

**Analyse der mRNA-Expression von Fas und seiner  
Signaltransduktionskaskade bei Multipler Sklerose und  
Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis**

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

vorgelegt von: Regina Hofmann, geb. Budde  
aus: Hilden

Gießen 2011

Aus dem medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie  
Klinik für Neurologie  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: PD Dr. med. M. Berghoff
  2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. H. Oertel
- Tag der Disputation: 19.07.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Erklärung .....</b>	<b>III</b>
<b>II. Zusammenfassung.....</b>	<b>IV</b>
<b>III. Summary .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Multiple Sklerose .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und Prädispositions-/Umweltfaktoren.....	1
1.1.3 Immunpathogenese.....	2
1.1.4 Verlaufsformen.....	3
1.1.5 Symptome.....	4
1.1.6 Diagnostik .....	4
1.1.7 Therapie.....	5
1.1.8 Das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis .....	6
1.2 Fas-vermittelte Apoptose .....	7
1.2.1 Aufbau und Funktion des Fas-Rezeptorkomplexes .....	7
1.2.2 Die Rolle der Fas-vermittelten Apoptose im Immunsystem.....	8
1.2.3 Zusammenhang zwischen Multipler Sklerose und Fas .....	10
1.3 Real Time-PCR im LightCycler.....	12
1.3.1 Der LightCycler.....	12
1.3.2 Detektion von PCR-Produkten mittels SYBR-Green .....	12
1.3.3 Schmelzkurvenanalyse .....	12
1.3.4 Grundlagen zur Quantifizierung einer Real Time-PCR.....	13
1.3.5 Optimierungsstrategien einer Real Time-PCR.....	14
1.4 Zielsetzung .....	16
<b>2. Patienten.....</b>	<b>17</b>
2.1 Rekrutierung der Patienten auf Station/in der Multiple Sklerose-Sprechstunde.....	17
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien .....	17
2.3 Gesunde Kontrollen.....	17
<b>3. Tiere.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
4.1 Material .....	20
4.2 Methoden.....	21
4.2.1 Leukozytenisolation .....	21
4.2.2 RNA-Isolation .....	21
4.2.3 cDNA-Synthese.....	21
4.2.4 Real Time-PCR im LightCycler.....	22
4.2.5 Erstellen der Zielsequenzen für die Verdünnungsreihen .....	22
4.2.6 Verdünnungsreihen .....	23
4.3 Statistische Auswertung .....	24

<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
5.1 Demographische Daten von Patienten und gesunden Kontrollen .....	25
5.2 Etablierung der Real Time-PCR .....	25
5.2.1. Verdünnungsreihe .....	26
5.2.1.1 Geradengleichung.....	26
5.2.1.2 Linearität .....	27
5.2.1.3 Amplifikationseffizienz.....	27
5.2.2 Spezifität der Primer.....	27
5.2.3 Reproduzierbarkeit .....	28
5.3. Relative mRNA-Expression der Marker bei Multipler Sklerose .....	30
5.3.1 Quotient Caspase 8/cFlip .....	31
5.3.2 Korrelation der Marker mit dem EDSS.....	32
5.3.3 Serielle Analyse der Marker.....	33
5.4 Relative mRNA-Expression der Marker bei Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis .....	34
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>36</b>
6.1 Vor- und Nachteile einer Real Time-PCR .....	36
6.2 Etablierung .....	38
6.2.1 Linearität .....	38
6.2.2 Amplifikationseffizienz.....	38
6.2.3 Spezifität.....	38
6.2.4 Reproduzierbarkeit .....	39
6.3 Expression der Marker bei Multipler Sklerose .....	40
6.3.1 mRNA Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8.....	40
6.3.2 Immunpathogenetische Bedeutung .....	42
6.3.3 Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 als laborchemische Verlaufskontrollen der Krankheitsaktivität bei Multipler Sklerose .....	43
6.4 Expression der Marker bei Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis .....	45
6.4.1 mRNA Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 .....	45
6.4.2 Immunpathogenetische Bedeutung .....	45
6.5 Vergleich beider Erkrankungen und Schlussfolgerung.....	49
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
 <b>Anhang</b>	
Abbildungsverzeichnis .....	-1-
Tabellenverzeichnis.....	-2-
Publikationsliste .....	-3-
Danksagung .....	-4-

## 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. Beiden von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“*

Gießen, den

---

R. Hofmann

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose (RR-MS) wurden in Leukozyten fluktuierende Fas-Expressionen während des Krankheitsverlaufs gemessen. Fas ist ein an der Regulation einer chronischen Immunantwort beteiligter Rezeptor, der durch Bindung der Fas-assoziierten Death Domain (FADD) und Spaltung von Caspase 8 den Zelltod auslösen kann. Bindet er cellular FLICE-like inhibitory protein (cFlip) anstelle von Caspase 8, werden proliferationsfördernde Signalwege aktiviert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der mRNA-Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 in Leukozyten des peripheren Bluts von MS-Patienten sowie in Leukozyten der Milz und des Zentralen Nervensystem (ZNS) bei Mäusen mit Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE). **Design/Methode:** Die Quantifizierung der mRNA-Level erfolgte mittels SYBR-Green Real Time-PCR. Es wurde eine Gruppe aus untherapierten RR-MS Patienten im Schub und drei Monate (Remission) danach untersucht und mit einer untherapierten Baselinegruppe ohne klinische Aktivität sowie gesunden Kontrollen verglichen. C57Bl/6 Mäuse wurde mit MOG<sub>35-55</sub> zur Induktion der EAE immunisiert und an Tag 8, 16 und 24 des Krankheitsverlaufs getötet. **Ergebnisse:** Bei den MS-Patienten fand sich abhängig vom Verlauf eine verminderte mRNA-Expression von Fas und Caspase 8, die negativ mit dem Behinderungsgrad der Patienten korrelierte. FADD war bei allen MS-Patienten im Vergleich mit den gesunden Kontrollen erhöht. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der cFlip mRNA-Expression zwischen den verschiedenen Gruppen. Bei EAE fanden sich keine Veränderungen der Transkriptlevel von Fas in der Milz, in den Leukozyten des ZNS war Fas jedoch an Tag 24 signifikant erhöht. Die FADD mRNA-Expression war in der Milz im Vergleich mit den gesunden Kontrolltieren erhöht, in den zerebralen Leukozyten im Vergleich mit der Milz jedoch erniedrigt. Es zeigten sich keine Veränderungen der cFlip mRNA-Expressionslevel in der Milz, in den Leukozyten des Gehirns waren die Transkripte jedoch an Tag 8 und 16 erhöht. Caspase 8 war in der Milz im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erniedrigt, stieg in den Leukozyten des ZNS jedoch an Tag 16 und 24 an. **Diskussion:** Bei MS zeigten sich erniedrigte mRNA-Expressionslevel von Fas und Caspase 8, zweier wichtiger Marker des programmierten Zelltodes. Beide korrelierten negativ mit dem Behinderungsgrad der Patienten. Die niedrige mRNA-Expression mag zu einer verminderten Apoptosefähigkeit in den Leukozyten beitragen und somit die Immunreaktion verlängern. Der deutliche Anstieg der Transkripte von Fas und Caspase 8 bei EAE in der Remission im ZNS könnte durch erhöhte Proteinlevel und damit verbesserte Apoptosekapazitäten zur Beendigung der Immunantwort beitragen.

## Summary

**Background:** Recent studies showed that Fas expression in leukocytes differs during the course of disease in Multiple Sclerosis (MS). Fas can regulate a chronic immune response by inducing apoptosis through FADD and Caspase 8. Binding of cFlip instead of Caspase 8 changes the signalling towards survival. Our objective was to characterize the mRNA-expression levels of Fas, FADD, Caspase 8 and cFlip in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in relapsing-remitting (RR-) MS and leukocytes from the spleen and the Central Nervous System (CNS) in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Design/Methods:** mRNA levels were quantified in leukocytes using SYBR-Green Real-Time PCR. RR-MS patients were studied in relapse and 3 month after relapse (remission) and compared to a baseline group with no clinical activity and healthy controls (HC). None of the patients were on immunomodulatory therapy. C57Bl/6 mice were immunized with MOG<sub>35-55</sub> to induce EAE and were killed during the course of disease at day 8, 16 and 24. **Results:** In MS, Fas and Caspase 8 mRNA expressions were decreased during the course of disease and showed a negative correlation with the severity of symptoms. The transcripts of FADD were increase in all patients groups. There was no significant change in cFlip mRNA expression in MS. In EAE, the transcripts of Fas did not differ within the spleen, but were increased in cerebral leukocytes at day 24. FADD mRNA expressions were increased in the spleen in comparison to the control animals, but were decreased in the leukocytes from the CNS. There was no significant change in cFlip mRNA expression in the spleen, but cerebral leukocytes showed an increase of cFlip transcripts at day 8 and 16. The transcripts of Caspase 8 were decreased in leukocytes from the spleen in comparison to healthy control animals, and were increased at day 16 and 24 in the CNS. **Conclusions:** In MS a decrease in the mRNA-levels of Fas and Caspase 8 is seen. Both transcripts correlate negatively with the severity of symptoms. Thus the transcripts of the proteins are decreased that are known to regulate a chronic immune response through apoptosis and might prolong disease activity. In EAE, Fas and cFlip mRNA expressions in the spleen did not change significantly, while Caspase 8 is decreased and FADD is up regulated. In the CNS, Fas, FADD and Caspase 8 are increased at day 24. Therefor the transcripts of the proteins are increased that can induce apoptosis and thus might contribute to the termination of the immunresponse in autoreactive leukocytes in the CNS.

## **1. Einleitung**

### **1.1 Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Entmarkungserkrankung von Gehirn und Rückenmark mit unbekannter Ätiologie. Traditionell wird sie als ein autoimmun vermitteltes Geschehen angesehen [1], bei dem es zur Einwanderung von Leukozyten in das zentrale Nervensystem (ZNS) und konsekutiver Zerstörung von Myelinscheiden und neuroaxonaler Schädigung kommt [2, 3]. Die Entmarkungen können herdförmig im gesamten ZNS auftreten und folglich die unterschiedlichsten neurologischen Symptome verursachen, wobei zu Beginn der Erkrankung oft Seh- und Sensibilitätsstörungen sowie Paresen im Vordergrund stehen [4]. Obwohl die MS die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter darstellt [5], ist sie trotz großer Forschungsanstrengungen bisher nicht heilbar. Allenfalls kann ihr Verlauf günstig beeinflusst werden.

#### **1.1.1 Epidemiologie**

Weltweit wird beobachtet, dass äquatornah lebende Menschen seltener an einer MS erkranken als Menschen aus nördlicheren oder südlicheren Breitengraden [6]. Im Fall einer Migration ändert sich jedoch das Erkrankungsrisiko: Migrieren Kinder oder Jugendliche aus einem äquatorfernen Land in ein Land mit niedrigerer MS-Prävalenz, übernehmen sie das niedrigere Erkrankungsrisiko des Ziellandes, während ältere Personen das Erkrankungsrisiko des Heimatlandes behalten [7].

In Deutschland ist die genaue Zahl der MS-Patienten nicht bekannt. Es wird jedoch geschätzt, dass die ungefähre Zahl aller MS-Erkrankten bei ca. 120.000 bis 140.000 Menschen liegt, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer [5]. Ungefähr 60-70 % der Erkrankungen beginnen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei etwa 0,2-0,5 % bereits vor dem 10. Lebensjahr beginnen [5].

#### **1.1.2 Ätiologie und Prädispositions-/Umweltfaktoren**

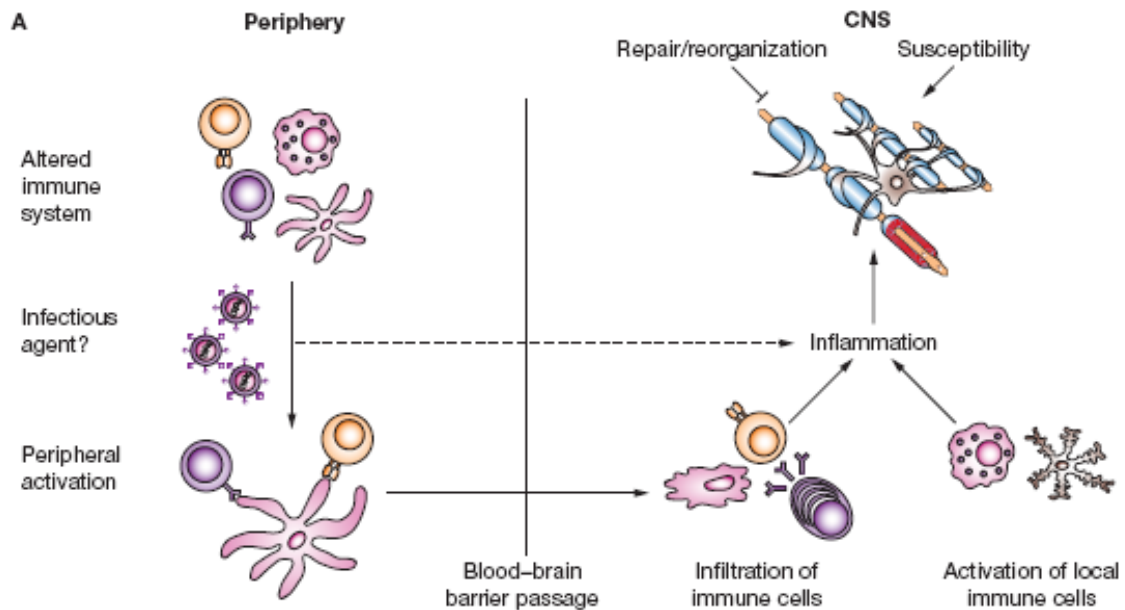
Bis heute ist die Ätiologie der MS nicht geklärt. Mehrere Prädispositions- und Umweltfaktoren scheinen jedoch in einem Zusammenhang mit der Erkrankung zu stehen. Aktuelle Erklärungsansätze gehen deshalb von einer multifaktoriellen Krankheitsgenese aus, bei der genetische Faktoren und Umwelteinflüsse Auslöser des immunologischen Geschehens sind [8, 9]. So konnte in Zwillingsstudien gezeigt werden, dass bei monozygoten Zwillingen eine Konkordanz zu erkranken von 25 % besteht, bei dizygoten Zwillingen von 5,4 % und



Geschwistern von 2,9 % [2]. In Genom-Scans konnte zusätzlich eine Vielzahl von Gen-Polymorphismen als prädisponierend für eine MS charakterisiert werden, deren Anzahl sich mittlerweile auf fast 50 identifizierte Allel-Frequenzen beläuft [10]. Die stärkste genetische Prädisposition scheint dabei für die Menschen zu bestehen, die Träger bestimmter HLA-Haplotypen wie z. B. DR2 oder A3 sind [11]. Außerdem wird von verschiedenen Umweltfaktoren angenommen, dass sie an der Genese einer MS beteiligt sein können. So wird z. B. vermutet, dass infolge einer Kreuzreaktion zwischen Oberflächenantigenen des Epstein Bar Virus und Proteinen der Myelinscheiden T-Helferzellen aktiviert werden, die die Autoimmunreaktion induzieren [12]. Infolge der geographisch unterschiedlichen Verteilung der MS ist eine weitere Annahme, dass eine gesteigerte Sonnenexposition sich positiv auf das Erkrankungsrisiko auswirkt bzw. der Vitamin D-Stoffwechsel in Zusammenhang mit der Erkrankung steht [13].

### **1.1.3 Immunpathogenese**

Bisher ist unklar, ob es sich bei der MS um eine einzige Erkrankung handelt oder ob die Entmarkungsprozesse im ZNS die gemeinsame Endstrecke verschiedener Erkrankungen sind [14]. Auch in der Peripherie gesunder Menschen können autoreaktive T-Helferzellen zirkulieren, die gegen Oberflächenantigene der Myelinscheiden gerichtet sind [15]. Aus unbekanntem Grund kommt es bei Patienten mit MS zu einer Aktivierung dieser Zellen durch antigenpräsentierende Makrophagen, woraufhin sie durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS einwandern und erneut mit „ihrem“ Antigen konfrontiert werden [16]. Da normalerweise im ZNS nur eine geringe Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen stattfindet, ist davon auszugehen, dass die Parenchymzellen im Gehirn aktiv an der Mitgestaltung des Entzündungsprozesses beteiligt sind [17]. Als Konsequenz der Antigen-Erkennung sezernieren die eingewanderten T-Helferzellen entzündliche Zytokine, die zum Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke und vermehrten Einstrom weiterer Immunzellen wie z. B. Makrophagen oder B-Zellen führen [18]. Im weiteren Verlauf kommt es zu Zerstörung von Myelinscheiden und axonaler Schädigung durch Makrophagen, proinflammatorische Zytokine, demyelinisierende Antikörper, im Rahmen der Inflammation freigesetzte Sauerstoffradikale und zusätzliche Aktivierung des Komplementsystems[19-26].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Immunreaktion bei Multipler Sklerose [27]**

Infolge eines veränderten Immunsystems bzw. einer veränderten Immunantwort und unter dem Einfluss von Umweltfaktoren entstehen autoreaktive T-Zellen, die durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS einwandern und zur Inflammation und Axonschädigung führen.

### 1.1.4 Verlaufsformen

Die verschiedenen Verlaufsformen einer MS lassen sich durch das Vorhandensein von Schüben unterscheiden, die durch das Auftreten einer neuen oder das Wiederaufflammen einer bekannten Symptomatik definiert sind [28]. Dabei muss der Schub länger als 24 Stunden persistieren ohne dass Fieber auftritt, wodurch man ihn von infektassoziierten Exazerbationen abgrenzen kann (Uthoff-Phänomen). Meist dauert ein Schub zwischen mehreren Tagen bis Wochen. Im Wesentlichen werden drei Verlaufsformen unterschieden [28]:

I. Relapsing-Remitting MS (RR-MS): Der schubförmiger Verlauf einer MS ist gekennzeichnet durch Schübe mit vollständiger Remission oder verbleibenden Residuen. Zwischen den einzelnen Schüben tritt keine Progression der Erkrankung auf.

II. Primary-Progressiv MS (PP-MS): Der primär progrediente Verlauf zeigt eine zunehmende Verschlechterung der Symptomatik von Krankheitsbeginn an, wobei einzelne Plateauphasen und geringfügige Verbesserungen möglich sind.

III. Secondary Progressiv MS (SP-MS): Beim sekundär progredienten Verlauf einer MS kommt es zum Übergang des schubförmigen Verlaufs in eine Phase zunehmender Verschlechterung der Symptomatik, in der teilweise noch Schübe auftreten können.

Neunzig Prozent der MS-Erkrankungen beginnen mit einem schubförmigen Verlauf, nur ca. 10 % zeigen eine primär progrediente Verlaufsform [5]. Nach einer durchschnittlichen

Krankheitsdauer von 10-15 Jahren gehen ca. 30-40 % der schubförmigen Erkrankungen in einen sekundär progredienten Verlauf über [5].

### **1.1.5 Symptome**

Da die Entmarkungsherde an den unterschiedlichsten Stellen im ZNS entstehen, können die Symptome einer MS sehr vielgestaltig sein [29]:

Bei etwa der Hälfte aller MS-Patienten sind Sensibilitätsstörungen nachweisbar, die als Parästhesien, Hitze- und Kältegefühle, Störungen des Vibrations- und Lagesinns, Beeinträchtigungen der Sensibilität und Schmerzempfindungen auftreten können. Bei ca. zwei Dritteln der MS-Patienten liegt im Verlauf der Erkrankung ein positives Lhermittsches Phänomen vor, welches als elektrischer Schlag im Nacken bei Kopfbeugen beschrieben wird [30]. Infolge von Läsionen der Pyramidenbahnen kann es zu Mono-, Hemi- oder Paraparesen, Reflexsteigerung, pathologischen Reflexen, fehlenden Bauchhautreflexen, spastischer Tonuserhöhung und Myoklonien kommen. Treten Herde im Kleinhirn auf, kann dies zu Stand-, Gang- und Zeigeataxie führen sowie zu Nystagmus und Intentionstremor. Ophthalmologische Störungen können als Visusminderung infolge einer Optikusneuritis auftreten, als Doppelbilder infolge von Augenmuskelparesen, als Bulbusschmerzen und Gesichtsfelddefekte. Bei vielen MS-Patienten stellt die Optikusneuritis das erste Symptom der Erkrankung dar. Des Weiteren können Beeinträchtigungen der Hirnnerven entstehen, wie z. B. Hypästhesien im Bereich des N. trigeminus oder eine Fazialisparese. Auch Blasen- und Mastdarmstörungen, Sexualstörungen oder psychische Veränderungen können je nach Stadium der Erkrankung Teil des Symptomkomplexes einer MS sein.

