

**Die Konzentration des B-Zell aktivierenden Faktors BAFF  
in Serum und Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose**

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

vorgelegt von  
Kathrin Anna Faltermeier  
aus Landshut

Giessen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie

Klinik für Neurologie

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Blaes

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 14.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung

## Summary

1.	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.2	Pathophysiologie der Multiplen Sklerose	5
1.3	B-Lymphozyten und B- Zell aktivierende Faktoren	11
1.3.1	Der B- Zell aktivierende Faktor BAFF	13
1.3.2	Die Rolle von BAFF bei autoimmunen und neuroimmunologischen Erkrankungen	18
1.4	Fragestellung	20
2.	Material und Methoden	21
2.1	Patienten	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Enzyme- linked immuno sorbent assay (ELISA)	22
2.2.2	Bestimmung der BAFF- Konzentration mit dem „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ ELISA	23
2.3	Statistik	26
3.	Resultate	27
3.1	BAFF- Serumkonzentrationen von Patienten mit Multipler Sklerose und Kontrollen	27
3.2	BAFF- Liquorkonzentrationen von Patienten mit Multipler Sklerose und Kontrollen	27

3.3	BAFF- Liquor/Serum Quotient und Albumin Liquor/ Serum Quotient	30
3.4	Liquorbefunde	33
3.5	Korrelation der Serum- und Liquorbefunde mit der Klinik der MS- Patienten	34
4.	Diskussion	37
5.	Literaturverzeichnis	44
6.	Abbildungsverzeichnis	54
7.	Tabellenverzeichnis	55
8.	Anhang	56

## Zusammenfassung

Einleitung: Die Multiple Sklerose (MS) ist die weltweit häufigste chronische entzündliche ZNS- Erkrankung. Pathogenetisch kommt es schon früh im Krankheitsverlauf neben einer inflammatorischen Demyelinisierung zu einer axonalen Schädigung. B-Zellen spielen dabei in der Pathogenese eine größere Rolle als bisher angenommen wurde. Vor kurzem wurde der B-Zell aktivierende Faktor BAFF, ein Mitglied der Tumor- Nekrose Faktor- Superfamilie beschrieben. Er spielt eine bedeutende Rolle für das Überleben sowie die Ausreifung von B- Zellen. Außerdem konnte der Nachweis erbracht werden, dass BAFF eine wichtige Rolle in der Pathogenese von systemischen Autoimmunerkrankungen spielt. Von Interesse ist dabei, ob sich die BAFF- Konzentration in Serum und Liquor von den Kontrollpatienten unterscheidet und ob dies auf eine Störung der Blut-Hirn Schranke oder auf eine intrathekale Produktion zurückzuführen ist.

Methoden: Es wurden Seren und Liquores von 50 MS- Patienten, 35 Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen (ID) und von 52 gesunden Kontrollpatienten (HC) mittels ELISA untersucht.

Resultate: Die BAFF- Serum Konzentration der gemessenen MS- Patienten war signifikant niedriger als bei den gemessenen ID- Patienten, nicht aber im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Kontrollen. (MS  $0.43 \pm 0.14$  ng/ml, ID  $0.54 \pm 0.24$  ng/ml, HC  $0.45 \pm 0.24$  ng/ml;  $p < 0.05$ ). Die BAFF- Konzentration im Serum der Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen war signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpatienten (HC  $0.45 \pm 0.24$  ng/ml, ID  $0.54 \pm 0.24$  ng/ml,  $p < 0.001$ ). Die BAFF- Konzentration im Liquor von Patienten mit MS war signifikant niedriger als bei den gesunden Kontrollpatienten ( $p < 0.05$ ) und den entzündlichen ZNS-Erkrankungen (HC  $0.25 \pm 0.14$  ng/ml, ID  $0.97 \pm 0.78$  ng/ml, MS  $0.16 \pm 0.11$  ng/ml  $p < 0.001$ ).

Der Albumin Liquor/ Serum Quotient ( $Q_{Alb} = \text{Liquor/ Serum} \cdot 1000$ ) gilt als Marker für die Integrität der Blut- Hirn Schranke. Während bei den ID- Patienten eine signifikante Erhöhung des Albumin Liquor/ Serum Quotienten gemessen wurde, war der Albumin Liquor/ Serum Quotient der MS-Patienten im Vergleich Quotienten der Kontrollpatienten nicht signifikant erhöht (ID  $19.0 \pm 25.0$ ; MS  $5.8 \pm 2.5$ ; HC  $6.1 \pm 2.4$ ,  $p < 0.05$ ; MS  $5.8 \pm 2.5$ ; HC  $6.1 \pm 2.4$ , n.sign.)

Diskussion: Der gemessene signifikant niedrigere Liquor BAFF- Spiegel bei MS- Patienten ist ein überraschendes Ergebnis, da bisher berichtet wurde, dass BAFF

durch Astrozyten in aktivierten MS- Läsionen produziert und exprimiert wird. Möglicherweise lässt sich dies durch eine gestörte Regulation von BAFF bzw. der B-Zell-Aktivität bei MS erklären. Offen ist, ob die Verhältnisse in den cerebralen Plaques tatsächlich durch das Liquorkompartiment repräsentiert werden. Die erhöhten BAFF- Spiegel bei Patienten mit infektiöser ZNS- Erkrankung sind auf eine Störung der Blut-Hirn Schranke zurückzuführen. Im Vergleich der BAFF- Liquorkonzentration und des Liquor/ Serum Quotienten der gemessenen MS- Patienten mit dem klinischen Verlauf lies sich keine Korrelation zwischen BAFF Konzentration und Krankheitsaktivität herleiten. Es wäre eine höhere Fallzahl sowie ein längerer Beobachtungszeitraum nötig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können, ob BAFF ein Prädiktor für den Verlauf oder ein Ansprechen auf eine Therapie ist.

## Summary

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is the most common immune-mediated CNS disease, characterised by demyelination and progressive neurological disability. B-cells may play a major role in pathophysiology of MS. Recently, the B-cell activating factor BAFF, a member of the tumor-necrosis factor- superfamily, has been described as an important regulator of B-cell development and survival and was also involved in the pathophysiology of different autoimmune diseases. The aims of this study were to investigate discrepancies in BAFF levels in serum and cerebrospinal fluid of ms-patients. Furthermore we wanted to clarify whether differences in BAFF levels are caused by a blood-brain barrier disturbance or an intrathecal production.

**Methods:** We therefore measured BAFF levels in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of 50 patients with diagnosed MS, 35 patients with infectious CNS disease and 52 healthy controls using a commercially available ELISA.

**Results:** We found significant lower BAFF-serum levels in MS-patients than in ID-patients, but not in healthy controls (MS  $0.43 \pm 0.14$  ng/ml, ID  $0.54 \pm 0.24$  ng/ml, HC  $0.45 \pm 0.24$  ng/ml;  $p < 0.05$ ). The BAFF-serum level in Patients suffering from infectious disease was significantly higher as in healthy controls (HC  $0.45 \pm 0.24$  ng/ml, ID  $0.54 \pm 0.24$  ng/ml,  $p < 0.001$ ). In MS-patients the BAFF- CSF level was significantly lower as in healthy controls ( $p < 0.05$ ) and in ID-patients (HC  $0.25 \pm 0.14$  ng/ml, ID  $0.97 \pm 0.78$  ng/ml, MS  $0.16 \pm 0.11$  ng/ml,  $p < 0.001$ ).

The albumin CSF/serum ratio is a marker of the integrity of the blood-brain barrier. In ID-patients we found a significantly higher level than in healthy controls. In MS-patients no significant difference could be detected (ID  $19.0 \pm 25.0$ ; MS  $5.8 \pm 2.5$ ; HC  $6.1 \pm 2.4$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA- Test; MS  $5.8 \pm 2.5$ ; HC  $6.1 \pm 2.4$ , n.sign.).

**Discussion:** The significant decreased BAFF CSF levels are a surprising result of our study. Although it has been reported that astrocytes in active MS lesions can express BAFF, the soluble form was not increased in the CSF of MS patients. This is possibly caused by a disturbancy in BAFF regulation or b-cell activity. So far it is unclear whether the conditions in the cerebral plaques are represented by the CSF-compartment or not. The high BAFF levels in the CSF of ID-patients can be traced back to a blood- brain- barrier disturbance caused by inflammation. According to the comparison of the BAFF CSF-level and the CSF/serum ratio in MS-patients, relating

to the clinical course no correlation between BAFF concentration and disease activity could be detected. In the comparison of BAFF CSF-level and CSF/serum ratio of the MS-patients a larger number of cases and a longer term of observation might be necessary to draw a final conclusion whether BAFF is a predictor for the course of disease or the response to a therapy.



# 1. Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose oder Enzephalitis disseminata ist die weltweit häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie wird vor allem auf der nördlichen Erdhalbkugel mit Schwerpunkten in Europa und Nordamerika beobachtet. Die Inzidenz ist ausgehend vom Äquator mit jedem Breitengrad zunehmend (Brody 1972). Bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 28 Jahren und einer Inzidenz von 30 bis 80 Personen/ 100.000 Einwohner sind Frauen wesentlich häufiger von der Krankheit betroffen als Männer (72% versus 28%) (Flachenecker et al. 2008). Auch ein Erkrankungsbeginn im Kindesalter ist möglich (Banwell 2007). Es wurde lange Zeit angenommen, dass sich die Erstsymptome der MS als Charcot-Trias mit Intentionstremor, Nystagmus und skandierender Sprache, oder als Trias von Marburg (temporale Abblassung der Pupillen, Paraspastik und fehlende Bauchhautreflexe) manifestieren.

Der klinische Alltag hat jedoch gezeigt, dass dies nur auf sehr wenige Fälle zutrifft. Das Charakteristikum der MS-Symptomatik sind die multilokulären Funktionsstörungen des ZNS, die in Schüben und mit Remissionen auftreten (Delank et al. 2004).

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

Man unterscheidet nach dem klinischen Verlauf zwischen dem klinisch isolierten Syndrom (CIS), der schubförmigen („relapsing- remitting“, RRMS), der sekundär progredienten (SPMS) und der primär progredienten (PPMS) Verlaufsform. (McAlpine et al. 1972, DGN, Leitlinien 2008; Abb.1).

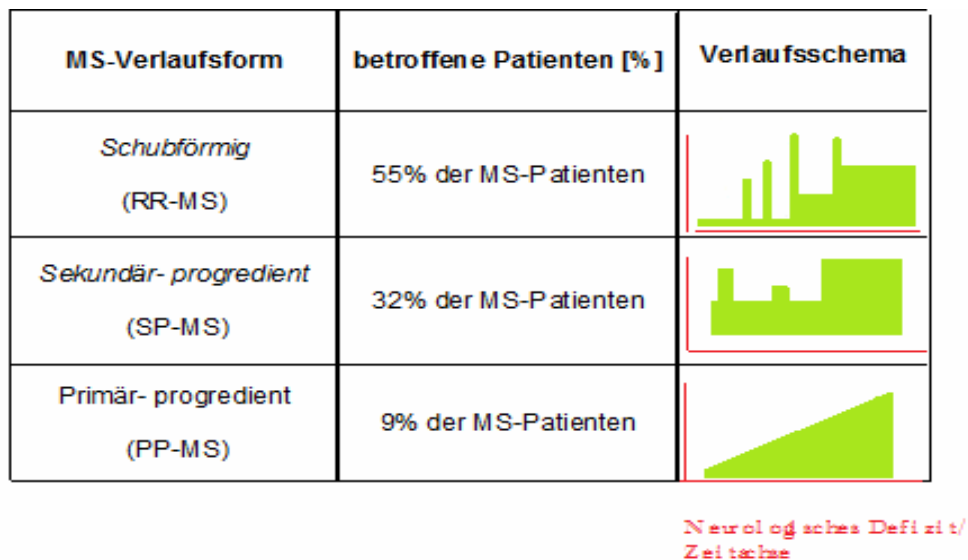


Abb. 1: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose modifiziert nach Virley; NeuroRx, Vol. 2, No.4, 2005)

Das klinische Bild der Multiplen Sklerose ist durch eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität gekennzeichnet. Ausschlaggebend für den Verlauf sind dabei die Lokalisation der Läsionen, die initiale Läsionslast bei Diagnosestellung und der zeitliche Rahmen in denen sie auftreten.

Die Erkrankung äußert sich bei mehr als 80% der Patienten zu Beginn mit einem schubförmigen Verlauf. Dabei ist ein Schub als akutes Auftreten neurologischer Ausfälle bzw. eine Verschlechterung bestehender Symptome, die für mindestens 24 Stunden anhalten, definiert. Diese dürfen nicht durch physiologische Schwankungen oder eine Infektion bedingt sein. Die Symptome eines Schubes bilden sich meist innerhalb sechs bis acht Wochen zurück.

Das klinisch isolierte Syndrom (CIS) zeichnet sich dadurch aus, dass beim Auftreten einer erstmalig klinischen Symptomatik, die von der Präsentation auf ein demyelinisierendes Ereignis deutet, die Kriterien der zeitlichen Disseminierung fehlen (Miller et al. 2004). Multifokale MR-Läsionen zu diesem Zeitpunkt zeigen ein erhöhtes Risiko für einen raschen Übergang zur MS an (Tintoré et al. 2000).

Die primär progressive MS ist dadurch gekennzeichnet, dass keine abgrenzbaren Schübe erkennbar sind. Viel mehr treten bei dieser Verlaufsform entweder immer neue Symptome zu den schon bestehenden auf, oder es kommt zu einer chronischen Verschlechterung der schon bestehenden Symptomatik (Lublin et al. 1996, Tremlett et al. 2009). Als die am häufigsten auftretenden Erstsymptome werden dabei Sensibilitätsstörungen, Gangstörungen oder eine einseitige Opticusneuritis beschrieben (Weinshenker et al. 1989). Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es bei der Hälfte der unbehandelten MS- Patienten zu einer sekundären Progredienz der Symptome (sekundär progrediente Verlaufsform). 10 bis 15% der MS- Patienten leiden unter der primär progredienten Verlaufsform der Multiplen Sklerose bei der keine Schübe auftreten, sondern es zu einer schleichenden Zunahme der neurologischen Defizite kommt. Zusammenfassend leiden in Deutschland 55% der MS Patienten an der schubförmig remittierenden Verlaufsform und 32% an der sekundär progredienten Verlaufsform. Bei 9% wurde eine primär chronisch progrediente MS festgestellt (Flachenecker et al. 2008). An Hand von Leistungsskalen wie des EDSS- Scores (Expanded disability status scale) lassen sich Behinderungsgrade und Krankheitsverläufe objektiviert darstellen. Dabei entspricht Grad null einer normalen neurologischen Untersuchung, Grad zehn Tod durch MS (Kurtzke 1983). Diagnostisch relevant ist zum einen die Anamnese, zum anderen spielt bis heute der Liquorbefund eine wesentliche Rolle. Bei MS- Patienten lässt sich meist eine mäßige Pleozytose (<50 Zellen / $\mu$ l) aus Monozyten und Lymphozyten, oft auch Plasmazellen nachweisen. Zudem haben rund 95% der Patienten mit einer klinisch gesicherten MS positive oligoklonale Banden im Liquor. Nach den international anerkannten McDonald-Kriterien kann eine MS diagnostiziert werden, wenn nach einem ersten Krankheitsschub im Liquor MS-typische Veränderungen nachweisbar sind und sich in der Magnetresonanztomographie mehr als zwei charakteristische Läsionen zeigen.

Außerdem muss die zeitliche Dissemination der Läsionen nachgewiesen werden (Mc Donald et al 2001, Polmann et al 2005, Tab.1).

