNETTE ET, ORENTREICH N, VOGELMANN JH, ASCHERIO A (2006) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long term follow-up. *Arch Neurol* 63: 839-44

- DEMPSEY PW, DOYLE SE, HE JQ, CHENG G (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 193-209
- DEVIN A, COOK A, LIN Y ET AL. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNFR1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12(4): 419-489
- DEVIN A, LIN Y, YAMOKA S ET AL. (2001) The alpha and beta subunits of the I $\kappa$ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol* 21 (12): 3986-3994
- DGN Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2012) DGN/KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Online Version. Stand 17.07.2012. URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030050l\\_S2e\\_Multiple\\_Sklerose\\_Diagnostik\\_Therapie\\_2012-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030050l_S2e_Multiple_Sklerose_Diagnostik_Therapie_2012-07.pdf)
- DOAN JES, WINDMILLER DA, RICHES DWH (2004) Differential Regulation of TNFR1 Signaling: Lipid raft dependency of p42mapk/erk2 activation, but not NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol* 172: 7654-7660
- DONEPUDI M, MAC SWEENEY A, BRIAND C, GRUTTER MG (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11: 543-549
- DUDDY M, BAR-OR A (2006) B-cells in Multiple Sclerosis. *The International MS Journal* 13: 84-90
- DURELLI L, VERDUN E, BARBERO P ET AL. and the independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial study group (2002). results of a 2-year prospective randomized multicentre study (INCOMIN). *Lancet* 359: 1453-60.
- EBERS GC, SADOVNICK AD (1993) The geographic distribution of multiple sclerosis: a review. *Neuroepidemiology* 12: 1-5
- EBERS GC, SADOVNICK AD (1998) Epidemiology. In: Paty DW, Ebers GC (Eds.): *Multiple sclerosis*. F:A Davis, Philadelphia, 5-28
- ECK MJ, SPRANG SR (1989) The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264: 17595-17605
- EVANGELOU N, ESOIRI MM, SMITH S, PALACE J, MATTHEWS PM (2000) Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 47: 391-395

- FERGUSON B, MATYSZAK MK, ESIRI MM., PERRY VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120: 393-399
- FESIK SW (2000) Insights into programmed cell death through structural biology *Cell* 103: 273-282
- FLACHENECKER P, HARTUNG H-P (1996) Krankheitsverlauf und Prognose der Multiplen Sklerose. 1. Teil: Der natürliche Krankheitsverlauf. *Nervenarzt* 67(6): 435-443
- FÖRSTER G (2004) Immunmonitoring bei der Therapie der Multiplen Sklerose mit Interferon beta. Durchflusszytometrische Bestimmungen von Zytokinen und Zytokinrezeptoren. Dissertation Universität Giessen.
- FOTIN-MLECZEK M, HENKLER F, SAMEL D, REICHWEIN M, HAUSSER A, PAMRYD I, SCHEURICH P, SCHMID JA, WAJANT H (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2 induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of Caspase-8. *Journal of Cell Science* 115(13): 2757-2770
- FRANCIOTTA D, SALVETTI M, LOLLI F, ALOISI F (2008) B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7: 852-58
- FRENCH LE, TSCHOPP J (2003) Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. Review. *Cell death and differentiation* 10: 117-123
- FRIESE A, FUGGER L (2005) Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128: 1747-1763
- FRISCHHOLZ C, RIECKMANN P (2006) Praktischer Aspekte der MS-Therapie. *INFO Neurologie & Psychiatrie\_CME spezial* 2/06:1-10
- FROHMANN EM, FILIPPI M, STUVE O, WAXMAN SG, CORBOY J, PHILLIPS JT, LUCCHINETTI C, WILKEN J, KRANDIKAR N, HEMMER B, MONSON N, DE KEYSER J, HARTUNG H, STEINMAN L, OKSENBERG JR, CREE BAC, HAUSER S, RACKE MK (2005) Characterizing the Mechanisms of Progression in Multiple Sclerosis: Evidence and New Hypotheses for Future Directions. *Arch Neurol.* 62: 1345-1356
- FUJINAMI RS AND OLDSTONE MB (1985) Amino acid homology between the encephalogenetic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230: 1043-1045
- GAY D, ESIRI M (1991) Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study. *Brain* 1991

- GAY FW ET AL. (1997) The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis: identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120: 1461-1483
- GENAIN CP, CANNELLA B, HAUSER SL, RAINE CS (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5: 170- 175
- GENAIN CP, HAUSER SL (1997) Autoimmune Demyelinating Diseases of the Central Nervous System. In Keane RW, Hickey WF (eds.) *Immunology of the Nervous System*. Oxford University Press, New York, Oxford.
- GNIADEK P, AKTAS O, WANDINGER KP, BELLMANN-STROBL J, WENGERT O, WEBER A, VON WUSOW P, OBERT HJ, ZIPP F (2003) Systemic IFN beta treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. *J Neuroimmunol* 137: 187-196
- GOLD R, HARTUNG HP, LASSMANN H (1997) T cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with spezialized immune defense meachanisms. *Trends Neurosci.* 20: 399-404
- GRANGER GA, SHACKS SJ, WILLIAMS TW, KOLB WP (1969) Lymphocyte in vitro cytotoxicity. Specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* 221: 1155-1157
- GRECH AP, AMESBURY M, CHAN T ET AL. (2004) TRAF2 differentially reguöates the canonical and noncanonical pathways of NF-κB activation in mature B cells. *Immunity* 21 (5): 629-642
- GRELL M, DOUNI E, WAJANT H ET AL. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 793-802
- GRELL M, SCHEURICH P, MEAGER A, PFIZENMAIER K (1993) TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF) receptors can independently mediate cytolysis. *Lymphokine Cytokine Res* 12: 143-148
- GRELL M, WAJANT H, ZIMMERMANN G, SCHEURICH P (1998) The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 570-575

- GRELL M, ZIMMERMANN G, GOTTFRIED E ET AL. (1999) Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNFR1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J* 18: 3034-3043
- GRIFFITHS I, KLUGMANN M, ANDERSON T, YOOL D, THOMSON C, SCHWAB MH, SCHNEIDER A, ZIMMERMANN F, MCCULLOCH M, NADON N, NAVE KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280: 1610-1613
- GUERDER S, MEYERHOFF J, FLAVELL R (1994). The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* 1, 155-66
- GULIANI F, GOODYER CG, ANTEL JP, YONG VW (2003) Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 171: 368-379
- HAAHR S, HÖLLSBERG P (2006) Multiple sclerosis is linked to Epstein Barr virus infection. *Rev Med. Virol.* 16: 297-310.
- HAAHR S, KOCH-HENRIKSEN N, MOLLER-LARSEN A, ERIKSEN LS, ANDERSEN HM ( 1995) Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein Barr virus infection: a historical prospective study. *Mult Scler* 1: 73-77.
- HAINES J, PERICAK-VANCE M, SEBOUN E, HAUSER S (1996) The multiple sclerosis genetics group; a complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex, *Nature Genet* 13: 469 – 471
- HARRIS JO, FRANKF JA, PATRONAS N, MC FARLIN DE, MCFARLAND HF (1991) Serial gadoliniumenhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for clinical trials and natural history. *Ann Neurol.* 29(5): 548-55.
- HARTUNG H- P (1993) Immune-Mediated Demyelination. *Ann. Neurol* 33: 563-567
- HARTUNG HP (2009) Atacicept bei Multipler Sklerose. Ein neuer B-Lymphozyten-gerichteter Therapieansatz. *Nervenarzt* 80: 1462-1472.
- HARTUNG H-P ET AL. (2002) Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360:2018-2025
- HARTUNG H-P, REINERS K, ARCHELOS JJ et al. (1995): Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 38 (2), 186-193

- HAUSER SL, WAUBANT E, ARNOLD DL, VOLLMER T, ANTEL J, FOX RJ, BAROR A, PANZARA M, SARKAR N, AGARWAL S, LANGER-GOULD A, SMITH CH; HERMES TRIAL GROUP (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358 (7): 676-688
- HEHLGANS T, MANNEL DN (2002) The TNF-TNF receptor system *Biol Chem* 383: 1581- 1585
- HEHLGANS T, PFEFFER K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1-20
- HEIN T, HOPFENMÜLLER W (2000) Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71: 288-294
- HELSON L, GREEN S, CARSWELL E, OLD LJ (1975) Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 258: 731-732
- HEMMER B ET AL. (1997) Identification of high potency microbial and self ligands for human autoreactiv classII-restricted T cell clone. *J Exp Med* 185: 1651-1659
- HEMMER B, ARCHELOS JJ, HARTUNG H-P (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3: 291-301
- HEMMER B, NESSLER S, ZHOU D, KIESEIER B, HARTUNG H-P (2006) Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat. Clin Pract Neurology* 2 (4): 201-211
- HOEFLICH KP, YEH WC, YAO Z ET AL. (1999) Mediation of TNF receptor associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *Oncogene* 18(42): 5814-5820
- HOFMAN FM, HINTON DR, JOHNSON K, MERRILL JE (1989) Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 170: 607-612
- HOHLFELD R, MEINL E, WEBER F, ZIPP F, SCHMIDT S., SOTGLU S., GOEBELS N., VOLTZ R., SPULER S., IGLESIAS A, et al. (1995) The role of autoimmune Tlymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis *Neurology*, 45: 33-38
- HOHLFELD R, WIENDL H (2001) The ups and downs of multiple sclerosis of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol.* 49: 281-284