### **1.1.6 Diagnostik**

Die Diagnose einer MS wird anhand klinischer und laborunterstützter (MRT, Liquor) Kriterien gestellt. Dabei wird sich an den MS-Diagnosekriterien nach McDonald orientiert, die 2001 das erste Mal publiziert und 2005 sowie 2010 revidiert wurden [31-33]. Im Vordergrund der Diagnosefindung nach McDonald steht die räumliche und zeitliche Dissemination der Läsionen im MRT bzw. im klinischen Verlauf. Eine räumliche Dissemination gilt als erfüllt, wenn mehr als eine T2-Läsion in zwei von vier ZNS-Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) gefunden werden. Eine zeitliche Dissemination liegt bei Nachweis einer oder mehrerer neuer T2-Läsionen in einem Verlaufs-MRT vor. Alternativ können auch die gleichzeitige Anwesenheit von Kontrastmittel-

aufnehmenden und nicht aufnehmender Läsionen als zeitliche Dissemination gewertet werden.

**Tabelle 1: Modifizierte McDonald Kriterien nach Polmann et al., 2011 [32]**

<b>Schübe/ Klinik</b>	<b>Klinisch nachweisbare Läsionen</b>	<b>Zur Diagnose benötigte Zusatzuntersuchungen</b>
Zwei oder mehr	Zwei oder mehr	Keine; der klinische Befund reicht aus
Zwei oder mehr	Eine	Örtlich verteilte Läsionen im MRT <b>oder</b> weiterer klinischer Schub mit anderer Lokalisation im ZNS
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> zweiter klinischer Schub mit anderer Lokalisation im ZNS <b>sowie</b> zeitliche Verteilung (im MRT oder durch einen zweiten Schub)
Von Anfang chron. prog. Verlauf mit V. a. MS	Langsame neurologische Verschlechterung vereinbar mit MS	Ein Jahr Krankheitsprogression <b>und</b> zwei der folgenden Kriterien: a) räumliche Dissemination im MRT b) Spinales MRT positiv (zwei oder mehr herdförmige T2 Läsionen) c) Liquoranalyse positiv

### 1.1.7 Therapie

Bei der Therapie einer MS kann zwischen symptomatischer Therapie, Schubtherapie und immunmodulierender Langzeittherapie unterschieden werden. Bei der symptomatische Therapie steht die unmittelbare Behandlung der Symptomen durch Maßnahmen wie Physiotherapie, Logopädie und Psychotherapie oder die Gabe von direkt gegen die Beschwerden gerichteter Medikamente im Vordergrund (z. B. Antidepressiva bei depressiven Patienten). Im akuten Schub wird versucht mittels eines hochdosierten Kortisonstoßes die Rückbildung eines Schubs einzuleiten bzw. zu beschleunigen. Dabei macht man sich zunutze, dass Glukokortikoide die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke vermindern und entzündungshemmend wirken [34]. Üblich ist eine intravenöse Gabe von einem Gramm Methylprednisolon über fünf Tage [35]. In der Langzeittherapie stehen verschiedenen Medikamente zur Verfügung, mit denen die immunologische Vermittlung der MS durchbrochen werden soll. Dabei unterscheidet man zwischen einer immunmodulierenden und einer immunsupprimierenden Therapie: Immunsuppressiva (wie z. B. Methotrexat) sollen die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut vermindern, während immunmodulierende Medikamente verschiedene Wirkmechanismen nutzen um regulierend ins Immunsystem

einzugreifen. So ist z. B. Natalizumab (Tysabri®) ein monoklonaler Antikörper gegen das Adhäsionsmolekül Very-late Antigen 4 (VLA-4), der die Migration von Leukozyten durch das Endothel der Blut-Hirn-Schranke hemmt [36].

### **1.1.8 Das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis**

Um die komplexen immunologischen Zusammenhänge der MS besser erforschen zu können, wurde das Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) entwickelt. Diese kann an verschiedenen Tierarten wie z. B. Mäusen oder Ratten aber auch Affen induziert werden, und ähnelt in ihren verschiedenen Verlaufsformen den unterschiedlichen klinischen Verläufen der MS [37]. Als auslösendes Agens werden den Tieren Myelinoberflächenantigene injiziert, die zu einer MS-ähnlichen Immunreaktion gegen Myelinscheiden mit Schädigung von Nervenzellen im ZNS führen [38]. Eine häufig genutztes Modell der EAE ist die durch Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) bei C57Bl/6 Mäusen ausgelöste Verlaufsform, bei welcher die Tiere chronisch erkranken und aufgelagerte Schübe zeigen [39]. Nach einer Latenz von mehreren Tagen nach der Immunisierung zeigen die Tiere typische Symptome, die aus aufsteigenden Lähmungen beginnend mit den Hinterläufen bestehen. Zu den weiteren zur Immunisierung genutzten Myelinpeptiden zählen das Proteolipid-Protein (PLP) und das Myelin-basische Protein (MBP), die zu einem schubförmigen bzw. monophasischen Verlauf der Erkrankung führen [40]. Eine alternative Methode zur Immunisierung ist das Auslösen der EAE durch adoptiven Transfer, bei dem myelinreaktive T-Zellen erkrankter Tiere in gesunde Tieren transferiert werden [41].



**Abbildung 2: Vergleich einer gesunden und einer immunisierten Maus mit EAE [42]**  
Die linke Maus zeigt Symptome einer EAE, die rechte Maus ist gesund.

## 1.2. Fas-vermittelte Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltodes, der grundsätzlich über zwei verschiedene Mechanismen in einer Zelle ausgelöst werden kann: den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg [43]. Die Vermittlung der Apoptose durch Fas ist dem extrinsischen Signalweg zuzuordnen, der den Zelltod durch Bindung eines Liganden an einen Apoptose-vermittelnden Rezeptor auslöst. Neben Fas zählen hierzu hauptsächlich die Rezeptoren Tumornekrosefaktor (TNF) Rezeptor 1 und *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL) Rezeptor 1 bzw. 2, die zur Signaltransduktion im Wesentlichen die gleichen Adapterproteine nutzen wie Fas [44]. Alternativ dazu führt der intrinsische oder auch mitochondriale Signalweg über intrazelluläre Stressoren wie z. B. beschädigte DNA zu einer Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien. Gemeinsame Endstrecke beider Signalwege ist die Aktivierung von Caspasen, einer Gruppe von Proteasen, die ihrerseits beginnen Peptide in der Zelle zu spalten und Zellorganellen und DNA abzubauen [45].

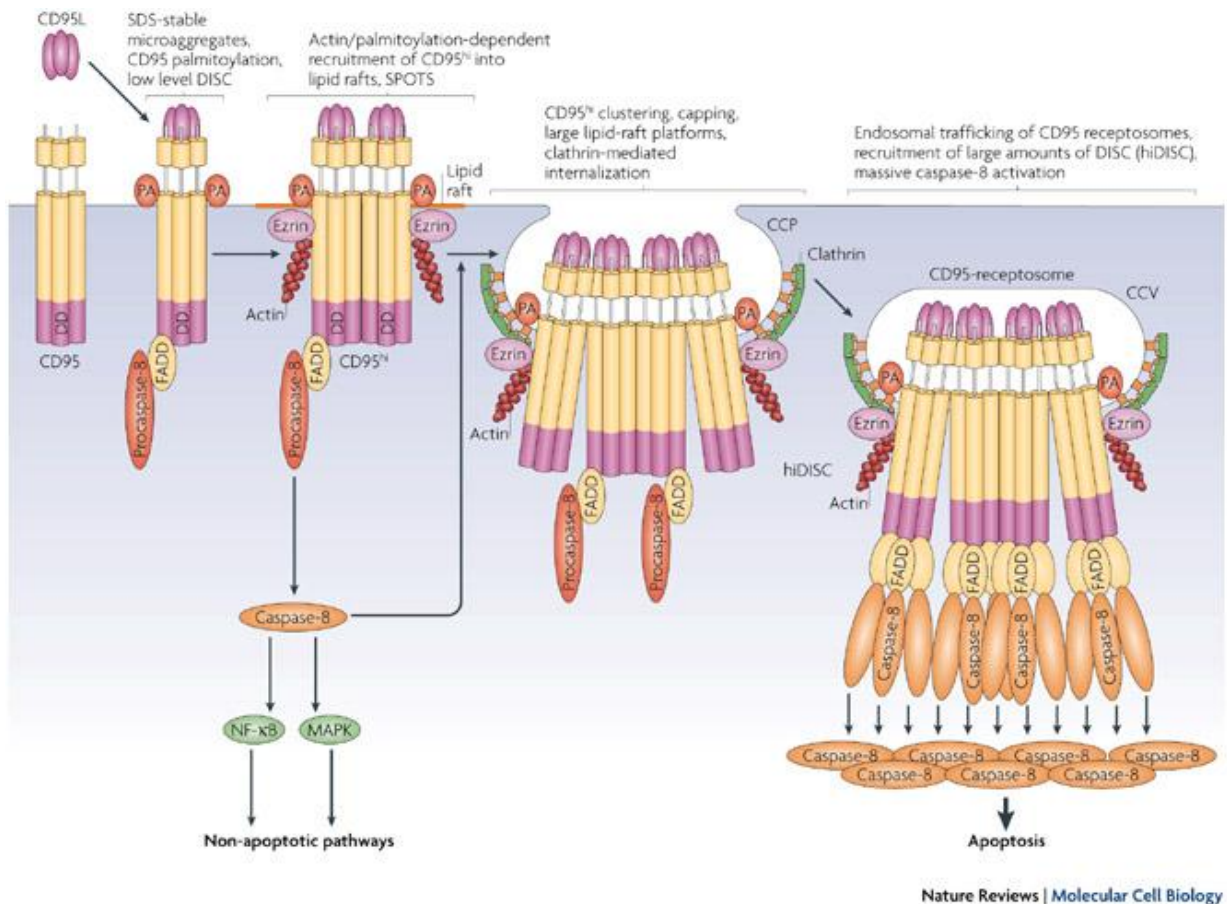
### 1.2.1 Aufbau und Funktion des Fas-Rezeptorkomplexes

Fas (auch CD95, APO-1) ist ein 45 kDa schweres Membranprotein, dessen Ligand FasL (FasLigand) sowohl in löslicher als auch in membranständiger Form exprimiert wird [46, 47]. Bei Kontakt mit ihren Liganden trimerisieren die Rezeptoren und binden auf der zytosolischen Seite ihr Adapterprotein Fas assoziierte Death Domain (FADD) [48]. Die weitere Signaltransduktion ist von der Dauer der Fas-Aktivierung abhängig: In der frühen Phase der Ligandenbindung bleibt der Rezeptor membranständig, bis er wenige Minuten später in die Zelle aufgenommen wird [44].

*Initiale/membranständige Phase:* Über Bindung von FADD, Procaspase 8 (die noch nicht gespaltene und somit nicht aktivierte Vor-Form der Caspase 8) und teilweise auch cellular FLICE-like inhibitory protein (cFlip) werden nicht-apoptotische Signalwege induziert, indem z. B. der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF-κB) oder Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktiviert und darüber Zellproliferation und –migration gefördert werden [49-51].

*Rezeptor-Internalisation:* Nur ca. 5 bis 15 Minuten nach Bindung des FasL wird der ganze Rezeptorkomplex, der jetzt als Death Inducing Signalling Complex (DISC) bezeichnet wird, in die Zelle internalisiert [52]. Am DISC können große Mengen Caspase 8 gebunden, gespalten und aktiviert werden [53]. Die aktivierte Caspase 8 kann wiederum andere Caspasen spalten, wodurch sich deren Aktivierung gleich einer Kaskade in der ganzen Zelle

fortsetzt und effektiv den Zelltod auslöst [45]. Die Spaltung von Caspase 8 kann verhindert werden, indem die Bindungsstelle von Caspase 8 an FADD bei erhöhter Konzentration von cFlip blockiert wird; liegt cFlip in niedriger Konzentration vor so vermutet man, dass es zur Stabilisierung von Caspase 8 beiträgt und damit pro-apoptotisch wirkt [54].



**Abbildung 3: Internalisierung von Fas [44]**

Nach Bindung des FasL trimerisiert der Rezeptor und bindet sein Adapterprotein FADD. In der frühen membranständigen Phase der Aktivierung können durch Bindung und Spaltung von Procaspase 8 über NF-κB und MAP-Kinasen nicht-apoptotische Signalwege induziert werden. Nach Internalisierung wird durch massive Bindung und Spaltung von Caspase 8 der Zelltod ausgelöst.

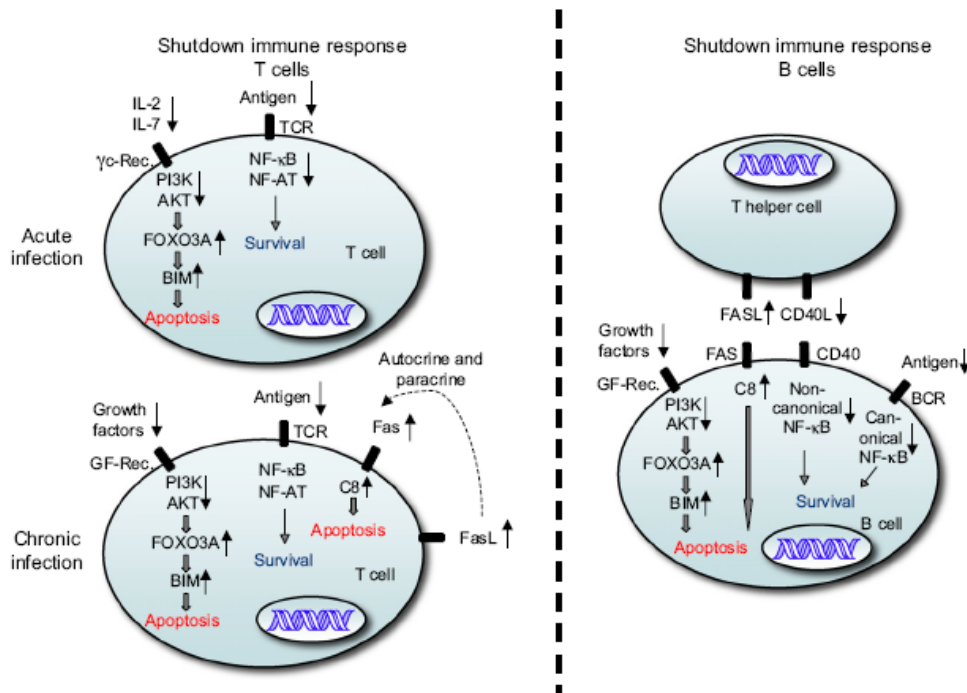
Es ist davon auszugehen, dass noch nicht alle Funktionsweisen der am DISC beteiligten Proteine geklärt sind. So scheinen FADD, cFlip und Caspase 8 unabhängig vom DISC unter bestimmten Umständen auch anti-apoptotische Signale in verschiedenen Zellen zu vermitteln [55-57]. Inwiefern sie dann an anderen Signalwegen beteiligt sind und an andere Rezeptoren binden ist bislang nicht bekannt.

### 1.2.2 Die Rolle der Fas-vermittelten Apoptose im Immunsystem

Der FasL wird in membrangebundener Form (mFasL) von CD8+ T-Zellen, NK-Zellen und einem Teil der CD4+ T-Zellen exprimiert [58]. Nach Abspaltung durch Metalloproteasen

kann er in löslicher Form (sFasL) vorliegen und ebenfalls biologisch aktiv sein [59]. Eine aktivierte zytotoxische T-Zelle, die den FasL exprimiert, kann diesen nutzen um andere z. B. Virus-infizierte oder nicht mehr funktionstüchtige/gestörte Zellen zu töten [60]. Auch in immunprivilegierten Geweben, z.B. dem Auge oder dem Hoden, wird der FasL exprimiert, um hierüber infiltrierende Leukozyten zu eliminieren [61]. Fraglich gilt gleiches für die Expression des FasL in Tumorgewebe, jedoch ist hierzu die Studienlage nicht eindeutig [62]. Da man bei Fas Knockout-Mäusen (Fas<sup>lpr/lpr</sup>) eine deutlich erhöhte Anzahl an CD4+ und CD8+ T- als auch B-Zellen fand, wurde lange Zeit angenommen, dass die FasL-Fas induzierte Apoptose eine wichtige Rolle bei der Selektion nicht-funktionstüchtiger oder autoreaktiver T- bzw. B-Zellen während der Lymphopoese spielt. Auch vom programmierten Zelltod überschüssiger Leukozyten nach einer akuten Immunantwort nahm man an, dass dieser über die Fas-vermittelte Apoptose erfolgt. Diese Thesen konnten mittlerweile widerlegt werden, beide Prozesse sind weitestgehend unbeeinträchtigt in Fas<sup>lpr/lpr</sup> Tieren [63]. Fas erfüllt jedoch eine wichtige Aufgabe bei der Regulation einer länger anhaltenden Aktivierung des Immunsystems, wie sie z. B. im Rahmen einer chronischen Infektion oder eines Autoimmungeschehens auftritt. Eine repetitive Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TZR) durch Pathogene oder Autoantigene führt durch Aktivierung von NF-κB zur vermehrten Expression des FasL sowie von Fas und Caspase 8 [64]. Die dadurch ausgelöste erhöhte Expression des Apoptose-Komplexes führt zum autokrinen Zelltod, dem sogenannten Activation Induced Cell Death (AICD) [65]. Bei B-Zellen scheint Fas ein wichtiger Kontrollmechanismus in der Regulation einer humoralen Immunantwort zu sein. Bei ausbleibender Stimulation der B-Lymphozyten durch den B-Zell-Rezeptor (BZR) und CD40 sind die Zellen anfälliger für die Fas-vermittelte Apoptose [66]. Im Gegensatz zu den T-Zellen wirkt jedoch die Stimulation des BZR bzw. von CD40 durch T-Helferzellen apoptose-protectiv, wenn Fas gleichzeitig aktiviert wird. Ursache hierfür scheint eine durch den BZR vermittelte Aktivierung von NF-κB und eine damit verbundene erhöhte Expression von cFlip zu sein [67]. Blockiert cFlip die Bindungsstelle von Caspase 8 an FADD, führt eine Aktivierung von Fas über cFlip im Gegenteil sogar zu weiterer NF-κB Aktivierung und damit zur Proliferation und Differenzierung von B-Zellen [63].





**Abbildung 4: Die unterschiedlichen Rollen der Fas-vermittelten Signaltransduktion im Immunsystem [63]**  
 Abhängig von unterschiedlichen co-stimulatorischen Signalen (TZR- oder BZR- bzw. CD40-Aktivierung) wird in Lymphozyten entweder der AICD ausgelöst oder über NF-κB anti-apoptotische Transkripte exprimiert und das Überleben der Zellen gefördert.

Menschen mit heterozygoten Mutationen im Fas-Gen leiden an so genannten Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) [68], einer Erkrankung bei der massiv erhöhte Zellzahlen von T- und B-Lymphozyten sowie verschiedenste Autoantikörper auftreten. Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse entwickeln eine dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) ähnliche Erkrankung, exprimieren ebenfalls eine erhöhte Zahl von Autoantikörpern und haben eine Lymphadenopathie [69]. Sowohl die ALPS-Patienten als auch die Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse entwickeln häufiger Lymphome, was als Folge einer gestörten Tumorsuppression in den Lymphozyten angesehen wird [70].

