

Immunmonitoring bei der Therapie der Multiplen Sklerose mit β -Interferonen

- Durchflusszytometrische Bestimmungen
von Zytokinen und Zytokinrezeptoren -

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

GESINE KRISTINA FOERSTER

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 389687677-5

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2004

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
-Neurologische Klinik-

Betreuer: PD Dr. P. Oschmann

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch Herrn Prof. Dr. E. Petzinger

**Immunmonitoring bei der Therapie der Multiplen Sklerose
mit β -Interferonen**

-Durchflusszytometrische Bestimmungen
von Zytokinen und Zytokinrezeptoren-

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Gesine Kristina Foerster
Tierärztin aus Gießen (Hessen)

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr .Dr. h.c. B.Hoffmann

1.Gutachter: PD Dr. P. Oschmann

2.Gutachter: Prof. Dr. E. Petzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Mai 2004

Hier mein Geheimnis. Es ist ganz einfach: Man sieht nur mit dem Herzen gut.

Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.

Antoine de Saint-Exupéry

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Multiple Sklerose	1
1.2	Zytokine	13
1.2.1	Bedeutung von Zytokinen	13
1.2.2	Th1- und Th2-Zellen	14
1.2.3	Bedeutung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 bei der Multiplen Sklerose	15
1.3	Immunmodulation durch IFN- β : vermutete Wirkmechanismen bei der Multiplen Sklerose	23
1.4	Die Durchflusszytometrie zum Nachweis intrazellulärer Zytokine und membranständiger Zytokinrezeptoren	28
1.5	Fragestellung	31
2	MATERIAL	32
2.1	Chemikalien	32
2.2	Reagenzien für das Durchflusszytometer	32
2.3	Monoklonale Antikörper	33
2.4	Zellkulturmedium	34
2.5	Lösungen und Puffer	34
2.6	Geräte und sonstiges Material	36
2.7	Auswertungssoftware	37
2.8	Patientenkollektiv	38
3	METHODEN	41
3.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	41
3.2	Stimulationsassays für Leukozyten	47

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Leukozytenstimulation mit verschiedenen Konzentrationen der Stimulatoren PMA, Ionomycin und Monensin.....	47
3.2.2	Leukozytenstimulation bei unterschiedlich langen Stimulationszeiten.....	49
3.2.3	Einfluss des Antikoagulans auf die Leukozytenstimulation und den intrazellulären Zytokinnachweis.....	50
3.2.4	Einfluss der Lagerung auf die Leukozytenstimulation und den intrazellulären Zytokinnachweis.....	51
3.2.5	Kontrollzellen für die intrazelluläre Zytokinfärbung.....	51
3.3	Färbung der membranständigen Rezeptoren IFN-R-II und IL-4R auf Leukozyten des peripheren Blutes.....	52
3.4	Messparameter für die Patientenstudie.....	53
3.4.1	Bestimmung von IFN-R-II und IL-4R auf verschiedenen Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes.....	54
3.4.2	Quantitative Bestimmung der Expression von IFN-R-II und IL-4R.....	57
3.4.3	Intrazelluläre Markierung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 in Lymphozyten des peripheren Blutes.....	59
3.4.4	Bestimmung der prozentualen Anteile der Zytokin-positiven-Lymphozyten(sub)populationen.....	62
3.5	Überwachung des Durchflusszytometers.....	63
3.6	Statistische Auswertung.....	64
4	ERGEBNISSE	66
4.1	Etablierung des intrazellulären Zytokinnachweises mittels Durchflusszytometrie.....	66
4.1.1	Stimulatorenkonzentration.....	66
4.1.2	Stimulationsdauer.....	68
4.1.3	Antikoagulans.....	71
4.1.4	Lagerungszeit.....	73
4.2	Etablierung des durchflusszytometrischen Nachweises der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R.....	76
4.3	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	78

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Positivkontrollzellen	78
4.3.2	Intra-Sample-, Intra- und Inter-Assay-Präzision	81
4.4	Ergebnisse der Patientenstudie	85
4.4.1	Homogenitätsprüfungen	86
4.4.1.1	Strukturvergleich zwischen MS-Patienten und Gesunden	87
4.4.1.2	Strukturvergleich zwischen SPMS- und RRMS-Patienten	90
4.4.1.3	Strukturvergleich zwischen untherapierten, IFN- β -1a-[A]- und IFN- β -1a-[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS	92
4.4.2	Korrelationsüberprüfungen	97
4.4.2.1	Korrelation der Expression der immunologischen Parameter mit Alter oder Geschlecht	97
4.4.2.2	Korrelation der Expression der immunologischen Parameter mit dem klinischen Verlauf der MS-Patienten	98
4.4.3	Ergebnisse der Longitudinalstudie (1)	100
4.4.3.1	IFN-R-II-Expression auf verschiedenen Leukozytenpopulationen	101
4.4.3.2	IL-4R-Expression auf CD19+Zellen	105
4.4.3.3	Intrazellulärer Nachweis von IFN- γ in T-Zellen	106
4.4.3.4	Intrazellulärer Nachweis von IL-4 in T-Zellen	109
4.4.3.5	Intrazellulärer Nachweis von IL-10 in T-Zellen	110
4.4.4	Ergebnisse der Longitudinalstudie (2)	113
4.4.4.1	IFN-R-II-Expression auf verschiedenen Leukozytenpopulationen	113
4.4.4.2	IL-4R-Expression auf CD19+Zellen	117
4.4.4.3	Intrazellulärer Nachweis von IFN- γ , IL-4 und IL-10 in T-Zellen	119
4.4.4.4	Korrelation der Expression der immunologischen Parameter mit dem Auftreten von Nebenwirkungen oder vorliegender Begleitmedikation	125
5	DISKUSSION	127
5.1	Etablierung der Durchflusszytometrie	127
5.2	Patientenstudie	134
5.2.1	Vergleich der Zytokin(rezeptoren)profile von Gesunden und MS-Patienten	135

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	Einfluss des klinischen Verlaufes auf die Zytokin(Rezeptoren)- Expression	137
5.2.3	Einfluss einer IFN- β -Therapie auf die Zytokin(Rezeptoren)- Expression	139
5.2.4	IFN- β -Präparatvergleich.....	143
5.3	MS und Veterinärmedizin.....	146
6	ZUSAMMENFASSUNG	149
7	SUMMARY	150
8	LITERATUR	151
9	ANHANG	179
10	DANKSAGUNG	212

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of differentiation bzw. Cluster determinants
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale nach J.F.Kurtzke
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
et al.	und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FeLV	Felines Leukämievirus
FIP	Feline infektiöse Peritonitis
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FIV	Felines Immundefizienz Virus
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gravitationsbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten- und Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
IFN-R-II	Interferon-gamma-Rezeptor
IFN- β	Interferon-beta
IFN- β -1a[A]-Gruppe	auf 6,0 M.I.E./Woche Avonex®; IFN- β -1a i.m. eingestellte MS-Patienten
IFN- β -1a[R]-Gruppe	auf 3 x 22 bzw. 3 x 44 μ g/ Woche Rebif®; IFN- β -1a s.c eingestellte MS-Patienten
IFN- β -1b-Gruppe	auf 24,0 M.I.E./Woche Betaferon®; IFN- β -1b s.c. eingestellte MS-Patienten
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-10	Interleukin-10
IL-4	Interleukin-4

Abkürzungsverzeichnis

IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor
Kap.	Kapitel
LDA	Limiting Dilution Analysis
LSD-Test	Least-Significant-Differences-Test
MBP	Basisches Myelinprotein
min	Minuten
mod.	modifiziert
MRT	Magnet-Resonanz-Tomogramm
MS	Multiple Sklerose
MW	Arithmetischer Mittelwert
Na-Heparinat	Natriumheparinat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
ON	Optische Neuritis
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PLP	Proteolipidprotein
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
r-FelFN	Rekombinantes felines Interferon
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming-Growth-Factor beta
TNF- α ; - β	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha; -beta
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose

Definition

Die Multiple Sklerose (MS) oder auch „*Enzephalomyelitis disseminata*“ ist die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters in Mitteleuropa. In Deutschland wird die Gesamtzahl der MS-Erkrankten auf 100.000 bis 120.000 geschätzt (POSER, 1996). Der Krankheitsverlauf der MS ist sehr variabel und gekennzeichnet durch das Vorliegen symptomatischer Läsionen im Zentralen Nervensystem (ZNS) sowie durch progrediente neurologische Störungen, welche nicht selten zu dauerhaften Behinderungen führen. Aufgrund dieser meist alltagsrelevanten Behinderungen und des frühen Krankheitsbeginns um das 30. Lebensjahr ist die MS nicht nur von medizinischer, sondern auch von erheblicher sozialer Bedeutung. Trotz intensiver Forschungsbemühungen, bei denen große Fortschritte bei der Aufklärung der Pathogenese und der Therapie gemacht wurden, ist die Ursache dieser entzündlichen Erkrankung des ZNS bisher unbekannt.

Epidemiologie und Ätiologie

Die Ursache der MS ist zur Zeit noch unbekannt. Man vermutet aber aufgrund der bisherigen Erkenntnisse ein multifaktorielles Geschehen. Mit Hilfe von epidemiologischen Untersuchungen erhofft man sich Rückschlüsse, inwieweit genetische und/ oder Umweltfaktoren an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind.

Betrachtet man die weltweite Verbreitung der MS, dann fällt die Abhängigkeit der Prävalenzrate von der geographischen Breite auf. Verallgemeinert kann man sagen, dass die Prävalenz mit zunehmender Entfernung vom Äquator steigt, wobei Erkrankungen in äquaturnahen Gegenden sehr selten sind (KURLAND, 1970; KURTZKE ET AL., 1979). Unabhängig dieses geographisch

Einleitung

bevorzugten Auftretens ist das Risiko einer MS-Erkrankung bei Menschen der kaukasischen Rasse signifikant höher als bei Afroamerikanern oder Asiaten (MCALPINE, 1972; KURTZKE, 1983a; WAKSMANN UND REYNOLDS, 1984).

Mitteleuropa gehört zu den Zonen mit hohem Risiko, d.h. man findet hier eine Prävalenzrate von 30-70 Fällen pro 100.000 Einwohner (KURTZKE, 1995). Für Deutschland beschreiben einige Studien Prävalenzen von 80-100 Fällen pro 100.000 Einwohner (LAUER, 1994).

Der Beginn einer MS-Erkrankung liegt in der Mehrzahl zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, in dieser Zeit kommt es bei über 50 % zur ersten Manifestation neurologischer Symptome. Insgesamt gesehen erkranken darüber hinaus Frauen im Verhältnis 1,8:1 häufiger als Männer (KESSELRING, 1997).

Auf einen Einfluss exogener Umweltfaktoren weisen Migrationsstudien hin. In ihnen wurde untersucht, ob sich das Erkrankungsrisiko ändert, wenn Menschen aus Gebieten mit hoher Prävalenz in Gebiete mit niedriger Prävalenz einwandern und umgekehrt. Dabei zeigte sich, dass bei einer Migration nach dem 15. Lebensjahr das Erkrankungsrisiko des Herkunftslandes beibehalten wurde, wohingegen das Risiko des Einwanderungslandes erworben wird, wenn die Umsiedlung vor dem 15. Lebensjahr erfolgt (DEAN UND KURTZKE, 1971; DEAN ET AL., 1976; KURTZKE ET AL., 1995).

Auch das nach dem 2. Weltkrieg scheinbar epidemische Auftreten der MS auf den Faröer-Inseln und in Island stützt die These eines Umwelteinflusses. Man vermutete sogar ein übertragbares, infektiöses Agens als Ursache, was aber nicht bewiesen werden konnte (KURTZKE UND HYLLESTED, 1979, 1988; KURTZKE ET AL., 1983a).

Hinsichtlich einer erregerbedingten Genese der MS wurden hauptsächlich Viren, vor allem Masern-Virus, Herpes-Simplex-Virus, endogene Retroviren, Epstein-Barr-Virus, als Auslöser diskutiert (MEINL, 1999). Jedoch konnte bisher zu keinem ein klarer kausaler Zusammenhang hergestellt werden. EBERS ET AL. (1995) schließen sogar aufgrund der von ihnen durchgeführten Adoptionsstudien eine direkte Übertragung im Sinne einer Infektiosität aus. Es wird vielmehr vermutet, dass infolge struktureller Ähnlichkeiten der Erreger mit enzephalogenen Selbstantigenen durch Kreuzreaktion

Einleitung

(sog. molekulares Mimikry) eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird (WUCHERPFENNIG UND STROMINGER, 1995).

Für eine Beteiligung genetischer Faktoren, z.B. im Sinne einer Prädisposition, sprechen die Ergebnisse aus Familien- und Zwillingsstudien. Auffallend hierbei ist die familiäre Häufung der Erkrankung: bis zu 20 % der MS-Patienten haben einen ebenfalls betroffenen Verwandten, wobei das Risiko für Verwandte ersten Grades mit 3,4-5,1 % am höchsten ist (SADOVNICK ET AL., 1988). Obendrein findet man bei eineiigen Zwillingen eine 10-fach höhere Konkordanzrate als für zweieiige Zwillinge (SADOVNICK ET AL., 1993; EBERS ET AL., 1995).

Als recht schwierig erweist sich die Identifikation der ausschlaggebenden Erbanlagen. Bisher konnten die HLA-Klasse-II-Haplotypen DR15, DQ6 und Dw2 mit einer MS-Erkrankung bei Kaukasiern assoziiert werden (HAINES ET AL., 1996; OKSENBERG UND HAUSER, 1997)

Die MS im klinischen Alltag

Die MS zeigt aufgrund des multilokulären Auftretens der Entmarkungsherde eine sehr variable Krankheitssymptomatik. Die Frühsymptome sind relativ unspezifisch und äußern sich in 40 % der Fälle als Sehstörungen, Paresen, Parästhesien und Ataxien (POSER ET AL., 1979). Diese Symptome herrschen auch im weiteren Krankheitsverlauf vor, bei dem es zu einer Zunahme der neurologischen Symptome wie auch der Behinderung kommen kann. Zusätzlich findet man bei ca. 60 % der Patienten urologische Störungen und bei etwa einem Drittel neuropsychologische Auffälligkeiten (GOLD UND RIECKMANN, 2000).

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Multiplen Sklerose zwei Verlaufsformen: den *schubförmig-remittierenden Verlauf* (Relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS) und den *chronisch-progredienten Verlauf*.

Als Schub bezeichnet man das Auftreten neuer oder das Wiederauftreten bzw. die Verschlechterung vorbestehender Symptome über mindestens 24 Stunden. Ein assoziiertes Auftreten von Infekten oder Fieber muss ausgeschlossen werden, da es bei MS-Patienten typischerweise durch Erhöhung der Temperatur zur Verstärkung bestehender klinischer Symptome oder Generierung von neuen kommt (Uthhoff-

Einleitung

Phänomen, UHTHOFF, 1890; GUTHRIE UND NELSON, 1995). In der Regel dauert ein Schub nicht länger als acht Wochen. Im Anschluss kommt es entweder zu einer totalen Rückbildung der Symptome oder nur zu einer Teilremission.

Der *chronisch-progrediente Verlauf* ist definiert als kontinuierliche Verschlechterung der Symptome über mindestens sechs Monate. Treten zu Beginn der Erkrankung keine Schübe auf, wie es bei 10–15 % der Patienten der Fall ist, spricht man von *primär chronisch-progredient* (Primary progressive multiple sclerosis, PPMS). Ein *sekundär chronisch-progredienter Verlauf* (Secondary progressive multiple sclerosis, SPMS) liegt hingegen vor, wenn Patienten mit einem ursprünglich schubförmig-remittierenden Verlauf in einen chronisch progredienten Verlauf übergehen. Dies tritt bei 30–50 % der MS-Patienten innerhalb von zehn Jahren ein (WEINSHENKER ET AL., 1989). Neben den typischen Verlaufsformen gibt es zudem Sonderformen wie z.B. die Marburg-Variante, bei der es innerhalb von Monaten zu schwersten Defekten und zum Tod kommen kann (MARBURG, 1906; MCALPINE, 1972).

Die Krankheitsprogression wird üblicherweise mit Hilfe der von KURTZKE (1983b) etablierten Expanded Disability Status Scale (EDSS) bewertet. Dabei werden die Patienten, je nach erhobenem neurologischen Befund von acht Funktionssystemen, in eine Skala von 0 (normaler neurologischer Befund) bis 10 (Tod infolge MS) eingeordnet. Obwohl die EDSS aufgrund der Überbetonung des Gehvermögens und mangelnder Präzision auch auf Kritik stößt (SIPE ET AL., 1984; WILLOUGHBY UND PATY, 1988), wurde und wird sie in allen jüngeren und aktuellen Therapiestudien angewandt (FLACHENEGGER UND HARTUNG, 1996).

Die Mannigfaltigkeit der Erscheinungsbilder bereitet im klinischen Alltag häufig diagnostische Probleme, weshalb man sich auf die Anwendung standardisierter diagnostischer Kriterien geeinigt hat. Der derzeit gängige (und in dieser Arbeit zur Patientenrekrutierung eingesetzte) Kriterienkatalog nach C.M.POSER basiert auf Anamnese, neurologischem Untersuchungsbefund und Zusatzuntersuchungen wie Liquoranalyse, Ableitung evozierter Potentiale und Kernspintomographie (POSER ET AL., 1983). Je nach Befunderhebung ist so eine Einteilung in eine *gesicherte* oder eine *wahrscheinliche MS* möglich. Erweiterungen bzw. Aktualisierungen dieser diagnostischen Kriterien mit einer größeren Einbeziehung neuer

Einleitung

kernspintomographischer Untersuchungsverfahren wurden in den vor kurzem erschienenen McDONALD-Kriterien festgelegt (MCDONALD ET AL., 2001).

Für die Prognosestellung gibt es keinen objektiven Parameter, so dass man auch hier mehrere Faktoren miteinbeziehen muss. Prognostisch günstig zu werten sind: erhaltene Gehfähigkeit, monosymptomatischer Beginn, kurze Schubdauer, nur sensible Symptome und ein Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr (KESSELRING, 1997). Dagegen sind als ungünstig anzusehen: frühe motorische und zerebelläre Zeichen, rasche Schubfolge der ersten zwei Schübe, schlechte Rückbildungstendenz der Schubsymptomatik sowie multiple Magnet-Resonanz-Tomogramm-(MRT)-Läsionen zu Beginn der Erkrankung (RUDICK ET AL., 1997a).

Therapie

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt beinhaltet die medikamentöse Therapie der MS vor allem Maßnahmen bei akuten Schüben, zur Reduktion der Schubfrequenz und zur Progressionsverlangsamung. Dabei stützt sich die Behandlung im wesentlichen auf Glukokortikosteroide und andere immunsuppressive sowie immunmodulierende Substanzen.

Bei Therapie von akuten Schüben gehört der Einsatz hochdosierter Glukokortikosteroide zum etablierten Standard. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antiödematösen und immunsuppressiven Wirkungen zur beschleunigten Rückbildung der Schubsymptome kommt (ANDERSSON UND GOODKIN, 1998). Als Langzeittherapie sind positive Effekte unzureichend zu beobachten, dafür aber vermehrt unerwünschte Wirkungen. Bei schweren, nicht Kortison-responsiblen Schüben ist laut einer kürzlich veröffentlichten Studie der Einsatz einer Plasmapherese in Betracht zu ziehen (WEINSHENKER ET AL., 1999).

Zur prophylaktischen Therapie der RRMS werden vor allem Interferon(IFN)- β -Präparate und Glatirameracetat angewendet. In unabhängigen Studien konnte für IFN- β eine breite Wirksamkeit nachgewiesen werden: die durchschnittliche Reduktion der Schubfrequenz lag bei 30 %, die Krankheitsaktivität im Kernspintomogramm nahm bis zu 80 % ab und ein Trend zur Progressionsverlangsamung war zu beobachten (THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS

Einleitung

STUDY GROUP, 1993; 1995; JACOBS ET AL., 1996; PRISMS STUDY GROUP, 1998). Entsprechend den Therapieprotokollen dieser Studien wurden die Zulassungen für die drei erhältlichen Präparate ausgesprochen:

- *IFN- β -1b* (Betaferon[®], Schering AG)
8 Mio Einheiten subkutan (s.c.) jeden zweiten Tag (THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP, 1993; 1995; EUROPEAN STUDY GROUP, 1998)
- *IFN- β -1a* (Avonex[®], Biogen Inc.)
6 Mio Einheiten intramuskulär (i.m.) einmal pro Woche (JACOBS ET AL., 1996)
- *IFN- β -1a* (Rebif[®], Ares-Serono, Serono International SA)
3 x 22 μ g bzw. 3 x 44 μ g (s.c.) pro Woche (PRISMS STUDY GROUP, 1998)

Neuere Studien zur IFN- β -Behandlung in der Frühphase einer *klinisch-möglichen MS* konnten aufzeigen, dass ein Therapiebeginn bereits nach Auftreten des ersten Schubes den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen kann (COMI ET AL., 2000; JACOBS ET AL., 2000).

IFN- β (insbesondere IFN- β -1b) ist ebenfalls bei sekundär-chronischen Verläufen therapeutisch einsetzbar. Dabei lassen sich Behandlungserfolge besonders bei Patienten mit nachgewiesener Krankheitsaktivität (Schübe oder Gadolinium-anreichernde Läsionen im MRT) beobachten (EUROPEAN STUDY GROUP, 1998; PATY AND SPECTRIMS STUDY GROUP, 1999; MCFARLAND AND IFNB-1B SPMS STUDY GROUP, 2000).

Eine Alternative zur IFN- β -Therapie der RRMS ist das den Krankheitsverlauf ähnlich positiv beeinflussende Copolymer-1 (COP-1, Glatirameracetat). COP-1 ist ein synthetisches Tetrapeptid aus den vier Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin und wirkt vermutlich über eine Blockade der Bindungsstellen für MBP an MHC-II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (TEITELBAUM ET AL., 1998). Auch für COP-1 konnte in unabhängigen Studien eine deutliche Reduktion der Schubrate sowie eine Abnahme der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (JOHNSON ET AL., 1995; COMI ET AL., 1999).

Für Patienten mit Injektionsabneigung, Unverträglichkeitserscheinungen oder Kontraindikationen steht noch das Immunsuppressivum Azathioprin zur Verfügung,

Einleitung

welches aber nur unter enger Überwachung des Blutbildes eingesetzt werden sollte (MS-THERAPIE KONSENSUS GRUPPE, MSTKG, 1999). Bei Therapieversagen eines IFN- β -Präparates, Patienten mit hochfrequentem schubförmigen Verlauf oder rascher Progredienz ist der Einsatz von Mitoxantron, einem Zytostatikum, zu erwägen. In den bisher veröffentlichten Studien ließ sich eine signifikante Reduktion der Schubzahl und auch der Krankheitsprogression nachweisen (MILLEFIORINI ET AL., 1997; HARTUNG ET AL., 1998). Dabei ist zu beachten, dass der Einsatz von Mitoxantron begrenzt ist: es sollte infolge seiner kardiotoxischen Wirkung ab einer kumulativen Höchstdosis nicht länger als 24-36 Monate verabreicht werden (KOEHLER ET AL., 1998, CURSIEFEN ET AL., 1999).

Andere immunprophylaktische Therapien (z.B.: Cyclosporin A, Cladribin, Linomid, Enzymtherapie) zeigten bislang keine ausreichenden positiven Studien- bzw. Behandlungsergebnisse, die einen therapeutischen Einsatz bei der MS rechtfertigen würden (MSTKG, 1999).

Pathogenese

Kennzeichnend für die MS sind die in der gesamten weißen Substanz disseminiert auftretenden, entzündlichen Entmarkungsherde, die typischerweise periventrikulär gelegenen Plaques. Makroskopisch erscheinen die bis mehrere Zentimeter großen Plaques als grau bis graurosa, mehr oder weniger gut abgegrenzte Herde (LASSMANN UND VASS, 1995). Histologisch ist der akute Schub charakterisiert durch perivaskuläre entzündliche Infiltrate und Ödembildung in der weißen Substanz. Die Infiltrate bestehen hauptsächlich aus myelin-spezifischen T-Zellen, B-Zellen, die gegen Myelinbestandteile gerichtete Antikörper produzieren, und einer Reihe nichtspezifischer mononukleärer Effektorzellen, vor allem Makrophagen (LUCCINETTI ET AL., 1996; MARTINO UND HARTUNG, 1999). Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zunehmend zum Untergang der Oligodendrozyten und zur Proliferation von Astrozyten mit anschließender gliöser Narbenbildung (LUCCINETTI ET AL., 1996). Nach BRÜCK ET AL. (1995) ist anhand des erhobenen histopathologischen Befundes eine nähere Differenzierung in frühaktive, spätaktive und inaktive demyelinisierende Läsionen möglich.

Einleitung

Die Fortschritte bei der Aufklärung der MS-Pathogenese sind hauptsächlich den aus dem Tiermodell der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) gewonnenen Erkenntnissen zu verdanken. Die EAE ist eine T-Zell-vermittelte, je nach Spezies, auslösendem Agens oder Applikationsform unterschiedlich verlaufende entzündliche Erkrankung des ZNS (TSUNODA UND FUJINAMI, 1996).

Durch Injektion einer Kombination aus Myelinhomogenat oder gereinigten Myelinbestandteilen (wie z.B. basischem Myelinprotein (MBP) oder Proteolipidprotein (PLP)) und Freudschem Adjuvans kann die EAE in verschiedenen Tierarten induziert werden (WEKERLE ET AL., 1994; SWANBORG, 1995). Dabei können unterschiedliche Verlaufsformen und pathologische Veränderungen bei den Versuchstieren auftreten: eine *akute, monophasische Enzephalomyelitis*, bei welcher die Entzündungsvorgänge dominieren und die im allgemeinen ohne wesentliche Demyelinisierungserscheinungen verläuft. Daneben kann durch Variation des Autoantigens (v.a. durch Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein, MOG) und des Applikationsweges auch eine *chronisch rezidivierende EAE* induziert werden, welche in ihrem Verlauf der MS sehr ähnlich ist und die innerhalb der Entzündungsherde ausgedehnte Demyelinisierungen aufzeigt (BEN-NUN ET AL., 1996; STEFFERL ET AL., 1999). Durch Transferversuche mit isolierten MBP-reaktiven enzephalogenen T-Zellen konnte man schließlich nachweisen, dass die EAE eine T-Zell-vermittelte Erkrankung ist (BEN-NUN ET AL., 1981, WEKERLE, 1994; SWANBORG, 1995). In diesen mittlerweile etablierten Transferversuchen werden EAE-empfindliche Tiere zuerst mit dem entsprechenden Autoantigen immunisiert, bevor Zellen aus Milz und Lymphknoten entnommen werden und nochmals mit dem Autoantigen kultiviert werden. Überträgt man die auf diese Weise präparierten Immunzellen auf einen naives Empfängertier, so kommt es bei diesem zum Ausbruch einer EAE. Eine Induktion der EAE ist hingegen nicht möglich, wenn humorale Faktoren transferiert werden (TSUNODA UND FUJINAMI, 1996). Weiterführende Studien konnten aufzeigen, dass die EAE-auslösenden MBP- oder PLP-reaktiven T-Zellen in der Mehrzahl vom Th1-Subtyp sind (ANDO ET AL., 1989; POWELL ET AL., 1990; CUA ET AL., 1995). MARTIN UND MCFARLAND (1995) zufolge lässt sich dagegen eine EAE nicht induzieren, wenn CD4+T-Zellen vom Th2-Typ übertragen werden. Vielmehr sind laut CUA ET AL. (1995)

Einleitung

Th2-Zellen in der Lage, den Schweregrad einer Erkrankung zu mindern.

Gestützt durch die oben dargestellten Beobachtungen im Tiermodell, ist die heute gängige Hypothese, dass der MS nicht nur ein immunpathologisches Krankheitsgeschehen zugrunde liegt, sondern dass sie eine T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit des ZNS darstellt. Des Weiteren konnte man im Blut und Liquor von MS-Patienten autoreaktive T-Lymphozyten nachweisen, welche gegen Myelin- und Nichtmyelinantigene des ZNS gerichtet sind (HOHLFELD ET AL., 1995; MARTIN UND MCFARLAND, 1995). Die Anwesenheit und Persistenz dieser autoreaktiven T-Zellen deuten darauf hin, dass die normalen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei MS-Patienten offenbar versagen. In erheblich geringerer Anzahl finden sich auch im Blut Gesunder autoreaktive T-Zellen, offenbar aber ohne pathogene Eigenschaften (OLSSON ET AL., 1990; SUN ET AL., 1991a).

Zu Beginn der Erkrankung erkennen die autoreaktiven T-Zellen der MS-Patienten vermutlich nur einige wenige Epitope eines Autoantigens, während mit Fortschreiten der Erkrankung das Spektrum der Epitope erweitert wird. Ursächlich dafür könnten u.a. die wiederholten Entzündungsprozesse der Myelinscheide oder anderen Strukturen der weißen Substanz sein, durch welche „neue“, der Immunantwort vorher nicht zugängliche, Molekülstrukturen freigelegt werden (sog. Epitop Spreading) (LEHMANN ET AL., 1993).

Da die im Blut zirkulierenden „ruhenden“ autoreaktiven T-Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht überwinden können, muss zu Beginn eines MS-Schubes eine Aktivierung stattfinden. Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfordert einerseits die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ), welche das Antigen im Kontext mit MHC-II-Molekülen präsentieren und andererseits die Bindung kostimulierender Moleküle (z.B. B7.1) auf APZ an ihre Liganden (z.B. CD28) auf den T-Lymphozyten (HARTUNG ET AL., 1996; MITROVIC ET AL., 1999).

Der genaue Auslösemechanismus ist noch nicht bekannt, aber als mögliche Trigger kommen virale und bakterielle Superantigene, molekulares Mimikry oder proinflammatorische Zytokine in Frage (WUCHERPFENNIG UND STROMINGER, 1995; HARTUNG, 1996). Nach ihrer Aktivierung können die T-Lymphozyten mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen, die u.a. unter Zytokineinfluss auf T-Lymphozyten und Endothelzellen der BHS exprimiert werden, und mit Hilfe von Metalloproteinasen

Einleitung

durch die BHS in Hirn und Rückenmark einwandern (LEPPERT ET AL., 1995; BUTCHER UND PICKER, 1996).

Um im ZNS eine lokale Entzündungsreaktion in Gang zu setzen, muss eine Reaktivierung der eingewanderten T-Lymphozyten stattfinden. Diese erneute Aktivierung erfolgt durch APZ des Hirns (Mikrogliazellen oder Astrozyten), welche die entsprechenden antigenen Epitope (Myelinbestandteile) zusammen mit MHC-II-Molekülen präsentieren. Nach Wiedererkennung ihrer Zielantigene und anschließender Proliferation setzen die eingewanderten autoreaktiven T-Lymphozyten Zytokine frei, durch welche eine Entzündungskaskade ausgelöst wird. Die Mehrzahl dieser T-Lymphozyten gehört der CD4+Th1-Subpopulation an: die Th1-Zellen setzen proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Lymphotoxin (LT)) frei, welche zum einen einen gesteigerten Einstrom von Entzündungszellen ins ZNS und zum anderen eine Aktivierung von Makrophagen und Mikrogliazellen initiieren.

Einleitung

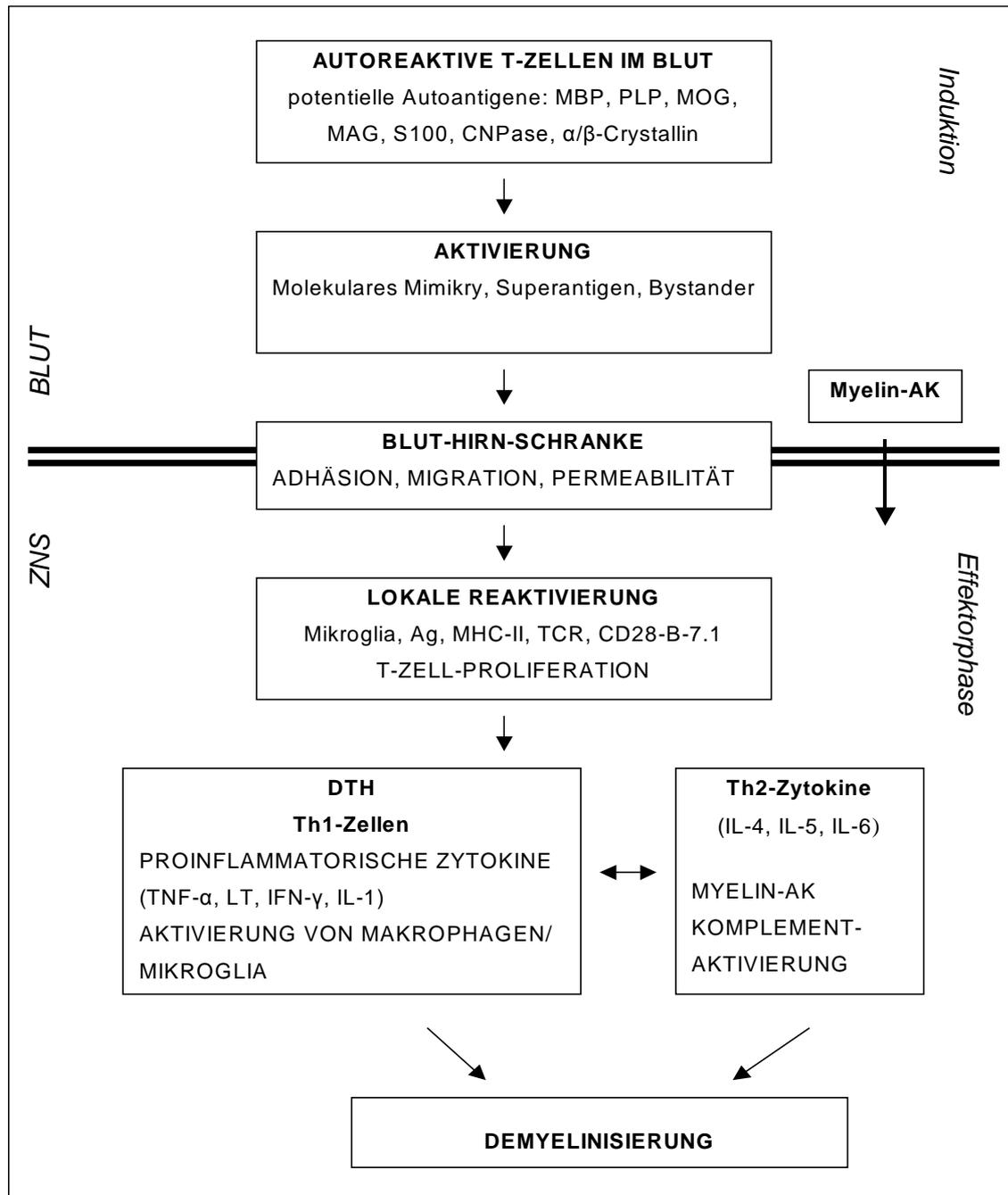


Abb.1.1: Pathogenese der MS (nach HARTUNG, 1996). Die Demyelinisierung bei der MS ist das Ergebnis einer komplexen Kette zellulärer und molekularer Interaktionen. Ausgangspunkt der pathogenetischen Ereignisse ist wahrscheinlich die Aktivierung präexistenter, im Blut zirkulierender autoreaktiver T-Zellen. Aktivierte T-Lymphozyten können die BHS passieren und produzieren nach lokaler Reaktivierung Zytokine, welche die Entzündungskaskade im ZNS in Gang setzen.

Einleitung

Die aktivierten Makrophagen/ Mikroglia können das Myelin entweder direkt durch Phagozytose schädigen oder indirekt infolge Produktion von Entzündungsmediatoren (TNF- α , Sauerstoffradikale und Stickoxid), welche ebenfalls die Myelinscheide angreifen (HARTUNG, 1992, 1996).

Parallel zu diesem Vorgang stimulieren Th2-spezifische Zytokine (Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-6) B-Zellen und regen sie zur Produktion von Autoantikörpern an, die gegen Myelinbestandteile gerichtet sind. Die Autoantikörper können ihrerseits auf verschiedenen Wegen zur Demyelinisierung beitragen (COMPSTON ET AL., 1989; COMPSTON, 1991):

1. durch Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia infolge einer Bindung an den Fc-Rezeptor,
2. durch Opsonisierung von Myelinoberflächen,
3. durch „Antibody dependent cellular cytotoxicity“
4. und nicht zuletzt infolge der Aktivierung des Komplementsystems.

Sowohl in EAE- als auch in MS-Läsionen sind aktivierte Komplementkomponenten nachweisbar. Auch im peripheren Blut werden Autoantikörper produziert, die wahrscheinlich mit Hilfe der aktivierten T-Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke passieren können (HARTUNG, 1996).

Die Th2-Zytokine (IL-4, IL-10, Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) wirken aber auch der entzündlichen Reaktion entgegen. Während in der akuten entzündlichen Phase der MS noch ein Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-vermittelter Immunantwort vorliegt, so wird dieses bei Beendigung des Schubes durch vermehrte Synthese von entzündungshemmenden Th2-Zytokinen ausgeglichen (LINK ET AL., 1994; SÖDERSTRÖM, 1995). Letztendlich beendet wird der akute Schub vermutlich durch Apoptose der eingewanderten autoreaktiven T-Lymphozyten (GOLD ET AL., 1997).

Zu Beginn der Erkrankung sind die endogenen Regulationsmechanismen offenbar noch in der Lage, jeden Schub zu beenden und den Gewebeschaden zu limitieren, doch mit Fortschreiten der Erkrankung nimmt man an, dass sich diese selbstregulatorischen Maßnahmen erschöpfen und ein Übergang in den chronisch progredienten Verlauf erfolgt (GIOVANNONI UND HARTUNG, 1996).

1.2 Zytokine

1.2.1 Bedeutung von Zytokinen

Komplexe Vorgänge wie Stoffwechsel, Zellteilung und Differenzierung von Zellen erfordern einen effektiven Informationsaustausch zwischen Zellen und Organen. Dabei spielen neben Zell-Zell-Kontakten humorale Mediatoren eine wichtige Rolle, zu welchen neben Hormonen auch die Zytokine zählen. Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Glykoproteinen von geringem Molekulargewicht (i.d.R. zwischen 15-25 kDa), die von den verschiedensten Zelltypen wie z.B. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen produziert werden. Eine Freisetzung erfolgt nur nach vorangegangener Zellaktivierung, welche Mitogen- oder auch Zytokin-induziert sein kann. Zur wachsenden Familie der Zytokine gehören Interleukine (IL-1 bis IL-20), Interferone (z.B. IFN- γ), Tumornekrosefaktoren (z.B. TNF- α oder - β), koloniestimulierende Faktoren (z.B. Granulozyten- und Monozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF)) und verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β). Die Einteilung in Familien erfolgt aufgrund ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur (BAZAN, 1990a, b).

Zytokine sind unter anderem involviert in zelluläre und humorale Immunantworten, Entzündungsprozesse, Chemotaxis, Tumorregression und Hämatopoese (KISHIMOTO ET AL., 1994). Dabei vermitteln sie ihre Wirkung in der Regel lokal auto- oder parakrin, seltener auch endokrin (JANEWAY UND TRAVERS, 1997). Zytokine beeinflussen ihre Zielzellen, indem sie an spezifische, hochaffine Rezeptoren binden, welche anschließend aggregieren und eine intrazelluläre Signalkaskade induzieren. Die Rezeptoren der meisten Zytokine setzen sich aus einer ligandenbindenden α -Untereinheit und einer signalinduzierenden β -Untereinheit zusammen. Häufig nutzen mehrere Mitglieder einer Zytokinfamilie die gleichen β -Untereinheiten, wodurch die für Zytokine charakteristische funktionelle Redundanz zustande kommt. Ebenfalls kennzeichnend für Zytokine ist ihre Pleiotropie, d.h. sie vermitteln unterschiedliche biologische Aktivitäten auf unterschiedlichen Zielzellen. Zudem können Zytokine die Produktion eines anderen Zytokins induzieren, dessen Rezeptor transmodulieren, generell antagonistisch oder synergistisch wirken, d.h. sie sind

Einleitung

involviert in ein komplexes Signalübertragungsnetzwerk („Zytokin-Netzwerk“) (JANEWAY UND TRAVERS, 1997).

1.2.2 Th1- und Th2-Zellen

Anhand ihrer charakteristischen Zytokinsekretionsmuster differenziert man CD4+Zellen in folgende Subpopulationen:

1. *Th1-Zellen*, welche IL-2, IFN- γ , IL-12 und TNF- β
2. *Th2-Zellen*, welche IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 produzieren

(MOSMANN UND COFFMAN, 1989; MOSMANN UND SAD, 1996).

Diese Subpopulationen haben unterschiedliche Funktionen, weshalb man hier auch von Th1- und Th2-vermittelter Immunantwort spricht. Th1-Zytokine sind Mediatoren der zellulären Immunantwort, wie z.B. bei der Aktivierung von Makrophagen; außerdem aktivieren sie das Komplementsystem und spielen eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten Allergie sowie der humanen IgG1-Synthese. Th2-Zytokine hingegen sind Effektoren der humoralen Immunantwort, sie wirken u.a. als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von B-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen und sind involviert in Allergien vom Soforttyp (humorale Allergie) (MOSMANN UND SAD, 1996). Nach LICHTMAN ET AL. (1987) wirken die von einem Th-Zelltyp freigesetzten Zytokine als eigener autokriner Wachstumsfaktor wie auch als Signalgeber für die Differenzierung naiver T-Zellen zu diesem Th-Zelltyp. *In-vitro*-Experimente bestätigen diese Aussage: so differenzierten sich erstmalig stimulierte CD4+Zellen in Gegenwart von IL-12 und IFN- γ meist zu inflammatorischen Zellen vom Th1-Typ, wohingegen in Gegenwart von IL-4 die Mehrzahl der aktivierten CD4+Zellen sich zum Th2-Typ entwickelte (ABBAS ET AL., 1996; MOSMANN UND SAD, 1996). Außerdem greifen jeweils die Zytokine des einen Subtyps in die Entwicklung und Aktivität des anderen ein. Das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ inhibiert die Proliferation von Th2-Zellen (FITCH ET AL., 1993), während IL-4 und IL-10 die Aktivierung von Th1-Zellen supprimieren (ABBAS ET AL., 1996).

Zwei weitere Subtypen der CD4+Zellen wurden beschrieben:

-die Th0-Zellen: sie produzieren Th1- und Th2-typische Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ und TNF- β und werden aufgrund dessen auch als

Einleitung

Vorläuferzellen für T-Helferzellen diskutiert (FIRESTEIN ET AL., 1989, ROMAGNANI, 1994)

-und die Th3-Zellen, die vorwiegend das antiinflammatorisch wirksame TGF- β produzieren (ROMAGNANI, 1995).

1.2.3 Bedeutung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 bei der Multiplen Sklerose

Die Rolle der Zytokine bei der Multiplen Sklerose ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Immer mehr Studienergebnisse deuten auf eine Dysbalance der Th1- und Th2-vermittelten Immunantwort während des Krankheitsgeschehens, wobei proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α vermutlich eher krankheitsfördernd und antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β mehr stabilisierend wirken. Doch eine klare Trennung der Th1- und Th2-Antwort wie man sie bei der EAE beobachten kann scheint bei der MS nicht möglich (ANDO ET AL., 1989; VAN DER WEEN UND STOHLMAN, 1993). Vielmehr erscheinen die Zytokininteraktionen wesentlicher komplexer und einige Veröffentlichungen dokumentieren sogar ein Nebeneinander der entzündlichen und restaurativen Prozesse (RIECKMANN ET AL., 1994; 1995; LINK ET AL., 1994a-c).

Zu den wichtigsten Vertretern der Th1-/Th2-Immunantwort im Rahmen der Immunpathogenese der MS zählen die in dieser Studie untersuchten Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10.

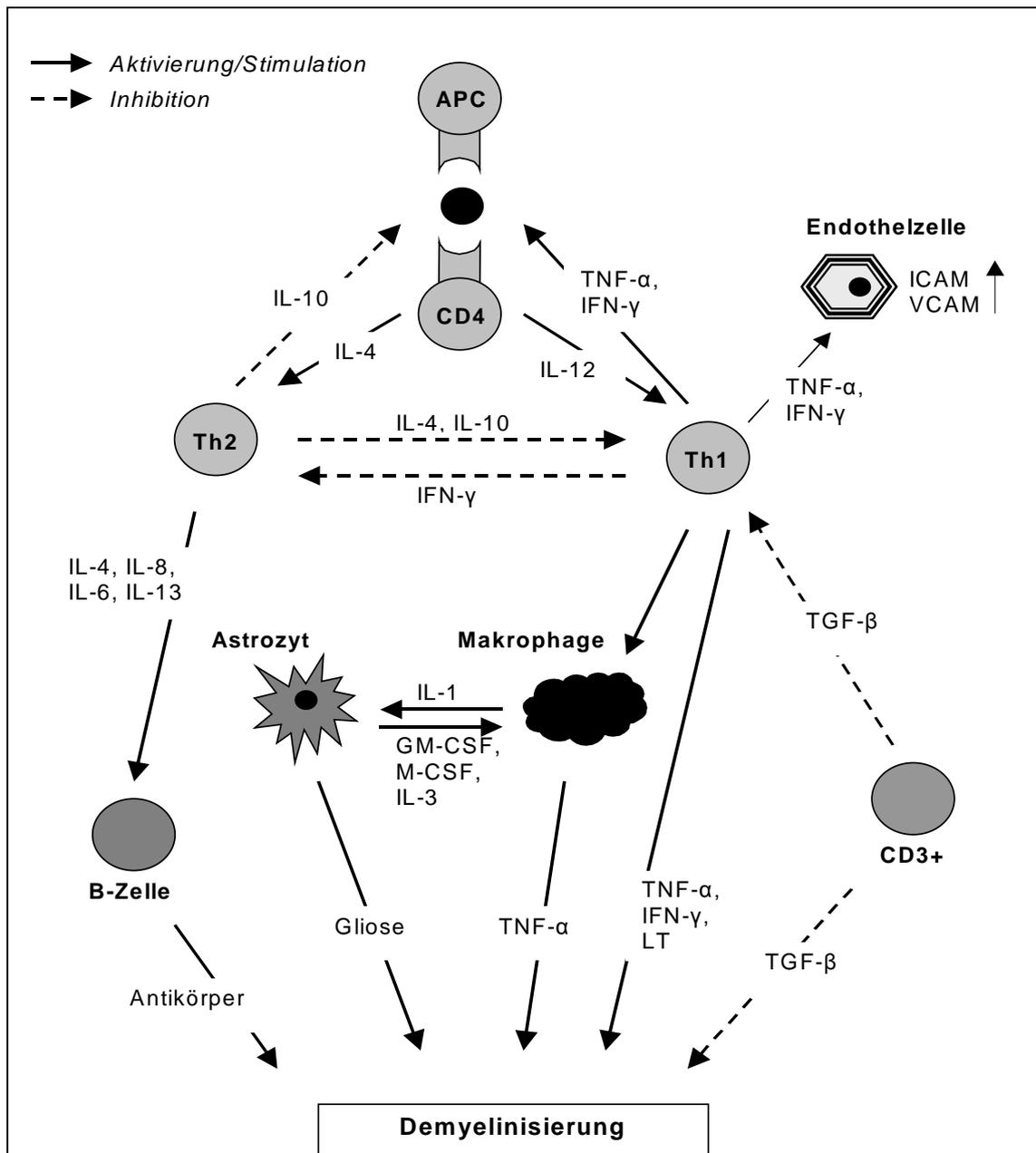


Abb.1.2: Zytokine und ihre Rolle bei der MS (nach MITROVIC ET AL., 1999). T-Zellen werden durch Antigenpräsentation zur Differenzierung in Th1- oder Th2-Subtypen angeregt, welche pro- oder antiinflammatorische Zytokine produzieren. Mit Hilfe der freigesetzten Zytokine kontrollieren die beiden Subtypen jeweils die Proliferation des anderen im Rahmen eines negativen Feedbacks. Th1-Zytokine aktivieren Makrophagen/ Mikroglia und Astrozyten und unterhalten auf diese Weise Immunantworten, die zur Oligodendrozytenzerstörung und somit zur Demyelinisierung führen.

IFN- γ

IFN- γ ist ein 20-25 kDa großes Protein und wird von T-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und B-Zellen gebildet. Es verfügt über ein äußerst breites Wirkungsspektrum, welches immunoinflammatorische Effekte ebenso einschließt wie antivirale und antiparasitäre Eigenschaften.

Experimentelle Untersuchungsergebnisse lassen für IFN- γ eine entscheidende Rolle im Rahmen des Entzündungsprozesses im ZNS bei der Pathogenese der MS vermuten:

1. IFN- γ aktiviert Makrophagen (zusammen mit dem CD40-Liganden) zu verstärkter Phagozytose und Freisetzung antimikrobieller Mediatoren (Sauerstoffradikale, Stickoxid, antimikrobielle Peptide) und fördert auf diese Weise die Demyelinisierung (HARTUNG ET AL., 1992)
2. IFN- γ bewirkt eine gesteigerte Expression von MHC-II-Molekülen auf der Makrophagenoberfläche, wodurch eine Antigenpräsentation und letztendlich die T-Zell-Aktivierung begünstigt wird (FIERZ ET AL., 1985).
3. durch IFN- γ wird die Expression von Adhäsionsmolekülen auf immunkompetenten Zellen erhöht. Als Folge können autoreaktive T-Zellen leichter an Gefäßendothelien der Blut-Hirn-Schranke (BHS) anhaften und ins ZNS eindringen (RAINE, 1994).
4. IFN- γ steigert die Permeabilität endothelialer Schranken: auch unspezifische aktivierte Zellen können so die BHS passieren und die Kaskade an Entzündungsreaktionen vorantreiben (HARTUNG ET AL., 1992)
5. IFN- γ kann einen Oligodendrozytentod durch Apoptose induzieren, d.h. eine potentielle Myelinschädigung bei MS verursachen (VARTANIAN ET AL., 1995).

Die krankheitsfördernde Rolle von IFN- γ wird auch bestätigt durch eine Pilotstudie bei Patienten mit RRMS, bei denen die vermeintlich therapeutische Gabe von IFN- γ zu einem vermehrten Auftreten von Schüben, einer erhöhten Anzahl MHC-Klasse-II-Genprodukte-exprimierender Monozyten, verstärkten proliferativen Antworten von T-Zellen und zu einer erhöhten NK-Zell-Aktivität führte (PANITCH ET AL., 1987).

Einleitung

Immunohistochemisch und mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierungs-Technik ist IFN- γ in den typischen MS-Läsionen, genauer gesagt in perivaskulären Entzündungszellen, nachweisbar (TRAUGOTT UND LEBON, 1988; WOODROOFE UND CUZNER, 1993; CANNELLA UND RAINE, 1995).

Auf eine eventuell vorliegende Th1/Th2-Dysbalance bzw. auf ein Zuviel an Th1-Zytokinen im Krankheitsverlauf der MS deuten ELISPOT-Untersuchungen an MS-Patienten. In diesen konnte eine erhöhte IFN- γ -Sekretion von aus Blut und Liquor gewonnenen mononukleären Zellen nach *in-vitro*-Stimulation mit Myelin-Protein und viralem Antigen beobachtet werden (SUN ET AL., 1991a, b; LINK ET AL., 1992). Zudem konnten mehrere Gruppen in ihren Untersuchungen bei MS-Patienten die vermehrte Produktion von IFN- γ durch periphere Blutleukozyten nachweisen (BECK ET AL., 1988; LINK ET AL., 1994; NAVIKAS ET AL., 1996; BALASHOV ET AL., 2000). PELFREY ET AL. (2000) gelang eine genauere Differenzierung der untersuchten Immunzellen: sie fanden bei MS-Patienten eine hohe Frequenz an PLP-spezifischen Immunzellen, welche in der Mehrzahl der Th1-Subpopulation zugeordnet werden konnten.

Durch Korrelation der experimentellen Untersuchungen mit dem klinischen Verlauf bei MS-Patienten konnten mehrere Arbeitsgruppen demonstrieren, dass IFN- γ bzw. die Th1-Antwort während der aktiven Erkrankungsphase im Vergleich zum stabilen Verlauf deutlich erhöht ist (RUDICK UND RANSOHOFF, 1992; DETTKE ET AL., 1997; TEJADA-SIMON ET AL., 2000). Andere Studien konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen IFN- γ -Produktion und Krankheitsverlauf herstellen (HAAHR ET AL., 1986; HERTZOG ET AL., 1991).

IFN-R-II

Der die IFN- γ -Wirkung vermittelnde IFN- γ -Rezeptor (IFN-R-II) besteht aus einer hochaffin bindenden α -Kette, und einer β -Kette, welche für die Signalübertragung benötigt wird (CALLARD UND GEARING, 1994; BELARDELLI; 1995). Der IFN-R-II wird u.a. auf peripheren Blutleukozyten sowie auf B-Zellen und Makrophagen in lymphatischen Geweben exprimiert (VALENTE ET AL., 1992). Über die Liganden-Rezeptor-Interaktion ist bekannt, dass IFN- γ auf murinen Th1-Zellen die Expression der β -Kette vermindert, mit der Folge des Verlustes eine IFN- γ -vermittelten

Einleitung

Transduktion. Die Th1-Zellen sprechen nicht mehr auf IFN- γ an. Dieser β -Ketten-Verlust trat ebenfalls bei Th2-Zellen auf (BACH ET AL., 1995). Die gegenseitige Regulation von Rezeptor und Ligand zeigte sich des weiteren in einer verminderten IFN- γ -Produktion bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit vollständiger IFN-R-II- α -Ketten- oder β -Ketten-Defizienz (NEWPORT ET AL., 1995; HOLLAND ET AL., 1998). In mehreren Literaturangaben wird zudem eine Liganden induzierte Internalisation des Ligand-Rezeptor-Komplexes beschrieben (FINBLOOM, 1988; BADER UND WIETZERBIN, 1994; TORRES ET AL., 1995).

Im Rahmen der MS-Forschung wurde bisher nur wenig über die IFN-R-II-Expression veröffentlicht. BONGIOANNI ET AL. (1996) wiesen auf T-Zellen des peripheren Blutes bei MS-Patienten eine geringere Anzahl an IFN-R-II im Vergleich zu Gesunden nach. Weitergehende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ergaben unter IFN- β -1b-Therapie einen signifikanten Anstieg der IFN-R-II-Expression nach 3 Monaten. Nach 6 Monaten wurden fast identische Werte wie bei den Gesunden festgestellt (BONGIOANNI ET AL., 1999).

IL-4

IL-4 wird von T-Zellen, basophilen Granulozyten und Mastzellen gebildet (CHOMARAT UND BANCHEREAU, 1998). Zu seinen Aufgaben gehören T- und B-Zellproliferation, Induktion von anti-CD40-abhängigem Klassenwechsel zu IgE sowie die vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und von CD23 auf B-Zellen und Makrophagen (PUNNONEN ET AL., 1995; CHOMARAT UND BANCHEREAU, 1998; DAVEY ET AL., 1998).

Für eine Involvierung von IL-4 in die Immunpathogenese der MS spricht u.a. der immunhistochemische Nachweis von IL-4 in MS-Läsionen (CANELLA UND RAINE, 1995). Außerdem fanden LU ET AL. (1993) vermehrt IL-4-sezernierende Zellen im Blut von MS-Patienten. LINK ET AL. (1994) wiesen erhöhte Spiegel IL-4-mRNA-exprimierender mononukleärer Zellen in Blut und Liquor von MS-Patienten nach. WINDHAGEN ET AL. (1998) beobachteten dagegen eine reduzierte IL-4- und eine

Einleitung

erhöhte IFN- γ -Synthese in MBP-spezifischen-Zell-Linien bei MS-Patienten. Auch eine unveränderte IL-4-Produktion wurde beschrieben (BALASHOV ET AL., 2000).

Eindeutigere Ergebnisse für eine Beteiligung von IL-4 bei der MS zeigen tierexperimentelle Untersuchungen. Im EAE-Modell konnte der Erkrankungsausbruch durch Vorbehandlung der Ratten mit IL-4 und IL-10 verhindert werden (OLSSON, 1995). Bei Transferversuchen mit isolierten Myelin-spezifischen T-Zellklonen von oral-Myelin-behandelten Mäusen kam es ebenfalls zu keinem EAE-Ausbruch. Diese protektiven T-Zellklone sezernierten die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β , was einen regulativen Einfluss dieser Zytokine bei autoimmunen Prozessen vermuten lässt (CHEN ET AL., 1994). RACKE ET AL. (1994) applizierten Mäusen kurz nach Induktion der EAE IL-4. Auch in diesem Tierexperiment verbesserte sich das klinische Bild der EAE und es kam des weiteren zu einer Inhibition der proinflammatorischen Zytokine im ZNS und zu einer Verringerung der Demyelinisierung. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass von antigenpräsentierenden Zellen freigesetztes IL-4 und IL-10 die zelluläre Immunantwort und die Aktivität von autoreaktiven Lymphozyten supprimiert (MUELLER ET AL., 1996; SEDDON UND MASON, 1999).