- HOLLER N, ZARU R, MICHEAU O, THOME M, ATTINGER A, VALITUTTI S, BODMER P, SCHNEIDER P, SEED B, TSCHOPP J (2000) Fas triggers an alternative, Caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1: 489-495
- HÖVELMEYER N, HAO Z, KRANIDIOTI K, KASSIOTIS G, BUCH T, FROMMER F, VON HOCH L, KRAMER D, MINICHELLO L, KOLLIAS G, LASSMANN H, AISMAN A (2005) Apoptosis of Oligodendrocytes via FAS and TNF-R1 is a key event in the Induction of experimental autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 175: 5875-5884.
- HSU H, HONG-BIN S, MING-GUI P, GOEDDEL DV (1996a) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD Interactions define two distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways. *Cell* 84: 299-308
- HSU H, HUANG J, SHU HB, BAICHWAL V, GOEDDEL DV (1996b) TNF dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor 1 signaling complex. *Immunity* 4: 387-396
- HSU H, XIONG J AND GOEDDEL DV (1995) The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504
- INOUE J, ISHIDA T, TSUKAMOTO N, KOBAYASHI N, NAITO A, AZUMA S AND YAMAMOTO T (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 254: 14-24
- JAATTELA M AND TSCHOPP J (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4:416-423
- JACOBS LD, BECK RW, SIMON JH ET AL. (2000) Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000; 343:898-904
- JACOBS LD, COOKFAIR DL, RUDICK RA ET AL. (1996) Intramuscular interferon beta 1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 39:285-94
- JIANG Y, WORONICZ JD, LIU W, GOEDDEL DV (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaing by silencer of death domain. *Science* 288: 543-546
- JUPP OJ, MCFARLANE SM, ANDERSON HM ET AL. (2001) TypeII tumor necrosis factor alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal (JNK) but not

- mitogen activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem J* 359(3): 525-535
- JUREWICZ A, BIDDISON WE, ANTEL JP(1998) MHC class I restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide specific CD8 T lymphocytes. *J.Immunol.* 160: 3056-3059
- KAPOOR R, DAVIES M, BLAKER PA, HALL SM, SMITH KJ (2003) Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration. *Ann Neurol* 53: 174-180
- KARIN M UND LIN A (2002) NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. Review. *Nature Immunology* 3(3): 221-227
- KERSCHENSTEINER M, GALLMEIER E, BEHRENS L, LEAL VV, MISGELD T, KLINKERT WE ET AL. (1999) Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189: 865-870
- KIESER A, KAISER C AND HAMMERSCHMIDT W (1999) LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J* 18: 2511-2521
- KINOUCI K, BROWN G, PASTERNAK G, DONNER DB (1991) Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor- $\alpha$  in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 181(3): 1532-1538
- KISCHKEL FC, LAWRENCE DA, CHUNTHARAPAI A ET AL. (2000) Apo2L/TRAIL dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620
- KNIESEL U, WOLBURG H (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20: 57-76
- KOLLIAS G, KONTOYIANNIS D (2002) Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 13: 315-321
- KONTOYIANNIS D, KOLLIAS G (2000) Fibroblast biology. Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: leading role or chorus line? *Arthritis Res* 2: 342-343
- KORN T, MEUTH SG (2011) Therapieempfehlungen zur Behandlung der Multiplen Sklerose mit Natalizumab und Fingolimod. *Aktuelle Neurologie* 38:267-268.
- KORNEK B, LASSMANN H (2003) Neuropathology of multiple sclerosis – new concepts. *Brain Res Bull* 61: 321-326.

- KRAMMER PH (2000) CD 95's deadly mission in the immune system . Nature 407: 789- 795.
- KRIPPNER-HEIDENREICH A, TÜBING F, BRYDE S, WILLI S, ZIMMERMANN G, SCHEURICH P (2002) Control of Receptor-induced Signaling Complex Formation by the Kinetics of the Ligand/Receptor Interaction J Biol Chem 277: 44155-44163
- KRUEGER A, BAUMANN S, KRAMMER PH, KIRCHHOFF S (2001) FLICE inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. Mol Cell Biol 21: 8247 8254
- KRUTZIK P, NOLAN GP (2003) Intracellular phosphor-protein staining techniques for flow cytometry: Monitoring single cell signaling events. Cytometry Part A 55A: 61-70
- KURODA Y, SHINAMOTO Y (1991) Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. J Neuroimmunol 34: 159-164
- KUROSAKI T (2008) Paradox of B cell-targeted therapies. J Clin Invest. 118(10): 3260-3.
- KURTZKE JF (1980): Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. Acta Neurol Scand 62 (2), 65-80
- KURTZKE JF (1983) Rating neurological impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). Neurology 33:1444-1452
- KURTZKE JF (1993). Epidemiology evidence for multiple sclerosis as an infection. Clin Microbiol Rev 6:382-427
- KURTZKE JF (1995) Epidemiology, One view of current status, Acta Neurol Scand (Suppl), 161: 23 - 33
- KURTZKE JF, BEEBE GW, NORMAN JE JR, ET AL (1979): Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: I. Race, sex and geographic distribution. Neurology 29 (Pt1), 1228-1235
- LAMAN JD, THOMPSON EJ, KAPPOS L (1998) Balancing the Th1/Th2 concept in multiple sclerosis. Immunol Today 19: 489-490.
- LAPPE-SIEFKE C, GOEBBELS S, GRAVEL M, NICKSCH E, LEE J, BRAUN PE, GRIFFITHS IR, NAVE KA (2003) Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. Nat Genet 33: 366-374

- LASSMANN H, RANSOHOFF RM (2004) The CD4Th1 model for multiple sclerosis: a critical (correction of crucial) re-appraisal. *Trends Immunol* 25: 132-137
- LEE SJ, BENVENISTE EN (1999) Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98: 77-88
- LEGLER DF, MICHEAU O, DOUCEY MA, TSCHOPP J, BRON C (2003) Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF  $\kappa$ B activation. *Immunity* 18:655
- LEHMANN PV, SERCARZ EE, FORSTHUBER T, DAYAN CM, GAMMON G (1993) Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T cell repertoire. *Immunol Today* 14: 203-208
- LEUSSINK VL, JUNG S, MERSCHDORF U, TOYKA KV, GOLD R (2001) High Dose Methylprednisolone Therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 58: 91-97
- LINDBERG C, ANDERSEN O, VAHLME A, DALTON M, RUNMARKER B (1991) Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 10: 62-65.
- LININGTON C ET AL. (1988) Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/ oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130: 443-454
- LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501
- LOETSCHER H, STUEBERD; BANNER D, MACKAY F, LESSLAUER W (1993) human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55kDa or 75kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 268: 26350-26357
- LUBLIN FD, REINGOLD SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, *Neurology* 46: 4 907-11
- LUCCHINETTI CF, BRÜCK W, PARISI J ET AL. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol* 47: 707-717

- LUCCHINETTI CF, BRÜCK W, RODRIGUEZ M ET AL. (1996) Distinct patterns of Multiple Sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol.* 6: 259-274
- LUTTMANN W, BRATKE K, KÜPPER M, MARTYRTEK D (2004) *Der Experimentator Immunologie*. 1. Auflage, Elsevier GmbH, München
- MACCHI B, MATTEUCCI C, NOCENTINI U, CALTAGIRONE C, MASTINO A (1999) Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *NeuroReport* 10: 399-402.
- MAIANSKI NA, ROOS D, KUIJPERS (2003) Tumor necrosis factor alpha induces a Caspase independent death pathway in human neutrophils. *Blood* 101: 1987-1995
- MAIMONE D, GREGORY S, ARNASON BGW, REDER AT (1991) Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 32: 67-74
- MALLISON SM, SMITH JP, SCHENKEIN HA, TEW JG (1991) Accumulation of plasmacells in inflamed sites: effects of antigen, non-specific microbial activators, and chronic inflammation. *Infect Immun* 59: 4019-4025
- MARTIN R, MCFARLAND HF (1995) Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis *Crit Rev Clin Lab Sci*, 32: 121-182
- MARTINO G, CONSIGLIOA, FRANCIOTTA DM, CORTI A, FILIPPI M, VANDENBROECK K, SCIACCA FL, COMI G, GRIMALDI LM (1997) Tumor necrosis factor alpha and its receptors in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 152(1): 51-61
- MÄURER M (2011) State of the Art-Multiple Sklerose. *PharmaFokus ZNS* 8: 5-7
- MC FARLAND H AND IFNB-1B SPMS STUDY GROUP (2000) Subcutaneous IFN beta-1 b in secondary progressive multiple sclerosis. 52nd Annual Meeting American Academy Neurology, San Diego
- MC FARLAND HF, MARTIN R (2007) Multiple Sclerosis: a complicated picture of autoimmunity, review, *Nature Immunology* 8(9): 913-919
- MCDERMOTT MF, AKSENTIJEVICH I, GALON J ET AL. (1999) Germline mutations in the extracellular domains of the 55kDa TNF receptor, TNFR1; define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97: 133-144

- MCDONALD W ET AL. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127
- MEDANA IM, GALLIMORE A, OXENIUS A, MARTINIC MM, WEKERLE H, NEUMANN H (2000) MHC class I-restricted killing of neurons by virus specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *European Journal of Immunology* 30(12): 3623-3633
- MEINL E (1999) Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis, *Curr Pin Neurol*, 12: 303-307
- MELDVEDEV AE, SUNDAN A; ESPEVIK T (1994) Involvement of th tumor necrosis factorreceptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities. *Eur J mmunol* 24: 2842-2849
- MICHEAU O, TSCHOPP J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptois via two sequential signalling complexes. *Cell* 114 (2): 181-190
- MILLER JR (2004) The importance of Early Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Journal of Managed Care Pharmacy*; 10 (3) S4-S11
- MONTAG DT, LOTZE MT (2006) Successful simultaneous measurement of cell membrane and cytokine induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Meth* 313 (1-2): 48-60
- MORGAN M, THORBURN J, PANDOLFI PP, THORBURN A (2002) Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J Cell Biol* 157: 975-984
- MSTCG (2004) Escalating immunotherapy of multiple sclerosis- new aspects and practical application. *J Neurol* 251: 1329-1339
- MSTKG (2006) Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose- Aktuelle Therapieempfehlungen. *Der Nervenarzt* 77: 1506-1518
- MUMMENTHALER M, MATTLE H (2006) *Kurlehrbuch Neurologie*. 1.Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 217-223
- NAVIKAS V, LINK H (1996) Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 45: 322-333
- NILLER HH, WOLF H, MINAROVITS J (2008) Regulation and dysregulation of Epstein Barr virus latency; implications fort he development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 41: 298-328.