### 1.2.3 Zusammenhang zwischen Multipler Sklerose und Fas

Da gezeigt wurde, dass die FasL-Fas vermittelte Apoptose eine bedeutende Rolle in der Regulation einer Immunantwort bei chronischen Infektionen und Autoimmunerkrankungen inne hat, wurden mehrere Studien zur Funktionalität der FasL-Fas vermittelten Apoptose sowie der Protein- und mRNA-Expression des Rezeptorkomplexes bei MS durchgeführt. Dabei fand man auf Proteinebene eine verminderte Fas-Expression in Lymphozyten von Patienten mit RR- und SP-MS sowie eine reduzierte Apoptoserate bei Stimulation der Zellen mit FasL oder gegen Fas gerichteten Antikörpern [71-73]. Ebenso wurde eine erhöhte Protein-Expression von cFlip bei RR- bzw. SP-MS-Patienten beschrieben [73, 74]. Lediglich

in einer Studie fand sich kein Unterschied in der cFlip-Expression auf Proteinebene in peripheren Leukozyten [75]. Zur Proteinexpression von Caspase 8 und FADD bei MS wurden bisher keine Studien veröffentlicht.

Die Studienlage zur mRNA-Expression von Fas, Caspase 8 und cFlip ist nicht einheitlich und widerspricht zum Teil den Ergebnissen der Proteinebene. Während eine Studie eine erhöhte Fas mRNA-Expression bei Patienten zwei Wochen nach einem akutem Schub im Vergleich zu sechs Wochen vor dem Schub fand [76], wurde in einer anderen Studie bei Patienten mit neu aufgetretenen Gadolinium-aufnehmenden Läsionen im MRT von einer Erniedrigung der Transkript-Level von Fas im Vergleich zu Patienten ohne neue Läsionen berichtet [77]. Im Vergleich mit gesunden Kontrollen fand sich in allen Veröffentlichungen eine erhöhte mRNA-Expression von Fas in gemischten Gruppen mit Patienten im Schub und in der Remission [76, 78, 79], was im Gegensatz zu den Beobachtungen auf Proteinebene steht. Bezüglich der mRNA-Expression von cFlip findet sich eine Publikation, die erhöhte Transkript-Level bei MS-Patienten in Remission im Vergleich zu Gesunden zeigt [78]. Es fand sich jedoch keinen Unterschied in der cFlip mRNA-Expression zwischen Patienten mit und ohne Gadolinium aufnehmenden Läsionen im MRT [77]. Zu Caspase 8 wurde eine Studie veröffentlicht, in welcher erhöhte Transkript-Level bei MS-Patienten in Remission im Vergleich zu Gesunden gezeigt werden konnten [78]. Zwei weitere Studien fanden erniedrigte Caspase 8-Transkripte bei Patienten mit aktiver RR-MS/im Schub im Vergleich zu Patienten in Remission [77, 80]. Zur mRNA-Expression von FADD wurden bisher keine Studien veröffentlicht.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse auf Proteinebene wäre bei Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen bzw. FasL-Defekt (FasL<sup>gld/gld</sup>) ein klinisch stärkerer Verlauf der EAE zu erwarten. Es erkrankten jedoch im Gegenteil weniger Mäuse nach Immunisierung, und die erkrankten Tiere zeigen eine mildere Verlaufsform der EAE [81, 82]. Nur in einer Publikation fand sich ein stärkerer Verlauf der EAE bei Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen [83]. Wurde während der EAE FasL intrathekal gegeben, führte dies zu einer deutlichen Besserung des Krankheitsverlaufs [84]. Bei Mäusen, die über kein funktionsfähiges FADD in T-Zellen verfügten, lies sich keine EAE auslösen [85]. Wurde eine Überexpression von cFlip in T-Zellen induziert, lies sich abhängig vom genetischen Hintergrund der Maus keine bzw. eine stärkere Verlaufsform der EAE auslösen [86, 87]. Zu Caspase 8 im Verlauf einer naiven EAE (unbehandelte Tiere) gibt es keine Daten.

### **1.3 Real Time-PCR im LightCycler**

Bei der Real Time-PCR handelt es sich um eine Methode zur Quantifizierung von mRNA-Expressionen. Es beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei jedoch sämtliche Arbeitsschritte (Amplifikation, Detektion der PCR-Produkte und Quantifizierung) in einem geschlossenen System stattfinden, ohne dass zusätzliche Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind [88, 89].

#### **1.3.1 Der LightCycler**

Ein LightCycler besteht aus einer optischen Einheit, einem Probenkarusell und einem Thermocycler, der die Temperatur während der einzelnen Schritte der PCR reguliert [90]. In das Probenkarussell des hier genutzten LightCyclers 1.5 der Firma Roche können 32 Proben eingesetzt und gemessen werden, die von einem Motor in die korrekte Position vor der optischen Einheit gebracht werden [91]. Dort wird die Fluoreszenz in jeder Probe gemessen, die proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt, und über eine Software direkt graphisch dargestellt (real time) [91, 92].

#### **1.3.2 Detektion von PCR-Produkten mittels SYBR-Green**

In dieser Arbeit wurde die Amplifikation der Zielsequenz mit SYBR-Green gemessen. Bei SYBR-Green handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich unspezifisch zwischen doppelsträngiger DNA anlagert und dabei zu fluoreszieren beginnt [93]. Durch Zunahme der Ziel-DNA in jedem Zyklus steigt damit auch die Fluoreszenz pro Probe, die von der optischen Einheit detektiert und von der LightCycler Software quantifiziert wird. Ein Nachteil der Quantifizierung mit SYBR-Green ist die geringe Spezifität des Farbstoffs. Indem er sich an jede amplifizierte doppelsträngige DNA anlagert, können nicht mehrere Produkte gleichzeitig gemessen werden. Außerdem werden auch Signale, die durch False-Priming, Primer-Dimere oder –Hairpins entstehen, detektiert und können das Messergebnis stören. Dieses Problem lässt sich jedoch durch Analyse der Schmelzkurve beheben.

#### **1.3.3 Schmelzkurvenanalyse**

Die Schmelzkurvenanalyse findet am Ende der Real Time-PCR statt. In den Proben liegt nun die höchste Menge doppelsträngiger DNA vor, die idealer Weise nur aus der Zielsequenz und nicht aus anderen Produkten wie z. B. Primer-Dimeren bestehen sollte. In der Schmelzkurvenanalyse macht man sich zunutze, dass sämtliche Produkte infolge ihrer unterschiedlichen Größe bei verschiedenen Temperaturen denaturieren [94]. Wird also die

Temperatur im LightCycler kontinuierlich erhöht, kann bei verschiedenen Temperaturen eine Abnahme der Fluoreszenz registriert werden, da die Doppelstränge zu Einzelsträngen denaturieren, SYBR-Green freisetzen und die emittierte Fluoreszenz abnimmt. In die Auswertung sollten nur solche Proben mit einfließen, in denen keine weiteren Produkte als das der Zielsequenz nachweisbar sind.

### 1.3.4 Grundlagen zur Quantifizierung einer Real Time-PCR

*Ct-Wert:* Bei der Real Time-PCR kann die Amplifizierung in drei Phasen unterteilt werden [95]: In der ersten Phase, in der wenig Ausgangsmaterial der Zielsequenz vorliegt, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sich Primer, Polymerase und Zielsequenz optimal finden. Das Signal des PCR-Produkts hebt sich deshalb nicht von dem des Hintergrundes ab. In der zweiten Phase kommt es zum exponentiellen und damit quantifizierbaren Wachstum der Ziel-DNA und messbarem Anstieg der Fluoreszenz in der Probe. Der Zyklus, in welchem sich die emittierte Fluoreszenz statistisch signifikant vom Hintergrund unterscheidet, wird von der Software ermittelt und als Cycle Threshold (Ct-Wert) bezeichnet. Die dritte Phase der Amplifizierung wird auch als Plateauphase bezeichnet. In ihr steigt die Menge der PCR-Produkte derart an, dass diese teilweise miteinander hybridisieren, Substrat aufgebraucht wird und die Polymerase durch häufiges Erhitzen geschädigt sein kann. Eine Quantifizierung in dieser Phase würde zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen.

*Amplifikationseffizienz:* Die theoretisch optimale Amplifikationseffizienz einer Real-Time-PCR beträgt  $E = 2$ , was bedeuten würde, dass sich in jedem Zyklus die Menge des Templates verdoppelt. In der Praxis ist die Effizienz der PCR meist etwas kleiner. Berechnet wird die Amplifikationseffizienz  $E$  aus der Steigung  $m$  der Regressionsgeraden der Verdünnungsreihe bzw. Standardkurve:  $E = 10^{-1/m}$  [96].

*Verdünnungsreihe:* Eine Verdünnungsreihe wird erstellt, indem eine Probe mit bekannter Ausgangsmenge an Template jeweils um den Faktor 10 verdünnt wird [95]. Für diese Probe werden häufig kommerziell erhältliche Plasmid-Standards verwendet, im Prinzip kann aber jede cDNA benutzt werden. Der Funktionsgraph der Verdünnungsreihe wird dementsprechend als dekadischer Logarithmus dargestellt.

Setzt man die Geradengleichung  $y = m * x + b$

in  $x = \log_{10}(x)$

ein, erhält man folgende Gleichung:  $x = 10^{((y-b)/m)}$

nach der jedem Ct-Wert ein Absolutwert zugeordnet werden kann.

( $x$  = Absolutwert,  $y$  = Ct-Wert,  $b$  = Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse,  $m$  = Steigung)

*Normalisierung mittels eines Referenzgens:* Durch die Verdünnungsreihe kann jedem Ct-Wert einen Absolutwert zugeordnet und absolut quantifiziert werden. Solche Absolutwerte sind jedoch sehr fehleranfällig und setzen voraus, dass in jeder Probe exakt die gleiche Menge cDNA eingesetzt wurde und die Bedingungen bei jeder Real Time-PCR genau gleich sind, da sich schon kleinste Schwankungen direkt auf den Absolutwert auswirken. Um dem zu entgehen, wird der Absolutwert durch ein Referenzgen normalisiert [95]. Ein solches Referenzgen sollte in jeder Zelle gleich stark exprimiert werden und keinen Einflüssen durch Zellzyklus oder Krankheiten unterliegen. Bei Messungen in Leukozyten wurde in unserem Labor Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, das bereits in anderen Studien als Referenzgen bei MS verwendet wurde [97].

### **1.3.5 Optimierungsstrategien einer Real Time-PCR**

Bei der Etablierung einer Real Time-PCR mit SYBR-Green gibt es verschiedene Möglichkeiten den Ablauf zu optimieren. An den folgenden drei wurde sich in der vorliegenden Arbeit orientiert [98]:

*Primerdesign:* Oligodesoxyribonucleotide oder kurz Oligonucleotide, werden als Primer für eine PCR nach spezifischen Kriterien designed.

Folgende Kriterien eines Primerpaares sollten erfüllt sein/sind optimal:

- keine Primer-Dimere, d. h. die Primer sollten keine selbst oder paarweise komplementären Stränge enthalten, damit sie nicht aneinander binden können
- kein False-Priming, d. h. die Primer sollten nicht an anderer Stelle der cDNA binden können
- keine Hairpins oder Stem-loops, d. h. die Primer oder das Produkt sollten keine Schleifchen-artigen (hairpin = Haarnadel) Strukturen ausbilden
- die Größe des PCR-Produkts sollte zwischen 100 und 300 Basenpaare betragen
- ausgewogener GC-Gehalt der Primer (GC-Basenpaarungen binden über drei Wasserstoffbrücken und sind deswegen stabiler als TA-Basenpaarungen mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen - je mehr GC-Basenpaarungen ein Primer hat, desto höher ist seine Annealingtemperatur)
- vergleichbare Annealingtemperatur beider Primer bei ca. 60°C
- Anzahl der Nucleotide zwischen 18 und 30 je Primer

*Annealingtemperatur:* Die Annealingtemperatur beeinflusst das Bindungsverhalten der Primer und liegt üblicherweise bei 60°C. Wird die Annealingtemperatur erhöht, binden die Primer spezifischer, d. h. False-Priming wird vermindert. Dies kann jedoch dazu führen, dass

Primer bei nicht optimalem Design die Zielstruktur nicht mehr erkennen. Wird die Annealingtemperatur erniedrigt, binden die Primer unspezifischer. Bei nicht optimalen Bindungseigenschaften der Primer kann so ihr Anlagern an die Zielstruktur verbessert und mehr Primer während der Annealingphase in Bindung gebracht werden. Das Risiko für False-Priming steigt jedoch.

*Mastermix/Polymerase:* Abhängig von Zielstruktur und Primern kann es manchmal sinnvoll sein, Mastermixe verschiedener Firmen auszuprobieren. Diese Mastermixe enthalten jeweils andere Polymerasen, die unterschiedlich gut mit den Primern und den Zielsequenzen „harmonisieren“.

## 1.4 Zielsetzung

Die durch Fas ausgelöste Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Regulation einer chronischen Immunantwort, wie sie zum Beispiel bei einer Autoimmunerkrankung wie der Multiplen Sklerose vorliegt. Obwohl die Proteinexpression von Fas und seinen Adapterproteinen cFlip und Caspase 8 bei Multipler Sklerose bereits charakterisiert ist, ist die Studienlage zu ihrer mRNA-Expression nicht eindeutig bzw. wie im Fall von FADD bisher nicht untersucht. Die aus Tierstudien mit Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis gewonnenen Daten zu Fas, FADD und cFlip widersprechen teilweise ihrer vermuteten Rolle bei Multipler Sklerose.

Ziele dieser Arbeit:

I. Etablierung einer Real Time-PCR für humanes Fas, cFlip und Caspase 8 sowie murines Fas, FADD, cFlip und Caspase 8.

II. Es soll ein untherapiertes Kollektiv mit RR-MS-Patienten zusammengestellt werden. In diesem wird im Schub sowie drei Monate danach (Remission) die mRNA-Expression der oben genannten Marker gemessen. Es soll mit einer Gruppe untherapierter RR-MS-Patienten ohne Schub (Baseline) sowie gesunden Kontrollpersonen verglichen werden. Durch diesen Vergleich soll geklärt werden, ob die Expression der Fas-Signaltransduktionskaskade bereits auf mRNA-Ebene gestört ist bzw. welchen Einfluss ein Schub auf die mRNA-Expression hat.

III. Mit Hilfe von Korrelationsanalysen und seriellen Analysen soll überprüft werden, ob sich die mRNA-Expression der Marker als laborchemische Kontrolle für den Krankheitsverlauf eignet.

IV. Es soll die mRNA-Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei EAE zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf (entsprechend den unter II. genannten Patientengruppen bei MS) gemessen werden.

V. Es soll die mRNA-Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei MS und EAE miteinander verglichen werden.

## **2. Patienten**

### **2.1 Rekrutierung der Patienten auf Station/in der Multiple Sklerose-Sprechstunde**

Nach Vorlage des positiven Votums der Ethikkommission (Ethikantrag Nr. 08/06) wurden die Patienten der Schubgruppe auf den Stationen der Neurologischen Klinik bzw. in der MS-Ambulanz rekrutiert. Dazu war eine regelmäßige Mitarbeit in der MS-Ambulanz erforderlich sowie eine jeden zweiten Tag stattfindende Kontrolle der Stationsbelegungen. Durch die MS-Ambulanz ist seit 1998 ein Archiv mit Blutproben angelegt worden, aus dem die Baselinegruppe rekrutiert sowie die Schubgruppe aufgefüllt wurde. Nach 18 Monaten bestand letztere erst aus sechs Patienten, da mangelnde Compliance, Basistherapiebeginn oder Schwangerschaft die Rekrutierung zu zwei Zeitpunkten erschwerten. Die Patienten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach der Blutabnahme auch neurologisch untersucht. Über den Expanded Disability Status Scale (EDSS) [99] wurde der Schweregrad der Behinderung eines Patienten in einer Skala von 0 bis 10 ausgedrückt. Dazu wurden die Symptome der Patienten acht funktionellen Systemen zugeordnet und bewertet.

### **2.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Einschlusskriterien waren folgende:

- Patienten mit schubförmig verlaufender MS (nach McDonald) oder
- klinisch isoliertem Syndrom (d. h. erster Schub),
- Lebensalter 18-60 Jahre,
- EDSS maximal 4,
- Beginn des Schubes maximal vier Wochen vor Einschluss,
- vorliegende schriftliche Einwilligungserklärung.

Als Ausschlusskriterien wurden definiert:

- mehr als 2 Schübe in den vorherigen 24 Monaten,
- relevante Nebenerkrankungen (z. B. Infektionen, Tumore) oder Schwangerschaft,
- bestehende Basistherapie, Beginn einer Basistherapie,
- fehlendes Verständnis für Inhalte, Ziel oder Konsequenz des Forschungsvorhabens,
- relevante Laborwerte außerhalb des Normalbereichs.

### **2.3 Gesunde Kontrollen**

Es wurden gesunde Mitarbeiter der Neurologischen Klinik rekrutiert, die von Geschlecht und Alter möglichst den Patienten entsprachen und keine Nebenerkrankungen aufweisen sollten.



**Tabelle 2: EDSS nach Kurzke** (modifiziert nach <http://ms-interaktiv.de/board/download/edss/edss-komplettta.jpg>)

<b>Expanded Disability Status Scale</b>	
<b>0</b>	Normale neurologische Untersuchung (Grad 0 in allen FS)
<b>1,0</b>	Keine Behinderung, minimale Abnormität in einem FS (d. h. Grad 1)
<b>1,5</b>	Keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem FS (mehr als einmal Grad 1)
<b>2,0</b>	Minimale Behinderung in einem FS (ein FS Grad 2, andere 0 oder 1)
<b>2,5</b>	Minimale Behinderung in zwei FS (zwei FS Grad 2, andere 0 oder 1)
<b>3,0</b>	Voll gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem FS (ein FS Grad 3, andere 0 oder 1) oder leichte Behinderung in drei oder vier FS (3 oder 4 FS Grad 2, andere 0 oder 1), aber voll gehfähig
<b>3,5</b>	Voll gehfähig, aber mit massiver Behinderung in einem FS (Grad 3) und ein oder zwei FS Grad 2; oder zwei FS Grad 3; oder fünf FS Grad 2 (andere 0 oder 1)
<b>4,0</b>	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während etwa 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
<b>4,5</b>	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. Ganztägig arbeitsfähig, gewisse Einschränkung der Aktivität, benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
<b>5,0</b>	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen (z. B. ganztägig zu arbeiten ohne besondere Vorkehrungen). (Ein FS Grad 5, übrige 0 oder 1; oder Kombination niedrigerer Grade, die über die Stufe 4,0 geltenden Angaben hinausgehen)
<b>5,5</b>	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität zu verunmöglichen (FS-Äquivalent wie Stufe 5.0)
<b>6,0</b>	Bedarf intermittierend oder auf einer Seite konsequent der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene) um etwa 100 m ohne Rast zu gehen (FS-Äquivalente: Kombination von mehr als zwei FS Grad 3 plus).
<b>6,5</b>	Benötigt konstant beidseits Hilfsmittel (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 20 m ohne Rast zu gehen (FS-Äquivalente wie 6.0).
<b>7,0</b>	Unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als 5 m zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt den Rollstuhl selbst und transferiert ohne Hilfe (FS-Äquivalente: Kombination von mehr als zwei FS Grad 4 plus, selten Pyramidenbahn Grad 5 allein).
<b>7,5</b>	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl (FS-Äquivalent wie 7,0)
<b>8,0</b>	Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden; pflegt sich weitgehend selbstständig. Meist guter Gebrauch der Arme (FS-Äquivalente: Kombination meist von Grad 4 plus in mehreren Systemen).
<b>8,5</b>	Weitgehend an Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege möglich (FS-Äquivalente wie 8,0).
<b>9,0</b>	Hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen, meist Grad 4 plus)
<b>9,5</b>	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen von fast lauter Grad 4 plus)
<b>10</b>	Tod infolge MS
<b>Funktionelle Systeme (FS)</b>	
<b>1</b>	Motorik
<b>2</b>	Sensibilität
<b>3</b>	Zerebellum
<b>4</b>	Hirnstamm
<b>5</b>	Blase und Mastdarm
<b>6</b>	Visus
<b>7</b>	Mentale Funktion
<b>8</b>	anderes
<b>Grade der Behinderung der FS</b>	
<b>0</b>	Normal
<b>1</b>	Abnorme Zeichen ohne Behinderung
<b>2</b>	Leichte Behinderung
<b>3-6</b>	Mäßige bis schwere Behinderung