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

Schübe/ Klinik	Klinisch nachweisbare Läsionen	Zur Diagnose benötigte Zusatzuntersuchungen
Zwei oder mehr	Zwei oder mehr	Keine; der klinische Befund reicht aus
Zwei oder mehr	Eine	Örtlich verteilte Läsionen im MRT <b>oder</b> Liquoranalyse positiv und mindestens zwei MS- typische Läsionen im MRT oder weiterer klinischer Schub
Ein Schub	Zwei oder mehr	Zeitlich versetzt auftretende Läsionen im MRT <b>oder</b> zweiter klinischer Schub
Ein Schub mit nur einem Symptom	Eine	Läsionen örtlich verteilt im MRT <b>oder</b> zwei oder mehr mit MS vereinbare MS- Läsionen und positiver Befund im Liquor sowie zeitliche Verteilung (im MRT oder durch einen zweiten Schub)
Von Anfang an chronisch-progredienter Verlauf mit Verdacht auf MS	Langsame neurologische Verschlechterung vereinbar mit MS	Ein Jahr Krankheitsprogression <b>und</b> zwei der folgenden Kriterien: a) c- MRT positiv (neun T2-Läsionen oder vier oder mehr T2 Läsionen mit positiven VEP) b) Spinales MRT positiv (zwei oder mehr herdförmige T2 Läsionen) c) Liquoranalyse positiv

Des Weiteren haben bei der Diagnosestellung einer Multiplen Sklerose neurophysiologische Testungen, allen voran die visuell evozierten Potentiale (VEP), einen Stellenwert. Sie geben Hinweise auf subklinische Funktionsstörungen in verschiedenen funktionellen Systemen.

Als Schubtherapie hat sich die intravenöse Verabreichung von Methylprednisolon als Hochdosistherapie (je 1g über drei bis fünf Tage) bewährt (Grauer et al. 2002).

Zur Dauertherapie werden verschiedene Präparate wie Interferon- beta 1b, Interferon- beta 1a sowie Glatirameracetat (Copaxone ®) (Copolymer aus den linksdrehenden Aminosäuren: Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Tyrosin (GLAT) in einem bestimmten molekularen Verhältnis) und Natalizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen  $\alpha_4$ - Integrin eingesetzt. Auch das Purinanalogon Azathioprin und Mitoxantron werden bei bestimmten Indikationen verwendet. Die Präparate, vor allem Interferone und Glatirameracetat, haben in mehreren Studien gezeigt, dass sie bei richtiger Indikationsstellung die Schubfrequenz sowie die Schubschwere reduzieren (Goodin et al. 2002, Jacobs et al. 1996, Ebers et al. 1998). Für die Früh- Therapie mit Interferon beta- 1b nach dem ersten Schub konnte eine positive Wirkung auf den Behinderungsgrad, gemessen im EDSS nach 3 Jahren, dokumentiert werden (Kappos et al. 2006).

## ***1.2 Pathophysiologie der Multiplen Sklerose***

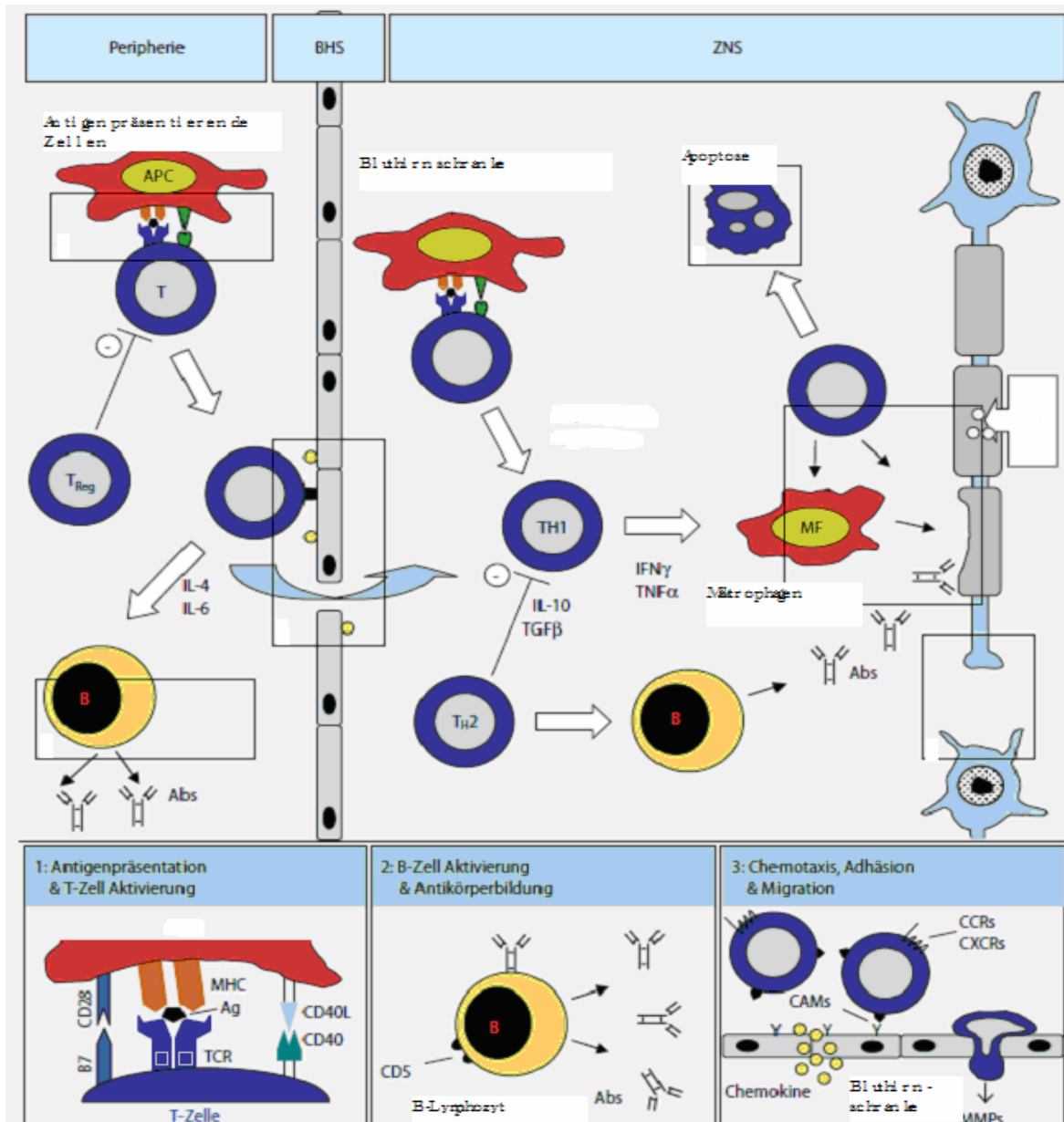
Die Pathogenese der Multiplen Sklerose ist bisher nicht völlig geklärt. Neben einer genetischen Disposition mit einer erhöhten Konkordanzrate in Zwillingsstudien ist ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Trägern von bestimmten HLA- Antigenen, z.B. dem DR2-Allel, nachgewiesen. Zusätzlich werden verschiedene Umweltfaktoren und Infektionen mit bestimmten Virusarten, z.B. Viren der Herpesgruppe wie Cytomegalie- (CMV) oder Epstein- Bar- (EBV) Virus (Ascherio et al. 2007) oder endogene Retroviren als mögliche Ursachen diskutiert. Pathophysiologisch wird die Multiple Sklerose als Autoimmunerkrankung angesehen. Diese These wurde anhand es EAE- Modells (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) postuliert. Bei diesem Modell wurden Mäusen und Affen das myelin basic protein (MBP), welches von

einigen Modellen als das Krankheit auslösende Antigen angesehen wird, appliziert. Die Versuchstiere entwickelten nach kurzer Latenzzeit MS- typische Symptome (Rivers et al. 1933, Gold et al. 2006). Ob das EAE- Tiermodell mit der humanen multiplen Sklerose verglichen werden kann, ist bislang jedoch nicht vollständig geklärt (Hafler 2004).

Zu Beginn der Erkrankung gelangen autoreaktive T- Lymphozyten, die sich in der Peripherie aus noch nicht vollständig geklärt Ursache bilden, über die Blut- Hirn Schranke ins ZNS. Als ursächlich für die Entstehung von autoreaktiven T- Zellen wird das molekulare Mimikry, eine Kreuzreaktion von exogenen (mikrobiellen) Epitopen mit identischen körpereigenen Strukturen, gesehen (Benoist et al. 2001).

Die Autoantigene werden in der Peripherie mittels MHC Klasse II Molekül an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen den T-Zellen präsentiert. Zytotoxische T- Zellen (CD8-T-Zellen) erkennen in Assoziation mit MHC Klasse I Molekül zumeist endogene Peptide und lysieren die Zielzellen. Die transendotheliale Migration wird unter anderem durch Adhäsionsmolekülen des Bluthirnschrankenendothels (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, PECAM-1, urokinase activator- Rezeptor), Chemokinen und Matrixmetalloproteinasen reguliert (Greenwood et al. 2002).

Nach der Transmigration in das ZNS erfolgt dort die Ausbildung von Entzündungsherden. Die CD4+ T- Helferzellen und die zytotoxischen CD8+ T- Zellen werden durch Mikrogliazellen reaktiviert und setzen proinflammatorische Zytokine frei. Es folgt eine gesteigerte Phagozytose und eine vermehrte Produktion von Zytokinen und freien Radikalen wie z.B. TNF- $\alpha$ , Lymphytoxin (LT) und Stickstoffmonoxid (NO) (Huitinga et al. 1995). Dies führt dann entweder direkt, T-Zell vermittelt, oder durch das Anlocken von Effektorzellen, meist Makrophagen, zur Zerstörung der Myelinscheiden. Aber auch B-Zellen können, durch T-Zellen aktiviert, spezifische Antikörper bilden, die dann schädigend auf die Myelinscheiden wirken (Archelos et al. 2000). Außerdem können die von B-Zellen produzierten Autoantikörper Komplementkaskaden aktivieren, sodass der Membran- Angriffs-Komplex (C5b-9) gebildet wird, welcher Zielstrukturen auflösen kann. Des Weiteren wird die axonale Degeneration auch durch Hochregulierung von Natrium- und Kalzium- Kanälen auf den Axonen und eine gestörte Mitochondrienfunktion gefördert (Abb.2).



*Abb. 2: Überblick über die an der Pathogenese der MS beteiligten Bestandteile des Immunsystems, modifiziert nach Kleinschnitz et al. 2007. Autoreaktive T- Zellen (T) in der Peripherie erkennen ihr spezifisches Autoantigen (Ag), welches ihnen von antigenpräsentierenden Zellen (AP) angeboten wird. Dies bedarf der Interaktion mit dem T-Zell- Rezeptor (TCR) und dem gleichzeitigen Vorhandensein kostimulatorischer Signale (dargestellt in 1). Nähere Erläuterungen zum Vorgang der transendothelialen Migration (dargestellt in 3) siehe Text.*

*Innerhalb des ZNS werden die T- Zellen reaktiviert und stimulieren Mikrogliazellen und Makrophagen. Dies führt zu einer gesteigerten Phagozytose und einer vermehrten Produktion von Zytokinen und freien Radikalen, welche letztendlich die Demyelinisierung und den axonalen Schaden hervorrufen. Die Hochregulation von Natrium- und Calcium- Kanälen auf den Axonen sowie eine gestörte Mitochondrienfunktion fördern ebenfalls axonale Degeneration. Die Entzündungsreaktion wird durch ein Gleichgewicht pro- und anti- inflammatorischer Zytokine reguliert.*

Auch wird in letzter Zeit diskutiert, ob ein bislang unklarer Mechanismus durch gestörte Apoptose zu einer vermehrten Anhäufung autoreaktiver T-Zellen im peripheren Blut und/ oder im ZNS führt. Außerdem hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass sogenannte regulatorische T-Zellen entscheidend, vor allem CD4+CD25+ Zellen als Subpopulation für die Aufrechterhaltung des immunologischen Milieus im ZNS beteiligt sind, da sie autoreaktive Prozesse effektiv unterdrücken. Die Funktion der regulatorischen T-Zellen sind möglicherweise bei MS- Patienten beeinträchtigt (Sakaguchi 2005). Bisher konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass eine gezielte Auslöschung der Subpopulation CD4+CD25+ spontane Autoimmunerkrankungen induzieren (Baecher-Allan et al. 2004).

Schon seit Langem wird der Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor von MS- Patienten als diagnostischer Marker herangezogen. Histopathologisch gelang in den Meningen von MS- Patienten der Nachweis von ektopischen B-Zell-follikelartigen Strukturen mit Keimzentren (Aloisi et al. 2006) und von Zentroblasten (Magliozzi et



al. 2004). Auch expandieren B-Zellen und Plasmazellen sehr früh klonal im Liquor von MS- Patienten (Quin et al. 2003). Außerdem wurden Epitope des Epstein- Barr-Virus (EBV) als mögliche Zielstrukturen der humoralen Immunantwort bei der MS identifiziert (Cepok et al. 2005). Krumbholz et al. (2005) gelang der Nachweis, dass der B-Zell aktivierende Faktor BAFF, der in humanen MS- Plaques hochreguliert ist, von Astrozyten gebildet wird. Vor allem die Unterformen Neuromyelitis optica (NMO) und akut demyelinisierende Enzephalomyelitis (ADEM) scheinen durch humorale Mechanismen induziert und unterhalten zu werden.

Schon früh im Krankheitsverlauf kommt es neben der inflammatorischen Demyelinisierung zur axonalen Schädigung. Der axonale Schaden wird dabei als ursächlich für die irreversible Behinderung erachtet. Die Frage, ob die axonale Schädigung primär, als Folge direkter zellulärer und humoraler Mechanismen zu sehen ist, oder aber sekundär auf Grund der vorangegangenen Demyelinisierung entsteht, ist Gegenstand der aktuellen Diskussion (Steinman 2001, Bjartmar et al. 2001). Bislang ergaben histopathologische Untersuchungen von cerebralen Plaques verschiedenster MS- Patienten vier unterschiedliche Läsionsmuster (Lucchinetti et al. 2000). Bei Muster I und II überwiegen zelluläre (T-Zellen, Makrophagen) und humorale (Antikörper, Komplement) Bestandteile des Immunsystems. Im Gegensatz dazu ließ sich bei den Läsionen, die Muster III und IV zuzuordnen waren, eine „primäre Oligodendropathie“ mit fast vollständig fehlender Entzündungsreaktion nachweisen. MS-Läsionen vom Typ III weisen schon früh einen Verlust an myelinassoziiertem Glykoprotein (MAG) auf und zeigen eine nur geringe Remyelinisierungsrate. Eine Immunglobulin- oder Komplementablagerung ist nicht nachweisbar. Die Typ III und Typ IV Läsionen weisen beide histomorphologisch ähnliche Veränderungen auf, wie sie bei hypoxischen ZNS-Schäden gesehen werden. Typ IV-Läsionen zeigen aber im Gegensatz zu denen des Typ III eine erhöhte Apoptoserate von Oligodendrozyten durch vermehrte DNA- Fragmentierung (Abb. 3).