- NITSCH R, POHL EE, SMORODCHENK A, INFANTE-DUARTE C, AKTAS O, ZIPP F (2004) Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J Neurosci* 24: 2458-2464
- NOMURA LE, WALKER JM, MAECKER HT (2000) Optimization of whole blood antigen- specific cytokine assays for CD4+Tcells. *Cytometry*, 40: 60-68.
- NORSWORTHY JH ET AL. (2000) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952
- O'CONNOR P (2003) The effects of intramuscular interferon beta-1a in patients at high risk of development of multiple sclerosis: a post hoc analysis of data from CHAMPS. *Clin Ther.* 25: 2865-74
- O'CONNOR P, ARNASON BGW, COMI G ET AL. (2008) Inteferon-beta 1b 500µg, interferon-beta 1b 250 µg and glatiramer acetate: primary outcomes of the Betaferon/ Betaseron Efficacy yielding outcomes of a new dose study. AAN, Late Breaker presentation S004.
- OKSARANTA O, TARVONEN S, ILONEN J, POIKONEN K, REUNANEN M, PANELIUS M, SALONEN R (1996) T-cell subpopulations in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology* 47. 1542-1545
- OKSENBERG JR, HAUSER S (1997) New insights into the immunogenetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 10: 181 – 185
- OLERUP O, HILLERT J (1991) HLA class II –associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38:1-15
- OLSSON T (1995a) Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 144. 245-68.
- OLSSON T (1995b) Cytokine producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45 (6): S11-15
- PANITCH H, GOODIN DS, FRANCIS G ET AL. (2002) Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: the EVIDENCE trial. *Neurology* 59: 1496-506.
- PANITCH H, GOODIN DS, FRANCIS G ET AL. (2005) Benefit of high dose, high frequency interferon beta 1a in relapsing remitting multiple sclerosis are sustained to 16 months: Final comparative results of the EVIDENCE trial. *J Neurol Sci* 239: 67-74.

- PENDER MP (1998) Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet* 351: 978–981.
- PESCHON JJ, SLACK JL, REDDY P ET AL (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284
- PIGUET PF, VESIN C, GUO J, DONATI Y, BARAZZONE C (1998) TNF-induced enterocyte apoptosis in mice is mediated by th TNFR1 and doesnot require p53. *Eur J Immunol* 28: 3499-3505
- POECK K, HACKE W (2006) *Neurologie*. 12.überarbeitete Auflage, Springer, Berlin 490-504
- POHL D, KRONE B, ROTASY K, KAHLER E, LEHNERT M, WAGNER HJ, GARTNER J; HANENFELD F (2006) High seroprevalence of Epstein Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology* 67: 2063-2065.
- POLMAN CH ET AL. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 58(6): 840-846
- POLMAN CH, REINGOLD SC, BANWELL B, CLANET M, COHEN JA, FILIPPO M, FUJIHARA K, HAVRDOVA E, HUTCHINSON M, KAPPOS L, LUBLIN FD, MONTALBAN X, O’CONNOR P, SANDBERG-WOLLHEIM M, THOMPSON AJ, WAUBANT E, WEINSHENKER B, WOLLINSKY JS (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis:2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 69: 292-302
- POSER CM ET AL. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis. Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13: 227-230
- POSER S, RITTER G (1980) *Multiple Sklerose in Forschung, Klinik und Praxis*. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- PRINEAS JW, WRIGHT RG (1978) Macrophages, lymphocytes and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest*38: 409-421
- PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Inteferon-beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) STUDY GROUP. Randomised double-blind placebo of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 352: 1498 1504
- RAMAGOPALAN SV, VALDAR W, DYMENT DA, DELUCA GC, YEE IM, GIOVANNONI G, EBERS GC, SADOVNICK AD for the Canadian Study

- Group 2009) Association of Infectious Mononucleosis with Multiple Sclerosis. *Neuroepidemiology* 32: 257-262.
- REINHARD C, SHAMOON B, SHYAMALA V ET AL. (1997) Tumor necrosis factor alpha induced activation of c-junN-terminal kinase (JNK) is mediated by TRAF2. *EMBO* 16(5): 1080-1092
- REUSS R, POHLE S, RETZLAFF K, HEMBERGER J, OSCHMANN P (2009) Interferon beta-1a induces tumor necrosis factor receptor 1 but decreases tumor necrosis factorreceptor 2 leukocyte mRNA levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuro immunomodulation*. 16(3):171-6.
- REUSS R, MIRAU A, MISTARZ M, RETZLAFF K, POHLE S, OSCHMANN P (2007) TRAF2 gene expression is clearly elevated in RR-MS. *Ectrimis 2007 Prague*.
- ROBBINS DS, SHIRAZI Y, DRYSDALE BE, LIEBERMANN A, SHIN HS, SHIN ML (1987) Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol* 139: 2593-2597
- RODRIGUEZ M, LENNON VA (1990) Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous sytem. *Ann Neurol* 27: 12-17
- ROTHER M, WONG SC, HENZEL WJ ET AL. (1994) a novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78 (4): 681-692
- ROY N, DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVSEN GS REEDJC (1997)The c IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO* 16: 6914-6925
- RUDDLE NH, BERGMAN CM, MCGRATH KM ET AL. (1990) An antibody to lymphotoxin nd tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 172: 1193-1200
- RÜHLMANN ME (2011) Genexpression verschiedener an der Signaltransduktion der TNF Rezeptoren beteiligter Komponenten bei Patienten mit verschiedenen Verlaufsformen der multiplen Sklerose Etablierung einer quantitativen RT-PCR zur Analyse der Genexpression von TRADD und FADD in humanen Leukozyten. URN:nbn.de:hebis:26-opus-85741 URL: [http:// geb.uni giessen.de/volltexte/2012/8574/](http://geb.uni-giessen.de/volltexte/2012/8574/)
- SACHS, HEDDERICH (2006) *Angewandte Statistik*. Springer.

- SADOVNICK AD (1981), MACLEOD PMJ (1981) The familial nature of multiple sclerosis: empiric recurrence risks for first-, second- and third-degree relatives of patients. *Neurology* 31:1039-1041
- SADOVNICK AD, BAIRD PA, WARD RH ET AL. (1988) Multiple sclerosis: Updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29 (3), 533-541
- SARIEF MK, SEMRA YK (2012) Down regulation of surviving expression in T lymphocytes after Interferon beta-1 a treatment in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59: 1115-1121
- SCHINSKE KA, NYATI S, KHAN AP, WILLIAMS TM, JOHNSON TD, ROSS BD, TOMAS RP, REHEMTULLA A (2011) A novel kinase inhibitor of FADD phosphorylation chemosensitizes through the inhibition of NF- $\kappa$ B. *Mol Cancer Ther* 10(10) 1807-17.
- SCHMIDT RM, HOFMANN F (2002) Multiple Sklerose. 3. überarbeitete Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena
- SCHNEIDER F (2005) Die Rolle des TRADD Adapterproteins in der Signaltransduktion des zellulären TNF-Rezeptors und des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr-Virus. Dissertation LMU München. URN: nbn:de:bvb:19-42527. URL: <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/4252/>
- SCHNEIDER F, NEUGEBAUER J, GRIESE J, LIEFOLD N, KUTZ H, BRISENO C, KIESER A (2008) The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signalling by masking its apoptotic activity. *PloS Biol.* 6(1): 0086-0098.
- SCHNEIDER-BRACHERT W, TCHIKOV V, NEUMEYER I ET AL.(2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* 21: 415-428
- SEDER RA, PAUL WE (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev. Immunol.* 17: 635-673
- SEGAL BM, CROSS AH (2000) Fas(t) track to apoptosis in MS: TNF receptors may suppress or potentiate CNS demyelination, *Neurology* 55: 906–907.
- SEIDI OA, SHARIEF MK (2002) The expression of apoptosis-regulatory proteins in B lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 130 (1-2): 202-10
- SELMAJ K, RAINE CS, CROSS AH (1991) Anti-tumor necrosis factor abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 30: 694-700

- SELMAJ KW, FAROQ M, NORTON WT, RAINE CS, BROSNAN CF (1990)  
Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokine: a primary role of tumor necrosis factor. *J Immunol* 144: 129-135
- SELMAJ KW, RAINE CS (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23: 339-346
- SERAFINI B, ROSICARELLI B, FRANCIOTTA D ET AL. (2007) Dysregulated EBV infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204: 2899-912
- SERAFINI B, ROSICARELLI B, MAGLIOZZI R, STIGLIANO E, ALOISI F (2004)  
Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathol* 14: 164-74
- SHARIEF MK, HENTGES R (1991) Association between tumor necrosis factor-alpha and disease and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325: 467-472
- SHAULIAN E AND KARIN M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E 131-136
- SMITH CA, FARRAH T, GOODWIN RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins. Activation, costimulation and death. *Cell* 76: 959-9562
- SOLOMON KA, PESTI N, WU G, NEWTON RC (1999) Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J Immunol* 163: 4105-4108
- SOMMER N, ZIPP F, RÖSENER M, DICHGANS J, MARTIN R (1996) Influence of genetic factors on multiple sclerosis, *Nervenarzt* 67: 457-464
- STANGER BZ, LEDER P, LEE TH, KIM E, SEED B (1995) RIP. a novel protein containing a death domain that interacts with FAS/APO-1(CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81: 513-523
- STEINMAN L (2001b) Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 194: F27-30
- STEINMAN L, (2001a) Multiple sclerosis: a two stage disease. The pathogenesis of multiple sclerosis consists of an inflammatory and neurodegenerative phase. Better understanding of these stages has aided the development of specific therapeutic targets. *Nature Immunology* 2 (9): 762-764

- STONE, LA ET AL. (1995) Blood brain barrier disruption on contrast-enhanced MRI in patients with mild relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship to course, gender and age, *Neurology* 45, 1122-1126
- TARTALGIA LA, AYRES TM, WONG GH, GOEDDEL DV (1993) A novel domain within the 55kDa TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853
- THACKER EL, MIRAZAEI F, ASCHERIO A (2006) Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: meta-analysis. *Ann Neurol* 59: 499–503.
- THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP (1993) Interferon beta 1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 43:655-61
- THE LENERCEPT MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP AND THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA MS/MRI ANALYSIS GROUP (1999) TNF Neutralization in MS: Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53: 457-465
- THOME M UND TSCHOPP J (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1: 50-58
- TRACEY KJ, CERAMI A (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annual Review of Cell Biology* 9: 317-343
- TRAPP BD, PETERSON J, RANSOHOFF RM, RUDICK RA, MÖRK S, BO L (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 338: 278-285
- TRAUGOTT U (1987) Multiple sclerosis: relevance of class I and class II MHC expressing cells to lesion development *J Neuroimmunol* 16. 283-302
- VARFOLOMEEV EE, SCHUCHMANN M, LURIA V ET AL. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9: 267–276
- VASS K, LASSMANN H (1990) Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol* 137: 789-800
- VISSERLH, VAN DER ZANDE A (2011) Reasons patients give to use or not to use immunomodulating agents for multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 18(11): 1343-1349
- WAJANT H, HENKER F, SCHEURICH P (2001) The TNF-receptor-associated factor family. Scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13: 389-400

- WAJANT H, PFILZENMALER K AND SCHEURICH P (2003) Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death and Differentiation* 10: 45-65
- WALLLACH D, ENGELMANN H, NOPHAR Y ET AL. (1991) Soluble and cell surface factors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl.* 35: 51-57
- WANDINGER K, JABS W, SIEKHAUS A, BUBEL S, TRILLENBERG P, WAGNER H ET AL (2000) Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 55: 178–184.
- WANG CY, MAYO MW, KORNELUK RG, GOEDEL DV, BALDWIN AS Jr (1998) NF-kappaB antiapoptosis induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP-1 and c-IAP-2 to suppress Caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683
- WEINSHENKER BG (1999) Therapeutic plasma exchange for acute inflammatory demyelinating syndromes of the central nervous system. *J Clin Apher.* 14(3): 144-148
- WEISS T, GRELL M, HESSABI B, BOURTEELES, MÜLLER G, SCHEURICH P, WAJANT H (1997) Enhancement of TNF receptor p60- mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor associated factor-2 binding site. *J Immunol* 158: 2398-2404
- WESEMANN DR, QIN H, KOKORINA N, BENVENISTE EN (2004) TRADD interacts with STAT1-alpha and influences interferon-gamma signaling. *Nat Immunol* 5: 199 207
- WIENDL H, HOHLFELD R (2002) Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs* 16, 183-200
- WIENDL H, KLOTZ L (2012) Was gibt es Neues bei der Multiplen Sklerose? *Multiple Sclerosis Update, Akt Neurol* 39: 116-126
- WILLIS SN, STADELMANN C, RODIG SJ, CARON T, GATTENLOEHNER S, MALLOZZI SS (2009) Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 132(Pt 12): 3318-28.
- WUCHERPFENNIG KW, STRUMINGER JL (1995) Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 80: 695 – 705
- YEH WC, POMPA JL, MCCURRACH ME ET AL. (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279: 1954–1958

- YEH WC, SHAHINIAN A, SPEISER D ET AL. (1997) Early lethality, functional NF kappaB activation and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2 deficient mice. *Immunity* 7(5): 715-725
- YUASA T, OHNO S, KEHRL JH ET AL. (1998) Tumor necrosis factor signalling to stress activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while the receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MEKK6 and p38. *J Biol Chem* 163(6): 22681-22692
- ZAADSTRA BM, CHORUS AMJ, VAN BUUREM S, KALSBECK H, NOORT JM (2008) Selective association of multiple sclerosis with infectious mononucleosis. *Multiple Sclerosis* 14:307-313.
- ZHANG J, CADO D, CHEN A ET AL. (1998) Fas-mediated apoptosis and activation induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392: 296–300
- ZHENG L, BIDERE DS, CUBRE A, ORENSTEIN J, CHAN F, LENARDO M (2006) Competitive control of independent programs of Tumor necrosis factor receptor induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol* 26 (9): 3505-3513
- ZIPP F, WEIL JG, EINHAUPL KM (1999) No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination, *Nat Med* 5, 9: 964-5
- ZULA JA, GREEN HC, RANSOHOFF RM, RUDICK RA, STARK GR, VAN BOXEL-DEZAIRE AHH (2011) The role of cell type specific responses in IFN beta therapy of multiple sclerosis. *PNAS* 108(49): 19689- 19694

## 7. Anhang

### 7.1 Graphiken

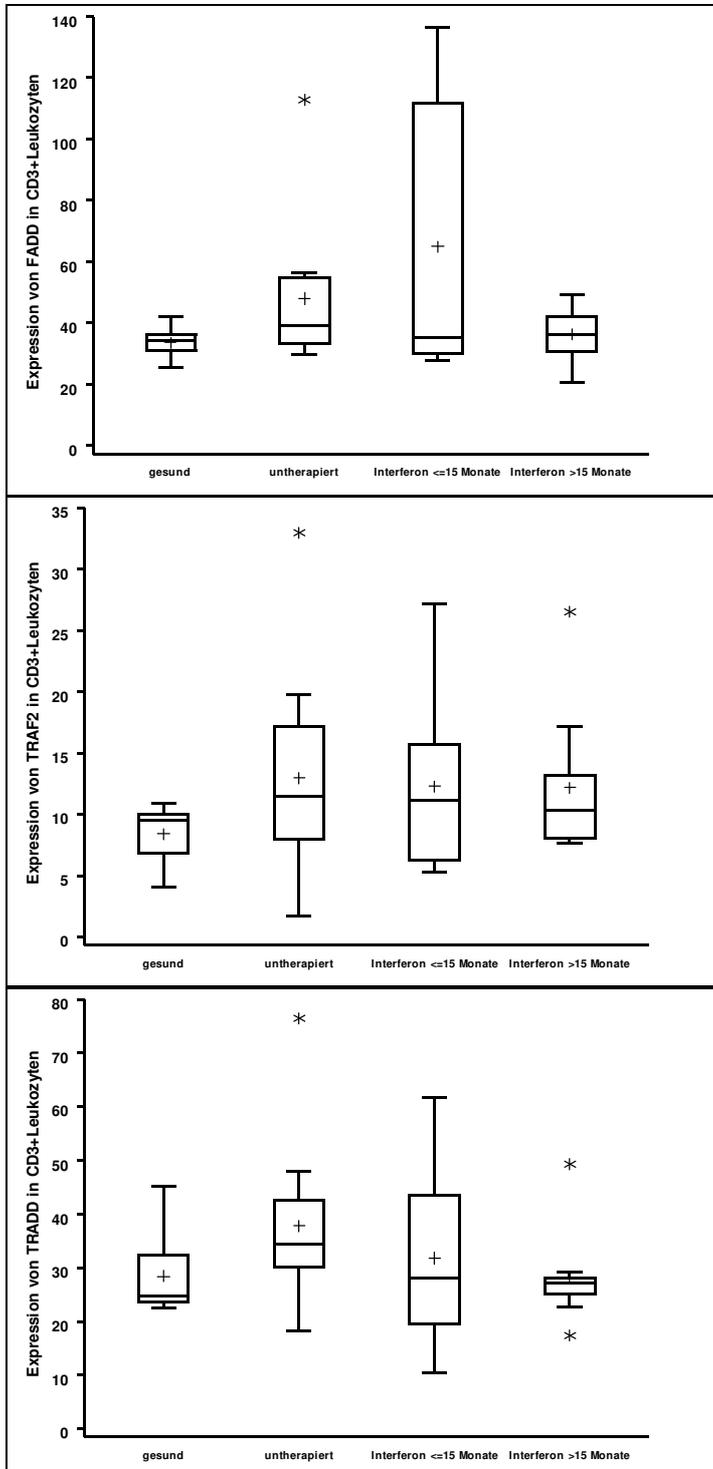


Abb. 1-3: Box Plots für die Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3 Leukozyten im Vergleich der vier zu untersuchenden Gruppen (untherapierte MS Patientinnen, Gesunde Probandinnen, <15 Monate Therapierte, >15 Monate Therapierte mit Interferon Beta).