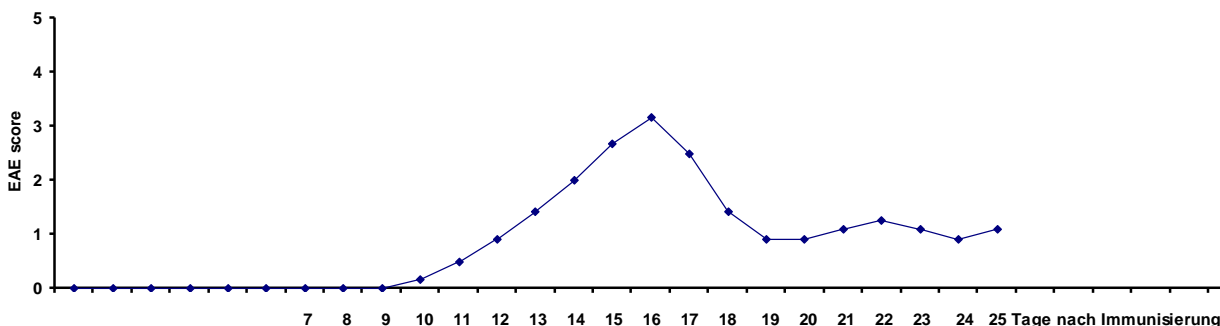
### 3. Tiere

Für die EAE-Versuche wurden Mäuse des Genotyps C57Bl/6 J OlaHsd verwendet (Tierantrag 31/2008). Die Tiere wurden von Harlan Winkelmann bezogen und im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität vermehrt. Die EAE wurde durch Injektion eines Gemisches aus 200 µg MOG<sub>35-55</sub> unter Zusatz von 10 mg/ml Mycobacterium tuberculosis gelöst in Freund's Adjuvant induziert. Den Mäusen wurden je 50 µl der Lösung in die vier Flanken injiziert. Die Verwendung von Freund's Adjuvant und Mycobacterium tuberculosis dient einer Verstärkung der Immunreaktion zur gesicherten Induktion der EAE. Zur Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhielten die Tiere an Tag 0 und Tag 2 nach Induktion intraperitoneal 300 ng Pertussis-Toxin. Es wurden ausschließlich Weibchen für die Experimente benutzt, da infolge der größeren Häufigkeit der MS bei Frauen eine hormonelle Komponente in der Krankheitsgenese nicht auszuschließen ist. Das Alter der Versuchstiere lag zwischen 8-12 Wochen. Ähnlich dem EDSS beim Menschen wurde ein Score als objektiver Marker genutzt, um die Schwere der Erkrankung der Tiere zu quantifizieren:

**Tabelle 3: Score zur Quantifizierung des Krankheitsgrades im Verlauf der EAE**

Score	Behinderung
0	gesund
1	Schwanzplegie
2	Hinterlaufschwäche bzw. -parese
3	Hinterlaufplegie
4	Hinterlaufplegie und Vorderlaufschwäche (Tetraparese)
5	moribund (tot)

Die Tiere wurden an Tag 8, 16 und 24 nach Immunisierung getötet. Den schematischen Krankheitsverlauf der MOG-induzierten EAE zeigt folgende Abbildung:



**Abbildung 5: Typischer Verlauf einer MOG<sub>35-55</sub> induzierten EAE bei einer C57Bl/6 Maus**

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

<b>Geräte</b>	
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch, Liebherr
LightCycler 1.5	Roche Diagnostics
LightCycler Zentrifugen Adapter	Roche Diagnostics
Pipetten (verschiedene Volumina)	Gilson, Eppendorf
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	Integra Biosciences
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Bio-Rad
Tischzentrifuge EBA 20	Hettich
Tischzentrifuge Mikro 120	Hettich
Universal 32 R (Zentrifuge)	Hettich
Vortex Minishaker	IKA Werke
<b>Verbrauchsgegenstände</b>	
Falconröhrchen (15 und 20 ml)	Becton Dickinson
Kodan Tinktur Forte	Schülke und Mayr
LightCycler Capillaries	Genaxxon Bioscience
Pipettenspitzen steril (verschiedene Volumina)	Nerbe Plus
S-Monovette EDTA KE, 7,5 ml	Sarstedt
Vlieskompressen steril 5 x 5 cm	Fuhrmann Verbandstoffe GmbH
<b>Chemikalien</b>	
Beta-Mercaptoethanol	Fluka
Ethanol 100 %	Sigma Aldrich
<b>Kits, Mastermixe</b>	
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen
Quanti Fast SYBR Green PCR Kit	Qiagen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
ProtoScript M-MuLV Taq RT-PCR Kit	New England Biolabs
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems
<b>Software</b>	
Excel 2008 Microsoft	
Graph Pad Prism Software Version 4.02 (statistische Auswertung und Graphiken)	
Microsoft Office Word 2008	
Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software Version 3.5 (LightCycler)	
Primer Premiere	

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Leukozytenisolation**

1,5 ml EDTA-Blut bzw. eine homogenisierte Mausmilz wurden mit 7,5 ml Erythrozyten Lysis Buffer (EL-Puffer) aus dem Qiagen RNA Blood Mini Kit gemischt und 10-15 min auf Eis gestellt, um die Erythrozyten zu lysieren. Danach wurden die Proben für 10 min bei 1620 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 3 ml EL-Puffer zum Pellet gegeben, welches auf einem Vortexer vollständig gelöst wurde. Nach weiteren 10 min Lyse auf Eis wurden die Proben erneut für 10 min bei 1620 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Das Pellet wurde dann mit 600 µl RLT-Buffer mit 10 % Mercaptoethanol gemischt und vorsichtig durch auf- und abpipettieren aufgelöst. Dies geschah um die Zellen aufzuschließen und Proteinbindungen zu lösen. Die Proben wurden anschließend bei -70 °C gelagert bis die RNA isoliert wurde.

Die isolierten Leukozyten aus dem ZNS der Mäuse wurden ebenfalls mit 600 µl RLT-Buffer mit 10 % Mercaptoethanol aufgelöst. Die Lagerung geschah wie oben beschrieben.

### **4.2.2 RNA-Isolation**

Die Isolation der RNA aus den Leukozytenlysaten erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). Dabei wurde das Lysat auf ein System aus Säulen aufgetragen und mehrmals mit verschiedenen Puffern gewaschen. Zum Schluss wurde die RNA mit RNase/DNase freiem Wasser aus der letzten Säule ausgewaschen und direkt zur cDNA Synthese verwendet, um den Verdau durch RNAsen zu verhindern.

### **4.2.3 cDNA-Synthese**

Hierzu wurde das RevertAid First Strand Synthesis Kit (Fermentas) verwendet und die cDNA-Synthese nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In jedem Probenansatz wurde das maximale RNA-Lysat-Volumen von 11,5 µl eingesetzt, 1 µl Oligo (dT) Primer zugegeben und bei 70 °C für 5 min inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl RiboLock Ribonuklease Inhibitor und 2 µl dNTPs (10mM) zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben und für 1 h bei 42 °C inkubiert. Durch abschließendes Erhitzen der Proben auf 70 °C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt. Die fertige cDNA konnte nun bei 4 °C für mehrere Monate gelagert werden.

#### 4.2.4 Real Time-PCR im LightCycler

Im LightCycler wurde die quantitative PCR der verschiedenen Marker durchgeführt. In jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle mitgeführt und die Proben in Doppelwerten gemessen. Der jeweils niedrigere Wert wurde später für die Auswertung benutzt. Lagen die Doppelwerte mehr als 0,5 auseinander, wurde die Messung der Probe wiederholt. Dies geschah insgesamt nur einmal.

<b>Pipettierschema Real Time-PCR</b>	
<b>Ansatz pro Probe</b>	10 µl Mastermix
	1 µl Vorwärtsprimer
	1 µl Rückwärtsprimer
	1 µl cDNA
	7 µl H <sub>2</sub> O
<b>insgesamt</b>	20 µl

<b>Bedingungen der Real Time-PCR</b>		
<b>Initialdenaturierung</b>	5 min bei 95 °C	
<b>Amplifikation</b> (45 Zyklen)	Denaturierung	10-30 sek (je nach Marker) bei 95 °C
	Annealing	15-30 sek bei 52-62 °C (je nach Marker)
	Extension	20-60 sek (je nach Marker) bei 72 °C
<b>Melting Curve</b>	Temperaturerhöhung von 65-95°C mit 0,1 °C / sek	

#### 4.2.5 Erstellen der Zielsequenzen für die Verdünnungsreihen

Für humanes FADD und GAPDH konnte auf Plasmide zur Erstellung der Verdünnungsreihen zurückgegriffen werden. Für die anderen Marker wurden hochkonzentrierte cDNA-Proben für die Verdünnungsreihen generiert. Im Protokoll wurden die Annealingtemperaturen eingesetzt, die für die Real Time als ideal ermittelt wurden.

<b>Pipettierschema der Zielsequenzen</b>	
<b>Ansatz pro Probe</b>	13 µl H <sub>2</sub> O
	2 µl Puffer
	1 µl dNTP
	1 µl Vorwärtsprimer
	1 µl Rückwärtsprimer
	1 µl cDNA
	1 µl Taq Polymerase
<b>insgesamt</b>	20 µl

<b>PCR-Bedingungen beim Erstellen der Zielsequenzen</b>		
<b>Initialdenaturierung</b>	5 min bei 95 °C	
<b>Amplifikation (30 Zyklen)</b>	Denaturierung	30 sek bei 95 °C
	Annealing	30 sek bei 52-62 °C (je nach Marker)
	Extension	30 sek bei 72 °C
<b>Abschließende Extension</b>	5 min bei 72 °C	
<b>Cooling</b>	bei 4 °C	

Die so vervielfältigten Zielsequenzen wurden für die Verdünnungsreihen benutzt.

#### **4.2.6 Verdünnungsreihen**

Angenommen wurde, dass 1 µl der in 4.2.5 generierten Probe  $1 \times 10^8$  Kopien der Zielsequenz enthält. Diese Proben wurden um den Faktor 10 verdünnt, daraus wieder eine Probe genommen und um den Faktor 10 verdünnt usw. Schließlich lagen 9 Proben vor mit Konzentrationen von  $1:10^8$  bis  $1:10^1$ . Diese wurden in Dreifachwerten in einer SYBR-Green Real Time-PCR zu den in 2.2.4 beschriebenen Konditionen gemessen, jeder Lauf wurde einmal reproduziert. Die Auswertung der Standardkurven erfolgte in Excel.

### **4.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit Graph Pad Prism (Graph Pad Prism 4, San Diego, USA) durchgeführt. Gruppenunterschiede wurden durch den Kruskal-Wallis-Test detektiert. War dieser signifikant, wurde eine post hoc Analyse mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt, um die genauen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu ermitteln. Außerdem wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den Markern und dem EDSS sowie der Anzahl der Schübe in den letzten 2 Jahren durchgeführt. Bei der seriellen Analyse wurde der Wilcoxin-Rangsummentest eingesetzt.

Das Konfidenzintervall lag bei 95 %, statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Demographische Daten von Patienten und gesunder Kontrollgruppe

	Baseline	Schub	Remission	Gesunde Kontrollen
Anzahl (weiblich)	15 (12)	15 (12)	15 (12)	15 (12)
Alter (Jahre)	39.0 ± 7.4	38.9 ± 7.4	38.9 ± 7.4	38.8 ± 7.2
Erkrankungsdauer (Jahre)	3.4 ± 4.4	3.7 ± 4.7	3.7 ± 4.7	-
EDSS	1.4 ± 0.5	2.1 ± 0.8	1.7 ± 1.0	-
Schübe in 2 Jahren	0.8 ± 0.7	0.6 ± 0.6	0.6 ± 0.6	-

Mittelwerte ± Standardabweichung

### 5.2 Etablierung der Real Time-PCR

Pro Marker wurden mehrere Primerpaare designed und mit unterschiedlichen Mastermixen bei verschiedenen Annealingtemperaturen und Amplifikationszeiten getestet. Letztere bestanden bei jedem Marker aus 10 sek Denaturierung, 15 sek Annealing und 20 sek Extension, außer bei murinem FADD (30 sek Denaturierung, 30 sek Annealing, 60 sek Extension). Zur vollständigen Darstellung sind auch humanes FADD und humanes sowie murines GAPDH aufgeführt.

Marker	Sequenzen der Primerpaare	Annealing-temperatur	Mastermix
humanes Fas	<i>fw</i> 5'-CGTCTGTTGCTAGATTATCG-3'	54°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-TTGTCTGTGTACTCCTCCC-3'		
humanes FADD	<i>fw</i> 5'-GAAGAAGACCTGTGTGCAGCATT-3'	60°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-GTTGCGTTCTCCTTCTCTGTGTT-3'		
humanes cFlip	<i>fw</i> 5'-AAGCAGCAATCCAAAAGAGTC-3'	62°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-CCCAGGGAAGTGAAGGTG-3'		
humane Caspase 8	<i>fw</i> 5'-AGGAGGAGATGGAAAGGGAACCTT-3'	60°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-ACCTCAATTCTGATCTGCTGACTTCT-3'		
humanes GAPDH	<i>fw</i> 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'	60°C	Applied Biosystems
	<i>rv</i> 5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'		
murines Fas	<i>fw</i> 5'-ATGCTGTGGATCTGGGCT-3'	50°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-TCACTCGACACATTGTCC-3'		
murines FADD	<i>fw</i> 5'-TGGATGGGATTGAGGAGAAG-3'	58°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-AAACCACAGTCCTCACAGGG-3'		
murines cFlip	<i>fw</i> 5'-ACAGGCAGAGGCAAGATAGC-3'	56°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-CAATTTTGGGAGCGAAGC-3'		
murine Caspase 8	<i>fw</i> 5'-GGCCTCCATCTATGACCTGA-3'	56°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-GCAGAAAGTCTGCCTCATCC-3'		
murines GAPDH	<i>fw</i> 5'-TGACGTGCCGCCTGGAGAAA-3'	56°C	Qiagen
	<i>rv</i> 5'-AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'		



## 5.2.1 Verdünnungsreihe

Für alle Marker wurden Verdünnungsreihen erstellt, aus denen sich Geradengleichung, Linearität und Amplifikationseffizienz ableiten ließen.

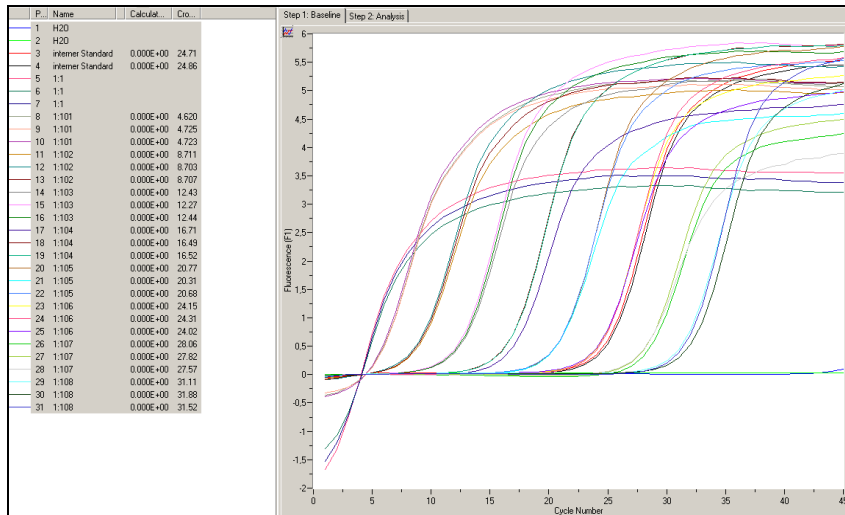


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Verdünnungsreihe von murinem cFlip aus dem LightCycler

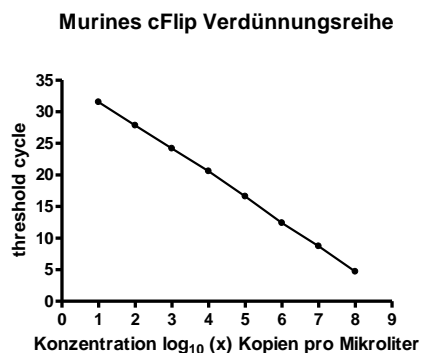


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Verdünnungsreihe von murinem cFlip umgerechnet mit Excel

### 5.2.1.1 Geradengleichung

Folgende Geradengleichungen ließen sich für die Verdünnungsreihen der verschiedenen Marker erstellen:

Humanes Fas:  $y = - 3,2595 x + 34,203$

Humanes cFlip:  $y = - 3,6921 x + 40,538$

Humane Caspase 8:  $y = - 3,4355 x + 36,38$

Murines Fas :  $y = - 3,5357 x + 35,961$

Murines FADD :  $y = - 3,477 x + 34,86$

Murines cFlip :  $y = - 3,8405 x + 35,584$

Murines Caspase 8 :  $y = - 3,3959 x + 29,709$

### 5.2.1.2 Linearität

Für jede Verdünnungsreihe ließ sich ein linearer Korrelationskoeffizient berechnen, der bei optimaler Korrelation  $r = -1$  sein sollte. Nur unter diesen Voraussetzungen kann verlässlich quantifiziert werden. Folgende Korrelationskoeffizienten ließen sich für die Verdünnungsreihen der Marker berechnen:

Humanes Fas:	$r = -0,9991$	$(p < 0,0001)$
Humanes cFlip:	$r = -0,9996$	$(p < 0,0001)$
Humane Caspase 8:	$r = -0,9999$	$(p < 0,0001)$
Murines Fas :	$r = -0,9971$	$(p = 0,0002)$
Murines FADD :	$r = -0,9998$	$(p < 0,0001)$
Murines cFlip :	$r = -0,9998$	$(p < 0,0001)$
Murines Caspase 8 :	$r = -0,999$	$(p < 0,0001)$

### 5.2.1.3 Amplifikationseffizienz

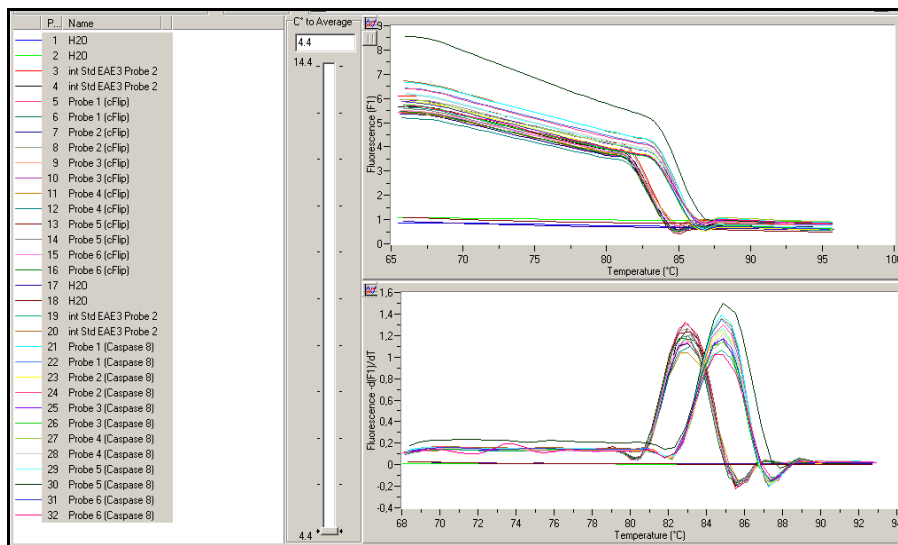
Die Amplifikationseffizienz berechnet sich aus der Steigung  $m$  der Regressionsgeraden der Verdünnungsreihe nach der Formel  $E = 10^{-1/m}$ . Würde man von einer optimalen Amplifikationseffizienz, d. h. Verdopplung der cDNA in jedem Zyklus der Real Time-PCR, ausgehen wäre  $E = 2$ . Folgende Amplifikationseffizienzen wurden für die Marker ermittelt (gerundet auf die zweite Dezimalstelle):

Humanes Fas:	$E = 2,0$	$(m = -3,2592)$
Humanes cFlip:	$E = 1,87$	$(m = -3,6921)$
Humane Caspase 8:	$E = 1,96$	$(m = -3,4355)$
Murines Fas :	$E = 1,91$	$(m = -3,5614)$
Murines FADD :	$E = 1,93$	$(m = -3,5122)$
Murines cFlip :	$E = 1,82$	$(m = -3,8405)$
Murines Caspase 8 :	$E = 1,97$	$(m = -3,3959)$

### 5.2.2 Spezifität der Primer

Die Spezifität der Primer wurde über die Schmelzkurvenanalyse getestet. Dabei zeigten sich für alle Parameter regelrechte Schmelzkurven. Bei humanem wie murinem Fas traten außerdem unspezifische Produkte in der Schmelzkurve auf, bei denen es sich jedoch um Primer-Dimere handelte. Dies sind Zusammenlagerungen zwischen Primern, bei denen auch SYBR-Green gebunden wird und die somit ebenfalls ein ansteigendes Fluoreszenzsignal

senden. Die Dimere lagen jedoch an einer anderen Stelle der Schmelzkurve und nicht im Bereich des spezifischen Produkts.