Eine Korrelation zwischen IL-4 und Krankheitsaktivität bei MS-Patienten konnte von SODERSTROM ET AL. (1995) nachgewiesen werden. Durch *in-situ*-Hybridisierung konnten vermehrt IL-4-mRNA-exprimierende Zellen bei MS-Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer und geringerer Behinderung festgestellt werden.

IL-4R

IL-4 entfaltet seine Wirkung durch die spezifische Bindung an den IL-4-Rezeptor (IL-4R). Dieser besteht aus 2 Ketten: der IL-4R α -Kette, welche spezifisch IL-4 bindet und der IL-4R γ -Kette, welche auch ein Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-7, IL-9 und IL-15 ist (GALIZZI ET AL., 1990; RUSSELL ET AL., 1993; ZURAWSKI ET AL., 1995). Der IL-4R liegt in löslicher und membrangebundener Form vor. Eine membranständige Expression wurde auf B-Zellen, Makrophagen und Mastzellen nachgewiesen (CHOMARAT UND BANCHERAEU, 1997).

Einleitung

Über die Wechselwirkung Rezeptor-Ligand ist aus experimentellen Untersuchungen bekannt, dass IL-4 die Expression des IL-4R auf B- und T-Zellen heraufreguliert (OHARA UND PAUL., 1988; MORI ET AL., 1996; KIM ET AL., 1998). KIM ET AL. (1998) konnten dabei aufzeigen, dass diese durch IL-4- und anti-CD40-induzierte Expression des IL-4R Tyrosinkinase-abhängig ist. Die Arbeitsgruppe wies weiterhin nach, dass IFN- γ und IFN- α die durch IL-4-induzierte IL-4R-Expression vermindern. Diese Inhibition vermitteln die beiden Interferone dabei vermutlich nicht transkriptional, sondern posttranskriptional durch eine verringerte Stabilität der IL-4R-mRNA (SO ET AL., 2000).

Im Zusammenhang mit der MS-Pathogenese wurde bisher nur wenig über die Expression des IL-4R veröffentlicht. HULSHOF ET AL. (2002) untersuchten die IL-4R-Expression immunhistochemisch in Hirngewebe von Gesunden und MS-Patienten. Dabei stellten sie eine starke Immunreaktivität in aktiven und chronischen MS-Läsionen auf Makrophagen und Astrozyten fest. Eine Korrelation der Expression mit verschiedenen Entwicklungsstadien der MS-Läsionen konnte noch nicht aufgezeigt werden. Die Ergebnisse lassen aber dennoch eine aktive Rolle des IL-4 und seines spezifischen Rezeptors bei der ZNS-Immunantwort vermuten.

IL-10

IL-10 wird freigesetzt von T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen. Zu seinen vielfältigen biologischen Aktivitäten gehört die Unterdrückung der antigenpräsentierenden Funktion von Makrophagen und Monozyten, der T-Zell-Proliferation und der Synthese einiger Th1-Zytokine (THOMSON, 1994). *In-vitro* kann IL-10 Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen induzieren (VORA ET AL., 1996) und agiert als kostimulierender Faktor bei der B-Zelldifferenzierung (BURDIN ET AL., 1995). Hinsichtlich der Funktion von IL-10 bei der MS-Pathogenese wird dieses Zytokin allgemein als antiinflammatorisch bzw. die Immunantwort herabregulierend angesehen. Aus experimentellen Untersuchungen lassen sich für IL-10 präventive Wirkungen hinsichtlich Myelinschädigung und Phagozytose bei dem Entzündungsgeschehen der MS ableiten:

Einleitung

- 1) Unterdrückung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen und der T-Zellfunktion durch Verhinderung der CD28/B7.1-Rezeptor-Interaktion (GRUNIG ET AL., 1997; PAYVANDI ET AL., 1998)
- 2) Inhibition der APZ-Funktion von Monozyten und Makrophagen und Herabregulation der MHC-Klasse-II-Moleküle auf diesen Zellen (THOMSON, 1994; ROTT ET AL., 1994)
- 3) Suppression der zytotoxischen Funktion von aktivierten Makrophagen durch Unterdrückung der NO-Produktion (OSWALD ET AL., 1992).

Im EAE-Modell verhinderte die systemische Gabe von IL-10 den Ausbruch der Krankheit bei Ratten (ROTT ET AL., 1994; OLSSON, 1995). Und in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der EAE konnte von KENNEDY ET AL. (1992) eine vermehrte IL-10-mRNA-Expression im ZNS in Remissionsperioden nachgewiesen werden.

Auf ein allgemeines Zytokinungleichgewicht bzw. ein Zuwenig an Th2-Zytokinen bei MS-Patienten deutet die von HUANG ET AL. (1999) gezeigte verminderte Expression an IL-10-mRNA in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).

Ähnlich den Ergebnissen aus der EAE könnte IL-10 bei MS-Patienten ebenfalls für die Remission relevant sein, denn auch bei ihnen konnte vermehrt IL-10 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Bei Patienten mit optischer Neuritis (ON), eine häufige Erstmanifestation der MS, fand man in der Remissionsphase mehr MBP-reaktive-IL-10-mRNA im Blut als bei Patienten nahe eines akuten ON-Schubes (NAVIKAS ET AL., 1995). CARRIERI ET AL. (1998) beobachteten höhere IL-10-Konzentrationen im Liquor und im Blut von MS-Patienten in Remission im Vergleich zu Patienten im Schub und im Vergleich zu gesunden Probanden. Eine Korrelation vermehrter IL-10- und TGF- β -mRNA in mononukleären Zellen des peripheren Blutes und im Liquor mit der Phase kurz nach einem Schub, Remissionsperioden und einem weniger aggressiven Krankheitsverlauf bei MS-Patienten gelang auch anderen Arbeitsgruppen (RIECKMANN ET AL., 1994;1995; NAVIKAS ET AL., 1995).

Trotz einiger widersprüchlicher Daten deuten die Studienergebnisse auf eine ätiopathogenetisch wichtige Rolle der Zytokine bei der MS mit der Tendenz zu einer

Einleitung

Th1-dominierten Immunantwort im akuten Schub. Doch zur genaueren Klärung bedarf es weiterer Untersuchungen, wie z.B. ob ein Zuviel an proinflammatorischen Th1-Faktoren oder ein Zuwenig an antiinflammatorischen Th2-Einflüssen zum Krankheitsgeschehen beitragen.

Daneben ist zu bedenken, dass viele dieser Zytokinaberrationen nicht MS-spezifisch sind, sondern auch bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen (z.B. aseptischer Meningitis) oder auch nichtentzündlichen Erkrankungen wie dem Schlaganfall zu finden sind (WANG ET AL., 1992).

1.3 Immunmodulation durch IFN- β : vermutete Wirkmechanismen bei der Multiplen Sklerose

Die Interferone sind in 2 Hauptklassen eingeteilt: die Typ-I- und die Typ-II-Interferone. Zu den Typ-I-Interferonen gehören Interferon- β und die α -Interferone, das einzige Typ-II-Interferon ist IFN- γ . IFN- β ist ein 20 kDa großes Glykoprotein, das aus 166 Aminosäuren besteht. Im Organismus wird es hauptsächlich von Fibroblasten, Epithelzellen, Monozyten und Makrophagen gebildet, wobei die Synthese durch IL-2, IL-1 oder TNF induziert werden kann. Die Typ-I-Interferone binden an den gleichen Rezeptor, welcher auf fast allen Zelltypen zu finden ist (ARNASON ET AL., 1996). Dennoch lösen IFN- α und IFN- β nach Rezeptorbindung größtenteils unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle aus (PELLEGRINI UND SCHINDLER, 1993). Hinsichtlich ihrer Wirkungen ist für die Interferone bekannt, dass sie sowohl antivirale, antiproliferative als auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzen (RUDICK UND RANSOHOFF, 1995; TILG UND KASER, 1999).

Bei der Therapie der Multiplen Sklerose werden zwei verschiedene Typen von rekombinantem humanen Interferon-beta eingesetzt (Abb.1.3):

1. IFN- β -1a (Avonex[®], Biogen Inc., und Rebif[®], Ares-Serono, Serono International SA)
2. IFN- β -1b (Betaferon[®], Schering AG).

Einleitung

Die beiden IFN- β -1a-Produkte werden aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) gewonnen. Sie sind glykosiliert und fast identisch mit dem nativen humanen Protein (KAGAWA ET AL., 1988). Zwischen den IFN- β -1a-Typen gibt es hinsichtlich ihrer physikalisch-strukturellen und ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften keine Unterschiede, sie unterscheiden sich nur durch verschiedene Aufreinigungsschritte des rekombinanten Ausgangsmaterials (HERNDON, 1998).

IFN- β -1b stammt aus *Escherichia coli* und ist im Vergleich zum nativen Interferon- β geringfügig modifiziert: es ist nicht glykosiliert, die N-terminale Aminosäure Methionin fehlt und Cystein an Position 17 wurde durch Serin ersetzt.

	IFN-β-1a (Avonex®)	IFN-β-1a (Rebif®)	IFN-β-1b (Betaferon®)
Herkunft	CHO-Zellen	CHO-Zellen	<i>Escherichia coli</i>
Molekulargewicht	20 kDa	20 kDa	18,5 kDa
Aminosäuren	166	166	165*
Glykosilierung	ja	ja	nein
Spezifische Aktivität (I.U./mg)	27×10^7	27×10^7	2×10^7
Applikationsweg	i.m.	s.c.	s.c.

Tab.1.1: Charakteristika der rekombinanten β -Interferone. CHO = Chinese hamster ovary; * = kein N-Methionin und Cystein an Position 17 ist durch Serin ersetzt; i.m. = intramuskulär; s.c. = subkutan

Die drei großen klinischen IFN- β -Studien haben gezeigt, dass eine Therapie mit β -Interferonen einen deutlich positiven und anhaltenden Effekt auf Schubrate, Behinderungsprogression und MRT-Aktivität hat (THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP 1993, 1995; JACOBS ET AL., 1996; PRISMS STUDY GROUP, 1998). Aus diesem Grund wurden alle drei Präparate entsprechend den Studienprotokollen zur Therapie der MS (der RRMS, IFN- β -1b auch für SPMS) in Deutschland zugelassen. Nicht alle MS-Patienten sprechen auf die IFN- β -Therapie positiv an (RUDICK ET AL., 1997b). Der Grund für diese unterschiedliche Ansprechbarkeit ist bisher unbekannt. Weitgehend unbekannt sind auch die immunologischen Mechanismen, durch welche IFN- β seine Wirkung bei der MS ausübt. Am Anfang wurden Betainterferone

Einleitung

aufgrund ihrer antiviralen Eigenschaften bei der MS eingesetzt (RUDICK ET AL., 1996). Jedoch konnte bisher noch kein ätiologischer Zusammenhang mit persistierender viraler Infektion hergestellt werden. Eine klinische Studie bei IFN- β -behandelten MS-Patienten hat vielmehr aufgezeigt, dass eine IFN- β -Therapie keinen Einfluss auf die Frequenz an Atemwegsinfektionen hat (PANITCH, 1994). Die wissenschaftlichen Untersuchungen der letzten Jahre sprechen eher für einen immunmodulatorischen Einfluss, wobei die Mehrzahl der Studienergebnisse einen protektiven Effekt von IFN- β durch antiinflammatorische bzw. immunsupprimierende Wirkungen vermuten lässt. Dabei spielen vermutlich unterschiedliche Wirkmechanismen eine Rolle, wie zum Beispiel:

- I. Supprimierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine
- II. Induktion antiinflammatorischer Zytokine
- III. Inhibition der Expression von MHC-II-Molekülen
- IV. Verbesserung der Suppressorfunktion von T-Zellen
- V. Blockade der Transmigration

I. Supprimierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine (am Beispiel des in dieser Studie untersuchten Zytokins IFN- γ):

In zahlreichen *in-vitro*-Versuchen an PBMC-, T-Zell- und dendritischen Zellkulturen konnte demonstriert werden, dass es nach Zugabe von IFN- β zu einer reduzierten IFN- γ -Freisetzung kommt (NORONHA ET AL., 1993b; RUDICK ET AL., 1993; MCRAE ET AL., 1998). KOZOVSKA ET AL. (1999) bestätigten diese Ergebnisse mittels Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) der Kultur-überstände von MBP-reaktiven T-Zell-Klonen: sie wiesen bei IFN- β -behandelten MS-Patienten eine verminderte Produktion der Zytokine TNF- α und IFN- γ sowie eine vermehrte Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 nach. Des Weiteren wird die These einer Supprimierung der Th1-Antwort durch IFN- β gestützt durch *in-vivo*-Untersuchungen an MS-Patienten: mehrere klinischen Studien zeigten anhand durchflusszytometrischer

Einleitung

Untersuchungen, dass es bei MS-Patienten nach Beginn einer IFN- β -Therapie zu einen signifikanten Abfall IFN- γ -produzierenden Lymphozyten kommt (PETEREIT ET AL., 1997; FURLAN ET AL., 2000; CLERICI ET AL., 2001).

II. Induktion antiinflammatorischer Zytokine (am Beispiel der in dieser Studie untersuchten Zytokine IL-4 und IL-10):

Neben der Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokine spielt wahrscheinlich die Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation durch IFN- β . *In-vitro*-Versuche verschiedener Arbeitsgruppen belegen, dass es infolge von IFN- β zu einer verstärkten IL-10-Synthese sowohl bei aktivierten humanen Monozyten (PORRINI ET AL., 1995) als auch bei aktivierten T-Zellen kommt (REP ET AL., 1996). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine *in-vivo*-Studie bei Gesunden: hier wurden nach der täglichen Applikation von 6 MIU IFN- β -1b über den Zeitraum von einer Woche erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem IL-10 nachgewiesen (WILLIAMS UND WITT, 1998). Auch bei Studien mit MS-Patienten ließen sich antiinflammatorische Effekte von IFN- β vermuten: Wie schon unter Punkt I.) erwähnt, konnten KOZOVSKA ET AL. (1999) *in-vitro* eine vermehrte IL-4- und IL-10-Synthese bei MBP-reaktiven-T-Zell-Klonen von IFN- β -behandelten MS-Patienten nachweisen. In Untersuchungen an PBMC-Zellkulturen induzierte IFN- β eine erhöhte IL-10-Protein-Sekretion bei MS-Patienten als auch bei Gesunden (RUDICK ET AL., 1996; HUANG ET AL., 2001) und des weiteren die Akkumulation von IL-10-mRNA (RUDICK ET AL., 1996). Auch weitere *in-vivo*-Versuche bestätigten diese vermehrte IL-10-Synthese unter IFN- β -Einfluss: hier gelang der Nachweis von erhöhten zirkulierenden IL-10-Konzentrationen bei IFN- β -1b-behandelten MS-Patienten (NORONHA ET AL., 1993A, RUDICK ET AL., 1998; ÖZENCI ET AL., 1999).

III. Inhibition der Expression von MHC-II-Molekülen:

Die hauptsächlich durch IFN- γ induzierte Expression der MHC-II-Moleküle (FIERZ ET AL., 1985) wird *in-vitro* auf verschiedenen Zellen unter IFN- β -Einfluss inhibiert. Man konnte diesen IFN- γ -Antagonismus u.a. bei murinen Makrophagen (LING ET AL.,

Einleitung

1985), humanen Astrozyten und Astrozytomzellen (BARNA ET AL. 1989; RANSOHOFF ET AL., 1991) als auch bei Gliomzellen (JOSEPH ET AL., 1988) demonstrieren.

IV. Verbesserung der Suppressorfunktion von T-Zellen:

Die bei MS-Patienten beschriebene verminderte Funktion der T-Suppressor-Zellen während eines Krankheitsschubs (KOH ET AL., 1992) scheint durch IFN- β normalisiert zu werden. Eine Aktivierung von Suppressorzellen ließ sich sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* nachweisen (SCHNAPER ET AL., 1983; NORONHA ET AL., 1990, 1994).

V. Blockade der Transmigration:

Außerdem wirkt IFN- β anscheinend der Migration von Entzündungszellen durch die BHS entgegen. IFN- β vermindert *in-vitro* die Bindung von IFN- γ an endotheliale Zellen und unterdrückt auf diese Weise die durch IFN- γ induzierte vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (ARNASON ET AL., 1996). Daraus lässt sich schließen, dass unter IFN- β -Einwirkung autoreaktive T-Zellen schlechter an Gefäßendothelien der BHS anhaften und ins ZNS eindringen können. Außerdem bewirkt IFN- β in *in-vitro*-Experimenten eine Aktivitätsminderung der Matrixmetalloproteinase MMP-9 und verhindert dadurch eine Penetration der Basalmembran durch T-Zellen (STÜVE ET AL., 1996).

1.4 Die Durchflusszytometrie zum Nachweis intrazellulärer Zytokine und membranständiger Zytokinrezeptoren

Heutzutage ist neben dem Nachweis löslicher Zytokine im Serum mittels ELISA und der Bestimmung von membranständigen Zytokinrezeptoren durch Immunfluoreszenz auch eine Detektion dieser mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich. Hierbei können in Kombination mit Oberflächenantigenen die Zytokin(rezeptoren)muster einzelner Zellpopulationen qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Durch experimentelle Methoden wie ELISPOT, *in-situ*-Hybridisierung, Polymerase-Kettenreaktion und Limiting Dilution Analysis gelingt zwar der

Einleitung

Zytokin/Zytokinrezeptornachweis auf Protein- oder mRNA-Ebene, eine Zuordnung zu bestimmten Zellpopulationen ist jedoch mit diesen Techniken im Gegensatz zur Durchflusszytometrie nicht möglich, da nur die Gesamtmenge des Zytokins/Zytokinrezeptors bzw. die Gegenwart von Zytokin/Zytokinrezeptor-mRNA erfasst wird. Mit dem Durchflusszytometer kann man zudem, unter Ausnutzung der Fluoreszenzspektren, simultan verschiedene Zytokine/Zytokin-rezeptoren der gleichen Zelle erfassen. Ein weiterer Vorteil der durchfluss-zytometrischen Analyse ist eine verhältnismäßig einfache Handhabung sowie die Untersuchung einer großen Zellzahl innerhalb kürzester Zeit, wohingegen die obengenannten Assays sehr zeitaufwendig und schwer standardisierbar sind.

Der durchflusszytometrische Nachweis der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II (KIERSZENBAUM ET AL., 1995) und IL-4R (ARMITAGE ET AL., 1991; ZOLA ET AL., 1993; CHAN ET AL., 1996) auf humanen Leukozyten wurde bisher selten beschrieben. Dabei wurden von den Arbeitsgruppen in der Regel verschiedene Methoden angewandt. ZOLA ET AL. (1993) und CHAN ET AL. (1996) markierten *in-vitro* den membranständigen IL-4R mit direkt Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern auf unstimulierten Lymphozyten des peripheren Blutes. KIERSZENBAUM ET AL. (1995) gingen ähnlich vor: sie verwendeten für die IFN-R-II-Markierung auch direkt Fluorochrom-konjugierte monoklonale Antikörper, untersuchten aber in ihren experimentellen Versuchen nicht nur unstimulierte PBMC-Kulturen, sondern auch mit *Staphylococcus aureus Cowan-I* stimulierte PBMC-Kulturen. Eine weitere *in-vitro*-Methode präsentierten ARMITAGE ET AL. (1991). Sie bestimmten die IL-4R-Expression auf humanen T-Zellen indirekt, indem sie biotinyliertes rekombinantes IL-4 einsetzen und mit Hilfe von Avidin-Fluoreszein den an den spezifischen Rezeptor gebunden Anteil ermittelten. Auch sie untersuchten unstimulierte und stimulierte T-Zellen des peripheren Blutes. Als Stimulantien wurden IL-4, IL-7 oder Phytohämagglutinin-A verwendet.

Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass in den bisher durchgeführten Studien noch kein Standardprotokoll für den durchflusszytometrischen Nachweis der Expression der membranständigen IFN-R-II und IL-4R angewandt wurde. Eine

Einleitung

Anpassung und Optimierung der Methoden an die gegebenen Laborbedingungen ist deshalb notwendig.

Die noch relativ junge Methode der intrazellulären Zytokinmessung in peripheren Blutleukozyten mittels Durchflusszytometrie gründet auf der von SANDER ET AL. (1991) etablierten Technik. Nach Einführung der Methode zur Fixation und Permeabilisierung von Lymphozyten (die sog. „Paraformaldehyd-Saponin-Methode“), war der nächste Schritt in der Entwicklung des intrazellulären Zytokinnachweises die Verwendung von Sekretionshemmern. Mit ihrer Hilfe wurde eine intrazelluläre Akkumulation von Zytokinen erreicht, wodurch eine Signalverstärkung im Durchflusszytometer gelang und die Abgrenzung zur Autofluoreszenz der Zellen erleichtert wurde (SCHMITZ ET AL, 1993; JUNG ET AL., 1993). Weitere wissenschaftliche Weiterentwicklungen wie z.B. der Einsatz direkt Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper (OPENSHAW ET AL., 1995) oder die Markierung oberflächlicher Antigene und intrazellulärer Zytokine in einem Arbeitsschritt (PRUSSIN UND METCALFE, 1995) vereinfachten und verbesserten die ursprüngliche Methode. In den jüngeren und den aktuellen Studien wird der intrazelluläre Zytokinnachweises mittels Durchflusszytometrie basierend auf fünf wesentlichen Methodenschritten durchgeführt (ausführliche Beschreibung unter Kap.3.2) (PALA ET AL., 2000; CLERICI ET AL., 2001):

1. Leukozytenstimulation mit Inhibition der Proteinsekretion
2. Fixation der Zellen
3. Permeabilisierung der Zellmembran
4. Markierung intrazellulärer Zytokine mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern
5. Durchflusszytometrische Analyse

Mittels Durchflusszytometrie ist der intrazelluläre Zytokinnachweis ebenso wie der Nachweis membranständiger Zytokinrezeptoren sowohl bei isolierten Zellsuspensionen als auch bei Vollblut anwendbar. Die Vorteile der „Vollblutmethode“ liegen in der geringen Menge benötigten Zellmaterials, der Erfassung aller

Einleitung

Leukozytenpopulationen, einer verminderten Problematik unspezifischer Fc-Rezeptor-Bindungen und in der einfachen Probenvorbereitung (KLEINE ET AL., 1994). Aufgrund der genannten Vorteile gegenüber anderen Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrische Messungen durchgeführt.

1.5 Fragestellung

Obwohl die therapeutische Effektivität von IFN- β bei MS-Patienten hinreichend erwiesen ist, weiss man dagegen nur wenig über die entscheidenden Wirkmechanismen. Es ist in Anbetracht der postulierten Immunpathogenese der MS anzunehmen, dass IFN- β einen korrektiven Einfluss auf das Immunsystem ausübt.

Um potentielle Wirkmechanismen aufzudecken, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Monitoring MS-relevanter immunologischer Parameter bei untherapierten und IFN- β -therapierten MS-Patienten durchgeführt. Zur Erstellung des immunologischen Profils sollten die in Kap.1.4 genannten Vorteile der Durchflusszytometrie genutzt werden. Damit war das Ziel verbunden, die Methode der Durchflusszytometrie zu etablieren. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-10 sowie die Zytokinrezeptoren IFN-R-II- und IL-4R aufgrund folgender Kriterien ausgewählt:

- zentrale Rolle von T-Zellen und Zytokinen bei der MS-Pathogenese
- Th1-/Th2-Dichotomie
- Rezeptor-Ligand-Studie

Nach Etablierung der Methoden wurden diese zur Darstellung und Verlaufsbeobachtung von Zytokin(rezeptoren)profilen bei den verschiedenen MS-Patientenkollektiven angewandt. Ziele dieser Patientenstudie waren,

1. Aufdeckung möglicher Wirkungsweisen von IFN- β mit Hilfe der angewandten Methoden (Vergleich von untherapierten mit IFN- β -therapierten MS-Patienten)
2. Darstellung der Immunmodulation durch die zur Zeit zugelassenen IFN- β -Präparate (Vergleich von IFN- β -1a- und IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten)

Zudem war es im Rahmen der Untersuchungen wichtig, ob die experimentell ermittelten Befunde spezifisch für MS-Patienten sind. Aus diesem Grund wurde auch der Immunstatus von gesunden Probanden erhoben.

2 Material

2.1 Chemikalien

Albumin Fraktion V	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Riedel de Haen, Seelze
FacsLysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid (NaN_3)	Fluka, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Monensin	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Fluka, Steinheim
PermWash-Buffer®	Pharmingen, Hamburg
PBS 10x	GibcoBRL, Eggenstein
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und Glutamax-I®	GibcoBRL, Eggenstein

2.2 Reagenzien für das Durchflusszytometer

CaliBrite Beads	Becton Dickinson, Heidelberg
FacsClean	Becton Dickinson, Heidelberg
FacsFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FacsRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
HICK1-Positive-Control-Cells	Becton Dickinson, Heidelberg
HICK2-Positive-Control-Cells	Becton Dickinson, Heidelberg

2.3 Monoklonale Antikörper

Antikörper	Herkunft	Bezug
Antikörper zur Leukozytotypisierung		
mAk CD45-FITC	Maus-IgG1(Klon J.33)	Pharmingen
mAk CD45-PE	Maus-IgG1(Klon Immu-19.2)	Coulter
mAk CD3-PerCP	Maus-IgG1(Klon SK7)	Becton Dickinson
mAk CD4-APC	Maus-IgG1(Klon SK3)	Becton Dickinson
mAk CD8-FITC	Maus-IgG1(Klon 39.11)	Coulter
mAk CD8-PE	Maus-IgG1(Klon HIT8a)	Pharmingen
mAk CD19-APC	Maus-IgG1 (Klon SJ25C1)	Becton Dickinson
mAk CD14-PerCP	Maus-IgG1 (Klon MØP9)	Becton Dickinson
Antikörper zur Färbung der Oberflächenrezeptoren		
mAk IFN-R-II (CD118)-PE	Maus-IgG1(Klon GIR208)	Pharmingen
mAk IL-4R (CD124w)-PE	Maus-IgG1 (Klon S456C9)	Coulter
Antikörper zur intrazellulären Färbung		
mAk IFN-γ-FITC	Maus-IgG1(Klon B27)	Pharmingen
mAk IL-4-PE	Ratte-IgG2 (Klon MP4-25D2)	Pharmingen
mAk IL-10-PE	Ratte-IgG2A (Klon JES3-9F1)	Pharmingen
Negativkontrollen		
Maus-IgG1-FITC	Klon MOPC21	Pharmingen
Maus-IgG1-PE	Klon MOPC21	Pharmingen
Maus-IgG1-PE	Klon 679.1MC7	Coulter
Ratte-IgG1-PE	Klon R3-34	Pharmingen
Ratte-IgG2A-PE	Klon R35-95	Pharmingen

Tab.2.1: In dieser Studie verwendete monoklonale Antikörper

Material

2.4 Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit 25 mM Hepes und Glutamax I™

Das Kulturmedium wurde gemäß den Herstellerangaben gelagert, sowie vor jedem Gebrauch mit einem Membranfilter der Porenweite 0,2 µm steril filtriert.

2.5 Lösungen und Puffer

Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2

15,0 mmol/l	NaCl
0,4 mmol/l	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
1,6 mmol/l	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O

Färbepuffer

0,1 g	Natriumazid (NaN ₃)
1,0 g	Bovines Serumalbumin
100,0 ml	PBS (pH 7,2)

Fixierlösung

4,0 g	Paraformaldehyd (PFA)
100,0 ml	PBS (pH 7,2)

Auflösen des PFA unter Rühren und Erwärmen der Lösung auf 56°C. 1N NaOH tropfenweise zusetzen. pH auf 7,2 einstellen. Durch 0,2 µm-Membranfilter filtrieren.

Material

Stimulatoren-Stammlösungen

- *Ionomycin*

Stammlösung zu 0,5 mg/ml in Ethanol (96 %)

- *Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)*

Stammlösung zu 0,1 mg/ml in DMSO

- *Monensin*

Stammlösung zu 10 mM in Ethanol (96 %)

Alle drei Stammlösungen wurden in 20 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Stimulatoren-Gebrauchslösungen

Eingesetzte Konzentrationen:

- Ionomycin 500 ng/ml
- PMA 10 ng/ml
- Monensin 25 µM

An jedem Untersuchungstag wurden immer frische Stimulatoren-Gebrauchslösungen angesetzt: Stammlösung-Aliquots auftauen und mit steril gefiltertem Zellkulturmedium verdünnen.

Material

Färbelösungen

Die Antikörper gegen intrazelluläre Proteine wurden bei Gebrauch in Permeabilisierungspuffer (PermWash-Buffer®, Pharmingen) zu einem Endvolumen von 100 µl angesetzt:

1. iso-IFN-γ-Färbelösung:

1,0 µl Maus-IgG1-FITC + 99,0 µl PermWash-Buffer®

2. anti-IFN-γ-Färbelösung:

1,0 µl anti-IFN-γ-FITC + 99,0 µl PermWash-Buffer®

3. iso-IL-4-Färbelösung:

2,5 µl Ratte-IgG1-PE + 97,5 µl PermWash-Buffer®

4. anti-IL-4-Färbelösung:

2,5 µl anti-IL-4 PE + 97,5 µl PermWash-Buffer®

5. iso-IL-10-Färbelösung:

2,5 µl Ratte-IgG2-PE + 97,5 µl PermWash-Buffer®

6. anti-IL-10-Färbelösung

2,5 µl anti-IL-10-PE + 97,5 µl PermWash-Buffer®

2.6 Geräte und sonstiges Material

Geräte

Brutschrank (Cellstar)	Nunc, Wiesbaden
CellCounter	Sysmex, Hamburg-Norderstedt
Durchflusszytometer: FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Heizrührer	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	Schott-Geräte, Mainz
Vortexer	IKA, Staufen
Waage	Fischer, Goslar
Zentrifuge (Universal 32R)	Hettich, Tuttlingen

Material

Sonstiges Material

Blue Caps (15 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Blutentnahmesystem: Kabevette Na-Heparinat	Kabe, Nümbrecht-Eisenroth
Combitips (0,5 ml; 5,0 ml), steril	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (96 well)	Nunc, Wiesbaden
Pipetten (5 ml; 10 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen (12 x 75 mm)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen (10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen

2.7 Auswertungssoftware

CellQuest 3.1	Becton Dickinson, Heidelberg
---------------	------------------------------

2.8 Patientenkollektiv

Von Juli 2000 bis Januar 2002 wurden 58 Patienten der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, die an einer klinisch sicheren oder an laborgestützt sicherer MS litten (POSER ET AL., 1983), in die vorliegende Studie aufgenommen. Alle untersuchten Patienten waren über die Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme. Die Patienten wurden in der Poliklinik der obengenannten Klinik ambulant betreut und im Rahmen einer dreimonatigen Routineuntersuchung regelmäßig neurologisch untersucht. Auf diese Weise konnten der Behinderungsgrad, die Schübe bezüglich ihrer Dauer sowie Schwere und eventuell auftretende unerwünschte Arzneimittelwirkungen sorgfältig dokumentiert werden.

21 der MS-Patienten waren untherapiert.

Die anderen 37 MS-Patienten erhielten ein IFN- β -Präparat und wurden vor Beginn ihrer IFN- β -Therapie für die vorliegende Studie rekrutiert. Über den Präparatetyp entschieden die Patienten in Absprache mit dem behandelnden Arzt. Es konnten folgende Gruppen unterschieden werden:

- (1) 14 der 37 Patienten wurden auf 3 x 22 μ g/ Woche bzw. 3 x 44 μ g/ Woche s.c. IFN- β -1a (Rebif[®], Ares-Serono, Serono International SA),
- (2) 13 Patienten auf 6,0 M.I.E./ Woche i.m. IFN- β -1a (Avonex[®], Biogen Inc.) und
- (3) 10 Patienten auf 24,0 M.I.E./ Woche s.c. IFN- β -1b (Betaferon[®], Schering AG) eingestellt.

Die an der Studie teilnehmenden MS-Patienten waren zwischen 16,2 und 63,6 Jahren alt (im Durchschnitt: 38,7 Jahre) und wiesen einen EDSS-Wert von 0,0 bis 6,0 auf .

Material

Außerdem wurden 21 gesunde Personen untersucht. Sie waren zwischen 25,2 und 74,5 Jahren alt (im Durchschnitt: 34,5 Jahre).

Eine detaillierte Aufstellung der Zusammensetzung des Probandenkollektivs ist in Tabelle 2.2 wiedergegeben.

Keiner der Patienten bzw. gesunden Probanden hatte drei Monate vor Studienbeginn Immunsuppressiva (z.B. Kortikosteroide) erhalten. Von MS-Patienten, die unter einem akuten Schub litten, wurde kein Blut abgenommen und untersucht.

	IFN- β -1a[A]	IFN- β -1a[R]	IFN- β -1b	Untherapiert	Gesunde
Gruppenumfang (n)	13	14	10	21	21
Frauen	7	10	7	16	12
Männer	6	4	3	5	9
Alter zu Studienbeginn (Jahre)	33,6 \pm 10,3	32,3 \pm 7,4	47,7 \pm 10,3	40,4 \pm 10,5	34,5 \pm 12,4
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	30,8 \pm 9,5	29,0 \pm 6,8	36,2 \pm 11,4	36,0 \pm 10,0	---
Dauer der MS (Jahre)	2,8 \pm 3,0	3,3 \pm 2,8	11,4 \pm 9,0	4,4 \pm 6,1	---
EDSS-Ausgangswert	1,6 \pm 1,3	1,9 \pm 1,4	5,1 \pm 0,8	2,2 \pm 1,4	---
Schübe in den vorhergehenden 24 Monaten	2,6 \pm 1,0	2,4 \pm 1,7	1,7 \pm 0,8	1,4 \pm 0,7	---
MS-Form	RRMS	RRMS	SPMS	RRMS (17) SPMS (4)	---

Tab.2.2: Zusammensetzung des Probandenkollektivs

IFN- β -1a[A] = auf 6,0 M.I.E./ Woche i.m. IFN- β -1a (Avonex[®], Biogen Inc.) eingestellte MS-Patienten

IFN- β -1a[R] = auf 3 x 22 μ g/ Woche bzw. 3 x 44 μ g/ Woche s.c. IFN- β -1a (Rebif[®], Ares-Serono, Serono International SA) eingestellte MS-Patienten,

IFN- β -1b = auf 24,0 M.I.E./ Woche s.c. IFN- β -1b eingestellte MS-Patienten

Material

Studiendesign:

Von den IFN- β -behandelten MS-Patienten, unbehandelten MS-Patienten und den gesunden Probanden wurde an den in Tabelle 2.3 aufgeführten Zeitpunkten Blut abgenommen und im Rahmen der Studie untersucht.

Probandenkollektiv	Blutentnahmezeitpunkt
IFN- β -behandelte Patienten:	(4 Blutentnahmezeitpunkte)
T0	vor der ersten IFN- β -Behandlung
T1	3 Wochen nach der ersten IFN- β - Behandlung
T2	6 Wochen nach der ersten IFN- β -Behandlung
T3	3 Monate nach der ersten IFN- β -Behandlung
unbehandelte MS-Patienten:	(2 Blutentnahmezeitpunkte)
T0	zu Studienbeginn
T3	3 Monate später
gesunde Individuen:	(einmalige Blutentnahme)
T0	zu Studienbeginn

Tab.2.3: Blutentnahmezeitpunkte der Studienteilnehmergruppen

3 Methoden

3.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

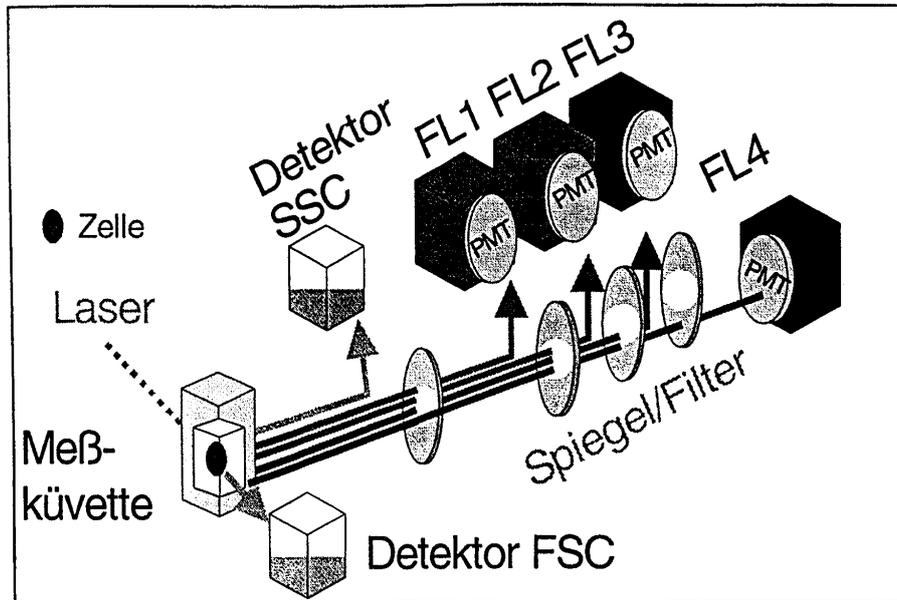


Abb.3.1: Die Detektionsoptik. Die Abbildung zeigt das komplexe optische System eines Durchflusszytometers, bestehend aus Blenden und verschiedenen Filtern. Diese trennen Streu- von Fluoreszenzlicht und teilen die Fluoreszenzen in unterschiedliche Farbbereiche auf (nach Trainingshandbuch Durchflusszytometrie, Becton Dickinson, 1999)

Das Durchflusszytometer, früher auch als „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) bezeichnet, ist ein Messsystem, welches auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften, aber auch Fluoreszenzen erfasst. Das Prinzip beruht darauf, dass vereinzelte Zellen (Abb.3.2) in einem flüssigem Medium einen Laser passieren und durch diesen zur Emission von Streulicht und bei entsprechender Markierung von Antigenen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern auch zur Fluoreszenzlichtemission angeregt werden. Messungen der Streu- und Fluoreszenzlichtemission erlauben eine Quantifizierung von antigenetischen, biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Einzelzelle (Multiparameteranalyse).

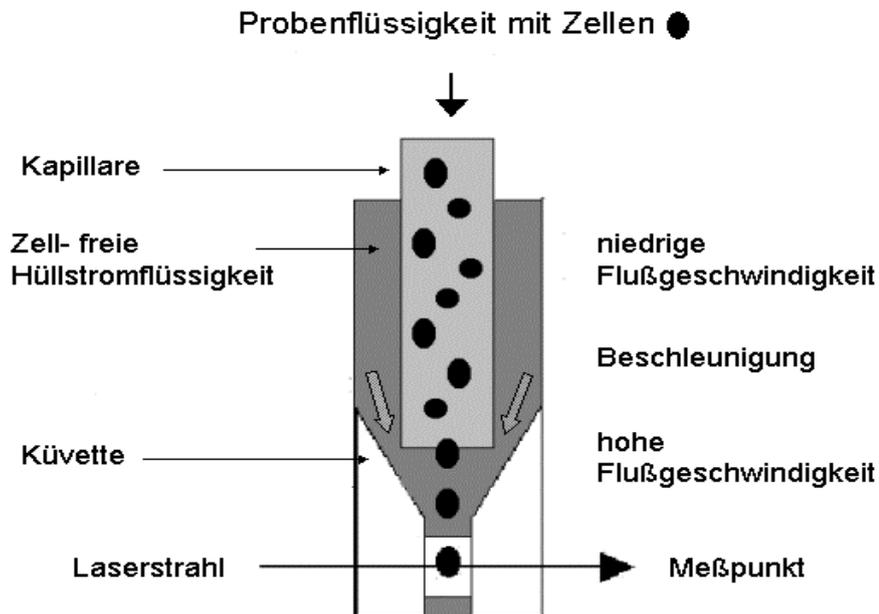


Abb.3.2: Hydrodynamische Fokussierung. Ein ausgeklügeltes Flüssigkeitssystem im Durchflusszytometer ermöglicht die Messung auf Einzelzellebene: Die Probenflüssigkeit wird in einer Stahlkapillare unter Druck zu einer sich konisch verengenden Küvette geführt. Diese Stahlkapillare wird von einer zellfreien Flüssigkeit (Hüllstrom), welche eine laminare Strömung erzeugt, umspült. Am Ende der Kapillare trifft der Hüllstrom auf die Probenflüssigkeit und beschleunigt diese, wodurch die sich darin befindlichen Zellen vereinzelt werden. Durch den konischverlaufenden, engen Eingang der Küvette werden die einzelnen Zellen fokussiert und können auf diese Weise vom Laser optimal am definierten Messpunkt erfasst werden.

Wie oben angeführt, misst das Durchflusszytometer die Streuung des Laserlichtes, wobei man eine Streuung zwischen 0 und 10° als Forward-Scatter (FSC) und die Ablenkung des Lichts im 90° -Winkel als Sideward-Scatter (SSC) bezeichnet. Der FSC korreliert mit der Zellgröße bzw. dem Zelldurchmesser und der SSC mit den extra- und intrazellulären Bestandteilen (entspricht dem Refraktionsindex), wie z.B. Granularität und Membranfältelung. Aufgrund der individuellen Streulichtmuster kann man die analysierten Zellen bestimmten (Sub-)Populationen zuordnen.

Der in dieser Arbeit verwendete FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) ist

Methoden

weiterhin in der Lage zwischen Emissionsspektren von vier verschiedenen Fluorochromen zu differenzieren, nämlich die der Fluorochrome Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (R-PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) sowie Allophycocyanin (APC). Die Farbstoffe werden durch einen Argon-Ionen-(488 nm) bzw. einen Helium-Neon-Laser (633 nm) zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt, welches nach elektronischer Verstärkung durch Photomultiplier (PMT) mit spezifischen Detektoren erfasst wird. Die Messwerte werden an den angeschlossenen Computer weitergeleitet und dann mit Hilfe des Softwareprogramms CellQuest 3.1 dargestellt und ausgewertet. Neben der Berechnung der Prozentanteile einzelner Zellsubpopulationen können Fluoreszenzintensitäten, ein Maß für die Antigenmenge pro Zelle, und zahlreiche andere statistische Werte ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Durchflusszytometrie zur Messung und Analyse von Leukozyten des peripheren Blutes, insbesondere Lymphozyten und Monozyten, sowie deren membrangebundenen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R und den intrazellulären Zytokinen IFN- γ , IL-4 und IL-10 angewandt. Durch eine Markierung der Antigene mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (es wurden alle vier Fluoreszenzbereiche ausgenutzt) konnten auf diese Weise simultan verschiedene Zellpopulationen und deren spezifische Zytokin- bzw. Zytokinrezeptorenmuster erfasst werden.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden mit Hilfe der geräteeigenen Software CellQuest 3.1 (Becton Dickinson) dargestellt und ausgewertet. Dabei wurden korrelierte Zweiparameterdarstellungen (DotPlots) verwendet. Ein DotPlot demonstriert anhand einer x-y-Achsendarstellung die Relation zwei verschiedener Zelleigenschaften. Sowohl die x-Achse als auch die y-Achse repräsentieren Lichtintensitäten. Dabei wird jede Zelle durch einen Punkt dargestellt und jeder Punkt dementsprechend durch zwei Werte beschrieben (Abb.3.3-3.4).

Darstellungsformen der Ergebnisse

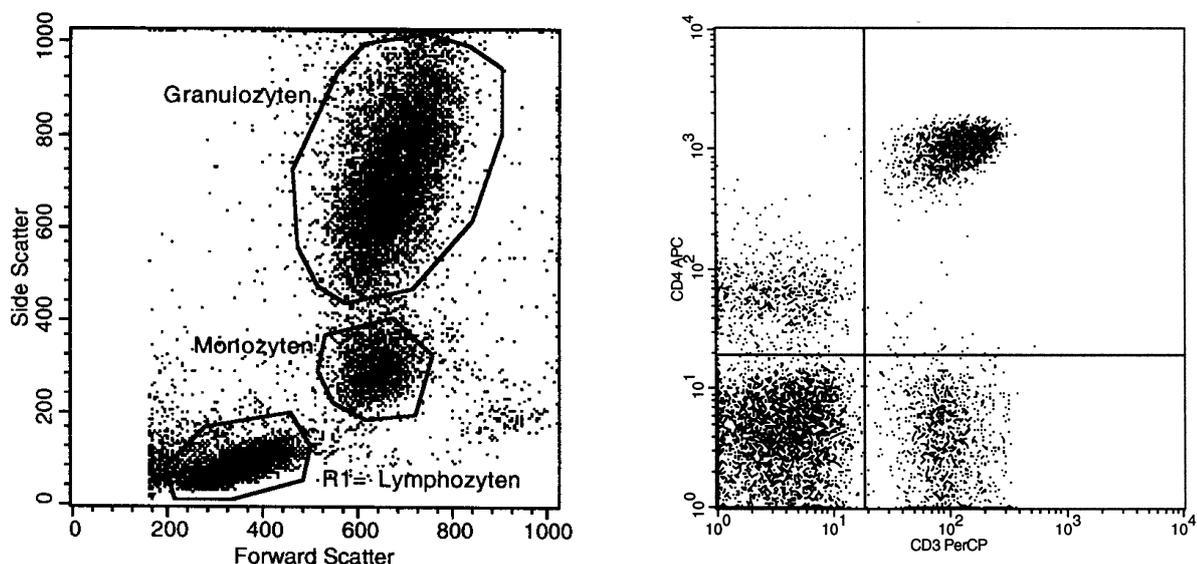


Abb.3.3-3.4: Korrelierte Zweiparameterdarstellung (Punktwolkendiagramm; DotPlot).

Das **links** abgebildete Beispiel zeigt die durchflusszytometrische Analyse einer lysierten Vollblutprobe mit der für diese typischen Anordnung der Leukozytensubpopulationen aufgrund ihrer individuellen Streulichtmuster. In der Abbildung ist der FSC auf der x-Achse und SSC auf der y-Achse dargestellt. Jeder Punkt im DotPlot entspricht einer Zelle und wird durch zwei Werte (FSC und SSC) beschrieben. Die analysierten Zellen ordnen sich entsprechend ihrer morphologischen Eigenschaften (= individuelle Streulichtmuster) im DotPlot ein, und können auf diese Weise in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert werden.

Die **rechte** Abbildung zeigt die Expression von CD3 und CD4 auf peripheren Blutleukozyten. Dazu wurde eine lysierte Vollblutprobe mit anti-CD3-PerCP und anti-CD4-APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die x-Achse repräsentiert in diesem Beispiel die PerCP-Fluoreszenz und die y-Achse die APC-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Quadrantensetzung ist eine klare Differenzierung der Zellpopulationen möglich: Im unteren linken Quadranten befinden sich Zellen, die weder eine PerCP-Fluoreszenz noch eine APC-Fluoreszenz emittieren, d.h. es ist die Autofluoreszenz der Zellen in diesem Quadranten dargestellt. Im unteren rechtem Quadranten ordnen sich alle Zellen mit einer PerCP-Fluoreszenz und im oberen linken Quadranten die Zellen mit einer APC-Fluoreszenz ein. Zellen, die beide Fluoreszenzen emittieren, werden im oberen rechten Quadranten dargestellt.

Methoden

Zur Vergleichbarkeit der Patienten bzw. der einzelnen Messungen wurden pro Messung jeweils 5000 Lymphozyten im sogenannten „Live-Gate“ akquiriert. Zudem wurde bei jeder Messung ein standardisiertes Akquisitions- und Auswerteschema befolgt. Hierzu das Beispiel einer Messung einer anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD8-FITC und anti-IFN-R-II-PE gefärbten Probe (Abb.3.5-3.9):

1. Identifikation der Lymphozyten-Gesamtpopulation anhand ihrer morpho-logischen Eigenschaften im initialen FSC-/SSC-DotPlot (Punktwolken-diagramm) (Abb.3.5, R1).
2. Selektion der CD3+Zellen (innerhalb der Lymphozytenpopulation=R1) durch Erfassung des entsprechendenden Fluoreszenzsignals (Abb.3.6, R2) sowie
3. weitere Differenzierung dieser Population in CD3+CD4+ und CD3+CD8+Zellen aufgrund deren spezifischer Fluoreszenzsignale (Abb.3.7 und 3.8)
4. Messung der IFN-R-II-Expression (bzw. der Fluoreszenzintensität der anti-IFN-R-II-PE-markierten Proben) auf den einzelnen Zellpopulationen (im Abbildungsbeispiel auf CD3+Zellen, Abb.3.9)
5. Auswertung der Messergebnisse

Auswertungsbeispiel

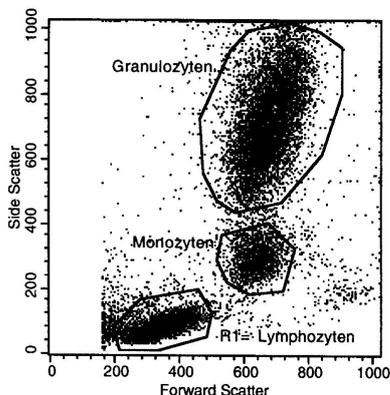


Abb.3.5: Lymphozytengating. Die erste Messung dient zur bestmöglichen Einstellung eines Lymphozytengates über die Vorwärts-(FSC)- und Seitwärts-(SSC) Lichtstreuung. Dieses Gate wird über die weiteren Analysen desselben Messansatzes beibehalten.

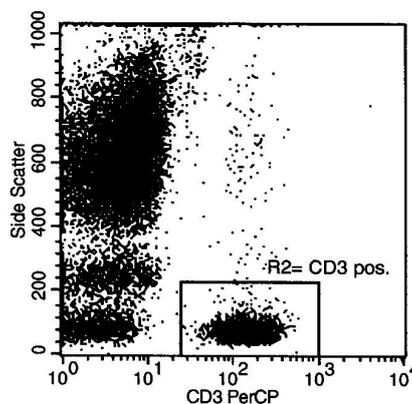


Abb.3.6: Darstellung der CD3+Population (R2) innerhalb des Lymphozytengates (R1). Die in Abb.3.5 gegateten Lymphozyten werden genauer definiert: es wird ein Gate um die CD3+Zellen gesetzt. Dieses Verfahren vermeidet Verunreinigungen der Messregion durch Mono- und Erythrozyten.

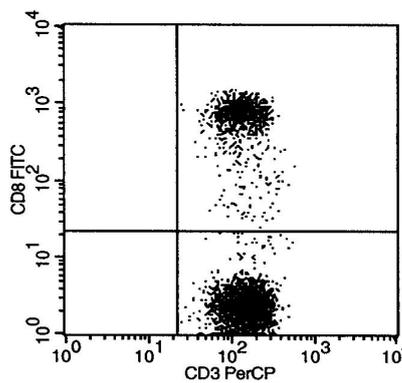
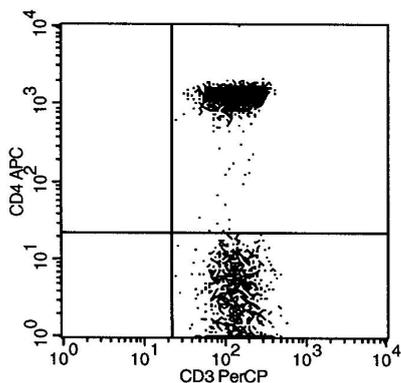


Abb.3.7-3.8: Darstellung der CD3+CD4+Zellen und der CD3+CD8+Zellen (jeweils oberer rechter Quadrant). Es wurden nur Messereignisse erfasst, die sowohl in R1 als auch in R2 liegen.

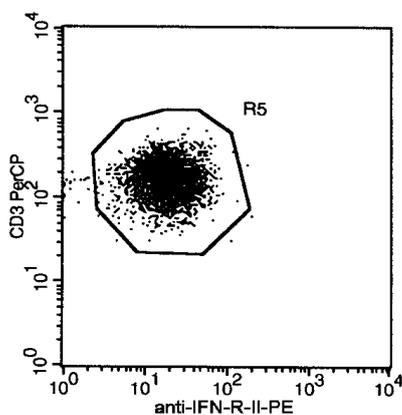


Abb.3.9: Messung der IFN-R-II-Expression. Im Beispiel auf CD3+Zellen (Messereignisse aus R1 und R2).

3.2 Stimulationsassays für Leukozyten

3.2.1 Leukozytenstimulation mit verschiedenen Konzentrationen der Stimulatoren PMA, Ionomycin und Monensin

In den Veröffentlichungen über die Stimulation von Leukozyten des peripheren Blutes für den intrazellulären Zytokinnachweis mittels Durchflusszytometrie wurden unterschiedliche Konzentrationen der Stimulatoren Ionomycin und PMA sowie des Golgi-Apparat-Blockers Monensin verwandt (SANDER ET AL., 1991; JUNG ET AL., 1993; PRUSSIN UND METCALFE, 1995). Anhand diesen wurde die Verdünnungsreihe im unten angeführten Versuch erstellt. Zur Stimulationskontrolle wurde der monoklonale Antikörper anti-CD69-PE verwendet. CD69 ist das früheste Aktivierungsantigen (nach zwei- bis dreistündiger Aktivierung ist die membranständige Expression nachweisbar) und konnte somit zur Überprüfung der Aktivierung der zu untersuchenden Proben herangezogen werden. Durch Kombination dieses Antikörpers mit einem zweiten Antikörper, nämlich anti-CD3-PerCP, war es möglich, den prozentualen Anteil der stimulierten CD3+Zellen genau zu bestimmen.

Versuchsaufbau:

Zuerst wurden die Verdünnungsstufen der Stimulatoren angesetzt. Dafür wurden die bei -20°C eingefrorenen Stammlösungen aufgetaut und mit Zellkulturmedium zu den in der Tabelle 3.1 angegebenen Konzentrationen verdünnt:

	Konzentrationen
Ionomycin	1000 ng/ml, 500 ng/ml, 375 ng/ml und 250 ng/ml
PMA	50 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml und 1 ng/ml
Monensin	25 µM, 12,5 µM und 6,25 µM

Tab.3.1 Eingesetzte Stimulatorenkonzentrationen

Mit Hilfe des Cell Counters wurden die Leukozyten der Heparinblutproben gezählt. Anhand der ermittelten Leukozytenzahl wurde das Blut mit dem Zellkulturmedium auf

Methoden

10^6 Zellen/ml verdünnt und jeweils 200 μ l in 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen pipettiert. Zwei Röhrchen enthielten nur das Blut-Medium-Gemisch, bei den anderen wurden jeweils 30 μ l der Stimulatoren hinzugegeben. Es wurde im Doppelansatz jede mögliche Kombination der drei Stimulatoren bzw. ihrer angesetzten Konzentrationen ausgetestet.

Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Proben aus dem Brutschrank genommen und mit 2 ml PBS/1 % BSA gewaschen (5 min bei 250 g). Die Zellpellets wurden sorgfältig resuspendiert und anschließend wurde zu jeder Probe 10 μ l des kombinierten Antikörpers anti-CD69-PE/anti-CD3-PerCP pipettiert. Die Proben inkubierten erst 30 min bei 4°C, dann erfolgte die Zugabe von 2 ml „FACSLysing Solution®“ (um die bei der durchflusszytometrischen Messung störenden Erythrozyten zu lysieren) und eine Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit. Abschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (250 g, 5 min), in 300 μ l PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.2 Leukozytenstimulation bei unterschiedlich langen Stimulationszeiten

Die Optimierung der Stimulationsdauer war der nächste Schritt der Versuchsreihe. Hierbei wurde untersucht, wie sich unterschiedlich lange Stimulationszeiten auf die durchflusszytometrisch bestimmbare Anzahl Zytokin-positiver-Zellen auswirken.

Versuchsaufbau:

Stimulation: Die Leukozyten des heparinisierten Blutes wurden gezählt, das Blut mit Zellkulturmedium auf 10^6 Zellen/ml verdünnt und 200 μ l in 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von je 30 μ l der Stimulatoren-Gebrauchslösungen wurden jeweils sechs Proben

- 3, 4, 5 oder 24 Stunden inkubiert

des weiteren wurden noch unstimulierte Blutproben mitgeführt, d.h. Proben, die nur 200 μ l verdünntes Blut enthielten.

Nach der Inkubationszeit wurden die Blutproben aus dem Brutschrank genommen, mit 2 ml PBS/1 % BSA gewaschen (250 g, 5 min) und sorgfältig resuspendiert.