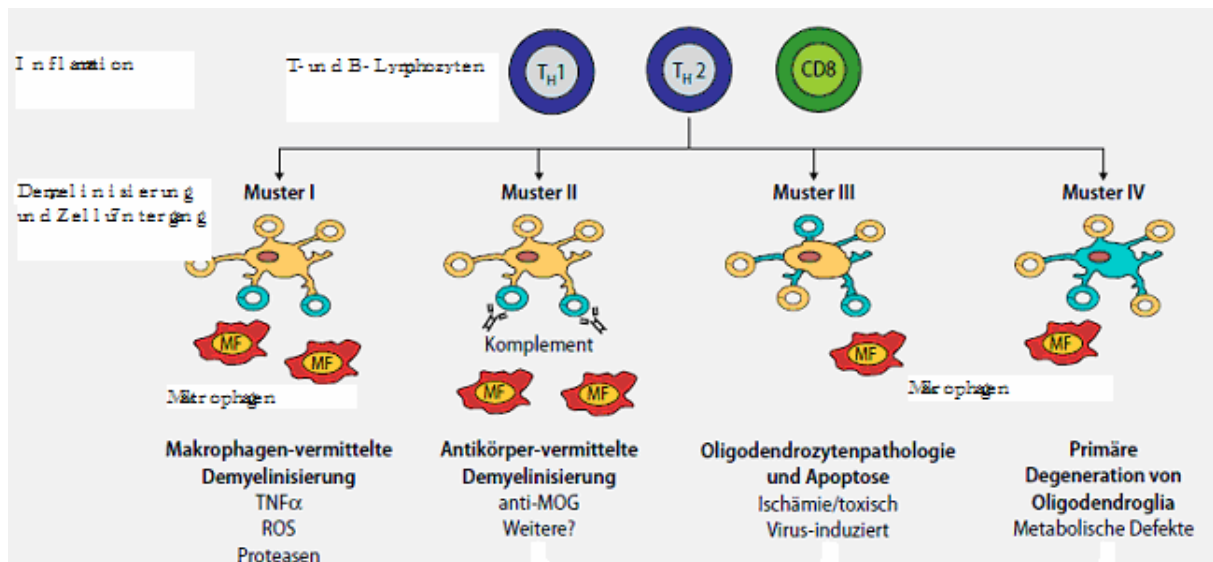


Abb.3: Klassifikation der MS- Läsionen modifiziert nach Lassmann et al 2001.

Zelluäre (Makrophagen, aktivierte Mikroglia, T- Zellen) und humorale (Antikörper, Komplement) Bestandteile des Immunsystems überwiegen bei den Läsionen vom Muster I und II. Die Läsionen III und IV sind überwiegend durch eine primäre Oligodendrozytenpathologie mit wenig Entzündungen gekennzeichnet. Muster III Läsionen remyelinieren so gut wie nicht und ähneln den histologischen Veränderungen nach einem hypoxischen oder toxischen Hirnschaden. Die Muster IV- Läsionen unterscheiden sich von denen des Musters III durch vermehrte Apoptose der Oligodendrozyten aufgrund metabolischer Störungen. CD8 CD8-T-Zelle; MF Makrophage; MOG Myelin- Oligodendrozyten- Glykoprotein; ROS reaktive Sauerstoffverbindung; T T-Zelle; TNF Tumornekrosefaktor.

Der Nachweis der Entwicklung heterogener Läsionen bei MS- Patienten hat wichtige Auswirkungen auf die Therapie. Bislang können die meisten Patienten jedoch noch nicht eindeutig bestimmten Läsionstypen zugeordnet werden. In einem kleinen Studienkollektiv wurden die Patienten an Hand von MRT-, klinischen und histopathologischen Kriterien einem Plaquemuster zugeordnet. Überraschend war, dass Patienten mit Läsions Typ II zu 100% auf eine Plasmapherese positiv reagierten (Keegan et al. 2005). In Zukunft wird möglicherweise eine dem jeweiligen Läsionstyp zugeordnete spezifische Therapie möglich sein.

### **1.3 B- Lymphozyten und B- Zell aktivierende Faktoren**

Das menschliche Immunsystem besteht aus Antigen- präsentierenden Zellen sowie T- und B- Lymphozyten, die kontinuierlich in der Blutbahn zirkulieren. Dabei stehen B- Zellen neben dem Komplementsystem im Zentrum der humoralen Immunantwort und sezernieren als Plasmazellen Antikörper gegen gebundene Antigene. B- Zellen haben eine Halbwertszeit von vier bis acht Wochen (Linette et al. 1994).

T- und B- Lymphozyten entstehen gemeinsam aus einer pluripotenten Stammzelle, reifen in den primären lymphatischen Organen Thymus und Knochenmark heran und durchlaufen eine antigenspezifische Differenzierung in den sekundär-lymphatischen Organen der Peripherie wie zum Beispiel Lymphknoten und Milz.

An Hand von verschiedenen Oberflächenmarkern („cluster of differentiation“, CD) lassen sich die einzelnen Reifungsstufen der B- Zellen unterscheiden. So finden sich die Marker der heranreifenden B- Zelle CD19 und CD20 nicht auf Stammzellen oder Plasmazellen. Der Marker für Gedächtnis- B- Zellen ist CD 27, für Plasmazellen CD 138.

Reife B- Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche B-Zell-Rezeptoren an die jeweils ein bestimmtes Antigen binden kann. Durch die Bindung dieser Antigene werden die B- Zellen aktiviert, differenzieren daraufhin entweder zu Gedächtnis B-Zellen (Memory- B- Zellen) oder zu Plasmazellen und sezernieren Antikörper spezifisch gegen das gebundene Antigen (Rajewski 1996, Abb. 4). Zu Beginn der Antikörperreaktion werden vermehrt Immunglobuline der Klasse IgM freigesetzt, während dann im Verlauf der Immunantwort meist IgG- und IgA- Antikörper sowie geringe Mengen an IgE sezerniert werden. Plasmazellen haben eine kurze Lebensdauer von vier bis fünf Tage (Manz et al. 1997) und können bis zu 2000 Antikörper pro Sekunde vor allem im Knochenmark produzieren. Anschließend gehen sie in Apoptose. Da Plasmazellen keine membranständigen Immunglobuline exprimieren, interagieren sie nicht mit anderen Immunzellen. B-Zellen halten zusammen mit Gedächtnis- T-Zellen als immunologisches Gedächtnis die Immunität des Körpers bei einem zweiten Antigen- Kontakt aufrecht. Aus den aktivierten B-Zellen entstehen nach klonaler Expansion zum Teil die so genannten Gedächtniszellen. Diese haben zu dem ihnen

bekannten Antigen eine hohe Affinität und können bei einem erneuten Kontakt mit sehr kurzer Latenzzeit Antikörper bilden.

Die Reifung von T- Zellen findet hauptsächlich im Thymus statt. T- Zellen-Rezeptoren können nicht an freie Antigene binden. Sie erkennen nur Peptidfragmente, die von antigenpräsentierenden Zellen in MHC- Molekülen (major histocompatibility complex) präsentiert werden. Zu den antigenpräsentierenden Zellen zählen unter anderem Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Die CD4+ T-Zellen, auch T- Helferzellen genannt, erkennen nur MHC-Klasse II assoziierte Antigene. CD4+ T- Zellen produzieren bzw. induzieren die Produktion von Interleukinen (v.a. IL-4) und aktivieren so z.B. Makrophagen bzw. haben regulierende Wirkungen auf andere Lymphozyten. Je nach Interleukinausschüttung kommt es bei den CD4+ Zellen zu einer Differenzierung in TH1 oder TH2- Zellen. So fördert zum Beispiel Interferon gamma (INF- $\gamma$ ) und IL- 12, das von Natürlichen- Killer- Zellen produziert wird, die Ausbildung von TH1 Zellen. Es hemmt die Bildung von TH2- Zellen. IL-4 wiederum hemmt die Bildung von TH1 Zellen. Für TH2- Zellen gilt das gleiche umgekehrt. Bei der Multiplen Sklerose findet sich eine TH1- vermittelte, gesteigerte Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) Produktion mit nachfolgender Makrophagen- und Mikrogliahyperaktivität.

Die zytotoxischen T-Zellen, auch CD8+ T- Zellen genannt, erkennen MHC-I-assozierte Antigene und lysieren histokompatible, virusinfizierte oder anders veränderte Zielzellen. CD8+ T-Zellen führen über eine Freisetzung von Interleukinen und Induktion weitere nichtlytische Funktionen aus.

B- Zellen wirken während der T-Zell-B-Zell Kooperation als antigenpräsentierende Zellen und präsentieren Antikörper als Peptid- MHC II- Komplex auf ihrer Oberfläche. Sie spielen so neben den anderen antigenpräsentierenden Zellen eine essentielle Rolle für die körpereigene T- Zell Aktivierung.

Aktivierte B- Zellen setzen zusätzlich verschiedene Chemo- und Zytokine wie IL-6, IL- 10, IL-12 oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und IFN- $\gamma$  frei. Diese haben pro-inflammatorische Wirkungen.

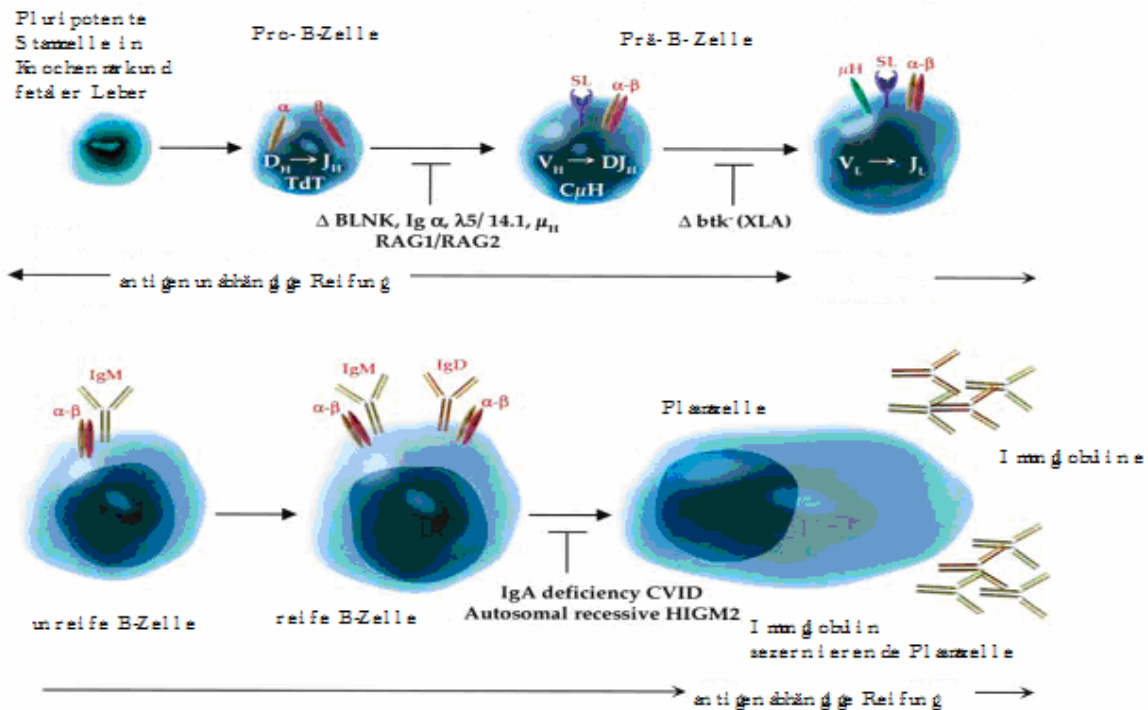


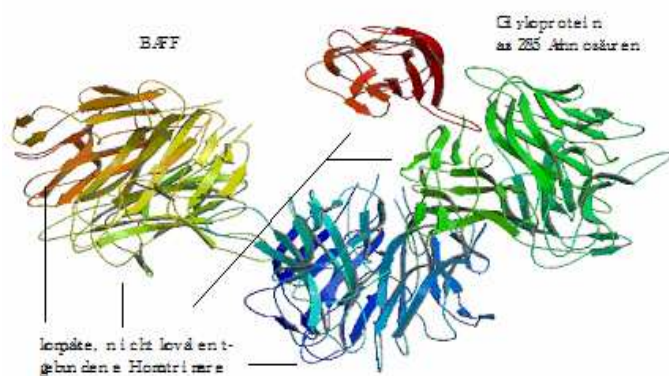
Abb. 4: B- Zell Reifung und Differenzierung modifiziert nach M. Ballow. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:581-91. In der fetalen Leber und dem Knochenmark reifen antigenunabhängig pluripotente Stammzellen heran, die sich über verschiedene Vorstufen durch antigenselektierung zu reifen B- Lymphozyten und Immunglobulin sezernierende Plasmazellen entwickeln. Im Verlauf agieren B-Lymphozyten zudem als antigenpräsentierende Zelle, in dem sie Peptid- MHC II- Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentieren.

### 1.3.1 Der B-Zell aktivierende Faktor BAFF

Der B-Zell aktivierende Faktor BAFF ist ein wichtiger Überlebensfaktor für B-Zellen (Schneider et al. 1999).

BAFF ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie und wird vor allem in Milz, Lymphknoten und in peripheren Leukozyten exprimiert. Dabei wird BAFF von myeloproliferativen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, als auch von Stromazellen der Lymphknoten und der Milz gebildet (Morre et al. 1999, Hase et al. 2004). Daneben sind auch neutrophile Granulozyten ein wichtiger

Produzent von BAFF. Außerdem gelang der Nachweis von BAFF mRNA in B-Zellen, die aus dem Knochenmark und dem Peritoneum von Mäusen isoliert wurden. (Van Trung Chu et al. 2007). BAFF ist ein aus 285 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das am Ende -124 glykosyliert wird. Es existiert als aktive lösliche und als membrangebundene sowie als Splice-Variante deltaBAFF. Es tritt in einer (homo-) trimeren Struktur auf, die für die TNF- Familie typisch ist. (Bodmer et al. 2002, Karpusas et al. 2002, Abb.5).



*Abbildung 5: Molekülstruktur des B-Zell aktivierenden Faktor BAFF (modifiziert nach <http://www.wwpdb.org/>)*

BAFF als B- Zell aktivierender Faktor wurde erstmals Ende der 1990er von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Daher sind in der Literatur auch andere Namen, wie BLyS (B Lymphocyte Stimulator), TALL-1 (TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1), THANK (TNF homolog activates apoptosis, nuclear factor- B und c- Jun NH2 terminal kinase), zTNF4 (z- tumor necrosis factor 4) und TNFSF 13b (TNF- Superfamily Member 13b) zu finden (Morre et al. 1999, Shu et al. 1999, Mukhopadhyay et al. 1999, Gross et al. 2000).

BAFF gilt seit seiner Entdeckung als essentieller Faktor für das Überleben von B-Zellen (Schneider et al. 1999). BAFF scheint dabei vor allem während der Reifung und Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle von Bedeutung zu sein (Schiemann et al. 2001, Schneider et al. 2001, Gross et al. 2001). Man geht davon aus, dass BAFF membranständig ist und seine Bildung durch Zytokine wie IFN- $\alpha$ , IFN $\gamma$  sowie IL-10 und andere Wachstumsfaktoren getriggert wird.

Die TNF-Superfamilie besteht zurzeit aus rund 40 identifizierten Ligand- und Rezeptorproteinen. Diese können sowohl Wachstum, als auch Differenzierung und Überleben von Zellen sowie die Apoptose der Zielzellen beeinflussen und modifizieren. Die Interaktion geschieht meist über membrangebundene beziehungsweise lösliche Liganden der TNF Superfamilie mit korrespondierenden membranständigen oder löslichen Rezeptoren (Aggarwal 2003, Gaur et al. 2003).

BAFF-bindende Rezeptoren sind BAFF-Rezeptor (BAFF-R), B cell maturation antigen (BCMA), und transmembran activator and CAML interactor (TACI) (Trembl et al. 2008). Alle drei Rezeptoren werden auf B-Lymphozyten exprimiert, TACI wurde auch auf aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen. (Thompson et al. 2001, Abb.6).