**Abbildung 8:** Beispielhafte Darstellung der Schmelzkurven von murinem cFlip und muriner Caspase 8

### 5.2.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit einer Real Time-PCR wurde zu Beginn getestet, indem jede PCR mit einem internen Standard an zwei verschiedenen Tagen wiederholt wurde. Dieser Standard wurde dann bei jedem Lauf (Verdünnungsreihen und Messungen im Kollektiv bzw. bei den Tieren) mitgeführt. Aus den verschiedenen Werten des internen Standards wurde dann für jeden Marker der Variationskoeffizient zur Darstellung der relativen Standardabweichung ermittelt.

Humanes Fas:  $VK = 0,01046618$

Humanes cFlip:  $VK = 0,0155375$

Humane Caspase 8:  $VK = 0,00628304$

Murines Fas :  $VK = 0,01705597$

Murines FADD :  $VK = 0,01342818$

Murines cFlip :  $VK = 0,01841179$

Murines Caspase 8 :  $VK = 0,01976779$

Zum Vergleich der Reproduzierbarkeit abhängig von der cDNA-Menge wurden außerdem exemplarisch die Variationskoeffizienten der Verdünnungsreihen von humanem Fas berechnet. Durch die Intraassay-Variationskoeffizienten wurden die Standardabweichungen innerhalb eines Laufs dargestellt, mit den Interassay-Variationskoeffizient die

Standardabweichungen in zwei Läufen. Es fand sich eine Zunahme der Standardabweichungen sowohl bei sehr hohen als auch sehr niedrigen cDNA Mengen an den äußeren Rändern der Verdünnungsreihen. Bei der Konzentration  $1:10^1$  lag der Ct-Wert außerhalb des messbaren Bereichs.

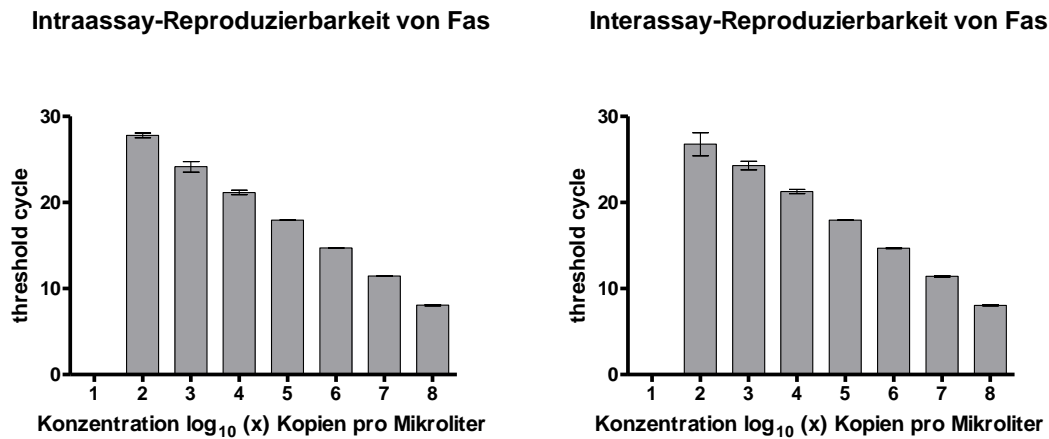


Abbildung 9: Balkendiagramm der Verdünnungsreihen von humanem Fas, dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung

Tabelle 4: Beispielhafte Darstellung der Variationskoeffizienten von Fas

Fas	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
Intraassay-Variationskoeffizient	0,0097	0,0013	0,0022	0,0017	0,012	0,0254	0,01
Interassay-Variationskoeffizient	0,0081	0,0065	0,0043	0,0017	0,011	0,02	0,033

### **5.3 Relative mRNA-Expression der Marker bei Multipler Sklerose**

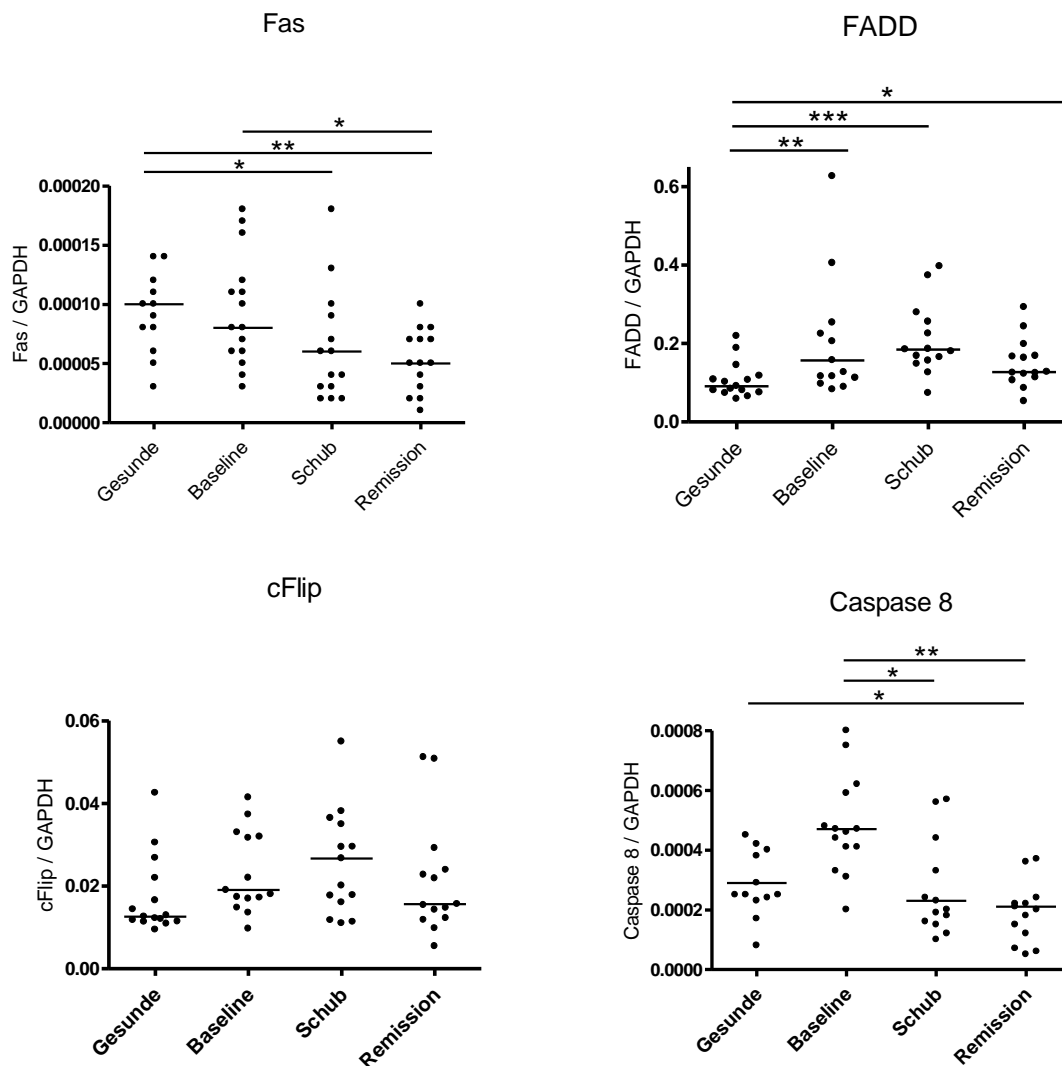
Um die Frage zu beantworten, ob in peripheren Leukozyten die mRNA von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 in den verschiedenen Krankheitsphasen der MS unterschiedlich exprimiert wird, wurden deren Transkriptlevel in der Real Time-PCR bestimmt. Zur Detektion eines Unterschiedes zwischen den verschiedenen Gruppen wurden sie im Kruskal-Wallis-Test miteinander verglichen. Zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied, wurde zum Vergleich der einzelnen Gruppen als post hoc Analyse der ManWhitney-Test durchgeführt.

Die Analyse der Fas-Expression zeigte im Kruskal-Wallis-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,017$ ). In der daraufhin durchgeführten post hoc Analyse fand sich im Vergleich mit der Baseline für Fas eine verminderte Expression in der Remission ( $p = 0,043$ ). Im Vergleich mit den gesunden Kontrollen war Fas im Schub ( $p = 0,032$ ) und in der Remission ( $p = 0,005$ ) signifikant erniedrigt.

Für FADD fand sich im Kruskal-Wallis-Test ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,002$ ). In der post hoc Analyse zeigte sich in der Remission eine Erniedrigung der mRNA von FADD im Vergleich mit der Schubgruppe ( $p = 0,068$ ). In allen drei Patientengruppen fand sich eine Erhöhung von FADD im Vergleich mit den gesunden Kontrollen (Baseline:  $p = 0,004$ ; Schub:  $p = 0,001$ ; Remission:  $p = 0,013$ ).

Für die mRNA-Expression von Caspase 8 ließ sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test zwischen den einzelnen Gruppen detektieren ( $p = 0,007$ ). In der post hoc Analyse war Caspase 8 im Vergleich zur Baseline sowohl im Schub ( $p = 0,033$ ) als auch in der Remission ( $p = 0,013$ ) signifikant erniedrigt. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen war Caspase 8 in der Remission ( $p = 0,03$ ) signifikant vermindert.

In der cFlip mRNA-Expression fand sich kein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test zwischen den beobachteten Gruppen ( $p = 0,07$ ).



**Abbildung 10: Gegen GAPDH normalisierte Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei MS**

Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Fas mRNA-Expression in Schub und Remission im Vergleich zu gesunden Kontrollen, die Remissionsgruppe war ebenfalls im Vergleich zur Baseline erniedrigt. FADD war im Vergleich mit den gesunden Kontrollen in allen Patientengruppen signifikant erhöht. cFlip zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die mRNA-Expression von Caspase 8 war sowohl in Schub als auch Remission im Vergleich zur Baseline vermindert, ebenso in der Remission im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

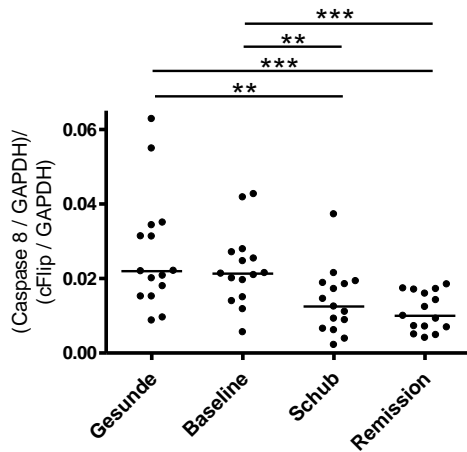
Dargestellt sind die Mediane der Gruppen. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### 5.3.1 Quotient Caspase 8/cFlip

Da das Verhältnis von Caspase 8 zu cFlip besseren Aufschluss darüber zu geben scheint, welcher Marker das größere Potential hat an FADD zu binden [78, 100, 101] wurde der Quotient aus Caspase 8/cFlip bestimmt.

Im Kruskal-Wallis-Test fand sich ein signifikante Unterschied bezüglich des Quotienten zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,0002$ ). In der post hoc Analyse durch den Mann-Whitney-Test zeigte sich eine Verminderung des Quotienten Caspase 8/cFlip im Schub ( $p =$

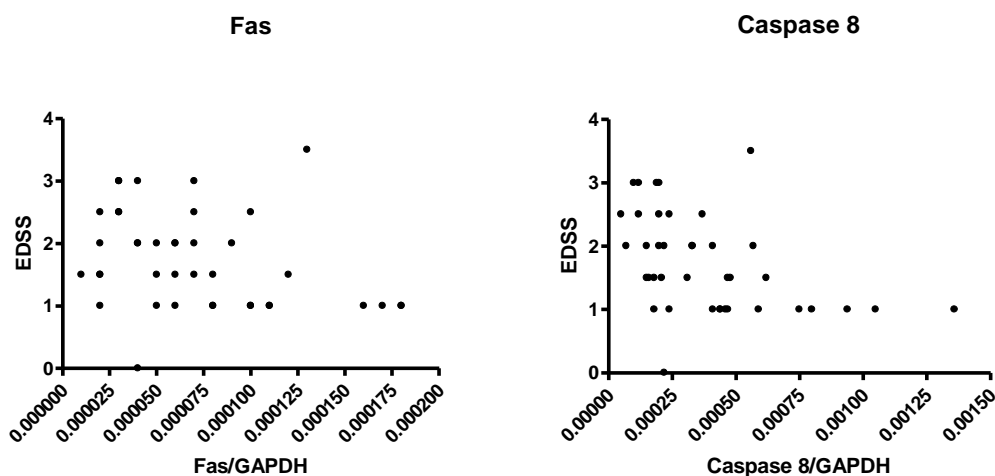
0,007) und in der Remission ( $p = 0.001$ ) im Vergleich zur Baseline. Im Vergleich mit den gesunden Kontrollen war der Quotient im Schub ( $p = 0,007$ ) und in der Remission ( $p = 0,001$ ) ebenfalls erniedrigt.



**Abbildung 11: Veränderung des Quotienten Caspase 8/cFlip in den verschiedenen Gruppen**  
 Dargestellt sind die Mediane der Gruppen. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### 5.3.2 Korrelation der Marker mit dem Behinderungsgrad

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu prüfen, ob sich einer der Marker als laborchemische Verlaufskontrolle für die Krankheitsaktivität bei MS eignet. Hierzu wurde eine Korrelationsanalyse zwischen allen Gruppen der Marker und dem EDSS durchgeführt. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem EDSS und Fas (Korrelationskoeffizient  $r = -0,3061$ ,  $p = 0,0409$ ) sowie Caspase 8 (Korrelationskoeffizient  $r = -0,4431$ ,  $p = 0,0023$ ).

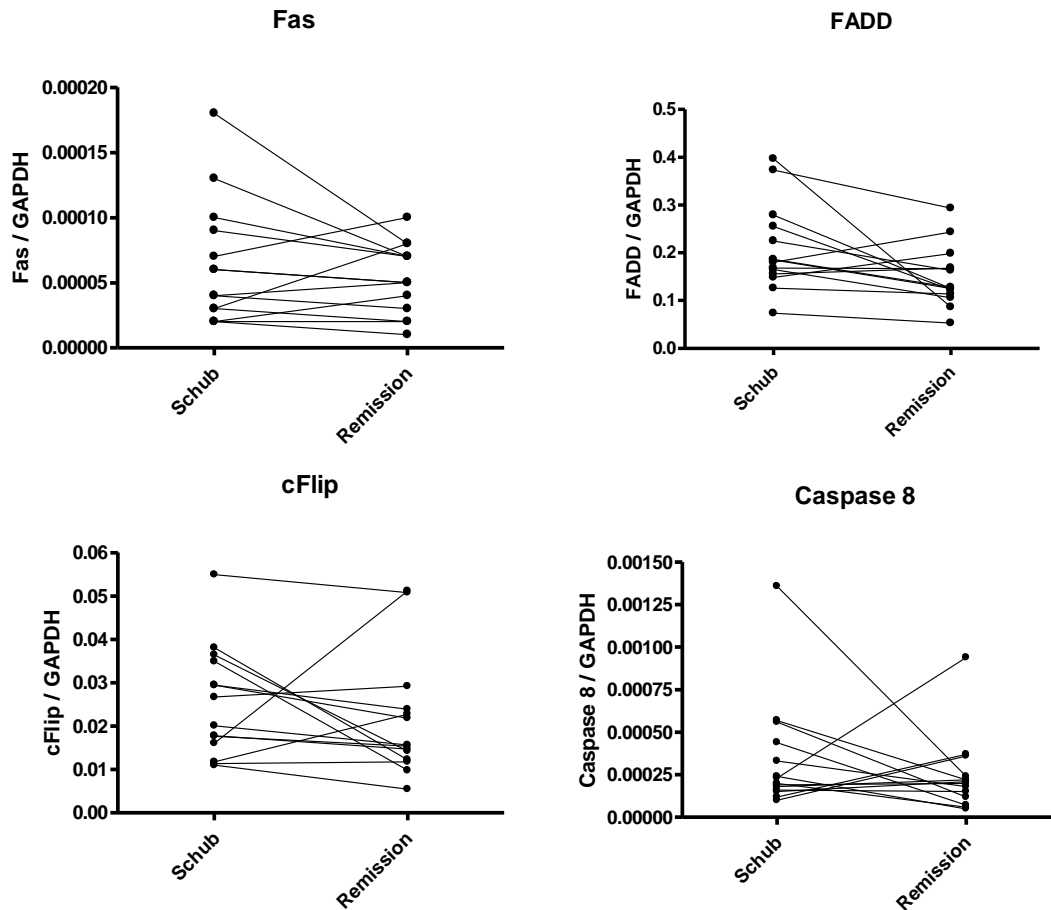


**Abbildung 12: Korrelation von Fas und Caspase 8 zum EDSS**

In der Korrelationsanalyse fand sich eine negative Korrelation zwischen Fas und dem EDSS (Korrelationskoeffizient  $r = -0,3061$ ,  $p = 0,0409$ ) sowie Caspase 8 und dem EDSS (Korrelationskoeffizient  $r = -0,4431$ ,  $p = 0,0023$ )

### 5.3.3 Serielle Analyse der Marker bei Multipler Sklerose

In der seriellen Analyse wurde die Expression der Marker in der Schub- und der Remissionsgruppe so aufgeschlüsselt, dass die Veränderungen beim einzelnen Patienten deutlich wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Rangsummentest zwischen Schub und Remission ließ sich jedoch nicht finden.



**Abbildung 13: Serielle Analyse von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei MS**

Im Wilcoxon-Rangsummentest zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Expression von Fas, FADD, cFlip oder Caspase in Schub und Remission.



#### **5.4 Relative mRNA-Expression der Marker bei Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis**

Um einen Vergleich der mRNA-Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei MS mit dem Tiermodell der EAE zu erhalten, wurden die Transkripte der vier Marker in Leukozyten von C57Bl/6 Mäuse nach MOG<sub>35-55</sub> induzierter EAE gemessen. Nach Immunisierung wurden die Tiere an Tag 8 (prae Schub), 16 (Schub) und 24 (post Schub) getötet und Leukozyten aus Milz und ZNS isoliert. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurden die Gruppen der peripheren Leukozyten sowie die Leukozyten aus dem ZNS untereinander verglichen. Erst wenn sich hier ein signifikanter Unterschied zeigte, wurde eine post hoc Analyse durch den Man-Whitney-Test durchgeführt, um Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen zu ermitteln. Im Man-Whitney-Test wurden außerdem die Leukozyten aus Milz und ZNS der prae Schub-, Schub- und post Schub-Gruppe miteinander verglichen.

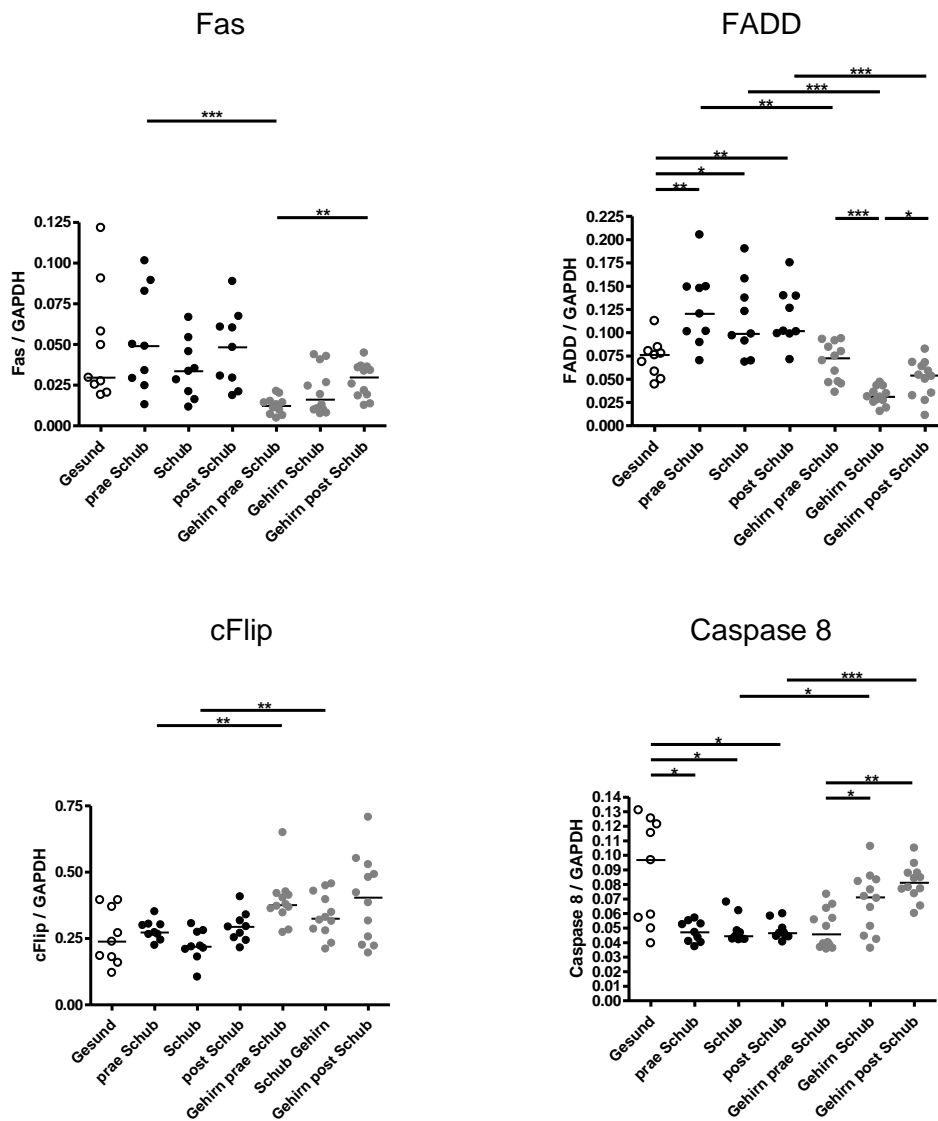
Die Analyse der Fas-Expression zeigte im Kruskal-Wallis-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen im ZNS ( $p = 0,0087$ ), jedoch nicht in der Milz. In der daraufhin durchgeführten post hoc Analyse der Leukozyten des ZNS fand sich ein signifikanter Anstieg der Fas mRNA-Expression in der post Schub Gruppe im Vergleich zur prae Schub Gruppe ( $p = 0,0006$ ). Im Vergleich zwischen peripheren und zentralen Leukozyten zeigte sich eine signifikant erniedrigte Fas mRNA-Expression im ZNS der prae Schub Gruppe ( $p = 0,0006$ ).

Für die mRNA-Expression von FADD fanden sich Unterschiede innerhalb der Leukozyten der Milz ( $p = 0,01$ ) und des ZNS ( $p = 0,0005$ ). In der Milz waren im Vergleich mit den gesunden Mäusen die Transkripte von FADD prae Schub ( $p = 0,0028$ ), im Schub ( $p = 0,0142$ ) und post Schub ( $p = 0,0056$ ) erhöht. Im Gehirn war die FADD-Expression in Leukozyten im Schub im Vergleich mit der prae und post Schub Gruppe erniedrigt ( $p = 0,0002$  bzw.  $p = 0,0166$ ). Zwischen den zentralen und peripheren Leukozyten fand sich eine Erniedrigung der FADD mRNA-Expression bei allen Leukozyten aus dem ZNS (prae Schub:  $p = 0,0016$ ; Schub:  $p = 0,0001$ ; post Schub:  $p = 0,0004$ ).

cFlip zeigte im Kruskal-Wallis-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den Leukozytengruppen der Milz und des ZNS. Nur im direkten Vergleich zwischen Milz und ZNS fand sich in letzteren eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von cFlip prae Schub ( $p = 0,0016$ ) und im Schub ( $p = 0,0032$ ).

In der Caspase 8 mRNA-Expression ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen der Milz ( $p = 0,0346$ ) und des ZNS ( $p = 0,0003$ ) detektieren. In der Milz waren im Vergleich mit den gesunden Mäusen alle Transkripte von Caspase 8 erniedrigt

(prae Schub:  $p = 0,0106$ ; Schub:  $p = 0,0244$ ; post Schub:  $p = 0,0244$ ). In den Leukozyten des ZNS zeigte sich im Vergleich mit der prae Schub Gruppe ein erhöhtes Transkriptlevel von Caspase 8 im Schub ( $p = 0,0226$ ) und post Schub ( $p = 0,0001$ ). Im Vergleich zwischen Milz und ZNS fand sich ein signifikanter Anstieg in der Caspase 8 mRNA-Expression im Schub ( $p = 0,0361$ ) und post Schub ( $p = 0,0001$ ) im Gehirn.



**Abbildung 14: Gegen GAPDH normalisierte Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei EAE**  
 Dargestellt sind die Mediane der Gruppen. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

## 6. Diskussion

### 6.1 Vor- und Nachteile einer Real-Time-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Fas und seinen Adaptermolekülen FADD, cFlip und Caspase 8 mittels Real Time-PCR bestimmt. Damit wurde ein mRNA-basiertes Nachweisverfahren als Messmethode gewählt, welches mehrere Vorteile in der täglichen Laborroutine bietet. Bei einer durchschnittlichen Dauer von ca. zwei Stunden von der Leukozyten-Isolation zur fertigen cDNA und einer Dauer von ca. 60 Minuten zur Durchführung der hier etablierten Real Time-PCRs (Ausnahme murines FADD mit ca. 120 Minuten), ermöglicht diese Methode eine zeitsparende Messung der Marker. Außerdem ist eine Real Time-PCR im LightCycler, wenn sie einmal etabliert ist, wenig arbeitsintensiv, da nur relativ wenige Komponenten pro Probe (Mastermix, Primer, cDNA und Wasser) pipettiert werden müssen. Bei der Real Time-PCR handelt es sich zudem um ein sehr sensitives und zugleich auch spezifisches Nachweisverfahren für die Expression von mRNAs, weshalb bereits geringe cDNA-Mengen aus kleinen Zellzahlen messgenau quantifiziert werden können [102]. Dies ist bei proteinbasierten Nachweisverfahren, wie zum Beispiel dem Western Blot, nicht immer der Fall. So reichte zum Beispiel die Menge an gewonnener cDNA aus den Leukozyten des ZNS der Mäuse für mehrere Real Time-PCRs, jedoch war die isolierte Proteinmenge zu gering um damit aussagekräftige Western Blots durchführen zu können. Nachteil eines mRNA-basierten Nachweisverfahrens wie der Real Time-PCR ist die Tatsache, dass die Menge an gemessenem Transkript nicht zwangsläufig der Proteinexpression entspricht. Ebenso kann eine Speicherung von größeren Mengen mRNA, die erst bedarfsadaptiert translatiert wird, nicht von einer mRNA, die für die direkte Translation in das Protein bestimmt ist, unterschieden werden. Für die in dieser Arbeit gemessenen Transkripte von Fas, cFlip und Caspase 8 konnte jedoch in mehreren Publikationen eine hohe Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinleveln in verschiedenen Zellkulturreihen sowie PBMC gezeigt werden [78, 103, 104]. Über post-translationelle Veränderungen, wie zum Beispiel die Phosphorylierung zur Aktivierung eines Proteins, können mit der vorliegenden Methode keine Aussagen gemacht werden. Auch post-transkriptionelle Modifizierungen werden nur zum Teil mit einer Real Time-PCR erfasst, wenn nämlich die Veränderungen im Bereich des durch die Primer abgelesenen Stücks der cDNA liegen. Dies lag bei keinem der Transkripte vor.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Real Time-PCR auf Grundlage von mRNA aus Leukozyten des peripheren Bluts durchgeführt. Eine spezifische Isolierung von T- oder B-

Lymphozyten oder anderen Leukozytengruppen ist nicht erfolgt. Damit gibt die Auswertung der Lysate einen Querschnitt durch alle Leukozytenpopulationen des peripheren Bluts, aber keine Auskunft über die Expressionsraten in den einzelnen Zelltypen. Dies wäre jedoch ein interessanter Ansatz für eine Folgestudie, in welcher z. B. selektiv die T-Lymphozyten untersucht werden könnten.

## **6.2 Etablierung**

Mit der Etablierung der Real Time-PCRs für Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 wurde das Ziel verfolgt, eine spezifische und gut zu reproduzierende Methode zur Quantifizierung der Marker zu finden. Zunächst wurden für jeden Parameter mehrere Primer designed und diese mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen und Mastermixen getestet. Anhand von Verdünnungsreihen wurden danach die Linearität, die Amplifikationseffizienz und die Spezifität demonstriert sowie die Reproduzierbarkeit in mehreren PCR-Läufen und im langfristigen Verlauf gezeigt. Eine PCR wurde erst dann als etabliert betrachtet, wenn sie in allen vier Bereichen gute bis sehr gute Werte erzielte.

### **6.2.1 Linearität**

Bei der Quantifizierung einer Real Time-PCR wird nur ein verlässliches Ergebnis erzielt, wenn im linearen Bereich der Standardkurve quantifiziert wird. Die Linearität der Verdünnungsreihen war für alle Marker bis in den Bereich  $1:10^8$  gegeben. Innerhalb dieses Bereichs lagen auch die Proben des gemessenen Kollektivs bzw. aus den Tierversuchen. Die Korrelationskoeffizienten der Verdünnungsreihen lagen zwischen  $r = -0,999$  (murine Caspase 8) und  $r = -0,9999$  (humane Caspase 8), weshalb von einer verlässlichen Quantifikation ausgegangen werden konnte.

### **6.2.2 Amplifikationseffizienz**

Eine optimale Amplifikationseffizienz bedeutet eine Verdopplung der cDNA bei jedem Zyklus der Real Time-PCR, was einer Effizienz der PCR von  $E = 2$  entspricht. In der vorliegenden Arbeit konnte für alle Marker eine hohe Amplifikationseffizienz gezeigt werden, die in den Bereichen zwischen  $E = 1,82$  (murines cFlip) und  $E = 2$  (humanes Fas) lag. Deshalb konnte bei den hier etablierten Real Time-PCRs von einer hohen Effizienz während der Amplifikationsphase mit guter Bindung der Primer an die cDNA und effektiver Arbeit der Polymerase ausgegangen werden.

### **6.2.3 Spezifität**

Für alle Marker wurde eine hohe Spezifität in der Real Time-PCR erzielt, die über die Schmelzkurvenanalyse überprüft wurde. In keiner der Schmelzkurven ließ sich die Amplifikation unspezifischer Produkte nachweisen. Fanden sich Primer-Dimere wie bei Fas, so entstanden diese nur im Wasser und nicht in den Proben. Dies bedeutet, dass in den Proben

das Verhältnis von Primern zur Ziel-cDNA-Sequenz ausgewogen war und sich während der Amplifizierung keine überschüssigen Primer-Dimere bilden konnten.

Wäre hier eine Real Time-PCR mit Hybridisierungssonden verwendet worden, so hätte dies ein absolut spezifisches Produkt garantiert, da sowohl Sonden als auch Primer an die Zielstruktur binden müssen und erst dann die Fluoreszenz emittiert wird [92, 105]. False-Priming oder Primer-Dimere haben dann keinen Einfluss auf das Ergebnis der PCR. Dies kann in der SYBR-Green basierten Real Time-PCR nur über eine saubere Schmelzkurve der Proben ausgeschlossen werden und ist damit ein zusätzlicher Faktor der in der Etablierung beachtet werden musste. Jedoch hat eine mit Hybridisierungssonden durchgeführte Real Time-PCR den Nachteil, dass die emittierte Fluoreszenz pro amplifizierter cDNA geringer ist als bei SYBR-Green, weshalb pro Probe eine größere Menge an Template vorliegen muss um verlässliche Messungen durchführen zu können. Außerdem sind die Hybridisierungssonden und die bei ihnen speziell zu verwendenden Glaskapillaren ein zusätzlicher Kostenfaktor.

#### **6.2.4 Reproduzierbarkeit**

Für alle etablierten Marker zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit. Bei jedem Lauf während der kompletten Versuchsreihe wurde ein interner Standard mitgeführt, und daraus nach Abschluss der Versuche der Variationskoeffizient errechnet. Dieser war bei allen Parametern sehr niedrig und unterstreicht die langfristig über die komplette Versuchsreihe gegebene gute Reproduzierbarkeit. Zusätzlich wurden exemplarisch für Fas die Variationskoeffizienten der verschiedenen Proben der Verdünnungsreihen errechnet. Die beste Reproduzierbarkeit fand sich in den mittleren Bereichen der Verdünnungsreihe, in welchen sich die niedrigsten Variationskoeffizienten zeigten. Bei sehr hohen wie auch sehr niedrigen Konzentrationen der Ausgangs-cDNA, wie sie zu Beginn als auch am Ende einer Verdünnungsreihe vorliegen, ist es wahrscheinlich, dass diese nicht im optimalen Verhältnis mit Primern und Polymerase zusammengefunden hat und so ein negativer Einfluss auf die Reproduzierbarkeit entstand. Zudem nimmt mit niedrigen Kopienzahlen in den unteren Bereichen der Verdünnungsreihen der Effekt von Pipettierfehlern zu. Es wurde dementsprechend darauf geachtet, dass die Ct-Werte der Proben den mittleren Bereichen der Verdünnungsreihen entsprachen.

## **6.3 Expression der Marker bei Multipler Sklerose**

### **6.3.1 mRNA-Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8**

Zur mRNA-Expression von Fas im Verlauf einer schubförmigen MS sind bisher nur sehr wenige Publikationen erschienen. Eine davon ist die Studie von Lopatinskaya und Mitarbeitern [76], in welcher MS-Patienten 6 und 2 Wochen vor sowie 2 und 6 Wochen nach einem Schub untersucht wurden. Dabei fanden die Autoren keinen Unterschied in der mRNA-Expression von Fas zu diesen vier Zeitpunkten. Zusätzlich wurde eine Subgruppe aus dem Patientenkollektiv definiert, die im Schub aktive Läsionen im MRT zeigten. Bei diesen Patienten konnte eine Erhöhung der mRNA von Fas 2 Wochen nach dem Schub im Vergleich zu 6 Wochen vor dem Schub nachgewiesen werden. Wurden die Proben der MS-Patienten unabhängig von Schub oder Remission gepoolt, fanden sich auch im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Transkriptlevel von Fas. In einer weiteren Studie von Gomes und Mitarbeitern [78], in welcher ebenfalls die mRNA-Expressionslevel von Fas bei MS untersucht wurden, konnte auch eine Erhöhung der Transkripte von Fas bei Patienten mit MS im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachtet werden. Wie bei der Studie von Lopatinskaya und Mitarbeitern wird im Vergleich mit den gesunden Kontrollen auch bei dieser Studie nicht zwischen Schub oder Remission bei den eingeschlossenen MS-Patienten unterschieden. Eine reine Schub- oder Remissionsgruppe, die dann mit Gesunden verglichen wurde, wurde bisher nicht untersucht.

Damit widersprechen beide Studien den Ergebnissen dieser Arbeit. Dafür lassen sich mehrere mögliche Erklärungen heranziehen. Ein Grund können die unterschiedlichen Charakteristika der Patientengruppen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde streng zwischen einem Schub und einer Remission unterschieden. Bei den Patienten der Baseline lag der letzte Schub mehr als sechs Monate zurück und der nächste Schub mindestens drei Monate nach dem Zeitpunkt der Blutabnahme. Damit sollte eine möglichst geringe basale Krankheitsaktivität sichergestellt werden. Die Patienten der Schubgruppe wurden direkt im Schub sowie drei Monate danach untersucht; an diesen Tagen fanden auch die Blutabnahmen statt. Das Ziel war in dieser Phase die Transkriptlevel bei maximaler Krankheitsaktivität sowie während des Nachlassens der immunologischen Aktivität drei Monate später zu untersuchen. Die einzelnen Patientengruppen wurden bei keinem der Vergleiche zur mRNA-Expression miteinander vermischt. Sie wurden getrennt voneinander mit eng gematchten gesunden Kontrollen verglichen, auch um eine mögliche Rückkehr der Transkriptlevel auf das Niveau einer gesunden Vergleichsgruppe zu finden. Damit unterscheiden sich unsere Patientengruppen von

den oben beschriebenen Charakteristika der Patienten von Lopatinskaya und Gomes. Ein weiterer Grund für Unterschiede zwischen den Studien kann die Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten sein. In der vorliegenden Arbeit erhielten zwölf der fünfzehn Patienten im Schub Methylprednisolon. Dieser Kortisonstoß fand jedoch immer erst nach der Blutabnahme statt, weshalb er die Schubgruppe nicht beeinflussen kann. Ein Effekt auf die drei Monate später genommene Leukozytenprobe ist als unwahrscheinlich einzustufen [106]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erhielten die Patienten von Lopatinskaya Methylprednisolon im Schub und hier ist es wahrscheinlich, dass dies die Ergebnisse der Gruppe zwei Wochen nach dem Schub beeinflusst haben kann. Dieses Argument ist aber nicht auf die Studie von Gomes anwendbar, deren Patienten keine Behandlung mit Methylprednisolon erhielten. Ein weiterer wichtiger Punkt, der zu den verschiedenen Ergebnissen bezüglich der Fas mRNA-Expression beigetragen haben mag, sind Unterschiede in den demographischen Daten der Patienten. In der vorliegenden Arbeit sind Patienten mit einem Alter zwischen 26 und 51 Jahren (Mittelwert 38,9 Jahre, Standardabweichung 7,4), einer Erkrankungsdauer zwischen 0 und 18,5 Jahren (Mittelwert 3,7 Jahre, Standardabweichung 4,7 bzw. 3,4 Jahre, Standardabweichung 4,4), einem EDSS  $\leq$  4 und maximal 2 Schüben in den letzten 2 Jahren eingeschlossen. Damit unterscheiden sie sich von den Patienten der beiden anderen Studien. Bei Lopatinskaya sind jüngere Patienten (durchschnittliches Alter 31, Standardabweichung 6,4 Jahre) mit kürzerer Krankheitsdauer (durchschnittliche Krankheitsdauer 2 Jahre, Standardabweichung 1,2) und höherem EDSS (Durchschnitt 4,4, Standardabweichung 1,3) eingeschlossen. Die Patienten bei Gomes sind heterogener in Bezug auf das Alter (19 bis 73 Jahre; Durchschnittsalter 37 Jahre). Allerdings werden in dieser Studie keine Daten zu ihrer Erkrankungsdauer oder dem EDSS veröffentlicht. Dieses Fehlen vergleichbarer Daten erschwert einen direkten Vergleich der beiden Studien mit der vorliegenden Arbeit.