Fixation und Permeabilisierung: Unter leichtem Vortexen wurde 0,5 ml eiskalte Fixierlösung hinzugegeben und die Röhrchen für 10 min in den Kühlschrank gestellt. Dann wurden die Proben zweimal mit PBS/1 % BSA gewaschen (250 g; 5 min), zur Permeabilisierung der Zellmembran in 2 ml „PermWash-Buffer[®]“ resuspendiert und weitere 10 min in den Kühlschrank gestellt.

Intrazelluläre Zytokinfärbung: Nach Abzentrifugation des „PermWash-Buffer[®]“ (250 g, 5 min) wurde in alle sechs Ansätze 2,5 μ l anti-CD3-PerCP-Antikörper und in je zwei des Sechsfachansatzes noch jeweils 100 μ l anti-IFN- γ -Färbelösung, anti-IL-4-Färbelösung bzw. anti-IL-10-Färbelösung pipettiert. Die Inkubation erfolgte über 30 min bei 4°C. Die Proben wurden anschließend mit 2 ml „PermWash-Buffer[®]“ gewaschen (250 g, 5 min) und nach Resuspension der Zellpellets in 300 μ l PBS konnten die Proben im Durchflusszytometer analysiert werden.

3.2.3 Einfluss des Antikoagulans auf die Leukozytenstimulation und den intrazellulären Zytokinnachweis

Um beurteilen zu können, inwieweit das im Blutentnahmesystem verwendete Antikoagulans den durchflusszytometrischen Nachweis intrazellulärer Zytokine beeinflusst, wurden Untersuchungen an Heparin- und an Citratblutproben durchgeführt.

Versuchsaufbau:

Heparin- und Citratblutproben wurden mit Zellkulturmedium zu 10^6 Zellen/ml verdünnt. 200 µl des Blut-Medium-Gemisches wurden zusammen mit je 30 µl der Stimulatoren-Gebrauchslösungen in 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen pipettiert und über vier Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Entsprechend der in Kap.3.2.2 beschriebenen Methode wurden die Proben dann fixiert, permeabilisiert und die Zytokine IFN-γ, IL-4 und IL-10 intrazellulär mit monoklonalen Antikörpern markiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

3.2.4 Einfluss der Lagerung auf die Leukozytenstimulation und den intrazellulären Zytokinnachweis

Weiterhin wurde getestet, wie sich zum einen die Lagerungszeit und zum anderen die Lagerungstemperatur auf die Zytokinproduktion von stimulierten Leukozyten des peripheren Blutes auswirkt. Dazu wurden Heparinblutproben

- direkt nach der Blutentnahme
- nach dreistündiger Lagerung bei RT (18-22°C)
- nach dreistündiger Lagerung im Kühlschrank (4°C)
- nach 24-stündiger Lagerung bei RT (18-22°C)
- nach 24-stündiger Lagerung im Kühlschrank (4°C)

untersucht.

In Anlehnung an den in Kap.3.2.2 beschriebenen Versuchsaufbau wurde eine vierstündige Stimulation der verschiedenen gelagerten Heparinblutproben mit anschließender T-Zell-Typisierung und intrazellulärer Färbung von IFN- γ , IL-4 und IL-10 durchgeführt.

3.2.5 Kontrollzellen für die intrazelluläre Zytokinfärbung

In der Etablierungsphase wurden die erhobenen Messergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung von Vollblut mit der intrazellulären Zytokinfärbung von Positivzellen (sog. „*HICK-Zellen*“, *human-intracellular-cytokine-positive-control-cells*, Pharmingen) verglichen. Dabei handelte es sich um aktivierte und fixierte humane Leukozyten, welche bestimmte Zytokinmuster aufwiesen:

„*HICK1-Positive Control Cells*“: IL-2, TNF- α und IFN- γ

„*HICK2-Positive Control Cells*“: IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 und GM-CSF

3.3 Färbung der membranständigen Rezeptoren IFN-R-II und IL-4R auf Leukozyten des peripheren Blutes

Neben dem intrazellulären Zytokinnachweis in T-Zellen sollte die Expression der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R auf Leukozyten des peripheren Blutes durchflusszytometrisch analysiert werden. Zur Erkennung eines möglichen Stimulationseinflusses auf die IFN-R-II- oder IL-4R-Expression wurde diese sowohl auf unstimulierten als auch stimulierten Leukozyten des peripheren Blutes untersucht.

Versuchsaufbau:

Nach Verdünnung der heparinisierten Blutproben auf 10^6 Zellen/ml wurden

I) 200 μ l direkt zusammen mit 10 μ l anti-CD45-FITC und 1 μ l anti-IFN-R-II-PE bzw. mit 10 μ l anti-CD45-FITC und 5 μ l anti-IL-4R-PE in ein Rundbodenröhrchen pipettiert oder

II) 200 μ l mit je 30 μ l der Stimulatoren-Gebrauchslösungen über vier Stunden im Brutschrank (37°C und 5 % CO₂) inkubiert, mit PBS/ 1 % BSA gewaschen und anschließend mit 0,5 ml eiskalter Fixierlösung fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/1 % BSA wurden zu den Zellpellets je 10 μ l anti-CD45-FITC und 1 μ l anti-IFN-R-II-PE bzw. 10 μ l anti-CD45-FITC und 5 μ l anti-IL-4R-PE pipettiert.

Alle Proben wurden nach 30-minütiger Antikörperinkubation (4°C) über 15 min im Dunkeln mit 2 ml „FACSLysing Solution[®]“ inkubiert und anschließend abzentrifugiert (250 g, 5 min). Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellpellets in 300 μ l PBS resuspendiert.

3.4 Messparameter für die Patientenstudie

Für jeden Studienteilnehmer wurde pro Untersuchungstermin ein definiertes Zytokin(rezeptoren)profil in Leukozyten des peripheren Blutes ermittelt (s.Kap.3.4.1-3.4.4). Um die Messgenauigkeit zu erhöhen, wurde immer mit einem Doppelansatz gearbeitet und zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde der Mittelwert der Messergebnisse aus diesem Doppelansatz herangezogen.

Stimulationskontrolle:

An jedem Untersuchungszeitpunkt wurde pro Studienteilnehmer eine Probe des stimulierten Blutes mit der Kombination der monoklonalen Antikörper anti-CD69-PE und anti-CD3-PerCP gefärbt. Nach der vierstündigen Stimulation sollten über 90 % der T-Zellen CD69 koexprimieren.

Negativkontrollen

Bei den Messungen wurde für jeden untersuchten Parameter eine sogenannte Isotypkontrolle mitgeführt. Dabei handelte es sich um Antikörper mit dem gleichen Isotypenaufbau (z.B. Maus-IgG1 im Falle des IFN-R-II-Antikörpers) und der gleichen Fluoreszenzmarkierung wie der entsprechende Antikörper des untersuchten Parameters (z.B. PE-konjugiert beim IFN-R-II-Antikörper), aber mit einer anderen Spezifität. Auf diese Weise ist es möglich, unspezifische Bindungen von spezifischen abzugrenzen und Positivpopulationen genau zu definieren. Eine ausführliche Erklärung des Auswertungsverfahrens mit Hilfe der Isotypkontrolle folgt unter 3.4.2 und 3.4.4 .

Methoden

3.4.1 Bestimmung von IFN-R-II und IL-4R auf verschiedenen Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes

Die membranständige Expression des IFN-R-II und des IL-4R wurde im Rahmen der Patientenstudie auf folgenden Leukozytenpopulationen quantitativ ermittelt:

Rezeptor	Untersuchte Zellpopulation
IFN-R-II	CD3+,CD4+,CD8+,CD19+ und CD14+Zellen
IL-4R	CD19+Zellen

Versuchsaufbau:

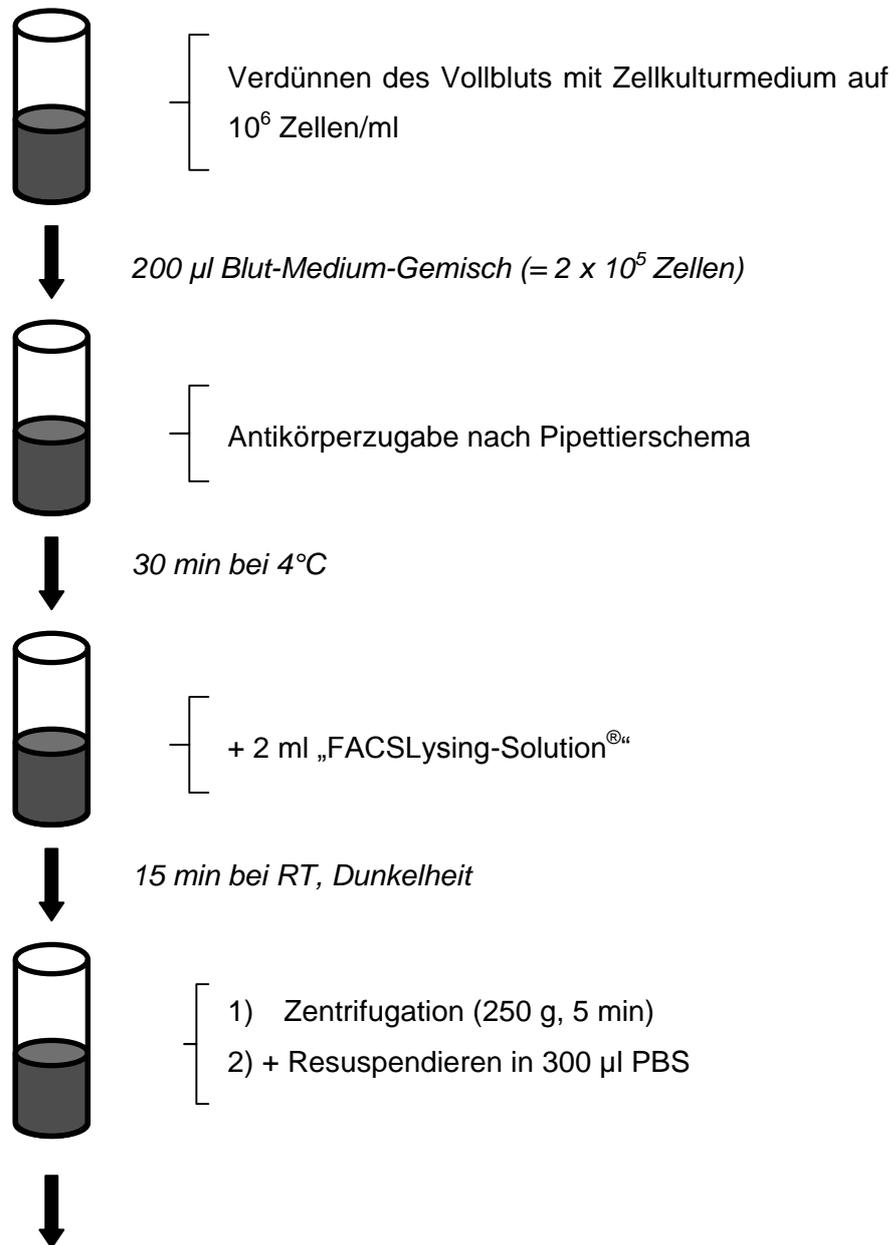
Heparinisiertes Blut wurde mit Zellkulturmedium zu 10^6 Zellen pro ml verdünnt. Davon wurden jeweils 200 μ l in 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen pipettiert und entsprechend dem in Tabelle 3.2 dargestellten Pipettierschema monoklonale Antikörper zur Leukozytentypisierung und Markierung der membranständigen Zytokinrezeptoren (IFN-R-II und IL-4R) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C, erfolgte die Lyse der Erythrozyten nach der „Lyse-No-Wash-Methode“: Dazu wurden die Proben 15 min in 2 ml „FACSLysing-Solution®“ in Dunkelheit bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert (250 g, 5 min). Die Zellpellets wurden in 300 μ l PBS resuspendiert.

Die Messung und Analyse der Proben erfolgte dann mit Hilfe des Durchflusszytometers.

Ansatz-Nr.	Monoklonale Antikörper						
	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE	1 µl anti-Maus-IgG1-PE	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE
1	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE	1 µl anti-Maus-IgG1-PE	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE
2	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE	1 µl anti-IFN-R-II-PE	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE
3	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE	1 µl anti-IFN-R-II-PE	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE
4	2,5 µl anti-CD14-PerCP	1 µl anti-CD19-APC	---	1 µl anti-IFN-R-II-PE	2,5 µl anti-CD14-PerCP	1 µl anti-CD19-APC	---
5	2,5 µl anti-CD14-PerCP	1 µl anti-CD19-APC	---	1 µl anti-IFN-R-II-PE	2,5 µl anti-CD14-PerCP	1 µl anti-CD19-APC	---
6	---	1 µl anti-CD19-APC	---	5 µl anti-Maus-IgG1-PE	---	1 µl anti-CD19-APC	---
7	---	1 µl anti-CD19-APC	---	5 µl anti-IL-4R-PE	---	1 µl anti-CD19-APC	---

Tab.3.2: Pipettierschema zur Leukozytentypisierung und Markierung membranständiger Zytokinrezeptoren (IFN-R-II und IL-4R). Pro Patient und Untersuchungstag wurden die Ansätze 1-7 jeweils als Doppelansatz durchgeführt.

Abb.3.10: Flussdiagramm des entwickelten Methodenprotokolls zum Nachweis membranständiger Zytokinrezeptoren



Durchflusszytometrische Analyse

3.4.2 Quantitative Bestimmung der Expression von IFN-R-II und IL-4R

Die Expression von IFN-R-II und IL-4R auf der Leukozytenoberfläche im peripheren Blut wurde anhand der im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensitäten ausgewertet. Diese entsprechen aufgrund der logarithmischen Achsenskalierung im DotPlot dem von der Software ermittelten geometrischen Mittelwert (x-GeoMean) der Punktwolken. Da aufgrund der individuellen Unterschiede der Leukozytenmorphologie und der damit einhergehenden unterschiedlichen Messeinstellungen des FACSCalibur keine direkte Vergleichbarkeit der Werte gegeben war, wurde folgende Formel angewendet, um die gemessenen Fluoreszenzwerte der Studienteilnehmer miteinander vergleichen zu können:

$$\text{Relative Fluoreszenzintensität (Rfi)} = \frac{\text{x-GeoMean Rezeptor} - \text{x-GeoMean Isotyp}}{\text{x-GeoMean CD45 PE} - \text{x-GeoMean Isotyp}} \times 1000$$

Es wurde also die relative Fluoreszenzintensität berechnet. Im einzelnen heißt das, dass die für einen Rezeptor gemessene Fluoreszenzintensität durch die der Isotypkontrolle korrigiert und mit der ebenfalls korrigierten Positivkontrolle zu der vergleichbaren Rfi umgerechnet wurde. Diese Auswertemethode basiert auf dem Prinzip, dass der Wert der Isotypkontrolle gleich 0 und der Wert der Positivkontrolle gleich 1000 gesetzt wurde und die Rfi somit einen auf diese Skala (0-1000) angepassten Wert darstellt. Durch diesen wurden die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und von unterschiedlichen Studienteilnehmern ermittelten Fluoreszenzintensitäten vergleichbar.

Die Zellen des Lymphozyten- und des Monozytengates wurden getrennt ausgewertet, da die morphologischen Unterschiede auch verschiedene Werte der Negativ-(Isotyp-) und der Positivkontrollen (CD45-PE) bewirkten.

Methoden

Beispiel der Rfi-Berechnung von IFN-R-II auf CD3+Zellen (Abb.3.11-3.13)

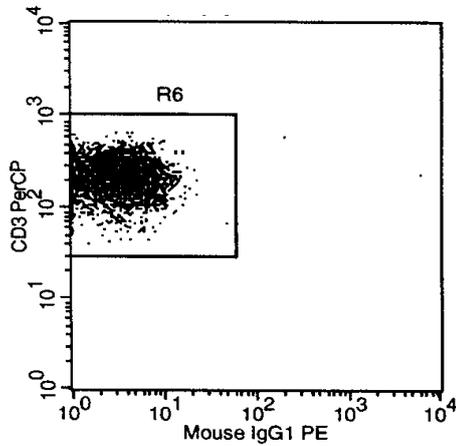


Abb.3.11: Isotypkontrolle. (bei der Rfi-Berechnung definiert als Wert 0)
x-GeoMean = 3,0

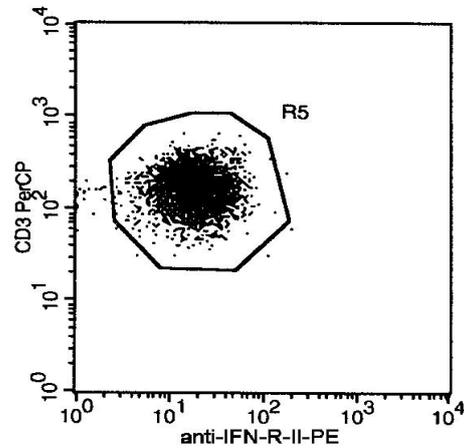


Abb.3.12: IFN-R-II-Expression auf CD3+ Zellen.
x-GeoMean = 18,7

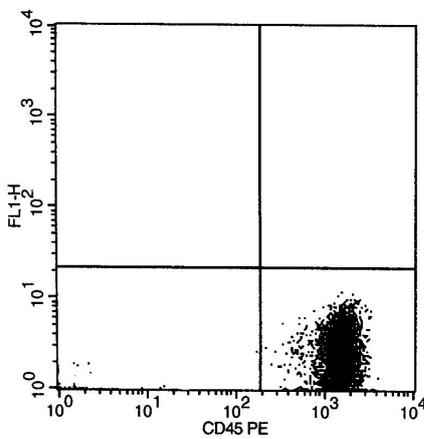


Abb.3.13: Positivkontrolle (bei der Rfi-Berechnung definiert als Wert 1000)
x-GeoMean = 1469,7

RFI-BERECHNUNG LAUT FORMEL:

$$\text{Rfi} = \frac{18,7 - 3,0}{1469,7 - 3,0} \times 1000$$

$$\text{Rfi} = 10,7$$

3.4.3 Intrazelluläre Markierung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 in Lymphozyten des peripheren Blutes

An den Untersuchungstagen der Patientenstudie wurde außerdem ein intrazellulärer Zytokinnachweis mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei wurden die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 in CD3+Zellen sowie deren Subpopulationen CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen bestimmt.

Versuchsaufbau:

Stimulation und Fixation

Heparinblutproben wurden mit Zellkulturmedium auf 10^6 Zellen/ml verdünnt und jeweils 200 μ l in 12 x 75 mm Rundbodenröhrchen pipettiert. Zu den 200 μ l Blut-Medium-Gemisch wurden je 30 μ l der Stimulatoren-Gebrauchslösungen pipettiert und die Proben wurden im Anschluss über vier Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach einmaligem Waschen (250 g, 5 min) mit 2 ml PBS/1 % BSA, wurden die Zellen fixiert: während des Vortexens der Zellpellets wurden 0,5 ml der eiskalten Fixierlösung hinzugegeben und die Proben in dieser 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend folgten noch zwei Waschschritte mit 2 ml PBS/1 % BSA. Bis zur intrazellulären Färbung wurden die Zellpellets bei 4°C gelagert.

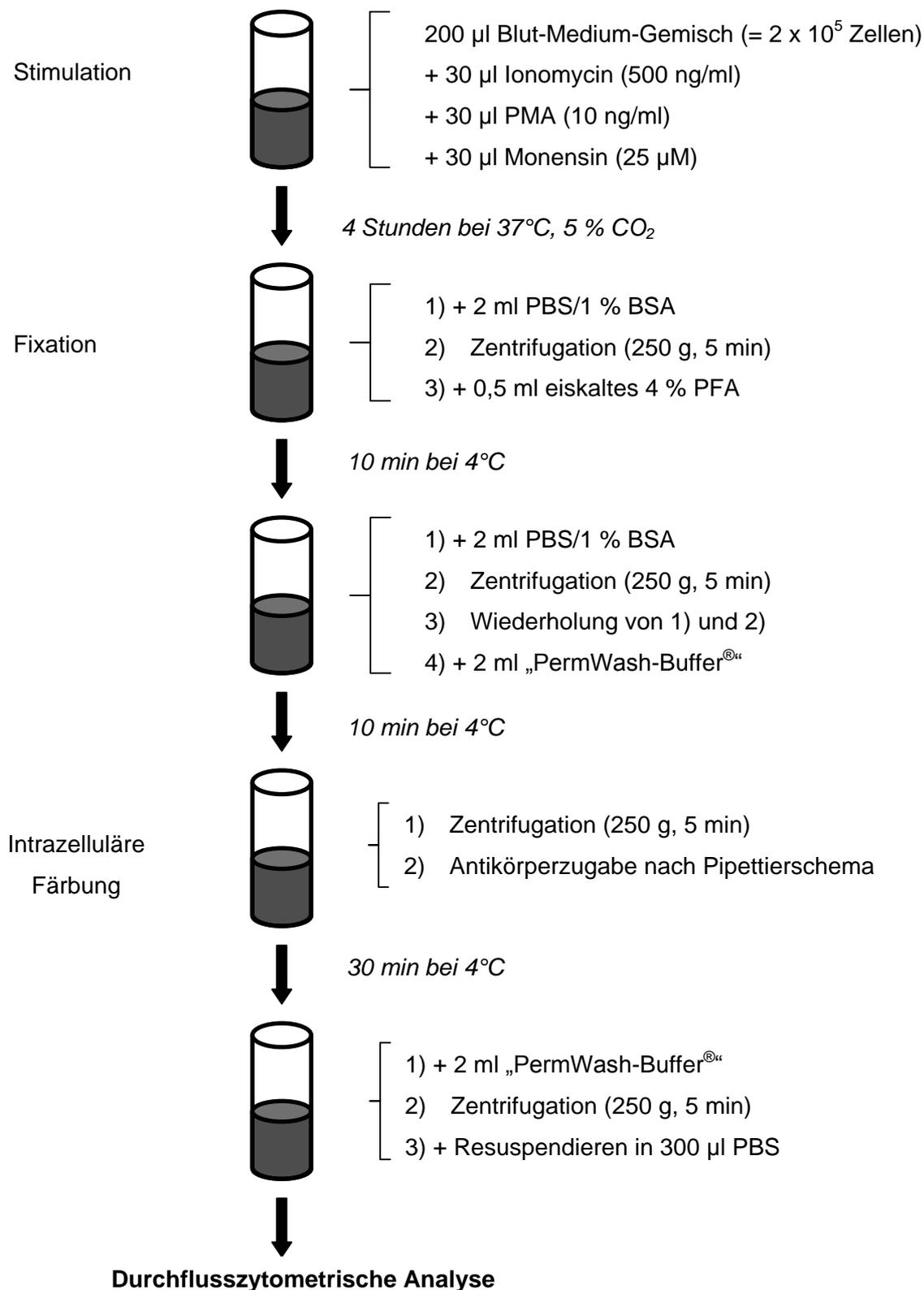
Intrazelluläre Färbung

Die so vorbereiteten Proben wurden zur Permeabilisierung für 10 min mit 2 ml „PermWash-Buffer[®]“ inkubiert. Nach Abzentrifugation des „PermWash-Buffer[®]“ (250 g, 5 min) wurden monoklonale Antikörper zur T-Zelltypisierung und zur Markierung der intrazellulären Zytokine (IFN- γ , IL-4 und IL-10) entsprechend dem Pipettierschema in Tabelle 3.3 hinzupipettiert. Die Proben inkubierten 30 min bei 4°C, bevor sie mit 2 ml „PermWash-Buffer[®]“ gewaschen wurden (250 g, 5 min). Die Zellpellets wurden in 300 μ l PBS resuspendiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Monoklonale Antikörper					
Ansatz-Nr.					
1	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE	100 µl iso-IFN-γ-Färbelösung	
2	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-PE	100 µl anti-IFN-γ-Färbelösung	
3	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-FITC	100 µl iso-IL-4-Färbelösung	
4	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-FITC	100 µl anti-IL-4-Färbelösung	
5	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-FITC	100 µl iso-IL-10-Färbelösung	
6	2,5 µl anti-CD3-PerCP	1 µl anti-CD4-APC	2,5 µl anti-CD8-FITC	100 µl IL-10-Färbelösung	

Tab.3.3: Pipettierschema zur T-Zelltypisierung und zur Markierung intrazellulärer Zytokine (IFN-γ, IL-4, und IL-10). Pro Patient und Untersuchungstag wurden die Ansätze 1-6 jeweils als Doppelansatz durchgeführt.

Abb.3.14: Flussdiagramm des entwickelten Methodenprotokolls zum Nachweis intrazellulärer Zytokine



3.4.4 Bestimmung der prozentualen Anteile der Zytokin-positiven-Lymphozyten(sub)populationen

Beim intrazellulären Zytokinnachweis wurde die prozentuale Anzahl IFN- γ -, IL-4- und IL-10-positiver-Zellen in CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen im peripheren Blut bestimmt. Dabei wurde jeweils unmittelbar vor der Messung der Zytokin-markierten-Blutproben eine Negativkontrolle gemessen, mit deren Hilfe die Quadrantensetzung (bzw. Grenzwert Negativ-/ Positivpopulation) vorgenommen wurde.

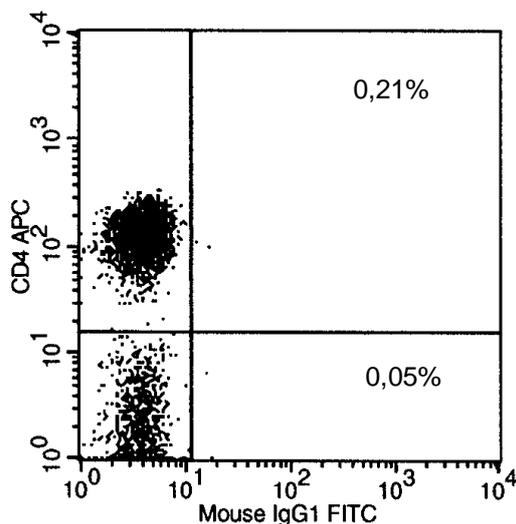


Abb.3.15: Isotypische Negativkontrolle für anti-IFN- γ -FITC, dargestellt bei CD4+Zellen.

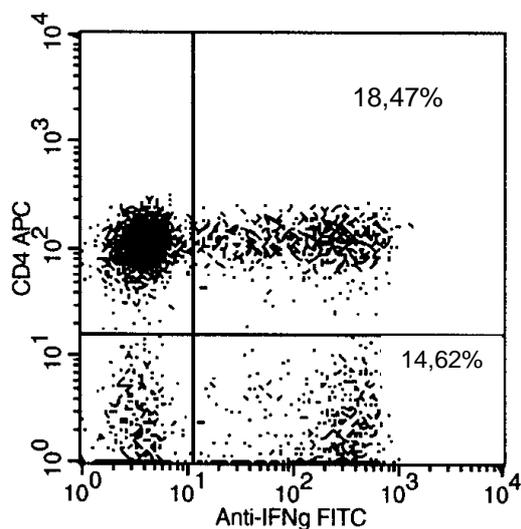


Abb.3.16: Anti-IFN- γ -FITC-markierte Blutprobe. Die prozentualen Anteile IFN- γ -positiver CD4+Zellen stellen sich im oberen rechten Quadranten dar

Auswertungsbeispiel (Abb.3.15 und 3.16):

1. Durchflusszytometrische Messung der isotypischen Negativkontrolle: im Beispiel dargestellt als Maus-IgG1-FITC in CD4+Zellen (Abb.3.15). Anhand dieser wurden dann die Quadranten gesetzt, um bei der darauffolgenden Messung der anti-IFN- γ -

Methoden

FITC-markierten Probe den Anteil der IFN- γ -positiven Zellen innerhalb der CD4+Population klar definieren zu können. Das Setzen der Quadranten erfolgte mit einer Positivanalyse $<0,5\%$, d.h. die Quadranten wurden so gesetzt, dass in den beiden rechten Quadranten zwischen $0,0\%$ und $0,5\%$ positive Zellen vorhanden waren. Eine Quadrantensetzung über $0,0\%$ ist erforderlich, um in der anschließenden Messung keine positiven Zellen zu verlieren.

2. Anschließend erfolgte die Messung der anti-IFN- γ -FITC-gefärbten Probe unter Beibehaltung der Quadranteneinstellungen der Negativkontrolle (Abb.3.16). Die IFN- γ -positiven Zellen innerhalb der CD4+Population stellten sich aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften (doppelt positiv im vorliegenden DotPlot) im oberen rechten Quadranten dar und mit Hilfe der Software konnte der prozentuale Anteil bestimmt werden.

Dieses Auswerteverfahren wurde bei allen untersuchten Zellpopulationen und Zytokinen angewandt.

3.5 Überwachung des Durchflusszytometers

Die regelmäßige Überwachung des Durchflusszytometers erfolgte mit Kalibrierungspartikeln. Dabei handelte es sich um fluoreszierende Latexpartikel definierter Größe („CaliBrite Beads[®]“, Becton Dickinson, Heidelberg). Die ermittelten Messwerte, d.h. die Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der Beads, wurden protokolliert, so dass Abweichungen in der Geräte- bzw. Laserstabilität vorzeitig erfassbar waren. Bei Messwerten außerhalb der vom Hersteller definierten Grenzwerte wurden keine Daten erhoben.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen in dieser Studie wurden unter Verwendung der Statistikprogramme Statistica® für Windows Version 4.3 und SPSS® für Windows Version 6.0.1 durchgeführt. Zur Datenbeschreibung wurden der Stichprobenumfang (n), der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) angegeben.

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

$$V = \frac{SD}{MW} \times 100$$

Für die im Rahmen der Patientenstudie durchgeführten Homogenitätsprüfungen wurden verwendet:

1. der Chi²-Test (Ermittlung des Gruppenunterschieds des relativen Frauen-/Männeranteils)
2. der t-Test für unabhängige Gruppen (Homogenitätsprüfung der demographischen und experimentell erhobenen Daten zwischen zwei verschiedenen Gruppen) sowie
3. mehrdimensionale nicht-parametrische Varianzanalysen (MANOVA) (Homogenitätsprüfung der demographischen und experimentell erhobenen Daten zwischen mehr als zwei verschiedenen Gruppen).

Zur Verlaufsbetrachtung der Patientenstudie (Longitudinalstudie) wurden für die Ermittlung statistischer Differenzen nicht-parametrische mehrdimensionale Varianzanalysen (MANOVA) durchgeführt. Mit dieser statistischen Methode war die Möglichkeit gegeben, mehrere Variable im Zusammenhang zu beurteilen. Auf diese Weise konnten Messzeitpunkt- und Gruppeneffekte bestimmt werden. Das Signifikanzniveau wurde mittels der im Rahmen eines „Least-Significant-Differences-(LSD)Test“ durchgeführten post-hoc-Vergleiche errechnet.

Methoden

Folgende Bezeichnungen wurden für die Benennung der Signifikanzen verwendet:

$p \leq 0,01$ hoch signifikant

$p \leq 0,05$ signifikant

$p > 0,05$ nicht signifikant

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des intrazellulären Zytokinnachweises mittels Durchflusszytometrie

Mit den von SANDER ET AL. (1991) und PRUSSIN UND METCALFE (1995) beschriebenen Methoden des intrazellulären Zytokinnachweises mittels Durchflusszytometrie waren grundsätzlich die Voraussetzungen zur Etablierung dieser Technik für den Nachweis der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 in T-Zellen gegeben. Basierend auf den Grundsätzen dieser beiden Methoden wurden im Rahmen von Stimulationsassays die optimalen Stimulationsbedingungen unter den gegebenen Laborbedingungen des Neurochemischen Labors der Neurologischen Klinik der JLU-Gießen ermittelt und die angewandte Methode entsprechend modifiziert.

4.1.1 Stimulatorenkonzentration

Zur Ermittlung der optimalen Stimulatorenkonzentrationen wurden in der Versuchsreihe Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden untersucht. Die Blutproben wurden mit jeder möglichen Kombination der eingesetzten Konzentrationen von Ionomycin (1000; 500; 375; 250 ng/ml), PMA (50; 20; 10; 5; 1 ng/ml) und Monensin (25; 12,5; 6,75 μ M) über vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Die stimulierten Proben wurden mit monoklonalen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt. Die beiden verwendeten Antikörper waren spezifisch für den Aktivierungsmarker CD69 sowie das T-Zell-Differenzierungsantigen CD3. Zum Vergleich wurden unstimulierte Proben mitgeführt.

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung der Versuchsreihe wurden zum einen der Aktivierungsgrad der CD3+Zellen (I.) und zum anderen auftretende Veränderungen der Zellmorphologie sowie Zellverluste (II.) berücksichtigt.

Ergebnisse

I.) Die *Bestimmung des Aktivierungsgrades* der CD3+Zellen erfolgte unter Verwendung des Aktivierungsmarkers CD69. Dabei wurde der prozentuale Anteil CD69+Zellen an der Gesamtzahl der CD3+Zellen errechnet. Um vergleichbare Bedingungen bei der Methodenanwendung für verschiedene Untersuchungstage und Patienten zu erhalten, wurde ein hoher Aktivierungsgrad (>90 % CD69+CD3+Zellen) angestrebt. Aus diesem Grund wurde bei den Stimulationsassays folgende Einteilung vorgenommen:

1. <75 % CD69+CD3+Zellen
2. 75-90 % CD69+CD3+Zellen
3. >90 % CD69+CD3+Zellen.

II) Neben dem Aktivierungsgrad wurde berücksichtigt, inwieweit es durch die Stimulation zu *Veränderungen der Zellmorphologie* oder auch *Zellverlusten* kam. Diese beiden Kriterien wurden mit Hilfe der durchflusszytometrischen Darstellung der Lymphozyten im FSC/-SSC-DotPlot beurteilt. Zum Vergleich wurden Lymphozyten aus unstimulierten Blutproben analysiert. Je nach Veränderung erfolgte eine Differenzierung in *gering* und *hoch*. *Geringe* Veränderungen lagen vor, wenn die Punktwolkendarstellung im FSC/-SSC-DotPlot der Lymphozytenpopulation in stimulierten Blutproben eine klar abgrenzbare und ansprechbare Zellpopulation darstellte und wenn weniger als 20 % Zellverluste vorlagen. Darüber liegende Abweichungen, wie zum Beispiel eine in der Punktwolkendarstellung des FSC/-SSC-DotPlot nicht deutlich erkennbare Lymphozytenpopulation, wurde als *hoch* definiert.

Die vollständigen Datensätze des angewandten Auswerteschemas dieser Versuchsreihe sind im Anhang in den Tabellen 9.1 und 9.2 wiedergegeben.

Bei der Auswertung der Versuche unter den geschilderten Gesichtspunkten zeigte sich, dass die niedrigeren Stimulatorenkonzentrationen im allgemeinen zu keinen bis geringen Zellverlusten oder Veränderungen der Zellmorphologie führten. Dagegen lag der Aktivierungsgrad der CD3+Zellen in der Mehrzahl der Fälle unter 90 %. Das umgekehrte Bild ergab sich bei den höheren Konzentrationen der Stimulatoren: ansteigende Stimulatorenkonzentrationen korrelierten positiv mit der CD69-

Ergebnisse

Expression auf CD3+Zellen, aber auch positiv mit Zellverlusten. Zudem waren bei den hohen Stimulatorenkonzentrationen vermehrt Veränderungen der charakteristischen Zellmorphologie zu beobachten.

Die effektivste Stimulation von CD3+Zellen des peripheren Blutes ließ sich für die Kombination aus 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin ermitteln. In diesem Versuchansatz wurden über 90 % an CD69+CD3+Zellen bei nur geringen Zellverlusten und geringer Veränderung der Zellmorphologie festgestellt.

4.1.2 Stimulationsdauer

Zur Bestimmung der effektivsten Stimulationsdauer wurden heparinisierte Blutproben von zehn gesunden Probanden mit den zuvor (Kap.4.1.1) als optimal ermittelten Stimulatorenkonzentrationen 3, 4, 5 oder 24 Stunden stimuliert. Nach Stimulation der Blutproben, Zugabe von Fixierlösung und Inkubation in „PermWash-Buffer®“ erfolgte eine intrazelluläre Markierung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Im selben Arbeitsschritt wurde auch ein anti-CD3-Antikörper für die spätere T-Zelltypisierung hinzugegeben. Bei der durchflusszytometrischen Auswertung wurden die prozentualen Anteile IFN- γ -, IL-4- bzw. IL-10-positiver-Zellen innerhalb der CD3+Zellpopulation bestimmt.

Zur Kontrolle und Darstellung der spontanen Zytokinproduktion von peripheren Blutlymphozyten wurden zudem unstimulierte Zellen untersucht.

Abhängig vom untersuchten Zytokin konnte die höchste Anzahl Zytokin-positiver-CD3+Zellen nach unterschiedlich langen Stimulationszeiten beobachtet werden. Für IFN- γ wurden mit $32,6 \pm 16,8$ % (MW \pm SD) die meisten IFN- γ -exprimierenden-CD3+Zellen nach 24-stündiger Stimulation nachgewiesen. Die ermittelten prozentualen Werte an den anderen drei Untersuchungszeitpunkten waren hoch signifikant niedriger ($p < 0,01$), zeigten aber untereinander nur geringe Unterschiede ($18,7 \pm 6,0$ % nach dreistündiger; $20,2 \pm 7,7$ % nach vierstündiger und $20,5 \pm 8,5$ % nach fünfstündiger Stimulation) (Abb.4.1).

Ergebnisse

Die Maximalwerte IL-4- sowie IL-10-positiver CD3+Zellen wurden nach einer Stimulationszeit von vier Stunden erreicht: $1,3 \pm 0,6$ % bzw. $0,6 \pm 0,4$ %. Nach 24-stündiger Stimulation glichen die prozentualen Anteile der IL-4- bzw. IL-10-positiven CD3+Zellen etwa denen der jeweiligen unstimulierten Zellen, d.h. hier war ein Stimulationseffekt nicht mehr nachweisbar (Abb.4.2 und Abb.4.3).

Da ein gemeinsames Protokoll für die drei zu untersuchenden Zytokine angewandt werden sollte, wurde die vierstündige Stimulationszeit als am effektivsten angesehen. So konnten auch die in geringerer Menge produzierten Interleukine detektiert werden.

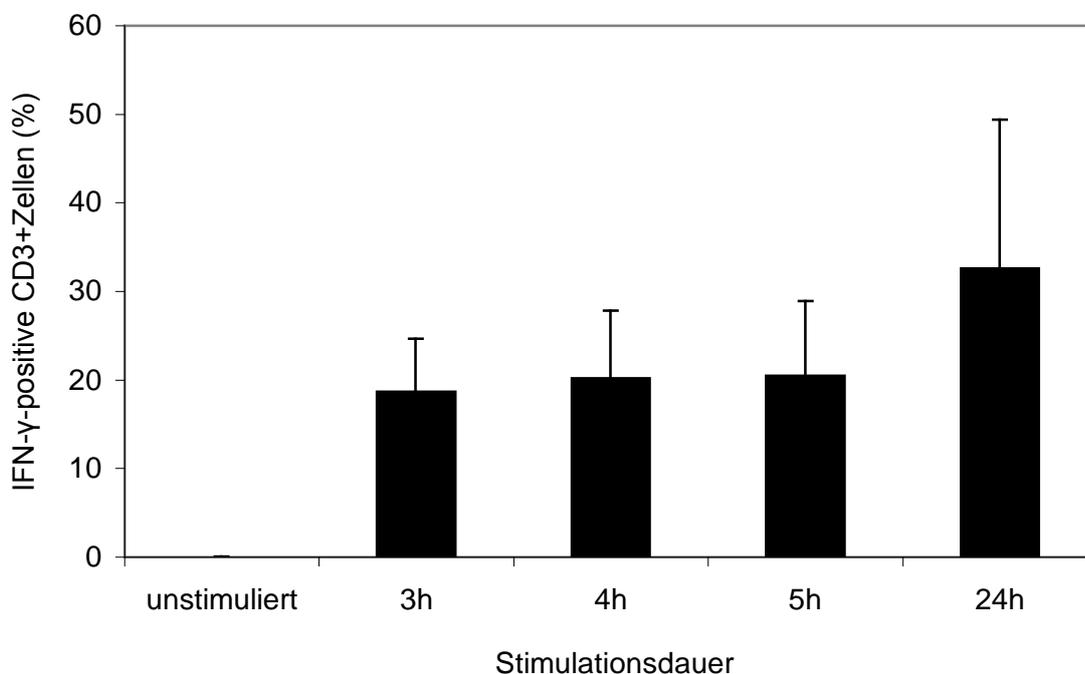


Abb.4.1: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Anzahl IFN- γ -positiver-CD3+Zellen.

Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden wurden 3, 4, 5 bzw. 24 Stunden mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin stimuliert. Nach Markierung von intrazellulärem IFN- γ mit monoklonalen Antikörpern wurde der prozentuale Anteil IFN- γ -positiver-T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert + SD von n=10.

Ergebnisse

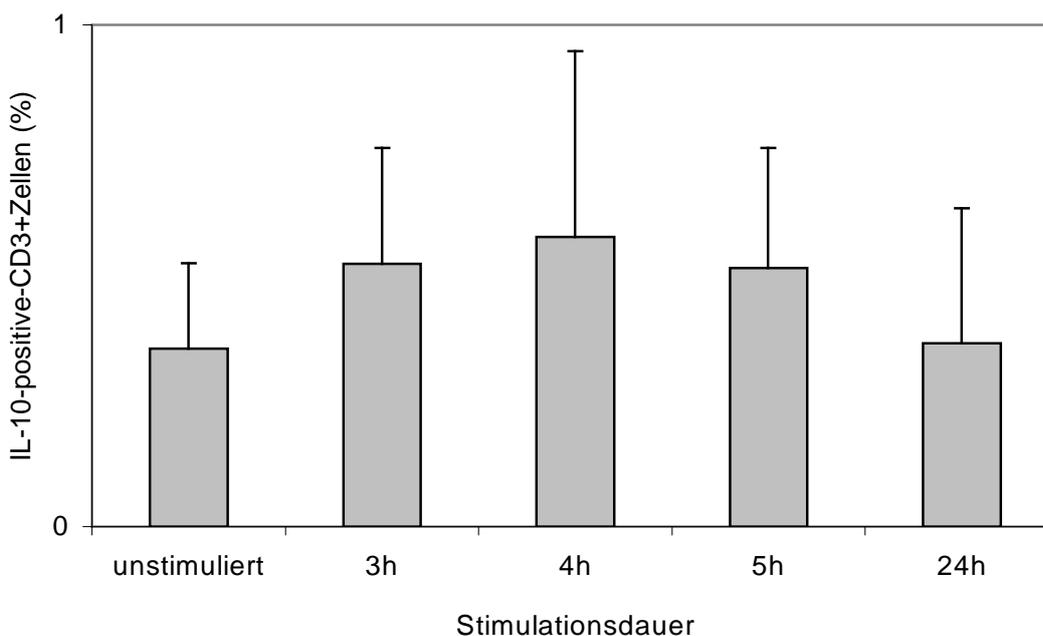
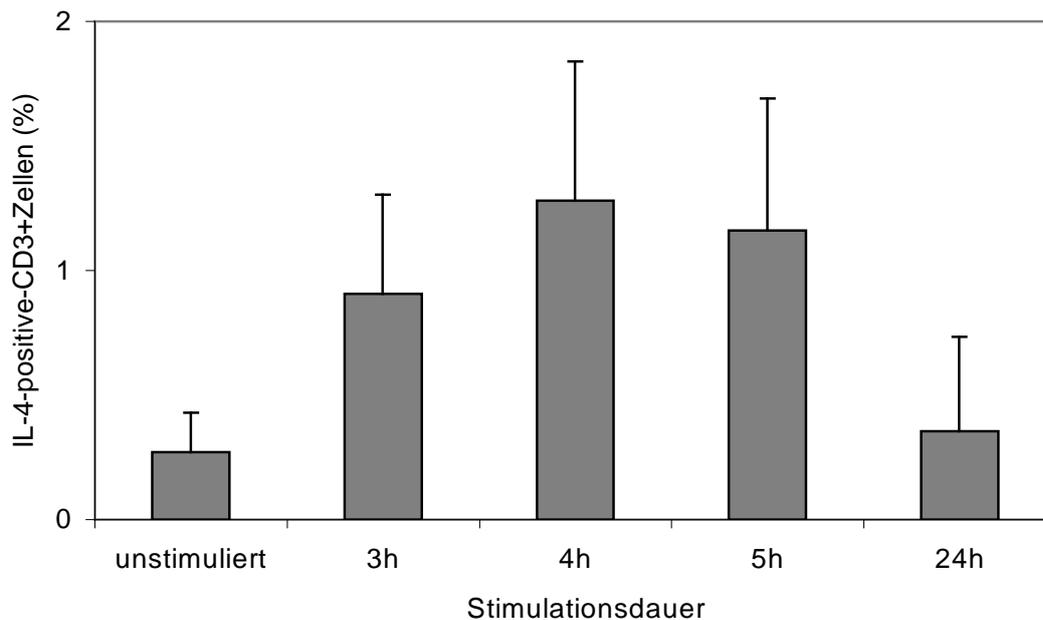


Abb.4.2-4.3: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Anzahl IL-4-positiver- (obere Abb.) bzw. IL-10-positiver-CD3+Zellen (untere Abb.). Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden wurden 3, 4, 5 bzw. 24 Stunden mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin stimuliert. Nach Markierung der intrazellulären Zytokine mit monoklonalen Antikörpern wurde der prozentuale Anteil an IL4- bzw. IL-10-positiven-CD3+Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert + SD von n=10.

4.1.3 Antikoagulans

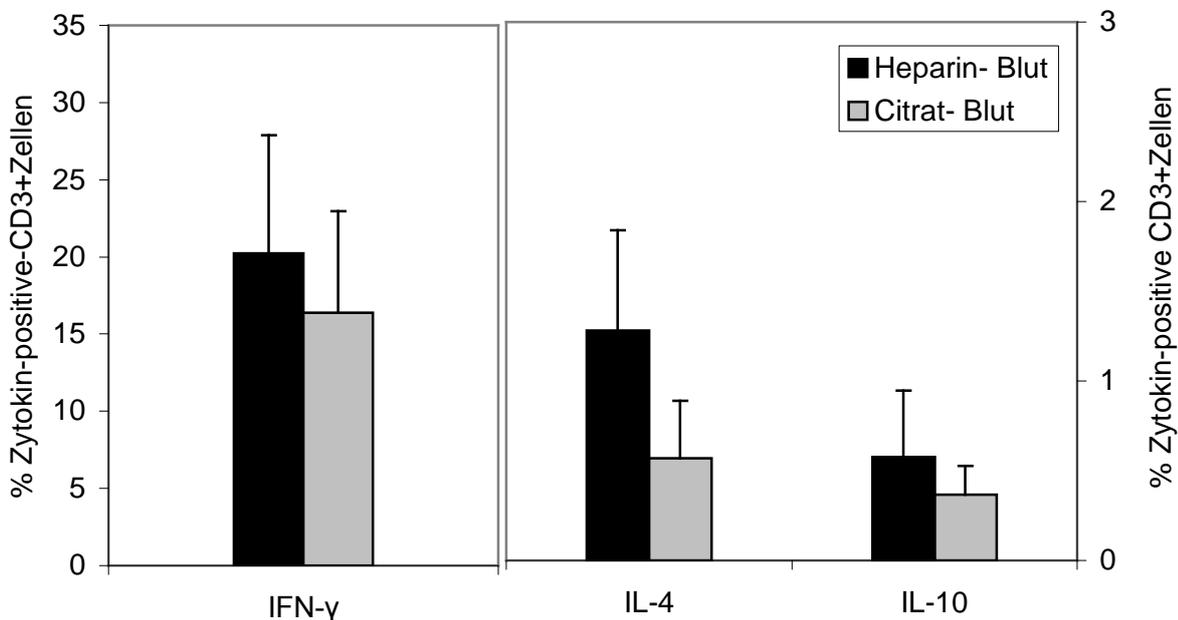


Abb.4.4: Einfluss des Antikoagulans (Heparin oder Citrat) auf die Anzahl Zytokin-positiver-CD3+Zellen. Heparin- und Citratblutproben von zehn gesunden Probanden wurden vier mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin stimuliert. Nach Markierung der intrazellulären Zytokine mit monoklonalen Antikörpern wurde jeweils der prozentuale Anteil IFN- γ -, IL4- bzw. IL-10-positiver-Zellen innerhalb der T-Lymphozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert + SD von n=10.

Für den intrazellulären Zytokinnachweis in Vollblut mittels Durchflusszytometrie werden Blutentnahmesysteme bzw. Blutproben benötigt, welche gerinnungshemmende Substanzen enthalten. Bei Blutkulturen wird im allgemeinen Heparin als Antikoagulans verwendet. Deshalb war es das Ziel der durchgeführten Untersuchung herauszufinden, inwieweit bei Verwendung eines anderen Antikoagulans (im vorliegenden Falle Citrat) ein Effekt auf die Anzahl der nachgewiesenen Zytokin-positiven-CD3+Zellen feststellbar ist. Dazu wurden Heparin- und Citrat-Blutproben von zehn gesunden Probanden vier Stunden mit 10

Ergebnisse

ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin stimuliert. Nach Stimulation der Blutproben, Zugabe von Fixierlösung und Inkubation in PermWash-Puffer erfolgte eine intrazelluläre Markierung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 mit Hilfe von monoklonalen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Im selben Arbeitsschritt wurde auch das CD3-Antigen mit einem monoklonalen Antikörper markiert. Bei der Auswertung wurde der durchflusszytometrisch ermittelte prozentuale Anteil IFN- γ -, IL-4- bzw. IL-10-positiver-CD3+Zellen in stimuliertem Citrat-Blut mit dem von stimuliertem Heparinblut verglichen.

Dabei zeigte sich, wie in der Abb.4.4 dargestellt, eine generell höhere Anzahl Zytokin-positiver-CD3+Zellen bei Verwendung von Heparinblut: Die prozentualen Anteile IFN- γ -positiver-CD3+Zellen betragen $20,2 \pm 7,7$ % (MW \pm SD) im Vergleich zu $16,4 \pm 6,6$ % in Citrat-Blut. Auch die Prozentwerte der IL-4- bzw. IL-10-positiven-CD3+Zellen waren in heparinisiertem Blut ($1,3 \pm 0,6$ % bzw. $0,6 \pm 0,4$ %) eindeutig höher als in Citrat-Blut ($0,6 \pm 0,3$ % bzw. $0,4 \pm 0,2$ %). Der Unterschied bei den IL-4-positiven-CD3+Zellen war hoch signifikant ($p < 0,01$).

4.1.4 Lagerungszeit

Ein ebenso wichtiger zu klärender Faktor für die spätere Anwendung der experimentellen Methode war die Lagerungszeit der Blutproben. Negative Einflüsse einer Lagerung nach der Blutentnahme auf die durchflusszytometrische Nachweisbarkeit der intrazellulären Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 mussten ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden nach der Blutentnahme unterschiedlich lange und bei verschiedenen Temperaturen gelagert und anschließend untersucht :

1. direkt nach der Blutentnahme
2. kurze Lagerung über drei Stunden bei RT
3. kurze Lagerung über drei Stunden bei 4°C
4. lange Lagerung über 24 Stunden bei RT
5. lange Lagerung über 24 Stunden bei 4°C

Nach Lagerung der Blutproben entsprechend Punkt 1-5 wurden sie für die durchflusszytometrische Analyse präpariert: die Proben wurden vier Stunden mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin, 25 μ M Monensin stimuliert, anschließend fixiert und permeabilisiert, bevor mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern eine Markierung des T-Zelldifferenzierungsantigens (CD3) sowie der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 vorgenommen wurde. Durchfluss-zytometrisch ausgewertet wurde jeweils der prozentuale Anteil IFN- γ -, IL-4- bzw. IL-10-positiver-CD3+Zellen. Die Anzahl an detektierten IFN- γ -positiven-CD3+Zellen in Blutproben, die nach dreistündiger Lagerung bei RT ($20,2 \pm 8,0$ % (MW \pm SD)) oder 4°C ($18,7 \pm 7,6$ %) verarbeitet und untersucht wurden, unterschied sich nicht von den ermittelten Werten in den direkt nach der Blutentnahme verarbeiteten Proben ($20,2 \pm 7,2$ %) (Abb.4.5). Das gleiche Ergebnis ergab die Untersuchung der IL-4- und IL-10-positiven-CD3+Zellen (Abb.4.6). Hoch signifikant mehr IFN- γ -positive-CD3+Zellen im Vergleich zu den drei eben genannten Untersuchungszeitpunkten waren bei den Blutproben nachzuweisen, die nach einen Zeitraum von 24 Stunden verarbeitet wurden. Diese

Ergebnisse

Beobachtung war für beide Lagerungstemperaturen feststellbar ($33,7 \pm 8,0$ % bei RT bzw. $37,9 \pm 8,8$ % bei 4°C ; $p < 0,01$) (Abb.4.5). Die Auswertung der prozentualen Anteile IL-10-positiver-CD3+Zellen zeigte, dass bei Verarbeitung der Blutproben nach 24-stündiger Lagerung (sowohl bei RT als auch bei 4°C) die ermittelten Werte niedriger als zu den drei anderen Lagerungsbedingungen waren. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (Abb.4.6).

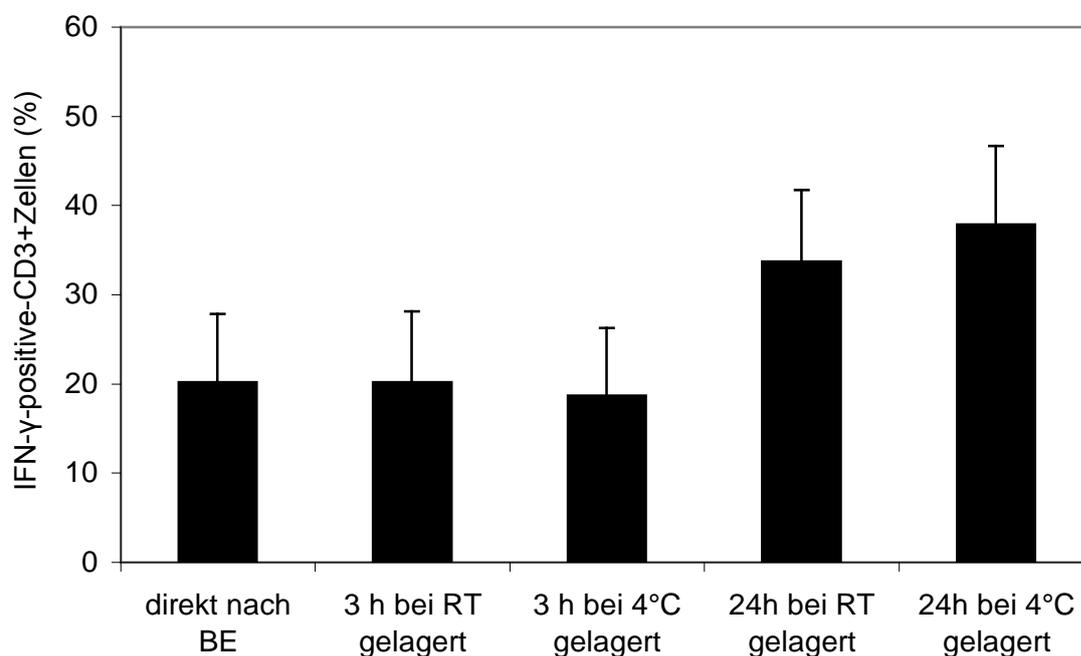


Abb.4.5: Einfluss der Lagerung auf die Anzahl IFN- γ -positiver-CD3+Zellen. Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden wurden vier Stunden mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μM Monensin nach verschiedenen Lagerungszeiten stimuliert :1.) direkt nach der Blutentnahme, 2.) nach 3-stündiger Lagerung bei RT, 3.) nach 3-stündiger Lagerung bei 4°C , 4.) nach 24-stündiger Lagerung bei RT und 5.) nach 24-stündiger Lagerung bei 4°C . Nach Markierung der intrazellulären Zytokine mit monoklonalen Antikörpern wurde der prozentuale Anteil IFN- γ -positiver-Zellen innerhalb der T-Lymphozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert + SD von $n=10$.