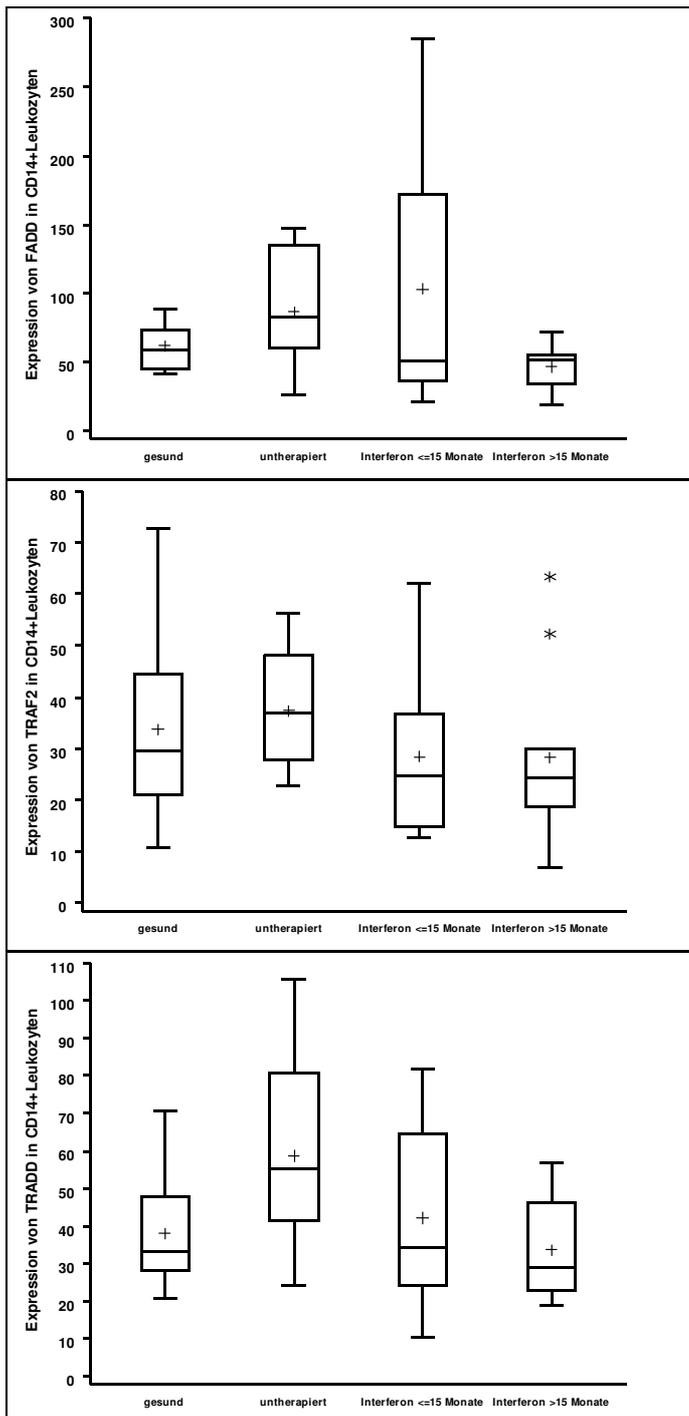
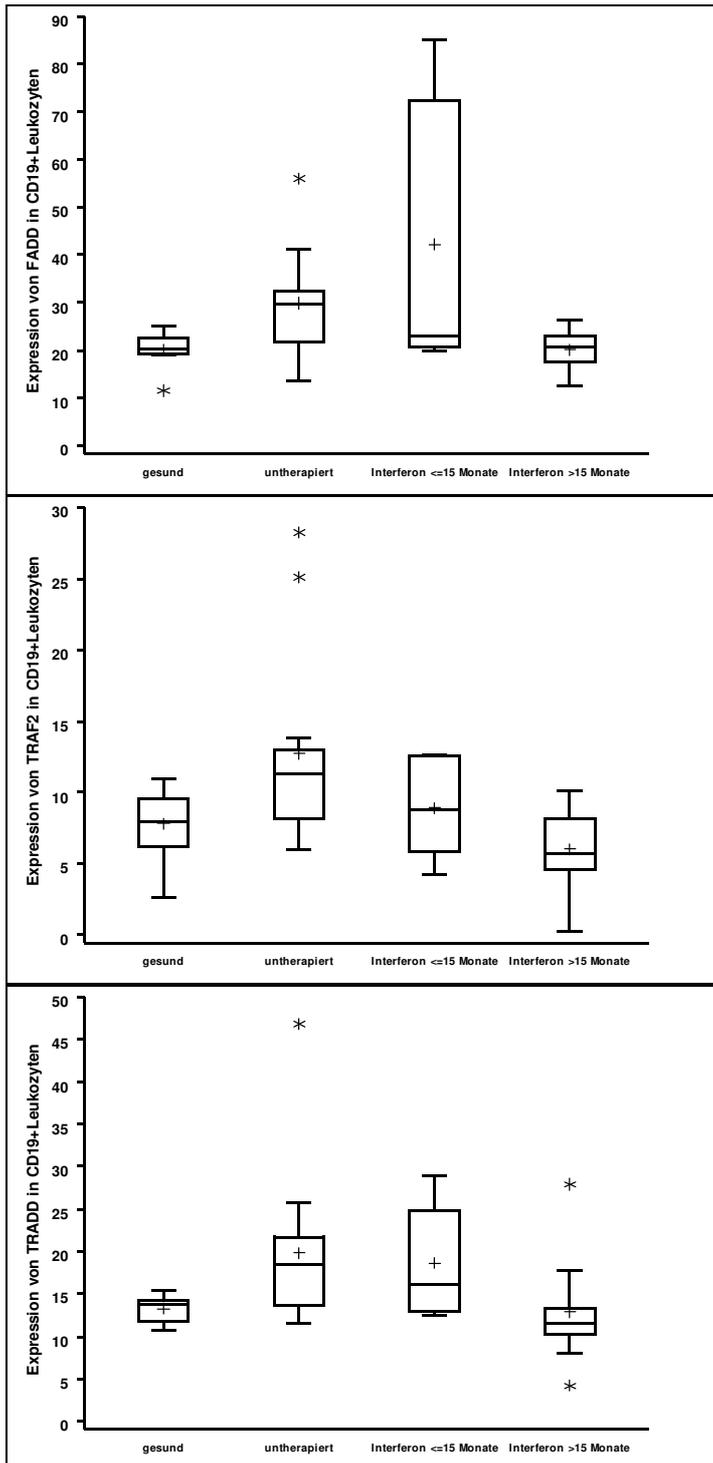


Abb. 4-6: Box Plots für die Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD14Leukozyten im Vergleich der vier zu untersuchenden Gruppen (untherapierte MS Patientinnen, Gesunde Probandinnen, <15 Monate Therapierte, >15Monate Therapierte mit Interferon Beta).



**Abb. 7-9: Box Plots für die Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD19 Leukozyten im Vergleich der vier zu untersuchenden Gruppen (untherapierte MS Patientinnen, Gesunde Probandinnen, <15 Monate Therapierte, >15 Monate Therapierte mit Interferon Beta).**

## Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots

Korrelation des EDSS mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3, CD14 und CD19 Leukozyten:

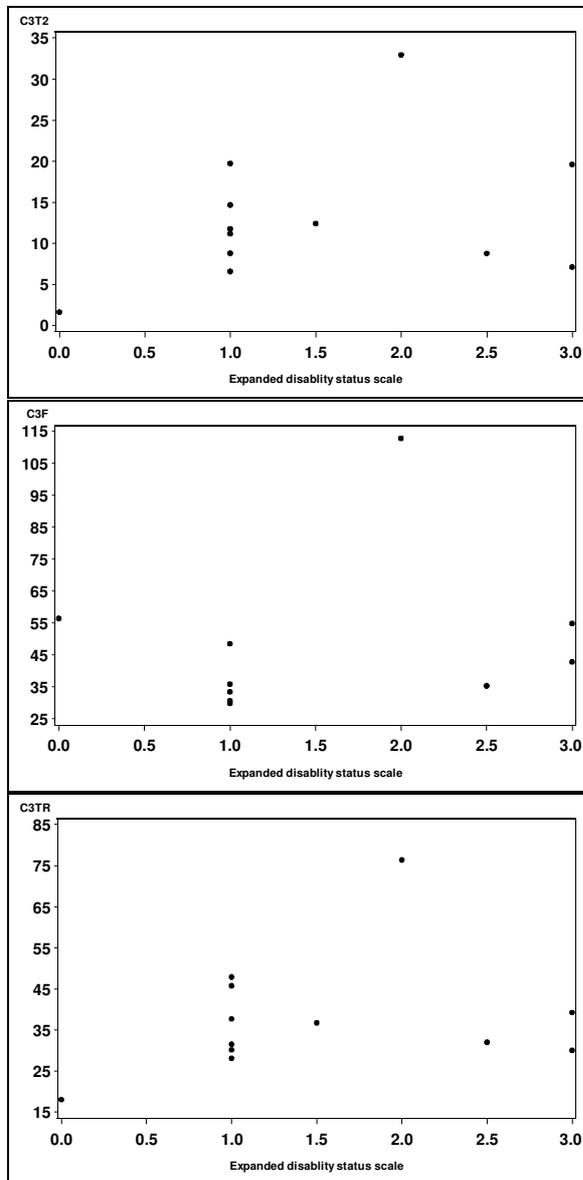
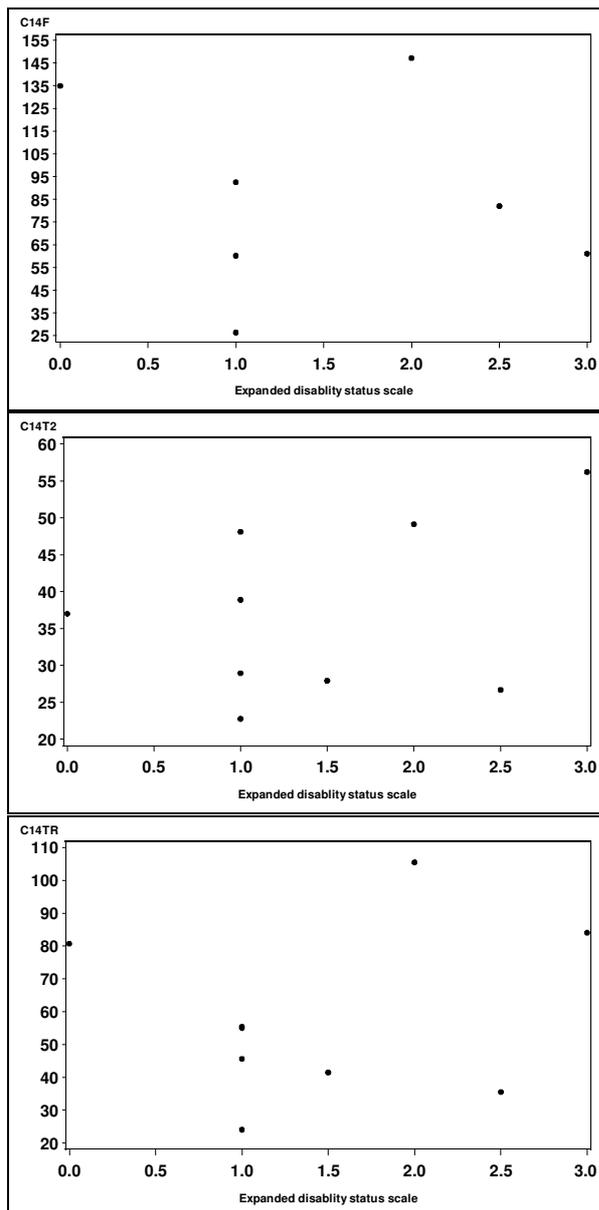
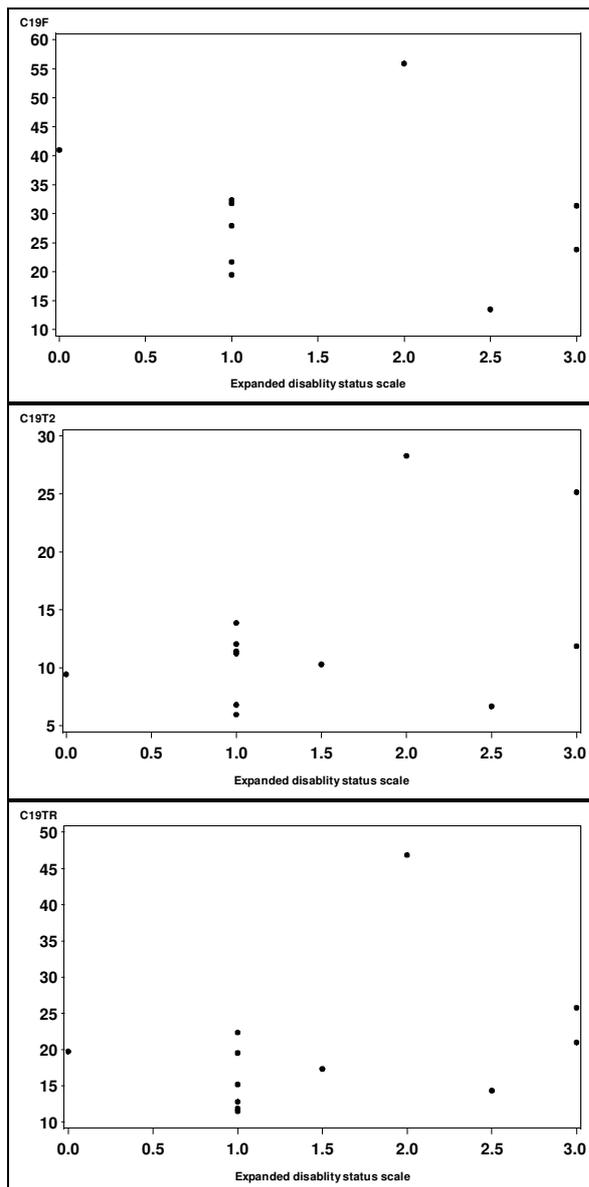


Abb. 7.10 bis 12: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots  
Korrelation des EDSS mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3.

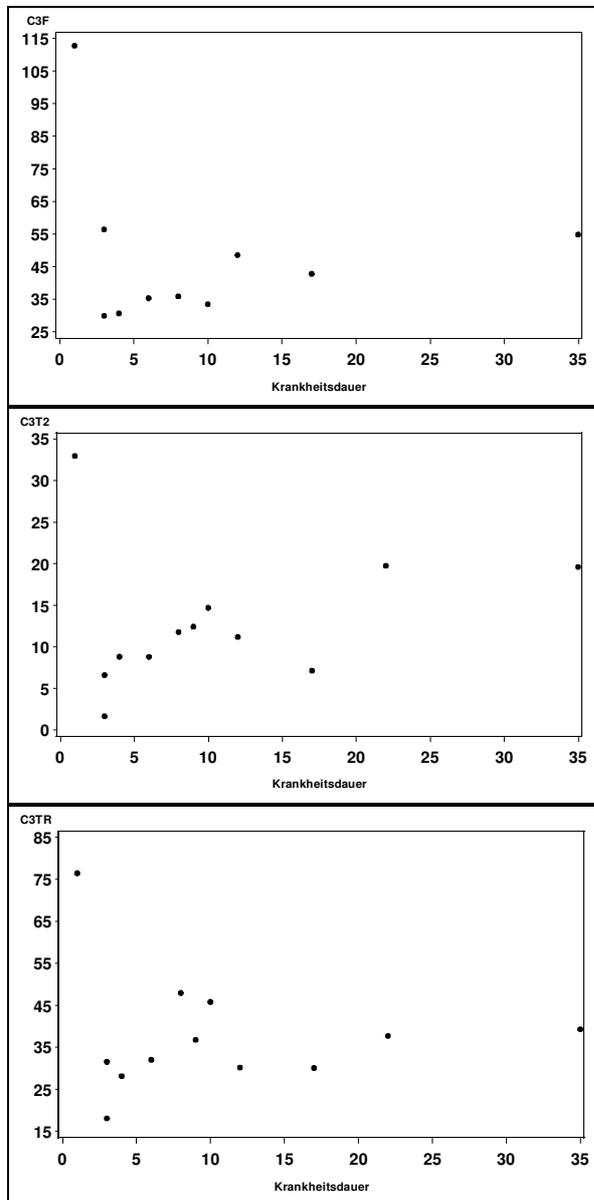
Y-Achse: Proteinexpression: CD3F= FADD in CD3 Leukozyten, CD3T2 = TRAF2 in CD3 Leukozyten, CD3TR = TRADD in CD3 Leukozyten. X-Achse: EDSS.



**Abb. 7.13 bis 15: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation des EDSS mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD14**  
**Leukozyten.** Y-Achse: Proteinexpression: CD14 F= FADD in CD14 Leukozyten, CD14T2 = TRAF2  
in CD14 Leukozyten, CD14TR = TRADD in CD14 Leukozyten. X-Achse: EDSS.