In der Studie von Gomes und Mitarbeiter [78] wurden außerdem die mRNA-Expressionen von cFlip und Caspase 8 untersucht, für die jeweils signifikant erhöhte Werte in der Gruppe mit schubförmiger MS beschrieben wurden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei der sich kein Unterschied in der Caspase 8 mRNA-Expression zwischen gesunden Kontrollen und der Baselinegruppe fand. Vielmehr zeigten sich erniedrigte Caspase 8 Transkriptlevel in der Schub- und Remissionsgruppe im Vergleich mit der Baselinegruppe bzw. den gesunden Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied in der cFlip mRNA-Expression fand sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Als Erklärung der Unterschiede zwischen der Studie von Gomes und dieser Arbeit werden vermutlich die



gleichen Gründe wie unter 4.4 diskutiert beigetragen haben. Wie oben erwähnt, können die unterschiedlichen Zeitpunkte der Blutabnahme und die sich unterscheidenden demographischen Daten der Patienten die gegensätzlichen Ergebnisse der Studien hervorgerufen haben.

Zur mRNA-Expression von FADD bei MS wurden bislang keine Studien veröffentlicht.

### **6.3.2 Immunpathogenetische Bedeutung**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte sowohl in der Schub- als auch der Remissionsgruppe eine erniedrigte mRNA-Expression von Fas und Caspase 8 im Vergleich mit der Baseline bzw. den gesunden Kontrollen beobachtet werden. Beide Parameter sind wichtig in der Regulation einer chronischen Immunantwort oder eines Autoimmungeschehens durch Apoptose. Ein Beispiel hierfür stellt AICD dar, über welchen autoreaktive T-Zellen bei repetitiver Stimulation ihres TZR eliminiert werden können und der bereits unter 1.2 ausführlich beschrieben worden ist. Aber auch in allen anderen Leukozyten kann über Fas die Apoptose induziert werden. Eine Reduktion beider Parameter in der Schub- wie auch der Remissionsgruppe könnte bedeuten, dass hier bereits auf mRNA-Ebene eine Beeinflussung im Sinne einer verminderten Regulationsfähigkeit der chronischen Immunantwort durch Apoptose besteht. Vor allem zeigen sie, dass die erniedrigten Transkriptlevel über die klinisch aktive Phase des Schubs hinaus noch drei Monate danach bestehen. Sofern die mRNA-Expression hier der Proteinexpression entspricht, können diese Daten ein Beispiel für einen immunologischen Prozess sein, in welchem Leukozyten bei einer Autoimmunerkrankung dem Zelltod entkommen und ihr *Survival* verbessern. Diese Ergebnisse werden auch von anderen Studien bestätigt, in welchen eine verminderte Fas-vermittelte Apoptoserate in T-Zellen von MS-Patienten gezeigt werden konnte [71]. Vor allem die T-Zellen, die durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker mit einer Einwanderung in das ZNS in Verbindung gebracht werden können, scheinen sich durch eine verminderte Fas-Expression auf ihrer Zelloberfläche auszuzeichnen [72].

Da sowohl Caspase 8 als auch cFlip um die Bindungsstelle an FADD konkurrieren, scheint der Quotient aus Caspase 8/cFlip ein biologisch relevanter Marker für die apoptotische bzw. nicht-apoptotische Signalübertragung zu sein [77]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein signifikant niedriger Quotient in Schub und Remission im Vergleich zu Baseline und gesunden Kontrollen gezeigt werden. Bei gleicher Expression der Marker auf Proteinebene würde anstelle von Caspase 8 cFlip zur gemeinsamen Bindungsstelle an FADD rekrutiert werden und so zu einer verminderten Apoptosekapazität beitragen. Unter bestimmten

Umständen könnte es in der Zelle durch cFlip sogar zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommen, wofür bei Patienten mit MS ebenfalls erhöhte Aktivitätslevel beschrieben worden sind [4]. NF- $\kappa$ B kann als Transkriptionsfaktor sowohl proapoptotische als auch anti-apoptotische DNA-Sequenzen ablesen [107]. Zu seinen Zielgenen gehören auch Fas und cFlip [108, 109]. Die erniedrigte mRNA-Expressionsrate von Fas bei gleichzeitig unverändertem cFlip könnte im Umkehrschluss ein Zeichen für ein vermindertes Ablesen proapoptotischer Gene durch NF- $\kappa$ B sein.

In der vorliegenden Studie konnte außerdem eine erhöhte mRNA-Expression von FADD bei allen drei Gruppen der MS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen gezeigt werden. Dies scheint im ersten Moment nicht zu den erniedrigten Expressionen der Transkripte von Fas und Caspase 8 zu passen. Obwohl es sich bei FADD um die „Fas-assoziierte Death Domain“ handelt, ist Fas nicht der einzige Rezeptor, an den FADD binden kann. Als Adapterprotein kann es unter anderem an TNFR1, TRAIL R1 und R2 oder die Toll-like Rezeptoren (TLR) 3 und 4 binden und hierüber auch proinflammatorische Funktionen erfüllen [57]. Sollte die FADD-Expression ebenfalls auf Proteinebene erhöht sein, könnte dies bedeuten, dass sich die FADD-vermittelte Apoptose von Fas an andere Rezeptoren des extrinsischen Signalweges verschiebt. Dem würde jedoch eine auch auf Proteinebene erniedrigte Caspase 8 Expression widersprechen. Möglich wäre daher, dass FADD aufgrund seiner proinflammatorischen Kapazitäten an anderen Signalwegen beteiligt ist.

### **6.3.3 Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 als laborchemische Verlaufskontrollen der Krankheitsaktivität der Multiplen Sklerose**

Ein Ziel dieser Arbeit war das Prüfen der mRNA-Expressionen von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 als laborchemische Verlaufskontrollen der Krankheitsaktivität. Eine statistisch signifikante negative Korrelation fand sich zwischen den Transkriptleveln von Fas sowie Caspase 8 und dem EDSS. Beide Parameter sind wie bereits beschrieben wichtig in der Regulation einer chronischen Immunantwort bzw. eines Autoimmungeschehens durch Apoptose. Bei einer Beurteilung des EDSS ist jedoch zu beachten, dass dieser zwar ein Maß für den Behinderungsgrad bei MS darstellt, jedoch nicht zwangsläufig ein Marker für deren Krankheitsaktivität ist. Auch Defektheilungen nach einem Schub können zu einem erhöhten EDSS beitragen, sodass floride Läsionen nicht alleinige Ursache einer Erhöhung dieses Scores sein müssen. Im umgekehrten Fall können sogenannte „stumme“ jedoch immunologisch aktive Herde im ZNS entstehen, die sich nicht in klinischen Symptomen äußern und somit trotz Krankheitsaktivität den EDSS nicht erhöhen. In die Auswertung wurde

der EDSS von allen Patienten (Baseline, Schub und Remission) mit einbezogen, so dass ein Querschnitt mit sicher aktiven Phasen und klinisch stummen Phasen mit wahrscheinlich niedriger Krankheitsaktivität gebildet werden kann. Die hohe mRNA-Expression von Fas und Caspase 8 scheint einen positiven Effekt auf die Höhe des EDSS zu haben. Wird die erhöhte mRNA-Expression auch auf Proteinebene weitergegeben, könnte sie zu einer effektiveren Regulation des Immungeschehens beitragen. Dies würde eine erniedrigte Krankheitsaktivität mit weniger Schüben und konsekutiv niedrigerem Behinderungsgrad zur Folge haben.

In der seriellen Analyse der Marker wurde die mRNA-Expression in Schub und Remission so dargestellt, dass die Werte eines Patienten jeweils miteinander verbunden sind. Die homogensten Verläufe in den Expressionraten erzielten die seriellen Analysen von Fas und FADD, die ein Absinken der Transkriptlevel bei zehn bzw. elf der fünfzehn Patienten mit MS in der Remission zeigten. Bei den elf Patienten mit erniedrigter FADD-Expression fand sich bis auf eine Ausnahmen auch eine Erniedrigung der Transkripte von Fas. Eine statistisch signifikante Veränderung der Expressionsraten zwischen beiden Gruppen ließ sich im Wilcoxon-Rangsummentest jedoch nicht nachweisen.

Betrachtete man die vier bzw. fünf Patienten mit ansteigenden Fas- und FADD-Transkripten isoliert, zeigte sich, dass dies die Patienten mit dem stärksten Rückgang der klinischen Symptome in der Remission waren. Eine erhöhte Expression von Fas und FADD in der Remission könnte bei diesen Patienten auf eine bessere Regulationsfähigkeit des Immunsystems hindeuten. Über ein erhöhtes Fas bzw. FADD mag vermehrt Apoptose ausgelöst und damit die Immunantwort effektiver beendet werden, was zu einer besseren Remission dieser Patienten nach dem Schub beigetragen haben kann.

## **6.4 Expression der Marker bei Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis**

### **6.4.1 mRNA-Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8**

Zur mRNA-Expression von Fas bei EAE ist bislang nur eine Studie erschienen [110]. In dieser wurden sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von Fas in und auf Leukozyten der Milz und des ZNS gemessen und eine positive Korrelation zum klinischen Verlauf gesehen. Die maximale Fas mRNA-Expression lag dementsprechend im Schub vor, ein Ergebnis welches hier nicht bestätigt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Transkripte von Fas in den peripheren Leukozyten. In den Leukozyten des ZNS fand sich ein Anstieg der mRNA-Level in der post Schub Phase, in welcher es bereits zu einer deutlichen Besserung des klinischen Scores kam. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Studie von Bonetti und dieser Arbeit sind die unterschiedlichen Methoden, mit denen die EAE bei den Mäusen induziert wurde. Während die EAE für diese Arbeit durch Immunisierung der Tiere mit MOG<sub>35-55</sub> ausgelöst wurde, wurde bei Bonetti die Methode des adoptiven Transfers gewählt. Zudem wurden die Versuche hier mit C57Bl/6 Mäusen durchgeführt, während bei Bonetti Tiere mit dem genetischen Hintergrund SJL/L benutzt wurden. Damit sind zwei sehr unterschiedliche methodische Herangehensweisen gewählt worden, die einen Vergleich beider Arbeiten erschweren. Die klinischen Verläufe der EAE in beiden Arbeiten ähneln sich, da jeweils ein chronischer Verlauf mit aufgelagerten Schüben und unvollständiger Remission bei den Mäusen gesehen wird. Unter der Voraussetzung, dass die mRNA-Expression der Proteinexpression entspricht, mag man spekulieren, dass Fas bei Bonetti früher als in der vorliegenden Arbeit im Schub an der Regulation der Immunantwort beteiligt ist und in der Remission an Bedeutung verliert. Publikationen zur Expression der Transkripte von FADD, cFlip und Caspase 8 in Leukozyten bei EAE sind bislang nicht erschienen.

### **6.4.2 Immunpathogenetische Bedeutung**

Die meisten Veröffentlichungen zu einem der Marker bei EAE beziehen sich auf die Proteinexpression von Fas/die Fas-vermittelte Apoptose oder den Krankheitsverlauf bei Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen. Abhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere und dem zur Immunisierung genutzten Myelinpeptid gibt es mehrere Publikationen, die von einem schwächeren Verlauf der EAE bei Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen berichten [81, 82], und andere, bei denen die Tiere stärker erkrankten [83]. Insgesamt scheint der Verlauf einer EAE bei C57Bl/6 mit Fas<sup>lpr/lpr</sup> jedoch schwächer zu sein [111]. Die vermutliche Ursache wird in der Resistenz der Oligodendrozyten zur FasL-Fas vermittelten Apoptose durch autoreaktive T-Zellen

angenommen [111]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine an Tag 8 erniedrigte mRNA-Expression von Fas in Leukozyten des ZNS im Vergleich zur Milz gezeigt werden. Innerhalb der Leukozyten des ZNS stiegen die Transkriptlevel von Fas in der Remission an Tag 24 jedoch wieder an. Sollte sich diese Expression auf Proteinebene fortsetzen, könnte es ein Hinweis darauf sein, wie in den autoreaktiven Leukozyten des ZNS im Verlauf der Erkrankung Fas zur Regulation der chronischen Immunantwort erhöht wird. Dieses Ergebnis scheint jedoch eher jenen Studien zu entsprechen, die bei Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen mit EAE einen stärkeren Krankheitsverlauf sehen konnten, bei dem vor allem die geringe Remission imponierte [83]. Unabhängig davon, ob Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse einen schwächeren oder stärkeren Verlauf der EAE zeigen, ist bei ihnen im Schub die Stärke der Läsionen im ZNS vergleichbar mit WT-Tieren [82, 112]. Fas scheint damit im Tiermodell wenig am initialen Immungeschehen beteiligt zu sein. Dies könnte ein weiterer Grund für das auf mRNA-Ebene erst relativ späte Ansteigen der Fas-Expression in Leukozyten sein.

Zur Rolle von FADD bei EAE gibt es bislang nur eine Veröffentlichung. In dieser wurde die EAE bei C57Bl/6 Mäusen mit einer „dominant-negative“ (DN) FADD-Mutation in T-Zellen induziert, was einer kompletten Blockade von FADD in diesen Zellen entspricht [85]. Im Gegensatz zu den WT-Kontrolltieren erkrankten von den DN-FADD Mäusen nur 44 %. Die erkrankten DN-FADD Tiere zeigten zudem einen deutlich schwächeren Verlauf der EAE mit klinischen Scores von maximal 1. Neben der Vermittlung von Apoptose über Fas, TNFR1 und TRAIL R1 bzw R2 kann FADD ebenfalls an der Aktivierung von NF-κB und konsekutiver Proliferation beteiligt sein [113]. Ein Ziel der Studie von Sun und Mitarbeitern war zu zeigen, welcher dieser gegensätzlichen Prozesse bei EAE überwiegt. Dazu wurden transgene Mäuse mit einem MOG-spezifischen TZR und DN-FADD gekreuzt. Die T-Zellen der so entstandenen Tiere wurden wiederum anderen Mäusen injiziert, bevor sie mit MOG<sub>35-55</sub> immunisiert wurden. An Tag 6 erfolgte deren Tötung und Untersuchung der Leukozytenpopulationen in der Milz. Dabei wurden signifikant niedrigere Zahlen der T-Zellen mit MOG-spezifischen TZR und DN-FADD gefunden. Die Autoren schlossen daraus, dass FADD eine wichtige Funktion in der Proliferation der autoreaktiven T-Zellen hat und bei den DN-FADD Mäusen deshalb die EAE nur in abgeschwächter Form abläuft. In der hier vorliegenden Studie wurde eine signifikante Erhöhung der mRNA von FADD an Tag 8, 16 und 24 in den Leukozyten aus der Milz gesehen. Würde sich diese Erhöhung auch auf Proteinebene zeigen, könnte hierüber tatsächlich eine vermehrte Aktivierung von NF-κB stattfinden. Interessant ist indes die in den Leukozyten des ZNS deutlich herabregulierte Expression der mRNA von FADD. Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass FADD zwar

an der initialen Proliferation der Leukozyten nach Immunisierung beteiligt ist, aber im weiteren Verlauf in den autoreaktiven Zellen des ZNS weniger relevant ist.

Zwei weitere Studien beschäftigen sich mit der Überexpression von cFlip bei EAE. In beiden Studien wurde die lange Isoform, cFlip<sub>L</sub>, für die Überexpression gewählt, da diese Isoform am stärksten zur Aktivierung von NF-κB beizutragen scheint. Bei Djerbi [87] wurde die EAE bei DBA/1 Mäusen mit einer Überexpression von cFlip in allen myeloischen und lymphatischen Zellen induziert und ein schwerer Krankheitsverlauf ohne Remission beobachtet. Im Gegensatz dazu erkrankten bei Tseveleki [86] C57Bl/6 Mäuse mit einer selektiven cFlip-Überexpression in T-Zellen seltener, und die wenigen erkrankten Tiere zeigten geringere klinische Scores als die WT-Kontrollen. Obwohl es sich bei der EAE um eine mit einer Th1-Polarisation des Immunsystems einhergehende Erkrankung handelt, fanden die Autoren beider Studien eine Verschiebung des Zytokonnusters von Th1 zu Th2, welcher jedoch bei den Tieren von Tseveleki ausgeprägter zu sein scheint. Djerbi und Mitarbeiter argumentieren, dass ihre Tiere einen schwereren Verlauf der EAE zeigen, da durch die Überexpression von cFlip in allen Leukozyten keine Regulation der Immunantwort und auch keine Remission durch die Fas-vermittelte Apoptose eingeleitet werden kann. Vor diesem Hintergrund diskutieren Tseveleki und Mitarbeiter, dass eine bei ihren Mäusen effektivere Th2 polarisierte Immunantwort die Induktion der EAE abschwächen konnte. Ursache für die sich widersprechenden Ergebnisse beider Publikationen mag der unterschiedliche genetische Hintergrund der Tiere sein. Zudem konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass abhängig von der Höhe der cFlip Expression auch unterschiedliche Signale in T-Zellen vermittelt werden [114]. So scheint eine zu stark erhöhte cFlip-Expression wiederum die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen zu inhibieren. Vor diesem Hintergrund ist die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schwierig. Bei den aus der Milz gewonnenen Leukozyten zeigte sich kein Unterschied in der mRNA-Expression von cFlip, jedoch fand sich im Vergleich mit diesen Zellen eine Erhöhung der cFlip-Transkripte in den Leukozyten des Gehirns prae Schub und im Schub. Bei den hier untersuchten Leukozyten kann nicht im Nachhinein die cFlip-Expression in den T-Zellen selektiv ermittelt werden, noch kann zwischen den verschiedenen Isoformen cFlips unterschieden werden. Außerdem ist nicht klar, ob das cFlip mRNA-Expressionsmuster auch auf Proteinebene weiter besteht. Bei C57Bl/6 Mäusen findet man während der EAE eine Th1-Ausrichtung des Immunsystems, somit mag der Ansatz der Protektion vor EAE durch einen Th2-Shift in den T-Zellen hier nicht zutreffen. Möglicherweise ist die erhöhte cFlip mRNA-Expression in den Leukozyten

des ZNS ein Ausdruck des Ablesens antiapoptotischer und proliferationsfördernder Gene durch NF- $\kappa$ B.

Bisher wurde weder die mRNA- noch Proteinexpression von Caspase 8 bei Mäusen mit EAE untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Verminderung der Transkripte von Caspase 8 in den Leukozyten der Milz prae Schub, im Schub und post Schub gesehen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Anhebung der Caspase 8 mRNA-Level in den Leukozyten des Gehirns im Schub und post Schub. Wie oben bereits beschrieben, steigt auch die Fas mRNA-Expression in den Leukozyten des Gehirns post Schub an. Bei Weiterbestehen der erhöhten mRNA-Expression beider Parameter auf Proteinebene, könnten erhöhte Mengen proapoptotischer Proteine eine Induktion der Apoptose in diesen Zellen erleichtern. Sollte eine effektive Apoptose über diesen Signalweg in den autoreaktiven Leukozyten des ZNS stattfinden, könnte die Regulation der Immunantwort in der Remission durch die Fas-vermittelte Apoptose geschehen.

## **6.5 Vergleich beider Erkrankungen und Schlussfolgerung**

Beim Vergleich der Expression von Fas in Leukozyten von MS-Patienten und aus der Milz der C57Bl/6 Mäuse fällt auf, dass die mRNA-Expression des Rezeptors im Verlauf des Schubes bei MS abnimmt, während sich in den Leukozyten der Milz bei EAE keine Veränderungen der Transkript-Level zeigen. Im Gegensatz dazu fallen bei FADD, cFlip und Caspase 8 in der Expression bei MS und EAE mehrere Parallelen auf. Die mRNA-Expression von FADD ist bei MS bei allen Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht. Gleiches gilt bei der EAE, in der ebenfalls zu allen drei Zeitpunkten in der Milz erhöhte Transkript-Level im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren gefunden wurden. In der cFlip mRNA-Expression zeigte sich sowohl bei MS als auch EAE kein Unterschied in den peripheren Leukozyten der verschiedenen Gruppen. Die Transkript-Level von Caspase 8 sind bei MS im Schub als auch in der Remission erniedrigt ebenso wie bei EAE, bei welcher verminderte Caspase 8-Transkripte in allen drei Gruppen gefunden wurden.