Ergebnisse

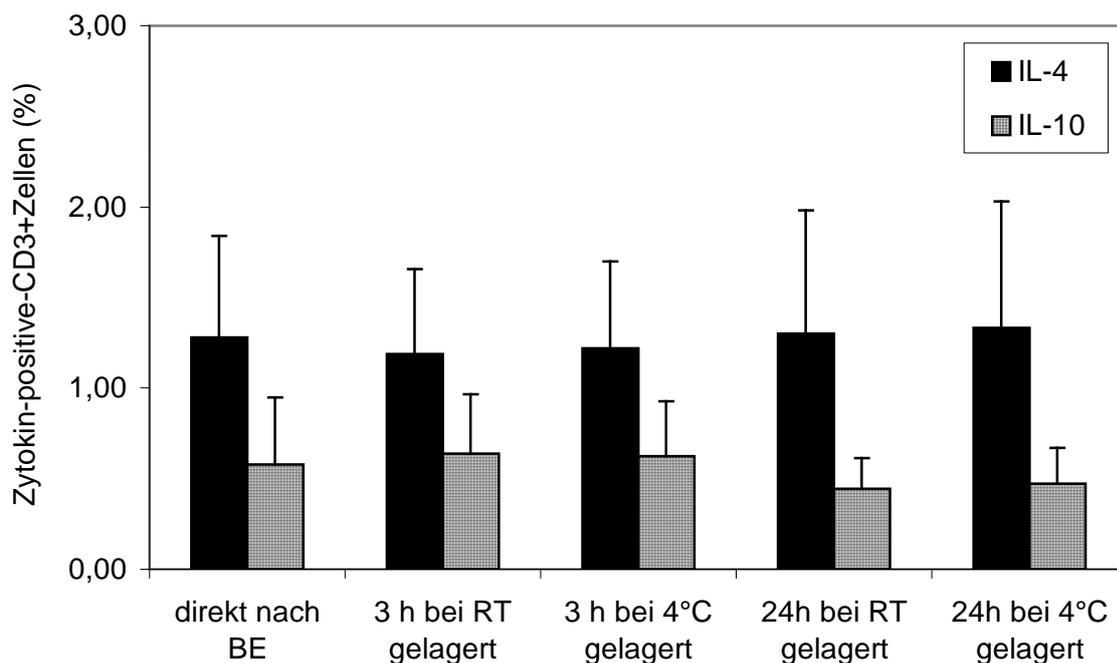


Abb.4.6: Einfluss der Lagerung auf die Anzahl IL-4- und IL-10-positiver-CD3+Zellen.

Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden wurden vier Stunden mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 µM Monensin nach verschiedenen Lagerungszeiten stimuliert :1.) direkt nach der Blutentnahme, 2.) nach dreistündiger Lagerung bei RT, 3.) nach dreistündiger Lagerung bei 4°C, 4.) nach 24-stündiger Lagerung bei RT und 5.) nach 24-stündiger Lagerung bei 4°C. Nach Markierung der intrazellulären Zytokine mit monoklonalen Antikörpern wurde der prozentuale Anteil IL-4- und IL-10-positiver-Zellen innerhalb der T-Lymphozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert + SD von n=10.

4.2 Etablierung des durchflusszytometrischen Nachweises der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R

Neben der in Kap.4.1 beschriebenen Etablierung des intrazellulären Zytokinnachweis in T-Zellen sollte auch der durchflusszytometrische Nachweis der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R auf Leukozyten des peripheren Blutes etabliert werden. Da der durchflusszytometrische Nachweis der Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R auf humanen Leukozyten bisher selten beschrieben wurde, wurde mit Hilfe der durchgeführten Versuche untersucht, ob Unterschiede in der Expression der Rezeptoren zwischen unstimulierten und stimulierten Leukozyten bestehen.

In zwei parallel durchgeführten Versuchsansätzen wurden Heparinblutproben von zehn gesunden Probanden untersucht: im ersten Ansatz wurden die Blutproben vier Stunden mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin stimuliert (im folgenden als stimulierte Proben bezeichnet) und im zweiten Ansatz wurde mit unstimulierten Blutproben gearbeitet. Auf den unstimulierten und stimulierten Proben erfolgte eine Markierung der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R sowie des Leukozyten-Typisierungs-Antigens (CD45) mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt. Dabei handelte es sich um Antikörper mit dem gleichen Isotypenaufbau (z.B. Maus-IgG1 im Falle des IFN-R-II-Antikörpers) und der gleichen Fluoreszenzmarkierung wie der entsprechende Antikörper des untersuchten Parameters (z.B. PE-konjugiert beim IFN-R-II-Antikörper), aber mit einer anderen Spezifität. Auf diese Weise war es möglich, unspezifische Bindungen von spezifischen abzugrenzen und Positivpopulationen genau zu definieren. Mittels des Durchflusszytometers bzw. den gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde die membranständige Expression des IFN-R-II und des IL-4R auf der gesamten CD45+Zellpopulation quantitativ bestimmt. Dabei wurden zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen die relativen Fluoreszenzintensitäten (Rfi) anhand der in Kap.3.4.2 beschriebenen Formel errechnet und für die weitere Auswertung verwendet.

Ergebnisse

In den unstimulierten Blutproben gelang eine spezifische Markierung des IFN-R-II und des IL-4R auf CD45+Zellen. Dies belegten die deutlich höheren Rfi-Werte der anti-IFN-R-II- bzw. anti-IL-4R-markierten-CD45+Zellen im Vergleich zu ihren jeweiligen Negativkontrollen (Tab.4.1).

Auf den stimulierten Blutproben konnte keine eindeutige Zunahme der Rfi-Werte für die anti-IFN-R-II- bzw. anti-IL-4R-markierten-CD45+Zellen im Vergleich mit den Negativkontrollen festgestellt werden. Die Rfi-Werte in Tabelle 4.3 zeigen zudem, dass die Messergebnisse der stimulierten Leukozyten den Rfi-Werten der Negativkontrollen auf unstimulierten Leukozyten ähnelten und in Folge dessen auf eine nicht erfolgte spezifische Bindung der Zytokinrezeptoren-Antikörper deuten.

	Relative Fluoreszenzintensität (Rfi)
1) Negativkontrolle von 2)	3,3
2) IFN-R-II-Expression auf <i>unstimulierten</i> CD45+Zellen	106,7
3) Negativkontrolle von 4)	2,2
4) IL-4R-II-Expression auf <i>unstimulierten</i> CD45+Zellen	19,9
5) Negativkontrolle von 6)	3,1
6) IFN-R-II-Expression auf <i>stimulierten</i> CD45+Zellen	4,1
7) Negativkontrolle von 8)	2,9
8) IL-4R-II-Expression auf <i>stimulierten</i> CD45+Zellen	3,5

Tab.4.1: Vergleich der IFN-R-II- und IL-4R-Expression auf stimulierten und unstimulierten Leukozyten. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der relativen Fluoreszenzintensität (Rfi) von n=10.

4.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

4.3.1 Positivkontrollzellen

In der Etablierungsphase des intrazellulären Zytokinnachweises mittels Durchflusszytometrie musste verifiziert werden, ob es sich bei den mit der entwickelten Methode erhobenen Messdaten wirklich um Zytokin-positive-Zellen handelte oder ob nur unspezifische Bindungen bzw. Autofluoreszenzen der Zellen (sog. Hintergrundrauschen) erfasst wurden. Mit Hilfe von Positivkontrollzellen der Firma Pharmingen war dieser Nachweis einer Bindung des anti-Zytokin-Antikörpers mit dem spezifischen Antigen möglich. Bei den verwendeten Positivkontrollzellen (sog. „HICK-Zellen“, *human intracellular cytokine positive control cells*) handelte es sich um aktivierte und fixierte humane Leukozyten, welche definierte Zytokinmuster aufwiesen. In der vorliegenden Studie wurden „HICK1-Positive-Control-Cells“ (u.a. positiv für IFN- γ) und „HICK2-Positive-Control-Cells“ (u.a. positiv für IL-4 und IL-10) eingesetzt.

Heparinblutproben von fünf gesunden Probanden wurden anhand des entwickelten Methodenprotokolls (Kap.3.4.3) durchflusszytometrisch auf den Anteil IFN- γ -, IL-4- und IL-10-positiver-CD3+Zellen untersucht. Zum direkten Vergleich wurden die Kontrollzellen nach derselben Methode wie die Probandenblutproben permeabilisiert, mit denselben monoklonalen Antikörpern inkubiert und anschließend nach dem gleichen Protokoll durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abb.4.10-4.13 am Beispiel des intrazellulären IFN- γ -Nachweises erkennbar, zeigten die Untersuchungen der Kontrollzellen und der Probandenblutproben vergleichbare Ergebnisse. Dabei konnten zwei wesentliche Feststellungen getroffen werden:

1. Sowohl bei den „HICK1-Positive-Control-Cells“ als auch bei den Probandenblutproben war ein deutlicher Unterschied zwischen den mit isotypischen Antikörper (Negativkontrolle) und den mit anti-IFN- γ -FITC-markierten Proben zu beobachten. Während sich bei letzteren die IFN- γ -positiven-CD3+Zellen als klar definierbare Population im Zweifarben-DotPlot darstellten (oberer rechter Quadrant in

Ergebnisse

den Abbildungen 4.11 und 4.13), waren bei den Negativkontrollen nur vereinzelte Zellen (<1 %) im oberen rechten Quadranten erkennbar (Abb.4.10 und 4.12).

2. In beiden Fällen stellten sich die IFN- γ -positiven-Zellen im Zweifarben-DotPlot ähnlich dar, nämlich als relativ gestreute („kometenschweifartige“), aber klar abgrenzbare Population (Abb.4.11 und 4.13).

Die in Punkt 1 und 2 gemachten Beobachtungen waren auch beim Vergleich der IL-4- und IL-10-markierten Probandenblutproben und Kontrollzellen („HICK2-Positive-Control-Cells“) festzustellen. Dabei waren, verglichen mit den Messungen der IFN- γ -positiven-CD3+Zellen, für diese beiden Parameter generell geringere Anzahlen an IL4- bzw. IL-10-positiven-CD3+Zellen im Durchflusszytometer detektierbar.

Zur Kontrolle der Methodik des durchflusszytometrischen Nachweises der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R waren keine Positivzellen erhältlich.

Ergebnisse

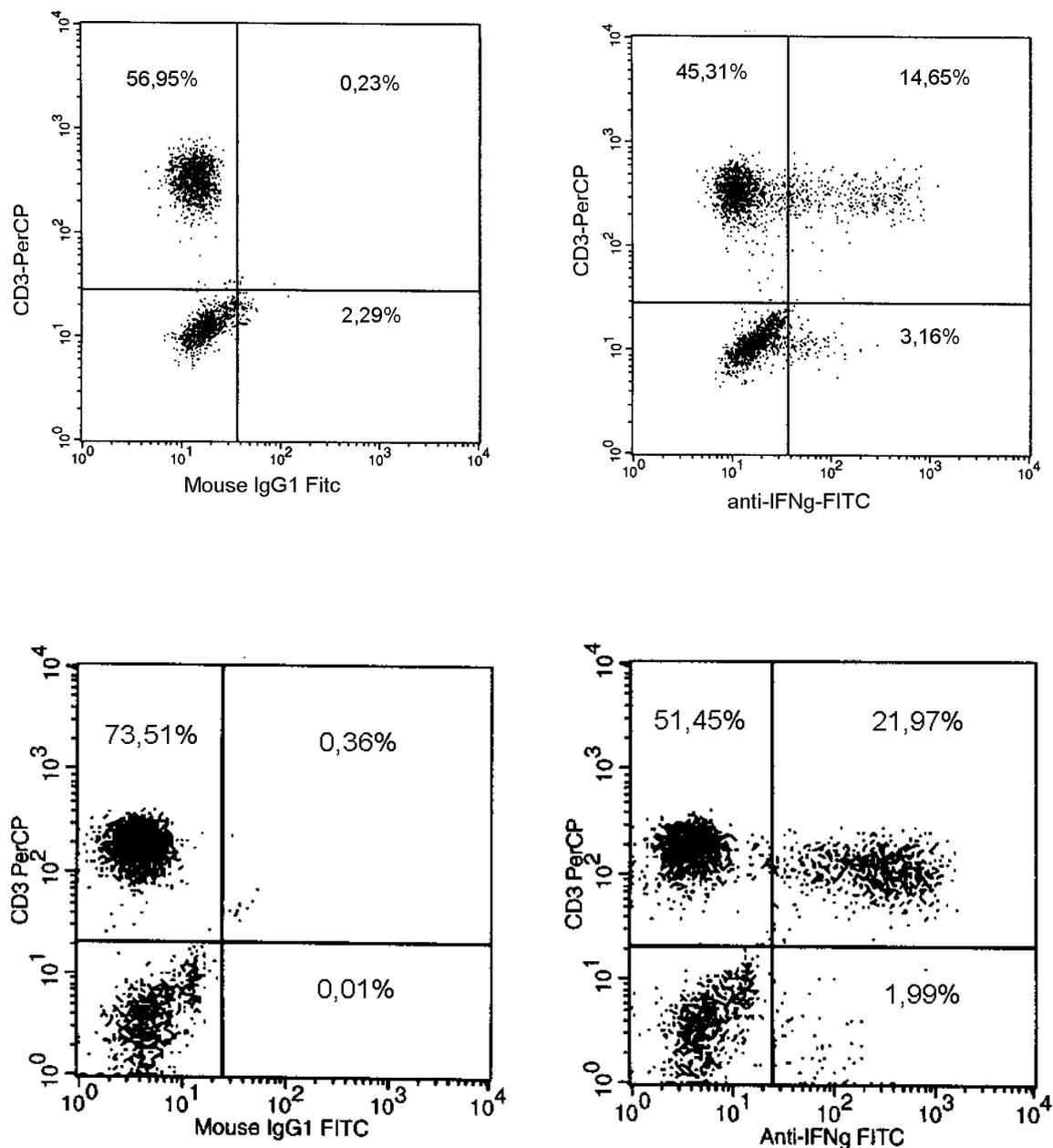


Abb.4.10-13: Durchflusszytometrischer Nachweis von intrazellulärem IFN- γ in Positivkontrollzellen (obere Abb.) und in Probandenblut (untere Abb.). Die beiden rechten Abbildungen zeigen die mit anti-IFN- γ -FITC-markierten Proben und in den linken Abbildungen sind die dazugehörigen Negativkontrollen dargestellt. Im Zweifarben-DotPlot stellen sich die IFN- γ -positiven-CD3⁺Zellen „kometenschweifartig“ dar (oberer rechter Quadrant in den rechten Abbildungen).

4.3.2 Intra-Sample-, Intra- und Inter-Assay-Präzision

Die Reproduzierbarkeit des durchflusszytometrischen Nachweises der intrazellulären Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 und der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R wurde des weiteren anhand der *Intra-Sample-* (Varianz zwischen mehrfachen Messungen der gleichen Probe), *Intra-Assay-* (Varianz innerhalb eines Versuchsansatzes) und *Inter-Assay-Präzision* (Varianz zwischen unabhängigen Versuchsansätzen) getestet. Die drei Präzisionen wurden für alle Parameter (Tab.4.2-4.4), die in der Patientenstudie durchflusszytometrisch untersucht werden sollten, bestimmt. Dabei wurden Heparinblutproben von acht gesunden Probanden untersucht. Die Datenauswertung erfolgte anhand des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung sowie dem Quotienten dieser beiden Werte, dem sogenannten Variationskoeffizienten. Um von einer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sprechen, sollte der Variationskoeffizient unter 20 % liegen (AUSTIN UND MCINTOSH, 2000; NOMURA ET AL., 2000).

Zur Bestimmung der *Intra-Sample-Präzision* wurden die einzelnen Versuchsansätze wiederholt (dreimal) im Durchflusszytometer gemessen. Die erhobenen Daten der Versuchsreihe wiesen darauf hin, dass die Varianz zwischen wiederholten Messungen der gleichen Probe begrenzt war. Dies verdeutlichte die statistische Auswertung: die ermittelten Variationskoeffizienten aller untersuchten Parameter lagen unter 10 % (Tab.4.2).

Mittels eines Dreifachansatzes aller zu untersuchenden Parameter wurde die *Intra-Assay-Präzision* bestimmt. Wie in Tab.4.3 dargestellt, wurden bei der statistischen Auswertung in der Mehrzahl Variationskoeffizienten unter 10 % ermittelt. Die etwas höheren Variationskoeffizienten einiger IL-4- und IL-10-positiven-T-Zellpopulationen lagen noch unter der vorgegebenen 20 %-Grenze.

Zur Bestimmung der *Inter-Assay-Präzision* wurde die schon für die *Intra-Assay-Präzision* analysierten Blutproben noch in zwei weiteren, zeitlich unabhängigen, Experimenten untersucht. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte der Einfluss der experimentellen Technik auf die Varianz der Messergebnisse ermittelt werden. Die errechneten Variationskoeffizienten waren deutlich höher im Vergleich zu denen der

Ergebnisse

beiden vorher beschriebenen Präzisionen. Zudem wurden bei der Auswertung der IL-10-positiven-Zellen für alle untersuchten Zellpopulationen Variationskoeffizienten über 20 % ermittelt (Tab.4.4).

Intra-Sample-Präzision			
	MW	SD	VK (%)
1) IFN-R-II auf CD3+Zellen (Rfi)	7,1	0,2	2,3
2) IFN-R-II auf CD3+CD4+Zellen (Rfi)	7,6	0,1	1,6
3) IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen (Rfi)	5,9	0,2	2,9
4) IFN-R-II auf CD19+Zellen (Rfi)	69,8	2,2	3,2
5) IFN-R-II auf CD14+Zellen (Rfi)	21,4	0,7	3,0
6) IL-4R auf CD19+Zellen (Rfi)	9,8	0,2	2,3
7) IFN- γ in CD3+Zellen (%)	21,6	0,8	3,9
8) IFN- γ in CD3+CD4+Zellen (%)	15,4	0,7	7,7
9) IFN- γ in CD3+CD8+Zellen (%)	50,5	2,4	4,7
10) IL-4 in CD3+Zellen (%)	1,6	0,1	7,6
11) IL-4 in CD3+CD4+Zellen (%)	2,6	0,2	8,2
12) IL-4 in CD3+CD8+Zellen (%)	2,8	0,1	4,3
13) IL-10 in CD3+Zellen (%)	1,0	0,1	7,1
14) IL-10 in CD3+CD4+Zellen (%)	0,8	0,1	8,3
15) IL-10 in CD3+CD8+Zellen (%)	0,9	0,1	7,6

Tab.4.2: Varianz bei wiederholten Messungen der gleiche Probe (Intra-Sample-Präzision). Die Versuchsansätze 1-15 wurden jeweils dreimal im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) von n=8, sowie der daraus hervorgehende Variationskoeffizient (VK).

Ergebnisse

Intra-Assay-Präzision			
	MW	SD	VK (%)
1) IFN-R-II auf CD3+Zellen (Rfi)	8,9	0,3	3,3
2) IFN-R-II auf CD3+CD4+Zellen (Rfi)	9,3	0,4	4,0
3) IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen (Rfi)	7,8	0,7	9,4
4) IFN-R-II auf CD19+Zellen (Rfi)	73,7	3,3	4,5
5) IFN-R-II auf CD14+Zellen (Rfi)	20,3	1,4	6,9
6) IL-4R auf CD19+Zellen (Rfi)	11,1	0,8	6,8
7) IFN- γ in CD3+Zellen (%)	22,9	1,7	7,4
8) IFN- γ in CD3+CD4+Zellen (%)	15,1	1,1	7,4
9) IFN- γ in CD3+CD8+Zellen (%)	50,2	2,8	5,7
10) IL-4 in CD3+Zellen (%)	2,5	0,2	8,3
11) IL-4 in CD3+CD4+Zellen (%)	2,9	0,3	10,9
12) IL-4 in CD3+CD8+Zellen (%)	3,6	0,4	10,2
13) IL-10 in CD3+Zellen (%)	1,3	0,2	12,0
14) IL-10 in CD3+CD4+Zellen (%)	1,2	0,1	10,7
15) IL-10 in CD3+CD8+Zellen (%)	1,3	0,2	12,1

Tab.4.3: Varianz innerhalb eines Versuchsansatzes (Intra-Assay-Präzision). Die Versuchsansätze 1-15 wurden jeweils als Triplet angesetzt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) von n=8, sowie der daraus hervorgehende Variationskoeffizient (VK).

Ergebnisse

Inter-Assay-Präzision			
	MW	SD	VK (%)
1) IFN-R-II auf CD3+Zellen (Rfi)	9,1	0,8	8,5
2) IFN-R-II auf CD3+CD4+Zellen (Rfi)	10,4	0,8	7,5
3) IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen (Rfi)	6,9	0,7	10,4
4) IFN-R-II auf CD19+Zellen (Rfi)	71,5	5,2	7,3
5) IFN-R-II auf CD14+Zellen (Rfi)	20,0	1,8	9,0
6) IL-4R auf CD19+Zellen (Rfi)	9,3	0,7	7,8
7) IFN- γ in CD3+Zellen (%)	18,0	1,4	7,6
8) IFN- γ in CD3+CD4+Zellen (%)	11,6	1,2	10,7
9) IFN- γ in CD3+CD8+Zellen (%)	40,5	6,4	15,7
10) IL-4 in CD3+Zellen (%)	2,0	0,3	15,4
11) IL-4 in CD3+CD4+Zellen (%)	2,0	0,3	14,9
12) IL-4 in CD3+CD8+Zellen (%)	2,4	0,4	15,6
13) IL-10 in CD3+Zellen (%)	1,1	0,3	27,3
14) IL-10 in CD3+CD4+Zellen (%)	1,0	0,2	20,0
15) IL-10 in CD3+CD8+Zellen (%)	1,1	0,3	27,3

Tab.4.4: Varianz zwischen unabhängigen Versuchsansätzen (Inter-Assay-Präzision).

Triplets der Versuchsansätze 1-15 wurden an drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) von n=8, sowie der daraus hervorgehende Variationskoeffizient (VK).

4.4 Ergebnisse der Patientenstudie

Nach Etablierung der durchflusszytometrischen Nachweise der intrazellulären Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 sowie der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R in Leukozyten des peripheren Blutes wurden die beiden Methoden zur Untersuchung dieser immunologischen Parameter bei MS-Patienten und gesunden Probanden angewandt. Dabei wurde die Expression des membranständigen IFN-R-II auf CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen CD3+CD8+Zellen, CD19+Zellen und CD14+Zellen und die des membranständigen IL-4R auf CD19+Zellen des peripheren Blutes untersucht. Der intrazelluläre Nachweis von IFN- γ , IL-4 und IL-10 erfolgte in CD3+Zellen sowie den beiden Subpopulationen CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen.

Der Beobachtungszeitraum der vorliegenden Studie erstreckte sich über drei Monate. Die Blutentnahmen erfolgten bei den MS-Patienten im Rahmen der dreimonatigen ambulanten neurologischen Routineuntersuchung. Da in der Longitudinalstudie sowohl der spontane Verlauf der immunologischen Parameter als auch der Verlauf unter IFN- β -Therapie untersucht wurde, wurden innerhalb des MS-Patientenkollektivs folgende Gruppen unterschieden:

- 1) auf 3 x 22 μ g/ Woche bzw. 3 x 44 μ g/ Woche s.c. IFN- β -1a-(Rebif[®], Ares-Serono, Serono International SA) eingestellte MS-Patienten
- 2) auf 6,0 M.I.E./ Woche i.m. IFN- β -1a-(Avonex[®], Biogen Inc.) eingestellte MS-Patienten
- 3) auf 24,0 M.I.E./ Woche s.c. IFN- β -1b-(Betaferon[®], Schering AG) eingestellte MS-Patienten
- 4) untherapierte MS-Patienten

Ergebnisse

Im folgenden werden die Gruppen 1) - 3) als *IFN- β -1a[R]-*, *IFN- β -1a[A]-* und *IFN- β -1b-Gruppe* bezeichnet.

Die zu Behandlungsbeginn intensivere Betreuung der neu auf ein IFN- β -Präparat eingestellten Patienten (Beratung und Einweisung über das neue Medikament bzw. die Selbstapplikation, Erfassung evtl. Nebenwirkungen, etc.) ermöglichte bei der IFN- β -1a[R]-, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1b-Gruppe weitere Untersuchungen drei und sechs Wochen nach Therapiebeginn.

Dem Gesundenkollektiv wurde einmalig Blut abgenommen und untersucht.

4.4.1 Homogenitätsprüfungen

Aufgrund des offenen Studiendesigns war eine exakte Anpassung hinsichtlich Alter und Geschlecht zwischen den einzelnen Studienteilnehmergruppen nicht möglich. Die untersuchten MS-Patientengruppen unterschieden sich zudem in ihren erhobenen neurologischen Befunden (Erkrankungsdauer, Anzahl der Schübe, ermittelter EDSS-Score etc.). Zur Erfassung dieser zu Studienbeginn vorliegenden individuellen Unterschiede und Aufklärung eventueller Einflüsse auf die Expression der analysierten immunologischen Parameter wurden deshalb zuerst Strukturvergleiche der einzelnen Probandenkollektive durchgeführt. Dabei wurden einerseits die demographischen Daten und andererseits die durchflusszytometrisch ermittelten immunologischen Parameter im Rahmen einer Querschnittsstudie (zu Studienbeginn durchgeführt = Baselinecharakterisierung) verglichen.

Für die statistischen Analysen wurden verwendet

1. der Chi²-Test (Ermittlung des Gruppenunterschieds des relativen Frauen-/Männeranteils)
2. der t-Test für unabhängige Gruppen (Strukturvergleich der demographischen und experimentell erhobenen Daten zwischen zwei verschiedenen Gruppen)
3. mehrdimensionale nicht-parametrische Varianzanalysen (MANOVA) (Strukturvergleich der demographischen und experimentell erhobenen Daten zwischen mehr als zwei verschiedenen Gruppen).

Ergebnisse

Die Datenbeschreibung erfolgte anhand des arithmetischen Mittelwertes (MW) und der Standardabweichung (SD).

4.4.1.1 Strukturvergleich zwischen MS-Patienten und Gesunden

Demographische Daten

Die MS-Patienten und die gesunden Probanden unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf den relativen Frauen-/Männeranteil oder ihr durchschnittliches Alter zu Studienbeginn (Tab.4.5).

	MS-Patienten (n=58)	Gesunde (n=21)	p
Geschlecht			
Frauen	69 % (n=40)	57 % (n=12)	p < 0,29
Männer	31 % (n=18)	43 % (n=9)	p < 0,16
Alter			
MW ± SD	38,2 ± 11,2	34,5 ± 12,4	p < 0,22

Tab.4.5: Strukturvergleich der demographischen Daten zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standard-abweichung; p = Signifikanzniveau

Ergebnisse

Immunologische Parameter

Der Strukturvergleich der erhobenen immunologischen Parameter zeigte Unterschiede zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden auf. Bei den untersuchten MS-Patienten wurden zu Studienbeginn sowohl in CD3+Zellen ($1,1 \pm 0,5$ %) als auch in CD3+CD4+Zellen ($1,1 \pm 0,5$ %) hoch signifikant höhere prozentuale Anteile an IL-10-positiven Zellen als bei Gesunden (jeweils $0,8 \pm 0,5$ %) nachgewiesen. Eine genauere Betrachtung der Daten zeigte, dass diese Unterschiede zwischen Gesunden und RRMS-Patienten bestanden (Abb.4.12a). SPMS-Patienten wiesen hingegen im Vergleich zu Gesunden keine statistisch belegbaren Unterschiede in der Anzahl der IL-10-positiven T-Zellen auf.

RRMS-Patienten besaßen weiterhin signifikant mehr IFN- γ -positive CD3+CD4+Zellen im Vergleich zu den gesunden Probanden ($p < 0,02$; Abb.4.12b).

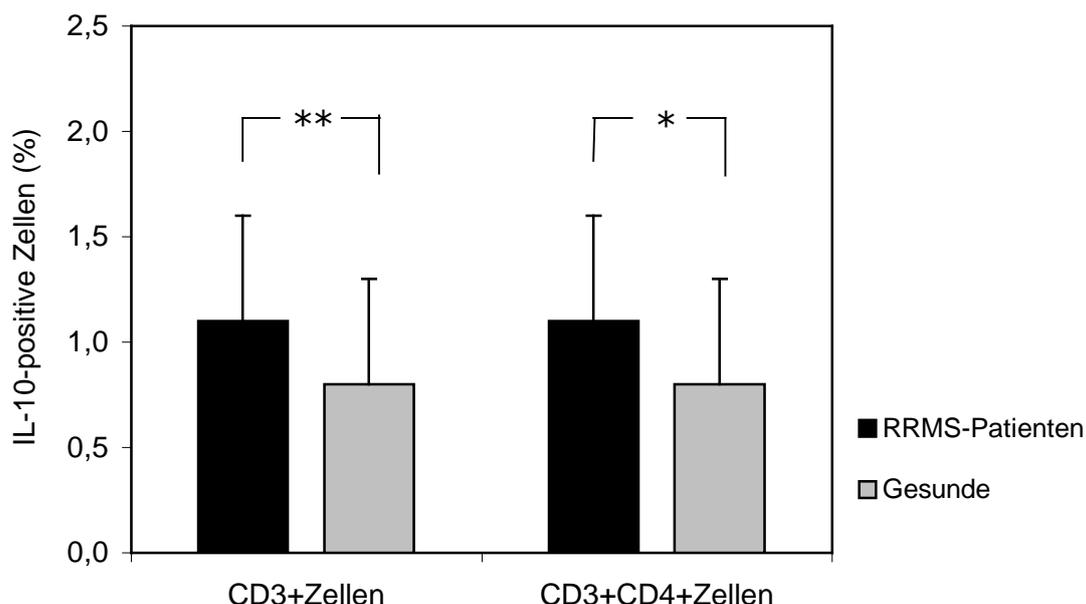


Abb.4.12a: Vergleich der Baseline der Anzahl IL-10-positiver CD3+Zellen und IL-10-positiver CD3+CD4+Zellen zwischen RRMS-Patienten und gesunden Probanden. Die Auswertung erfolgte anhand der prozentualen Anteile IL-10-positiver Zellen innerhalb der CD3+Zell- bzw. CD3+CD4+Zellpopulation. Die Ergebnisse wurden dargestellt als MW + SD. ** = hoch signifikant, * = signifikant

Ergebnisse

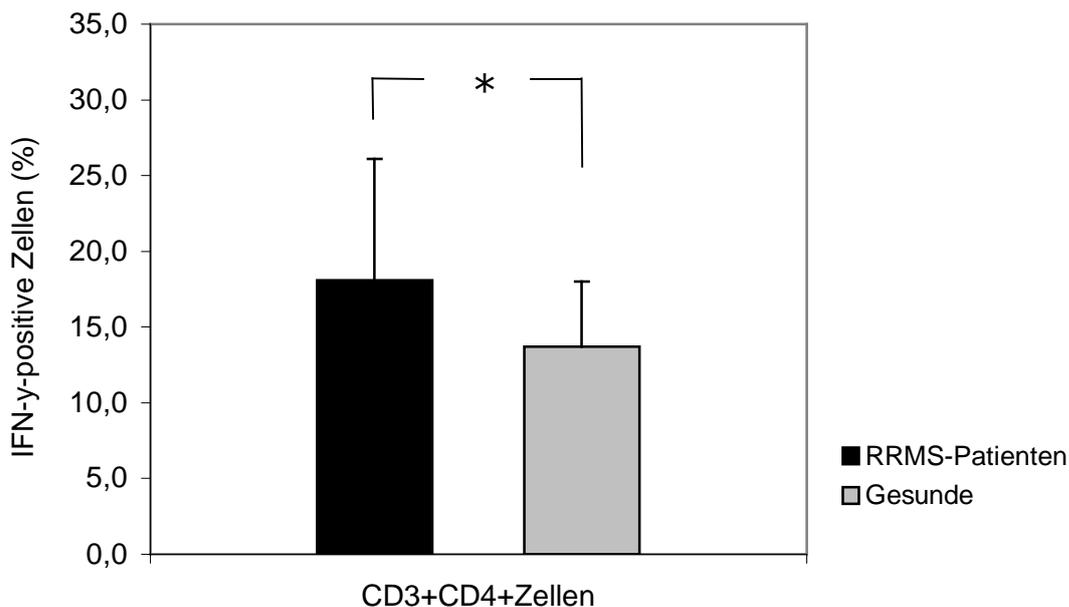


Abb.4.12b: Vergleich der Baseline der Anzahl IFN- γ -positiver CD3+CD4+Zellen zwischen RRMS-Patienten und gesunden Probanden. Die Auswertung erfolgte anhand der prozentualen Anteile IL-10-positiver Zellen innerhalb der CD3+CD4+Zellpopulation. Die Ergebnisse wurden dargestellt als MW + SD. * = signifikant

Bei der statistischen Auswertung der IL-4-positiven T-Zellpopulationen wurden keine Unterschiede zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden festgestellt. Dieses Ergebnis lieferte auch der Vergleich zwischen RRMS- bzw. SPMS-Patienten und Gesunden.

Die Betrachtung der ermittelten Expressionswerte des IFN-R-II und des IL-4R auf den untersuchten Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes ergab ebenfalls keine signifikanten Baselineunterschiede zwischen den Gruppen.

Eine ausführliche Darstellung aller erhobenen Daten ist im Anhang in den Tabellen 9.4 und 9.5 wiedergegeben.

4.4.1.2 Strukturvergleich zwischen SPMS- und RRMS-Patienten

Das in der vorliegenden Studie untersuchte MS-Patientenkollektiv setzte sich aus Patienten mit unterschiedlichen MS-Verlaufsformen zusammen. Dabei handelte es sich um 44 MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf (RRMS) und 14 Patienten mit sekundär-progredientem Verlauf (SPMS). Zur Aufklärung der Vergleichbarkeit und Beurteilbarkeit der erhobenen Daten von Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen wurde ein Strukturvergleich zwischen dem SPMS- und dem RRMS-Patientenkollektiv durchgeführt.

Demographische Daten

Der Vergleich der demographischen Daten des SPMS- und des RRMS-Patientenkollektivs zeigte Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Die rekrutierten SPMS-Patienten wiesen im Vergleich zu den RRMS-Patienten

- ein höheres Alter zu Studienbeginn
- eine längere Krankheitsdauer
- einen höheren EDSS-Score

auf (Tab.4.6).

Immunologische Parameter

Die statistische Auswertung der immunologischen Parameter zeigte, wie aus den in Tabelle 9.6 (Anhang) dargestellten p-Werten hervorgeht, dass für keinen der untersuchten Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen RRMS- und SPMS-Patienten nachweisbar war.

Ergebnisse

	RRMS-Patienten (n=44)	SPMS-Patienten (n=14)	p
Geschlecht			
Frauen	66 % (n=29)	79 % (n=11)	p < 0,28
Männer	34 % (n=15)	21 % (n=3)	p < 0,08
Alter bei Studienbeginn (Jahre)			
MW ± SD	35,0 ± 9,6	48,1 ± 10,3	p < 0,01
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)			
MW ± SD	32,0 ± 8,7	37,0 ± 13,0	p < 0,11
Erkrankungsdauer			
MW ± SD	3,0 ± 4,0	11,1 ± 8,5	p < 0,01
Schübe in den letzten 24 Monaten			
MW ± SD	2,1 ± 1,3	1,5 ± 0,9	p < 0,11
Schübe während der Studie			
MW ± SD	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0	p < 0,60
EDSS-Score			
MW ± SD	1,7 ± 1,2	4,9 ± 0,8	p < 0,01
Progressionsindex¹			
MW ± SD	2,7 ± 3,7	1,3 ± 1,9	p < 0,16

Tab.4.6: Strukturvergleich der demographischen Daten zwischen RRMS- und SPMS-Patienten. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; p = Signifikanzniveau; ¹ Progressionsindex = EDSS/Erkrankungsdauer

4.4.1.3 Strukturvergleich zwischen untherapierten, IFN- β -1a-[A]- und IFN- β -1a-[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS

Innerhalb der RRMS-Patienten wurde in weitere Untergruppen differenziert. Da in der sich anschließenden Longitudinalstudie der Verlauf der untersuchten immunologischen Parameter bei verschiedenen IFN- β -Präparat-Therapie-gruppen beobachtet wurde, wurde auch zwischen diesen Probandenkollektiven ein Strukturvergleich durchgeführt.

Die IFN- β -1b-Gruppe setzte sich nur aus SPMS-Patienten zusammen. Der Vergleich des SPMS-Patientenkollektivs mit dem RRMS-Patientenkollektiv wurde bereits in Kap.4.4.1.2 ausgeführt und dargestellt. Die RRMS-Patienten setzten sich also aus der IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1a[R]-Gruppe sowie untherapierten MS-Patienten zusammen.

Demographische Daten

Die drei Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich des relativen Frauen-/Männeranteils. Auch der statistische Vergleich der Erkrankungsdauer, des EDSS-Scores sowie des Progressionsindex zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Dagegen hatte die Gruppe der untherapierten RRMS-Patienten im Vergleich zu der IFN- β -1a[R]-Gruppe

- ein signifikant höheres Durchschnittsalter zu Studienbeginn
- ein durchschnittlich höheres Alter bei Erstdiagnose der MS sowie
- eine niedrigere Anzahl an akuten Schüben in den letzten 24 Monaten.

In der IFN- β -1a[A]-Gruppe traten in den der Studie vorausgehenden 24 Monaten hoch signifikant mehr Schübe auf als bei den untherapierten RRMS-Patienten ($p < 0,01$; Tab.4.7).

Ergebnisse

	untherapiert (n=17)	IFN-β-1a[A] (n=13)	IFN-β-1a[R] (n=14)	p
Geschlecht				
Frauen	71 % (n=12)	54 %n (n=7)	71 % (n=10)	p < 0,23
Männer	29 % (n=5)	46 % (n=6)	29 % (n=4)	p < 0,06
Alter bei Studienbeginn (Jahre)				p(1) < 0,18 p(2) < 0,03 p(3) < 0,72
MW ± SD	38,4 ± 10,1	33,6 ± 10,3	32,3 ± 7,4	
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)				p(1) < 0,15 p(2) < 0,04 p(3) < 0,58
MW ± SD	35,3 ± 8,6	30,8 ± 9,5	29,0 ± 6,8	
Erkrankungsdauer				p(1) < 0,87 p(2) < 0,87 p(3) < 0,75
MW ± SD	3,1 ± 5,4	2,8 ± 3,0	3,3 ± 2,8	
Schübe in den letzten 24 Monaten				p(1) < 0,01 p(2) < 0,04 p(3) < 0,57
MW ± SD	1,5 ± 0,6	2,6 ± 1,0	2,4 ± 1,7	
Schübe während der Studie				p(1) < 0,58 p(2) < 1,00 p(3) < 0,50
MW ± SD	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6	1,0 ± 0,0	
EDSS-Score				p(1) < 0,83 p(2) < 0,63 p(3) < 0,51
MW ± SD	1,7 ± 1,0	1,6 ± 1,3	1,9 ± 1,4	
Progressionsindex¹				p(1) < 0,44 p(2) < 0,76 p(3) < 0,65
MW ± SD	3,2 ± 3,9	2,1 ± 3,1	2,8 ± 4,1	

Tab.4.7: Stukturvergleich der demographischen Daten zwischen untherapierten, IFN-β-1a[A]-und IFN-β-1a[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS.

MW= rithmetischer Mittelwert; SD=Standardabweichung; p=Signifikanzniveau;
 p(1)=Signifikanzniveau zwischen untherapierten und IFN-β-1a[A]-therapierten MS-Patienten;
 p(2)=Signifikanzniveau zwischen untherapierten und IFN-β-1a[R]-therapierten MS-Patienten;
 p(3) =Signifikanzniveau zwischen IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1a[R]-therapierten MS-Patienten;
¹Progressionsindex = EDSS/Erkrankungsdauer

Ergebnisse

Immunologische Parameter

Wie in den Abb.4.13-4.15 dargestellt, ließen sich Gruppenunterschiede bei Untersuchung der Baseline der immunologischen Parameter feststellen. Dies betraf die mittels Durchflusszytometrie bestimmte Expression des IFN-R-II auf T-Zellen und die Anzahl der IL-10-positiven CD3+CD4+Zellen. Die Auswertung der anderen untersuchten Parameter ergab keine statistisch nachweisbaren Unterschiede. Eine ausführliche Darstellung aller erhobenen Daten findet sich im Anhang in der Tab.9.7a-b .

Die ermittelten Rfi-Werte des IFN-R-II innerhalb der CD3+Zellpopulation waren am höchsten bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe ($13,3 \pm 7,5$). Signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten wurden für die IFN- β -1a[A]-Gruppe ($8,5 \pm 5,7$; $p < 0,04$) gemessen (Abb.4.13).

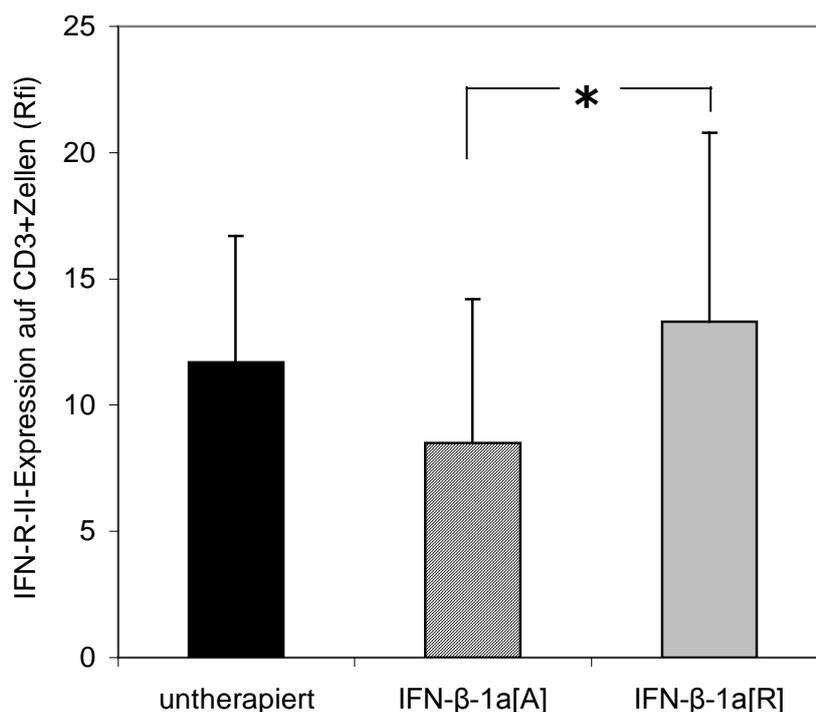


Abb.4.13: Vergleich der Baseline der IFN-R-II-Expression auf CD3+Zellen zwischen untherapierten, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS. Gezeigt wird der Vergleich zwischen den Probandengruppen zum Zeitpunkt T0 (Studienbeginn). Die Auswertung erfolgte anhand der Rfi. Die Ergebnisse wurden dargestellt als MW +SD. * = signifikant

Ergebnisse

Auf den CD3+CD4+Zellen wurden ebenfalls die höchsten IFN-R-II-Expressionswerte für die IFN- β -1a[R]-Gruppe nachgewiesen ($14,3 \pm 7,2$). Die niedrigsten Rfi-Werte wurden bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe ($9,3 \pm 4,9$) ermittelt. Der Unterschied zur IFN- β -1a[R]-Gruppe war signifikant ($p < 0,03$; Abb.4.14).

Bei den CD3+CD8+Zellen lag der ermittelte IFN-R-II-Rfi-Wert bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe ($6,8 \pm 8,3$) deutlich, aber statistisch nicht signifikant, niedriger als bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe ($11,0 \pm 8,3$) und der untherapierten Gruppe ($9,2 \pm 6,6$).

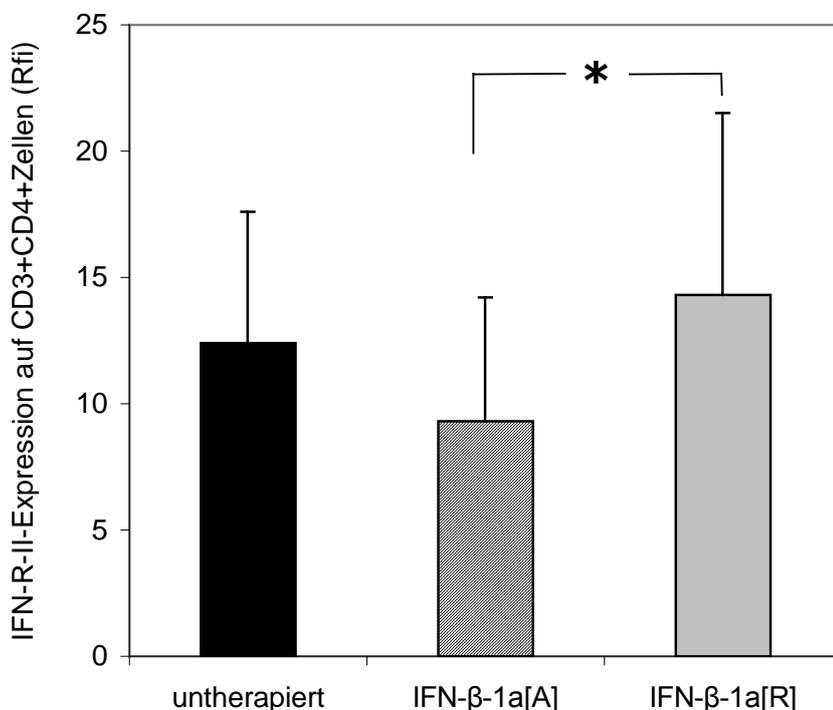


Abb.4.14: Vergleich der Baseline der IFN-R-II-Expression auf CD3+CD4+Zellen zwischen untherapierten, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS. Gezeigt wird der Vergleich zwischen den Probandengruppen zum Zeitpunkt T0. Die Auswertung erfolgte anhand der Rfi. Die Ergebnisse wurden dargestellt als MW +SD. * = signifikant

Ergebnisse

Der Vergleich der Expression der intrazellulär bestimmten Zytokine zeigte einen Gruppenunterschied in der Anzahl der detektierten IL-10-positiven CD3+CD4+Zellen auf. Die höchsten prozentualen Anteile IL-10-positiver CD3+CD4+Zellen wurden bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe gefunden ($1,3 \pm 0,7$ %). Niedrigere prozentuale Anteile ließen sich bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe ($0,9 \pm 0,3$ %) und den untherapierten MS-Patienten ($1,1 \pm 0,5$ %) nachweisen. Der Unterschied zwischen der IFN- β -1a[A]- und der IFN- β -1a[R]-Gruppe war signifikant ($p < 0,04$) (Abb.4.15).

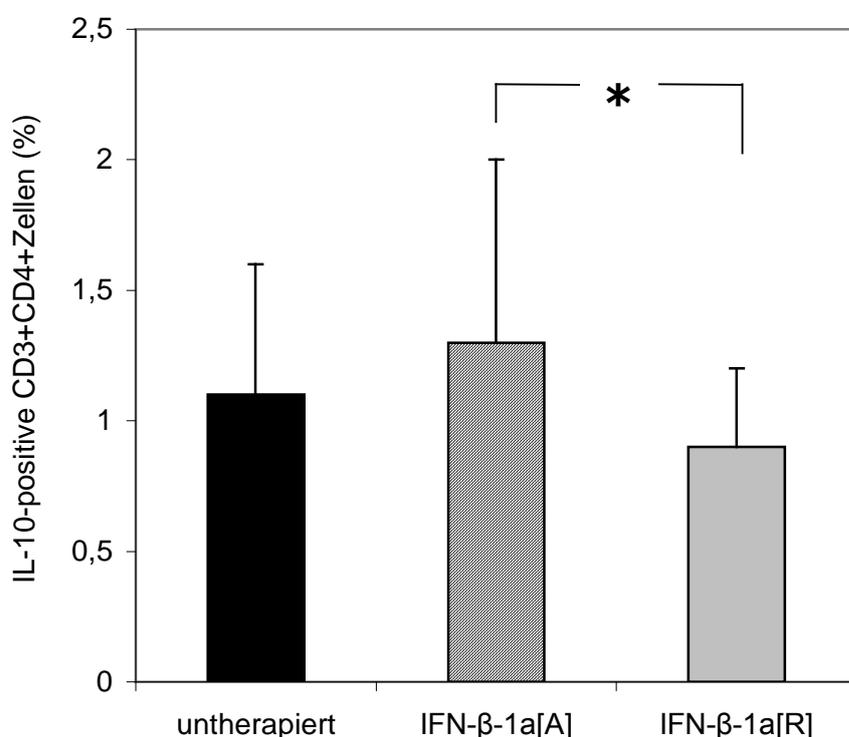


Abb.4.15: Vergleich der Baseline der IL-10-positiven CD3+CD4+Zellen zwischen untherapierten, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS. Gezeigt wird der Vergleich zwischen den Probandengruppen zum Zeitpunkt T0. Die Auswertung erfolgte anhand der prozentualen Anteile IL-10-positiver Zellen innerhalb der CD3+CD4+Zellpopulation. Die Ergebnisse wurden dargestellt als MW + SD. * = signifikant.

4.4.2 Korrelationsüberprüfungen

Neben den Strukturvergleichen bzw. der Baselinecharakterisierung der verschiedenen Studienteilnehmergruppen wurde auch der potentielle Einfluss des Alters, des Geschlechts, der Krankheitsdauer und der klinischen Krankheitsaktivität (Anzahl der Schübe, EDSS-Score, Progressionsindex) auf die Expression der analysierten immunologischen Parameter untersucht. Mit Hilfe der Pearson-Korrelation (bivariate Korrelation) wurden der Korrelationskoeffizient und das Signifikanzniveau bestimmt. Auf diese Weise war die Darstellung eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Variablen möglich. Alle erhobenen Daten sind in den Tabellen 9.8-9.17 im Anhang wiedergegeben.

4.4.2.1 Korrelation der Expression der immunologischen Parameter mit Alter oder Geschlecht

Anhand der durchgeführten statistischen Auswertungen wurden Zusammenhänge zwischen der Expression der analysierten immunologischen Parameter und dem Alter oder Geschlecht bei gesunden Probanden und MS-Patienten untersucht. Die beiden im Studienteilnehmerkollektiv auftretenden MS-Verlaufsformen (RRMS und SPMS) wurden dabei noch zusätzlich im Einzelnen betrachtet.

Sowohl bei den gesunden Probanden als auch bei den MS-Patienten wurde kein statistisch nachweisbarer Effekt des Alters oder Geschlecht auf die Expression der immunologischen Parameter festgestellt (Tab.9.8-9.9; Anhang).

Die Untersuchung der RRMS- und SPMS-Patienten konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen den analysierten immunologischen Parametern und dem Alter bzw. dem Geschlecht aufzeigen (Tab.9.10-9.11; Anhang).

4.4.2.2 Korrelation der Expression der immunologischen Parameter mit dem klinischen Verlauf der MS-Patienten

Gesamtes MS-Patientenkollektiv:

Die Betrachtung aller an der vorliegenden Studie teilnehmenden MS-Patienten zeigte, dass die untersuchten immunologischen Parameter unabhängig von der Krankheitsdauer, der Anzahl der in den letzten 24 Monaten auftretenden Schübe bzw. des ermittelten EDSS-Scores exprimiert wurden (Tab.9.12-13; Anhang).

Die Untersuchung des Zusammenhangs (Tab.9.13) zwischen dem Progressionsindex (=EDSS-Score/Krankheitsdauer) und der Expression der immunologischen Parameter ergab eine

- negative Korrelation mit der Anzahl an IL-4-positiven CD3+Zellen, d.h. mit zunehmendem Progressionsindex wurden weniger IL-4-positive CD3+Zellen exprimiert
- positive Korrelation mit der Anzahl an IL-4-positiven-CD3+CD4+Zellen
- negative Korrelation mit der Anzahl an IL-10-positiven-CD3+Zellen und IL-10-positiven-CD3+CD8+Zellen

RRMS-Patienten:

Innerhalb des RRMS-Patientenkollektivs wurde kein Zusammenhang zwischen der Expression der analysierten immunologischen Parameter und dem klinischen Krankheitsverlauf (Krankheitsdauer, Anzahl der Schübe in den letzten 24 Monaten, EDSS-Score, Progressionsindex) gefunden (Tab.9.14-15; Anhang)

SPMS-Patienten

Anders verhielt es sich bei den SPMS-Patienten. Bei diesen MS-Patienten wurde eine vom klinischen Krankheitsverlauf beeinflusste Expression der immunologischen Parameter beobachtet (Tab.9.16-17; Anhang):

- die Krankheitsdauer korrelierte positiv mit der Anzahl an IL-10-positiven CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen

Ergebnisse

- der Progressionsindex korrelierte negativ mit der Anzahl an IL-10-positiven CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen sowie mit der Anzahl an IL-4-positiven CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen.

4.4.3 Ergebnisse der Longitudinalstudie (1)

In der Longitudinalstudie (1) wurden alle MS-Patienten (untherapiert und IFN- β -Therapiegruppen) über einen Zeitraum von drei Monaten beobachtet. Dabei wurden die Blutproben zu Studienbeginn (T0) und im Rahmen der dreimonatigen neurologischen Routineuntersuchung (T3) gewonnen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Verlaufsbeobachtung wurde vorgenommen, um beurteilen zu können,

- ob Einflüsse einer IFN- β -Therapie auf die Expression der immunologischen Parameter festzustellen sind und
- inwieweit Unterschiede zwischen den Patientengruppen vorherrschen

Wie bei der zuerst durchgeführten Querschnittsstudie (bzw. den Homogenitätsprüfungen) wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse die Expression des membranständigen IFN-R-II auf CD14+Zellen, CD19+Zellen, CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen, CD3+CD8+Zellen und die des membranständigen IL-4R auf CD19+Zellen des peripheren Blutes untersucht. Dabei wurde die Expression des IFN-R-II und des IL-4R auf Leukozytensubpopulationen des peripheren Blutes durch Ermittlung der Rfi quantitativ ausgewertet. Der intrazelluläre Nachweis von IFN- γ , IL-4 und IL-10 erfolgte durchflusszytometrisch in CD3+Zellen des peripheren Blutes sowie den Subpopulationen CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen. Anhand des prozentualen Anteils Zytokin-positiver-T-Lymphozyten erfolgte eine qualitative Auswertung der Messergebnisse des intrazellulären Zytokinnachweises.

Zur statistischen Analyse der ermittelten Werte wurden mehrdimensionale nicht-parametrische Varianzanalysen (MANOVA) sowie der LSD-Test für die post-hoc-Vergleiche angewandt. Eine ausführliche Darstellung aller erhobenen Daten findet sich im Anhang in den Tabellen 9.11-9.21 .

4.4.3.1 IFN-R-II-Expression auf verschiedenen Leukozytenpopulationen

Auf CD3+Zellen:

Im Verlauf der drei Monate waren innerhalb der CD3+Zellen sowohl Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe als auch unterschiedliche Verläufe der verschiedenen Probandengruppen zu beobachten. Die IFN- β -1a[R]-Gruppe, die IFN- β -1b-Gruppe und ebenfalls die untherapierten Patienten zeigten einen tendenziell abfallenden Verlauf der Rfi-Werte über den dreimonatigen Untersuchungszeitraum. Dabei waren die Messzeitpunktunterschiede bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe signifikant ($13,3 \pm 7,5$ zu T0 bzw. $8,0 \pm 4,3$ zu T3; $p < 0,03$). Einen gegensätzlichen Verlauf zu diesen drei Patientengruppen zeigte die IFN- β -1a[A]-Gruppe. Hier war nach drei Monaten ein leichter Anstieg der Rfi-Werte zu sehen ($8,5 \pm 5,7$ zu T0 und $11,3 \pm 6,8$ zu T3) (Abb.4.16).

Ähnliche Verläufe konnten auch für die beiden Subpopulationen CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen beobachtet werden. Auch auf diesen war nach drei Monaten eine verminderte IFN-R-II-Expression bei der IFN- β -1a[R]-, IFN- β -1b- und der untherapierten Gruppe festzustellen, wobei der Unterschied auf CD3+CD4+Zellen in der IFN- β -1a[R]-Gruppe statistisch signifikant war ($14,3 \pm 7,2$ bzw. $9,0 \pm 4,5$; $p < 0,03$). Ebenso bestätigten sich die bei CD3+Zellen nachgewiesenen erhöhten Rfi-Werte der IFN- β -1a[A]-Gruppe nach drei Monaten (Abb.4.17 und Abb.4.18).

Auf CD14+Zellen:

Keine signifikanten Gruppen- oder Messzeitpunktunterschiede ergaben die Messungen des IFN-R-II auf Monozyten. Lediglich leicht verminderte Rfi-Werte waren nach drei Monaten bei den IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten erkennbar (Abb.4.19).