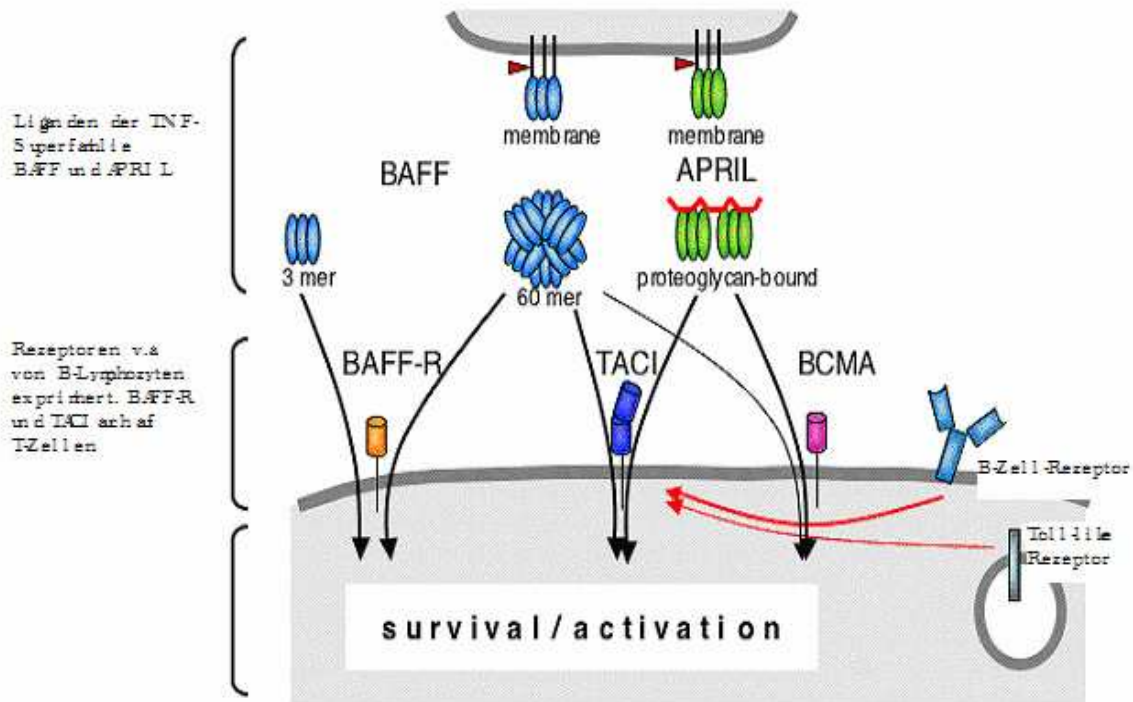


Abbildung 6: Interaktion von BAFF und APRIL mit ihren Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem modifiziert nach [www.unil.ch/.../ib/shared/Schneider/PS\\_Fig1.gif](http://www.unil.ch/.../ib/shared/Schneider/PS_Fig1.gif). BAFF; nicht APRIL bindet an BAFF-R. BCMA und TACI binden BAFF und APRIL. BAFF hat nur eine geringe Affinität zu BCMA. (Masters, Yan, Thompson 2002). Entscheidend für die B-Zell aktivierende Funktion des BAFF scheint nur die Bindung von BAFF an BAFF-R zu sein. Außerdem erfolgt damit die Ko-Stimulation von T-Zellen. Die Interaktion von BAFF mit TACI ist bewirkt einen Ig-Klassenwechsel und vermittelt eine T-Zell unabhängige Immunantwort. Durch die Bindung an TACI inhibiert BAFF das Überleben von B-Zellen. Durch die geringe Affinität von BAFF an BCMA und die Interaktion wird das Überleben von Plasmazellen beeinflusst.



Die Interaktion von BAFF und BAFF- R wird als verantwortlich für die Funktion von BAFF als den Überlebensfaktor für B- Zellen gesehen. Es konnte aber auch eine Co-stimulation von T- Zellen meist über BAFF- R gezeigt werden (Mackay et al. 2003, Ng et al. 2004). Umgekehrt zeigen Studien eine Reduktion der Anzahl der B-Zellen und der Antikörperproduktion, wenn BAFF inhibiert wurde (Yan et al. 2000).

Einen weiteren Liganden der TNF-Familie stellt APRIL (A proliferation inducing ligand) dar. Seine Rolle ist im Immunsystem noch nicht völlig geklärt (Trembl et al. 2008). APRIL wird ebenso wie BAFF hauptsächlich von myeloischen Zellen exprimiert und konnte bisher vor allem in Tumorgeweben nachgewiesen werden (Kelly et al. 2000). Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass APRIL die Zahl der in der Peripherie zirkulierenden B- Lymphozyten erhöht und auf die T- Zell- getriggerte Immunantwort supprimierend wirkt (Castigli et al. 2004, Stein et al. 2002, Varfolomeev et al. 2004). APRIL interagiert mit den Rezeptoren BCMA und TACI sowie mit Proteoglykanen der Zellmembran, nicht aber mit BAFF-R (Marsters et al. 2000, Bischof et al. 2006, Trembl et al. 2008).

Es zeichnet sich vermehrt ab, dass BAFF bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Lymphomen eine entscheidende Rolle spielt. BAFF stellt sich dabei als möglicher diagnostischer Marker und Ziel therapeutischer Behandlungsansätze dar und ist vermehrt Gegenstand der aktuellen Forschung bis hin zu Studien in klinischer Erprobung.

### **1.3.2 Die Rolle von BAFF bei autoimmunen und neuroimmunologischen Erkrankungen**

Wie bereits eingangs erwähnt reguliert BAFF als Zytokin die Aktivierung und Selektion von B- Lymphozyten und beeinflusst die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Inzwischen konnte bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren Syndrom sowie der systemischen Sklerose und dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) eine erhöhte BAFF- Konzentration im Serum nachgewiesen werden (Zhang et al. 2001, Matsushita et al. 2006). Zum Teil, wie bei der systemischen Sklerose, korreliert die Höhe der im Serum gemessenen BAFF Werte mit der Schwere der Krankheit (Zhang et al. 2001, Mariette et al. 2003). Auch in den Seren von Patienten mit systemischen Lupus erythematoses konnte ein erhöhter BAFF Spiegel nachgewiesen werden, dessen Höhe mit dem Grad der Krankheitsaktivität korreliert (Matsushita et al. 2006, Mariette et al. 2003).

Es wird davon ausgegangen, dass erhöhte BAFF Spiegel in Zusammenhang mit aktivierten B- Zellen und Plasmazellen stehen. Ebenso werden diese mit gesteigerter Krankheitsaktivität und Zunahme von Symptomen assoziiert (Cancro et al. 2003, Van Trung Chu et al. 2007).

Es ist bekannt, dass die Selektion und Aktivierung von B- Lymphozyten durch verschiedene Signalkaskaden, darunter auch BAFF, erfolgt. Erhält eine B-Zelle ein nur schwaches Signal zur Apoptose, so wird die Apoptose durch eine physiologisch vorhandene BAFF- Konzentration verhindert und die B- Zelle kann heranreifen (Bannish et al. 2001). Eine B- Zelle bekommt ein starkes Apoptose-Signal, wenn sie hochaffin an ein Auto-Antigen bindet. Die physiologisch vorhandene BAFF- Konzentration kann dies nicht ausgleichen, so dass die Zelle in Apoptose geht. Falls aber im Organismus eine Überproduktion an BAFF stattfindet und somit auch starke Apoptose-Signale unterdrückt werden, kann es geschehen, dass es zum Heranreifen autoreaktiver B- Zellen kommt und Autoimmunität ausgelöst wird. (Mackay et al. 2002). Schon seit längerem ist bekannt, dass B-Zellen und Plasmazellen in MS-Läsionen vorkommen (Prineas et al. 1979). Im Liquor von MS- Patienten finden sich differenzierte Gedächtnis- B- Zellen und Zentroblasten, die normalerweise in

lymphatischen Geweben vorkommen. Es wurde auch beschrieben, dass diese B-Zellen im Liquor von MS-Patienten persistieren (Cepok et al. 2005). Es scheint, als seien die regulatorischen Funktionen der Gedächtnis-B-Zellen bei der Multiplen Sklerose beeinträchtigt, sodass autoreaktive T-Zellen vermehrt aktiviert werden (Duddy et al. 2006). Zudem wird eine Assoziation eines hohen B-Zell-Anteils im Liquor, verglichen mit dem Anteil der Monozyten, mit einer raschen Progression der Multiplen Sklerose gesehen (Cepok et al. 2005).

Unlängst konnte nachgewiesen werden, dass der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF im ZNS vor allem von Astrozyten gebildet und freigesetzt wird (Krumbholz et al. 2005). Außerdem ist BAFF in aktivierten MS-Läsionen bei akuten und chronischen Verläufen sowie in primären ZNS-Lymphomen hochreguliert. Dabei war jedoch im Liquor cerebrospinalis der betroffenen Patienten der BAFF-Spiegel nicht erhöht. Ob BAFF dabei in den Läsionen kumuliert oder durch die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie gelangt, bedarf weiterer Klärung (Krumbholz et al. 2005). Eine weitere Studie zeigt, dass die BAFF-Spiegel im Serum von MS-Patienten, die mit Interferon-beta (INF- $\beta$ ) behandelt wurden, deutlich erhöht waren (Krumbholz et al. 2008). Die Bildung von BAFF kann durch Zytokine wie IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder IL-10 getriggert werden (Aggarwal 2003, Gaur et al. 2003). Es erscheint daher durchaus möglich, dass auch Interferon-beta (INF- $\beta$ ) bei MS-Patienten zu erhöhten BAFF-Serumkonzentrationen führt (Krumbholz et al. 2008).

Darüber hinaus ließ sich in der Studie von Krumbholz et al. (2008) kein Unterschied in der BAFF-Serumkonzentration zwischen untherapierten MS-Patienten und Gesunden nachweisen. Dies ist ein überraschender Befund, da bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der systemischen Sklerose oder Lupus erythematosus, die BAFF-Serumkonzentration erhöht ist und zum Teil mit den Antikörperspiegeln korreliert (Matsushita et al. 2006). Außerdem führt eine Überproduktion von BAFF im Tiermodell zu spontanen Autoimmunerkrankungen (Matsushita et al. 2006).

Dies könnte dafür sprechen, dass das Serumkompartiment in der Pathogenese der Multiplen Sklerose nicht involviert ist. Diese entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems scheint sich in allen Stadien vor allem im Liquorkompartiment abzuspielen. Die Rolle von BAFF bedarf somit vor allem bei Krankheiten wie der MS weiterhin intensiver Forschungsarbeit.

## **1.4 Fragestellung**

Die Rolle der B-Zell-Regulation in der Ätiologie und Pathogenese entzündlicher ZNS-Erkrankungen, vor allem der Multiplen Sklerose ist bisher nicht geklärt und Gegenstand verschiedenster Forschungsansätze.

In letzter Zeit zeigte sich zunehmend, dass B- Lymphozyten und deren assoziierten Faktoren, allen voran der B- Zell aktivierende Faktor BAFF, mutmaßlich eine entscheidende Rolle im Krankheitsbeginn und –verlauf dieser Erkrankungen spielen.

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragen:

1. Unterscheidet sich die BAFF- Konzentration in Serum und Liquor von neu diagnostizierten MS von Erreger-bedingten entzündlichen ZNS- Erkrankungen oder gesunden Kontrollen?
2. Sind erhöhte BAFF- Spiegel im Liquor Resultat einer Störung der Blut-Hirn Schranke oder einer intrathekalen Produktion?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In dieser Studie wurde die BAFF Konzentration in Serum und Liquor von insgesamt 137 Patienten mittels ELISA bestimmt. Eingeschlossen wurden 50 Patienten mit neu diagnostizierter Multiplen Sklerose (MS) nach den Diagnosekriterien von Mc Donald et al. (2001). Darunter sind 16 männliche und 34 weibliche Patienten. Das durchschnittliche Alter lag bei  $39.2 \pm 12.2$  Jahren (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Eine weitere Gruppe der Studie waren Patienten mit infektiösen Erkrankungen (ID) des zentralen Nervensystems (n= 35, 19 männlich, 16 weiblich). Der Altersdurchschnitt liegt bei  $50.3 \pm 18.2$  Jahren. Acht der gemessenen Patienten litten an einer Neuroborreliose. Weitere 27 Patienten waren an einer viralen oder bakteriellen Meningitis erkrankt.

Die dritte Gruppe der Studie waren 52 Patienten ohne entzündliche oder infektiöse ZNS- Erkrankung als gesunde Kontrollgruppe. (Healthy controls, HC). In dieser Gruppe befinden sich 30 männliche und 22 weibliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von  $48.6 \pm 16.2$  Jahren. Die Patienten wurden zum Ausschluss einer organischen Erkrankung punktiert. Eine entzündliche oder tumoröse ZNS- Erkrankung oder eine Erkrankung mit strukturellen Veränderungen des Nervensystems lag bei diesen Patienten nicht vor.

Die Seren und Liquores wurden in der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen, nach entsprechender Aufklärung und Zustimmung der betreffenden Patienten gesammelt. Das Material wurde bis zur Austestung bei  $-20^\circ$  gelagert. Ein positiver Bescheid der Ethikkommission zu dieser Studie lag vor.

## **2.2 Methode**

### **2.2.1 Enzyme- linked immuno sorbent assay (ELISA)**

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren zur quantitativen Konzentrationsbestimmung diverser Proteine.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Sandwich- ELISA Technik, werden zwei Antikörper, die spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden, benutzt. Zunächst wird eine Mikroplatte (96- Well- Platte) mit dem ersten Antikörper (Coating-Antikörper) beschichtet. Anschließend folgt eine Inkubationsphase unterschiedlicher Dauer. In dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase erfolgt eine Wasch-Phase. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dabei entfernt. Zurück bleibt das am Antikörper gebundene Antigen. Anschließend wird ein weiterer Antikörper (Detektions-Antikörper) zugegeben. Dieser Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen.

Am Ende des Detektions- Antikörper ist ein Enzym, zum Beispiel die Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish), die alkalische Phosphatase (AP) oder auch die Glucoseoxidase (GOX) gebunden.

Im weiteren Verlauf wird ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgen kann (Abb.7). Gemessen wurde mit dem ELISA Messgerät BEP 2000 Advance der Firma Dade Behring (Marburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) im Labor für Liquordiagnostik der Klinik für Neurologie, Giessen.

Die Bestimmung der BAFF Konzentration in Serum und Liquor in dieser Arbeit erfolgte an Hand des ELISA- Kit „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ der Firma R & D Systems (Minneapolis, USA).

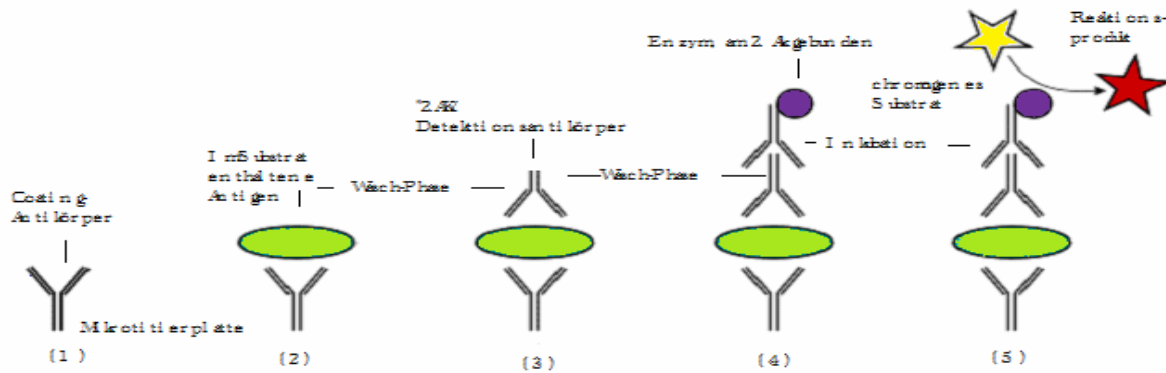


Abb.7: Schemadarstellung Sandwich- Elisa, modifiziert nach J. M. Vinocur. Auf eine mit einem coating-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte (1) wird die entsprechende Probe zugegeben und inkubiert (2). Anschließend wird der Detektions—Antikörper (3) sowie der enzyme-linked Antikörper (4) zugegeben und es entsteht eine Komplexbildung zwischen Antikörper und Antigen. Zum Abschluss erfolgt das Auftragen eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird (5).

### 2.2.2. Bestimmung der BAFF- Konzentration mit dem „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ ELISA

Die Serum und Liquorproben der zu messenden Patienten wurden aufgetaut und anschließend zu jeweils 100 µl in Eppendorf Röhrchen portioniert. Die Liquorproben wurden unverdünnt gemessen. Die Serumproben wurden mit dem Calibrator Diluent RD6Q im Verhältnis 1: 2 verdünnt.