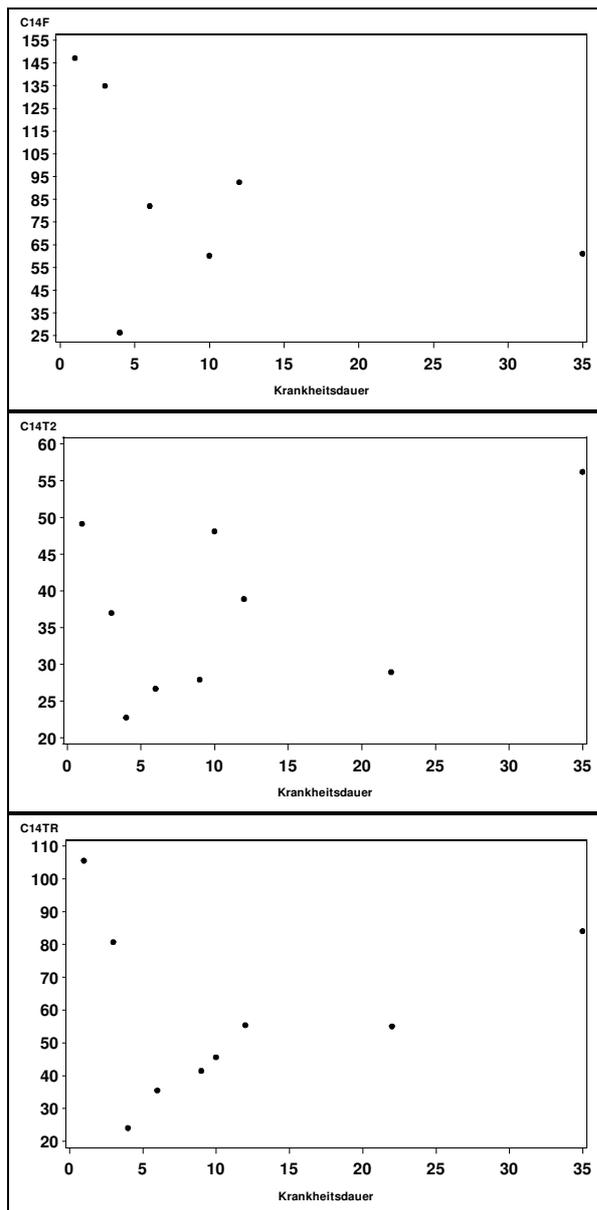


**Abb. 7.16 bis 18: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation des EDSS mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD19**  
**Leukozyten.** Y-Achse: Proteinexpression: CD19 F= FADD in CD19 Leukozyten, CD19T2 = TRAF2  
in CD19 Leukozyten, CD19TR = TRADD in CD19 Leukozyten. X-Achse: EDSS.

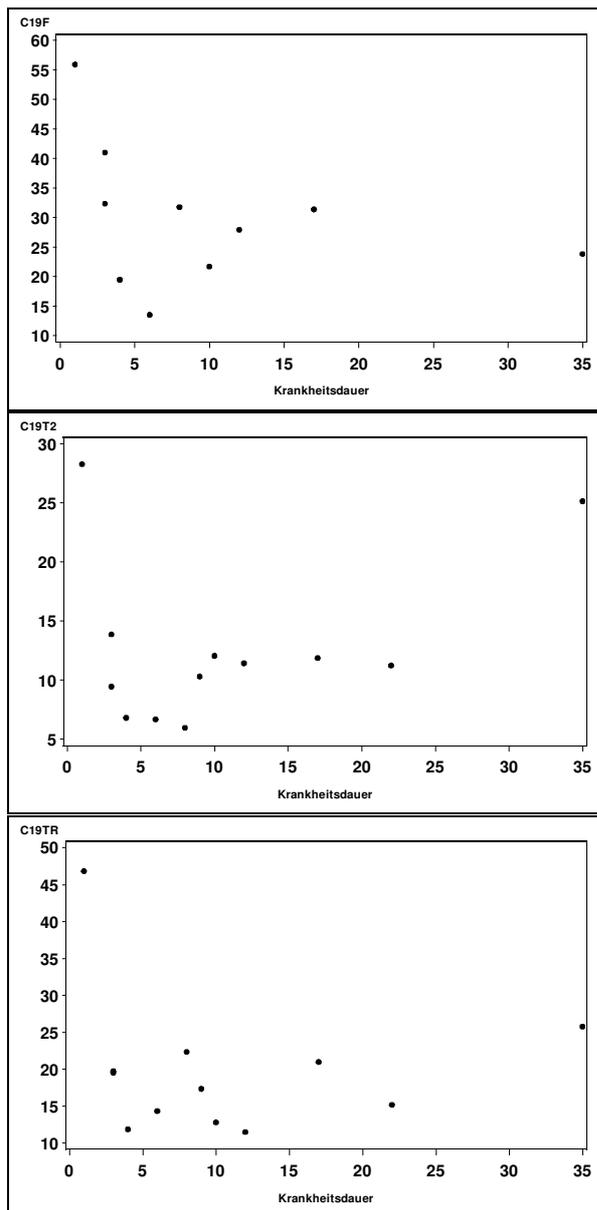
**Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots****Korrelation der Krankheitsdauer mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3, CD14 und CD19 Leukozyten:**

**Abb. 7.19 bis 21: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation der Krankheitsdauer mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3.**

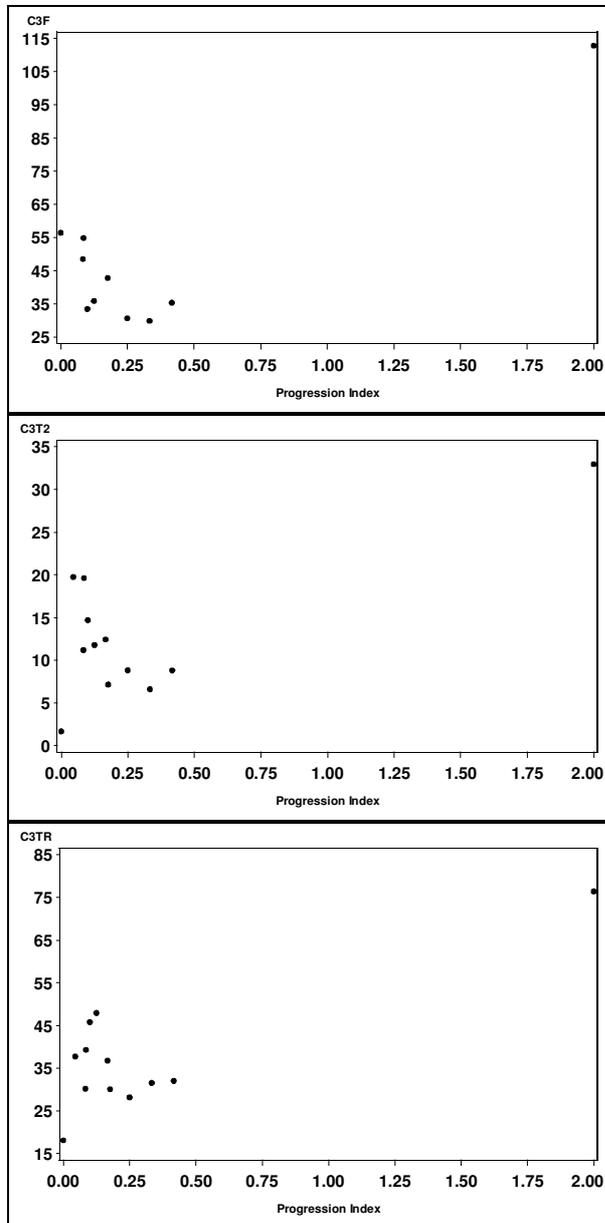
Y-Achse: Proteinexpression: CD3F= FADD in CD3 Leukozyten, CD3T2 = TRAF2 in CD3 Leukozyten, CD3TR = TRADD in CD3 Leukozyten. X-Achse: Krankheitsdauer.



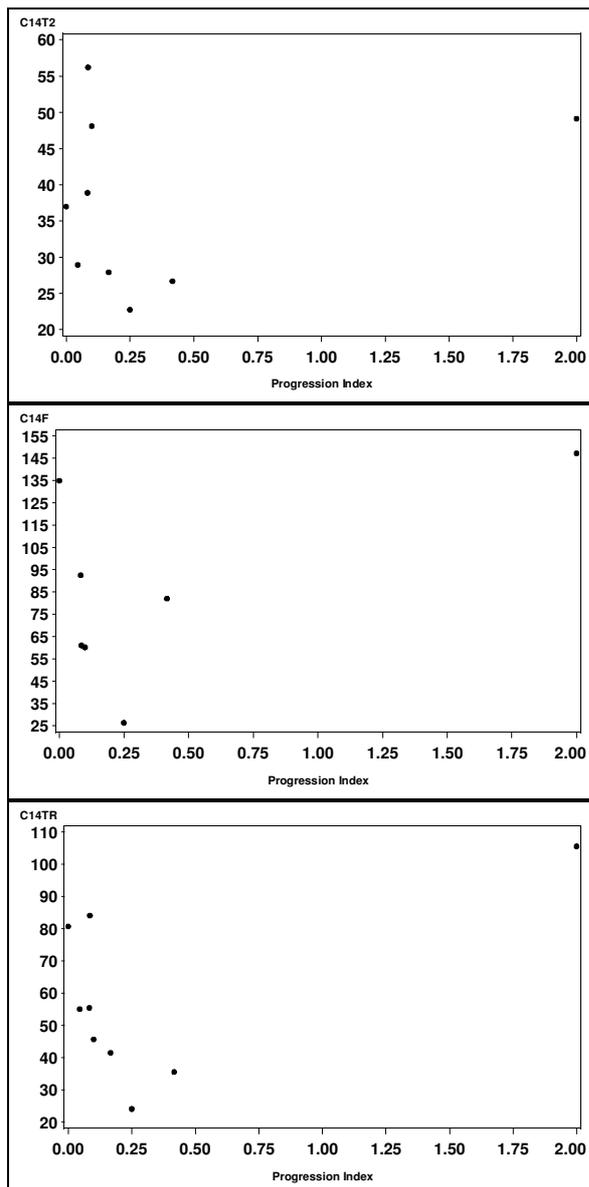
**Abb. 7.22 bis 24: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation der Krankheitsdauer mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in**  
**CD14 Leukozyten.** Y-Achse: Proteinexpression: CD14 F= FADD in CD14 Leukozyten, CD14T2 =  
TRAF2 in CD14 Leukozyten, CD14TR = TRADD in CD14 Leukozyten. X-Achse: Krankheitsdauer.



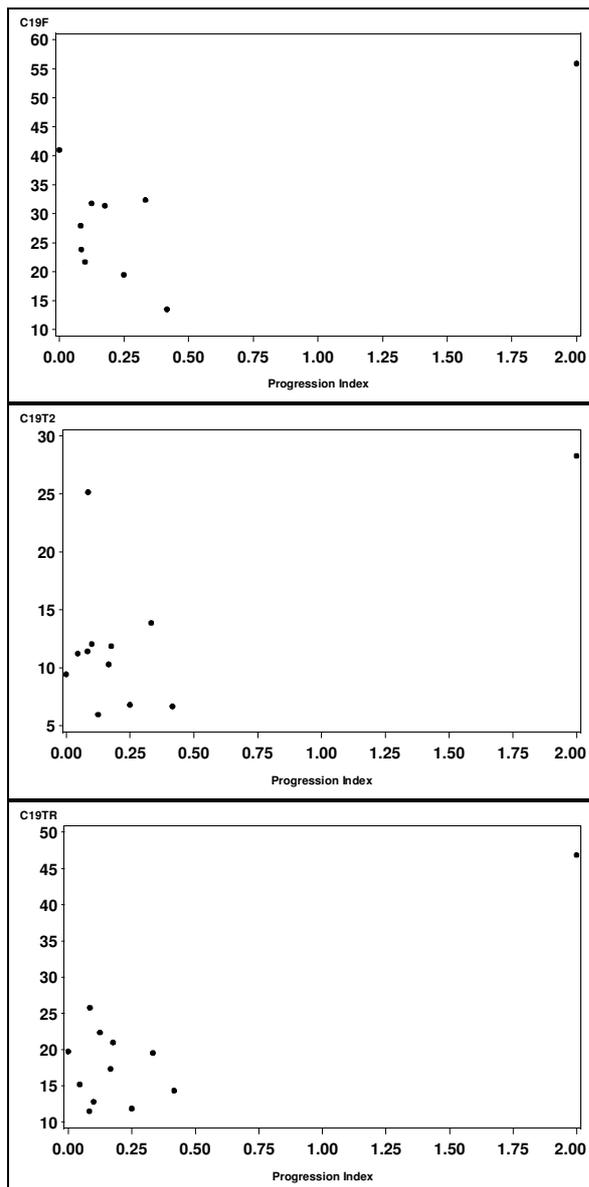
**Abb. 7.25 bis 27: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation der Krankheitsdauer mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in**  
**CD19 Leukozyten.** Y-Achse: Proteinexpression: CD19 F= FADD in CD19 Leukozyten, CD19T2 =  
TRAF2 in CD19 Leukozyten, CD19TR = TRADD in CD19 Leukozyten. X-Achse: Krankheitsdauer.

**Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots****Korrelation des Progressionsindexes mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3, CD14 und CD19 Leukozyten:**

**Abb. 7.28 bis 30: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation des Progressionsindexes mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD3.** Y-Achse: Proteinexpression: CD3F= FADD in CD3 Leukozyten, CD3T2 = TRAF2 in CD3 Leukozyten, CD3TR = TRADD in CD3 Leukozyten. X-Achse: Progressionsindex.



**Abb. 7.30 bis 31: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation des Progressionsindexes mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD14 Leukozyten.** Y-Achse: Proteinexpression: CD14 F= FADD in CD14 Leukozyten, CD14T2 = TRAF2 in CD14 Leukozyten, CD14TR = TRADD in CD14 Leukozyten. X-Achse: Progressionsindex.



**Abb. 7.10 bis 12: Korrelationsprüfungen: graphische Darstellungen in Form von Scatter Plots**  
**Korrelation des Progressionsindexes mit der Proteinexpression von FADD, TRAF2 und TRADD in CD19 Leukozyten.** Y-Achse: Proteinexpression: CD19 F= FADD in CD19 Leukozyten, CD19T2 = TRAF2 in CD19 Leukozyten, CD19TR = TRADD in CD19 Leukozyten. X-Achse: Progressionsindex.

## 7.2 EDSS Score

EDSS	Bedeutung
0,0	Normale neurologische Untersuchung
1,0	Keine Behinderung, minimale Zeichen in 1 FS (Grad1)
1,5	Keine Behinderung, minimale Zeichen in mehr als einem FS (mehr als ein FS Grad1)
2,0	Minimale Behinderung in einem FS (ein FS Grad2, andere 0 oder 1)
2,5	Minimale Behinderung in zwei FS (zwei Grad 2, andere 0 oder 1)
3,0	Mäßige Behinderung in einem FS (Grad 3. Andere 0 oder 1) oder leichte Behinderung in drei oder vier FS (Grad2, andere 0 oder 1) und uneingeschränkt geh fähig
3,5	Uneingeschränkt gehfähig, aber mäßige Behinderung in einem FS (Grad3) und ein oder zwei FS Grad2 oder zwei FS Grad 3 oder fünf FS Grad 2(andere 0 oder 1)
4,0	Uneingeschränkt gehfähig ohne Hilfe, selbständig, etwa 12 Stunden am Tag trotz relativ schwerer Behinderung mit einem FS Grad 4 (andere 0 oder 1)
4,5	Uneingeschränkt gehfähig ohne Hilfe, meiste Zeit des Tages auf, vollschichtig arbeitsfähig, aber evtl. mit geringer Einschränkung oder Hilfe; relativ schwere Behinderung mit einem FS Grad 4 (andere 0 oder 1) oder Kombination geringerer Schweregrade, gehfähig ohne Hilfe für etwa 300m
5,0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für etwa 200 m; Behinderung stark genug um tägliche Aktivitäten zu beeinträchtigen (üblicherweise FS Grad 5, andere 0 oder 1; oder Kombinationen leichtere Grade, die Schritt 4 überschreiten).
5,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für etwas 100m; Behinderung stark genug um volle Tagesaktivitäten zu beeinträchtigen (üblicherweise ein FS Grad5, andere 0 oder 1; oder Kombinationen leichtere Grade die Schritt 4,0 überschreiten).
6,0	Intermittierende oder konstante Gehhilfe benötigt um 100m weit zu gehen.
6,5	Konstante, beidseitige Gehunterstützung benötigt um 100m weit zu gehen.
7,0	Unfähig mehr als ein paar Schritte zu gehen; weitgehend auf den Rollstuhl angewiesen; fährt selbst im Rollstuhl und macht Transfer alleine; sitzt etwa 12 Stunden am Tag im Rollstuhl.
7,5	Unfähig mehr als ein paar Schritte zu gehen; auf den Rollstuhl beschränkt; benötigt Hilfe beim Transfer; fährt selbst, kann aber nicht den ganzen Tag in normalem Rollstuhl sitzen und benötigt evtl. Elektrorollstuhl.
8,0	Weitgehend auf das Bett beschränkt, kann aber die meiste Zeit des Tages außerhalb des Bettes sitzen; besitzt noch viele Funktionen der Körperpflege sowie weitgehend gebrauchsfähige Arme.
8,5	Weitgehend für die meiste Zeit des Tages auf das Bett angewiesen; einige Funktionen der Arme und der Körperpflege erhalten.
9,0	Hilfloser bettlägeriger Patient; kann essen und kommunizieren.
9,5	Vollkommen hilfloser, bettlägeriger Patient; unfähig, effektiv zu kommunizieren oder zu essen und zu schlucken.
10,0	Tod durch MS.

**Tab. 7.1: Expanded Disability Status Scale (EDSS, Kurtzke 1983).**

Acht Funktionssysteme (FS Motorik, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensibilität, Blase und Mastdarm, Visus, Mentale Funktionen und Andere) Grad 0= normal; Grad1 = abnorme Zeichen ohne Behinderung, Grad2 = leichte Behinderung, Grad 3-6 = mäßige bis schwere Behinderung.

## **8. Danksagung**

Diese Seite möchte ich nutzen um allen zu danken, die in den letzten Jahren am Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Dabei gilt vor allem ein ganz besonders großer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Oschmann für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor der neurologischen Klinik in Gießen, die mir ein selbständiges Arbeiten ermöglicht haben.

Nicht weniger möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Reinhard Reuß für die kompetente, unermüdliche Betreuung und grenzenlose Unterstützung danken. Mit seinen Ideen und seinem Fachwissen stand er mir stets freundschaftlich zur Seite. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Für die statistische Aufarbeitung und Auswertung der Ergebnisse sowie die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft danke ich Frau Christine Scheibelhut und Herrn Dr. Bödecker aus dem Institut für Medizinische Informatik des Universitätsklinikums Gießen.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeitern des Liquorlabors der neurologischen Klinik in Gießen, die mir immer in Rat und Tat zur Seite standen. Herrn Tobias Thomas danke ich für seine Hilfsbereitschaft und fachkundige Unterstützung vor allem bei technischen Schwierigkeiten während des praktischen Teiles.

Der ganzen MS-Gruppe danke ich für die gegenseitige Unterstützung, insbesondere möchte ich meiner Freundin Miriam König für die vielen gemeinsamen Laborabende und die gegenseitige Aufmunterung bei der Arbeit danken.

Meinem lieben Peter möchte ich danken, da er mir immer wieder den Rücken frei gehalten hat, damit ich diese Arbeit fertigstellen konnte. Außerdem möchte ich meiner kleinen Tochter Maya danken, die mir die Zeit gegeben hat, diese Arbeit letztendlich zu vervollständigen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich die ganzen Jahre über unterstützt haben, und die in jeglicher Hinsicht den Grundstein zum Gelingen dieser Arbeit gelegt haben.