Ergebnisse

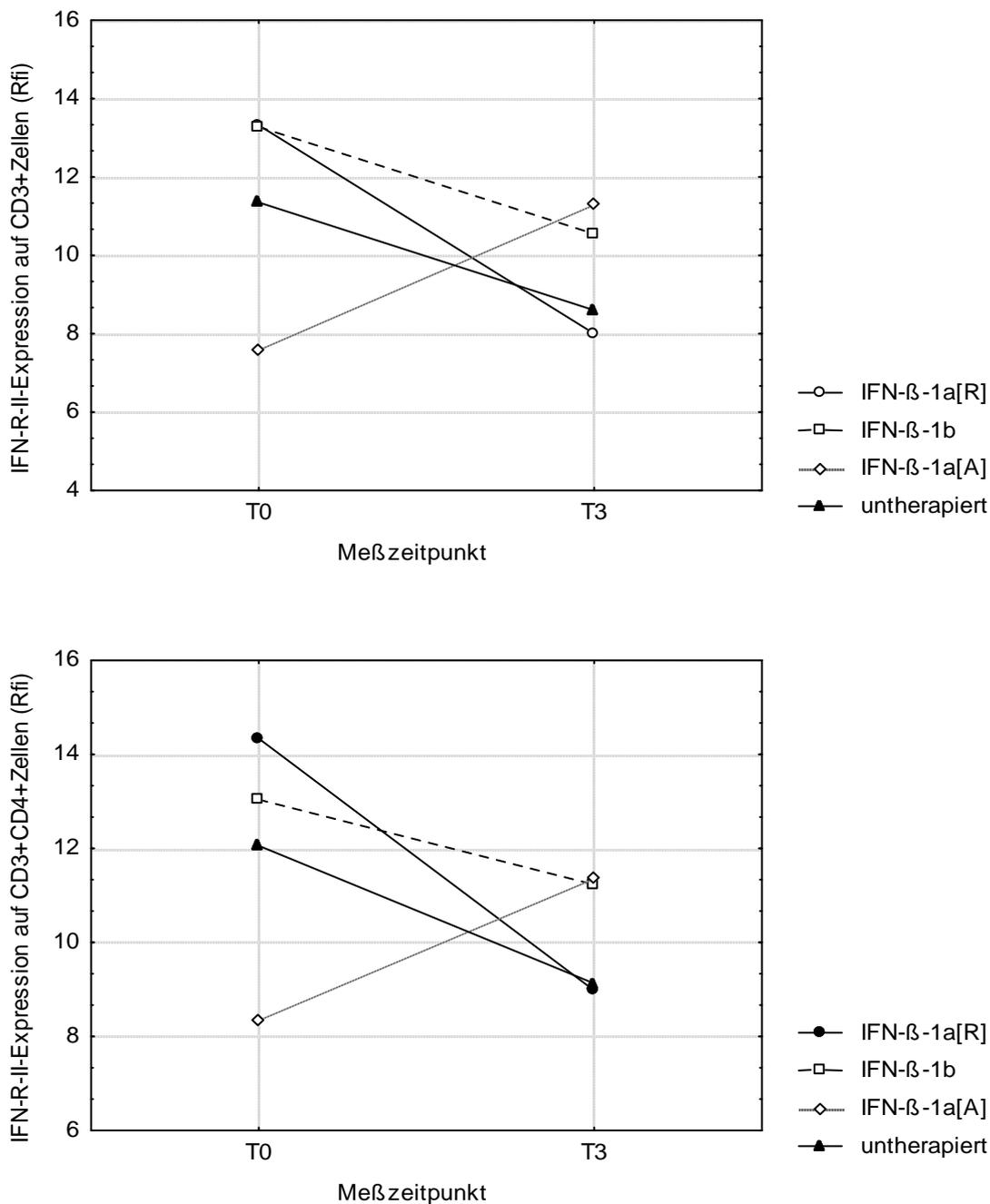


Abb.4.16-4.17: Expression des IFN-R-II auf CD3+Zellen (obere Abb.) und CD3+CD4+Zellen (untere Abb.) im Messzeitpunkt- und Gruppenvergleich. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der ermittelten Rfi-Werte zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten. Für die IFN-β-1a[R]-Gruppe war ein signifikanter Messzeitpunktunterschied bei beiden Zellpopulationen festzustellen ($p < 0,03$).

Ergebnisse

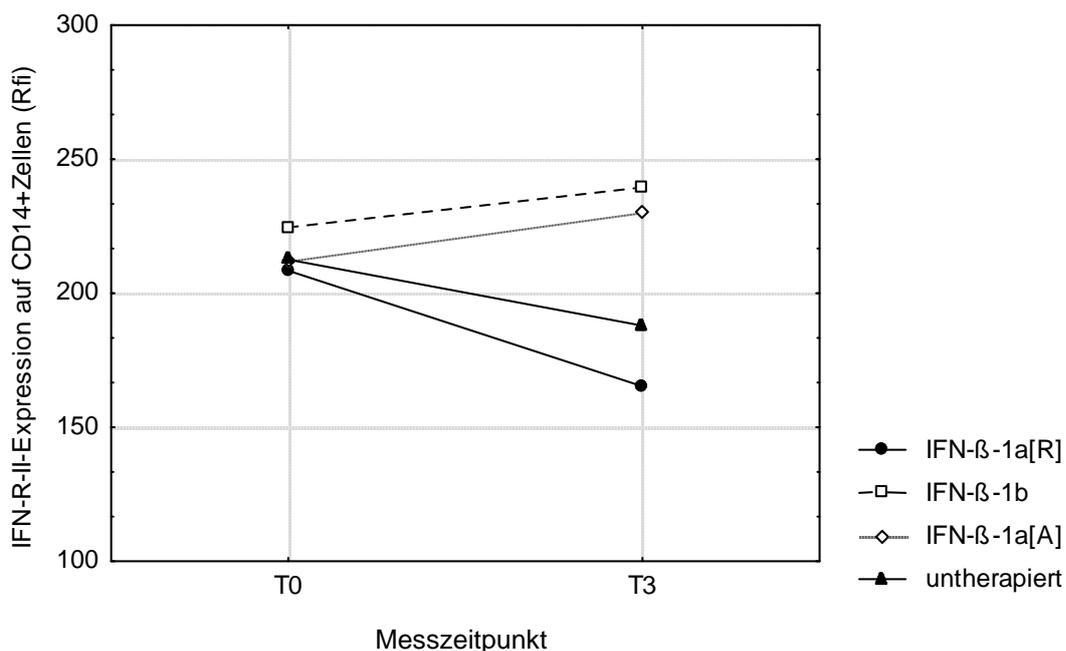
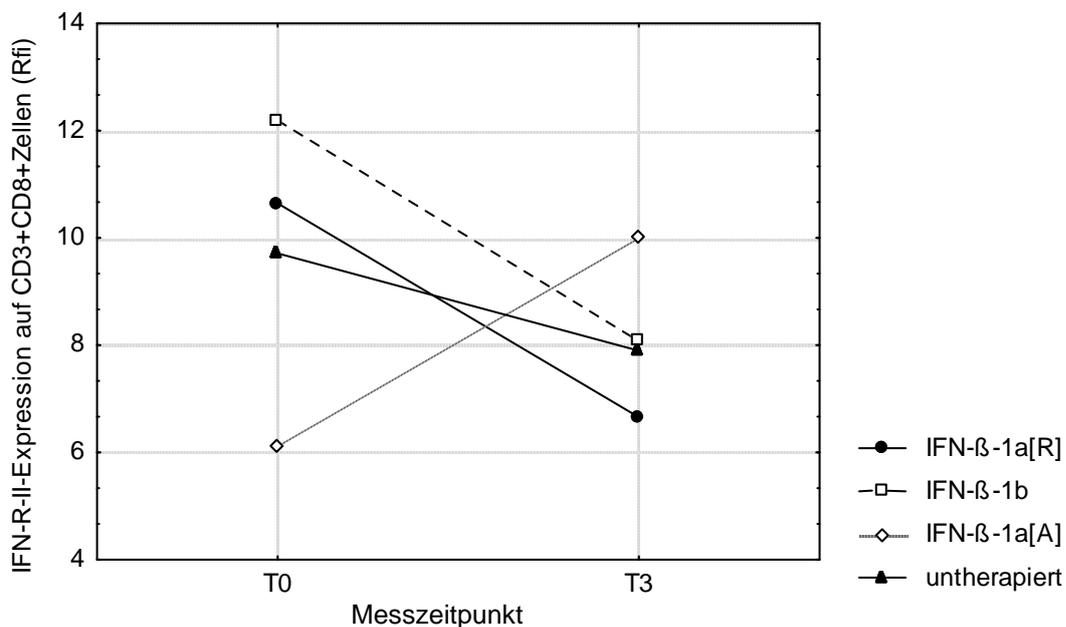


Abb.4.18-4.19: Expression des IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen (obere Abbildung) und CD14+Zellen (untere Abbildung) im Messzeitpunkts- und Gruppenvergleich. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der ermittelten Rfi-Werte zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten.

Ergebnisse

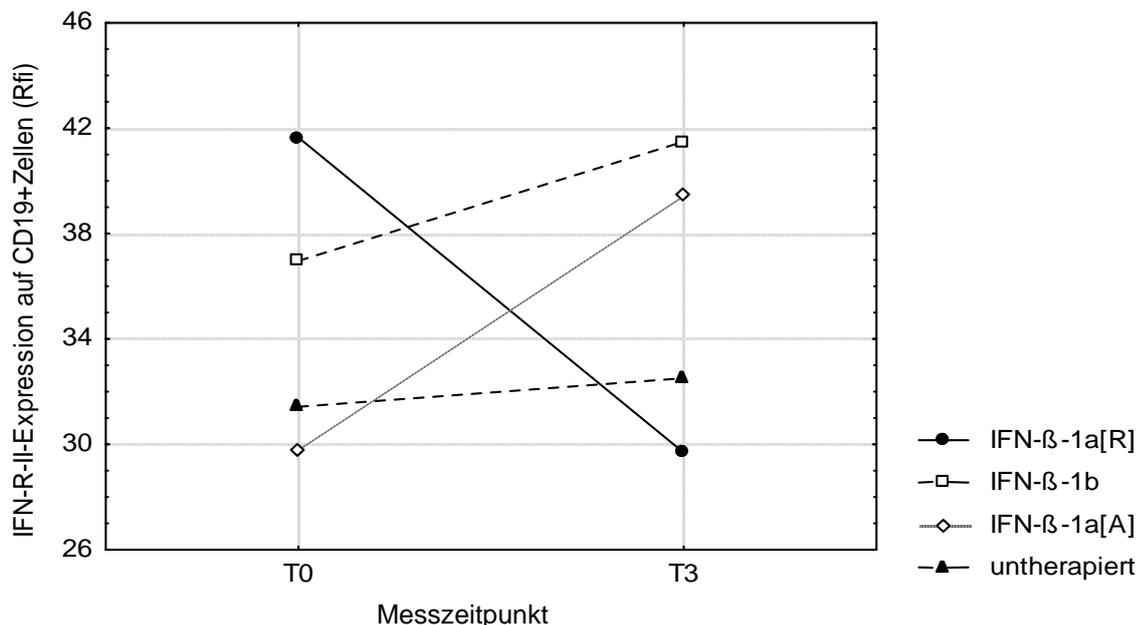


Abb.4.20: Expression des IFN-R-II auf CD19+Zellen im Messzeitpunkts- und Gruppenvergleich. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der ermittelten Rfi-Werte zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten. Signifikante Messzeitpunktunterschiede waren für die IFN-β-1a[R]-Gruppe festzustellen ($p < 0,05$).

Auf CD19+Zellen:

Auf dieser Leukozytenpopulation konnten für die IFN-β-1a[R]-Gruppe ebenfalls nach drei Monaten signifikant erniedrigte Rfi-Werte ermittelt werden ($41,6 \pm 18,1$ zu T0 bzw. $29,7 \pm 9,4$ zu T3; $p < 0,05$). Alle anderen Patientengruppen zeigten tendenziell ansteigende Verläufe zwischen den beiden Messzeitpunkten. Dabei waren statistisch keine signifikanten Unterschiede festzustellen, weder innerhalb noch zwischen den Gruppen (Abb.4.20).

4.4.3.2 IL-4R-Expression auf CD19+Zellen

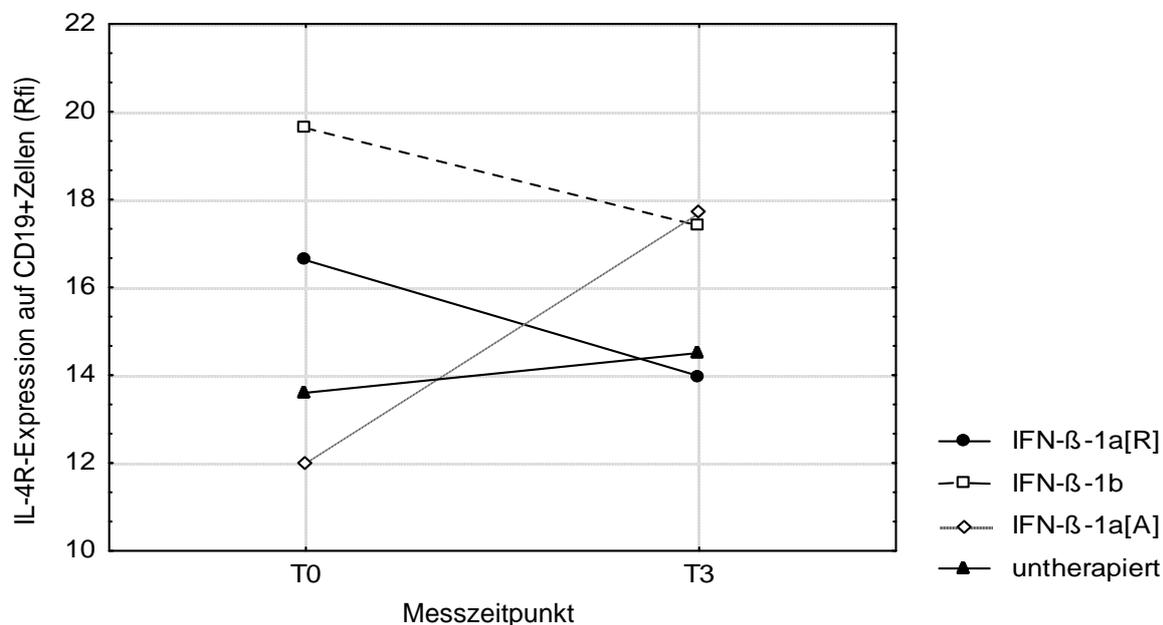


Abb.4.21: Expression des IL-4R auf CD19+Zellen im Messzeitpunkt- und Gruppenvergleich. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der ermittelten Rfi-Werte zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten.

Die Expression des IL-4R auf B-Zellen bzw. die errechneten Rfi-Werte zeigten generell keine statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen T0 und T3 der einzelnen Patientengruppen. Die Verlaufsbeobachtung im Gruppenvergleich ergab das gleiche Ergebnis. Einzig auffallend war der Verlauf der Rfi-Werte der IFN-β-1a[A]-Gruppe. Dieser hatte im Gegensatz zu den drei anderen eine ansteigende Tendenz ($12,0 \pm 7,2$ zu T0 bzw. $17,7 \pm 8,1$ zu T3), die aber nach statistischer Betrachtung nicht signifikant war (Abb.4.21).

4.4.3.3 Intrazellulärer Nachweis von IFN- γ in T-Zellen

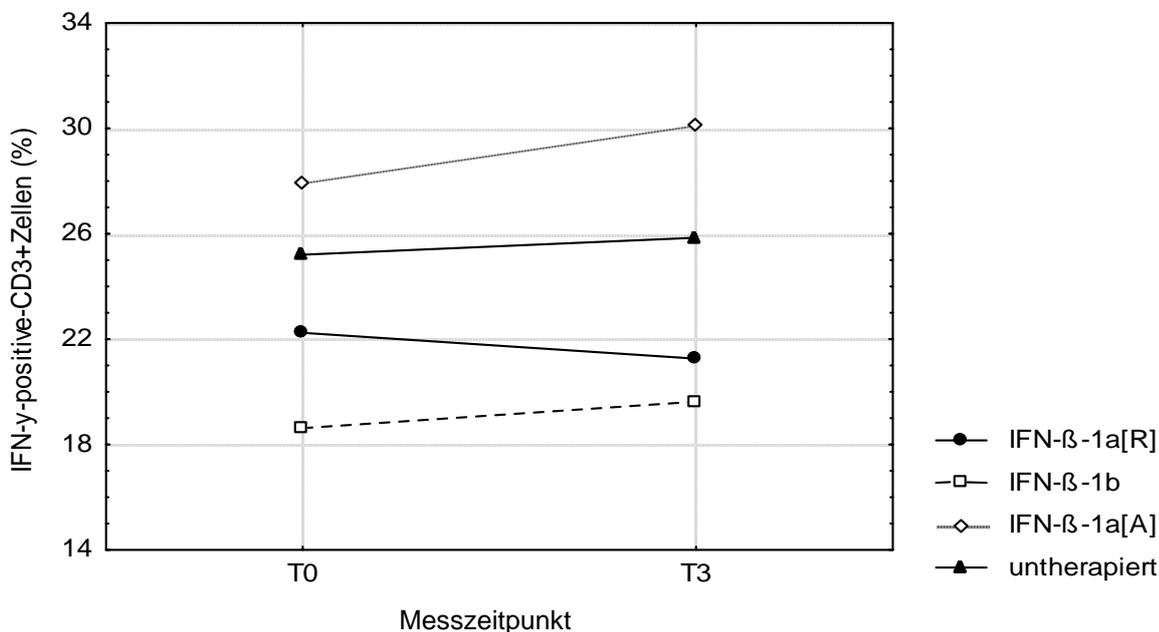


Abb.4.22: Messzeitpunkts- und Gruppenvergleich der Anzahl IFN- γ -positiver-CD3+Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentualen Anteile an IFN- γ -positiven-CD3+Zellen zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN- β -1a[R]-, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten. Der gezeigte Gruppeneffekt war signifikant ($p < 0,03$).

Die prozentualen Anteile an IFN- γ -positiven-CD3+Zellen wiesen bei allen vier Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Messzeitpunkten auf. Dagegen konnte ein Gruppeneffekt festgestellt werden ($p < 0,03$), d.h. abhängig von der untersuchten Gruppe wurden unterschiedlich hohe Anteile an IFN- γ -positiven-CD3+Zellen gefunden. So war z.B. für die IFN- β -1a[A]-Gruppe an beiden Messzeitpunkten die höchste Anzahl an IFN- γ -positiven-CD3+Zellen ($28,0 \pm 8,0\%$ zu T0 bzw. $30,1 \pm 10,3\%$ zu T3) nachzuweisen, während die IFN- β -1b-therapierten Patienten bei T0 und T3 jedesmal die niedrigsten Werte ($18,6 \pm 10,2\%$ und $19,6 \pm 8,3\%$) aufwiesen (Abb.4.22).

Ergebnisse

Dieser Gruppeneffekt ließ sich nicht in den Subpopulationen CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen aufzeigen. In diesen Zellpopulationen überschritten sich zum Teil die Bereiche der gefundenen prozentualen Anzahlen IFN- γ -positiver-Zellen. Besonders deutlich zeigte sich die Aufhebung des Gruppeneffekts innerhalb der CD3+CD8+Zellen, bei welchen ein leicht ansteigender Verlauf der IFN- γ -Produktion in der IFN- β -1a[A]-Gruppe zwischen den Messzeitpunkten zu beobachten war. Auffallend waren zudem die konstant niedrigeren Prozentwerte an IFN- γ -positiven-CD3+CD8+Zellen in der IFN- β -1a[R]-Gruppe. Während diese an beiden Messzeitpunkten unter 30 % lagen, erreichten die anderen Gruppen über 35 % IFN- γ -positive-CD3+CD8+Zellen (Abb.4.23-4.24).

Ergebnisse

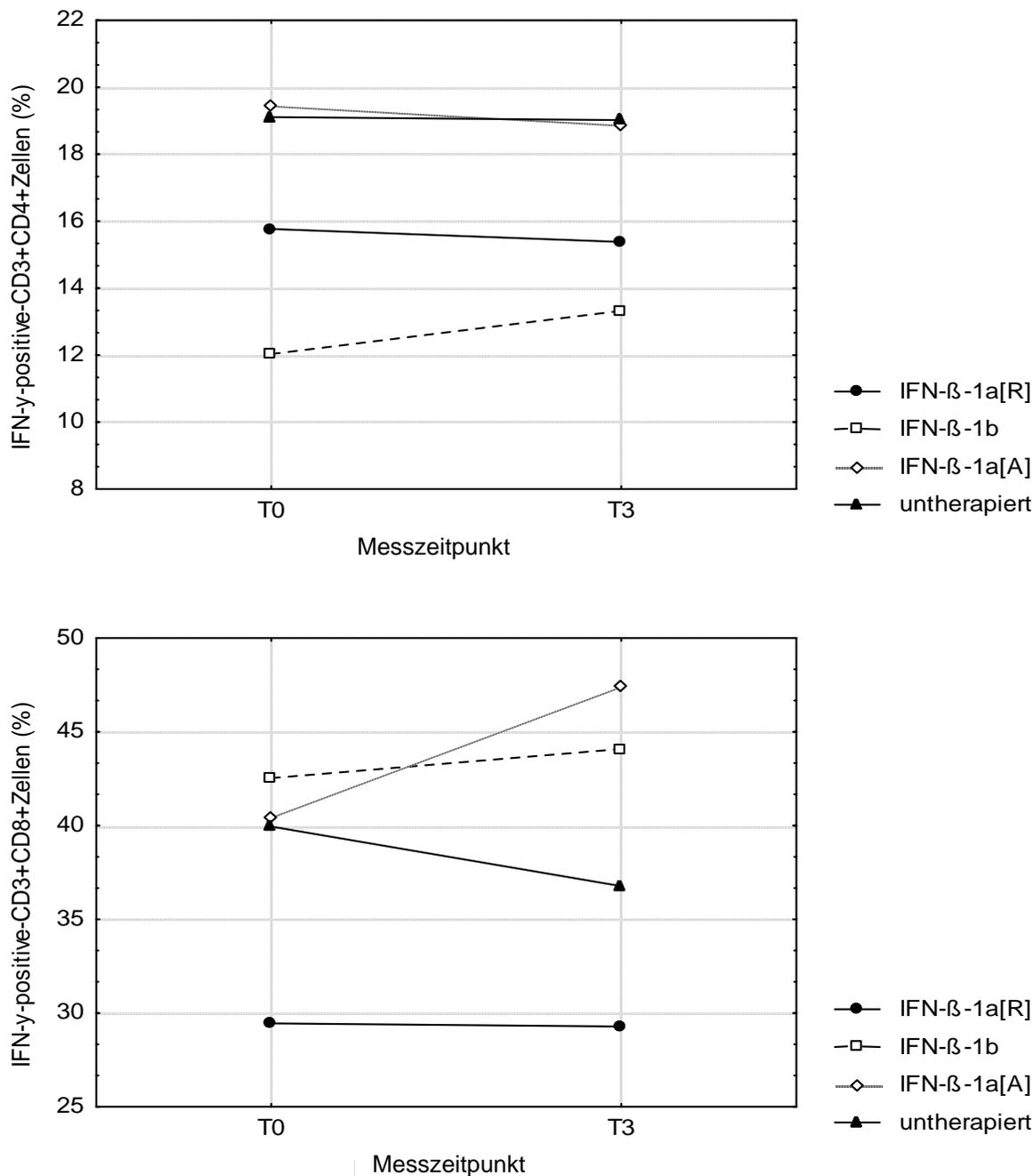


Abb.4.23-4.24: Messzeitpunkt- und Gruppenvergleich der Anzahl IFN- γ -positiver-CD3+CD4+Zellen (obere Abb.) und IFN- γ -positiver-CD3+CD8+Zellen (untere Abb.). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentualen Anteile an IFN- γ -positiven-CD3+Zellen und CD3+CD8+Zellen zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN- β -1a[R]-, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten.

4.4.3.4 Intrazellulärer Nachweis von IL-4 in T-Zellen

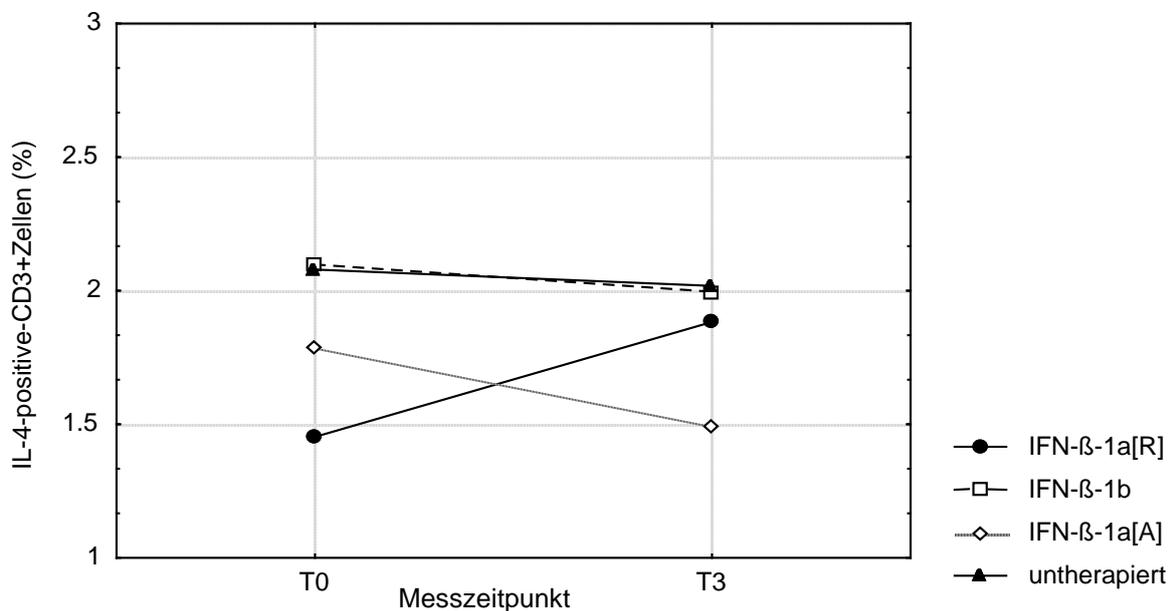


Abb.4.25: Messzeitpunkts- und Gruppenvergleich der Anzahl IL-4-positiver-CD3+Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentualen Anteile an IL-4-positiven-CD3+Zellen zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten.

Innerhalb der T-Zellpopulation konnten für die IFN-β-1a[R]-Gruppe mehr IL-4-positiv-CD3+Zellen zum Zeitpunkt T3 im Vergleich zu T0 ($1,5 \pm 0,9\%$ und $1,9 \pm 1,2\%$) durchflusszytometrisch detektiert werden. Durch diesen Anstieg an IL-4-positiven-CD3+Zellen erreichte die IFN-β-1a[R]-Gruppe zum Zeitpunkt T3 das Niveau der drei anderen Gruppen. Der tendenziell ansteigende Verlauf war nur für diese Gruppe aufzeigbar, die anderen drei Patientengruppen hatten an den zwei Messzeitpunkten etwa gleich viele IL-4-positiv-CD3+Zellen bzw. geringfügig weniger (IFN-β-1a[A]-Gruppe) (Abb.4.25).

Ähnliche Verläufe konnten ebenfalls für die CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen beobachtet werden. Auch bei diesen hatte nur die IFN-β-1a[R]-Gruppe einen leicht

Ergebnisse

ansteigenden Verlauf von T0 zu T3, während die Anzahl der IL-4-positiven-Zellen bei den IFN- β -1a[A]-, IFN- β -1b- und untherapierten MS-Patienten im Untersuchungszeitraum relativ konstant blieb.

4.4.3.5 Intrazellulärer Nachweis von IL-10 in T-Zellen

Grundsätzlich ließ sich für alle Gruppen feststellen, dass bei keiner ein ansteigender Verlauf an IL-10-positiven-Zellen zwischen den beiden Messzeitpunkten zu beobachten war. Im Falle der untherapierten MS-Patienten verringerten sich die IL-10-positiven-CD3+Zellen im Verlauf der drei Monate statistisch nachweisbar. Dieser Messzeitpunktunterschied war innerhalb der CD3+Zellen und der CD3+CD4+Zellen hochsignifikant (beide Zellpopulationen: $p < 0,01$) und für die CD3+CD8+Zellen signifikant ($p < 0,02$). Bei den anderen drei Gruppen konnten statistisch keine Veränderungen zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden (Abb.4.26-4.28). Ein Gruppeneffekt war ebenfalls nicht feststellbar.

Ergebnisse

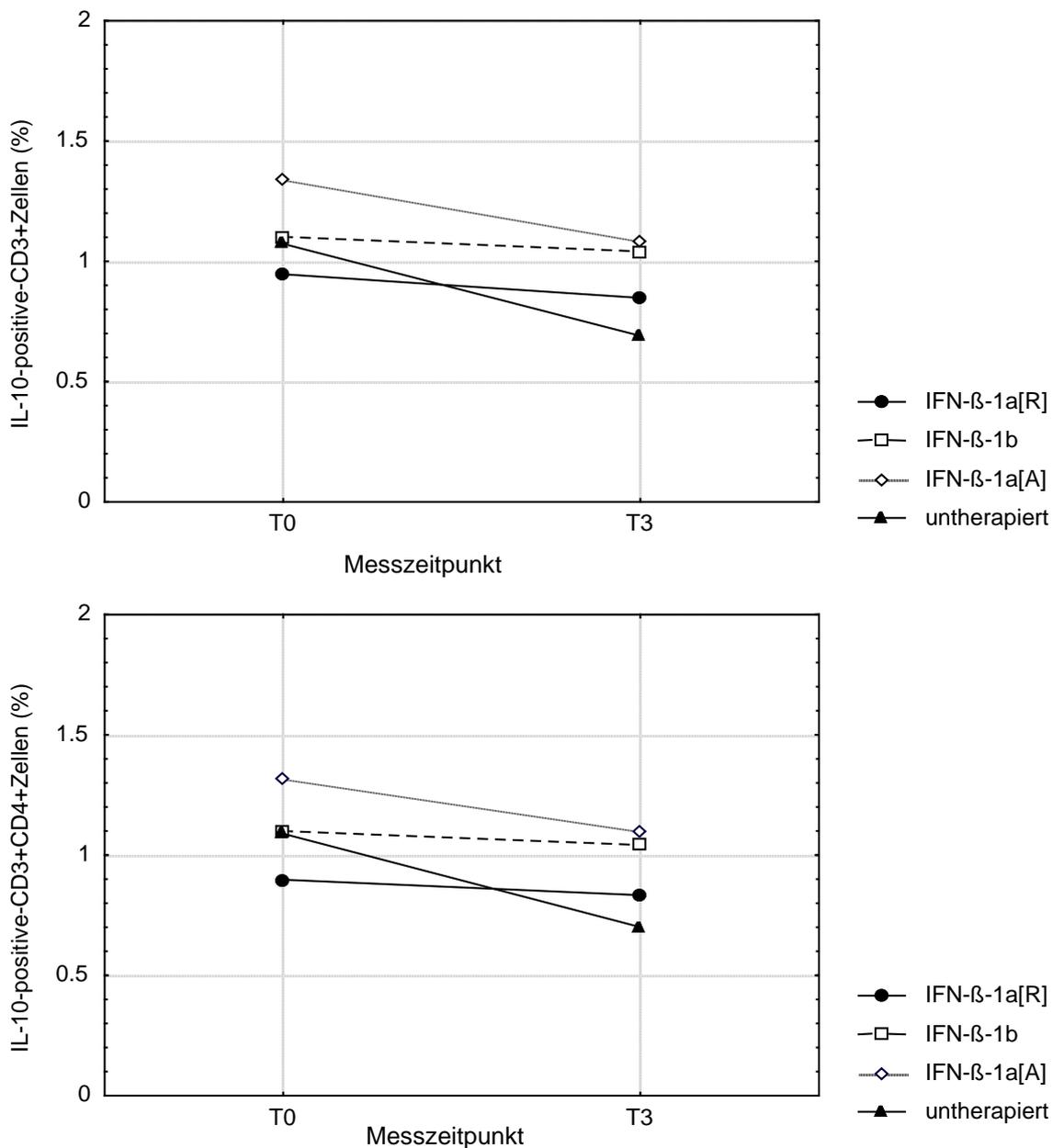


Abb.4.26-4.27: Messzeitpunkts- und Gruppenvergleich der Anzahl IL-10-positiver-CD3+Zellen (obere Abb.) und IL-10-positiver-CD3+CD4+Zellen (untere Abb.). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentualen Anteile an IL-10-positiven-CD3+Zellen und CD3+CD4+Zellen zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten. Hoch signifikante Messzeitpunktsunterschiede waren bei beiden Zellpopulationen für die untherapierte Patientengruppe festzustellen ($p < 0,01$).

Ergebnisse

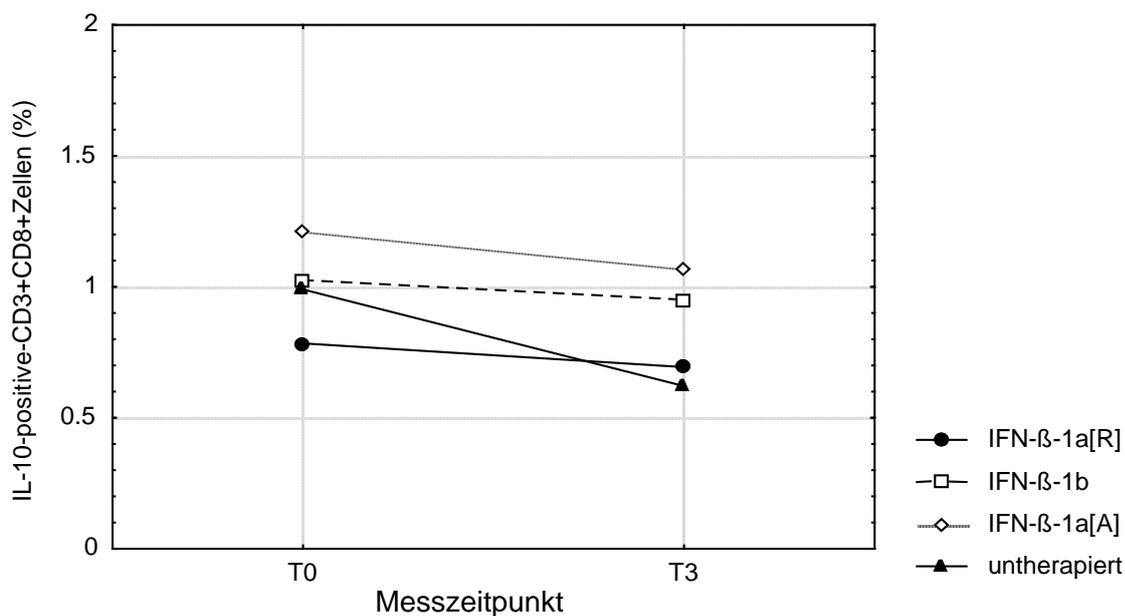


Abb.4.28: Messzeitpunkts- und Gruppenvergleich der Anzahl IL-10-positiver-CD3+8+Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der prozentualen Anteile an IL-10-positiven-CD3+CD8+Zellen zu Studienbeginn (T0) und nach drei Monaten (T3) bei untherapierten, IFN-β-1a[R]-, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1b-therapierten MS-Patienten. Signifikante Messzeitpunktsunterschiede waren für die untherapierte Patientengruppe festzustellen ($p < 0,02$).

4.4.4 Ergebnisse der Longitudinalstudie (2)

Wie schon zu Beginn des Kapitels 4.4 erwähnt, wurden die in der vorliegenden Studie durchflusszytometrisch untersuchten Zytokine und Zytokinrezeptoren bei den IFN- β -therapierten-Patienten noch an zwei zusätzlichen Blutentnahmetermenen (T1 = drei Wochen nach Therapiebeginn, T2 = sechs Wochen nach Therapiebeginn) bestimmt. So konnten relativ kurzfristige Schwankungen im Immunstatus dieses Patientenkollektivs erfasst werden und die verschiedenen IFN- β -Präparate miteinander verglichen werden.

Des Weiteren war die Möglichkeit gegeben, aufzuklären,

- ob die unter Kap.4.4.3 (Longitudinalstudie 1) beschriebenen Messzeitpunkts- und Gruppeneffekte bereits nach drei bzw. sechs Wochen vorlagen und
- ob zu T1 oder T2 Veränderungen sichtbar waren, die drei Monate nach Therapiebeginn statistisch nicht mehr nachzuweisen waren.

Zur statistischen Analyse der ermittelten Werte wurden mehrdimensionale nicht-parametrische Varianzanalysen (MANOVA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Differenzwerten bezogen auf die Baseline (T0). Der Vorteil dieses Verfahrens war eine einheitlichere und stabilere Beschreibung von relativen Effekten bzw. Tendenzen in der Longitudinalstudie (2). Die vollständigen Daten sind in den Tabellen 4.8-4.11 wiedergegeben.

4.4.4.1 IFN-R-II-Expression auf verschiedenen Leukozytenpopulationen

Auf CD3+Zellen:

Die Betrachtung der IFN-R-II-Expression auf CD3+Zellen zeigte, dass die unter Kap.4.4.3.1 beschriebene signifikante Abnahme des Rfi-Wertes der IFN- β -1a[R]-Gruppe zum Zeitpunkt T3 bereits drei Wochen nach Studienbeginn nachzuweisen war ($p < 0,01$). Nach sechs Wochen war die Abnahme des Rfi-Wertes im Vergleich zu

Ergebnisse

T0 noch deutlich zu erkennen, aber statistisch nicht mehr belegbar (Abb.4.29 und Tab.4.8/4.9). Auch auf den CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen war nach drei Wochen eine verminderte IFN-R-II-Expression bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe zu beobachten ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,03$). Während dieser signifikante Unterschied zu T0 auf CD3+CD4+Zellen an den zwei weiteren Untersuchungszeitpunkten ebenfalls feststellbar war, lag er auf CD3+CD8+Zellen weder nach sechs Wochen noch nach drei Monaten vor (Abb.4.30-4.31; Tab.4.8/4.9).

Die Messzeitpunktvergleiche der IFN- β -1a[A]-Gruppe und der IFN- β -1b-Gruppe ergaben keine statistisch nachweisbaren Unterschiede (Tab.4.8/4.9).

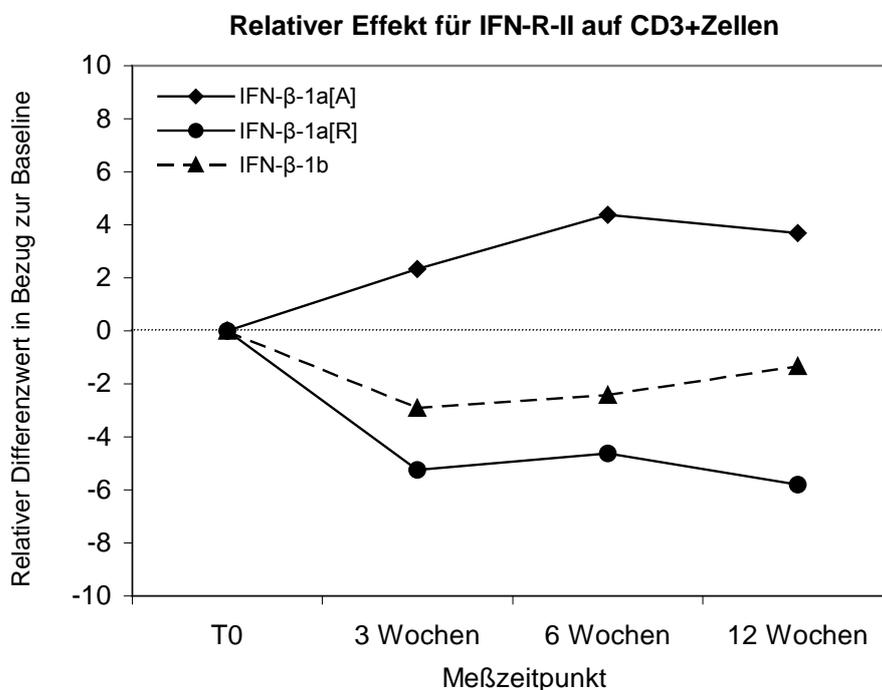


Abb.4.29: Relativer Verlauf der IFN-R-II-Expression auf CD3+Zellen bei IFN- β -therapierten-MS-Patienten. Die dargestellten Werte (T0, nach 3 Wochen, nach 6 Wochen, nach 12 Wochen) entsprechen den Differenzwerten zwischen den zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt errechneten Rfi-Werten und der Baseline (T0). Der relative Verlaufsunterschied nach 3 Wochen war bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe hoch signifikant ($p < 0,01$). Auch ein Gruppeneffekt war nachzuweisen ($p < 0,04$).

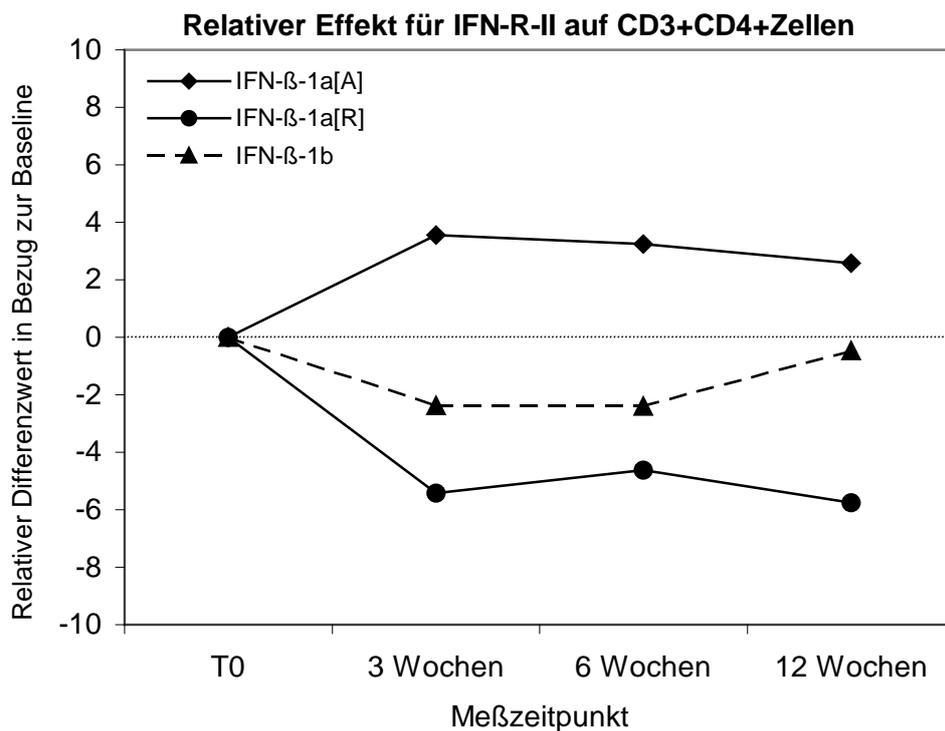


Abb.4.30: Relativer Verlauf der IFN-R-II-Expression auf CD3+CD4+Zellen bei IFN-β-therapierten-MS-Patienten. Die dargestellten Werte (T0, nach 3 Wochen, nach 6 Wochen, nach 12 Wochen) entsprechen den Differenzwerten zwischen den zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt errechneten Rfi-Werten und der Baseline (T0). Der relative Verlaufsunterschied war bei der IFN-β-1a[R]-Gruppe auf den CD3+CD4+Zellen nach 3 Wochen hoch signifikant ($p < 0,01$) und nach 6 Wochen signifikant ($p < 0,03$). Ein Gruppeneffekt war ebenfalls zu beobachten ($p < 0,02$).

Hinsichtlich eines Gruppenvergleichs der IFN-R-II-Expression auf CD3+Zellen sowie den beiden Subpopulationen konnte beobachtet werden, dass die IFN-β-1a[A]-Gruppe einen tendenziell ansteigenden Verlauf aufwies. Dagegen zeigten die IFN-β-1a[R]-Gruppe und IFN-β-1b-Gruppe abfallende Verläufe. Dieser Gruppeneffekt war innerhalb der CD3+Zellen und CD3+CD4+Zellen zum Zeitpunkt T1 signifikant ($p < 0,04$ bzw. $p < 0,02$) (Abb.4.29-4.30; Tab.4.8).

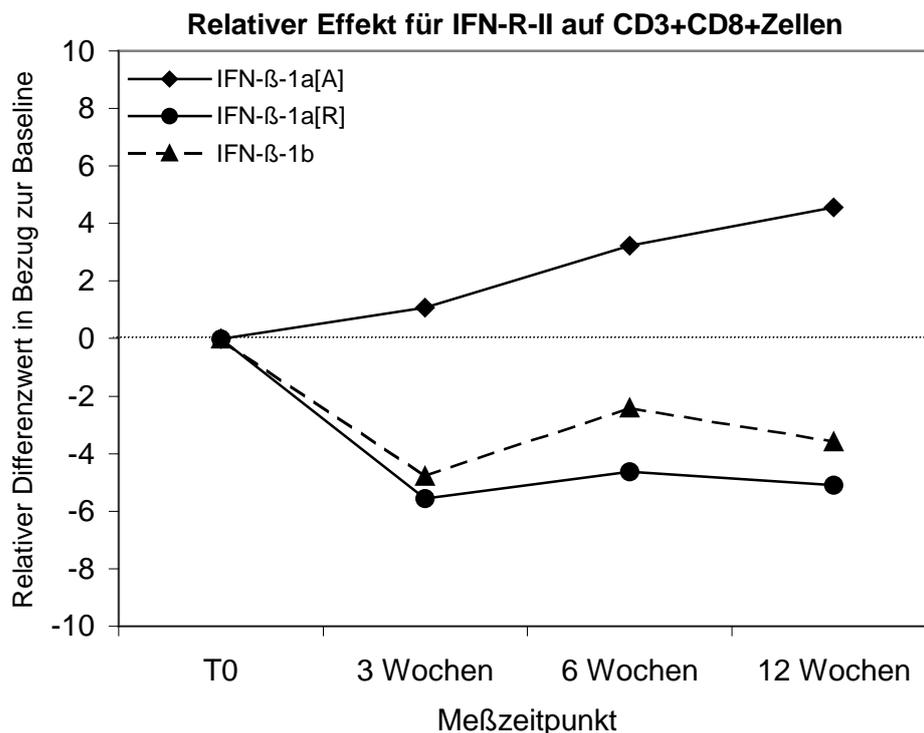


Abb.4.31: Relativer Verlauf der IFN-R-II-Expression auf CD3+CD8+Zellen bei IFN-β-therapierten MS-Patienten. Die dargestellten Werte (T0, nach 3 Wochen, nach 6 Wochen, nach 12 Wochen) entsprechen den Differenzwerten zwischen den zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt errechneten Rfi-Werte und der Baseline (T0). Der relative Verlaufsunterschied war bei der IFN-β-1a[R]-Gruppe nach 3 Wochen signifikant ($p < 0,03$).

Auf CD19+Zellen und CD14+Zellen:

Auf beiden Zellpopulationen ließen sich zu den Zeitpunkten T1 und T2 statistisch weder Messzeitpunkts- noch Gruppeneffekte bei der IFN-R-II-Expression für eine der untersuchten Gruppen feststellen (Tab.4.8/4.9).

Ergebnisse

Parameter	GRUPPE			p(2)
	IFN-β-1a[A]	IFN-β-1a[R]	IFN-β-1b	
	3.Woche*	3.Woche*	3.Woche*	
IFN-R-II auf CD3+Zellen	2,3	-5,3	-2,9	p < 0,04
p(1)	n.s.	p < 0,01	n.s.	
IFN-R-II auf CD3+CD4+Zellen	3,6	-5,4	-2,4	p < 0,02
p(1)	n.s.	p < 0,01	n.s.	
IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen	1,1	-5,6	-4,8	n.s.
p(1)	n.s.	p < 0,03	n.s.	
IFN-R-II auf CD19+Zellen	11,4	-7,3	3,0	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN-R-II auf CD14+Zellen	22,7	-17,4	-3,2	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4R auf CD19+Zellen	4,1	-3,8	-2,4	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	

Tab.4.8: Vergleich der IFN-R-II- und IL-4R-Expression auf peripheren Blutleukozyten drei Wochen nach Studienbeginn. Untersucht wurden die relativen Verlaufsunterschiede zwischen den IFN-β-therapierten Gruppen anhand von Differenzwerten in Bezug zur Baseline. * = die dargestellten Werte entsprechen den Differenzwerten zwischen den ermittelten Rfi-Werten von T1 (drei Wochen nach Studienbeginn) und der Baseline; p(1) = Veränderung zwischen den Messzeitpunkten (T0/T1); p(2) = Veränderung zwischen den Gruppen.

4.4.4.2 IL-4R-Expression auf CD19+Zellen

Die Rfi-Werte des IL-4-Rezeptors auf CD19+Zellen zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum einen relativ konstanten Verlauf. Sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen als auch zwischen den drei Gruppen waren statistisch keine Unterschiede nachzuweisen (Tab.4.8/4.9).

Ergebnisse

Parameter	GRUPPE			p(2)
	IFN- β -1a[A]	IFN- β -1a[R]	IFN- β -1b	
	6.Woche*	6.Woche*	6.Woche*	
IFN-R-II auf CD3+Zellen	4,4	-4,6	-2,3	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN-R-II auf CD3+CD4+Zellen	3,2	-4,6	-2,4	n.s.
p(1)	n.s.	p < 0,03	n.s.	
IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen	6,6	-4,4	-1,9	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN-R-II auf CD19+Zellen	6,6	-7,0	-2,8	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN-R-II auf CD14+Zellen	0,1	-17,5	-34,1	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4R auf CD19+Zellen	5,0	-4,2	-4,5	p < 0,04
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	

Tab.4.9: Vergleich der IFN-R-II- und IL-4R-Expression auf peripheren Blutleukozyten sechs Wochen nach Studienbeginn. Untersucht wurden die relativen Verlaufsunterschiede zwischen den IFN- β -therapierten Gruppen anhand von Differenzwerten in Bezug zur Baseline. * = die dargestellten Werte entsprechen den Differenzwerten zwischen den ermittelten Rfi-Werte von T2 (sechs Wochen nach Studienbeginn) und der Baseline; p(1) = Veränderung zwischen den Messzeitpunkten (T0/T2); p(2) = Veränderung zwischen den Gruppen.

4.4.4.3 Intrazellulärer Nachweis von IFN- γ , IL-4 und IL-10 in T-Zellen

Wie die p-Werte in den Tabellen 4.10 und 4.11 aufzeigen, ließen sich bei der statistischen Auswertung für die beiden Zytokine IFN- γ und IL-4 in keiner der drei untersuchten Zellpopulationen (CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen) signifikante Veränderungen nach drei bzw. sechs Wochen im Vergleich zur Baseline feststellen. Dies betraf alle drei Patientengruppen. Auch die Unterschiede zwischen den Gruppen unabhängig vom Messzeitpunkt waren statistisch nicht signifikant.

Obwohl, wie in Kap.4.4.3.5 erläutert, bei keiner der IFN- β -Therapiegruppen drei Monate nach Studienbeginn ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der IL-10-positiven-T-Lymphozyten auftrat, waren zu den beiden vorhergehenden Messzeitpunkten eben solche aufzeigbar.

Nach drei (T1) und sechs (T2) Wochen konnten für die IFN- β -1a[A]-Gruppe hoch signifikant niedrigere prozentuale Anteile an IL-10-positiven-CD3+Zellen und CD3+CD4+Zellen im Vergleich zu T0 detektiert werden ($p < 0,01$). Drei Monate nach Studienbeginn waren im Vergleich zu T1 und T2 deutlich mehr IL-10-positiv-CD3+Zellen und CD3+CD4+Zellen nachweisbar. Dadurch lag zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied verglichen zu T0 vor (Abb.4.32/4.33).

Die beiden anderen Patientengruppen zeigten innerhalb der CD3+Zellen ähnliche Verläufe, deren Messzeitpunktunterschiede aber statistisch nicht nachweisbar waren. Die Gruppe der IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten hatte demgegenüber drei Wochen nach Studienbeginn eine deutlich verminderte Anzahl IL-10-positiver-CD3+CD8+Zellen ($p < 0,01$) (Abb.4.34).

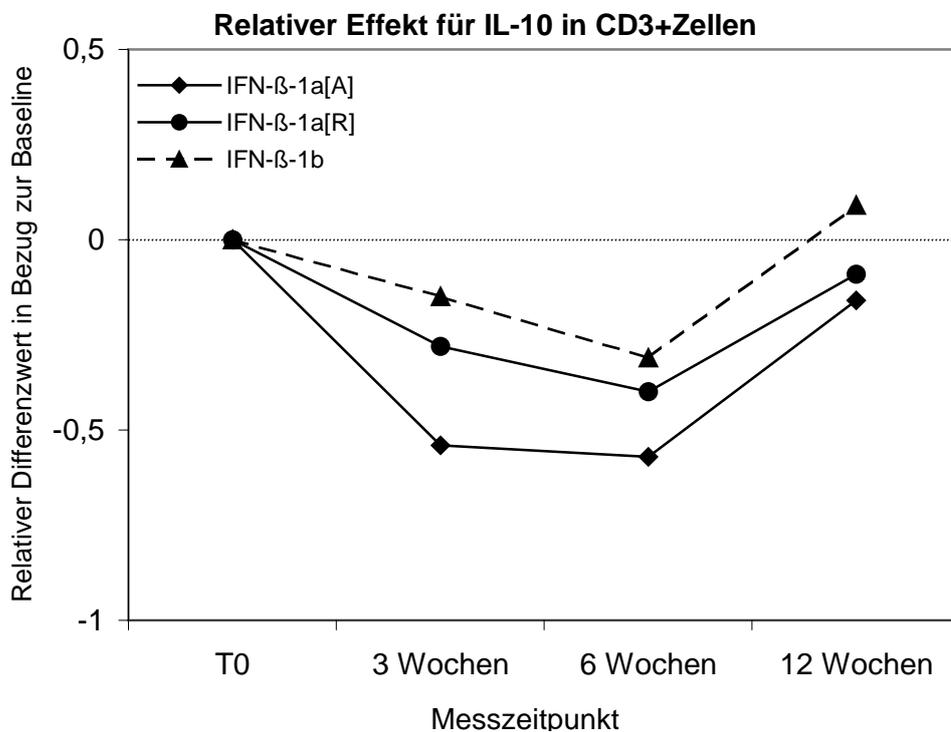


Abb.4.32: Relativer Verlauf der Anzahl IL-10-positiver-CD3+Zellen bei IFN- β -therapierten MS-Patienten. Die dargestellten Werte (T0, 3 Wochen, 6 Wochen, 12 Wochen) entsprechen den Differenzwerten zwischen den zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermittelten prozentualen Anteilen IL-10-positiver-CD3+Zellen und der Baseline (T0). Der relative Verlaufsunterschied war bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe nach 3 und 6 Wochen hoch signifikant.

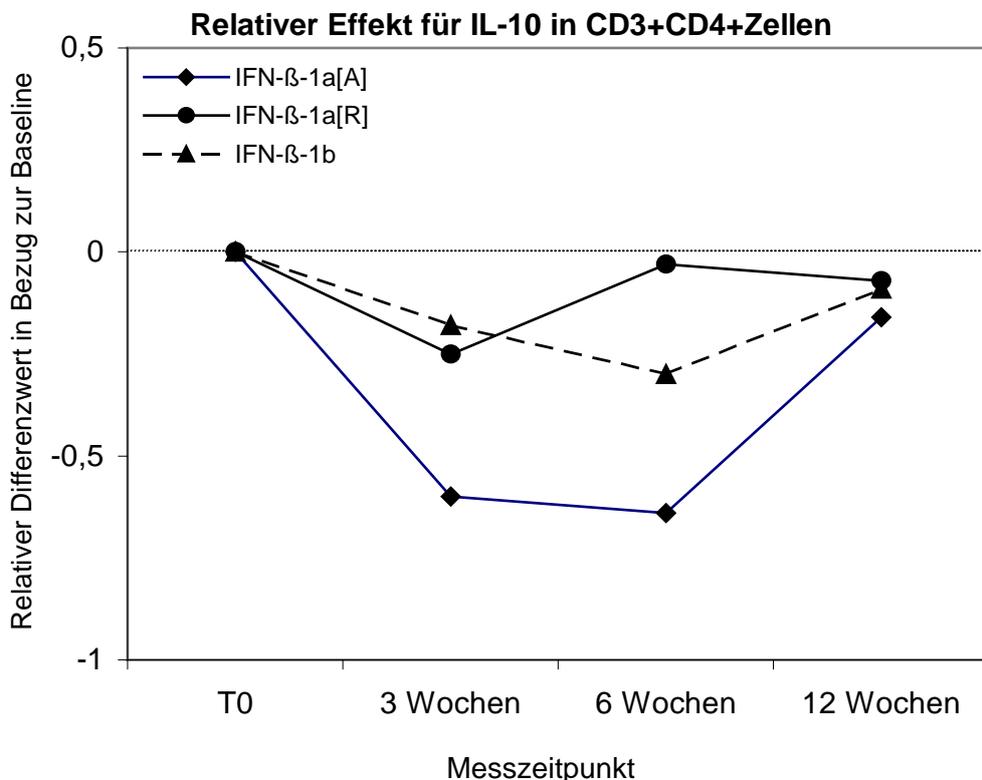


Abb.4.33: Relativer Verlauf der Anzahl IL-10-positiver-CD3+CD4+Zellen bei IFN- β -therapierten MS-Patienten. Die dargestellten Werte (T0, 3 Wochen, 6 Wochen, 12 Wochen) entsprechen den Differenzwerten zwischen den zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermittelten prozentualen Anteilen IL-10-positiver-CD3+CD4+Zellen und der Baseline (T0). Der relative Verlaufsunterschied war bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe nach 3 und 6 Wochen hoch signifikant.