Die in dem „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ ELISA Kit der Firma R& D Systems enthaltene 96-Well Platte ist mit einem monoklonalen anti-BAFF Antikörper beschichtet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem vom Hersteller beigefügten Protokoll. Es wurde eine Doppelbestimmung von jeder Probe und jedem Standard angefertigt. Der erste Schritt war die Anfertigung einer BAFF-Standard-Verdünnungsreihe. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde zusammen mit den präparierten Liquor- und Serumproben in die Mikroplatte gegeben und für zwei

Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Phase wird jedes BAFF-Protein der Proben und Standards durch die immobilen Antikörper gebunden. Nach Abschluss der zweistündigen Inkubationszeit erfolgte ein Waschvorgang. In diesem wurden durch insgesamt viermaliges Waschen ungebundene Substanzen entfernt. Als nächster Schritt wurde auf die 96-Well Platte ein Enzym-gekoppelter polyklonaler BAFF-Antikörper zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubationsphase von insgesamt zwei Stunden bei Raumtemperatur. Im nachfolgenden Waschvorgang wurde dann ungebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz gewegewaschen. Anschließend wurde mit einer Substratlösung im Dunkeln inkubiert. Die sich entwickelnde Farbreaktion ist proportional zur gebundenen BAFF- Menge in den einzelnen Wells der Platte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer Stop- Solution in die Mikroplatte beendet. Die sich bei dem Vorgang entwickelte Farbtintensität wurde innerhalb der ersten 30 Minuten nach Zugabe der Stop- Solution in dem ELISA- Reader BEP 2000 Advance der Firma Dade Behring bei einer Wellenlänge 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen. An Hand der Messergebnisse der BAFF-Standardverdünnungsreihe wird eine Standardkurve gebildet, durch welche die BAFF- Konzentration der Proben bestimmt wird. Es wurde für jede Probe einschließlich des BAFF-Standards eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert für jede Probe ermittelt. Die optischen Dichte (OD) - Werte wurden gemittelt und die Konzentration wurde an Hand einer Verdünnungsreihe des im ELISA-Kit mitgeliefertem BAFF-Standard berechnet. Bei der Verdünnungsreihe des BAFF-Standards ist die BAFF-Konzentration bekannt. Die Verdünnungsreihe des BAFF- Standards wurde bei jedem Versuch als Doppelbestimmung gemessen und dabei für jede Messung neu angesetzt.



Die BAFF- Konzentration der verschiedenen Proben wurde anhand unten folgender Formel errechnet. In Abbildung 8 ist der Wert des OD- Faktors 0.0999. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt 0.006.

$$\text{BAFF- Konzentration (ng/ml)} = \frac{\text{Gemessener OD} - \text{Faktor}}{\text{Steigung der Ausgleichsgeraden}}$$

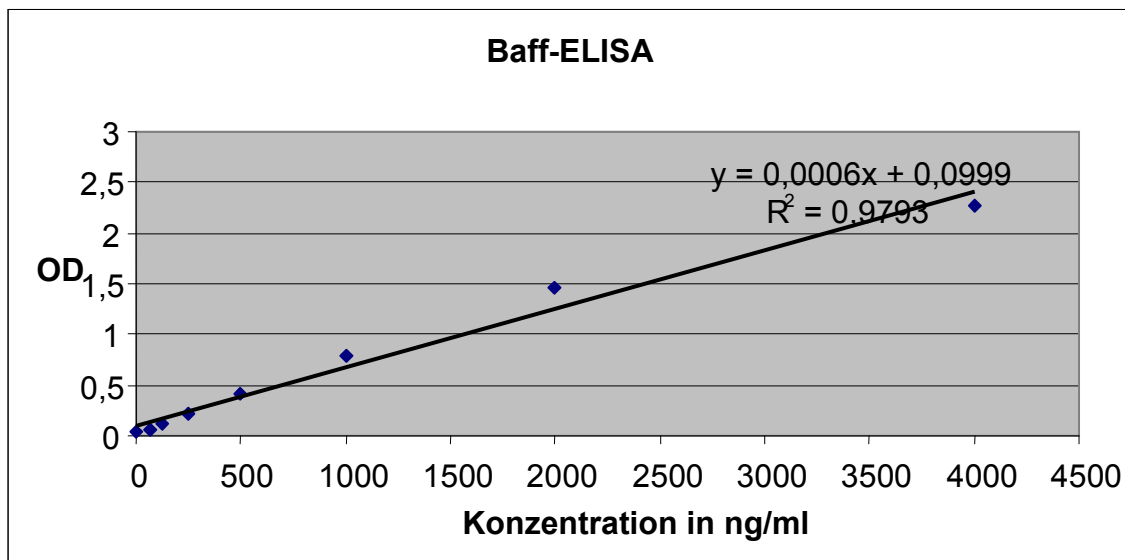


Abbildung 8: BAFF- Standard Verdünnungsreihe

Der BAFF- Standard wurde mit dem Testkit mitgeliefert und nach Herstellerangaben verdünnt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung bei jeder Messung. Dabei war die Konzentration des BAFF Standards bekannt. In der Abbildung wurde die gemessene optische Dichte (OD) der einzelnen Mittelwerte einer BAFF- Verdünnungsreihe gegen die bekannte BAFF- Konzentration in ng/ ml aufgetragen. Anschließend wurde die BAFF- Konzentration der einzelnen Proben anhand der aufgetragenen Ausgleichsgeraden berechnet.

## **2.3 Statistik**

Für die Berechnung von Unterschieden stetiger Merkmale wurde bei zwei verschiedenen Gruppen der t- Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde mittels ANOVA analysiert. Ein p- Wert  $< 0.05$  wurde als signifikant betrachtet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 4.02 © (San Diego, USA).

## **3. Resultate**

### ***3.1 BAFF- Serumkonzentrationen von Patienten mit Multipler Sklerose und Kontrollen***

Es wurden Seren von 50 MS- Patienten, 35 Patienten mit infektiösen ZNS-Erkrankungen und von 52 gesunden Kontrollpatienten untersucht. Dabei wurden die Seren in einer Verdünnungsreihe von 1:2 in den ELISA eingesetzt.

Die BAFF- Serum Konzentration der gemessenen MS- Patienten war signifikant niedriger als bei den gemessenen ID- Patienten, nicht aber im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Kontrollen. (MS  $0.43 \pm 0.14$  ng/ml, ID  $0.54 \pm 0.24$  ng/ml, HC  $0.45 \pm 0.24$  ng/ml;  $p < 0.05$ , Abb.9). Die BAFF- Konzentration im Serum der Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen war signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpatienten (HC  $0.45 \pm 0.24$  ng/ml, ID  $0.54 \pm 0.24$  ng/ml,  $p < 0.001$ , Abb.9).

### ***3.2 BAFF- Liquorkonzentrationen von Patienten mit Multipler Sklerose und Kontrollen***

Es wurden die Liquores von 50 MS- Patienten, 35 Patienten mit infektiösen ZNS-Erkrankungen und von 52 gesunden Kontrollpatienten untersucht. Dabei wurden die Liquorproben unverdünnt in den ELISA eingesetzt.

Die BAFF- Konzentration im Liquor von Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen war signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpatienten und den gemessenen MS- Patienten (HC  $0.25 \pm 0.14$  ng/ml, ID  $0.97 \pm 0.78$  ng/ml, MS  $0.16 \pm 0.11$  ng/ml  $p < 0.001$ ). Die BAFF- Konzentration im Liquor der gemessenen MS- Patienten war signifikant niedriger als in der gemessenen Kontrollgruppe (HC  $0.25 \pm 0.14$  ng/ml, MS  $0.16 \pm 0.11$  ng/ml,  $p < 0.05$ , Abb.10).

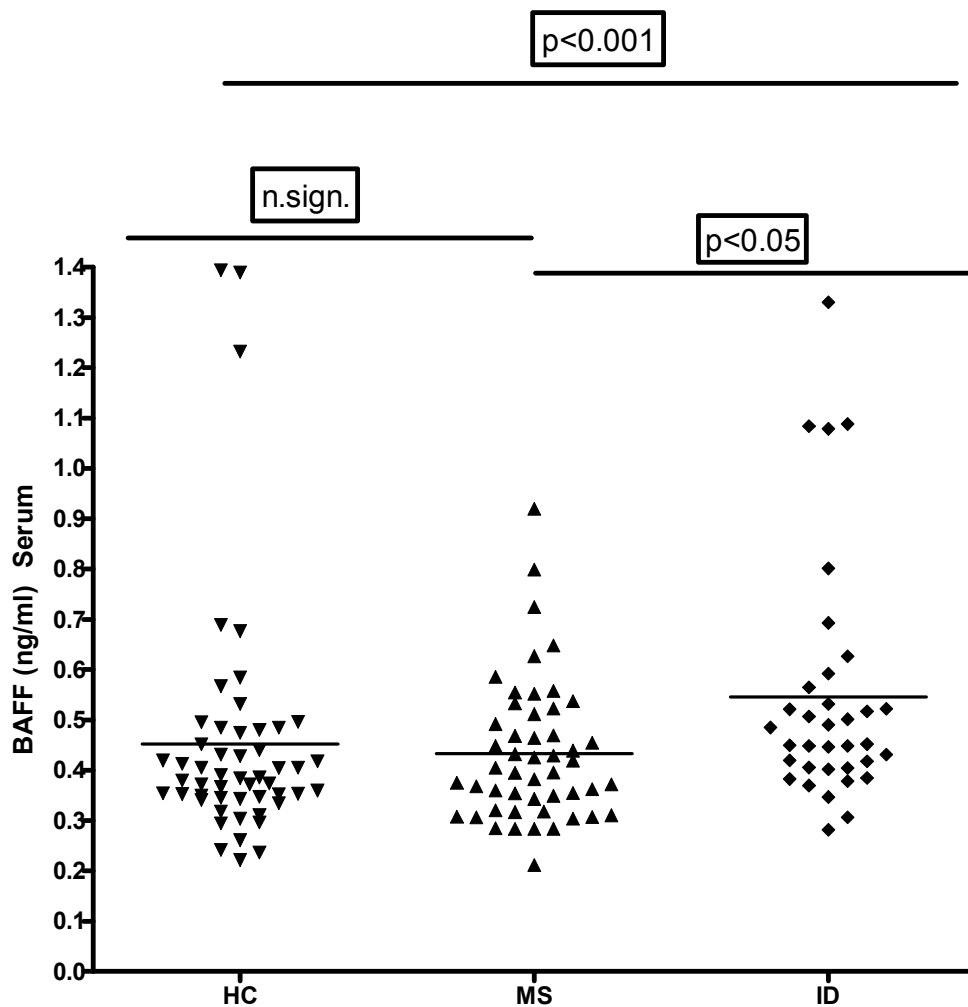


Abbildung 9: BAFF- Konzentration in Patientenserum

Die BAFF- Konzentration wurde in den Seren der drei verschiedenen Patientengruppen mittels ELISA bestimmt. Dabei wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:2 in den ELISA eingesetzt. Es wurde eine Doppelbestimmung jeder Serumprobe durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

MS= MS- Patienten, ID= infectious disease, Patienten mit infektiöser ZNS-Erkrankung, HC= healthy control, gesunde Kontroll- Patienten.

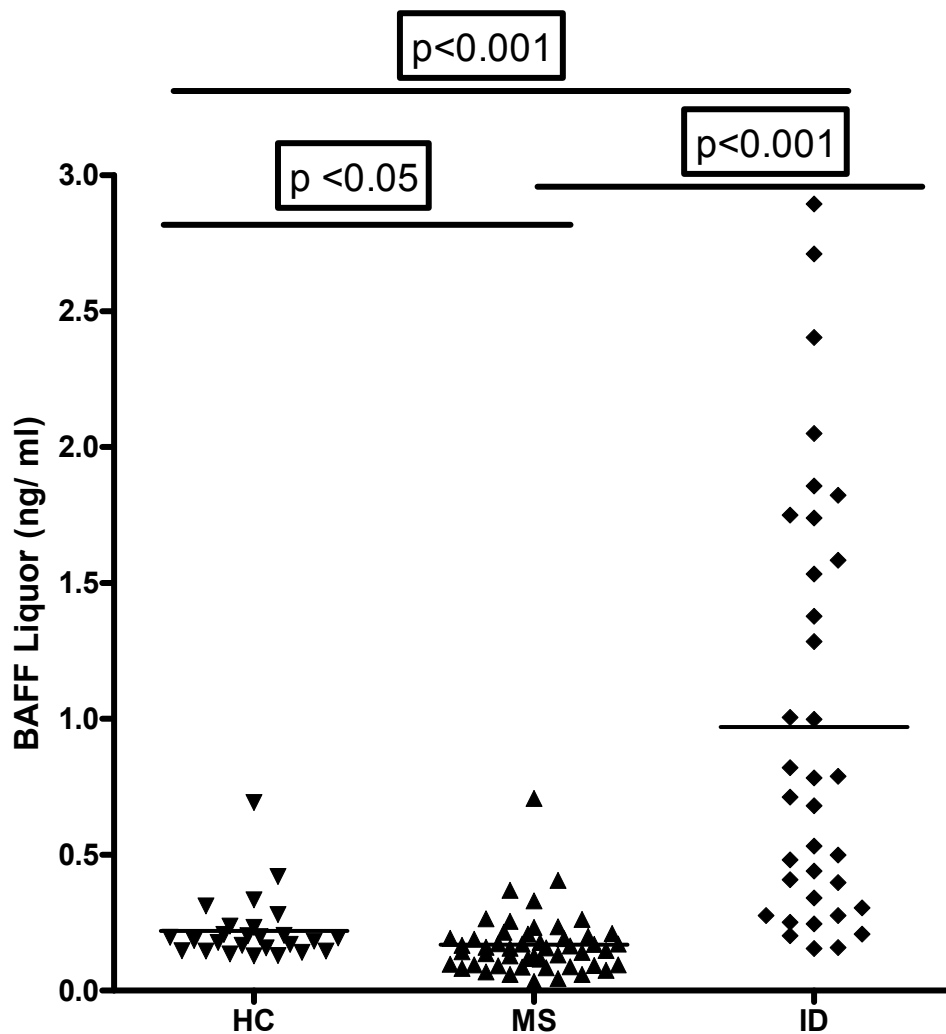


Abbildung 10: BAFF- Konzentration in Patientenliquores

Die Liquormessung zur Bestimmung der BAFF- Konzentration erfolgte per Doppelbestimmung mittels ELISA. Anschließend wurden die Mittelwerte errechnet.

MS= MS- Patienten, ID= infectious disease, Patienten mit infektiöser ZNS-Erkrankung, HC= healthy control, gesunde Kontroll- Patienten.

### **3.3 BAFF-Liquor/ Serum Quotient und Albumin Liquor/ Serum Quotient**

Der Albumin Liquor/ Serum Quotient ( $Q_{Alb} = \text{Liquor/ Serum} \cdot 1000$ ) gilt als Maß einer Schrankenstörung der Blut- Hirn Schranke (Anderson et al. 1994, Reiber et al. 2003). Albumin wird ausschließlich außerhalb des ZNS gebildet und gelangt über die Blut- Hirn Schranke in das ZNS. Bei Störungen der Blut-Liquor-Schrankenfunktion durch Veränderung der Liquorflussgeschwindigkeit und konsekutiv veränderter Schrankenpassage der Plasmaproteine kommt es zur Erhöhung des Albumins im Liquor. Dabei variieren die Normwerte des Albumin Liquor/Serum Quotienten für Erwachsene altersabhängig zwischen 5.0 und  $\leq 8.0$ . Die Konzentration wird routinemäßig in der Liquordiagnostik per Nephelometrie bestimmt und konnte so für jeden Patienten ermittelt werden.