Nun handelt es sich bei der EAE um eine artifiziell ausgelöste Erkrankung bei vormals gesunden Tieren. Die MS hingegen ist eine Erkrankung mit unbekannter Ätiologie und nur teilweise aufgeklärter Pathogenese. Es ist bei MS nicht bekannt, wie die aktivierten autoreaktiven T-Zellen entstehen und weshalb langfristig keine erfolgreiche Regulation des Immungeschehens stattfindet. Bei Vorliegen einer multifaktoriellen Krankheitsgenese ist wahrscheinlich, dass mehrere Prädispositionsfaktoren seitens des Patienten zusammen mit äußeren Faktoren das Autoimmungeschehen beeinflussen. Würde man von einer direkten Vergleichbarkeit des Krankheitsverlaufs der MS und der EAE ausgehen, könnte man spekulieren, dass verminderte Transkript-Level von Fas durch niedrigere Proteinexpressionen zu einem langfristigen Überleben der autoreaktiven T- bzw. B-Zellen beitragen. Dies könnte im umgekehrten Fall ein Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Studie die besten Remissionen bei jenen Patienten gesehen wurden, die nach dem Schub Fas auf mRNA-Ebene am stärksten hochregulierten. Dies mag auch den ansteigenden Fas Transkript-Leveln in den Leukozyten aus den Gehirnen bei EAE in der post Schub Phase entsprechen, in welcher die Tiere in Remission sind und die Immunaktivität im ZNS abnimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Leukozyten aus dem ZNS von MS-Patienten mit denen von Mäusen während der EAE verglichen. Trotzdem lässt sich aus den Tieren der Rückschluss ziehen, dass die in den peripheren Leukozyten gefundenen Expressionslevel der Transkripte nicht automatisch jenen im ZNS entsprechen müssen. Da sich die Veränderungen der Transkriptlevel von FADD, cFlip und Caspase 8 in der Peripherie bei beiden Erkrankungen gleichen, mag man spekulieren, ob dies im ZNS ebenfalls zutrifft. Bei der



mRNA-Expression von Fas wäre ein Anstieg in den Leukozyten des ZNS und eine damit vielleicht einhergehende erhöhte Proteinexpression und vermehrte Apoptose zumindest folgerichtig, sollte im ZNS hierüber die Immunantwort reguliert werden. Fraglich wäre jedoch wie effektiv die Apoptose in der Regulation der Immungeschehens tatsächlich ist.

Die MS und die EAE sind zwei verschiedene Erkrankungen im Mensch und im Tier, die eine unterschiedliche Ätiologie haben. Die EAE wird in Studien oft genutzt, um Aussagen über die Immunpathogenese der MS zu treffen. Dabei erwiesen sich einige Erkenntnisse aus dem Tiermodell als zutreffend, wie zum Beispiel die erfolgreiche Anwendung von Glatirameracetat oder monoklonalen Antikörpern gegen VLA-4 in der Therapie der MS zeigen. Auf der anderen Seite scheint es aber auch gravierende Unterschiede zwischen beiden Erkrankungen zu geben: so war zum Beispiel die Gabe von Antikörpern gegen TNF alpha eine erfolgreiche Therapie der EAE, die jedoch angewandt am Menschen zu einer erhöhten Schubrate und stärkerem Krankheitsverlauf führte [115]. Die entsprechende Studie musste seinerzeit verfrüht abgebrochen werden. Für die vorliegende Arbeit lässt sich daraus ableiten, dass sich die Ergebnisse bei MS und EAE zwar in vielerlei Hinsicht entsprechen, aber keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die in den Zellen ausgelösten Signale ihre jeweils gleiche Entsprechung im Mensch und in der Maus finden.

Auch die hier gemessene mRNA-Expression kann nur Hinweise darauf geben, ob Proteine vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Entsprechen die mRNA-Level der Proteinebene, ist jedoch noch keine Aussage darüber getroffen, ob der entsprechende Signalweg auch häufiger aktiviert wird und ob er effektiv arbeitet. Ebenso wurde hier die mRNA-Expression jeweils aller Leukozyten des peripheren Blut bzw. der Milz und des ZNS und nicht in einzelnen Leukozytensubpopulationen gemessen. Beides muss bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] McFarlin DE, Lachmann PJ. Multiple sclerosis. Hopeful genes and immunology. *Nature*. 1989 Oct 26;341(6244):693-4.
- [2] Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Oct 28;100(22):12877-82.
- [3] Stohl W, Gonatas NK. Chronic permeability of the central nervous system to mononuclear cells in experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol*. 1978 Sep;121(3):844-50.
- [4] Yan J, Greer JM. NF-kappa B, a potential therapeutic target for the treatment of multiple sclerosis. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2008 Dec;7(6):536-57.
- [5] Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, et al. Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Deutsches Arzteblatt international*. 2008 Feb;105(7):113-9.
- [6] Ebers GC, Sadovnick AD. The geographic distribution of multiple sclerosis: a review. *Neuroepidemiology*. 1993;12(1):1-5.
- [7] Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology*. 1995 Nov-Dec;47(4-5):425-48.
- [8] Wingerchuk DM. Environmental factors in multiple sclerosis: Epstein-Barr virus, vitamin D, and cigarette smoking. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2011 Mar-Apr;78(2):221-30.
- [9] Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine*. 2001 Mar;7(3):115-21.
- [10] Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug 11;476(7359):214-9.
- [11] Hillert J, Fredrikson S. [Wanted: families with multiple sclerosis]. *Lakartidningen*. 1994 Apr 13;91(15):1494.
- [12] Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 1983 Jul;40(7):406-8.
- [13] Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*. 2006 Dec 20;296(23):2832-8.

- [14] Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland). 1996 Jul;6(3):259-74.
- [15] Pender MP, Csurhes PA, Greer JM, Mowat PD, Henderson RD, Cameron KD, et al. Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5322-31.
- [16] Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine*. 2005 Mar;11(3):328-34.
- [17] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology*. 2005;23:683-747.
- [18] Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Feb;1812(2):252-64.
- [19] Bitsch A, Kuhlmann T, Da Costa C, Bunkowski S, Polak T, Bruck W. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia*. 2000 Feb 15;29(4):366-75.
- [20] Sanders P, De Keyser J. Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain research reviews*. 2007 Jun;54(2):274-85.
- [21] Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 1995 Apr;37(4):424-35.
- [22] Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*. 2000 Jun;123 ( Pt 6):1174-83.
- [23] Bruck W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 1995 Nov;38(5):788-96.
- [24] Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *The New England journal of medicine*. 2003 Jul 10;349(2):139-45.
- [25] Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Dec 19;92(26):12041-5.
- [26] Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of neurology*. 1998 Apr;43(4):465-71.

- [27] Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature clinical practice*. 2006 Apr;2(4):201-11.
- [28] Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907-11.
- [29] Courtney AM, Castro-Borrero W, Davis SL, Frohman TC, Frohman EM. Functional treatments in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*. 2011 Jun;24(3):250-4.
- [30] Rae-Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed JF. Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 1999 Jun;5(3):179-83.
- [31] McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2001 Jul;50(1):121-7.
- [32] Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011 Feb;69(2):292-302.
- [33] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of neurology*. 2005 Dec;58(6):840-6.
- [34] Reichardt HM, Gold R, Luhder F. Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert review of neurotherapeutics*. 2006 Nov;6(11):1657-70.
- [35] 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]. *Der Nervenarzt*. 2001 Aug;72(8):577-89.
- [36] Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2003 Jan 2;348(1):15-23.
- [37] Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews*. 2007 Nov;7(11):904-12.
- [38] Panitch H, Ciccone C. Induction of recurrent experimental allergic encephalomyelitis with myelin basic protein. *Annals of neurology*. 1981 May;9(5):433-8.
- [39] Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *European journal of immunology*. 1995 Jul;25(7):1951-9.

- [40] Gold R, Lington 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 Aug;129(Pt 8):1953-71.
- [41] Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol*. 1981 Oct;127(4):1420-3.
- [42] Janeway CA. *Immunology*. Spektrum Akademischer Verlag. 2002; Auflage: 5. Auflage.
- [43] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
- [44] Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Aug;9(8):655-62.
- [45] Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Jan 30;273(5):2926-30.
- [46] Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1169-78.
- [47] Li-Weber M, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Seminars in immunology*. 2003 Jun;15(3):145-57.
- [48] Feig C, Tchikov V, Schutze S, Peter ME. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *The EMBO journal*. 2007 Jan 10;26(1):221-31.
- [49] Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO journal*. 2004 Aug 4;23(15):3175-85.
- [50] Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, et al. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Dec 14;276(50):47100-6.
- [51] Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schutze S, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *The EMBO journal*. 2006 Mar 8;25(5):1009-23.
- [52] Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Molecular and cellular biology*. 2002 Jan;22(1):207-20.
- [53] Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CG, et al. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *European journal of immunology*. 2004 Jul;34(7):1930-40.

- [54] Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, et al. A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell*. 2003 Feb;11(2):529-41.
- [55] Newton K, Strasser A. Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes & development*. 2003 Apr 1;17(7):819-25.
- [56] Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature reviews*. 2006 Mar;6(3):196-204.
- [57] Park SM, Schickel R, Peter ME. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Current opinion in cell biology*. 2005 Dec;17(6):610-6.
- [58] Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, NY)*. 1994 Jul 22;265(5171):528-30.
- [59] Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *The EMBO journal*. 1995 Mar 15;14(6):1129-35.
- [60] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):789-95.
- [61] Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*. 1995 Oct 19;377(6550):630-2.
- [62] Restifo NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nature medicine*. 2000 May;6(5):493-5.
- [63] Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):180-92.
- [64] Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *The EMBO journal*. 1995 Dec 15;14(24):6136-47.
- [65] Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews*. 2007 Jul;7(7):532-42.
- [66] Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, Foote LC, Wang Z, Stanger B, et al. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):163-5.
- [67] Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Feb 19;193(4):447-58.

- [68] Fleisher TA, Straus SE, Bleesing JJ. A genetic disorder of lymphocyte apoptosis involving the fas pathway: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Current allergy and asthma reports*. 2001 Nov;1(6):534-40.
- [69] Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):314-7.
- [70] Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):194-200.
- [71] Okuda Y, Apatoff BR, Posnett DN. Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2006 Feb;171(1-2):163-70.
- [72] Julia E, Montalban X, Al-Zayat H, Issazadeh-Navikas S, Goertsches R, Martin R, et al. Deficient Fas expression by CD4+ CCR5+ T cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2006 Nov;180(1-2):147-58.
- [73] Seidi OA, Sharief MK. The expression of apoptosis-regulatory proteins in B lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2002 Sep;130(1-2):202-10.
- [74] Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2001 Feb 15;113(2):268-74.
- [75] Sharief MK. Increased cellular expression of the caspase inhibitor FLIP in intrathecal lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2000 Nov 1;111(1-2):203-9.
- [76] Lopatinskaya L, van Boxel-Dezaire AH, Barkhof F, Polman CH, Lucas CJ, Nagelkerken L. The development of clinical activity in relapsing-remitting MS is associated with a decrease of FasL mRNA and an increase of Fas mRNA in peripheral blood. *Journal of neuroimmunology*. 2003 May;138(1-2):123-31.
- [77] Gomes AC, Morris M, Stawiarz L, Jonsson G, Putheti P, Bronge L, et al. Decreased levels of CD95 and caspase-8 mRNA in multiple sclerosis patients with gadolinium-enhancing lesions on MRI. *Neuroscience letters*. 2003 Dec 4;352(2):101-4.
- [78] Gomes AC, Jonsson G, Mjornheim S, Olsson T, Hillert J, Grandien A. Upregulation of the apoptosis regulators cFLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003 Feb;135(1-2):126-34.
- [79] Arthur AT, Armati PJ, Bye C, Heard RN, Stewart GJ, Pollard JD, et al. Genes implicated in multiple sclerosis pathogenesis from consilience of genotyping and expression profiles in relapse and remission. *BMC medical genetics*. 2008;9:17.

- [80] Achiron A, Feldman A, Mandel M, Gurevich M. Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relapse. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007 Jun;1107:155-67.
- [81] Sabelko KA, Kelly KA, Nahm MH, Cross AH, Russell JH. Fas and Fas ligand enhance the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis, but are not essential for immune privilege in the central nervous system. *J Immunol*. 1997 Oct 1;159(7):3096-9.
- [82] Okuda Y, Bernard CC, Fujimura H, Yanagihara T, Sakoda S. Fas has a crucial role in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular immunology*. 1998 Apr;35(5):317-26.
- [83] Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD. Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Jan;105(2):223-31.
- [84] Zhu B, Luo L, Chen Y, Paty DW, Cynader MS. Intrathecal Fas ligand infusion strengthens immunoprivilege of central nervous system and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1561-9.
- [85] Sun J, Hilliard B, Xu L, Chen YH. Essential roles of the Fas-associated death domain in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4783-8.
- [86] Tseveleki V, Bauer J, Taoufik E, Ruan C, Leondiadis L, Haralambous S, et al. Cellular FLIP (long isoform) overexpression in T cells drives Th2 effector responses and promotes immunoregulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2004 Dec 1;173(11):6619-26.
- [87] Djerbi M, Abdul-Majid KB, Abedi-Valugerdi M, Olsson T, Harris RA, Grandien A. Expression of the long form of human FLIP by retroviral gene transfer of hemopoietic stem cells exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):2064-73.
- [88] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*. 1996 Oct;6(10):995-1001.
- [89] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996 Oct;6(10):986-94.
- [90] Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *BioTechniques*. 1991 Jan;10(1):76-83.
- [91] Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques*. 1997 Jan;22(1):176-81.
- [92] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*. 1997 Jan;22(1):130-1, 4-8.



- [93] Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*. 1998 Jun;24(6):954-8, 60, 62.
- [94] Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and cell biology*. 2001 Jun;79(3):213-21.
- [95] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85.
- [96] Pfaffl. Real-Time PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. *Biospektrum*. 2004;1/04(1):92-5.
- [97] Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Audano L, Castello A, Magliola U, et al. Evaluation of bioavailability of three types of IFNbeta in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification. *Journal of immunological methods*. 2001 Oct 1;256(1-2):141-52.
- [98] Mülhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. 2003;4. Auflage.
- [99] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444-52.
- [100] Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, et al. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*. 1998 Apr;5(4):271-88.
- [101] Tepper CG, Seldin MF. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1727-37.
- [102] Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech*. 2003 Mar;14(1):33-43.
- [103] Huang C, Li J, Zheng R, Cui K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human hepatoma cells is mediated by CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system and may involve activation of wild-type p53. *Molecular biology reports*. 2000 Mar;27(1):1-11.
- [104] Jonsson G, Paulie S, Grandien A. High level of cFLIP correlates with resistance to death receptor-induced apoptosis in bladder carcinoma cells. *Anticancer research*. 2003 Mar-Apr;23(2B):1213-8.
- [105] Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer. *Current opinion in biotechnology*. 1995 Feb;6(1):103-10.

- [106] Martinez-Caceres EM, Barrau MA, Brieva L, Espejo C, Barbera N, Montalban X. Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects. *Clinical and experimental immunology*. 2002 Jan;127(1):165-71.
- [107] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6853-66.
- [108] Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and cellular biology*. 2001 Aug;21(16):5299-305.
- [109] Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A, Ju ST. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol*. 1998 Oct 1;161(7):3469-73.
- [110] Bonetti B, Pohl J, Gao YL, Raine CS. Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis. *J Immunol*. 1997 Dec 1;159(11):5733-41.
- [111] Sabelko-Downes KA, Russell JH, Cross AH. Role of Fas--FasL interactions in the pathogenesis and regulation of autoimmune demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology*. 1999 Dec;100(1-2):42-52.
- [112] Malipiero U, Frei K, Spanaus KS, Agresti C, Lassmann H, Hahne M, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient *lpr* and *gld* mice. *European journal of immunology*. 1997 Dec;27(12):3151-60.
- [113] Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, et al. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *The Journal of cell biology*. 2004 Aug 2;166(3):369-80.
- [114] Tai TS, Fang LW, Lai MZ. c-FLICE inhibitory protein expression inhibits T-cell activation. *Cell death and differentiation*. 2004 Jan;11(1):69-79.
- [115] Caminero A, Comabella M, Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *Journal of neuroimmunology*. 2011 May;234(1-2):1-6.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Immunreaktion bei Multipler Sklerose (Hemmer et al., 2006)
- Abbildung 2:** Vergleich zweier Mäuse mit Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (Janeway, CA. Immunology 2002)
- Abbildung 3:** Internalisierung von Fas (Schütze et al., 2008)
- Abbildung 4:** Die unterschiedlichen Rollen der Fas-vermittelten Signaltransduktion im Immunsystem (Strasser et al., 2009)
- Abbildung 5:** Typischer Verlauf einer MOG<sub>35-55</sub> induzierten EAE bei einer C57/B16 Maus
- Abbildung 6:** Beispielhafte Darstellung der Verdünnungsreihe von murinem cFlip aus dem LightCycler
- Abbildung 7:** Beispielhafte Darstellung der Verdünnungsreihe von murinem cFlip umgerechnet mit Exel
- Abbildung 8:** Beispielhafte Darstellung der Schmelzkurven von murinem cFlip und muriner Caspase 8
- Abbildung 9:** Balkendiagramm der Verdünnungsreihen von humanem Fas, dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung
- Abbildung 10:** Gegen GAPDH normalisierte Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8
- Abbildung 11:** Veränderung des Quotienten Caspase 8/cFlip in den verschiedenen Gruppen
- Abbildung 12:** Korrelation von Fas und Caspase 8 zum EDSS
- Abbildung 13:** Serielle Analyse von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei MS
- Abbildung 14:** mRNA Expression von Fas, FADD, cFlip und Caspase 8 bei EAE

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** McDonald Kriterien (modifiziert nach McDonald et al. 2001, Polmann et al 2005 und 2010)

**Tabelle 2:** EDSS nach Kurzke (Kurzke et al., 1983)

**Tabelle 3:** Score zur Quantifizierung des Krankheitsgrades im Verlauf der EAE

**Tabelle 4:** Beispielhafte Darstellung der Variationskoeffizienten von Fas

## Publikationsliste

### **Poster**

*Budde R*, Thomas T, Reuss R, Oschmann P, Berghoff M. mRNA-Expression Patterns of Intracellular TRADD, FADD, cFlip, TRAF2 and Caspase 8 in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. Paperpräsentation auf dem 62. Kongress der American Academy of Neurology in Toronto, April 2010

*Budde R*, Tietz S, Thomas T, Reuss R, Oschmann P, Berghoff M. mRNA expression of death receptors TNFR1 and FAS in relapsing-remitting multiple sclerosis. Posterpräsentation auf dem Kongress des European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis in Göteborg, Oktober 2010

Tietz S, Kolbe M, *Budde R*, Berghoff M. MK2 as possible target to alter cell adhesion. Posterpräsentation auf dem Kongress des European Committee for Research and Treatment in Multiple Sclerosis in Amsterdam, Oktober 2011

### **Veröffentlichungen**

*Budde R*, Thomas T, Reuss R, Oschmann P, Berghoff M. mRNA expression patterns of death receptors TNFR1 and FAS in relapsing-remitting multiple sclerosis patients (Journal of Neurological Sciences, under revision)

## Danksagung

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

Herrn PD Dr. Berghoff danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die Möglichkeit sie in seinem Labor anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Oschmann danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Bödeker danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Herrn Dr. Reuss und Herrn Dr. Thomas danke ich für die Einarbeitung in das Thema.

Weiterhin danke ich allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit zur Seite standen. Allen voran den Mitarbeiterinnen des Liquorlabors und den anderen Doktoranden für ihre freundschaftliche Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Silvia Tietz für ihre wissenschaftliche Unterstützung und ihre Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Christian Hofmann für die emotionale Unterstützung und die stete Aufmunterung – danke für alles.