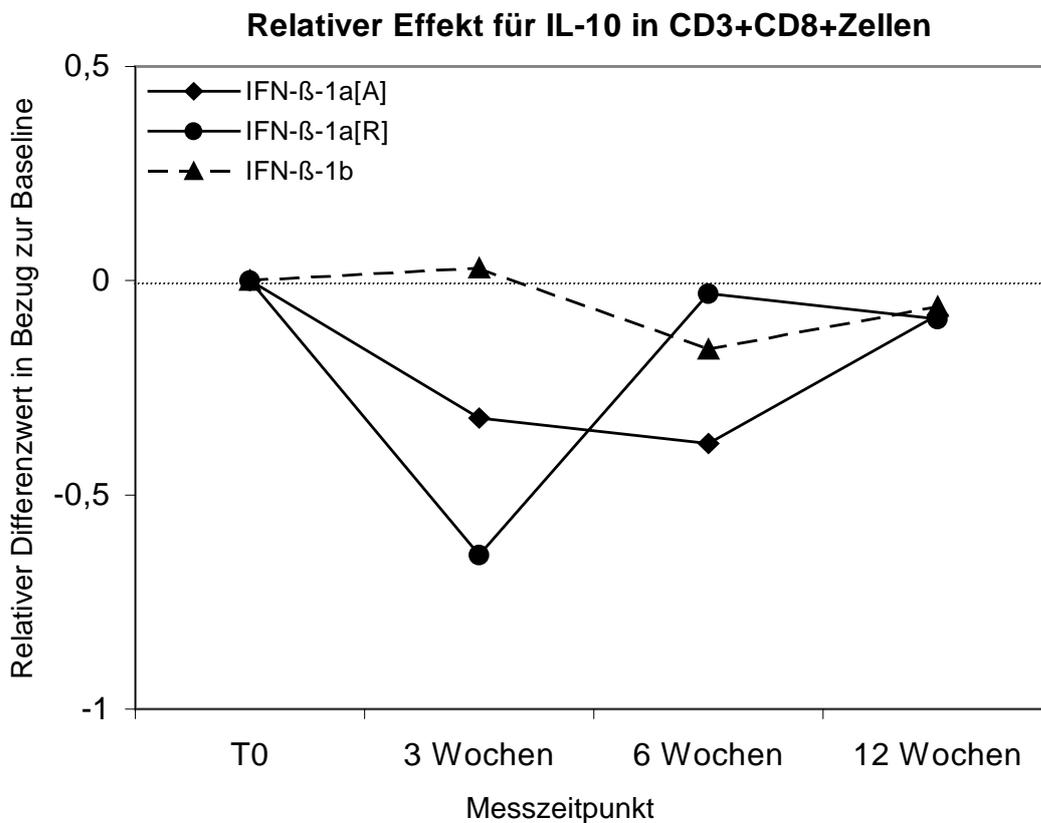


Abb.4.34: Relativer Verlauf der Anzahl IL-10-positiver-CD3+CD8+Zellen bei IFN- β -therapierten MS-Patienten. Die dargestellten Werte (T0, 3 Wochen, 6 Wochen, 12 Wochen) entsprechen den Differenzwerten zwischen den zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermittelten prozentualen Anteilen IL-10-positiver-CD3+CD8+Zellen und der Baseline (T0). Der relative Verlaufsunterschied war bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe nach 3 Wochen hoch signifikant.

Ergebnisse

Parameter	GRUPPE			p(2)
	IFN- β -1a[A]	IFN- β -1a[R]	IFN- β -1b	
	3.Woche*	3.Woche*	3.Woche*	
IFN- γ in CD3+Zellen	2,6	-3,3	-0,3	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN- γ in CD3+CD4+Zellen	0,5	-3,3	-0,2	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN- γ in CD3+CD8+Zellen	0,8	-5,7	-3,0	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4 in CD3+Zellen	0,6	-0,4	0,1	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4 in CD3+CD4+Zellen	1,5	-0,5	0,1	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4 in CD3+CD8+Zellen	-0,4	0,2	0,0	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-10 in CD3+Zellen	-0,5	-0,3	-0,2	n.s.
p(1)	p < 0,01	n.s.	n.s.	
IL-10 in CD3+CD4+Zellen	-0,6	-0,3	-0,2	n.s.
p(1)	p < 0,01	n.s.	n.s.	
IL-10 in CD3+CD8+Zellen	-0,3	-0,6	0,0	n.s.
p(1)	n.s.	p < 0,01	n.s.	

Tab.4.10: Vergleich der Anzahl IFN- γ -, IL-4 und IL-10-positiver-T-Zellen des peripheren Blutes zum Zeitpunkt T1. Untersucht wurden die relativen Verlaufsunterschiede zwischen den IFN- β -therapierten Gruppen anhand von Differenzwerten in Bezug zur Baseline. *= die dargestellten Werte entsprechen den Differenzwerten zwischen den ermittelten prozentualen Anteilen Zytokin-positiver Zellen zu T1 (drei Wochen nach Studienbeginn) und der Baseline; p(1) = Veränderung zwischen den Messzeitpunkten (T0/T1); p(2) = Veränderung zwischen den Gruppen.

Ergebnisse

Parameter	GRUPPE			p(2)
	IFN- β -1a[A]	IFN- β -1a[R]	IFN- β -1b	
	6.Woche*	6.Woche*	6.Woche*	
IFN- γ in CD3+Zellen	-1,1	-0,7	0,4	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN- γ in CD3+CD4+Zellen	-3,1	-0,6	0,2	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IFN- γ in CD3+CD8+Zellen	-1,3	-1,3	-1,8	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4 in CD3+Zellen	-0,2	0,0	-0,2	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4 in CD3+CD4+Zellen	0,0	-0,1	-0,5	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-4 in CD3+CD8+Zellen	-0,7	0,5	0,6	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	
IL-10 in CD3+Zellen	-0,6	-0,0	-0,3	n.s.
p(1)	p < 0,01	n.s.	n.s.	
IL-10 in CD3+CD4+Zellen	-0,6	-0,0	-0,3	n.s.
p(1)	p < 0,01	n.s.	n.s.	
IL-10 in CD3+CD8+Zellen	-0,4	-0,0	-0,2	n.s.
p(1)	n.s.	n.s.	n.s.	

Tab.4.11: Vergleich der Anzahl IFN- γ -, IL-4 und IL-10-positiver-T-Zellen des peripheren Blutes zum Zeitpunkt T2. Untersucht wurden die relativen Verlaufsunterschiede zwischen den IFN- β -therapierten Gruppen anhand von Differenzwerten in Bezug zur Baseline. *= die dargestellten Werte entsprechen den Differenzwerten zwischen den ermittelten prozentualen Anteilen Zytokin-positiver Zellen zu T2 (sechs Wochen nach Studienbeginn) und der Baseline; p(1) = Veränderung zwischen den Messzeitpunkten (T0/T2); p(2) = Veränderung zwischen den Gruppen.

Ergebnisse

4.4.4.4 Korrelation der Expression der immunologischen Parameter mit dem Auftreten von Nebenwirkungen oder vorliegender Begleit-medikation

Innerhalb der Longitudinalstudie (2) (Präparatevergleich) wurde der mögliche Einfluss des Auftretens von Nebenwirkungen bzw. dem Vorliegen einer Begleitmedikation auf die Expression der analysierten immunologischen Parametern untersucht (Tab.9.18-19; Anhang).

Als Nebenwirkungen wurden während der Studie auftretende grippale Symptome wie Schüttelfrost, Fieber und Kopfschmerzen definiert. Die erfasste Begleitmedikation setzte sich aus Schmerzmitteln (z.B. Ibuprofen) und Immunsuppressiva (Kortison) zusammen. Das prozentuale Auftreten von Nebenwirkungen und Begleitmedikation innerhalb der einzelnen Patientengruppen ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

	Therapiegruppe		
	IFN- β -1a[A]	IFN- β -1a[R]	IFN- β -1b
Nebenwirkungen	54% (n=7)	50% (n=7)	30% (n=3)
Begleitmedikation	46% (n=6)	46% (n=6)	50% (n=5)

Nebenwirkungen:

Innerhalb der IFN- β -1a[A]-Gruppe konnte festgestellt werden, dass Patienten mit grippalen Nebenwirkungen mehr IFN- γ -positive CD3+CD8+Zellen, IL-10-positive CD3+Zellen sowie IL-10-positive CD3+CD4+Zellen besaßen.

Bei der IFN- β -1b-Gruppe wurden im Rahmen der statistischen Auswertungen höhere prozentuale Anzahlen an IFN- γ -positiven CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen bei MS-Patienten mit grippalen Symptomen detektiert (Tab.9.18).

Ergebnisse

Begleitmedikation:

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen einer vorliegenden Begleitmedikation und der Expression der immunologischen Parameter ergab, dass bei allen drei IFN- β -Therapiegruppen die immunologischen Parameter unabhängig von einer Begleitmedikation exprimiert wurden (Tab.9.19, Anhang).

5 Diskussion

5.1 Etablierung der Durchflusszytometrie

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durchflusszytometrische Nachweismethoden für die Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-10 und die Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R bei Leukozyten des peripheren Blutes zu etablieren. Als Grundlage hierfür wurde die von SANDER ET AL. (1991) entwickelte und von PRUSSIN UND METCALFE (1995) modifizierte Methode herangezogen. Im Rahmen von Stimulationsassays wurde die Methode optimiert und den gegebenen Laborbedingungen angepasst.

Die Durchflusszytometrie wurde gewählt, weil mit ihr eine Detektion der Zytokin(Rezeptoren)proteine in der Zelle bzw. auf der Zelloberfläche möglich ist. Zytokine wirken hauptsächlich auto- oder parakrin. Aus diesem Grund sind Versuche, die sie als zirkulierende Moleküle im Blut messen, unzuverlässiger als die Durchflusszytometrie. Durch die Möglichkeit, sowohl extrazelluläre Epitope als auch intrazelluläre Zytokine in der gleichen Zelle zu messen, ist die Durchflusszytometrie zudem eine äusserst wirkungsvolle Methode, um die Zytokin(Rezeptoren)expression in definierten Zellpopulationen zu bestimmen. Neben der Zellpopulationszuordnung und der Messung auf Einzelzellebene ist bei dieser Technik weiterhin die Analyse einer großen Zellzahl innerhalb kürzester Zeit sowie die relativ einfache Handhabung von Vorteil. Mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten Vierfarben-Durchflusszytometer (FACSCalibur®, Becton Dickinson) bestand die Möglichkeit, vier verschiedene Antigene gleichzeitig zu erfassen, wodurch z.B. eine Zuordnung der Zytokin(Rezeptoren)profile nicht nur zu CD3+Zellen, sondern auch den beiden Subpopulationen CD4+Zellen und CD8+Zellen erreicht wurde.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse von **intrazellulären Zytokinen** ist es aufgrund der in Zellsuspensionen geringen spontanen Zytokinproduktion nötig, diese *in-vitro* zu stimulieren (SANDER ET AL., 1991; TAYEBI ET AL., 1999). Da Zytokine rasch aus der Zelle sezerniert werden, muss darüber hinaus für ihren

Diskussion

intrazellulären Nachweis eine **Hemmung der Sekretion** erfolgen (SCHMITZ ET AL., 1993; JUNG ET AL., 1993). Am besten gelingt dies durch Koinkubation mit sog. Golgi-Apparat-Hemmern, wie Brefeldin A oder Monensin. Monensin, ein Metabolit von *Streptomyces cinnamonensis*, ist ein Na⁺-Ionophor, der durch Veränderung der intrazellulären Na⁺- und H⁺-Gradienten den Proteintransport durch den Golgi-Apparat blockiert (MOLLENHAUER ET AL., 1990). Brefeldin A, ein Makrolid-Antibiotikum, welches von verschiedenen Pilzen synthetisiert wird, blockiert bereits den Transport der Zytokine zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (FUJIWARA ET AL., 1988). Beide Sekretionsinhibitoren führen zu einer Akkumulation der Zytokine im Zytoplasma. Nach Markierung mit monoklonalen Fluorochrom-konjugierten-Antikörpern können diese dann durchflusszytometrisch detektiert werden. Da sich Monensin in der Akkumulation der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 als deutlich effektiver als Brefeldin A erwiesen hat, wurde es auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt (PHARMINGEN, 1999).

In der Mehrzahl der bisher durchgeführten Studien wurde zur **Stimulation von Leukozyten** des peripheren Blutes eine Kombination aus dem Proteinkinase-C-Liganden Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und dem Ionophor Ionomycin sowie dem Sekretionshemmer Monensin verwendet. Durch eine polyklonale Stimulation der Leukozyten werden durchflusszytometrisch gut detektierbare Mengen an IFN- γ -, IL-4- und IL-10-positiven Zellen gebildet. (SANDER ET AL., 1991; JUNG ET AL., 1993; PRUSSIN UND METCALFE, 1996, TAYEBI ET AL., 1999). Bei Verwendung anderer Stimulantien wie z.B. Phytohämagglutinin (JUNG ET AL., 1993) oder spezifischem Antigen in Kombination mit antigenpräsentierenden Zellen (PALA ET AL., 2000) wurden deutlich geringere Anzahlen an IFN- γ -, IL-4- oder IL-10-positiven-Zellen nachgewiesen. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse wurden deshalb auch in der vorliegenden Studie PMA, Ionomycin und Monensin zur Stimulation von Leukozyten des peripheren Blutes eingesetzt. Dabei wurde im Rahmen der durchgeführten Stimulationsassays die Kombination aus 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin als optimale Stimulatorenkonzentration ermittelt. In den diesbezüglichen Literaturangaben setzten die meisten Arbeitsgruppen vergleichbare Konzentrationen ein (SANDER ET AL., 1991; JUNG ET AL., 1993; PRUSSIN UND METCALFE, 1996; TAYEBI ET AL., 1999).

Diskussion

Hinsichtlich der **Inkubationszeit** wurde in den durchgeführten Versuchen eine optimale Stimulationszeit von vier Stunden ermittelt. Nach der vierstündigen Stimulation der Heparinblutproben mit PMA, Ionomycin und Monensin wurden die Maximalwerte an IL-4- und IL-10-positiven CD3+Zellen nachgewiesen. Bei Untersuchung der IFN- γ -Produktion waren zwar nach 24-stündiger Stimulation am meisten IFN- γ -positive-CD3+Zellen festzustellen, zu diesem Zeitpunkt lagen aber die prozentualen Anteile IL-4- und IL-10-positiver CD3+Zellen deutlich unter 1 % und damit nahe der Detektionsgrenze des Durchflusszytometers. Aus diesem Grund und da mit der vierstündigen Stimulation bereits 75 % des Maximalwertes an IFN- γ -positiven CD3+Zellen erreicht wurden, wurde für die gegebenen Laborbedingungen eine Stimulationszeit von vier Stunden als optimal angesehen.

Diese Ergebnisse werden im wesentlichen durch die Angaben aus der Literatur bestätigt. Kinetikstudien von SANDER ET AL. (1991) zeigten unter Verwendung der gleichen Stimulatoren ähnliche Ergebnisse. Nach vier bis sechs Stunden Inkubationszeit wurde der Maximalwert an IL-4-positiven Zellen ermittelt. Bei Bestimmung der IFN- γ -positiven Zellen wurde ein biphasischer Verlauf mit einem Maximum nach vier bis sechs Stunden und einem Zweitem nach 24 Stunden beobachtet. CRUCIAN ET AL. (1996) wiesen dagegen nach 24-stündiger Stimulationszeit mit PMA, Ionomycin und Monensin abfallende prozentuale Anteile an IFN- γ -positiven T-Zellen nach. Gegensätzlich zu den in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnissen war die Beobachtung, dass IL-10-positive T-Zellen i.d.R. erst nach 24-stündiger Stimulationszeit detektierbar waren (CRUCIAN ET AL., 1996). Insgesamt gesehen wurde in der Mehrzahl der bisherigen Veröffentlichungen ebenfalls eine vier- bis sechsstündige Inkubationszeit gewählt (SANDER ET AL., 1991; CRUCIAN ET AL., 1996; TAYEBI ET AL., 1999; FRANCIOTTA ET AL., 2000; PALA ET AL., 2000).

Bei Verwendung der Stimulatoren PMA und Ionomycin für den intrazellulären Nachweis von Zytokinen sollten keine EDTA- oder Ca-haltige **Antikoagulantien** verwendet werden. Diese besitzen über eine Ca-Komplexbildung einen aktivierungshemmenden Effekt, d.h. sie verhindern insbesondere die Ca-abhängige

Diskussion

Stimulation durch Ionomycin (TAYEBI ET AL., 1999). Als Alternative zum üblicherweise für Blutkulturen verwendeten Heparinblut kam noch Citratblut in Frage.

Hinsichtlich der Anzahl an IFN- γ -, IL-4- und IL-10-positiven CD3+Zellen erwies sich Heparin als das am besten geeignete Antikoagulans. Die ermittelten prozentualen Anteile waren deutlich höher als bei Verwendung von Citrat (IFN- γ -positive CD3+Zellen: $20,2 \pm 7,7$ % zu $16,4 \pm 6,6$ %; IL-4-positive CD3+Zellen: $1,3 \pm 0,6$ % zu $0,6 \pm 0,3$ % und IL-10-positive CD3+Zellen: $0,6 \pm 0,4$ % zu $0,4 \pm 0,2$ %). Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von TAYEBI ET AL. (1999) überein. TAYEBI ET AL. detektierten in Heparinblutproben $34,3 \pm 5,0$ % IFN- γ -positive Zellen und $0,4 \pm 0,2$ % IL-4-positive Zellen, während sie in Citratblutproben nur $6,8 \pm 2,7$ % IFN- γ -positive Zellen und $0,1 \pm 0,1$ % IL-4-positive Zellen ermittelten. Als Ursache dieses deutlichen Unterschiedes vermuteten sie, dass auch das Citrat mit den Stimulatoren PMA oder Ionomycin über eine Ca-Komplexbildung oder eventuell sogar mit der Zytokinfärbung interferiert.

Bei der Ermittlung der geeignetsten **Lagerzeit** der Blutproben stellte sich heraus, dass eine 24-stündige Lagerung der Blutproben zu veränderten Werten hinsichtlich der Anzahl an detektierten IFN- γ -positiven und IL-10-positiven CD3+Zellen führt. Im Vergleich zu den sofort nach der Blutentnahme verarbeiteten bzw. drei Stunden gelagerten Blutproben waren die ermittelten Anteile an IFN- γ -positiven CD3+Zellen nach der 24-stündigen Lagerung deutlich höher. Die Anzahl an IL-10-positiven CD3+Zellen war dagegen nach 24-stündiger Lagerung niedriger als bei keiner oder kurzer Lagerung der Blutproben. Die Anteile an IL-4-positiven CD3+Zellen waren an allen Untersuchungszeitpunkten einheitlich. Aufgrund der festgestellten Veränderungen nach 24-stündiger Lagerung im Vergleich zu direkt verarbeiteten Blutproben wurden bei der Anwendung des Methodenprotokolls eine Lagerung von mehr als drei Stunden ausgeschlossen. Diese Befunde decken sich nicht mit Ergebnissen von TAYEBI ET AL. (1999), die auch nach 24-stündiger Lagerung der Blutproben eine unveränderte Anzahl an IFN- γ -positiven T-Zellen feststellten.

Diskussion

Auffällig waren die in der vorliegenden Arbeit allgemein sehr niedrigen Anzahlen an detektierbaren IL-4- und IL-10-positiven T-Zellen. Während bei der durchflusszytometrischen Analyse der IL-4-positiven Zellen noch ein relativ deutliches Signal erfasst werden konnte, lag die Anzahl an IL-10-positiven T-Zellen mit Werten um 1 % nahe der Sensitivitätsgrenze des Durchfluss-zytometers. Da diese geringen Werte nicht auf ein methodisches bzw. technisches Problem der intrazellulären Färbemethode zurückzuführen sind, belegen die Untersuchungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen. In diesen Studien waren die Anteile an IL-4- bzw. IL-10-positiven Zellen ebenfalls im Bereich von 1-5 % (JUNG ET AL., 1993; PICKER ET AL., 1995; CRUCIAN ET AL., 1997; CHALMERS ET AL., 1998; TAYEBI ET AL., 1999; PALA ET AL., 2000). Die Befunde sind zudem vergleichbar mit den Ergebnissen aus ELISPOT-Untersuchungen von KABILAN ET AL. (1990).

Neben dem Nachweis der intrazellulären Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 wurde auch der Nachweis der membranständigen **Zytokinrezeptoren** IFN-R-II und IL-4R auf Leukozyten des peripheren Blutes geführt. Wie bereits in Kap.1.4 erwähnt, wurden die membranständigen IFN-R-II und IL-4R bisher selten durchflusszytometrisch auf Leukozyten des peripheren Blutes nachgewiesen (ARMITAGE ET AL., 1993; ZOLA ET AL., 1993; KIERSZENBAUM ET AL., 1995; CHAN ET AL., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden, entsprechend den Versuchen von ZOLA ET AL. (1993), KIERSZENBAUM ET AL. (1995) und CHAN ET AL. (1996), zur Markierung des IFN-R-II und des IL-4R auf Leukozyten des peripheren Blutes direkt Fluorochrom-konjugierte monoklonale Antikörper verwendet. Da in den verschiedenen Studien sowohl unstimulierte Blutproben (ZOLA ET AL., 1993; KIERSZENBAUM ET AL., 1995; CHAN ET AL., 1996) als auch stimulierte Blutproben (KIERSZENBAUM ET AL., 1995) untersucht wurden, wurde dies auch in dieser Arbeit getan. Dabei wurde jedoch nicht das von KIERSZENBAUM ET AL. (1995) eingesetzte *Staphylococcus aureus Cowan-I* als Stimulans verwendet, sondern in Anlehnung an die bereits durchgeführten Stimulationsassays eine vierstündige Stimulation mit PMA und Ionomycin vorgenommen.

Diskussion

Eine Markierung des IFN-R-II und des IL-4R auf der Oberfläche von Leukozyten des peripheren Blutes mit direkt Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern gelang nur auf unstimulierten Blutproben. Hierbei war verglichen mit der parallel mitgeführten Negativkontrolle im Falle des anti-IFN-R-II-Antikörpers eine Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität von 3,3 auf 106,7 und im Falle des anti-IL-4R-Antikörpers von 2,2 auf 19,9 zu beobachten. Diese Fluoreszenzintensitätszunahme um den Faktor 30 bzw. Faktor 10 weist eindeutig auf eine stattgefundenene spezifische Bindung der anti-IFN-R-II bzw. anti-IL-4R-Antikörper hin. Die durchflusszytometrische Analyse der mit PMA und Ionomycin stimulierten Blutproben ergab dagegen ein negatives Ergebnis. In diesen Versuchsansätzen waren die ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten der mit anti-IFN-R-II bzw. anti-IL-4R-markierten Proben nahezu identisch mit den jeweiligen Negativkontrollen. Das heisst, hier konnte keine spezifische Bindung der anti-Zytokinrezeptoren-Antikörper nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnten die durch die polyklonale Stimulation produzierten Zytokine sein. Eine Herabregulation des membranständigen IL-4R auf humanen Lymphozyten durch IFN- γ wurde bereits von BYRON ET AL. (1991) beobachtet. Ein anderer Grund könnte die PMA/ Ionomycin-Stimulation an sich sein, wie die Ergebnisse von SKRENTA ET AL. (2000), die zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht vorlagen, vermuten lassen.

Bevor mittels der beiden neu etablierten Methoden Untersuchungen im Rahmen einer Patientenstudie durchgeführt wurden, wurde noch ihre **Reproduzierbarkeit** überprüft. Die angewandte Methode des intrazellulären Nachweises der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Positivzellen kontrolliert (HICK-1- und HICK-2-Zellen, Pharmingen®). Bei den verwendeten Positivzellen handelte es sich um aktivierte und fixierte humane Leukozyten, die entweder durchflusszytometrisch detektierbare Mengen an IFN- γ (HICK1-Zellen) oder an IL-4 und IL-10 (HICK-2-Zellen) exprimierten. Diese Positivzellen wurden parallel zu Probandenblutproben untersucht und nach genau dem gleichen Protokoll intrazellulär gefärbt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Positiv- und Probandenblutzellen konnte festgestellt werden, dass sich die Populationen der

Diskussion

IFN- γ -, IL-4- und IL-10-positiven-CD3+Zellen in beiden Ansätzen eindeutig darstellen ließen. Ein weiterer Aspekt, der für die erfolgreiche intrazelluläre Markierung der Zytokine sprach, waren die vergleichbaren prozentualen Anteile an IFN- γ -, IL-4- und IL-10-positiven CD3+Zellen in Positiv- und Probandenblutzellen sowie ihre identische „kometenschweifartige“ Darstellung im Zweifarben-DotPlot.

Die Reproduzierbarkeit der experimentellen Methoden wurde des Weiteren über die Ermittlung der biologisch-(individuell-) und technisch-bedingten Varianzen kontrolliert. Dabei wurden die Variationskoeffizienten der Intra-Sample, Intra- und Inter-Assay-Präzision errechnet. Um von einer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sprechen zu können, sollte der Variationskoeffizient unter 20 % betragen (AUSTIN UND MCINTOSH, 2000; NOMURA ET AL., 2000). Die statistische Auswertung zeigte, dass die Varianz zwischen wiederholten Messungen der gleichen Probe (Intra-Sample-Präzision) und die Varianz innerhalb eines Versuchsansatzes (Intra-Assay-Präzision) begrenzt war. Die ermittelten Variationskoeffizienten aller untersuchten Parameter lagen bei beiden Varianzen deutlich unter der 20 % Grenze. Die Bestimmung der Varianz zwischen unabhängigen Versuchsansätzen (Inter-Assay-Präzision) ergab ein ähnliches Bild. Auch hier betrug die Mehrzahl der errechneten Variationskoeffizienten unter 20 %. Ausnahmen waren bei Bestimmung der IL-10-positiven T-Zellen festzustellen. Bei allen drei untersuchten T-Zellpopulationen erreichten bzw. überschritten die Variationskoeffizienten die 20 %-Grenze (CD3+Zellen: 27,3 %; CD4+Zellen: 20,0 % und CD8+Zellen: 27,3 %). Aufgrund der niedrigen Messwerte der IL-10-positiven-Zellen hat eine geringe Abweichung, die infolge des schwachen Signals und damit der Detektionsschwierigkeit auftreten kann, große Auswirkungen bei der Berechnung des Variationskoeffizienten. Daher sind in diesem Messbereich höhere Variationskoeffizienten tolerierbar.

Zur Erhaltung der Reproduzierbarkeit wurden die im Rahmen der Stimulationsassays als optimal ermittelten Stimulationsbedingungen bei der sich anschließenden Patientenstudie als Standard definiert und strikt befolgt. Zusammengefasst heisst das, dass immer heparinisiertes und nicht länger als drei Stunden gelagertes Blut verwendet wurde. Für den intrazellulären Zytokinnachweis erfolgte immer eine

vierstündige Stimulation der Blutproben mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin.

5.2 Patientenstudie

Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war, die neu etablierten durchflusszytometrischen Nachweismethoden im Rahmen einer Patientenstudie anzuwenden. Die postulierte Hypothese einer Immunpathogenese sowie der entzündliche Charakter der MS-Erkrankung impliziert eine Beteiligung immunregulatorischer Zytokine. Auch die in den Literaturangaben häufig beschriebene Dysregulation des systemischen Zytokinnetzwerks lässt für die Zytokine eine tragende Rolle bei der MS-Pathogenese vermuten (FREI ET AL., 1991; LINK ET AL., 1994; RIECKMANN ET AL., 1994, 1995; NAVIKAS ET AL., 1995; CLERICI ET AL., 2001). Doch ihre genaue Wirkungsweise im Krankheitsverlauf der MS ist noch nicht vollständig geklärt. Deshalb wurde in der vorliegenden Patientenstudie einerseits die Frage untersucht, ob sich Veränderungen des Zytokin(Rezeptoren)profils als mögliche Diagnose- oder Aktivitätsmarker erweisen können und andererseits, ob ein modulatorischer Einfluss einer IFN- β -Therapie auf das Zytokin(Rezeptoren)profil nachzuweisen ist. Dazu wurden zwei Studien ausgewertet:

1. eine Querschnittsstudie,
welche einerseits die immunologischen Profile von gesunden Probanden und MS-Patienten miteinander verglich,
und andererseits verschiedene Einflussfaktoren auf die Expression der immunologischen Parameter untersuchte
2. eine Longitudinalstudie,
welche den Einfluss einer IFN- β -Therapie auf die untersuchten immunologischen Parameter betrachtete

Zur Erstellung des Zytokin(Rezeptoren)profils wurden dabei als typische Vertreter der Th1-vermittelten Immunantwort IFN- γ und IFN-R-II gewählt, sowie als Vertreter

Diskussion

der Th2-Antwort IL-4, IL-4R und IL-10. Die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 wurden intrazellulär in CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellen des peripheren Blutes detektiert. Die membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R wurden auf der Oberfläche von CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen, CD3+CD8+Zellen, CD14+Zellen und CD19+Zellen bzw. CD19+Zellen bestimmt.

5.2.1 Vergleich der Zytokin(Rezeptoren)profile von Gesunden und MS-Patienten

In der Querschnittsstudie wurde das zu Studienbeginn ermittelte Zytokin(Rezeptoren)profil von Gesunden und MS-Patienten miteinander verglichen. Diese Gegenüberstellung der untersuchten immunologischen Parameter beider Gruppen diente der Aufklärung, ob MS-Patienten grundsätzlich ein verändertes Zytokin(Rezeptoren)profil im Vergleich zu gesunden Individuen haben. Anhand dessen wäre dann die Möglichkeit gegeben, bei der Diagnosestellung der MS immunologische Parameter miteinzubeziehen.

Die Auswertung der in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigte, dass der einzige Parameter, der objektiv zur Abgrenzung zwischen Gesunden und MS-Patienten dienen könnte, der Anteil an IL-10-positiven CD3+Zellen bzw. CD3+CD4+Zellen war. In diesen beiden Zellpopulationen ließen sich für die gesunden Probanden hoch signifikant niedrigere prozentuale Anteile an IL-10-positiven T-Zellen als bei den MS-Patienten nachweisen. Die prozentualen Anteile an IL-4- und IFN- γ -positiven T-Zellen sowie die Expressionswerte der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R auf Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes lagen dagegen bei den MS-Patienten und dem Gesundenkollektiv in vergleichbaren Bereichen. Die weitere Differenzierung des MS-Patientenkollektivs zeigte, dass die Unterschiede insbesondere zwischen den rekrutierten RRMS-Patienten und Gesunden vorlagen. Die RRMS-Patienten besaßen dabei nicht nur deutlich höhere Anzahlen an IL-10-positiven CD3+Zellen bzw. CD3+CD4+Zellen, sondern auch an IFN- γ -positiven CD3+CD4+Zellen. Die SPMS-Patienten unterschieden sich in ihrem

Diskussion

Zytokin(Rezeptoren)profil weder von dem Gesundenkollektiv noch von den RRMS-Patienten.

Das die beobachteten Unterschiede in der IL-10- bzw. IFN- γ -Expression nicht auf der unterschiedlichen Alters- und Geschlechtsstruktur der beiden Gruppen beruhten, konnte anhand der durchgeführten Homogenitäts- und Korrelationsüberprüfungen belegt werden. Kritisch betrachtet werden müssen dagegen die niedrigen prozentualen Anteile der IL-10-positiven T-Zellen. Die Detektion des intrazellulären IL-10 bewegte sich mit Prozentwerten um 1 % nahe der Sensitivitätsgrenze des Durchflusszytometers. Zudem führen in diesen Zahlenbereichen bereits geringe Unterschiede zu statistischen Auffälligkeiten.

Trotz dieses Kritikpunktes sind die signifikant unterschiedlich hohen Anzahlen an IL-10-positiven CD3+Zellen bzw. CD3+CD4+Zellen zwischen gesunden Probanden und RRMS-Patienten beachtenswert. Dies bestätigen die durchflusszytometrischen Untersuchungen von INOGES ET AL. (1999). In einem ähnlichen Versuchsaufbau, wie in der vorliegenden Studie angewandt, wiesen INOGES ET AL. bei klinisch aktiven MS-Patienten deutlich höhere Anteile an IL-10-positiven Lymphozyten im Vergleich zu Gesunden nach. Klinisch inaktive MS-Patienten unterschieden sich dagegen kaum von den gesunden Probanden. Das gleiche Bild ergab die Untersuchung von IFN- γ -positiven Lymphozyten. Des weiteren wurde in Studien mit einem umfassenderen Zytokinprofil ebenfalls eine parallele Erhöhung der proinflammatorischen (IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-12) und der antiinflammatorischen Zytokine (TGF- β , IL-10) bei Gegenüberstellung von Gesunden und MS-Patienten nachgewiesen (LINK ET AL., 1994a; 1998). Dabei ist zu bedenken, dass LINK ET AL. ihre Untersuchungen auf mRNA-Ebene durchführten.

In der Literatur sind aber auch von den vorliegenden Arbeit abweichende Studienergebnisse beschrieben. BONGIOANNI ET AL. (1996) wiesen zum Beispiel auf T-Zellen des peripheren Blutes bei MS-Patienten eine geringere Anzahl des IFN-R-II im Vergleich zu Gesunden nach. Untersuchungen auf mRNA-Ebene von HUANG ET AL. (1999) lieferten ebenfalls widersprechende Resultate. Sie fanden in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von MS-Patienten erniedrigte IL-10-mRNA-Spiegel. Außerdem konnten sie bei der IFN- γ -mRNA-Expression keine

Diskussion

Unterschiede zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden feststellen (HUANG ET AL, 1999). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von DURAN ET AL. (2001) ermittelte sogar kaum differierende prozentuale Anteile an IFN- γ -, TNF- α -, IL-6, IL-10- und IL-12-positiven Zellen des peripheren Blutes beim Vergleich von SPMS-, RRMS-, PPMS-Patienten und Gesunden.

Trotz dieser zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass sich zumindest klinisch aktivere MS-Patienten in ihrem Zytokinprofil von Gesunden unterscheiden. Aus diesem Grund und in Hinblick auf die genannten Kritikpunkte ist es sicherlich notwendig, die gefundenen Resultate durch weitere Untersuchungen abzuklären. Insbesondere sollte auch die Spezifität des immunologischen Profils im Vergleich mit differentialdiagnostisch relevanten ZNS-Erkrankungen getestet werden.

5.2.2 Einfluss des klinischen Verlaufes auf die Zytokin(Rezeptoren) Expression

Obwohl tierexperimentelle Untersuchungen in der Mehrzahl auf eine Th1-vermittelte Erkrankung hinweisen, war es bisher im humanen Krankheitsverlauf nicht möglich, eine konstante Korrelation zwischen Krankheitsaktivität der MS und einem definierten Zytokinprofil herzustellen (LINK, 1998). Diese offene Frage wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und experimentell untersucht. Zu diesem Zweck wurde überprüft, ob Zusammenhänge zwischen der Expression der analysierten immunologischen Parametern und definierten klinischen Parametern (Krankheitsdauer, Anzahl der Schübe, EDSS-Score und Progressionsindex) bestehen.

Dabei konnte bei Betrachtung aller rekrutierten MS-Patienten festgestellt werden, dass sowohl die intrazellulären Zytokine als auch die membranständigen Zytokinrezeptoren unabhängig von der Krankheitsdauer, der Anzahl der Schübe in den vorausgegangenen 24 Monaten und der EDSS-Score exprimiert wurden. Die Krankheitsprogression beeinflusste indessen die Expression der untersuchten immunologischen Parameter. MS-Patienten mit einem höheren Progressionsindex wiesen eine höhere Anzahl an IL-4-positiven-CD3+CD4+Zellen auf. Negativ mit dem

Diskussion

Progressionsindex korrelierte hingegen die Anzahl an IL-4-positiven CD3+Zellen, IL-10-positiven-CD3+Zellen und IL-10-positiven-CD3+CD8+Zellen.

Dieser Effekt war vermutlich bedingt durch die SPMS-Patienten. Innerhalb des SPMS-Patientenkollektivs war ein höherer Progressionsindex verbunden mit geringeren Anzahlen an IL-4-positiven und IL-10-positiven T-Zellen.

Die herausgefundenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass IL-4 und IL-10 mit einer verminderten Progression der Erkrankung, insbesondere bei chronisch progredienten Verlauf, einhergehen und so den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen. Die ermittelten höheren Anteile IL-10-positiver T-Zellen bei SPMS-Patienten mit einer längeren Krankheitsdauer widersprechen dieser Annahme nicht, da bei dieser Betrachtung nicht das Fortschreiten der Erkrankung bzw. Behinderung berücksichtigt wird.

Für die These sprechen zudem die meisten Literaturangaben, in welchen für die Th1-Zytokine eine krankheitsfördernde und für die Th2-Zytokine eine den Krankheitsverlauf stabilisierende Wirkung beschrieben ist. PANITCH ET AL. (1987) zeigten in einer Therapiestudie, dass es bei RRMS-Patienten nach Gabe von IFN- γ zu einem vermehrten Auftreten von Schüben, einer erhöhten Anzahl an MHC-Klasse-II-Genprodukte-exprimierender Monozyten sowie einer erhöhte NK-Zell-Aktivität kam. Mehrere Arbeitsgruppen konnten eine Korrelation zwischen ihren experimentellen Untersuchungsergebnissen und dem klinischen Krankheitsverlauf demonstrieren. Hierbei war die Th1-Antwort bzw. die IFN- γ -Expression in der aktiven Erkrankungsphase im Vergleich zum stabilen Krankheitsverlauf der MS deutlich erhöht (RUDICK UND RANSOHOFF, 1992, DETTKE ET AL., 1997; TEJADA-SIMON ET AL., 2000). Eine dem entgegen wirkende, protektive und stabilisierende Rolle im Krankheitsgeschehen der MS konnte für IL-4 und IL-10 gezeigt werden. Anhand des EAE-Tiermodells gelang es OLSSON (1995) einen Krankheitsausbruch der EAE durch Vorbehandlung der Ratten mit IL-4 und IL-10 zu verhindern. Ebenfalls beschrieben ist eine Verbesserung des klinischen Bildes, wenn Mäusen IL-4 kurz nach Induktion der EAE appliziert wurde (RACKE ET AL., 1994). SODERSTROM ET AL. (1995) wiesen bei MS-Patienten einen Zusammenhang zwischen Zytokinexpression und Krankheitsverlauf nach. Sie stellten mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierungstechnik einen Benefiteffekt für IL-4 fest: IL-4 war bei MS-Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer

Diskussion

und geringerem Behinderungsgrad signifikant erhöht. Von anderen Autoren wurde zudem eine Korrelation zwischen erhöhter IL-10-mRNA-Produktion und der Remissionsphase oder einem weniger aggressiven Krankheitsverlauf aufgezeigt (RIECKMANN ET AL., 1994, 1995; NAVIKAS ET AL., 1995).

Das in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den Studien anderer Arbeitsgruppen (RUDICK UND RANSOHOFF, 1992; RIECKMANN ET AL., 1994, 1995; SODERSTROM ET AL., 1995; DETTKE ET AL., 1997; TEJADA-SIMON ET AL., 2000) keine eindeutige Korrelation mit der klinischen Krankheitsaktivität gefunden wurde, ist vermutlich auf die unterschiedlichen Studiendesigns zurückzuführen. Dabei sind vor allen zwei Punkte zu bedenken. Zum einen die Tatsache, dass von MS-Patienten, die an einem akuten Schub litten, kein Blut abgenommen und untersucht wurde. Zum anderen der Aspekt der Querschnittsstudie, bei welcher ein definierter Zeitpunkt und nicht ein längerer Zeitraum betrachtet wird. Dem ungeachtet liegen aber auch von anderen Arbeitsgruppen Studienergebnisse vor, die eine vom Krankheitsverlauf unbeeinflusste Zytokin-/IFN- γ -Produktion feststellten (HAAHR ET AL., 1986, HERTZOG ET AL., 1991).

5.2.3 Einfluss einer IFN- β -Therapie auf die Zytokin(Rezeptoren) Expression

In den letzten fünf bis sechs Jahren wurden große Fortschritte bei der Behandlung der MS gemacht. Eine der Vielversprechendsten ist die IFN- β -Therapie. Trotz der hinreichend bewiesenen Effektivität (THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP, 1993, 1995; JACOBS ET AL., 1996, PRISMS STUDY GROUP, 1998; EUROPEAN STUDY GROUP; 1998) sind die Wirkungsmechanismen von IFN- β noch nicht vollständig aufgeklärt. Man vermutet aufgrund der Mehrzahl der Studienergebnisse der letzten Jahre und vor allem infolge der postulierten Immunpathogenese der MS, dass IFN- β die Rolle eines Immunmodulators einnimmt. *In-vitro* Experimente haben gezeigt, dass IFN- β die von IFN- γ induzierte Expression an MHC-Klasse-II-Molekülen antagonisiert (LING ET AL., 1985; HUYNH ET AL., 1995) und die Expression kostimulatorischer Proteine wie B7.1/B7.2 auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen inhibiert (Arnason, 1996). Zudem ist für IFN- β eine Hemmung der

Diskussion

Migration und der Proliferation von T-Zellen (LEPPERT ET AL., 1996; STÜVE ET AL., 1996), sowie eine Verbesserung der Funktion von T-Suppressorzellen (NORONHA ET AL., 1990) nachgewiesen worden. *In-vitro*-Befunde beschreiben außerdem für IFN- β eine immunsupprimierende Wirkung infolge der Hemmung der Th-1-Antwort (NORONHA ET AL., 1993b; RUDICK ET AL., 1993; MCRAE ET AL., 1998; KOZOVSKA ET AL., 1999) und der Induktion der Th2-Antwort (PORRINI ET AL., 1995; REP ET AL., 1996; KOZOVSKA ET AL., 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufklärung potentieller Wirkmechanismen von IFN- β der *in-vivo*-Effekt einer IFN- β -Therapie auf das Zytokin(Rezeptoren)profil untersucht. Dazu wurde der spontane Verlauf der analysierten immunologischen Parameter bei untherapierten MS-Patienten mit dem Verlauf von IFN- β -therapierten Patienten anhand einer dreimonatigen Longitudinalstudie verglichen. In der MS-Therapie werden verschiedene IFN- β -Präparate bzw. Applikationsformen eingesetzt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und zur Darstellung eventueller immunmodulatorischer Unterschiede der verschiedenen IFN- β -Präparate, wurden innerhalb der IFN- β -therapierten MS-Patienten drei Gruppen unterschieden

1. auf 3 x 22 μ g/Woche bzw. 3 x 44 μ g/Woche s.c. IFN- β -1a (Rebif[®], Ares-Serono, Serono International SA) eingestellte MS-Patienten
2. auf 6,0 M.I.E./Woche i.m. IFN- β -1a (Avonex[®], Biogen Inc) eingestellte MS-Patienten
3. auf 24,0 M.I.E./Woche s.c. IFN- β -1b (Betaferon[®], Schering AG) eingestellte MS-Patienten.

Im folgenden werden die Gruppen als IFN- β -1a[R]-Gruppe (Gruppe 1), IFN- β -1a[A]-Gruppe (Gruppe 2) und IFN- β -1b-Gruppe (Gruppe 3) bezeichnet.

Aufgrund des offenen Studiendesigns und der Therapiemitsprache der MS-Patienten war eine Anpassung der demographischen Daten zwischen den einzelnen Probandengruppen nicht möglich. Um eine spätere Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden deshalb zuerst die Strukturunterschiede herausgearbeitet. Der Strukturvergleich ergab, dass sich die Probandengruppen zu Studienbeginn hinsichtlich ihrer Alters- und Geschlechtsstruktur, sowie der EDSS-Score, der

Diskussion

Anzahl der akuten Schübe in den letzten 24 Monaten und der Verlaufsform der MS unterschieden. Da diese Unterschiede keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten immunologischen Parameter hatten und somit eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen gegeben war, konnte anhand durchgeführten Korrelationsprüfungen gezeigt werden. Die zu Studienbeginn beobachtete erhöhte Expression des IFN-R-II auf CD3+Zellen und CD3+CD4+Zellen bei der IFN- β -1a[R]-Gruppe im Vergleich zur IFN- β -1a[A]-Gruppe, lässt deshalb vielmehr intra- bzw. interindividuelle Unterschiede vermuten. Dasselbe gilt für die verminderte Anzahl an IL-10-positiven CD3+CD4+Zellen der IFN- β -1a[R]-Gruppe. Möglich wäre weiterhin der Einfluss einer unterschiedlichen subklinischen Krankheitsaktivität. Diese ist aber nur anhand von MRT-Bildern beurteilbar und eine Erfassung dieser Daten ging über den Rahmen der vorliegenden Studie hinaus. Da in den statistischen Auswertungen eine Verlaufsbeurteilung (zwischen den Messzeitpunkten und zwischen den Gruppen) durchgeführt wurde, waren die geschilderten unterschiedlichen Baselinewerte zu vernachlässigen.

Die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen der ambulanten neurologischen Routineuntersuchung, weshalb die Effekte eines akuten Schubes bzw. der sich anschließenden Kortisontherapie während des Studienzeitraumes nicht separat untersucht werden konnten. Aufgrund des statistisch nicht signifikanten Unterschiedes zwischen den Gruppen in Bezug Schubauftreten und folgender Kortisonbehandlung war ein störender Einfluss auf die Ergebnisse unwahrscheinlich.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der immunologischen Parameter konnte nach drei Monaten kein spezifisches immunologisches Profil unter IFN- β -Therapie festgestellt werden. Ein klarer Beleg der Induktion der Th2-Antwort oder der Unterdrückung der Th1-Antwort, wie sie in der Literatur für *in-vitro*-Experimente beschrieben sind, blieb aus. Hinweise auf diesem von IFN- β vermittelten Wirkmechanismus waren aber zu beobachten. Die IFN- β -1a[R]-Gruppe zeigte nach der dreimonatigen IFN- β -Therapie einen signifikanten Abfall der IFN-R-II-Expression auf CD3+Zellen, CD3+CD4+Zellen und CD19+Zellen. Ebenso wurde ein leicht ansteigender (aber statistisch nicht belegbarer) Verlauf der IL-4-positiven-T-Zellen für die IFN- β -1a[R]-Gruppe beobachtet. Dies betraf alle untersuchten T-Zellpopulationen. Gegensätzlich war

Diskussion

einzig die nach drei Monaten leicht vermehrte Expression des IFN-R-II auf der T-Zelloberfläche von IFN- β -1a[A]-therapierten Patienten. Alle anderen untersuchten immunologischen Parameter veränderten sich statistisch nicht signifikant nach der dreimonatigen IFN- β -Therapie.

Der ermittelte deutlich abfallende Verlauf der Anteile an IL-10-positiven-T-Zellen bei den untherapierten MS-Patienten könnte hypothetisch gesehen die Folge von individuellen biologischen Schwankungen im Zytokinprofil von MS-Patienten sein, die dann aufgrund einer Stabilisierung unter einer IFN- β -Therapie nicht mehr vorliegen. Andererseits könnte, kritisch betrachtet, die Ursache auch, wie bereits für die Querschnittsstudie erläutert, in der Methodik liegen. Aufgrund der allgemein niedrigen IL-10-Prozentwerte führen schon geringe Abweichungen zu statistischen Auffälligkeiten.

Unter den wenigen publizierten Longitudinalstudien zur Erfassung des *in-vivo*-Effektes von IFN- β fanden einige entsprechend den oben genannten *in-vitro*-Ergebnissen eine Unterdrückung der Th1-Immunantwort oder eine Induktion der Th2-Immunantwort. Studien von RUDICK ET AL. (1996) haben gezeigt, dass es unter IFN- β -1a zu einer Erhöhung der IL-10-mRNA- und IL-4-mRNA-Spiegel in mononukleären Zellen des peripheren Blutes kommt. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe ansteigende IL-10-Konzentrationen im Liquor mit dem Erfolg einer IFN- β -1a-Therapie korrelieren (RUDICK ET AL., 1998). Aber es wurden auch von der vorliegenden Studie abweichende Ergebnisse veröffentlicht. Einen 48 Stunden nach IFN- β -1b-Therapiebeginn auftretenden und langanhaltenden signifikanten Abfall der IFN- γ -positiven-T-Zellen wurde in einer Longitudinalstudie von PETEREIT ET AL. (1997) beobachtet. FURLAN ET AL. (2000) wiesen ferner bei IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten eine reduzierte Anzahl IL-4-produzierender CD4+Zellen und eine verminderte Zahl IFN- γ -produzierender CD4+Zellen und CD8+Zellen nach. Dieser Effekt war, wie schon von PETEREIT ET AL. (1997) beschrieben, kurz nach Therapiebeginn sichtbar und blieb bis Ende des Beobachtungszeitraumes von neun Monaten bestehen. Die Arbeitsgruppe vermutete aufgrund dieser Ergebnisse eine persistierende Herabregulation IFN- γ - und IL-4-produzierender T-Zellen durch IFN- β .

5.2.4 IFN- β -Präparatvergleich

Aufgrund der intensiveren Betreuung der neu auf ein IFN- β -Präparat eingestellten MS-Patienten konnte bei der IFN- β -1a[A]-, IFN- β -1a[R]- und der IFN- β -1b-Gruppe noch an zwei weiteren Zeitpunkten (drei und sechs Wochen nach Studienbeginn) das Zytokin(Rezeptoren)profil untersucht werden. Auf diese Weise war es möglich, bei den IFN- β -therapierten Patienten relativ kurzfristige Veränderungen der immunologischen Parameter zu erfassen.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die nach drei Monaten festgestellte verminderte Expression des IFN-R-II auf der T-Zelloberfläche von IFN- β -1a[R]-therapierten Patienten bereits drei Wochen nach Therapiebeginn vorlag und danach einen relativ konstanten Verlauf bis zum Studienende aufwies. Dieser initiale Abfall der IFN-R-II-Expressionswerte auf T-Zellpopulationen war tendenziell ebenfalls für die IFN- β -1b-Gruppe zu beobachten. Ein gegensätzlicher Verlauf war bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe erkennbar. Innerhalb dieser Gruppe war ein Anstieg der IFN-R-II-Expressionswerte auf den T-Zellpopulationen nach drei Wochen zu sehen. Diese statistisch nicht signifikant ansteigenden Rfi-Werte waren auch sechs Wochen nach Therapiebeginn noch sichtbar. Die Anzahl der IL-10-positiven T-Zellen, die sich, wie oben angeführt, bei Betrachtung zu Studienbeginn und nach sechs Monaten bei keiner der drei IFN- β -Therapiegruppen veränderte, wies an den dazwischenliegenden Untersuchungszeitpunkten statistisch nachweisbare Unterschiede auf. Nach dreiwöchiger IFN- β -Therapie war bei der IFN- β -1a[A]-Gruppe ein hoch signifikanter Abfall an IL-10-positiven CD3+Zellen und IL-10-positiven CD3+CD4+Zellen festzustellen. Auch nach sechs Wochen war dieser Unterschied noch nachweisbar. Die IFN- β -1b-Gruppe, zeigte ähnliche, wenn auch nicht so eindeutige Verläufe. Auch für die IFN- β -1a[R]-Gruppe war eine Verminderung der IL-10-positiven CD3+Zellen nach drei- und sechswöchiger IFN- β -Therapie festzustellen. Innerhalb der CD3+CD4+Zellen und CD3+CD8+Zellpopulation war hingegen bereits nach sechs Wochen ein Anstieg der Anteile an IL-10-positiven-Zellen zu sehen.

Unter Vorbehalt des Fehlens eines unmittelbaren Vergleichs mit dem spontanen Verlauf bei untherapierten MS-Patienten (bei diesen fand keine drei- bzw. sechswöchige Untersuchung statt) scheinen transiente Effekte bei der Wirkung von

Diskussion

IFN- β eine Rolle zu spielen. Wie oben beschrieben, konnten die drei Wochen und teilweise auch sechs Wochen nach Therapiebeginn festgestellte verminderte Anzahl IL-10-positiver T-Zellen aller Therapiegruppen nach drei Monaten nicht mehr beobachtet werden. Andere Gründe für das sich verändernde Zytokinprofil wie der Einfluss von grippeähnlichen Nebenwirkungen oder einer vorhandenen Begleitmedikation wären denkbar. In der vorliegenden Studie konnte für alle drei IFN- β -Therapiegruppen eine durch eine Begleitmedikation unbeeinflusste Expression der immunologischen Parameter beobachtet werden. Die Effekte des Auftretens von grippeähnlichen Symptomen auf die Expression der IFN- γ - und IL-10-positiven T-Zellen der IFN- β -1a[A]-Gruppe und IFN- β -1b-Gruppe sind vorsichtig zu beurteilen. Hierbei ist zu bedenken, dass nur eine niedrige betroffene Patientenzahl für die statistischen Auswertungen zur Verfügung stand. Weiterhin lassen sich anhand der gemachten Beobachtungen nicht die unterschiedlichen Verläufe, wie etwa der IFN-R-II-Expression, der drei Therapiegruppen erklären.

Aufgrund dessen und dementsprechender Literaturangaben scheinen vielmehr die IFN- β -Präparate die transienten Veränderungen im Zytokin(Rezeptoren) Profil, wenn auch eventuell auf unterschiedliche Weise, zu bewirken. Ein transienter Einfluss auf das exprimierte Zytokin(Rezeptoren)muster wurde auch von DAYAL ET AL. (1995) gezeigt, die bei 60 % der IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten während der ersten zwei Behandlungsmonate einen Anstieg der IFN- γ -produzierenden Zellen beobachten konnten. Dieser Effekt war nach drei Monaten nicht mehr vorhanden. BYKOSH UND REDER (1996) konnten bei MS-Patienten nach einwöchiger IFN- β -Therapie vermehrt IL-10-mRNA im Vergleich zum Studienbeginn nachweisen. Auch in diesem Fall lag drei Monate später kein Unterschied mehr vor.

Bisher liegen noch keine anderen Studienergebnisse, die in diesem Zusammenhang einen Vergleich der drei Präparate durchgeführt haben, vor. Die zum Teil gegensätzlichen Verläufe der immunologischen Parameter bei den verschiedenen IFN- β -Therapiegruppen (z.B. IFN-R-II auf CD3+Zellen) lassen vermuten, dass der modulatorische Einfluss der IFN- β -Präparate auf das Zytokin(rezeptoren)profil nicht identisch bzw. individuell verschieden ist. In Anbetracht der nicht konstant auftretenden Differenzen zwischen den Gruppen und dem fehlenden Vergleich mit

Diskussion

untherapierten MS-Patienten besteht noch Aufklärungsbedarf. Eine Erklärung für diese Differenzen könnte die unterschiedliche Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der sich sowohl in Dosis als auch in der Applikationsart unterscheidenden IFN- β -Präparate sein. Mit Hilfe klassischer biologischer Aktivitätsmarker (Neopterin, β_2 -Mikroglobulin, 2-5-Oligoadenylatsynthetase) konnte bereits eine positive Dosis-Wirkungskorrelation für IFN- β gezeigt werden (WITTER ET AL., 1987; WITT ET AL., 1993). WITT ET AL. (1993) fanden zudem heraus, dass eine mehrmalige Applikationsfrequenz innerhalb einer Woche wirkungsvoller ist als eine einmalige Gabe pro Woche. Inwieweit sich diese Studienergebnisse mit dem immunmodulatorischen Einfluss der IFN- β -Präparate analogisieren lassen, muss durch weitere (z.B. kombinierte) Untersuchungen geklärt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen und die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass eine IFN- β -Therapie unterschiedliche Muster einer Immunreaktion aufweisen kann und dass nicht alleine eine Modulation des Zytokin(Rezeptoren)profils die Wirkung vermittelt. Aufgrund der hauptsächlich in T-Zellen festgestellten Veränderungen, scheint eine, wie von LIU ET AL. (2001) vermutet, Zelltyp-spezifische Wirkung des IFN- β bei der MS ebenfalls wahrscheinlich. Bei alledem ist zu bedenken, dass die Untersuchung eine Kurzzeitbeobachtung war und Langzeittherapieeffekte nicht bekannt sind. Aus diesem Grund bedarf es zusätzlicher Untersuchungen, um diese Vermutungen abzuklären.

5.3 Multiple Sklerose und Veterinärmedizin

Die Multiple Sklerose ist als Erkrankung in der Tiermedizin unbekannt. Dennoch sind den entwickelten Tiermodellen zahlreiche Fortschritte im Rahmen der MS-Forschung, vor allem bei der Aufklärung der MS-Pathogenese, zu verdanken. Schon 1933 wurde ein Tiermodell entwickelt, welches in vielen Aspekten der MS ähnelt und das heute anerkannte Tiermodell der MS darstellt (RIVERS ET AL., 1933). Dabei handelt es sich um die sogenannte experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE). Die EAE ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmun-erkrankung, bei welcher die Immunantwort gegen Myelinbestandteile gerichtet ist (TSUNODA UND FUJINAMI, 1996). Experimentell kann die EAE durch Injektion einer Kombination aus Myelinhomogenat oder gereinigten Myelinbestandteilen und Freundschem Adjuvans in verschiedenen Tierarten erzeugt werden (WEKERLE ET AL. 1994; SWANBORG, 1995). Abhängig von der untersuchten Tierspezies und der zur Immunisation verwendeten Antigenzusammensetzung können verschiedene Verlaufsformen der Erkrankung beobachtet werden:

1. die akute, monophasische EAE
2. die chronische, rezidivierende EAE

Die *akute allergische Enzephalomyelitis* zeichnet sich durch einen monophasischen Krankheitsverlauf aus. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Wochen nimmt dabei die Krankheit entweder einen letalen Ausgang oder es kommt zur Heilung, bei welcher Residuen zurückbleiben können. Pathologisch-anatomisch dominieren perivenöse Entzündungsvorgänge, Demyelinisierungen treten im allgemeinen nicht auf. Das Krankheitsbild der akuten EAE zeigt mehr Verwandtschaft zur humanen postvakzinalen Enzephalomyelitis als zur MS (FRICK, 1989).

Seit 1972 ist es durch Variation des Applikationsweges und des Autoantigens außerdem möglich, bei Versuchstieren eine *chronische EAE* auszulösen (RAINE, 1983). Die chronische EAE verläuft im Gegensatz zur akuten Form rezidivierend, d.h. es treten in unregelmäßigen Intervallen Krankheitsschübe auf, gefolgt von Phasen der Remission. Aufgrund dieses schubförmig-rezidivierendem Verlaufes sowie den neuropathologischen Befunden ähnelt die chronische EAE dem Krankheitsbild der MS, mit welcher sie auch in immunologischer Hinsicht vergleichbar ist. Die heute am

Diskussion

häufigsten eingesetzten Tiermodelle im Rahmen der MS-Forschung sind die chronisch rezidivierenden EAE-Formen bei Meerschweinchen und Mäusen.

Die EAE spielt aber nicht nur eine wichtige Rolle bei der Aufklärung der MS-Immunopathogenese. Mit ihrer Hilfe wurden auch mögliche Wirkmechanismen von IFN- β untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch IFN- β bei den Versuchstieren eine Reduktion der Krankheitsschwere oder sogar eine Inhibition des Krankheitsausbruchs erreicht wird (ABREU ET AL., 1982, 1985; BROD ET AL., 1995). Dieser bei der EAE experimentell demonstrierte Benefiteffekt sowie die aus *in-vitro*-Studien bekannten antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN- β (ARNASON ET AL., 1996) machten eine IFN- β -Therapie auch für die MS interessant.

Aufgrund der antiviralen und immunmodulatorischen Wirkungen wollte man humanes Interferon auch in der Tiermedizin nutzen. In einer Langzeitstudie von KÖLBL ET AL. (2000) wurde die Wirkung einer Therapie mit rekombinanten humanen Interferon-alpha auf den Krankheitsverlauf von mit felinem Leukämie Virus (FeLV-) infizierten Katzen untersucht. Dabei konnte aber von der Arbeitsgruppe keine Besserung der klinischen Symptome, keine Veränderungen der Laborparameter und auch kein Rückgang der FeLV-Virämie aufgezeigt werden. Von größerem Interesse für die Veterinärmedizin ist das rekombinante feline Omega-Interferon (r-FeIFN ω). Dieses Interferon-Präparat wurde in Japan entwickelt und wird ebenso wie das humane rekombinante IFN- β molekulargenetisch hergestellt. Mit Hilfe des rekombinanten Baculovirus wird das r-FeIFN ω aus einer Seidenraupe gewonnen (NAKAMURA ET AL., 1992; UEDA ET AL., 1993).

In den bisher vorliegenden *in-vitro*-Studien konnten für r-FeIFN ω antivirale Eigenschaften gegen feline Calici-, Corona-, Herpes-, und Panleukopenieviren sowie das canine Parvovirus aufgezeigt werden (YAMAMOTO ET AL., 1990, MOCHIZUKI ET AL., 1994; TRUYEN ET AL., 2002). Insbesondere aufgrund dieser belegten antiviralen Wirkungen wurde r-FeIFN ω zur Therapie der felinen Calicivirose in Japan zugelassen (NIMOMIYA ET AL., 1991; UEDA ET AL., 1993). Seit Anfang 2002 ist r-FeIFN ω auch auf dem deutschen Markt (Virbagen Interferon®, Virbac®).

Diskussion

Aktuelle klinische Studien liefern vielversprechende Ergebnisse für einen therapeutischen Einsatz von r-FelFN ω bei viral bedingten Erkrankungen von Katzen und Hunden. Positive Effekte einer r-FelFN ω -Therapie auf den Krankheitsverlauf (wie z.B. Steigerung der Überlebensrate, komplette Remission der Erkrankung) konnten dabei vor allem an FeLV-, FIV- und FIP-positiven bzw. erkrankten Katzen demonstriert werden (MÄHL ET AL., 2001; ISHIDA ET AL., 2002). Laut den Untersuchungen von MIHALJEVIC (2003) stellt die r-FelFN ω -Therapie außerdem im Rahmen des Krankheitsbildes der chronischen Gingivitis-Stomatitis-Oropharyngitis der Katze, für welche kombinierte virale Infektionen als Grundursache angenommen werden, ebenfalls eine aussichtsreiche Behandlungsmöglichkeit dar. Bei Hunden wurde in jüngerer Zeit der Einfluss einer r-FelFN ω -Therapie auf den Krankheitsverlauf der Hundestaupe und auf die durch das canine Parvovirus verursachte Enteritis untersucht. Bei beiden Erkrankungen kam es hierbei unter r-FelFN ω -Therapie zu einer Verbesserung der klinischen Symptome sowie einer Verringerung der Mortalitätsrate (ISHIWATA ET AL., 1998; ITO ET AL., 1999; DE MARI ET AL., 2003).

Diese bisher eindeutig erfolgversprechenden Ergebnisse einer r-FelFN ω -Therapie sind insofern noch vorsichtig zu beurteilen, da das Präparat erst relativ kurz auf dem Markt ist. Dementsprechend liegen nur begrenzt klinische Studien, insbesondere Langzeituntersuchungen, vor. Zudem wäre es außerdem interessant, ob r-FelFN ω auch bei nicht viral-bedingten Erkrankungen wie etwa Autoimmunerkrankungen oder weiteren Tierarten ähnlich positive Effekte hervorruft.

6 Zusammenfassung

1. Die Methode der Durchflusszytometrie wurde für den intrazellulären Nachweis der Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-10 und ebenfalls für den Nachweis der membranständigen Zytokinrezeptoren IFN-R-II und IL-4R in Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes neu etabliert.
2. Durch Stimulationsassays wurden die optimalen Stimulationsbedingungen ermittelt. Die beste Stimulation wurde bei einer vierstündigen Inkubation mit 10 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 25 μ M Monensin erreicht. Als geeignetstes Antikoagulans erwies sich Heparin und bezüglich der Lagerungsdauer der Blutproben wurden maximal drei Stunden festgelegt.
3. Die Reproduzierbarkeit der neu etablierten Methoden wurde anhand der Intra-Sample, Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision sowie mit Hilfe von Positivkontrollzellen nachgewiesen.
4. Die gesunden Probanden und die MS-Patienten unterschieden sich in ihrem Zytokin(Rezeptoren)profil. Bei den MS-Patienten wurden hoch signifikant mehr IL-10-positive CD3+Zellen und IL-10-positive CD3+CD4+Zellen festgestellt. RRMS-Patienten besaßen zudem deutlich mehr IFN- γ -positive CD3+CD4+Zellen als Gesunde.
5. Innerhalb des MS-Patientenkollektivs wurden die immunologischen Parameter unabhängig von der Krankheitsdauer, der Anzahl der Schübe und der EDSS-Score exprimiert. Der Progressionsindex korrelierte, insbesondere bei SPMS-Patienten, negativ mit der Th2-Zytokinexpression.
6. Unter IFN- β -Therapie traten bei MS-Patienten transiente Veränderungen im Zytokin(Rezeptoren)profil auf. Diese waren bei den verschiedenen Präparaten unterschiedlich.

7 Summary

1. A flow cytometric method was established for intracellular staining of the cytokines IFN- γ , IL-4, IL-10 and for staining of membrane-bound cytokine-receptors IFN-R-II and IL-4R in peripheral blood leukocyte populations.
2. Stimulation conditions were optimized: A four hour incubation with 10ng/ml PMA, 500ng/ml ionomycin and 25 μ M monensin yielded best stimulation results. Heparin proved to be the most suitable anticoagulants. Blood samples were stored up to 3 hours before use.
3. Intra-sample-, intra-assay- and inter-assay-precision as well as positive controls proved the established methods to be duly reproducible.
4. Patients suffering from multiple sclerosis and healthy control patients differed in their cytokine- and cytokine-receptor profiles. In multiple sclerosis patients we found significantly more IL-10-positive CD3+cells and IL-10-positive CD3+CD4+cells. Furthermore, RRMS patients were shown to have substantially more IFN- γ -positive CD3+CD4+cells in comparison to healthy controls.
5. The expression of the immunologic parameters within the multiple sclerosis patients group was independent from duration of disease, number of relapses, and EDSS-score respectively. The progression-index was negatively correlated with the Th2-cytokine expression, especially in SPMS patients.
6. Under therapy with IFN- β transient changes in the multiple sclerosis patients cytokine- and cytokine-receptor-profiles were shown. These changes differed dependent on the different IFN- β -preparations.

8 Literatur

- ABBAS AK, MURPHY KM, SHER A (1996)
Functional diversity of helper t lymphocytes
Nature, 383: 787-793
- ABREU SL (1982)
Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by interferon.
Immunol Commun, 11:1
- ABREU SL (1985)
Interferon in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): effects of
exogenous interferon on the antigen-enhanced adoptive transfer of EAE
Int Arch Allergy Appl Immunol, 76:302
- ANDERSSON PB, GOODKIN DE (1998)
Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review
J Neurol Sci, 160: 16-25
- ANDO DG, CLAYTON J, KONO D, URBAN JL, SERCARZ E (1989)
Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic
encephalomyelitis (EAE) are of Th1 lymphokine subtype
Cell Immunol, 124: 132-143
- ARMITAGE RJ, ZIEGLER SF, BECKMANN MP, IDZERDA RL, PARK LS, FANSLOW
WC (1991)
Expression of receptors for interleukin 4 and interleukin 7 on human T cells
Adv Exp Med Biol, 292: 121-130
- ARNASON BGW, DAYAL A, QU ZX, JENSEN MA, GENC K, REDER AT (1996)
Mechanism of action of interferon- β in multiple sclerosis
Springer Semin Immunopathol, 18: 125-148
- ARNASON BGW, TOSCAS A, DAYAL A, QU ZX, NORONHA A (1997)
Role of interferons in demyelinating diseases
J Neural Transm, 49 (Suppl): 117-123
- AUSTIN EB, MCINTOSH Y (2000)
Anti-D quantification by flow cytometry: a comparison of five methods
Transfusion, 40 (1): 77-83

Literatur

BACH EA, SZABO SJ, DIGHE AS, ASHKENAZI A, AGUET M, MURPHY KM, SCHREIBER RD (1995)

Ligand-induced autoregulation of interferon- γ -receptor β chain expression in T helper cell subsets
Science, 270:1215

BADER T, WIETZERBIN J (1994)

Modulation of murine and human interferon- γ receptor expression by their ligands or phorbol ester
Cytokine, 6:70

BALASHOV KE, COMABELLA M, OHASHI T, KHOURY SJ, WEINER HL (2000)

Defective regulation of IFN γ and IL-12 by endogenous in progressive MS
Neurology, 25: 192-198

BALKWILL FR (1985)

The regulatory role of interferons in the human immune response
In: Taylor-Papadimitriou (ed)
Interferons: Their impact in biology of medicine, 61-80
Oxford, UK, Oxford Medical Publications

BARNA BP, CHOU SM, JACOBS B, YEN-LIEBERMANN B, RANSOHOFF RM (1989)

Interferon- β impairs induction of HLA-DR antigen expression in cultured human astrocytes
J Neuroimmunol, 23: 45-53

BAZAN JF (1990a)

Haemopoietic receptors and helical cytokines
Immunol Today, 11 (10): 350-354

BAZAN JF (1990b)

Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily
Proc Natl Acad Sci USA, 87 (18): 6934-6938

BECK J, RONDOT P, CATINOT L, FALCOFF E, KIRCHNER H, WIETZERBIN J (1988)

Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations?
Acta Neurol Scand, 78: 318-323

BELARDELLI F (1995)

Role of interferons and other cytokines in the regulation of response
APMIS, 103: 161-179

BEN-NUN A, MENDEL I, BAKIMER R, FRIDKIS-HARELI M, TEITELBAUM D, ARNON R, SELA M, KERLERO DE ROSBO N (1996)

Literatur

The autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis is potentially pathogenic, effect of copolymer 1 on MOG-induced disease

J Neurol, 243 (Suppl) 1: 14-22

BEN-NUN A, WEKERLE H, COHEN IR (1981)

The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis

Eur J Immunol, 11: 195-204

BONGIOANNI P, LOMBARDO F, FIORETTI C, MEUCCI G (1996)

T-lymphocyte immunointerferon receptors in patients with multiple sclerosis

J Neurol, 243: 605-610

BONGIOANNI P, LOMBARDO F, MOSCATO G, MOSTI S, MEUCCI G (1999)

T-cell interferon gamma receptor binding in interferon beta-1b-treated patients with multiple sclerosis

Arch Neurol, 56: 217-222

BROD SA, SCOTT M, BURNS DK, PHILLIPS JT (1995)

Modification of acute experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat by oral administration of type 1 interferons

J Interferon Cytokine Res, 15(2): 155-122

BROD SA, NELSON LD, KHAN M, WOLINSKI JS (1997)

IFN- β -1b treatment of relapsing multiple sclerosis has no effect on CD3-induced inflammatory or counterregulatory antiinflammatory cytokine secretion ex vivo after nine months

Intern J Neuroscience, 90: 135-144

BURDIN N, KOOTEN CV, GALIBERT L, *et al* (1995)

Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes

J Immunol, 154: 2533

BUTCHER EC, PICKER LJ (1996)

Lymphocyte homing and homeostasis

Science, 272: 60-66

BYKOSH PV, REDER AT (1996)

Interferon- β -1b effects on cytokine mRNA in peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis

Mult Scl, 1: 262-269

BYRON KA, VARIGOS GA, WOOTTON AM (1991)

Recombinant interferon-gamma inhibits the expression of IL-4 receptors on

Literatur

human lymphocytes
Clin Exp Immunol, 85: 307-311

CALLARD R, GEARING AJH (1994)
The cytokines and their receptors: Other cytokines IFN γ
The Cytokine Facts Book, Academic Press, 157-162

CANNELLA B, RAINE CS (1995)
The adhesion molecules and cytokine profile of multiple sclerosis lesion
Ann Neurol, 37: 424-435

CARRIERI PB, PROVITERA V, DE ROSA T, TARTAGLIA G, GORGA F, PERRELLA O (1998)
Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-
remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity
Immunopharm Immunotox, 20: 373-382

CARSWELL R (1838)
Pathological anatomy: illustrations on elementary forms of disease
Longman, London

CHALMERS IM, JANOSSY G, CONTRERAS M, NAVARRETE C (1998)
Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes
Blood, 82: 11-18

CHAN EY, LAU CS, ZOLA H (1996)
Expression of IL2-R, IL-4R, IL-6R on peripheral blood lymphocytes in systemic
lupus erythematosus and correlation with disease activity: a prospective study
J Clin Pathol, 49: 660-663

CHEN Y, KUCHROO VK, INOBE J, *et al.* (1994)
Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune
encephalomyelitis
Science, 265: 1237-1240

CHOMARAT P, BANCHEREAU J (1997)
An update on interleukin-4 and its receptor
Eur Cytokine Network, 8: 333

CHOMARAT P, BANCHEREAU J (1998)
Interleukin-4 and interleukin-13: Their similarities and discrepancies
Int Rev Immunol, 17: 1-52

CLERICI M, SARESELLA M, TRABATTONI D, SPECIALE L, FOSSATI S, RUZZANTE S,
CAVARRETA R, FILLIPI M, CAPUTO D, FERRANTE P (2001)
Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in
multiple sclerosis patients with active or quiescent disease
J Neuroimmun, 121 (1-2): 88-101

Literatur

- COMI G, FILIPPI M AND THE COPAXONE MRI STUDY GROUP (1999)
The effect of glatiramer acetat (Copaxone) on disease activity as measured by cerebral MRI in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study extended by open label treatment
Neurology, 52 (Suppl 2): A289
- COMI G, FILIPPI M, BARKHOFF F, *et al* (2000)
Interferon beta-1a (Rebif) in patients with acute neurological syndromes suggestive of multiple sclerosis : A multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study
Neurology, 54 (Suppl 3): A85- A86
- COMPSTON DA, MORGAN BP, CAMPBELL AK, WILKINS P., COLE G., THOMAS ND, JASANI B. (1989)
Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis
Neuropathol Appl Neurobiol, 15: 307-316
- COMPSTON DA, SCOLDING N., NOBIC M. (1991)
Pathogenesis of demyelinating diseases: Insights form cell biology
Trends Neurosci, 14: 175-182
- CRUCIAN B, DUNNE P, FRIEDMAN H, RAGSDALE R, PROSS, WIDEN R (1996)
Detection of altered T helper 1 and T helper 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis utilizing intracellular cytokine detection by flow cytometry and surface marker analysis
Clin Diagn Lab immunol, 7: 411-416
- CUA DJ, HINTON DR, STOHLMAN SA (1995)
Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistent mice
J Immunol, 155: 4052-4059
- CURSIEFEN S, FLACHENECKER P, RIECKMANN P, TOYKA K (1999)
Mitoxantron (Novantron) zur Therapie der schwer verlaufenden multiplen Sklerose
Der Nervenarzt, 70: 723-731
- DAVEY EJ, THYBERG J, CONRAD DH, SEVERINSON E (1998)
Regulation of cell morphology in B lymphocytes by IL-4: Evidence for induced cytoskeletal changes
J Immunol, 160: 5366-5373
- DAYAL AS, JENSEN MA, LLEDO A, ARNASON BGW (1995)
Interferon-gamma-secreting cells in multiple sclerosis patients treated with

Literatur

interferon-beta-1b
Neurology, 45: 2173-2177

DE MARI K, MAYNARD L, EUN HM, LEBREUX B (2003)
Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial
Vet Rec, 152(4): 105-108

DEAN G UND KURTZKE JF (1971)
On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa
Br Med J, ii, 725-729

DEAN G, MCLOUGHLIN H, BRADY R, ADELSTEIN AM, TALLETT-WILLIAMS J (1976)
Multiple sclerosis among immigrants in Greater London
Br Med J, i, 861-864

DETTKE M, SCHEIDT P, PRANGE H, KIRCHNER H (1997)
Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis
J Clin Immunol, 17: 293-300

DURAN I, MARTINEZ-CACERES EM, BRIEVA L, TINTORE M, MONTALBAN X (2001)
Similar pro- and antiinflammatory cytokine production in the different clinical forms of multiple sclerosis
Mult Scler, 7 (3): 151-156

EBERS GC, SADOVNICK AD, RISCH NJ, BULMAN D, RICE GPA, HASHIMOTO SA, *et al* (1995)
A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis
Nature, 377: 150-151

EUROPEAN STUDY GROUP ON IFNB IN SPMS (1998)
Placebo- controlled multicentre randomized trial of interferon- β -1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis
Lancet, 352: 1491-1497

FIERZ W, ENDLER B, RESKE K, WEKERLE H, FONTANA A (1985)
Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effects on antigen presentation
J Immunol, 134: 3785-3793

FINBLOOM DS (1988)
Internalization and degradation of human recombinant interferon- γ in the human histocytic lymphoma cell line, U937, relationship to Fc receptor enhancement and anti-proliferation
Clin Immunol Immunopathol, 47:93

FIRESTEIN GS, ROEDER WD, LAXER JA, *et al.* (1989)

Literatur

A new murine CD4+T cell subset with an unrestricted cytokine profile
J Immunol, 143:518-525

FLACHENEGGER P, HARTUNG HP (1996)

Krankheitsverlauf und Prognose der Multiplen Sklerose, 1.Teil: Der natürliche
Krankheitsverlauf
Der Nervenarzt, 67: 435-443

FRANCIOTTA D, ZARDINI E, BERGAMASCHI R, ANDREONI L, COSI V (2000)

Interferon-gamma and interleukin-4-producing T cells in peripheral blood of
multiple sclerosis patients
Eur Cytokine Netw, 11: 677-681

FREI K, FREDRIKSON S, FONTANA A, LINK H (1991)

Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis
J Neuroimmunol, 31: 147-153

FRICK E (1989)

Multiple Sklerose
VCH, Edition Medizin

FUJIWARA T, ODA K, YOKOTA S, TAKATSUKI A, IKEHARA Y (1988)

Brefeldin A causes disassembly of the golgi complex and accumulation of
secretory proteins in the endoplasmic reticulum
J Biol Chem, 263: 18545-18552

FURLAN R, BERGAMI A, LANG R, BRAMBILLA E, FRANCIOTTA D, MARTINELLI V, COMI
G, PANINA P, MARTINO G (2000)

Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of
circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4
J Neuroimmunol, 111: 86-92

GALIZZI JP, CASTLE B, DJOSSOU O, HARADA N, CABRILLAT H, YAHIA SA, BARRETT R,
HOWARD M, BANCHEREAU J (1990)

Purification of a 130-kDa T cell glycoprotein that binds human interleukin 4 with
high affinity
J Biol Chem, 265: 439-444

GIOVANNONI G, HARTUNG HP (1996)

The immunopathogenesis of multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome
Curr Opin Neurol, 9: 165- 177

GOLD R, HARTUNG HP, LASSMANN H (1997)

T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the
nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms
Trends Neurosci, 20: 399-404

Literatur

- GOLD R, RIECKMANN P (2000)
Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose
UNI-MED Verlag AG, 2.Auflage-Bremen
- GRUNIG G, CORRY DB, LEACH MW, *et al* (1997)
Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis
J Exp Med, 185: 1089
- GUTHRIE TC, NELSON DA (1995)
Influence of temperature changes in multiple sclerosis: critical review of mechanisms and research potential
J Neurol Sci, 129 (1): 1-8
- HAAHR S, MOLLER-LARSEN A, JUSTESEN J, PEDERSEN E (1986)
Interferon induction, 2'-5' oligo A synthetase and lymphocyte subpopulations in out-patients with multiple sclerosis in a longitudinal study
Neurol Scand, 73: 345-351
- HAINES J, PERICAK-VANCE M, SEBOUN E, HAUSER S (1996)
The Multiple Sclerosis Genetics Group
A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex
Nature Genet, 13: 469-471
- HALLDEN G, ANDERSSON U, HED J, JOHANSSON SGO (1989)
A new membrane permeabilization method for the detection of intracellular antigens by flow cytometry
J Immunol Meth, 124: 103
- HART N, FABRY Z (1995)
CNS antigen presentation.
Trends Neurosci 18: 475-481
- HARTUNG HP (1996)
Pathogenese der Multiplen Sklerose: Stand der Forschung
Wien. Med. Wschr. 146: 520-527
- HARTUNG HP, GONSETTE R, MIMS-STUDY GROUP (1998)
Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis (MS): a placebo-controlled, randomized, observer-blind European phase III multicenter study-clinical results
Mult Scler, 4: 325 (Abstract OR 207)
- HARTUNG HP, JUNG S., STOLL G., ZIELASEK J., SCHMIDT B., ARCHELOS JJ, TOYKA KV (1992)
Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS
J Neuroimmunol, 40: 197-210

Literatur

- HERNDON RM (1998)
Treatment of multiple sclerosis with the IFN- β s: comparing risks and benefits
Biodrugs, 10: 463-470
- HERTZOG PL, WRIGHT A, HARRIS G, LINNANE AW, MACKAY IR (1991)
Intermittent interferonemia and interferon responses in multiple sclerosis
Clin Immunol Immunopathol, 58: 18-32
- HOHLFELD R, MEINL E, WEBER F, ZIPP F, SCHMIDT S., SOTGLU S., GOEBELS N., VOLTZ R., SPULER S., IGLESIAS A, *et al* (1995)
The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis
Neurology, 45: 33-38
- HOLLAND SM, DORMAN SE, KWON A, PITHA-ROWE IF, FRUCHT DM, *et al.* (1998)
Abnormal regulation of interferon gamma, interleukin 12, and tumor necrosis factor alpha in interferon gamma receptor 1 deficiency
J Infect Dis, 178: 1095-1104
- HUANG WX, HUANG P, LINK H, HILLERT J (1999)
Cytokine analysis in multiple sclerosis by competitive RT-PCR: A decreased expression of IL-10 and an increased expression of TNF-alpha in chronic progression
Mult Scler, 5: 342-348
- HUANG YM, HUSSEIN Y, JIN YP, SÖDERSTROM M, LINK H (2001)
Multiple sclerosis: deficient in-vitro responses of blood mononuclear cells to IFN- β
Acta Neurol Scand, 104: 249-256
- HULSHOF S, MONTAGNE L, DE GROOT CJA, VAN DER VALK P (2002)
Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4 and their receptors in multiple sclerosis lesions
Glia, 38(1): 24-35
- HUYNH HK, OGER J, DOROVINI-ZIS K (1995)
Interferon- β downregulated interferon- γ induced class II MHC molecule expression and morphological changes in primary cultures
J Neuroimmunol, 60: 63-73
- INOGES S, MERINO J, BANDRES E, DECASTRO P, SUBIRA ML, SANCHEZ-IBARROLA (1999)
Cytokine flow cytometry differentiates the clinical status of multiple sclerosis (MS) patients
Clin Exp Immunol, 115 (3), 521-525
- ISHIDA T, SHIBANAL A, TANAKA S, UCHIDA K, MOCHIZUKI M (2002)
Therapeutic effect of recombinant feline interferon on FIP

Literatur

Second international FcoV-FIP-Symposium, Glasgow

ISHIWATA K, MINAGAWA T, KAJIMOTO T (1998)

Clinical effects of the recombinant feline interferon- ω on experimental parvovirus infection in beagle dogs

J Vet Med Sci, 60(8): 911-917

ITO K, SHIMAMURA O, TAKAYAMA S, KOBAYASHI T, UCHIDA E, UCHINO T (1999)

Therapeutic effect of feline interferon (rFelFN) on canine distemper

In: Proceedings of 128th Japan Society of Veterinary Science, p220

JACOBS LD, COOKFAIR DL, RUDICK RA, *et al* (1996)

Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis

Ann Neurol, 39: 285-294

JACOBS LD, BECK RW, SIMON JH, *et al* (2000)

Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis

New Engl J Med, 343: 898-904

JANEWAY CA, TRAVERS P (1997)

Immunologie

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2.Auflage

JANSEN M, REINHARD JF JR (1999)

Interferon response heterogeneity: activation of a proinflammatory response by interferon alpha and beta. A possible basis for diverse responses to interferon beta in MS

J Leukoc Biol, 65: 439-443

JOHNSON KP, BROOKS BR, COHEN JA, *et al* AND THE COPOLYMER 1 MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP (1995)

Copolymer 1 reduces relaps rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial

Neurology, 45: 1268-1276

JOSEPH J, KOBLER RL, D'IMPERIO C, LUBLIN FD (1988)

Down regulation of IFN- γ induced MHC class II expression on human glioma cells by recombinant IFN- β : effects of dosage treatment schedule

J Neuroimmunol, 20: 39-44

JUNG T, SCHAUER U, HEUSSER C, NEUMANN C, RIEGER C (1993)

Detection of intracellular cytokines by flow cytometry

J Immunol Meth, 159: 197-207

Literatur

KABILAN L, ANDERSSON G, LOLLI F, EKRE HP, OLSSON T, TROYE-BLOMBERG M (1990)

Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single cell level after activation of human T cells with toxoid in-vitro
Eur J Immunol, 20: 1085-1089

KAGAWA Y, TAKASAKI S, UTSUMI J, *et al.* (1988)

Comperative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells
J Biol Chem, 263: 17508-17515

KENNEDY MK, TORRANCE DS, PICHA KS, MOHLER KL (1992)

Analysis of cytokine m-RNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery
J Immunol, 149: 2496

KESSELRING J (1997)

Multiple Sklerose
Stuttgart: Verlag Kohlhammer

KIERSZENBAUM F, MEJIA LOPEZ H, TANNER MK, SZTEIN MB (1995)

Trypanosoma cruzi-induced decrease in the level of interferon-gamma receptor expression by resting and activated human blood lymphocytes
Parasite Immunol, 17: 207-214

KILLESTEIN J, REP MHG, BARKHOF F, ROOS MTL, ADER HJ, VAN LIER AW, POLMAN CH (2001)

Active MRI lesion appearance in MS patients is preceded by fluctuations in circulating T-helper 1 and 2 cells
J Neuroimmunol, 118: 286-294

KIM HI, SO EY, YOON SR, HAN MY, LEE CE (1998)

Up-regulation of interleukin-4-receptor expression by interleukin-4 and CD40 ligation via tyrosine kinase-dependent pathway
J Biochem Mol Biol, 31 :83

KISHIMOTO T, TAGA T, AKIRA J (1994)

Cytokine signal transduction
Cell, 76 (2):253-262

KLEINE TO, HACKLER R, RAFFAEL A (1994)

Differenzierung von Leukozytenuntergruppen mittels der direkten Zweifarbenfluoreszenz im lysierten Vollblut.
In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg) Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik
Schattauer Stuttgart, New York, 217-223

Literatur

- KOEHLER J, BEER K, PETTE M (1998)
Mitoxantron-Therapie bei Multipler Sklerose
Akt Neurol, 25: 1-3
- KOH DR, FUNG LEUNG WP, HO A, GRAY D, ACHA ORBEA H, MAK TW (1992)
Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/-mice
Science, 256: 1210-1213
- KÖLBL S, SKOLEK R, HIRT R, SEISER M, THALHAMMER J (2000)
Klinische Studie an persistent virämischen Katzen mit FeLV-Infektion nach peroraler Langzeitapplikation von Interferon- α
Kleintierpraxis, 7:497
- KOZOVSKA ME, HONG J, ZANG YCQ, LI S, RIVERA VM, KILLIAN JM, ZHANG JZ (1999)
Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS
Neurology, 53: 1692-1697
- KURLAND LT (1970)
The epidemiological characteristics of multiple sclerosis.
In: Vinten PJ, Brugen GH (Hrsg) Handbook of neurology.
Elsevier/ North-Holland, Amsterdam, New York, 63-84
- KURTZKE JF (1983a)
Epidemiology of multiple sclerosis
In: Hallpike JF, Adams CWM, Tourtellotte WW (eds) (1983)
Multiple sclerosis
Chapman and Hall, London, 47-95
- KURTZKE JF (1983b)
Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)
Neurology, 33 : 1444-1452
- KURTZKE JF (1995)
MS epidemiology world wide. One view of current status.
Acta Neurol Scand (Suppl), 161: 23-33
- KURTZKE JF, BEEBE GW, NORMAN JE (1979)
Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans. Race, sex, and geographic distribution
Neurology, 29: 1228-1244
- KURTZKE JF, HYLLESTED K (1979)
Multiple sclerosis in the Faroe Islands: 1. clinical and epidemiological features
Ann Neurol, 5: 6-21

Literatur

- KURTZKE JF, HYLLESTED K (1988)
Validity of the epidemics of multiple sclerosis in the Faroe Islands
Neuroepidemiology, 7: 190-227
- KURTZKE JF, GUDMUNDSSON KR, BERGMANN S (1982)
Multiple sclerosis in Iceland: 1. Evidence of a postwar epidemic
Neurology, 32: 143-150
- LARNER AJ (1986)
Aetiological role of viruses in multiple sclerosis: a review
J R Soc Med, 79: 412-417
- LASSMANN H, VASS K (1995)
Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of ist lesions?
Springer, Semi Immunopathol, 17: 77-87
- LAUER K (1994)
Multiple sclerosis in the old world: the new old map
Multiple Sclerosis in Europe. An Epidemiological update. Edited by W Firnhaber, K Lauer, Darmstadt: LTV Press: 14-27
- LEHMANN PV, SERCARZ EE, FORSTHUBER T, DAYAN CM, GAMMON G (1993)
Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire
Immunol Today, 14: 203-208
- LEPPERT D, WAUBANT E, GALARDY R, BUNNETT NW, HAUSER SL (1995)
T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in-vitro
J Immunol, 154: 4379-4389
- LING PD, WARREN MK, VOGEL SN (1985)
Antagonistic effect of interferon-beta on the interferon-gamma-induced expression of 1a antigen in murine macrophages
J Immunol, 135 (3): 1857-1863
- LINK, H (1998)
The cytokine storm in multiple sclerosis
Mult Scler, 4: 12-15
- LINK H, SUN JB, WANG ZY, XU Z, LOVE A, FREDRIKSON F, OLSSON T (1992)
Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis
J Neuroimmunol, 78:63-73
- LINK J, SÖDERSTRÖM M, OLSSON T, BO H, LJUNGDAHL A, LINK H (1994a)
Increased transforming growth factor- β , interleukin-4 and interferon- γ in multiple sclerosis

Literatur

Ann Neurol, 36 : 379-386

LINK J, SÖDERSTRÖM M, LJUNGDAHL A, HÖJEBERG B, OLSSON T, XU Z, FREDRIKSON S, WANG ZY (1994b)

Organ-specific autoantigens induce interferon- γ and interleukin-4 mRNA expression in mononuclear cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis
Neurology, 44: 728-734

LINK J, FREDRIKSON S, SÖDERSTRÖM M, OLSSON T, HÖJEBERG B, LJUNGDAHL A, LINK H (1994c)

Organ-specific autoantigens induce transforming growth factor- β mRNA expression in multiple sclerosis and myasthenia gravis
Ann Neurol, 35: 197-203

LIU Z, PELFREY CM, COTLEUR A, LEE JC, RUDICK RA (2001)

Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis
J Neuroimmunol, 112: 153-162

LU CZ, JENSEN MA, ARNASON BGW (1993)

Interferon- γ - and interleukin-4-secreting cells in multiple sclerosis
J Neuroimmunol, 46: 123-128

LUCINETTI CF, BRÜCK W, RODRIGUEZ M, LASSMANN H (1996)

Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis
Brain Pathol, 6: 259-274

MÄHL P, MAYNARD L, DE MARI K, LEBREUX B (2001)

Survival of symptomatic FeLV or FeLV and FIV positive cats treated with a recombinant feline omega interferon
In Proceedings, World Small Animal Congress, Vancouver

MARBURG O (1906)

Die sogenannte akute Multiple Sklerose
Jahrb Psychatrie, 27: 211-312

MARTIN R, MCFARLAND HF (1995)

Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis
Crit Rev Clin Lab Sci, 32: 121-182

MARTINO G, HARTUNG HP (1999)

Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells
Curr Opin Neurol, 12: 309-321

MCALPINE D (HRSG) (1972)

Multiple sclerosis: a reappraisal

Literatur

Churchill Livingston, Edinburgh

MCDONALD WI, COMPSTON A, EDAN G, GOODKIN D, HARTUNG HP, LUBLIN FD, MCFARLAND HF, PATY DW, POLMAN CH, REINGOLD SC, *et al.* (2001)

Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis
Ann Neurol, 50 (1): 121-127

MCFARLAND H AND IFNB-1B SPMS STUDY GROUP (2000)

Subcutaneous IFN beta-1 b in secondary progressive multiple sclerosis
52nd Annual Meeting American Academy Neurology, San Diego

MCRAE BL, BEILFUSS BA, VAN SEVENTER GA (2000)

IFN-beta differentially regulates CD40-induced cytokine secretion by human dendritic cells
J Immunol, 164: 23-28

MCRAE BL, SEMNANI RT, HAYES MP, VAN SEVENTER GA (1998)

Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 development
J Immunol, 160: 4298-4304

MEINL E (1999)

Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis
Curr Opin Neurol, 12: 303-307

MIHALJEVIC SY (2003)

Erste klinische Erfahrungen mit dem Einsatz von Omega-Interferon bei der Therapie der chronischen Gingivitis-Stomatitis-Oropharyngitis der Katze
Der praktische Tierarzt, 5:350

MILLEFIORINI E, GASPERINI C, POZZILLI C, *et al.* (1997)

Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome
J Neurol, 244: 153-159

MITROVIC B, STOCK G, PEREZ DH, DINTER H (1999)

Molekulare Aspekte der Behandlung der Multiplen Sklerose
Handbuch der molekularen Medizin, Band 5, 411-449
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg

MOCHIZUKI M, NAKATANI H, YOSHIDA M (1994)

Inhibitory effects of recombinant feline interferon on the replication of feline enteropathogenic viruses *in vitro*
Vet Microbiol, 39: 145-152

MOLLENHAUER HH, MORRE DJ, ROWE LD (1990)

Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and

Literatur

relationship to toxicity
Biochim Biophys Acta, 1031: 225-246

MORI N, SHIRAKAWA F, MURAKAMI S, ODA S, ETO S (1996)
Characterization and regulation of interleukin-4 receptor in adult T-cell leukemia cells
Eur J Haematol, 56(4): 241-247

MOSMANN TR, COFFMAN RL (1989)
TH1 and TH2 cell: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties
Annu Rev Immunol, 7: 145-173

MOSMANN TR, SAD S (1996)
The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more
Immunol Today, 17: 138-146

MORGAN BP, CAMPBELL AK, COMPSTON DAS (1984)
Terminal component of complement (C9) in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis
Lancet, 344: 298-301

MUELLER R, KRAHL T, SARVETNICK N (1996)
Pancreatic expression of IL-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice
J Exp Med, 184: 1093-1099

MULTIPLE SKLEROSE-THERAPIE KONSENSUS GRUPPE (1999)
Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose
Der Nervenarzt, 70: 371-386

MULTIPLE SKLEROSE-THERAPIE KONSENSUS GRUPPE (2001)
Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose
1. Ergänzung: Dezember 2000
Der Nervenarzt, 72: 150-157

NAKAMURA N, SUDO T, MATSUDA S, YANAI A (1992)
Molecular cloning of feline interferon cDNA by direct expression
Biosci Biotechnol Biochem, 56(2): 211-214

NAVIKAS V, HE B, LINK J, HAGLUND M, SÖDERSTRÖM M, FREDRIKSON S, LJUNGDAHL A, HÖJEBERG B, QIAO J, OLSSON T, *et al.* (1996)
Augmented expression of tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis
Brain, 119: 213- 223

NAVIKAS V, LINK J, PALASIK W, SÖDERSTRÖM M, FREDRIKSON S, OLSSON T, LINK H

Literatur

(1995)

Increased mRNA expression of IL-10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis
Scand J Immunol, 41: 171- 178

NEWPORT M, HUXLEY CM, HUSTON S, HAWRYLOWICZ CM, OOTRA BA, WILLIAMSON R, LEVIN MA (1996)

Mutation in the interferon-gamma receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection
N Engl J Med, 335:1941-1949

NIMOMIYA H, FUKUTOME A, KABAYASHI K, *et al.* (1991)

Effect of recombinant feline interferon on feline calicivirus infection
In: Proceedings, XVI. World Congress, WSAVA, 558-559

NOMURA LE, WALKER JM, MAECKER HT (2000)

Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4+Tcells
Cytometry, 40: 60-68

NORONHA A, TOSCAS A, ARNASON BGW, JENSEN MA (1994)

IFN-beta augments in-vivo suppressor cell function in MS
Neurology, 44 (Suppl 2): A212

NORONHA A, TOSCAS A, JENSEN MA (1990)

Interferon beta augments suppressor cell function in multiple sclerosis
Ann Neurol, 27: 207-210

NORONHA A, TOSCAS A, JENSEN MA (1993a)

IFN-beta modulates immune function: implication for multiple sclerosis
J Immunol, 150: 259

NORONHA A, TOSCAS A, JENSEN MA (1993b)

Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis
J Neuroimmunol, 46: 145-154

OHARA J, PAUL WE (1988)

Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression
Proc Natl Acad Sci USA, 85: 8221-8225

OKSENBERG JR, HAUSER SL (1997)

New insights into the immunogenetics of multiple sclerosis
Curr Opin Neurol, 10: 181-185

OLSSON T (1995)

Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis

Literatur

Neurology, 45 (Suppl) 6: 11-15

OLSSON T, WANG W-Z, HÖJEBERG B, KOSTULAS V, JIANG Y-P, ANDERSON G, EKRE H-P, LINK H (1990)

Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma
J Clin Invest, 86: 981-985

OPENSHAW P, MURPHY EE, HOSKEN NA, MAINO V, DAVIS K, MURPHY K, O'GARRA A (1995)

Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations
J Exp Med, 182: 1357-1367

OSWALD IP, WYNN TA, SHER A, JAMES SJ (1992)

Interleukin-10 inhibits macrophage microbial activity by blocking the endogenous production of tumor-necrosis-factor- α required as a costimulatory factor for interferon γ -induced activation
Proc Natl Acad Sci USA, 89: 8676-8680

ÖZENCI V, KOUWENHOVEN M, HUANG YM, XIAO B, KIVISAKK P, FREDRIKSON S, LINK H (1999)

Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-beta-1b treatment
Scand J Immunol, 49: 554-561

PALA P, HUSSELL T, OPENSHAW PJM (2000)

Flow cytometric measurements of intracellular cytokines
J Immunol Meth, 243: 107-124

PANITCH HS (1994)

influence of infection on exacerbation of multiple sclerosis
Ann Neurol, 36 (Suppl): 25-28

PANITCH HS, HIRSCH RL, SCHINDLER J, JOHNSON KP (1987)

Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbation associated with activation of the immune system
Neurology, 37: 1097-1102

PATY DW AND SPECTRIM STUDY GROUP (1999)

Results of the 3-year, double-blind, placebo-controlled study of interferon beta-1a (Rebif) in secondary progressive MS
J Neurol, 249 (Suppl 1): I/ 15

PAYVANDI F, AMRUTE SA, FITZGERALD-BOCARSLY P (1998)

Exogenous and endogenous IL-10 regulate IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells in response to viral stimulation

Literatur

- J Immunol, 160: 5861
- PELFREY CM, RUDICK RA, COTLEUR AC, LEE JC, TARY-LEHMANN M, LEHMANN PV (2000)
Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single cell analysis of cytokine production
J Immunol, 165: 1641-1651
- PELLEGRINI S, SCHINDLER C (1993)
Early events in signaling by interferons
Trends Biochem Sci, 18: 338-342
- PEPPLER R, RUDICK RA, RANSOHOFF RM (1994)
The effects of recombinant human interferon beta on mitogen-driven-interferon-gamma mRNA accumulation in peripheral blood mononuclear cells
Brain Pathol, 4: 281(Abstract)
- PETEREIT HF, BAMBORSCHKE S, ESSE AD, HEISS WD (1997)
Interferon gamma producing blood lymphocytes are decreased by interferon beta therapy in patients with multiple sclerosis
Mult Scler, 3: 180-183
- PHADKE JG (1987)
Survival pattern and cause of death in patient with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in North east Scotland
J Neurol Neurosurg Psych, 50 (5): 523-531
- PHARMINGEN (1999)
Cytokines/Chemokines
Pharmingen, San Diego, Application Manual, 3rd Edition, S.46
- PICKER LJ, SINGH MK, ZDRAVESKI Z, TREER JR, WALDROP SL, BERGSTRESSER PR, MAINO VC (1995)
Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry
Blood, 86: 1408-1419
- PORRINI AM, GAMBI D, REDER AT (1995)
Interferon effects on interleukin-10 secretion mononuclear cell response to interleukin-10 is normal in multiple sclerosis patients
J Neuroimmunol, 61:27-34
- POSER CM, PATY DW, SCHEINBERG L, MCDONALD WI, DAVIS FA, EBERS GC, *et al* (1983)
New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols
Ann Neurol, 13: 227-231
- POSER S (1996)

Literatur

Neue Therapiestrategien in der Behandlung der MS
Beilage in Der Nervenarzt, Band 67, Heft 11

POSER S, WIKSTROM J, BAUER HJ (1979)

Clinical data and the identification of special forms of multiple sclerosis in 1271 cases studied with a standardized documentation system
J Neurol Sci, 40: 159-168

POWELL MB, MITCHELL D, LEDERMAN J, *et al.* (1990)

Lymphotoxin and tumor necrosis factor- α production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalogenicity
Int Immunol, 2: 539-544

PRISMS (PREVENTION OF RELAPSES AND DISABILITY BY INTERFERON BETA 1A SUBCUTANEOUSLY IN MULTIPLE SCLEROSIS) STUDY GROUP (1998)

Randomized double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/ remitting multiple sclerosis
Lancet, 352: 1498-1504

PRUSSIN C, METCALFE DD (1995)

Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies
J Immunol Meth, 188: 117-128

PUNNONEN J, COCKS BG, DEVRIES JE (1995)

IL-4 induces germ-line IgE heavy chain gene transcription in human fetal pre- B cells. Evidence for differential expression of functional IL-4 and IL-13 receptors during B cell ontogeny
J Immunol, 155: 4248-4254

RACKE MK, BONOMO A, SCOTT DE, CANNELLA B, LEVINE A, RAINE CS, SHEVACH M, RÖCKEN M (1994)

Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease
J Exp Med, 180: 1961-1966

RACKE MK, BURNERR D, PAK SH, *et al.* (1994)

Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course
J Immunol, 154: 450-458

RAINE CS (1983)

Multiple sclerosis and chronic relapsing EAE. Comparative ultrastructural neuropathology
In: Hallpike JF, Adams CWM, Tourtelotte WW (eds): Multiple sclerosis, Chapman and Hall, London

Literatur

RAINE CS (1994)

Multiple sclerosis: Immune system molecule expression in the central nervous system

J Neuropathol Exp Neurol, 53: 328-337

RANSONOFF RM, DEVAJYOTHI C, ESTES ML, *et al.* (1991)

Interferon-beta specifically inhibits interferon-gamma-induced class II major histocompatibility complex gene transcription in a human astrocytoma cell line

J Neuroimmunol, 33: 103-112

REP MHG, HINTZEN RQ, POLMAN CH, VAN LIER RAW (1996)

Recombinant interferon- β blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells

J Neuroimmunol, 67: 111-118

RIECKMANN P, ALBRECHT M, KITZE B, WEBER T, TUMANI H, BROOCKS A, LUER W, POSER S (1994a)

Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patient with multiple sclerosis

Neurology, 44: 1523-1526

RIECKMANN P, ALBRECHT M, KITZE B, WEBER T, TUMANI H, BROOCKS A, LUER W, HELWIG A, POSER S (1995)

Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity

Ann Neurol 37: 82-88

RIECKMANN P, MARTIN S, WEICHSELBRAUN I, ALBRECHT M, KITZE B, WEBER T, *et al.* (1994b)

Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse

Neurology, 44: 2367-2372

RIVERS TM, SPRUNT DH, BERRY GP (1933)

Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys

J Exp Med, 58: 39-53

ROGGE L, D'AMBROSIO D, BIFFI M, *et al.* (1998)

The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs

J Immunol, 161: 6567-6574

ROMAGNANI S (1994)

Lymphokine production by human T cells in disease states

Annu Rev Immunol, 12: 227-257

Literatur

- ROMAGNANI S (1995)
Biology of human Th1 and Th2 cells (Review)
J Clin Immunol, 15: 121-129
- ROTT O, FLEISCHER B, CASH E (1994)
Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats
Eur J Immunol, 24: 1434-1440
- RUDDLE NH, BERGMAN CM, MCGRATH KM, *et al.* (1990)
An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis
J Exp Med, 172: 1193-1200
- RUDICK RA, CARPENTER CS, COOKFAIR DL, TUOHY VK, RANSOHOFF RM (1993)
In-vitro and in-vivo inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon-beta
Neurology, 43: 2080-2087
- RUDICK RA, COHEN JA, WEINSTOCK-GUTTMAN B, KINKEL RP, RANSOHOFF RM (1997a)
Management of multiple sclerosis
N Engl J Med, 337: 1604-1611
- RUDICK RA, GOODKIN DE, JACOBS LD, *et al.* (1997b)
Impact of interferon beta-1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG)
Neurology, 49: 358-363
- RUDICK RA, RANSOHOFF RM (1992)
Cytokine secretion by multiple sclerosis monocytes. Relationship to disease activity
Arch Neurol, 49: 265-270
- RUDICK RA, RANSOHOFF RM (1995)
Biologic effects of interferons: relevance to multiple sclerosis
Mult Scler, 1: 12-16 (Suppl 1)
- RUDICK RA, RANSOHOFF RM, PEPPLER R, VAN DER BRUG, MEDENDORP S, LEHMANN P, ALAM J (1996)
Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis
Ann Neurol, 40: 618-627
- RUDICK RA, RANSOHOFF RM, LEE JC, *et al.* (1998)
In-vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis
Neurology, 50: 1294-1300

Literatur

- RUDICK RA, SIBLEY W, DURELLI L, *et al.* (1996)
Treatment of multiple sclerosis with type I interferons.
In: Goodkin DE, Rudick RA, eds.
Multiple sclerosis: advances in clinical trial design, treatment, and future perspectives
London, Springer
- RUHL S, FELDMANN GM, AKAHANE K, PLUZNIK DH (1993)
Interferon-gamma antagonizes interleukin-6-induced expression of interleukin-4 receptors in murine myeloid cells by a transcriptional mechanism
Blood, 82(9): 2641-2648
- RUSSELL SM, KEEGAN AD, HARADA N, NAKAMURA Y, NOGUCHI M, LELAND P, FRIEDMANN MC, MIYAJIMA A, PURI RK, PAUL WE (1993)
Interleukin-2 receptor gamma chain: A functional component of the interleukin-4 receptor
Science, 262: 1880-1883
- SADOVNICK AD, ARMSTRONG H, RICE GPA, BULMAN D, HASHIMOTO L, PATY DW, *et al* (1993)
A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update
Ann Neurol, 33: 281-285
- SADOVNICK AD, BAIRD PA, WARD RW (1988)
Multiple sclerosis: Updated risks for relatives
Am L Med Gen, 29: 533-541
- SANDER B, ANDERSSON J, ANDERSSON U (1991)
Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure
Immunol Rev, 119: 65- 93
- SCHMITZ J, ASSENMACHER M, RADBRUCH A (1993)
Regulation of T helper cell cytokine expression : functional dichotomy of antigen-presenting cells
Eur J Immunol, 23: 191-199
- SCHNAPER H, AUNE TM, PIERCE CW (1983)
Suppressor T cell activation by human leukocyte interferon
J Immunol, 131: 2301-2306
- SEDDON B, MASON D (1999)
Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and IL-4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45 RC-cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes
J Exp Med, 189: 279-288

Literatur

- SIPE JC, KNOBLER RL, BRAHENY SL, RICE GP, PANITCH HS, OLDSTONE MB (1984)
A neurologic rating scale (NRS) for use in multiple sclerosis
Neurology, 34: 1368-1372
- SKRENTA H, YANG Y, PESTKA S, FATHMAN CG (2000)
Ligand-independent down-regulation of IFN- γ receptor 1 following TCR engagement
J Immunol, 1: 3506-3511
- SO EY, PARK HH, LEE CE (2000)
IFN- γ and IFN- α postranscriptionally down-regulate the IL-4-induced IL-4 receptor gene expression
J immunol, 165: 5472-5479
- SÖDERSTRÖM M, HILLERT J, LINK J, NAVIKAS V, FREDRIKSON S, LINK H (1995)
Expression of IFN-gamma, IL-4 and TGF-beta in multiple sclerosis in relation to HLA-Dw2 phenotype and stage of disease
Mult Scler, 1:173-180
- SRIRAM S., STRATTON CW, YAO SY, THARP A., DING LM, BANNAN JD, *et al* (1999)
Chlamydia pneumonia infection of the central nervous system in multiple sclerosis
Annals of Neurology, 46, 6-14
- STEFFERL A, BREHM U, STORCH M, LAMBRACHT-WASHINGTON D, BOURQUIN C, WONIGKEIT K, *et al.* (1999)
Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response
J Immunol, 163: 40-49
- STUVE O, DOOLEY NP, UHM JH, ANTEL JP, FRANCIS GS, *et.al.* (1996)
Interferon β -1b decreases the migration of T lymphocytes in-vitro: effects in matrix metalloproteinase-9
Ann Neurol, 40: 853-863
- SUN JB, OLLSON T, WANG WZ, XIAO BG, KOSTULAS V, FREDERIKSON S, EKRE HP, LINK H (1991a)
Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls
Eur J Immunol, 21: 1461-1468
- SUN JB, LINK H, XIAO BG, DIENER P, ANDERSSON G, EKRE HP, LINNINGTON C, OLLSON T (1991b)
T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis
J Immunol, 146: 1490-1495

Literatur

SWANBORG RH (1995)

Animal models of human disease: Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease
Clin Immunol Immunopathol, 77: 4-13

TAYEBI H, LIENARD A, BILLOT M, TIBERGHIE P, HERVE P, ROBINET E (1999)

Detection of intracellular cytokines in citrated whole blood or marrow samples by flow cytometry
J Immunol Meth, 229: 121-130

TEITELBAUM D, AHARONI R, ARNON R, SELA M (1988)

Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer COP-1
Proc Natl Acad Sci USA, pp 9724-9728

TEJADA-SIMON MV, ZANG YCQ, YANG DY, HONG J, LI SF, SINGH RAK, VAN DEN BERG-LOONEN E, KILLIAN JM, RIVERA VM, ZHANG JZ (2000)

Aberrant T cell responses to myelin antigens during clinical exacerbation in patients with multiple sclerosis
Int Immunol, 12: 1641-1650

THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP (1993)

Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. 1. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.
Neurology, 43: 655-661

THE IFNB MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP, THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA MS/MRI ANALYSIS GROUP (1995)

Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial
Neurology, 45: 1277-1285

THOMSON A (ed, 1994)

The Cytokine Handbook, 2nd Edition
London: Academic Press

TILG H, KASER A (1999)

Interferons and their role in inflammation
Pharm Des, 5: 771-785

TORRES C, ARANGUEZ I, RUBIO N (1995)

Expression of interferon- γ receptors on murine oligodendrocytes and its regulation by cytokines and mitogens
Immunol, 86:250

TRAUGOTT U, LEBON P (1988)

Multiple sclerosis: Involvement of interferons in lesion pathogenesis

Literatur

Ann Neurol, 24: 243-251

TRUYEN U, BLEWASKA S, SCHULTHEISS U (2002)

Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von Interferon-Omega gegen ausgewählte Viren von Hund und Katze

Praktischer Tierarzt 83: 862-865

TSUNODA I, FUJINAMI RS (1996)

Two models for multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus

J Neuropathol Exp Neurol, 55: 673-686

UEDA Y, SAKURAI T, KASAMA K, SATOH Y, ATSUMI K, HANAWA S, UCHINO T, YANAI A (1993)

Pharmacokinetic properties of recombinant feline interferon and its stimulatory effect on 2', 5'-oligoadenylate synthetase activity in the cat

J Vet Med Sci, 55: 1-6

UHTHOFF W (1890)

Untersuchungen über die bei der multiplen Herdsklerose vorkommenden Augenstörungen

Arch Psychiat Nervenkr, 21: 55-116, 303-410

VALENTE G, OZMEN L, NOVELLI F, GEUNE M, PALESTRO G, FORNI G, GAROTTA G (1992)

Distribution of interferon- γ receptor in human tissues

Eur J Immunol, 22: 2403-2412

VAN DER WEEN R, STOHLMAN SA (1993)

Encephalitogenic Th1 cells are inhibited by Th2 cells with related peptide specificity: Relative roles of interleukin(IL)-4 and IL-10

J Neuroimmunol, 48: 213-220

VARTANIAN T, LI Y, ZHAO M, STEFANSSON K (1995)

Interferon- γ induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis

Mol Med, 1: 732-742

VORA M, ROMERO LI, KARASEK MA (1996)

Interleukin-10 induces E-selection on small and large blood vessel endothelial cells

J Exp Med, 184: 821

WAKSMANN BH UND REYNOLDS WE (1984)

Multiple sclerosis as a disease of immune regulation

Proc Soc exp Biol Med, 175: 228-294

WANG WZ, OLSSON T, KOSTULAS, HÖJEBERG B, EKRE HP, LINK H (1992)

Myelin antigen reactive T cells in cerebrovascular diseases

Literatur

Clin Exp Immunol, 88: 157-162

WEINSHENKER B, BASS B, RICE GPA, NOSEWORTHY J, CARRIERE W, BASKERVILLE J, EBERS GC (1989)

The natural history of multiple sclerosis: a geographical based study. 1. clinical course and disability
Brain, 112: 133-146

WEINSHENKER B, O'BRIEN P, PETERSON T, ET AL (1999)

A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease
Ann Neurol, 46: 878-886

WEKERLE H., KOJIMA K., LANNES VIEIRA J., LASSMANN H., LININGTON C (1994)

Animal models
Ann Neurol, 36 (Suppl): 47-53

WILLIAMS GJ, WITT PL (1998)

Comparative study of the pharmacodynamic and pharmacologic effects of Betaseron and Avonex
J Interferon Cytokine Res, 18: 967-975

WILLINGHAM MC, PASTAN I (EDS) (1985)

An atlas of immunofluorescence in cultured cells, Volume II
Academic press, Orlando

WILLOUGHBY EW, PATY DW (1988)

Scales for rating impairment in multiple sclerosis: A critique
Neurology, 38: 1793-1798

WINDHAGEN A, ANDERSON DE, CARRIZOSA A, BALASHOV K, WEINER HL, HAFLE DA (1998)

Cytokine secretion of myelin basic protein reactive T cells in patients with multiple sclerosis
J Neuroimmunol, 91(1-2): 1-9

WITT PL, STORER BE, BRYAN GT, BROWN RR, FLASHNER M, LAROCCA AT, COLBY CB, BORDEN EC (1993)

Pharmacodynamics of biological response in vivo after single and multiple doses of interferon- β
J Immunother, 13: 191-200

WITTER F, BAROUKI F, GRIFFIN D, NADLER P, WOODS A, WOOD D, LIETMAN P (1987)

Biologic response to recombinant human interferon alpha 2a as a function of dose and route of administration in healthy volunteers
Clin Pharmacol Ther, 42: 567-575

WOODROOFE MN, CUZNER ML (1993)

Literatur

Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: Detection by nonradioactive in-situ hybridization
Cytokine, 5: 583-588

WUCHERPFENNIG KW, STROMINGER JL (1995)

Molecular mimicry in T-cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein
Cell, 80: 695-705

YAMAMOTO JK, OKUDA T, YANAI A (1990)

Anti feline herpesvirus and calicivirus effects of feline interferon
J Interferon Res, 10: 114

ZURAWSKI SM, CHOMARAT P, DJOSSOU O, BIDAUD C, MCKENZIE AN, MIOSSEC P, BANCHEREAU J, ZURAWSKI G (1995)

The primary binding subunit of the human interleukin-4-receptor is also a component of the interleukin-13-receptor
J Biol Chem 270, 13: 869-878

9 Anhang

Stimulatorenkonzentration			CD69+CD3+Zellen	Veränderung der Zellmorphologie/ Zellverluste
PMA (ng/ml)	Ionomycin (ng/ml)	Monensin (μ M)		
1	250	6,25	< 75 %	gering
1	375	6,25	< 75 %	gering
1	500	6,25	< 75 %	hoch
1	1000	6,25	< 75 %	hoch
1	250	12,5	< 75 %	gering
1	375	12,5	< 75 %	gering
1	500	12,5	< 75 %	gering
1	1000	12,5	< 75 %	hoch
1	250	25	< 75 %	gering
1	375	25	< 75 %	gering
1	500	25	< 75 %	gering
1	1000	25	< 75 %	hoch
5	250	6,25	< 75 %	gering
5	375	6,25	< 75 %	gering
5	500	6,25	< 75 %	hoch
5	1000	6,25	< 75 %	hoch
5	250	12,5	< 75 %	gering
5	375	12,5	< 75 %	gering
5	500	12,5	75-90 %	hoch
5	1000	12,5	75-90 %	hoch
5	250	25	< 75 %	gering
5	375	25	75-90 %	gering
5	500	25	75-90 %	gering
5	1000	25	> 90	hoch
10	250	6,25	< 75 %	gering
10	375	6,25	75-90 %	gering
10	500	6,25	75-90 %	hoch
10	1000	6,25	> 90 %	hoch
10	250	12,5	< 75 %	gering
10	375	12,5	75-90 %	gering
10	500	12,5	> 90 %	hoch
10	1000	12,5	> 90 %	hoch
10	250	25	75-90 %	gering
10	375	25	75-90 %	gering
10	500	25	> 90 %	gering
10	1000	25	> 90 %	hoch

Tab.9.1: Einfluss der Stimulatorenkonzentration auf die Expression von CD69 bzw. Veränderung der Lymphozytenmorphologie. Grau unterlegt: ermittelte optimale Kombination der Stimulatoren.

Anhang

Stimulatorenkonzentration			CD69+CD3+Zellen	Veränderung der Zellmorphologie/ Zellverluste
PMA (ng/ml)	Ionomycin (ng/ml)	Monensin (μ M)		
20	250	6,25	< 75 %	gering
20	375	6,25	75-90 %	hoch
20	500	6,25	> 90 %	hoch
20	1000	6,25	> 90 %	hoch
20	250	12,5	< 75 %	gering
20	375	12,5	75-90 %	hoch
20	500	12,5	> 90 %	hoch
20	1000	12,5	> 90 %	hoch
20	250	25	75-90 %	gering
20	375	25	75-90 %	gering
20	500	25	> 90 %	hoch
20	1000	25	> 90 %	hoch
50	250	6,25	< 75 %	hoch
50	375	6,25	75-90 %	hoch
50	500	6,25	> 90 %	hoch
50	1000	6,25	> 90 %	hoch
50	250	12,5	75-90 %	hoch
50	375	12,5	> 90 %	hoch
50	500	12,5	> 90 %	hoch
50	1000	12,5	> 90 %	hoch
50	250	25	75-90 %	gering
50	375	25	> 90 %	hoch
50	500	25	> 90 %	hoch
50	1000	25	> 90 %	hoch

Tab.9.2: Einfluss der Stimulatorenkonzentration auf die Expression von CD69 bzw. Veränderung der Lymphozytenmorphologie.

Anhang

Stimulationsbedingungen	Parameter					
	CD3+IFN- γ +Zellen		CD3+IL-4+Zellen		CD3+IL-10Zellen	
	MW (%)	SD (%)	MW (%)	SD (%)	MW (%)	SD (%)
Unstimulierte Zellen	0,0	0,0	0,3	0,2	0,4	0,2
3h stimuliert	18,7	6,0	0,9	0,4	0,5	0,2
4h stimuliert	20,2	7,7	1,3	0,6	0,6	0,4
5h stimuliert	20,5	8,5	1,2	0,5	0,5	0,2
24h stimuliert	32,6	16,8	0,4	0,4	0,4	0,3
Citrat-Blut (4h stimuliert)	16,4	6,6	0,6	0,3	0,4	0,2
3h gelagert bei RT	20,2	8,0	1,2	0,5	0,6	0,3
3h gelagert bei 4°C	18,7	7,6	1,2	0,5	0,6	0,3
24h gelagert bei RT	33,7	8,0	1,3	0,7	0,4	0,2
24h gelagert bei 4°C	37,9	8,8	1,3	0,7	0,5	0,2

Tab.9.3: Ergebnisse der Stimulationsassays (n=10). MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung

Anhang

	MS-Patienten (n=58)	Gesunde (n=21)	
	MW ± SD	MW ± SD	p
IFN-R-II			
auf CD3+Zellen	11,5 ± 6,1	11,2 ± 6,3	p < 0,86
auf CD3+4+Zellen	12,2 ± 5,9	10,4 ± 5,9	p < 0,25
auf CD3+8+Zellen	9,6 ± 7,7	11,1 ± 6,3	p < 0,41
auf CD14+Zellen	213,4 ± 72,9	212,3 ± 78,3	p < 0,96
auf CD19+Zellen	34,5 ± 6,0	37,5 ± 12,3	p < 0,45
IL-4R			
auf CD19+Zellen	15,0 ± 8,1	16,5 ± 7,0	p < 0,45
IFN-γ			
auf CD3+Zellen	23,9 ± 9,3	23,1 ± 10,1	p < 0,75
auf CD3+4+Zellen	17,1 ± 8,0	13,7 ± 4,3	p < 0,07
auf CD3+8+Zellen	37,8 ± 18,0	32,1 ± 20,6	p < 0,23
IL-4			
auf CD3+Zellen	1,9 ± 1,4	2,1 ± 1,1	p < 0,60
auf CD3+4+Zellen	1,9 ± 1,5	2,2 ± 1,3	p < 0,52
auf CD3+8+Zellen	2,1 ± 2,4	2,0 ± 1,3	p < 0,81
IL-10			
auf CD3+Zellen	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,5	p < 0,01
auf CD3+4+Zellen	1,1 ± 0,5	0,8 ± 0,5	p < 0,01
auf CD3+8+Zellen	1,0 ± 0,6	0,7 ± 0,6	p < 0,07

Tab.9.4: Homogenitätsprüfung der untersuchten immunologischen Parameter zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; p = Signifikanzniveau

Anhang

Parameter	Signifikanzniveau		
	Vergleich aller drei Gruppen	Vergleich RRMS-Patienten mit Gesunden	Vergleich SPMS-Patienten mit Gesunden
IFN-R-II			
auf CD3+Zellen	p < 0,83	p < 0,99	p < 0,60
auf CD3+4+Zellen	p < 0,51	p < 0,28	p < 0,36
auf CD3+8+Zellen	p < 0,44	p < 0,29	p < 0,95
auf CD14+Zellen	p < 0,54	p < 0,81	p < 0,43
auf CD19+Zellen	p < 0,74	p < 0,50	p < 0,50
IL-4R			
auf CD19+Zellen	p < 0,34	p < 0,28	p < 0,76
IFN-γ			
auf CD3+Zellen	p < 0,20	p < 0,42	p < 0,34
auf CD3+4+Zellen	p < 0,04	p < 0,02	p < 0,87
auf CD3+8+Zellen	p < 0,39	p < 0,34	p < 0,18
IL-4			
auf CD3+Zellen	p < 0,63	p < 0,47	p < 0,88
auf CD3+4+Zellen	p < 0,70	p < 0,44	p < 0,91
auf CD3+8+Zellen	p < 0,26	p < 0,82	p < 0,21
IL-10			
auf CD3+Zellen	p < 0,03	p < 0,01	p < 0,11
auf CD3+4+Zellen	p < 0,05	p < 0,02	p < 0,10
auf CD3+8+Zellen	p < 0,20	p < 0,08	p < 0,21

Tab.9.5: Homogenitätsprüfung der untersuchten immunologischen Parameter zwischen Gesunden und RRMS- bzw. SPMS-Patienten. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung

Anhang

	RRMS-Patienten (n=44)	SPMS-Patienten (n=14)	
	MW ± SD	MW ± SD	p
IFN-R-II			
auf CD3+Zellen	11,3 ± 6,2	12,4 ± 5,7	p < 0,56
auf CD3+4+Zellen	12,1 ± 6,0	12,3 ± 5,4	p < 0,92
auf CD3+8+Zellen	9,1 ± 7,7	11,2 ± 6,3	p < 0,34
auf CD14+Zellen	207,4 ± 71,1	233,4 ± 78,0	p < 0,26
auf CD19+Zellen	34,7 ± 17,0	33,8 ± 12,9	p < 0,87
IL-4R			
auf CD19+Zellen	14,2 ± 7,2	17,3 ± 10,5	p < 0,22
IFN-γ			
auf CD3+Zellen	25,1 ± 8,9	20,0 ± 9,7	p < 0,07
auf CD3+4+Zellen	18,1 ± 8,0	14,1 ± 7,7	p < 0,11
auf CD3+8+Zellen	36,8 ± 16,8	40,8 ± 21,6	p < 0,47
IL-4			
auf CD3+Zellen	1,8 ± 1,4	2,1 ± 1,6	p < 0,46
auf CD3+4+Zellen	1,9 ± 1,5	2,1 ± 1,6	p < 0,60
auf CD3+8+Zellen	1,9 ± 2,1	2,9 ± 3,2	p < 0,15
IL-10			
auf CD3+Zellen	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,5	p < 0,67
auf CD3+4+Zellen	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,5	p < 0,82
auf CD3+8+Zellen	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,5	p < 0,95

Tab.9.6: Homogenitätsprüfung der untersuchten immunologischen Parameter zwischen RRMS- und SPMS-Patienten. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; p = Signifikanzniveau

Anhang

	untherapiert (n=17)	IFN-β-1a[A] (n=13)	IFN-β-1a[R] (n=14)	
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	11,7 ± 5,0	8,5 ± 5,7	13,3 ± 7,5	p(1) < 0,16 p(2) < 0,45 p(3) < 0,04
auf CD3+4+Zellen	12,4 ± 5,2	9,3 ± 4,9	14,3 ± 7,2	p(1) < 0,16 p(2) < 0,37 p(3) < 0,03
auf CD3+8+Zellen	9,2 ± 6,6	6,8 ± 8,3	11,0 ± 8,3	p(1) < 0,39 p(2) < 0,54 p(3) < 0,16
auf CD14+Zellen	202,9 ± 77,5	212,2 ± 69,2	208,4 ± 69,8	p(1) < 0,84 p(2) < 0,89 p(3) < 0,73
auf CD19+Zellen	32,7 ± 18,3	29,8 ± 11,9	41,6 ± 18,1	p(1) < 0,64 p(2) < 0,14 p(3) < 0,07
IL-4R				
auf CD19+Zellen	14,1 ± 8,1	12,0 ± 7,2	16,4 ± 5,7	p(1) < 0,42 p(2) < 0,38 p(3) < 0,11

Tab.9.7(a): Homogenitätsprüfung der untersuchten immunologischen Parameter (Zytokinrezeptoren) zwischen untherapierten, IFN-β-1a[A]- und IFN-β-1a[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; p(1) = Signifikanzniveau zwischen untherapierten und IFN-β-1a[A]-therapierten MS-Patienten; p(2) = Signifikanzniveau zwischen untherapierten und IFN-β-1a[R]-therapierten MS-Patienten; p(3) = Signifikanzniveau zwischen IFN-β-1a[A]-therapierten und IFN-β-1a[R]-therapierten MS-Patienten

Anhang

	untherapiert (n=17)	IFN- β -1a[A] (n=13)	IFN- β -1a[R] (n=14)	
	MW + SD	MW + SD	MW + SD	p
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	25,4 \pm 10,7	28,0 \pm 8,0	22,2 \pm 6,8	p(1) < 0,43 p(2) < 0,33 p(3) < 0,10
auf CD3+4+Zellen	19,0 \pm 9,8	19,5 \pm 7,4	15,8 \pm 5,6	p(1) < 0,86 p(2) < 0,28 p(3) < 0,24
auf CD3+8+Zellen	40,0 \pm 20,1	40,5 \pm 16,5	29,5 \pm 10,0	p(1) < 0,94 p(2) < 0,08 p(3) < 0,09
IL-4				
auf CD3+Zellen	2,1 \pm 2,0	1,8 \pm 0,8	1,5 \pm 0,9	p(1) < 0,60 p(2) < 0,23 p(3) < 0,52
auf CD3+4+Zellen	2,4 \pm 2,8	1,8 \pm 0,9	1,6 \pm 1,0	p(1) < 0,62 p(2) < 0,38 p(3) < 0,73
auf CD3+8+Zellen	2,4 \pm 2,8	2,0 \pm 1,7	2,1 \pm 0,9	p(1) < 0,68 p(2) < 0,10 p(3) < 0,24
IL-10				
auf CD3+Zellen	1,1 \pm 0,5	1,3 \pm 0,7	1,0 \pm 0,3	p(1) < 0,23 p(2) < 0,41 p(3) < 0,06
auf CD3+4+Zellen	1,1 \pm 0,5	1,3 \pm 0,7	0,9 \pm 0,3	p(1) < 0,31 p(2) < 0,25 p(3) < 0,04
auf CD3+8+Zellen	1,0 \pm 0,5	1,2 \pm 0,8	0,8 \pm 0,3	p(1) < 0,36 p(2) < 0,28 p(3) < 0,06

Tab.9.7(b): Homogenitätsprüfung der untersuchten immunologischen Parameter (Zytokine) zwischen untherapierten, IFN- β -1a[A]- und IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten mit RRMS. MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; p(1) = Signifikanzniveau zwischen untherapierten und IFN- β -1a[A]-therapierten MS-Patienten; p(2) = Signifikanzniveau zwischen untherapierten und IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten; p(3) = Signifikanzniveau zwischen IFN- β -1a[A]-therapierten und IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten.

Anhang

Gesunde (n=21)					
	Alter zu Studienbeginn		Geschlecht		
			Frauen (n=12)	Männer (n=9)	
Parameter	r	p	MW	MW	p
IFN-R-II					
auf CD3+Zellen	-0,2023	p < 0,38	9,9	14,4	p < 0,14
auf CD3+CD4+Zellen	-0,2082	p < 0,37	9,0	13,7	p < 0,17
auf CD3+CD8+Zellen	-0,1507	p < 0,51	9,6	13,1	p < 0,22
auf CD14+Zellen	-0,4286	p < 0,07	187,0	247,3	p < 0,10
auf CD19+Zellen	-0,4073	p < 0,08	41,8	45,4	p < 0,52
IL-4R					
auf CD19+Zellen	-0,2995	p < 0,19	17,1	15,6	p < 0,63
IFN-γ					
auf CD3+Zellen	0,2450	p < 0,28	22,0	24,6	p < 0,58
auf CD3+CD4+Zellen	-0,0188	p < 0,94	13,4	14,1	p < 0,69
auf CD3+CD8+Zellen	0,4751	p < 0,06	34,3	29,0	p < 0,57
IL-4					
auf CD3+Zellen	0,4480	p < 0,06	2,1	2,0	p < 0,90
auf CD3+CD4+Zellen	0,4069	p < 0,07	2,3	2,1	p < 0,79
auf CD3+CD8+Zellen	0,3945	p < 0,09	2,0	2,0	p < 0,95
IL-10					
auf CD3+Zellen	0,2778	p < 0,23	0,7	0,8	p < 0,54
auf CD3+CD4+Zellen	0,2468	p < 0,27	0,7	0,8	p < 0,63
auf CD3+CD8+Zellen	0,2841	p < 0,19	0,7	0,8	p < 0,55

Tab.9.8: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und Alter bzw. Geschlecht bei den gesunden Probanden. r = Korrelationskoeffizient (Pearson)

Anhang

MS-Patienten (n=58)					
	Alter zu Studienbeginn		Geschlecht		
			Frauen (n=40)	Männer (n=18)	
Parameter	r	p	MW	MW	p
IFN-R-II					
auf CD3+Zellen	0,1506	p < 0,26	12,1	10,1	p < 0,25
auf CD3+CD4+Zellen	0,0736	p < 0,58	12,8	10,7	p < 0,20
auf CD3+CD8+Zellen	0,2070	p < 0,12	10,0	8,7	p < 0,56
auf CD14+Zellen	-0,1003	p < 0,46	221,2	196,3	p < 0,23
auf CD19+Zellen	-0,0043	p < 0,98	35,5	32,3	p < 0,49
IL-4R					
auf CD19+Zellen	0,0095	p < 0,94	14,8	15,4	p < 0,79
IFN-γ					
auf CD3+Zellen	0,0564	p < 0,67	24,8	21,9	p < 0,28
auf CD3+CD4+Zellen	0,0755	p < 0,57	18,0	15,1	p < 0,21
auf CD3+CD8+Zellen	0,2951	p < 0,25	37,6	38,1	p < 0,92
IL-4					
auf CD3+Zellen	0,2691	p < 0,41	2,0	1,6	p < 0,28
auf CD3+CD4+Zellen	0,2083	p < 0,12	2,2	1,4	p < 0,14
auf CD3+CD8+Zellen	0,3103	p < 0,18	2,0	2,4	p < 0,60
IL-10					
auf CD3+Zellen	-0,0756	p < 0,58	1,1	1,1	p < 0,69
auf CD3+CD4+Zellen	-0,0581	p < 0,67	1,1	1,1	p < 0,76
auf CD3+CD8+Zellen	0,0221	p < 0,87	1,0	1,0	p < 0,63

Tab.9.9: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und Alter bzw. Geschlecht bei MS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Pearson)

Anhang

Parameter	Alter zu Studienbeginn			
	RRMS-Patienten (n=44)		SPMS-Patienten (n=14)	
	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	0,1537	p < 0,32	0,0475	p < 0,87
auf CD3+CD4+Zellen	0,1232	p < 0,43	-0,0773	p < 0,79
auf CD3+CD8+Zellen	0,1737	p < 0,26	0,1455	p < 0,62
auf CD14+Zellen	-0,1875	p < 0,22	-0,2254	p < 0,46
auf CD19+Zellen	-0,0303	p < 0,85	0,1644	p < 0,57
IL-4R				
auf CD19+Zellen	-0,2911	p < 0,06	0,3481	p < 0,22
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	0,1258	p < 0,42	0,4485	p < 0,11
auf CD3+CD4+Zellen	0,2017	p < 0,19	0,2666	p < 0,36
auf CD3+CD8+Zellen	0,2266	p < 0,14	0,4323	p < 0,12
IL-4				
auf CD3+Zellen	0,3515	p < 0,19	-0,0035	p < 0,99
auf CD3+CD4+Zellen	0,2767	p < 0,07	-0,0203	p < 0,95
auf CD3+CD8+Zellen	0,3685	p < 0,14	0,0318	p < 0,91
IL-10				
auf CD3+Zellen	-0,0984	p < 0,53	0,0998	p < 0,75
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1195	p < 0,45	0,1782	p < 0,56
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0272	p < 0,86	0,2380	p < 0,43

Tab.9.10: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und Alter bei RRMS- und SPMS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Pearson)

Anhang

	RRMS-Patienten (n=44)			SPMS-Patienten (n=14)		
	Frauen (n=29)	Männer (n=15)		Frauen (n=11)	Männer (n=3)	
	MW	MW	p	MW	MW	p
IFN-R-II						
auf CD3+Zellen	10,4	11,7	p < 0,51	13,3	8,9	p < 0,25
auf CD3+CD4+Zellen	12,6	11,3	p < 0,51	13,5	7,9	p < 0,11
auf CD3+CD8+Zellen	9,5	8,3	p < 0,63	11,3	11,0	p < 0,95
auf CD14+Zellen	208,4	205,5	p < 0,90	258,4	150,3	p < 0,06
auf CD19+Zellen	35,3	33,5	p < 0,75	35,9	26,3	p < 0,27
IL-4R						
auf CD19+Zellen	14,5	13,7	p < 0,72	15,5	24,0	p < 0,22
IFN-γ						
auf CD3+Zellen	26,1	23,4	p < 0,35	21,5	14,8	p < 0,31
auf CD3+CD4+Zellen	19,0	16,2	p < 0,27	15,3	9,7	p < 0,28
auf CD3+CD8+Zellen	35,6	39,0	p < 0,53	42,8	33,6	p < 0,54
IL-4						
auf CD3+Zellen	2,0	1,5	p < 0,25	2,1	2,1	p < 0,99
auf CD3+CD4+Zellen	2,2	1,3	p < 0,08	2,2	2,0	p < 0,89
auf CD3+CD8+Zellen	1,8	2,0	p < 0,76	2,6	4,5	p < 0,45
IL-10						
auf CD3+Zellen	1,1	1,1	p < 0,94	1,1	0,8	p < 0,37
auf CD3+CD4+Zellen	1,1	1,1	p < 0,94	1,1	0,8	p < 0,37
auf CD3+CD8+Zellen	1,0	1,0	p < 0,75	1,0	0,9	p < 0,66

Tab.9.11: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und Geschlecht bei RRMS- und SPMS-Patienten.

Anhang

MS-Patienten (n=58)				
	Erkrankungsdauer		Anzahl der Schübe (in den vorausgehenden 24 Monaten)	
Parameter	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	-0,0870	p < 0,52	-0,1281	p < 0,34
auf CD3+CD4+Zellen	-0,0885	p < 0,51	-0,0766	p < 0,57
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0819	p < 0,54	-0,1824	p < 0,17
auf CD14+Zellen	0,1113	p < 0,41	-0,0968	p < 0,47
auf CD19+Zellen	-0,0253	p < 0,85	-0,0604	p < 0,65
IL-4R				
auf CD19+Zellen	0,1836	p < 0,17	-0,0486	p < 0,72
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	-0,1425	p < 0,29	-0,0096	p < 0,94
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1234	p < 0,36	-0,1012	p < 0,45
auf CD3+CD8+Zellen	0,0446	p < 0,74	-0,0250	p < 0,85
IL-4				
auf CD3+Zellen	0,2068	p < 0,12	-0,0865	p < 0,52
auf CD3+CD4+Zellen	0,1749	p < 0,19	-0,0912	p < 0,50
auf CD3+CD8+Zellen	0,1862	p < 0,16	-0,0932	p < 0,49
IL-10				
auf CD3+Zellen	0,0674	p < 0,62	0,1187	p < 0,38
auf CD3+CD4+Zellen	0,0583	p < 0,67	0,1067	p < 0,44
auf CD3+CD8+Zellen	0,1474	p < 0,28	0,0878	p < 0,52

Tab.9.12: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und Krankheitsdauer bzw. Anzahl der Schübe (der vorausgehenden 24 Monate) bei MS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Pearson)

Anhang

MS-Patienten (n=58)				
Parameter	EDSS-Score		Progressionsindex ¹	
	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	-0,0231	p < 0,86	0,0460	p < 0,73
auf CD3+CD4+Zellen	-0,0862	p < 0,52	0,0403	p < 0,76
auf CD3+CD8+Zellen	-0,1095	p < 0,41	0,0327	p < 0,81
auf CD14+Zellen	-0,1268	p < 0,35	-0,1603	p < 0,23
auf CD19+Zellen	-0,0940	p < 0,48	-0,0694	p < 0,60
IL-4R				
auf CD19+Zellen	0,0399	p < 0,77	-0,0964	p < 0,47
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	-0,1665	p < 0,21	0,0558	p < 0,68
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1758	p < 0,19	0,0314	p < 0,82
auf CD3+CD8+Zellen	0,0861	p < 0,52	0,0473	p < 0,73
IL-4				
auf CD3+Zellen	-0,0409	p < 0,76	-0,2949	p < 0,03
auf CD3+CD4+Zellen	0,0693	p < 0,61	0,2912	p < 0,03
auf CD3+CD8+Zellen	0,0876	p < 0,51	-0,2218	p < 0,09
IL-10				
auf CD3+Zellen	-0,1666	p < 0,22	-0,2636	p < 0,05
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1649	p < 0,23	-0,2289	p < 0,09
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0789	p < 0,56	-0,2668	p < 0,05

Tab.9.13: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und EDSS-Score bzw. Progressionsindex bei MS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Spearman), ¹ Progressionsindex = EDSS-Score/Erkrankungsdauer

Anhang

RRMS-Patienten (n=44)				
	Erkrankungsdauer		Anzahl der Schübe (in den vorausgehenden 24 Monaten)	
Parameter	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	-0,1019	p < 0,51	-0,1934	p < 0,21
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1278	p < 0,41	-0,1297	p < 0,40
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0539	p < 0,73	-0,2596	p < 0,09
auf CD14+Zellen	-0,1932	p < 0,21	-0,1219	p < 0,43
auf CD19+Zellen	-0,0164	p < 0,92	-0,0995	p < 0,52
IL-4R				
auf CD19+Zellen	-0,0277	p < 0,86	-0,0908	p < 0,56
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	-0,1640	p < 0,29	-0,1545	p < 0,32
auf CD3+CD4+Zellen	-0,0617	p < 0,69	-0,2147	p < 0,16
auf CD3+CD8+Zellen	-0,2326	p < 0,13	-0,1047	p < 0,50
IL-4				
auf CD3+Zellen	0,0204	p < 0,90	-0,1710	p < 0,27
auf CD3+CD4+Zellen	-0,0282	p < 0,86	-0,1675	p < 0,28
auf CD3+CD8+Zellen	0,1058	p < 0,49	-0,1615	p < 0,30
IL-10				
auf CD3+Zellen	-0,1307	p < 0,40	0,0652	p < 0,68
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1882	p < 0,23	0,0540	p < 0,73
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0225	p < 0,89	0,0574	p < 0,71

Tab.9.14: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und Krankheitsdauer bzw. Anzahl der Schübe (der vorausgehenden 24 Monate) bei RRMS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Pearson)

Anhang

RRMS-Patienten (n=44)				
	EDSS-Score		Progressionsindex ¹	
Parameter	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	-0,1585	p < 0,30	0,0210	p < 0,89
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1761	p < 0,25	0,0366	p < 0,81
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0613	p < 0,69	-0,0212	p < 0,89
auf CD14+Zellen	-0,3735	p < 0,09	-0,0559	p < 0,72
auf CD19+Zellen	-0,2027	p < 0,19	-0,0778	p < 0,62
IL-4R				
auf CD19+Zellen	-0,1336	p < 0,39	-0,0908	p < 0,56
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	0,0028	p < 0,99	0,0383	p < 0,81
auf CD3+CD4+Zellen	0,0758	p < 0,63	0,0066	p < 0,97
auf CD3+CD8+Zellen	0,0513	p < 0,74	0,0429	p < 0,78
IL-4				
auf CD3+Zellen	0,0147	p < 0,93	-0,2267	p < 0,15
auf CD3+CD4+Zellen	0,0542	p < 0,73	-0,2172	p < 0,16
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0077	p < 0,96	-0,1603	p < 0,30
IL-10				
auf CD3+Zellen	-0,2390	p < 0,12	-0,1938	p < 0,21
auf CD3+CD4+Zellen	-0,2401	p < 0,13	-0,1633	p < 0,30
auf CD3+CD8+Zellen	-0,1251	p < 0,42	-0,1964	p < 0,21

Tab.9.15: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und EDSS-Score bzw. Progressionsindex bei RRMS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Spearman), ¹ Progressionsindex = EDSS-Score/Erkrankungsdauer

Anhang

SPMS-Patienten (n=14)				
	Erkrankungsdauer		Anzahl der Schübe (in den vorausgehenden 24 Monaten)	
Parameter	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	-0,2807	p < 0,33	0,3024	p < 0,29
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1175	p < 0,69	0,2148	p < 0,46
auf CD3+CD8+Zellen	-0,4798	p < 0,08	0,4273	p < 0,13
auf CD14+Zellen	0,3787	p < 0,20	0,1917	p < 0,53
auf CD19+Zellen	-0,0188	p < 0,95	0,1417	p < 0,63
IL-4R				
auf CD19+Zellen	0,2721	p < 0,35	0,2379	p < 0,41
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	0,1951	p < 0,50	0,3364	p < 0,24
auf CD3+CD4+Zellen	0,0753	p < 0,80	0,1392	p < 0,64
auf CD3+CD8+Zellen	0,2591	p < 0,37	0,3721	p < 0,19
IL-4				
auf CD3+Zellen	0,4218	p < 0,13	0,3644	p < 0,20
auf CD3+CD4+Zellen	0,4744	p < 0,09	0,3290	p < 0,25
auf CD3+CD8+Zellen	0,0937	p < 0,75	0,2669	p < 0,36
IL-10				
auf CD3+Zellen	0,5830	p < 0,03	0,3539	p < 0,24
auf CD3+CD4+Zellen	0,5585	p < 0,05	0,3551	p < 0,23
auf CD3+CD8+Zellen	0,5985	p < 0,03	0,2690	p < 0,37

Tab.9.16: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und EDSS-Score bzw. Progressionsindex bei SPMS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Spearman)

Anhang

SPMS-Patienten (n=14)				
	EDSS-Score		Progressionsindex ¹	
Parameter	r	p	r	p
IFN-R-II				
auf CD3+Zellen	0,1700	p < 0,56	0,2370	p < 0,42
auf CD3+CD4+Zellen	0,0657	p < 0,82	0,1085	p < 0,71
auf CD3+CD8+Zellen	0,4260	p < 0,13	0,4009	p < 0,16
auf CD14+Zellen	0,2281	p < 0,45	-0,5298	p < 0,06
auf CD19+Zellen	0,4170	p < 0,14	0,1418	p < 0,63
IL-4R				
auf CD19+Zellen	0,4416	p < 0,08	0,0221	p < 0,94
IFN-γ				
auf CD3+Zellen	-0,4056	p < 0,15	-0,1107	p < 0,71
auf CD3+CD4+Zellen	-0,5121	p < 0,06	-0,1218	p < 0,68
auf CD3+CD8+Zellen	-0,0657	p < 0,82	-0,1418	p < 0,63
IL-4				
auf CD3+Zellen	-0,1940	p < 0,51	-0,6696	p < 0,01
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1020	p < 0,73	-0,7597	p < 0,01
auf CD3+CD8+Zellen	-0,2629	p < 0,36	-0,5316	p < 0,05
IL-10				
auf CD3+Zellen	-0,1141	p < 0,71	-0,7143	p < 0,01
auf CD3+CD4+Zellen	-0,1199	p < 0,70	-0,5889	p < 0,03
auf CD3+CD8+Zellen	-0,1367	p < 0,66	-0,6852	p < 0,01

Tab.9.17: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und EDSS-Score bzw. Progressionsindex bei SPMS-Patienten. r = Korrelationskoeffizient (Spearman), ¹ Progressionsindex = EDSS-Score/Erkrankungsdauer

Anhang

	IFN- β -therapierte Patienten (n=37)					
	IFN- β -1a[R] (n=14)		IFN- β -1a[A] (n=13)		IFN- β -1b (n=10)	
Parameter	t-Wert	p	t-Wert	p	t-Wert	p
IFN-R-II						
auf CD3+Zellen	-0,21	p = 0,06	-1,10	p = 0,30	0,04	p = 0,97
auf CD3+CD4+Zellen	-1,68	p = 0,12	-1,32	p = 0,22	0,00	p = 1,00
auf CD3+CD8+Zellen	-1,99	p = 0,07	-0,65	p = 0,53	0,76	p = 0,47
auf CD14+Zellen	-0,93	p = 0,37	-1,01	p = 0,34	0,50	p = 0,63
auf CD19+Zellen	-1,22	p = 0,25	0,45	p = 0,66	-0,55	p = 0,60
IL-4R						
auf CD19+Zellen	0,61	p = 0,56	0,78	p = 0,45	-0,05	p = 0,96
IFN-γ						
auf CD3+Zellen	-0,28	p = 0,78	-2,05	p = 0,06	4,43	p < 0,01
auf CD3+CD4+Zellen	-0,79	p = 0,44	-0,58	p = 0,58	2,35	p = 0,05
auf CD3+CD8+Zellen	-0,32	p = 0,76	-2,35	p = 0,04	3,57	p < 0,01
IL-4						
auf CD3+Zellen	-0,13	p = 0,90	1,55	p = 0,15	1,84	p = 0,10
auf CD3+CD4+Zellen	0,47	p = 0,65	2,13	p = 0,06	1,76	p = 0,12
auf CD3+CD8+Zellen	-1,13	p = 0,28	-1,33	p = 0,21	1,44	p = 0,19
IL-10						
auf CD3+Zellen	-0,63	p = 0,54	-2,17	p = 0,05	1,67	p = 0,13
auf CD3+CD4+Zellen	-0,49	p = 0,63	-2,79	p = 0,02	1,32	p = 0,22
auf CD3+CD8+Zellen	-0,16	p = 0,88	-2,05	p = 0,07	0,58	p = 0,58

Tab.9.18: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und dem Auftreten von Nebenwirkungen (grippale Symptome) bei IFN- β -therapierten MS-Patienten.

Anhang

Parameter	IFN- β -therapierte Patienten (n=37)					
	IFN- β -1a[R] (n=14)		IFN- β -1a[A] (n=13)		IFN- β -1b (n=10)	
	t-Wert	p	t-Wert	p	t-Wert	p
IFN-R-II						
auf CD3+Zellen	-2,08	p < 0,06	-0,75	p < 0,47	-0,27	p < 0,80
auf CD3+CD4+Zellen	-2,07	p < 0,06	-1,01	p < 0,33	-0,21	p < 0,84
auf CD3+CD8+Zellen	-1,69	p < 0,12	-0,34	p < 0,74	0,00	p < 0,99
auf CD14+Zellen	-0,65	p < 0,53	-1,08	p < 0,31	0,35	p < 0,74
auf CD19+Zellen	-0,73	p < 0,48	0,90	p < 0,39	-0,97	p < 0,36
IL-4R						
auf CD19+Zellen	0,88	p < 0,40	1,05	p < 0,32	-1,14	p < 0,29
IFN-γ						
auf CD3+Zellen	-0,59	p < 0,57	-1,65	p < 0,13	1,50	p < 0,17
auf CD3+CD4+Zellen	-1,07	p < 0,31	-0,75	p < 0,47	1,17	p < 0,28
auf CD3+CD8+Zellen	-0,62	p < 0,55	-1,17	p < 0,27	1,91	p < 0,09
IL-4						
auf CD3+Zellen	-0,12	p < 0,90	1,50	p < 0,16	1,18	p < 0,27
auf CD3+CD4+Zellen	0,37	p < 0,72	2,07	p < 0,06	1,31	p < 0,23
auf CD3+CD8+Zellen	-0,84	p < 0,42	-0,94	p < 0,37	0,02	p < 0,99
IL-10						
auf CD3+Zellen	-0,81	p < 0,43	-1,13	p < 0,28	2,02	p < 0,08
auf CD3+CD4+Zellen	-0,75	p < 0,47	-1,51	p < 0,16	1,55	p < 0,16
auf CD3+CD8+Zellen	-0,22	p < 0,83	-0,83	p < 0,43	1,87	p < 0,10

Tab.9.19: Überprüfung der Korrelation zwischen den untersuchten immunologischen Parametern und vorliegender Begleitmedikation bei IFN- β -therapierten MS-Patienten.

Parameter	GRUPPE			
	IFN- β -1a[A]	IFN- β -1a[R]	IFN- β -1b	untherapiert
IFN-R-II auf CD3+Zellen	n.s.	p < 0,03	n.s.	n.s.
IFN-R-II auf CD3+CD4+Zellen	n.s.	p < 0,03	n.s.	n.s.
IFN-R-II auf CD3+CD8+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IFN-R-II auf CD19+Zellen	n.s.	p < 0,05	n.s.	n.s.
IFN-R-II auf CD14+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-4R auf CD19+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IFN- γ auf CD3+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IFN- γ auf CD3+CD4+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IFN- γ auf CD3+CD8+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL4 auf CD3+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-4 auf CD3+CD4+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-4 auf CD3+CD8+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-10 auf CD3+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,01
IL-10 auf CD3+CD4+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,01
IL-10 auf CD3+CD8+Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,02

Tab.9.20: Messzeitpunktsvergleich der Zytokin- und Zytokinrezeptoren-expression von T0 zu T3 bei den untersuchten Gruppen (IFN- β -1a[A]-Gruppe; IFN- β -1a[R]-Gruppe, IFN- β -1b-Gruppe, untherapierte MS-Patienten). Dargestellt sind die Messzeitpunkteffekte aller untersuchten Parameter zwischen T0 und T3. $p \leq 0,05$ = signifikant; $p \leq 0,01$ = hoch signifikant; n.s. = nicht signifikant

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1a[A]				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	8,5	5,7	3,3	19,0
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	9,3	4,9	3,6	21,0
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	6,8	8,3	0,3	23,2
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	29,8	11,9	5,9	47,7
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	212,2	69,2	117,0	331,6
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	12,0	7,2	3,5	32,7
T1	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	10,8	5,3	5,6	22,7
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	12,8	6,8	7,0	29,0
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	7,8	7,8	0,6	23,0
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	38,6	19,4	13,1	70,4
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	227,6	47,8	148,1	294,3
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	15,8	7,7	4,3	26,4
T2	CD3+IFN-R-II + (Rfi)	13,7	10,1	0,5	33,1
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	13,3	8,5	1,4	26,2
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	15,5	15,1	1,1	49,5
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	38,0	13,2	11,5	56,1
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	240,3	45,6	190,3	347,0
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	17,9	6,8	9,8	29,0
T3	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	11,3	6,8	2,5	25,4
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	11,4	6,7	3,4	22,5
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	10,0	7,1	0,3	27,0
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	39,5	11,1	20,8	54,3
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	230,5	82,2	129,9	366,2
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	17,7	8,1	5,1	33,9

Tab.9.21: Expression von IFN-R-II und IL-4R (Rfi) auf Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes während des Untersuchungszeitraums bei IFN- β -1a[A]-therapierten MS-Patienten (n=13). T0 = Baseline, vor Therapiebeginn; T1 = nach 3 Wochen; T2=nach 6 Wochen.; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1a[A]				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN- γ + (%)	28,0	8,0	19,1	45,3
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	19,5	7,4	9,0	37,1
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	40,5	16,5	19,8	83,8
	CD3+IL-4+ (%)	1,8	0,8	0,5	3,3
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	1,8	0,9	0,7	4,3
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,0	1,7	0,2	6,0
	CD3+IL-10+ (%)	1,3	0,7	0,5	3,3
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	1,3	0,7	0,4	2,9
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	1,2	0,8	0,2	3,0
T1	CD3+IFN- γ + (%)	27,8	18,8	9,3	70,7
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	17,9	12,5	4,6	47,4
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	42,4	24,3	16,7	85,3
	CD3+IL-4+ (%)	2,3	2,3	0,1	8,0
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	3,0	4,1	0,1	13,8
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,1	2,1	0,1	5,5
	CD3+IL-10+ (%)	0,8	0,5	0,1	1,7
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,8	0,5	0,1	1,8
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,9	0,6	0,1	1,6

Tab.9.22: IFN- γ , IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes an den Untersuchungszeitpunkten T0 und T1 bei IFN- β -1a[A]-therapierten MS-Patienten (n=13). T0 Baseline, vor Therapiebeginn; T1 = nach 3 Wochen; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1a[A]				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T2	CD3+IFN- γ + (%)	24,7	8,2	7,8	35,0
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	14,5	5,6	4,7	21,4
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	36,7	18,3	9,1	76,2
	CD3+IL-4+ (%)	1,3	1,0	0,0	3,1
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	1,6	1,1	0,0	3,2
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	0,8	1,0	0,0	3,4
	CD3+IL-10+ (%)	0,9	0,3	0,5	1,4
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,9	0,4	0,5	1,8
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,9	0,4	0,3	1,4
T3	CD3+IFN- γ + (%)	30,1	10,3	9,9	48,6
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	18,9	6,9	5,6	34,5
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	47,4	17,9	19,2	78,2
	CD3+IL-4+ (%)	1,5	0,5	0,4	2,4
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	1,5	0,8	0,2	3,2
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	1,8	1,4	0,4	4,4
	CD3+IL-10+ (%)	1,1	0,4	0,4	1,9
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	1,1	0,4	0,5	2,0
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	1,1	0,5	0,2	2,1

Tab.9.23: IFN- γ -, IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes an den Untersuchungszeitpunkten T2 und T3 bei IFN- β -1a[A]-therapierten MS-Patienten (n=13). T2 = nach 6 Wochen.; T3= nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1a[R]				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	13,3	7,5	3,0	27,2
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	14,3	7,2	2,0	26,4
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	11,0	8,3	1,7	27,1
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	41,6	18,1	13,3	71,6
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	208,4	69,8	58,0	349,3
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	16,4	5,7	8,4	29,1
T1	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	8,4	4,6	2,0	15,9
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	9,1	4,6	2,1	17,6
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	6,3	4,8	0,2	14,6
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	38,1	17,8	12,6	69,9
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	192,1	77,1	54,5	330,1
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	14,1	4,6	6,9	23,0
T2	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	8,8	4,5	2,5	18,9
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	9,7	4,4	2,5	18,9
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	6,6	6,0	0,0	22,1
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	34,6	17,5	13,8	64,1
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	190,9	88,0	88,5	357,6
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	12,3	5,7	6,0	23,2
T3	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	8,0	4,3	2,2	18,0
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	9,0	4,5	2,4	20,9
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	6,7	6,6	1,1	24,7
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	29,7	9,4	15,4	48,1
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	165,2	64,3	92,8	323,9
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	14,0	7,5	6,0	33,0

Tab.9.24: Expression von IFN-R-II und IL-4R (Rfi) auf Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes während des Untersuchungszeitraums bei IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten (n=14). T0 = Baseline, vor Therapiebeginn; T1 = nach 3 Wochen; T2=nach 6 Wochen.; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1a[R]				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN- γ + (%)	22,2	6,8	12,2	36,0
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	15,8	5,6	6,9	26,0
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	29,5	10,0	14,4	46,3
	CD3+IL-4+ (%)	1,5	0,9	0,6	3,2
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	1,6	1,0	0,6	3,8
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	1,1	0,9	0,1	3,6
	CD3+IL-10+ (%)	1,0	0,3	0,6	1,6
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,9	0,3	0,5	1,4
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,8	0,3	0,3	1,2
	T1	CD3+IFN- γ + (%)	20,0	7,9	6,8
CD3+CD4+IFN- γ + (%)		14,1	6,3	2,6	21,8
CD3+CD8+IFN- γ + (%)		25,4	12,3	9,8	42,2
CD3+IL-4+ (%)		1,3	0,8	0,5	2,5
CD3+CD4+IL-4+ (%)		1,4	0,8	0,5	2,6
CD3+CD8+IL-4+ (%)		1,4	1,1	0,5	3,4
CD3+IL-10+ (%)		0,8	0,3	0,4	1,1
CD3+CD4+IL-10+ (%)		0,7	0,3	0,2	1,1
CD3+CD8+IL-10+ (%)		0,2	0,1	0,1	0,3

Tab.9.25: IFN- γ -, IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes an den Untersuchungszeitpunkten T0 und T1 bei IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten (n=14). T0 = Baseline, vor Therapiebeginn; T1 = nach 3 Wochen; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1a[R]				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T2	CD3+IFN- γ + (%)	21,6	6,3	13,7	32,1
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	15,3	4,5	10,2	23,6
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	29,1	14,3	13,4	55,9
	CD3+IL-4+ (%)	1,5	1,1	0,1	3,5
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	1,6	1,0	0,1	3,4
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	1,6	2,1	0,2	7,5
	CD3+IL-10+ (%)	0,9	0,1	0,4	1,3
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,9	0,3	0,3	1,4
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,8	0,4	0,2	1,7
T3	CD3+IFN- γ + (%)	21,3	6,9	12,1	35,7
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	15,4	6,7	8,3	33,6
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	29,3	11,9	13,7	55,4
	CD3+IL-4+ (%)	1,9	1,2	0,6	4,3
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	1,9	1,0	0,7	3,6
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,2	2,4	0,2	7,0
	CD3+IL-10+ (%)	0,9	0,3	0,5	1,5
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,8	0,3	0,4	1,4
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,7	0,4	0,2	1,7

Tab.9.26: IFN- γ -, IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes an den Untersuchungszeitpunkten T2 und T3 bei IFN- β -1a[R]-therapierten MS-Patienten (n=14). T2 = nach 6 Wochen; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1b				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	13,3	6,0	6,2	24,8
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	13,0	5,6	6,3	22,4
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	12,2	6,7	3,7	21,6
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	37,0	13,5	23,5	55,6
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	224,5	74,9	111,6	295,1
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	19,6	10,8	2,7	36,3
T1	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	9,4	3,3	5,2	13,2
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	9,9	3,8	4,0	14,6
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	6,8	4,4	1,6	14,7
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	40,6	19,1	20,2	71,7
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	224,6	118,6	108,9	440,6
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	19,9	6,2	11,7	29,2
T2	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	10,0	4,4	2,6	14,8
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	10,0	4,2	2,5	14,6
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	9,5	6,1	1,6	21,0
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	33,1	15,6	9,8	55,6
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	202,1	82,6	122,0	319,7
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	14,5	10,2	0,0	32,0
T3	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	10,6	5,5	3,8	18,1
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	11,2	6,2	3,9	20,8
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	8,1	5,0	1,2	16,4
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	41,5	19,1	13,4	74,9
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	239,8	83,0	110,3	339,7
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	17,4	9,0	5,3	31,9

Tab.9.27: Expression von IFN-R-II und IL-4R (Rfi) auf Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes während des Untersuchungszeitraums bei IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten (n=10). T0 = Baseline, vor Therapiebeginn; T1 = nach 3 Wochen; T2=nach 6 Wochen.; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1b				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN- γ + (%)	18,6	10,2	3,9	35,5
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	12,0	6,0	0,7	20,3
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	42,5	24,3	4,4	69,6
	CD3+IL-4+ (%)	2,1	1,5	0,4	4,4
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,2	1,7	0,4	5,4
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,6	2,5	0,3	7,9
	CD3+IL-10+ (%)	1,1	0,5	0,2	1,8
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	1,1	0,6	0,2	1,8
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	1,0	0,6	0,3	1,9
T1	CD3+IFN- γ + (%)	23,5	8,0	14,0	38,5
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	14,6	4,7	8,9	20,5
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	53,7	15,6	27,2	74,2
	CD3+IL-4+ (%)	2,3	1,4	1,3	5,1
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,3	1,3	1,2	4,9
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	3,2	2,6	1,0	7,6
	CD3+IL-10+ (%)	1,0	0,6	0,4	1,9
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	1,0	0,6	0,4	1,8
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	1,1	0,9	0,2	2,6

Tab.9.28: IFN- γ -, IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes an den Untersuchungszeitpunkten T0 und T1 bei IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten (n=10). T0 = Baseline, vor Therapiebeginn; T1 = nach 3 Wochen; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: IFN- β -1b				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T2	CD3+IFN- γ + (%)	19,7	10,6	2,3	34,7
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	13,4	7,4	1,0	21,4
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	41,1	22,1	6,1	71,1
	CD3+IL-4+ (%)	2,2	1,5	0,5	5,1
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,0	1,3	0,5	4,7
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	3,5	3,1	0,6	8,9
	CD3+IL-10+ (%)	0,9	0,5	0,3	1,6
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,9	0,5	0,3	1,6
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,9	0,6	0,1	1,7
T3	CD3+IFN- γ + (%)	19,6	8,3	2,8	29,8
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	13,3	6,6	1,9	26,2
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	44,1	23,6	5,1	80,0
	CD3+IL-4+ (%)	2,0	1,2	0,5	4,5
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,0	1,2	0,5	4,6
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,7	2,0	0,2	6,0
	CD3+IL-10+ (%)	1,0	0,3	0,6	1,5
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	1,0	0,4	0,6	1,6
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	1,0	0,3	0,6	1,5

Tab.9.29: IFN- γ -, IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes an den Untersuchungszeitpunkten T2 und T3 bei IFN- β -1b-therapierten MS-Patienten (n=10). T2 = nach 6 Wochen.; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: untherapiert				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	11,4	4,8	4,0	19,4
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	12,1	5,2	5,0	23,9
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	9,2	6,2	0,0	22,9
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	31,4	16,8	9,5	86,7
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	212,5	80,7	74,1	363,5
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	13,6	7,9	3,4	27,9
T3	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	8,6	6,1	2,0	20,7
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	9,1	6,1	2,8	21,6
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	7,9	5,7	1,1	18,3
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	32,5	15,1	10,3	67,8
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	187,9	133,3	22,3	636,8
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	14,5	8,7	4,3	37,3

Tab.9.30: Expression von IFN-R-II und IL-4R (Rfi) auf Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes während des Untersuchungszeitraums bei untherapierten MS-Patienten (n=21). T0 = Baseline; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert.

Anhang

	Gruppe: untherapiert				
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN- γ + (%)	25,0	10,1	11,3	54,8
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	19,0	9,6	6,8	49,2
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	39,4	19,0	19,1	73,9
	CD3+IL-4+ (%)	2,1	2,0	0,2	8,1
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,1	2,0	0,2	9,1
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,6	3,3	0,2	11,9
	CD3+IL-10+ (%)	1,1	0,5	0,5	2,0
	CD3+CD4+IL-10+ /%	1,1	0,5	0,5	2,3
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	1,0	0,5	0,2	1,8
T3	CD3+IFN- γ + (%)	25,9	12,8	3,7	59,4
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	19,0	10,9	2,1	47,1
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	36,8	22,4	7,7	83,9
	CD3+IL-4+ (%)	2,0	1,7	0,1	7,2
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,0	1,4	0,1	4,9
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,5	3,2	0,1	13,6
	CD3+IL-10+ (%)	0,7	0,2	0,4	1,0
	CD3+CD4+IL-10+ /%	0,7	0,2	0,4	1,2
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,6	0,3	0,2	1,1

Tab.9.31: IFN- γ -, IL-4-, IL-10-positive-T-Zellen des peripheren Blutes während des Untersuchungszeitraums bei untherapierten MS-Patienten (n=21). T0 = Baseline; T3 = nach 3 Monaten; MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

Anhang

Gruppe: Gesundenkollektiv					
	Parameter	MW	SD	Min.	Max.
T0	CD3+IFN-R-II+ (Rfi)	11,2	6,3	2,5	28,3
	CD3+CD4+IFN-R-II+ (Rfi)	10,4	5,9	1,2	25,6
	CD3+CD8+IFN-R-II+ (Rfi)	11,1	6,3	2,5	25,1
	CD19+IFN-R-II+ (Rfi)	37,5	12,3	17,0	62,5
	CD14+IFN-R-II+ (Rfi)	212,3	78,3	99,5	402,9
	CD19+IL-4R+ (Rfi)	16,5	7,0	4,8	30,9
	CD3+IFN- γ + (%)	23,1	10,1	12,6	56,5
	CD3+CD4+IFN- γ + (%)	13,7	4,3	5,6	21,6
	CD3+CD8+IFN- γ + (%)	32,1	20,6	8,9	89,0
	CD3+IL-4+ (%)	2,1	1,1	0,4	4,7
	CD3+CD4+IL-4+ (%)	2,2	1,3	0,6	6,0
	CD3+CD8+IL-4+ (%)	2,0	1,3	0,2	5,5
	CD3+IL-10+ (%)	0,8	0,5	0,3	1,8
	CD3+CD4+IL-10+ (%)	0,8	0,5	0,3	1,8
	CD3+CD8+IL-10+ (%)	0,7	0,6	0,00	1,8

Tab.9.32: Expression von IFN-R-II und IL-4R (Rfi) auf Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes und IFN- γ -, IL-4-, IL-10-Produktion in T-Zellen des peripheren Blutes während des Untersuchungszeitraums bei gesunden Studienteilnehmern (n=21). T0 = Baseline, MW = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

10 Danksagung

Ich danke

Herrn PD Dr. P. Oschmann für die Anregung zur Anfertigung dieser Arbeit, für seine ständige Gesprächsbereitschaft sowie für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes während der Durchführung des praktischen Teils (1999-2002) und der damit verbundenen Möglichkeit des selbständigen Arbeitens.

Herrn Prof. Dr. E. Petzinger für die unkomplizierte Übernahme der vorliegenden Arbeit und Vertretung dergleichen am Fachbereich Veterinärmedizin

Herrn PD Dr. J. Richt für die Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin in den Jahren 1999-2003

Frau Dr. K. Funsch für die Durchführung der statistischen Auswertungen

allen Mitarbeiterinnen des Neurochemischen Labors für die freundliche Aufnahme und stetige Hilfsbereitschaft

Kerstin Retzlaff für ihr Lachen

Heike Buch, Heike Degenhardt, Sabina Kühne, Sabine Mannes-Keil, Jens Moll und Marlene Tschernatsch für ihre Freundschaft, Geduld und nicht zuletzt für die moralische Unterstützung in allen Lebenslagen.