Die Konzentration von BAFF im Liquor wird entscheidend durch drei Faktoren bestimmt: (1) die BAFF- Serumkonzentration, (2) die Permeabilität der Blut- Hirn Schranke und (3) die mögliche intrathekale Synthese von BAFF im Liquorkompartiment durch Leukozyten. Daher wurde in dieser Arbeit zum einen das Verhältnis der Konzentration von BAFF in Liquor und Serum (BAFF -Liquor/ Serum Quotient=  $CSF/ S$ ) bestimmt. Ein erhöhter BAFF- Liquor/ Serum Quotient kann sowohl auf eine Schrankenstörung oder eine intrathekale Produktion von BAFF zurückzuführen sein. Dies kann durch die Bestimmung des Albumin-Quotienten weiter differenziert werden. Daher wurden das Verhältnis der Albumin-Konzentration in Serum und Liquor für jeden Patienten der einzelnen Gruppen berechnet und miteinander verglichen.

Während bei den ID- Patienten eine signifikante Erhöhung des Albumin Liquor/ Serum Quotienten gemessen wurde, war der Albumin Liquor/ Serum Quotient der MS-Patienten im Vergleich zu dem Quotienten der Kontrollpatienten nicht signifikant erhöht (ID  $19.0 \pm 25$ ; MS  $5.8 \pm 2.5$ ; HC  $6.1 \pm 2.4$ ,  $p < 0.05$ , Tab.2). Bei den Patienten mit infektiöser ZNS- Erkrankung liegt im Gegensatz zu den MS und HC Patienten eine Störung der Blut- Hirn Schranke vor.

*Tabelle 2: Vergleich der Mittelwerte der Albumin Quotienten (QAlb) jeder Diagnosegruppe.*

<b>Diagnose</b>	<b>Albumin Quotient (QAlb) ± StAbw.</b>
Healthy control (HC)	6.1 ± 2.4
Multiple Sklerose (MS)	5.8 ± 2.5
Infectious disease (ID)	19.0 ± 25

Der BAFF- Liquor/ Serum Quotient (CSF/S Ratio) der MS- Patienten war signifikant erniedrigt verglichen mit dem BAFF- Liquor/ Serum Quotienten der gesunden Kontrollpatienten und der Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen. (MS 0.32 ± 0.30 vs. ID 0.87 ± 1.0 vs. HC 0.57 ± 0.26,  $p < 0.001$ , Abb. 11)

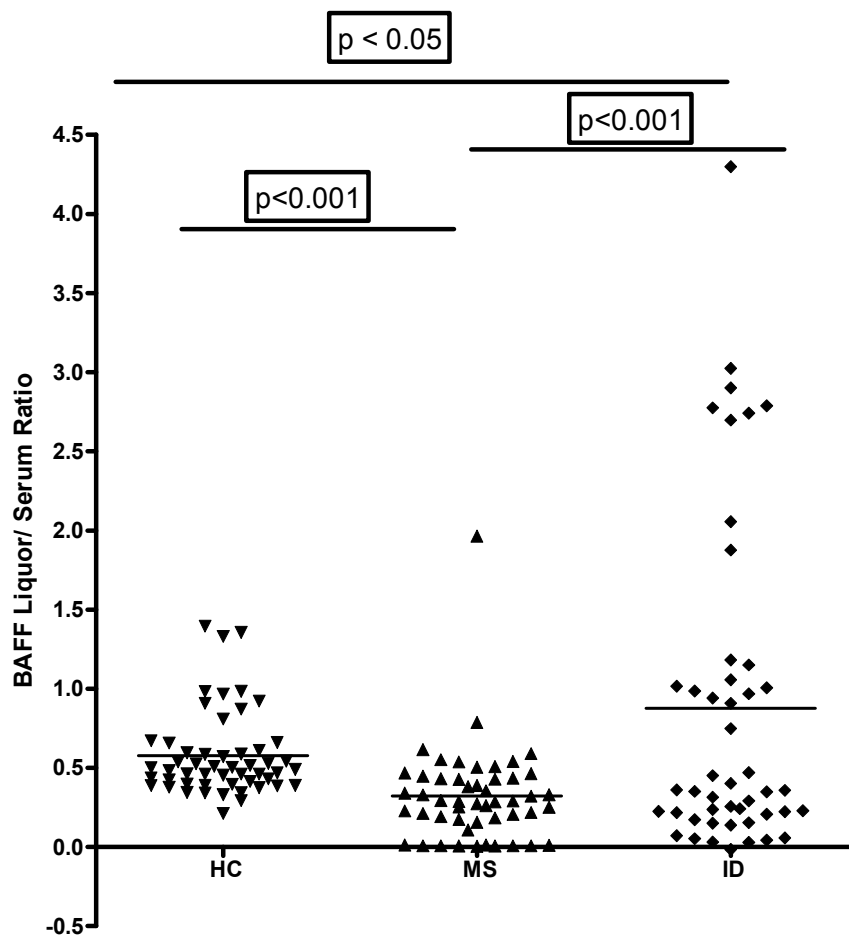


Abbildung 11: Vergleich der BAFF Liquor/ Serum Quotient

Um den Einfluss der Serumkonzentration von BAFF auf die BAFF- Liquor Konzentration zu eliminieren, wurde die BAFF- Konzentration im Liquor durch die BAFF- Konzentration im Serum des jeweiligen Patienten geteilt.

MS= MS- Patienten, ID= infectious disease, Patienten mit infektiöser ZNS- Erkrankung, HC= healthy control, gesunde Kontroll- Patienten.



Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die erhöhte BAFF-Konzentration im Liquor von Patienten mit infektiöser ZNS- Erkrankung auf eine Störung der Blut- Hirn Schranke zurückzuführen ist.

Die MS-Gruppe zeigte im Serum keine signifikant unterschiedliche BAFF-Konzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die Liquor- BAFF Konzentration der MS- Patienten war signifikant niedriger als in der gemessenen Kontrollgruppe. Dabei lag der Albumin Liquor/ Serum Quotient ( $Q\text{ Alb} = \text{Liquor/ Serum} \cdot 1000$ ), als Maß einer Schrankenstörung der Blut- Hirn Schranke, bei den MS- Patienten im Durchschnitt innerhalb des Normbereiches. Ein Hinweis auf eine Schrankenstörung besteht somit nicht.

### 3.4 Liquorbefunde

*Tabelle 3: Liquorbefunde der untersuchten Patientengruppen.*

	Healthy controls (HC)	Multiple Sklerose (MS)	Infectious disease (ID)
Positive Oligoklonale Banden	3/52 (1 n.bestimmbar)	38/50 (3 n.bestimmbar)	14/35 (3 n.bestimmbar)
Mittelwert der Zellzahl ( $\mu\text{l}$ ) $\pm$ StAbw	$1.7 \pm 1.5$	$8.5 \pm 15.9$	$775.2 \pm 2148.1$

Bei den gemessenen Patienten der gesunden Kontrollgruppe (HC) waren bei drei der 52 Patienten positive oligoklonale Banden nachweisbar. Im Vergleich dazu waren bei 38 der 50 gemessenen Patienten der Multiple Sklerose (MS) Gruppe positive oligoklonale Banden bestimmbar. Bei der Gruppe der infektiösen ZNS- Erkrankungen (ID) konnten bei 14 der 35 Patienten positive oligoklonale Banden nachgewiesen werden. Bei den gesunden Kontrollpatienten eine Zellzahl von  $1.7 \pm 1.5$  Zellen/  $\mu\text{l}$  nachweisbar (Tabelle 3).

In der Gruppe der MS- Patienten wurde eine Zellzahl von  $8.5 \pm 15.9$  Zellen/  $\mu\text{l}$  bestimmt. Im Vergleich dazu lag bei den entzündlichen ZNS- Erkrankungen die mittlere Zellzahl bei  $775.2 \pm 2148.1$  Zellen/  $\mu\text{l}$ .

Oligoklonale Banden deuten auf eine subakute oder chronische Entzündungsreaktion im ZNS hin. Sie sind das Resultat einzelner hochregulierter Plasmazellklone. Bei rund 95% der Patienten mit einer klinisch gesicherten MS sind positive oligoklonale Banden im Liquor nachweisbar. Nach den Mc Donald Kriterien kann eine Multiple Sklerose diagnostiziert werden, wenn nach einem ersten Krankheitsschub im Liquor MS-typische Veränderungen nachweisbar sind und sich in der Magnetresonanztomographie mehr als zwei charakteristische Läsionen zeigen. Außerdem muss die zeitliche Dissemination der Läsionen nachgewiesen werden (Mc Donald et al 2001, Polmann et al 2005). Meist lässt sich im Liquor von MS- Patienten zudem eine mäßige Pleozytose aus Lymphozyten und Monozyten ( $<50$  Zellen / $\mu\text{l}$ ) nachweisen.

### ***3.5 Korrelation der Serum- und Liquorbefunde mit der Klinik der MS- Patienten***

Es erfolgte eine klinische Verlaufskontrolle ein Jahr nach stattgehabter Lumbalpunktion und Diagnosestellung mittels Recherche in den elektronischen Patientenakten und Arztbriefen der jeweiligen Patienten.

Als Kriterium wurde dabei der EDSS (expanded disability status score) ein Jahr nach erfolgter Liquorpunktion herangezogen. Eine EDSS- Veränderung  $\pm 0.5$  bedeutet einen klinisch stabilen Verlauf bzw. Besserung. Eine Erhöhung des EDSS  $\geq 1$  gibt eine Progredienz der Erkrankung an. Zusätzlich wurde erhoben, ob die jeweiligen Patienten eine Basistherapie (wie z.B. Interferon, Copaxone) erhielten.

Über 23 der gemessenen MS- Patienten liegen keine weiteren Befunde vor.

Acht der Patienten, die keine Basistherapie erhielten, zeigten sich im klinischen Verlauf stabil bzw. verbesserten sich, d.h. EDSS  $\pm 0.5$ . Ein MS- Patient, der mit Betaferon (Interferon beta-1b) therapiert wurde, zeigte über ein Jahr einen stabilen klinischen Verlauf. In der untherapierten Gruppe der MS- Patienten verschlechterten sich sieben Patienten im EDSS- Score um mindestens 1 Punkt (EDSS  $\geq 1$ ).

Im Vergleich dazu lag bei elf Patienten, die eine Basistherapie erhielten, nach einem Jahr der EDSS Score  $\geq 1$ . Von den elf therapierten MS- Patienten wurden neun Patienten mit Betaferon (Interferon beta-1b 250  $\mu$ g alle 2 Tage), ein Patient mit Copaxone (Glatirameracetat 20 mg täglich) und ein Patient mit Mitoxantron behandelt. Siehe dazu auch Tabelle 4.

*Tabelle 4: EDSS Score der MS-Patienten ein Jahr nach Liquorpunktion.*

	EDSS $\pm 0.5$	EDSS $\geq 1$
ohne Basistherapie	8	7
mit Basistherapie	1	11

Bei den acht MS- Patienten ohne Basistherapie mit stabilem klinischen Befund (EDSS  $\pm 0.5$ ) lag die mittlere BAFF- Liquorkonzentration bei 0.15 ng/ml  $\pm$  0.06. Der BAFF- Liquor/ Serum Quotient lag im Mittelwert bei 0.22  $\pm$  0.2. Bei den sieben MS- Patienten ohne Basistherapie mit einer Zunahme des EDSS- Scores  $\geq 1$  lag die mittlere BAFF- Liquorkonzentration bei 0.13 ng/ml  $\pm$  0.08 ng/ml. Der BAFF- Liquor/ Serum Quotient der Patienten mit Schubereignis lag im Mittelwert bei 0.32  $\pm$  0.2 ng/ml.

*Tabelle 5: Veränderung des EDSS- Scores im Vergleich mit BAFF- Liquorkonzentration und BAFF Liquor/ Serum Quotienten bei Patienten ohne Basistherapie (CSF/S Ratio).*

	Pat. ohne Basistherapie, EDSS $\pm 0.5$ (n=8)	Pat. ohne Basistherapie, EDSS $\geq 1$ (n=7)
BAFF- Liquorkonz. (ng/ml) $\pm$ StAbw.	0.15 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.08
Liquor/ Serum Quotient	0.22 $\pm$ 0.2	0.32 $\pm$ 0.2

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der BAFF- Liquorkonzentration der Patienten ohne Basistherapie mit stabilem klinischen Verlauf (EDSS  $\pm$  0.5) bzw. nicht stabilem Verlauf (EDSS  $\geq$  1) ( $0.15 \pm 0.06$  ng/ml vs.  $0.13 \pm 0.08$  ng/ml; n.sign.). Der Mittelwert des Liquor/ Serum Quotienten der MS- Patienten ohne Basistherapie erreichte keinen signifikanten Unterschied ( $0.22 \pm 0.2$  ng/ml vs.  $0.32 \pm 0.2$  ng/ml; n.sign., Tab.5).

Bei den neun MS- Patienten ohne Schub lag die mittlere BAFF- Liquorkonzentration bei  $0.141$  ng/ml  $\pm$  0.07. Der BAFF- Liquor/ Serum Quotient lag im Mittelwert bei  $0.19 \pm 0.19$ . Bei den 18 MS- Patienten mit Schüben innerhalb eines Jahres, lag die mittlere BAFF- Liquorkonzentration bei  $0.14$  ng/ml  $\pm$  0.08 ng/ml. Der BAFF- Liquor/ Serum Quotient der Patienten mit Schubereignis lag im Mittelwert bei  $0.29 \pm 0.19$  ng/ml.

*Tabelle 6: Schubereignis in Vergleich mit BAFF- Liquorkonzentration und BAFF Liquor/ Serum Quotienten (CSF/S Ratio).*

	Ohne Schub (n=9)	Mit Schub (n=18)
BAFF- Liquorkonz. (ng/ml) $\pm$ StAbw.	$0.14 \pm 0.07$	$0.14 \pm 0.08$
Liquor/ Serum Quotient	$0.19 \pm 0.19$	$0.29 \pm 0.19$

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der BAFF- Liquorkonzentration der Patienten ohne bzw. mit Schubereingis ( $0.14 \pm 0.07$  ng/ml vs.  $0.14 \pm 0.08$  ng/ml; n.sign.).

Der Mittelwert der Liquor/ Serum Ratio der MS- Patienten mit Schubereignis war zwar im Vergleich zu den Patienten ohne Schub tendenziell erhöht, erreichte aber keine Signifikanz ( $0.29 \pm 0.19$  ng/ml vs.  $0.19 \pm 0.19$  ng/ml; n.sign., Tab.6).

## 4. Diskussion

Multiple Sklerose ist die weltweit häufigste chronische entzündliche ZNS Erkrankung mit den höchsten Inzidenzraten in Europa und Nordamerika (Brody 1972). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt um das dreißigste Lebensjahr und Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Nach dem klinischen Verlauf wird zwischen dem klinisch isolierten Syndrom (CIS), der schubförmigen („relapsing-remitting“, RRMS), der sekundär progrediente (SPMS) und der primär progredienten (PPMS) Verlaufsform unterschieden (Mc Alpine et al. 1972). Die am häufigsten auftretenden Erstsymptome der Multiplen Sklerose sind Sensibilitätsstörungen, Gangstörungen oder eine Optikusneuritis (Weinshenker et al. 1989). Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es bei der Hälfte der unbehandelten MS- Patienten zu einer progredienten Zunahme der neurologischen Defizite.

Bis vor Kurzem wurde auf Grund der Experimentell Autoimmunen Enzaphalomyelitis (EAE) Tiermodelle davon ausgegangen, dass T-Zellen die entscheidende Rolle in der Pathogenese der MS als Autoimmunerkrankung spielen (Gold et al. 2006). Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass CD20+ und CD27+ B- Zellen bei MS- Patienten fehlreguliert sind, so dass aktivierte T- Zellen mehr aktiv sein können (Duddy et al. 2007, Fillatreau et al. 2002). Bislang ergaben histopathologische Untersuchungen von cerebralen Plaques verschiedenster MS- Patienten vier unterschiedliche Läsionsmuster (Lucchinetti et al. 2000). Bei Muster I und II überwiegen zelluläre (T- Zellen, Makrophagen) und humorale (Antikörper, Komplement) Bestandteile des Immunsystems. Bei den Läsionen, die Muster III und IV zuzuordnen waren, ließ sich eine „primäre Oligodendropathie“ mit fast vollständig fehlender Entzündungsreaktion nachweisen. Eine Immunglobulin- oder Komplementablagerung ist nicht nachweisbar. B-Zellen und Plasmazellen bilden im ZNS Antikörper. Diese finden sich im Liquor cerebrospinalis in abnormaler Verteilung als oligoklonale Banden. Die oligoklonalen Banden sind bei den meisten MS- Patienten bereits zu Beginn der Erkrankung vorhanden und für eine Diagnosestellung bedeutsam. Die Banden persistieren und sind über viele Jahre im Liquor nachweisbar.

Vor gut einem Jahrzehnt wurden erstmals die Proteine BAFF (B- Zell aktivierender Faktor aus der Tumor- Nekrose-Faktor- Superfamilie) und APRIL (A proliferation inducing ligand) identifiziert (Schneider et al. 1999). BAFF und APRIL werden von myeloproliferativen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen gebildet. Diese Faktoren haben nachweislich Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung von B- Zellen und können den Isotypenwechsel der Immunglobuline auf B-Zellen auslösen (Castigli et al. 2005). Jedes der beiden Proteine bindet an spezifische Rezeptoren, welche vornehmlich von B-Zellen exprimiert werden. BAFF bindende Rezeptoren sind BAFF-Rezeptor (BAFF-R), B cell maturation antigen (BCMA), und transmembran activator and CAML interactor (TACI) (Tremel et al. 2008). Die Bildung von BAFF wird durch Zytokine wie IFN-  $\alpha$ , IFN $\gamma$  sowie IL-10 und andere Wachstumsfaktoren getriggert.

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass vor allem BAFF eine große Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielt. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression von BAFF in transgenen Mäusen zu erhöhten peripheren B-Zell Spiegel, der Bildung von Autoantikörpern und zu einem Lupus-ähnlichen Syndrom führt (Lit-Hung 2004, Strohl et al. 2005, Matsushita et al. 2006). Auch konnten bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren Syndrom sowie der systemischen Sklerose und dem systemischen Lupus erythematodes eine erhöhte BAFF- Konzentration im Serum nachgewiesen werden (Zhang et al. 2001, Matsushita et al. 2006). Bei der systemischen Sklerose und dem Sjögren Syndrom, korreliert die Höhe der im Serum gemessenen BAFF Werte mit der Schwere der Krankheit und mit der Höhe der Autoantikörperspiegel (Matsushita et al. 2006, Mariette et al. 2003). Es wird davon ausgegangen, dass erhöhte BAFF Spiegel in Zusammenhang mit aktivierten B- Zellen und Plasmazellen stehen. Auch werden diese mit gesteigerter Krankheitsaktivität und Zunahme von Symptomen assoziiert (Cancro et al. 2009, Van Trung Chu et al. 2007).

Das kindlichen Opsoklonus- Myoklonus Syndrom ist eine Autoimmunerkrankung, die als paraneoplastisches Syndrom im Rahmen von Neuroblastomen oder parainfektios auftritt (Blaes et al. 2005). Fühlhuber et al. wiesen in Liquores von Kindern mit Opsoklonus- Myoklonus- Syndrom (OMS) erhöhte BAFF- Spiegel nach. Diese korrelierten mit der Höhe der Autoantikörper gegen Granularisneurone (CGN-Antikörper) (Fühlhuber et al. 2009). Einer weiteren Arbeitsgruppe gelang der

Nachweis einer vornehmlichen B-Zell Antwort im Liquor der gemessenen OMS-Patienten im Vergleich zum Serum (Pranzatelli et al. 2004). Eine Erhöhung der BAFF-Konzentration im Serum der OMS- Patienten konnte nicht detektiert werden. Da bei den gemessenen Patienten keine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorlag, muss von einer intrathekalen Produktion von BAFF bei Patienten mit Opsoklonus-Myoklonus- Syndrom ausgegangen werden (Fühlhuber et al. 2009).

Ausgehend von den vorgenannten Befunden nahmen wir an, dass die Konzentration von BAFF im Liquor, eventuell auch im Serum, von Patienten mit MS als Ausdruck einer gesteigerten Autoimmunität erhöht sein sollte. Überraschenderweise konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die BAFF- Serumspiegel bei Patienten mit Multipler Sklerose nicht erhöht waren im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten. Im Liquor von Patienten mit diagnostizierter Multiple Sklerose war der BAFF- Spiegel sogar signifikant niedriger war als in der gesunden Kontrollgruppe. Dabei lag der Albumin Liquor/ Serum Quotient ( $Q\text{ Alb} = \text{Liquor/ Serum} * 1000$ ), als Maß einer Schrankenstörung der Blut- Hirn Schranke, bei den MS- Patienten im Durchschnitt innerhalb des Normbereiches. Ein Hinweis auf eine Schrankenstörung besteht somit nicht.

Krumbholz et al. beschrieben trotz einer erhöhten Expression von BAFF in intrazerebralen ZNS-Läsionen von MS- Patienten ebenfalls keine erhöhten BAFF-Liquorspiegel. BAFF war dabei auch im gesunden Gehirn und im Liquor in geringen Mengen nachweisbar. Es wurde auch eine Aktivierung des BAFF- Systems in aktiven intrazerebralen Läsionen von verstorbenen MS-Patienten beschrieben (Krumbholz 2005). Dabei gelang der Nachweis, dass BAFF und APRIL intrazerebral vornehmlich von Astrozyten produziert werden. Durch die kontinuierliche Stimulierung kommt es in den Meningen zur Ausbildung von Pseudofollikeln mit Keimzentren. Diese Follikel wurden unlängst bei MS- Patienten mit sekundär progredientem Verlauf nachgewiesen (Kalled 2005, Meinl et al. 2006).

Der B-Zell aktivierende Faktor BAFF ist aber nicht nur in aktivierten MS-Läsionen bei akuten und chronischen Verläufen, sondern auch in primären ZNS- Lymphomen hochreguliert (Novak et al. 2004). Es gibt Hinweise, dass BAFF bei der Entstehung von primären B-Zell ZNS-Lymphomen eine entscheidende Rolle spielt. Dabei wurde gezeigt, dass BAFF in ZNS- Lymphomen produziert wird. Außerdem wurde eine erhöhte Anzahl an BAFF-Rezeptoren, vornehmlich BAFF-R, in diesen Gewebeproben gefunden. Daher ist anzunehmen, dass eine lokale Produktion von

BAFF die Entstehung und Ausbreitung von primären ZNS- Lymphomen fördert (Mackay et al. 2002, Novak et al. 2004).

Infektiöse Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind meist viraler oder bakterieller Genese. Außerdem spielen Tumorerkrankungen im Sinne einer Meningitis carcinomatosa und entzündliche Erkrankungen im Rahmen von Vaskulitiden oder Kollagenosen eine Rolle. Bei den gemessenen Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen wurden in dieser Studie im Liquor und Serum im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant erhöhte BAFF- Spiegel gemessen. Bei ID- Patienten liegt zusätzlich eine Störung der Blut-Hirnschranke vor, da signifikante Erhöhung des Albumin Liquor/ Serum Quotienten gemessen wurde. Daher kann bei infektiösen ZNS- Erkrankungen davon ausgegangen werden, dass die erhöhten intrathekalen BAFF- Werte durch einen passiven Übertrittes des BAFF vom Serum in den Liquor bedingt sind. Dies bestätigt vorherige Arbeiten, die ebenso erhöhte BAFF- Serum- und Liquorspiegel bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen beschrieben hatten (Novak et al. 2004, Matsushita et al. 2006, Mackay et al. 2003).

Die erniedrigten BAFF-Liquorspiegel bei MS- Patienten sind ein überraschendes Ergebnis und könnte zum einen dafür sprechen, dass der B- Zell aktivierende Faktor BAFF in der Pathogenese der Multiplen Sklerose eine weniger bedeutende Rolle spielen könnte als in anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem Sjögren Syndrom oder dem Lupus erythematoses. Jedoch sprechen die bisherigen Studien dafür, dass BAFF nicht nur ein essentieller Faktor für das Überleben von B-Zellen ist, sondern eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielt (Schneider et al. 1999, Lit-Hung 2004). BAFF scheint vor allem während der Reifung und Differenzierung der B- Zelle zur Plasmazelle von Bedeutung zu sein (Schiemann et al. 2001, Schneider et al. 2001, Gross et al. 2000). Von einigen Autoren wurde bislang bei der Multiplen Sklerose eine Störung der allgemeinen B- Zell Regulation, vor allem CD20 und CD27 positive B- Zellen, beschrieben (Duddy et al. 2006, Fillatreau et al. 2002). Möglich erscheint also auch, dass die BAFF- Expression und Singaltransduktion bei MS fehlreguliert ist. Obwohl in cerebralen MS- Läsionen eine erhöhte BAFF-Expression von Astrozyten nachgewiesen werden konnte (Krumbholz et al. 2005), konnten bislang keine erhöhten BAFF-Liquorspiegel detektiert werden. Die BAFF-Liquorspiegel in meiner Arbeit waren signifikant niedriger als in den Liquores der gemessenen gesunden Kontrollpatienten. Es ist



daher auch zu diskutieren, ob die Verhältnisse in den cerebralen Plaques durch das Liquorkompartiment tatsächlich repräsentiert werden. Das Vorkommen von BAFF wurde bislang als aktive lösliche, als membrangebundene sowie als Splice-Variante deltaBAFF beschrieben (Bodmer et al. 2002, Karpusas et al. 2002). Es ist möglich dass BAFF in den cerebralen Läsionen vor allem in gebundener Form vorliegt und kumuliert.

Das Serumkompartiment scheint in der Pathogenese der Multiplen Sklerose nur eine geringfügige Rolle zu spielen. Auch in unserer Arbeit war der gemessene BAFF-Serumspiegel bei MS nicht höher als bei gesunden Kontrollpatienten. Es liegt die Vermutung nahe, dass sich die Multiple Sklerose als chronische entzündliche ZNS-Erkrankung in allen Stadien vornehmlich im ZNS-/ Liquorkompartiment abspielt. So beschrieben Thangarajh et al. zwar in MS- Patienten einen erhöhten Nachweis an BAFF mRNA in Monozyten und erhöhte BAFF-R mRNA in B- und T-Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Jedoch fanden sich gleich hohe BAFF-Spiegel in Serum und Liquor bei MS- Patienten und gesunden Kontrollen (Thangarajh et al. 2004).

BAFF wird nachweislich von myeloproliferativen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen gebildet. In den cerebralen MS-Läsionen können neben Astrozyten auch reichlich Makrophagen nachgewiesen werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die erhöhten BAFF-Spiegel in cerebralen MS-Läsionen sowohl durch Astrozyten, als auch durch Makrophagen bedingt sind (Krumbholz et al. 2005). Unter dem Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  produzieren Astrozyten bedeutend größere Mengen an BAFF als Makrophagen oder unstimulierte Astrozyten. Das von Astrozyten gebildete BAFF ist biologisch wirksam, es unterhält das Überleben von B-Zellen in vitro. BAFF produzierende Astrozyten finden sich dabei im cerebralen Gewebe vor allem in der Nähe von Makrophagen, die an ihrer Oberfläche den BAFF- Rezeptor BAFF-R als eine Bindungsstelle tragen. BAFF wiederum fördert nachweislich das Überleben von BAFF-R exprimierenden B-Zellen im Gehirn von MS-Patienten. Somit bleibt eine klonale Expansion von B-Zellen im ZNS bestehen.

Als Rezeptoren für BAFF sind bisher BAFF-Rezeptor (BAFF-R), B cell maturation antigen (BCMA), und transmembran activator and CAML interactor (TACI) beschrieben (Tremel et al. 2008). BCMA spielt dabei als ein Rezeptor für BAFF und APRIL eine entscheidende Rolle für die Persistenz von Plasmazellen (Cepok et al.

2005). Krumbholz et al. konnten zeigen dass BCMA in Gehirnen von Patienten mit Multipler Sklerose hochreguliert ist (Krumbholz et al. 2005). Lokalständig produziertes BAFF könnte zum langfristigen Überleben von Plasmazellen im ZNS beitragen. BAFF scheint dabei meist in gebundener Form im ZNS vorzuliegen und ist somit nur in geringen Mengen frei im Liquor cerebrospinalis vorhanden und nachweisbar.

Eine ähnliche Beobachtung wie bei BAFF beschreiben Krumbholz et al. mit CCL-2/MCP-1. Chemokine ligand 2 (CCL-2) oder auch monocyte chemotactic protein- 1 (MCP-1) ist ein Zytokin das zur Familie der Chemokine gehört und vor allem eine Rolle in der Rekrutierung von Monozyten, dendritischen Zellen und Gedächtnis- T-Zellen spielt. Dieses Zytokin ist wesentlich vorhanden im Liquor und vermehrt exprimiert in cerebralen MS- Läsionen. Aber die Konzentration des CCL-2/MCP-1 ist erniedrigt im Liquor von MS-Patienten (Krumbholz et al. 2005). Es ist anzunehmen, dass das Verhältnis von Produktion und Verbrauch von entzündlichen Zellen den Liquorspiegel des CCL-2/MCP-1 und ebenso den des B-Zell aktivierenden Faktors BAFF bestimmt.

In dieser Arbeit wurde zusätzlich ein Vergleich der BAFF- Liquorkonzentration mit dem klinischen Verlauf der MS- Patienten (Schubereignis ja oder nein innerhalb eines Jahres) durchgeführt. Als Kriterium wurde dabei der EDSS (expanded disability status scale) ein Jahr nach erfolgter Liquorpunktion herangezogen. Ein EDSS  $\pm$  0.5 bedeutet einen klinisch stabilen Verlauf bzw. Besserung. Eine Veränderung des EDSS  $\geq$  1 gibt eine Progredienz der Erkrankung an. Zusätzlich wurde erhoben, ob die jeweiligen Patienten eine Basistherapie (wie z.B. Interferon, Copaxone) erhielten. Acht der Patienten, die keine Basistherapie erhielten, zeigten sich im klinischen Verlauf stabil bzw. verbesserten sich, d.h. EDSS  $\pm$  0.5. Ein MS- Patient, der mit Betaferon (Interferon beta-1b) therapiert wurde, zeigte über ein Jahr einen stabilen klinischen Verlauf. In der untherapierten Gruppe der MS- Patienten verschlechterten sich sieben Patienten im EDSS- Score um mindestens 1 Punkt (EDSS  $\geq$  1).

Im Vergleich dazu lag bei elf Patienten, die eine Basistherapie erhielten, nach einem Jahr der EDSS Score  $\geq$  1. Von den elf therapierten MS- Patienten wurden neun Patienten mit Betaferon (Interferon beta-1b 250  $\mu$ g alle 2 Tage), ein Patient mit Copaxone (Glatirameracetat 20 mg täglich) und ein Patient mit Mitoxantron behandelt. Es fand sich dabei kein signifikanten Unterschied zwischen den BAFF-

Konzentrationen. Dies könnte daraufhin weisen, dass BAFF- Serum und Liquorspiegel bei der Multiplen Sklerose nicht mit der Krankheitsaktivität korrelieren und somit auch nicht als prognostischer Faktor herangezogen werden können. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass nur von 27 MS- Patienten nach einem Jahr Daten vorlagen. Über 23 Patienten lagen im Verlauf keine weiteren klinischen Informationen vor. Daher ist für die Fallzahl der nach beobachteten Patienten zu gering um eine endgültige Aussage zu treffen. Auch ist der Beobachtungszeitraum von einem Jahr begrenzt. Von Interesse wäre ein größerer Zeitraum über 2 bis 5 Jahre.

Eine spezifisch gegen B-Zellen gerichtete Therapie scheint dennoch eine neue Option in der Therapie der Multiplen Sklerose. Es wird die Entwicklung eines Antagonisten gegen BAFF als B- Zell stimulierender Faktor diskutiert und erprobt. Dieser würde dann das Überlebenssignal der B-Zellen blockieren. Der humane monoklonale Anti- BAFF-Antikörper LymphoStat-B ® (Belimumab) wird zurzeit in einer Phase III Studie mit Lupus erythematodes Patienten untersucht (Menge et al. 2009). Ein möglicher direkter BAFF-Inhibitor könnte aber zusätzlich zu einem verstärkten Wachstum dieser Zellen und damit sekundär zu noch höheren BAFF-Spiegeln führen (Van Trung Chu et al. 2007) und bedarf weiterer Prüfung.

Zusammenfassend ließen sich in den von mir untersuchten Liquores von MS-Patienten signifikant niedrigere BAFF- Spiegel nachweisen als in den gesunden Kontrollpatienten. Die gemessenen BAFF- Serumspiegel der MS- Patienten waren niedriger als bei den Kontroll- Patienten. Im klinischen Vergleich der MS- Patienten ein Jahr nach Entnahme des Liquor cerebrospinalis ließ sich, wahrscheinlich bedingt durch eine niedrige Fallzahl, kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und BAFF- Liquorkonzentration feststellen.

Bei den Patienten mit infektiösen ZNS- Erkrankungen waren die BAFF- Spiegel in Serum und Liquor erhöht im Vergleich zu den gemessenen MS- Patienten und zu den gesunden Kontrollpatienten. Die erhöhten BAFF- Liquorspiegel sind dabei auf eine Störung der Blut- Hirnschranke zurückzuführen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double- edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 745-56
2. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 205-217
3. Andersson M, Alvares-Cermeo J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Frederikson S et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47: 694-706.
4. Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47: 694- 706.
5. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan M, Olek MJ, Baker, KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG, Lappin PB, Riccobene T, Abramian D, Sekut L, Strum B, Poortman C, Minter RR, Dobson CL, Williams E, Carmen S, Smith R, roschke V, Hilbert DM, Vaughan TJ, Albert VR. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B- lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum.* 2007; 48: 3253-3265.
6. Baecher- Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J. Exp Med* 2004; 200: 273-276.
7. Bannish G, Fuentes-Panana EM, Cambier JC, Pear WS, Monroe JG. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *J Exp Med* 2001; 194:1583-96.
8. Banwell BL. Pediatric multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2004; 4:245-252
9. Benoist C, Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2001; 2:797-801.
10. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 19-26.
11. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Sem in Immunol* 2006; 18: 263- 275.

12. Bischof D, Elsawa SF, Mantchev G, Yoon J, Michels GE, Nilson A, Sutor SL, Platt JL, Ansell SM, Bulow von G, Bram RJ. Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* 2006; 107:3235-42.
13. Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in MS: mechanism and functional consequences. *Curr Opin Neurol*; 2001.14:271-278.
14. Blaes, F, Fülhuber V, Korfei M, Tschernatsch M, Behnisch W, Rostasy K, Hero B, Kaps M, Preissner KT. Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. *Ann.Neurol* 2005; 58:313-317.
15. Brody JA. Epidemiology of multiple sclerosis and possible virus aetiology. *The Lancet*, Volu, 300, Issu 7769, 1972; 173-176.
16. Cangro MP, Smith SH. Cutting edge: B cell receptor signals regulate BLYS receptor levels in mature b cells and their immediate progenitors. *J Immunol* 2003. 170:5820-5823.
17. Cancro MP, D´Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte simulator (BLYS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2009;119(5):1066-73.
18. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu s, Lam KP, Bram RJ, Jabara H, Geha RS. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B- cells. *J Exp Med* 2005; 201: 35-39
19. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS. Impaired IgA class switching in APRIL- deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 3903-8
20. Cepok S, Jacobsen M, Schock S et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124: 2169- 2176.
21. Cepok S, Zhou D, Srivastava R et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J. Clin Invest* 2005; 115: 1352-1360.
22. Delank HW, Gehlen W. *Neurologie*. 11. Auflage 2006; Thieme Verlag.
23. Duddy M, Bar- Or A. B cells in multiple sclerosis. *Int MS J* 2006; 13: 84-90
24. Ebers GC, Rice G, Lesaux J et al. Randomised double-blind controlled study of interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352:1498- 1504

25. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol* 2002 Oct;3(10):944-50.
26. Flachenecker et al. Multiple Sklerose Register in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg 105, Heft 7, 15.02.2008.
27. Fülhuber V, Bick S, Kirsten A, Hahn A, Gerriets T, Tschernatsch M, Kaps M, Preissner KT, Blaes F, Altenkämper S. Elevated B-cell activating factor BAFF, but not APRIL, correlates with the CSF cerebellar autoantibodies in pediatric opsoclonus- myoclonus syndrome. *J Neuroimmunol* 210 (2009); 87-91.
28. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003. 66:1403-8.
29. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129:1953-71.
30. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP et al. Disease modifying therapies in MS- report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS council für Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 2002; 58:169-178.
31. Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV, Gold R. Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis: evidence from clinical studies and practical recommendations. *Nervenarzt* 2001; 72:577-589.
32. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO, lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* (2002); 38(6):315–322
33. Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish- Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossmann A, Haugen H, Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 2000; 404: 995-9.
34. Hafler DA. Multiple Sclerosis. *J Clin Invest* 2004 Mar;113(6):788-94.
35. Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T. BAFF/Blys can

- potentiate B-cell selection with the B- cell coreceptor complex. *Blood* 2004; 103: 2257-2265.
36. Huitinga I, Ruuls SR, Jung S et al. Macrophages in T- cell line- mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 344-351.
  37. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA et al. Intramuscular interferon beta 1-a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The multiple sclerosis collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol*. 1996; 39:285-294.
  38. Kalled SL. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol Rev* 2005; 204: 43-54.
  39. Kappos C, Polman CH, Freedman MS et al. Treatment with interferon beta 1-b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006; 67:1242-1249.
  40. Karpusas M, Cachero TG, Qian F, Boriack-Sjodin A, Mullen C, Strauch K, Hsu M, Kalles SL. Crystal structures of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes. *J Mol Biol* 2002; 315:1145-54.
  41. Keegan M, König F, McClelland R et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 2005; 366: 579- 582.
  42. Kelly K, Manos E, Jensen G, Nadauld L, Jones DA. APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death. *Cancer Res* 2000; 60: 1021-7.
  43. Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer f, Hoffmann L.-A., Kümpfel T, Pellkofer H, Derfuss T, Ionescu C, Starck M, Hafner C, Hohlfeld R, Meinl E. Interferon- $\beta$  increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain* 2008; 131: 1455-1463.
  44. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalles SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 2005; 201: 195-200.
  45. Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-1452.

46. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7:115-21.
47. Linette GP, Korsmeyer SJ. Differentiation and cell death: lessons from the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 809-15.
48. Lit-Hung, Leung. Systemic lupus erythematosus: a combined deficiency disease. *Medic Hypotheses*. 2004; 62(6): 922-924
49. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 407-717.
50. Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996; 6:259-274.
51. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46:907-911.
52. Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B- cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 465-75.
53. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J: BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:231-64.
54. Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, Aloisi F. Intracerebral expression of CXCL 13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2004; 148:11-23.
55. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997; 388: 133-4.
56. Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, Kimberly R. The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 168-71.
57. Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A. Interaction of the TNF homologues BlyS and April with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol* 2000; 10:785-8.
58. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF level in patients with systemic sclerosis: enhanced



- BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54:192-201. edition. Edinburgh Scotland. Churchill Livingstone; 1972: 83-301.
59. McAlpine D, Lumsden CE, Acheson ED, multiple sclerosis: a reappraisal, second edition. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1972: 83- 301.
60. Mc Donald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, Mc Farland HF, Paty DW Polman CH, Reingold SC, Sandberg Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127.
61. Menge T, Büdingen HC, Dalakas MC, Kieseier BC, Hartung HP. B-Zell gerichtete Multiple Sklerose Therapie. *Der Nervenarzt* 2009; 80:190-198.
62. Meinel E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 2006; 59: 880- 892.
63. Miller DH, Filippi M, Fazekas F, et al. Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004;56:273– 278.
64. Morre PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, La Fleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen S, Fikes J, Hilber DM. Blys: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocytes stimulator. *Science* 1999; 285: 260-263.
65. Multiple Sklerose-Therapie-Konsensus-Gruppe (MSTKG). Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 2001; 72:150-157.
66. Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu GL, Aggarwal BB. Identification and characterization of a novel cytokine THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor – kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999; 274:15978-81.
67. Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Groom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalles L, Mackay F, Mackay CR. B- cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF)- R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 2004; 173: 807- 17.

68. Novak AJ, Grote DM, Stenson M, Ziesmer SC, Witzig TE, Habermann TM, Harder B, Ristow KM, Bram RJ, Jelinek DF, Gross JA, Ansell SM. Expression of BlyS and its receptors in B-cell non Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood* 2004; 104: 2247-53.
69. Polman CH, Reingold SC, Edan G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the "Mc Donald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58:840-846.
70. Pranzatelli MR, Travelstead AL, Tate ED, Allison TJ, Verhulst SJ. CSF B-cell expansion in opsoclonus-myoclonus-ataxia. *Pediatr. Neurol.* 2004; 27,384-387.
71. Prineas JW, Connell F. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1979; 5:22-31.
72. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352:1498–1504.
73. Qin Y, Duquette P, Zhang Y et al. Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Lab Invest* 2003; 83:1081-1088.
74. Rae-Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed KF. Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Multiple Sclerosis* (1999), Vol 5, No 3, 179-183.
75. Rajewski K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381: 751-8.
76. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G et al. Quality assurance for CSF protein analysis: International consensus by an internet-based group discussion. *Clin. Chem Lab Med* 2003; 41:331-7.
77. Rivers T, Sprunt D, Berry G, observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis. *J Exp Med* (1933), 39-53.
78. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD 25+CD4+regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-352.
79. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML. An essential role for BAFF in the normal

- development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001; 293:2111-4.
80. Schneider P, Mackay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999; 189: 1747-56.
  81. Schneider P, Takatsuka H, Wilson A, Mackay F, Tardivel A, Lens S, Cachero G, Finke D, Beermann F, Tschopp J. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med* 2001. 194: 1691-7.
  82. Shu HB, Hu WH, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 680-3.
  83. Söderström M, Ya-Ping J, Hillert J, Link H. Optic neuritis: prognosis for multiple sclerosis from MRI, CSF, and HLA findings. *Neurology* 1998; 50:708-714
  84. Stein JV, Lopez-Fraga, Elustodndo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodriguez D, Gomez-Caro R, De Jong J, Martinez AC, Medema JP, Hahne M. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 2002; 109: 1587-98.
  85. Steinman L. Multiple Sclerosis: a two stage disease. *Nat. Immunol* 2:762-764.
  86. Strohl W, Xu D, Kim KS, Koss MN, Jorgensen TN, Deocharan B, Metzger TE, Bixler SA, Hong YS, Ambrose CM, Mackay F, Morel L, Putterman C, Kotzin BL, Kalles SL. BAFF overexpression and accelerated glomerular disease in mice with an incomplete predisposition to systemic lupus erythematoses. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(7):2080-91.
  87. Thangarajh M, Gomes A, Masterman T, Hillert J, Hjelmström P. Expression of B-cell-activating factor of the TNF family (BAFF) and its receptors in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 152 (2004); 183-190.
  88. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001; 293:2108-11.

89. Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, Wang L, Lefevre EA, Cacheros TG, Mac Kay F, Bixler SA, Zafari M, Liu ZY, Woodcock SA, Qian F, Batten M, Madry C, Richard Y, Benjamin CD, Browning JL, Tsapis A, Tschopp J, Ambrose C. BAFF binds to the tumor necrosis factor- receptor- like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med* 2000; 192:129.
90. Tintoré M, Rovira A, Brieva L, Grivé E, Jardí R, Borrás C, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MRT criteria to predict conversion to clinically definite MS. *Am J Neurorad* 2000;21:702– 706.
91. Tintoré M, Rovira A, Rio J, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis – Application in first demyelinating episode. *Neurology* 2003;60:27– 30.
92. Trembl JF, Hao Y, Stadanlick JE, Cancro MP. The BLyS Family: Toward a Molecular understanding of B Cell Homeostasis. *Cell Biochem Biophys* 2008; 53: 1-16.
93. Tremlett H, Zhao Y, Devonshire V, UBC Neurologists, natural history comparisons of primary and secondary progressive multiple sclerosis reveals differences and similarities. *Journal of Neurol.* 2009; 256: 374-81.
94. Van Trung Chu, Enghard P, Riemekasten G, Berek C. In Vitro Activation Induces BAFF and APRIL Expression in B Cells. *J Neurol* 2007. 179: 5947-5957.
95. Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F, Seshasayee D, Wang h, Lawrence D, Olsson C, Tom L, Erickson S, French D, Schow P, Grewal IS, Ashkenazi A. APRIL- deficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 997-1006.
96. Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study I: clinical course and disability. *Brain* 1989; 112:133–146.
97. Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, Cancro M, Grewal IS, Dixit VM. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 2001; 11: 1547-52.
98. Yan, M, Marsters SA, Grewal IS, Wang H, Ashkenazi A, Dixit VM. Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity. *Nat Immunol* 2000; 1: 37-41.

99. Zhang Jm Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon SG, Fessler BJ, Bastian H, Kimberly RP, Zhou T. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001; 166:6-10.

## 6. Abbildungsverzeichnis

1. Modifiziert nach Virley, Neuro Rx Vol. 2, No.4 2005; Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.
2. Überblick über die an der Pathogenese der MS beteiligten Bestandteile des Immunsystems, modifiziert nach Kleinschnitz et al 2007.
3. Klassifikation der MS- Läsionen nach Lassmann et al 2001, modifiziert nach Trends Mol. Med. 7,115-121.
4. Ballow M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. J Allergy Clin Immunol 2002;109: 581-91.
5. Modifiziert nach <http://www.pdb.org/> Molekülstruktur des B- Zell aktivierenden Faktors BAFF.
6. Modifiziert nach [www.unil.ch/.../ib/shared/Schneider /PS\\_Fig1.gif](http://www.unil.ch/.../ib/shared/Schneider/PS_Fig1.gif). Interaktion von BAFF und APRIL mit ihren Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem.
7. Schemadarstellung Sandwich- Elisa, nach J. M. Vinocur; <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ELISAsandwich.svg&filetimestamp=20060509153928>
8. BAFF-Standard Verdünnungsreihe
9. BAFF-Konzentration in Patientenseren
10. BAFF-Konzentration in Patientenliquores
11. Vergleich der BAFF Liquor/Serum Quotienten

## 7. Tabellenverzeichnis

1. Mc Donald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, Mc Farland HF, Paty DW Polman CH, Reingold SC, Sandberg Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann Neurol 2001; 50: 121-127.
2. Vergleich der Mittelwerte der Albumin Quotienten (QA<sub>lb</sub>) jeder Diagnosegruppe.
3. Liquorbefunde der untersuchten Patientengruppen
4. EDSS Score der MS-Patienten ein Jahr nach Liquorpunktion.
5. Veränderung des EDSS- Scores im Vergleich mit BAFF- Liquorkonzentration und BAFF Liquor/ Serum Quotienten bei Patienten ohne Basistherapie (CSF/S Ratio).
6. Schubereignis in Vergleich mit BAFF- Liquorkonzentration und BAFF Liquor/ Serum Quotient (CSF/S Ratio).

## 8. Anhang

### Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Diskussion 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.



## Publikationsverzeichnis

Faltermeier K, Altenkämper S, Kaps M, Berghoff M, Blaes F. Decrease in the B-cell activating factor BAFF in the cerebrospinal fluid of patients with newly diagnosed multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15: S31-S150.

## Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. F. Blaes, für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährte engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen, die bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen voran Christian Dornes, Manuela Meixner und den Mitarbeitern des Liquorlabors für ihre Geduld und Unterstützung

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern.