Aus der Neurologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

Die Rolle des CD21-Rezeptors in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Nicole Marina Töpfner

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hemmer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rieder

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 EINLEITUNG 3

2.1 Die Multiple Sklerose 3
2.1.1 Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose 3
2.1.2 Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der MS 5
2.1.3 Die Rolle genetischer Faktoren in der Pathogenese der MS 8
2.1.4 Die Rolle exogener Faktoren in der Pathogenese der MS 13

2.2 Das Epstein-Barr-Virus 16
2.2.1 Die Charakterisierung des Epstein-Barr-Virus 16
2.2.2 Die Rolle des EBV in der Pathogenese der Multiplen Sklerose 17

2.3 Der CD21-Rezeptor 20
2.3.1 Die Charakterisierung des CD21-Rezeptors 20
2.3.2 Die Funktionen des CD21-Rezeptors 22
2.3.2.1 CD21 als Komplementrezeptor 22
2.3.2.2 CD21 als lösliches Plasmaprotein 23
2.3.2.3 CD21 als EBV-Rezeptor 25
2.3.3 Einzelbasenpolymorphismen des CD21-Gens 25

3 AUFGABENSTELLUNG 28

4 MATERIAL UND METHODEN 29

4.1 Rekrutierung des Patienten- und Kontrollpersonen-Kollektivs 29
4.1.1 Kollektiv für die SNP-Analyse 29
4.1.2 Kollektiv für den sCD21-ELISA 30

4.2 DNS-Isolation und RNS-Isolation aus humanem Serum 31

4.3 Primer 32

4.4 DNS-Sequenzierung 34
4.4.1 Identifikation von Polymorphismen im Gen des CD21-Rezeptors 36

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 38
4.5.1 ARMS-PCR 42
4.5.2 RFLP-PCR 44
4.5.3 RT-PCR 46

4.6 Agarose-Gelelektrophorese 49

4.7 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 50

4.8 Statistik 51
4.8.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht 51
4.8.2 Zweiseitiger Fisher-Exact-Test 52
4.8.3 Cochran-Armitage-Trend-Test 53
4.8.4 Mann-Whitney-Test 53
4.8.5 Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test 54
4.8.6 Multiples Testen 54

5 ERGEBNISSE 56

5.1 Polymorphismen im CD21-Gen 56
5.1.1 Frequenzanalyse von bekannten SNPs im CD21-Gen bei 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen 57
5.1.1.1 SNP rs3813946 57
5.1.1.2 SNP rs1048971 59
5.1.1.3 SNP rs17615 61
5.1.1.4 SNP rs4308977 62
5.1.1.5 SNP rs17616 63
5.1.1.6 SNP rs1143665 64
5.1.1.7 SNP rs17258982 64
5.1.1.8 SNP rs6540433 65
5.1.1.9 SNP rs9429940 66
5.1.2 Korrelation der SNPs rs17616 und rs4308977 67
5.1.3 Frequenzanalyse des SNP rs17615 im großen MS- und Kontroll-Kollektiv 69
5.1.4 Frequenzanalyse des SNP rs6540433 im großen MS- und Kontroll-Kollektiv 73
5.1.5 Korrelation der SNPs rs17615 und rs6540433 zum HLA-DR15-Lokus 75
5.1.6 Sequenzierung der Exone des CD21-Gens ohne bekannte SNPs bei 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen 77

5.2 Isoformen des CD21-Rezeptors 78

5.3 Lösliches CD21-Protein 80
5.3.1 sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten 81
5.3.2 sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten unter IFN-beta-Therapie 83
5.3.3 sCD21-Serumkonzentrationen bei verschiedenen MS-Verlaufsformen 85
5.3.4 Abhängigkeit der sCD21-Serumkonzentrationen vom Lebensalter 87
5.3.5 Potentielle Geschlechtsspezifität der sCD21-Serumkonzentrationen 90

6 DISKUSSION 91

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 99

8 LITERATURVERZEICHNIS 102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verschiedene Verlaufsformen der Multiplen Sklerose 3
Abbildung 2 Relatives Erkrankungsrisiko für Angehörige von MS-Patienten 9
Abbildung 3 Prozentuale MS-Konkordanzraten für Zwillinge 9
Abbildung 4 Geographische Unterschiede der MS-Prävalenz 14
Abbildung 5 Genom des Epstein-Barr-Virus 16
Abbildung 6 Expression der EBV-Proteine 17
Abbildung 7 Übersicht zu Ergebnissen der EBV-Serumpositivität 18
Abbildung 8 Antikörperkonzentrationen gegen die EBV-Proteine BRRF2 und EBNA-1 20
Abbildung 9 Lokalisation des CD21-Gens auf dem humanen Chromosom 1 21
Abbildung 10 Strukturelle Eigenschaften des CD21-Rezeptorproteins 22
Abbildung 11 EBV-Infektion humaner B-Lymphozyten 25
Abbildung 12 Schematische Darstellung der für die jeweilige Rezeptorstruktur codierenden Genabschnitte 27
Abbildung 13 Prozentuale Aufteilung der MS-Patienten aus den verschiedenen Kliniken. 29
Abbildung 14 Cycler-PCR-Zyklus der Sequenzierungsreaktion 36
Abbildung 15 Strategie zur Identifikation von SNPs im CD21-Rezeptorgen 37
Abbildung 16 Chromatogramm einer Sequenzierungsreaktion 37
Abbildung 17 Schematische Darstellung der PCR-Programme 42
Abbildung 18 Schematische Darstellung der SNP-Typisierung mittels ARMS-PCR 43
Abbildung 19 Schematische Darstellung des ARMS-PCR-Programms 44
Abbildung 20 Darstellung der Palindrom-Sequenz des Restriktionsenzyms BsiHKAI 45
Abbildung 21 Reaktionsschritte der reversen Transkription 47
Abbildung 22 Schematische Darstellung der *exon spanning* PCR 48
Abbildung 23 PCR-Programm der *exon spanning* PCR 49
Abbildung 24 Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA 50
Abbildung 25 Beziehung zwischen Allel- und Genotyp-Häufigkeit einer Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. 52
Abbildung 26 Promotersequenz des CD21-Rezeptorgens 58
Abbildung 27 Darstellung des abhängigen Auftretens des SNP rs4308977 und des SNP rs17616 in einer SeqMan-Detailansicht 69
Abbildung 28 Elektrophoretische Auftrennung der ARMS-PCR-Produkte 70
Abbildung 29 Vergleich der relativen Allel- und Genotyp-Häufigkeit des SNP rs17615 72
Abbildung 30 Gelektrophoretische Auftrennung der RFLP-PCR-Produkte 73
Abbildung 31 Vergleich der relativen Allel- und Genotyp-Häufigkeit des SNP rs6540433 75
Abbildung 32 Vergleich der relativen Allel- und Genotyp-Häufigkeit des SNP rs17615 stratifiziert nach HLA-DR15 76
Abbildung 33 Vergleich der relativen Allel- und Genotyp-Häufigkeit des SNP rs6540433 stratifiziert nach HLA-DR15 77
Abbildung 34 Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte 79
Abbildung 35 Prozentuale Verteilung der CD21-Isoform-Expression bei 50 MS-Patienten 80
Abbildung 36 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 unbehandelten MS-Patienten und 112 Kontrollpersonen und zwischen den Untergruppen des Kontroll-Kollektivs bestehend aus 56 OIND-Patienten und 56 NIND-Patienten 81
Abbildung 37 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 unbehandelten MS-Patienten mit den Teilgruppen der OIND-Patienten und der Gesamtgruppe der NIND-Patienten 83
Abbildung 38 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 nicht IFN-beta-behandelten MS-Patienten mit 28 MS-Patienten unter IFN-beta-Therapie 84
Abbildung 39 Einzelvergleich derselben 8 MS-Patienten vor und während der IFN-beta-Therapie 84
Abbildung 40 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 IFN-beta-behandelten MS-Patienten mit Teilgruppen der OIND-Patienten und der Gesamtgruppe der NIND-Patienten 85
Abbildung 41 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich zwischen MS-Patienten mit RR- und mit SP-Verlaufsform 85
Abbildung 42 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich zwischen MS-Patienten mit RR- und mit SP-Verlaufsform vor und während der IFN-beta-Therapie. 86

Abbildung 43 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich von MS-Patienten mit RR- und mit SP-Verlaufsform vor und unter IFN-beta-Therapie 87
Abbildung 44 Altersabhängigkeit der sCD21-Serumkonzentration im Gesamtkollektiv und in der Kontrollgruppe der NIND-Patienten 88
Abbildung 45 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich von MS-Patienten beider Alterskohorten. 88
Abbildung 46 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich der Alterskohorten von MS-Patienten vor und unter IFN-beta-Therapie 89
Abbildung 47 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich von männlichen und weiblichen Patienten des Gesamtkollektivs und im Vergleich von männlichen und weiblichen MS-Patienten 90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Bedeutende Nicht-MHC-Gene mit Assoziation zur Multiplen Sklerose 12
Tabelle 2 Identifizierte Gene mit potentieller MS-Assoziation 12
Tabelle 3 Validierte SNPs für den codierenden Bereich des CD21-Gens 27
Tabelle 4 Charakterisierung der verwendeten Primer-Oligonukleotide 34
Tabelle 5 Theoretische Genotypverteilung eines identifizierten Basentausches von SNP rs4308977 in der MS-Population 38
Tabelle 6 PCR-Reaktionsansatz mit AmpliTaq-DNS-Polymerase 39
Tabelle 7 PCR-Reaktionsansätze mit Taq-DNS-Polymerase 40
Tabelle 8 PCR-Reaktionsansatz mit PCR-Supermix Platinum 40
Tabelle 9 PCR-Reaktionsansatz mit HotstarTaq-DNS-Polymerase 41
Tabelle 10 Angaben zur Amplifikation der DNS-Zielsequenz vor der Sequenzierungsreaktion. 41
Tabelle 11 Primer-Oligonukleotide der ARMS-PCR 43
Tabelle 12 AMRS-PCR-Reaktionsansätze 44
Tabelle 13 Restriktionsansatz für 96 DNS-Proben 46
Tabelle 14 RT-PCR-Reaktionsansätze 47
Tabelle 15 Primerpaar für die *exon spanning* PCR (Exon 9) 48
Tabelle 16 Primerpaar für die *exon spanning* PCR (Exon 11) 48
Tabelle 17 SNPs auf den Exonen des CD21-Rezeptorgens 56
Tabelle 18 Vergleich der theoretischen und der beobachteten Genotypverteilung mittels Cochran-Armitage-Trend-Test 57
Tabelle 19 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs3813946 59
Tabelle 20 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs1048971 60
Tabelle 21 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17615 61
Tabelle 22 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs4308977 62
Tabelle 23 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17616 63
Tabelle 24 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17258982 65
Tabelle 25 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs6540433 66
Tabelle 26 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs9429940 67
Tabelle 27 Absolute und relative Häufigkeiten des verbundenen Auftretens von SNP rs17616 und SNP rs4308977 68
Tabelle 28 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17615 im großen Kollektiv 71
Tabelle 29 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs6540433 im großen Kollektiv 74
Tabelle 30 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17615 stratifiziert nach HLA-DR15 76
Tabelle 31 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs6540433 stratifiziert nach HLA-DR15 77
Tabelle 32 Altersdurchschnitt im sCD21-ELISA-Kollektiv 87

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkranku-bng des Zentralnervensystems mit bislang unbekannter Ursache. Basierend auf Voruntersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen der Epstein-Barr-Virus-Infektion und dem Auftreten der Multiplen Sklerose nahelegen, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die DNS-Sequenz des Epstein-Barr-Virus- und Komplementrezeptors CD21 auf molekulargenetische Veränderungen bei MS-Patienten untersucht.

Dazu wurden die codierenden Abschnitte des CD21-Rezeptorgens und der CD21-Promoterregion von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sequenziert und das Auftreten von Polymorphismen untersucht. Es wurden die bekannten Polymorphismen auf den Exonen 1, 10, 11, 14, 18 und 20 des CD21-Rezeptorgens bestätigt und ein neuer, bei Veröffentlichung dieser Arbeit als SNP rs17616 in der HapMap-Datenbank publizierter Polymorphismus auf Exon 11 identifiziert. Die Polymorphismen SNP rs17616 und SNP rs4308977 auf Exon 11 des CD21-Rezeptorgens scheinen den Ergebnissen dieser Studie zufolge voneinander abhängig aufzutreten. Die Polymorphismen SNP rs17615 und SNP rs6540433 wurden hinsichtlich ihrer Assoziation mit der Multiplen Sklerose in großen MS- und Kontroll-Kollektiven mittels ARMS- und RFLP-PCR untersucht. Ein – in den als Survey sequenzierten 16 DNS-Proben – deutlicher Unterschied zwischen den MS-Patienten und den Kontrollpersonen bezüglich der Allel- beziehungsweise Genotypverteilung des SNP rs17615 und des SNP rs6540433 konnte in beiden Fällen nicht bestätigt werden. Weitere neue Polymorphismen wurden auf den Exonen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17 und 19 nicht gefunden. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht konnte für alle detektierten Polymorphismen bestätigt werden. Alle Ergebnisse dieser Arbeit wurden bezüglich des Multiplen Testens korrigiert und die adjustierten Werte bei der Auswertung im großen MS- und Kontroll-Kollektiv separat angegeben.

In einer Assoziationsstudie, in der die DNS-Proben nach HLA-DR15 stratifiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Allel- beziehungsweise Genotypverteilung der Polymorphismen SNP rs17615 und SNP rs6540433 weder bei MS-Patienten noch bei Kontrollpersonen eine Korrelation zum HLA-DR15-Genotyp zeigen.

Es wurden die mRNS-Sequenzen des CD21-Rezeptors von 50 MS-Patienten bezüglich des Auftretens aller drei bekannten Isoformen des CD21-Rezeptorproteins untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Isoformen des CD21-Rezeptors bei den untersuchten MS-Patienten exprimiert werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob das CD21-Rezeptorprotein bei MS-Patienten und Kontrollpersonen unterschiedlich reguliert wird. Dazu wurden die Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Rezeptorproteins von MS-Patienten und Kontrollpersonen mittels eines *enzyme linked immunosorbent assay* gemessen.

Im Vergleich der Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Rezeptorproteins von MS-Patienten mit Kontrollpersonen zeigte sich, dass bei Patienten mit Multipler Sklerose deutlich geringere lösliche CD21-Serumkonzentrationen vorlagen. Im Gegensatz zu den Kontrollpersonen zeigten die MS-Patienten keine altersabhängige Veränderung der sCD21-Serumkonzentration. Es wurde der Einfluss der gängigen Behandlung mit Interferon-beta auf die sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten untersucht. Bei einem Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen unbehandelter MS-Patienten mit den sCD21-Serum-konzentrationen von mit Interferon-beta behandelten MS-Patienten zeigten sich unter Interferon-beta-Therapie deutlich niedrigere sCD21-Serumkonzentrationen. Die Abnahme des löslichen CD21-Rezeptorproteins konnte auch im Einzelvergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 8 MS-Patienten vor und unter Interferon-beta-Therapie bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit geringere Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Rezeptorproteins im peripheren Blut von MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen. Die bereits bekannte Interferon-beta-Wirkung auf die sCD21-Serumkonzentration konnte bestätigt werden und führt bei MS-Patienten zu einer weiteren Reduktion der sCD21-Serumspiegel.

2 EINLEITUNG

2.1 Die Multiple Sklerose

2.1.1 Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), bei der bereits in der Frühphase neurodegenerative Veränderungen beobachtet werden [1, 2]. Das Risiko, im Laufe seines Lebens an Multipler Sklerose zu erkranken, liegt in der kaukasischen Bevölkerung bei durchschnittlich 0,05 - 0,15 %. Dabei sind Frauen im Vergleich zu Männern etwa doppelt so häufig betroffen [3]. Weniger als 10 % der Patienten sind bei Ausbruch der Erkrankung älter als 55 Jahre und weniger als 5 % sind jünger als 14 Jahre [4-6]. Die Symptome weisen interindividuell eine große Variabilität auf und der Krankheitsverlauf ist bei Diagnosestellung schwer vorhersagbar. Ein gutartiger Krankheitsverlauf, der die Lebensqualität der Patienten kaum bis gar nicht beeinträchtigt, ist in 10 % der Krankheitsfälle zu beobachten. Dagegen treten bei 30 - 40 % der Patienten 15 Jahre nach Beginn der Erkrankung schwere Behinderungen auf, in deren Rahmen die Patienten rollstuhlangewiesen oder bettlägerig werden [7]. Trotz intensiver Studien ist bislang noch kein zuverlässiger prognostischer Faktor für den Verlauf der Erkrankung gefunden worden.

Allen Erscheinungsformen der Multiplen Sklerose ist das Auftreten von neurologischen Symptomkomplexen gemeinsam, die auch intraindividuell variieren können. Klinisch unterteilt man, wie in Abbildung 1 dargestellt, nach dem quantitativen Muster dieser repetitiven Symptomsequenzen und der qualitativ fortschreitenden Beeinträchtigung durch die Erkrankung folgende verschiedene MS-Verlaufsformen: schubförmig (RR), sekundär chronisch progredient (SP) und primär chronisch progredient (PP).

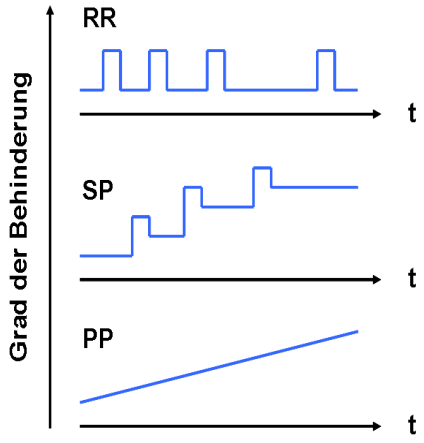


Abbildung 1 Verschiedene Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.

Bei 80 - 90 % der Patienten manifestiert sich die schubförmige MS-Verlaufsform, in der sich Phasen der plötzlich auftretenden klinischen Verschlechterung mit stabilen, beschwerdefreien Phasen abwechseln (relapsing remitting MS, RR-MS). Zu einer stetigen klinischen Verschlechterung ohne das Auftreten von akuten Schüben und Phasen der Erholung kommt es initial bei 10 - 20 % der Patienten (primär chronisch progrediente MS, PP-MS). Die Mehrzahl der Patienten mit schubförmiger Verlaufsform treten in der Spätphase ihrer Erkrankung in eine progrediente Phase ein (sekundär chronisch progrediente MS, SP-MS) [1].

Im Rahmen neuropathologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bei der MS zu einer Inflammation der Myelinscheide betroffener Nervenfasern kommt. Dieser Entzündungsreaktion folgen jeweils in unterschiedlichem Maße eine lokale Demyelinisierung und ein sich anschließender Regenerationprozess, bei dem die Neuronen remyelinisiert werden.

In den computertomographischen Bildaufnahmen stellen sich die Entzündungsareale als dunkelgraue, hypodense Herde dar, die insbesondere periventrikulär, im Balken, im Hirnstamm, im Cerebellum und in der weißen Substanz des Rückenmarks auftreten. Mit Hilfe kernspintomographischer Bildgebungsverfahren (Magnetresonanztomographie, MRT) können hyperintense Entmarkungsherde der weißen Substanz des Gehirns sichtbar gemacht werden, die auch bei vermeintlicher klinischer Stabilität subklinisch aktiv sind [8].

Bei der laborchemischen Analyse des Liquor cerebrospinalis (CSF) findet man als Zeichen der inflammatorischen ZNS-Reaktion bei 60 % der MS-Patienten eine leichte lymphozytäre Pleozytose (Zellzahl > 4 Zellen/µl). Nach isoelektrischer Fokussierung weisen 95 % der MS-Patienten oligoklonale Banden des Immunglobulin G (IgG) im Liquor, jedoch nicht im Serum auf. Dieser Nachweis einer intrathekalen Produktion von IgG-Antikörpern, die auch nach Abklingen des akuten Schubes noch zu erkennen ist [9], gilt als bisher zuverlässigster laborchemischer Parameter in der MS-Diagnostik.

Der Ort der Nervenschädigung und das jeweilige Läsionsprofil bestimmen dabei die klinisch-neurologische Symptomatik der Patienten. Insbesondere in vergangener Zeit wurden Symptomkompexe, wie die Charcot-Trias (Nystagmus, Intentionstremor, skandierte Sprache) oder die Marburg-Trias (Paraspastik, Erlöschen der Bauchhautreflexe, temporale Papillenunschärfe), sowie spezielle klinische Zeichen, wie z. B. das Lhermitte-Zeichen (bei

Nackenbeugung elektrisierende Empfindungen entlang der Wirbelsäule mit Ausstrahlung in Arme und Beine) und das Uthoff-Phänomen (Verschlechterung der Symptome bei Hitze und Fieber, Verbesserung bei Kälte) als entscheidende klinische Diagnosehilfen benutzt.

Das spezifischste, seitdem in eingehenden Krankheitsanalysen gefundene und bis heute anerkannte Charakteristikum der MS-Symptomatik ist die multilokuläre und mehrzeitig auftretende Funktionsstörung des ZNS. Es ist entscheidend, dass mindestens zwei verschiedene Regionen des ZNS zeitlich getrennt betroffen sind. Anhand dieses Kriteriums erfolgt die Diagnose der MS auch heute noch in erster Linie klinisch anhand von neurologischen Funktionseinschränkungen beziehungsweise -ausfällen. In der Erweiterung der Diagnosekriterien nach McDonald et al. [10] wird postuliert, dass auch eine im Zeitverlauf neu im MRT dargestellte Läsion die Diagnose der MS sichern kann. Unterstützt wird die Diagnose der Multiplen Sklerose bei weiteren subklinischen Schädigungen des ZNS zusätzlich durch die Ableitung evozierter Potentiale und die laborchemische Untersuchung des Liquor cerebrospinalis.

Die Ursache der Multiplen Sklerose bleibt trotz engagierter Forschungsprojekte bis jetzt ungeklärt und erschwert die Entwicklung von effizienten MS-spezifischen Therapien, die den Krankheitsverlauf nachhaltig beeinflussen können. Im akuten Krankheitsschub erhalten die MS-Patienten eine Stoßtherapie mit hohen Dosen von Methylprednisolon. Diese Stoßtherapie begünstigt die schnelle Rückbildung der Symptome, hat aber keine gesicherte Langzeitwirkung. Durch die positiven Ergebnisse mehrerer großer, multizentrisch durchgeführter Therapiestudien hat die immunmodulatorische Behandlung der Multiplen Sklerose einen wichtigen Durchbruch erlebt [11, 12]. Ein positiver Einfluss auf die Schubfrequenz und den Krankheitsverlauf konnte durch neu entwickelte Medikamentengruppen beobachtet werden. Zu den bis dato spezifisch für die MS-Therapie eingesetzten Substanzen zählen Interferon-beta-1b, Interferon-beta-1a, Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab.

2.1.2 Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der MS

Die histopathologischen Beobachtungen der ZNS-Infiltrationen durch Immunzellen, die Antikörperablagerungen und Komplementaktivierung in akuten Läsionen und das Ansprechen der Patienten auf Immuntherapien belegen die zentrale Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der Multiplen Sklerose [13-15].

Neben der bekannten klonotypischen Rekrutierung von CD8-Rezeptor-positiven-T-Zellen ist eine oligoklonale Expansion von B-Zellen sowohl in akuten Hirnläsionen [16, 17] wie auch im Liquor [18-20] von MS-Patienten nachweisbar, die im peripheren Blut nicht beobachtet werden kann. Die molekularen Analysen des B-Zell-Rezeptors von im ZNS expandierenden Zellen konnten darüber hinaus nachweisen, dass in den hypervariablen Rezeptorregionen somatische Hypermutationen auftreten, die sonst im Rahmen wiederholter Exposition mit dem gleichen Antigen beobachtet werden.

Die ausschließlich im Liquor von MS-Patienten vorhandenen oligoklonalen IgG-Banden (OKB) sind bis dato der zuverlässigste Laborparameter zur Diagnose der Multiplen Sklerose. Als Ansammlung von Antikörpern sind sie Zeichen einer aktiven, humoralen Immunreaktion im ZNS [21]. In molekularbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit anderen chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen, wie z. B. der Neuroborreliose, der Herpesenzephalitis und der subakut sklerosierenden Panenzephalitis nach Maserninfektion, die dort auftretenden intrathekalen Immunglobuline gegen das jeweils krankheitsverursachende Pathogen gerichtet sind [22]. Die Spezifität der oligoklonalen Antikörper bei MS-Patienten ist bisher unbekannt.

Zahlreiche Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen weisen unabhängig von der genauen Antigen-Spezifität einer sehr spezifischen Immunantwort den zentralen Stellenwert in der Pathogenese der Multiplen Sklerose zu. Es kann festgestellt werden, dass vergleichbare spezifische T- und B-Zell-Reaktivitäten bei akuten oder chronischen Infektionen des ZNS auftreten. Aus dieser Analogie wurde das infektiöse Modell für die Pathogenese der Multiplen Sklerose entwickelt. Da die Multiple Sklerose die Lebenserwartung der Patienten kaum beeinflusst, ist ein viraler Erreger am wahrscheinlichsten, der im menschlichen Organismus nicht zu schweren, potentiell lebensbedrohlichen Infektionen führt, sondern im Wirt persistiert und eine chronische Immunreaktion auslöst. In diesem immunpathogenetischen Konzept ist es möglich, dass Immunzellen entweder durch in der Peripherie vorhandene Viren aktiviert werden und in das ZNS einwandern oder eine Stimulation von Immunzellen durch die kurzzeitige Expression viraler Antigene von in enzephalitogenen Zellen latent persistierenden Viren [23] induziert wird. Die histopathologischen Befunde von MS-Läsionen weisen eine große Ähnlichkeit mit histopathologischen Befunden von humanen Erkrankungen durch neurotropen Viren [24, 25] und aus viralen Tiermodellen auf [26]. Indirekte Evidenz liefern zusätzlich die beobachtete Wirksamkeit von Interferonen mit antiviralen Effekten in

der MS-Therapie und die abnorme Immunantwort von MS-Patienten im Rahmen viraler Infekte [27, 28].

Ein anderes immunpathogenetisches Konzept postuliert, dass ein bedeutsamer Autoimmunprozess zentral für die Pathogenese der Multiplen Sklerose ist, der durch die antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften der Interferone [29] inhibiert werden kann. Dieser könnte in Form einer mit Myelin-Antigenen kreuzreagierenden Immunantwort stattfinden, die durch ein Agens im Rahmen einer akuten peripheren Immunreaktion induziert wird. Das sogenannte Autoimmunitätsmodell wurde aus der Beobachtung entwickelt, dass durch einen mit Myelin kontaminierten Rabies-Impfstoff eine akute Demyelinisierung im ZNS der Patienten ausgelöst wurde [30, 31]. Durch in der Peripherie vorhandene myelin-ähnliche Antigene könnten die Immunzellen aktiviert werden, die Blut-Hirn-Schranke überschreiten und durch den Kontakt mit ähnlichen Epitopen von Myelin-Proteinen aktiviert zu einer autoimmunen neuronalen Entzündungsreaktion und Gewebedestruktion der weißen Hirnsubstanz führen [32]. Diese These wird durch das Tiermodell der Multiplen Sklerose – der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) – unterstützt. In diesem konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Myelin-Antigen und Freundschem Adjuvans in bestimmten Maus-Stämmen eine demyelinisierende Enzephalomyelitis auslösen kann [33].

Als eine Art Synthese des infektiösen Modells und des Autoimmunitätsmodells für die Entstehung der Multiplen Sklerose kann das Modell des Molekularen Mimikry [34, 35] verstanden werden. In diesem wird postuliert, dass durch ein infektiöses Agens, das wirtseigene Strukturen imitiert, die humanen Immunzellen aktiviert werden. Diese primär gegen den Erreger gerichteten Immunzellen reagieren jedoch gleichzeitig bei Kontakt mit dem imitierten humanen Protein im ZNS und leiten auch dort eine inflammatorische Abwehrreaktion ein. Für diese Hypothese spricht die hohe Sequenz-Homologie zwischen verschiedenen Virusproteinen und Teilen des myelin-basischen Proteins (MBP) [36]. Zudem konnte eine Kreuzreaktion gegen MBP nach Stimulation spezifischer T-Zellen mit Virusantigenen nachgewiesen werden [37]. Eine genetische Prädisposition einzelner Individuen, wie sie für die Expression bestimmter humaner Leukozyten-Antigene (HLA) nachgewiesen ist, wäre durchaus mit diesem Konzept vereinbar.

Die akute periphere Immunreaktion, die zur Kreuzreaktion mit körpereigenen Proteinen und damit zur Autoimmunität führt, kann durch die Komplexität des menschlichen Immunsystems auf unterschiedlichsten Mechanismen beruhen.
Zum besseren Verständnis der MS-Pathogenese ist deswegen die Antigen-Spezifität der Immunreaktion seit langer Zeit Gegenstand der Forschung. Cepok et al. konnten 2005 Hinweise auf die Antigen-Spezifität der intrathekalen oligoklonalen IgG-Antikörper liefern [38]. Mittels Protein-Expressions-Array konnten zehn potentielle Zielantigene detektiert werden, gegen die Liquor-Antikörper von MS-Patienten deutlich höhere Immunreaktivitäten zeigten als Liquor-Antikörper von Kontrollpersonen. In der Analyse der Immunreaktivitäten wurden Überlappungen gefunden, die letztendlich zur Identifikation zweier Proteingruppen führten. Diese Proteine konnten in einer ausgedehnten Epitop-Suche schließlich als zwei Proteine des Epstein-Barr-Virus – BRRF-2 und EBNA-1 – identifiziert werden. Die deutlich stärkere Immunreaktivität im Liquor und Serum von MS-Patienten gegen diese EBV-Proteine wurde in weiterführenden Analysen bestätigt. Es konnte für einige ausgewählte MS-Patienten gezeigt werden, dass die OKBs im Liquor spezifisch gegen EBNA-1 und BRRF-2 gerichtet sind. Serafini et al. konnten eine bedeutende Anzahl EBV-infizierter B-Lymphozyten und Plasmazellen in der Mehrzahl der untersuchten ZNS-Gewebe von MS-Patienten nachweisen, die bei Patienten mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen nicht nachweisbar waren [39].

Neben der Identifikation krankheitsassoziierter Antigene im Rahmen der Immunpathogenese ist zum Verständnis der unterschiedlichen MS-Suszeptibilität und Heterogenität des Krankheitsverlaufs zusätzlich der potentielle Einfluss genetischer Faktoren von großer Bedeutung.

2.1.3 Die Rolle genetischer Faktoren in der Pathogenese der MS

Die Ergebnisse vieler unabhängiger Familienstudien legen nahe, dass genetische Komponenten an der Entstehung der Multiplen Sklerose beteiligt sind [40-42]. Die Wiederkehrrate von MS in Familien liegt bei ungefähr 15 %. Heterozygote Geschwisterkinder von MS-Patienten weisen im Vergleich zu Kindern aus nicht betroffenen Familien ein 20- bis 30-fach höheres Erkrankungsrisiko auf. Für monozygote Zwillinge wurde sogar ein um 150- bis 200-fach erhöhtes Risiko, an MS zu erkranken, detektiert [32]. Dieses erhöhte Erkrankungsrisiko gilt jedoch weder für gesunde Kinder, die in eine von MS betroffene

Familie adoptiert werden, noch für eine gesunde Familie nach Adoption eines genetisch nicht verwandten, an MS erkrankten Kindes [43, 44].

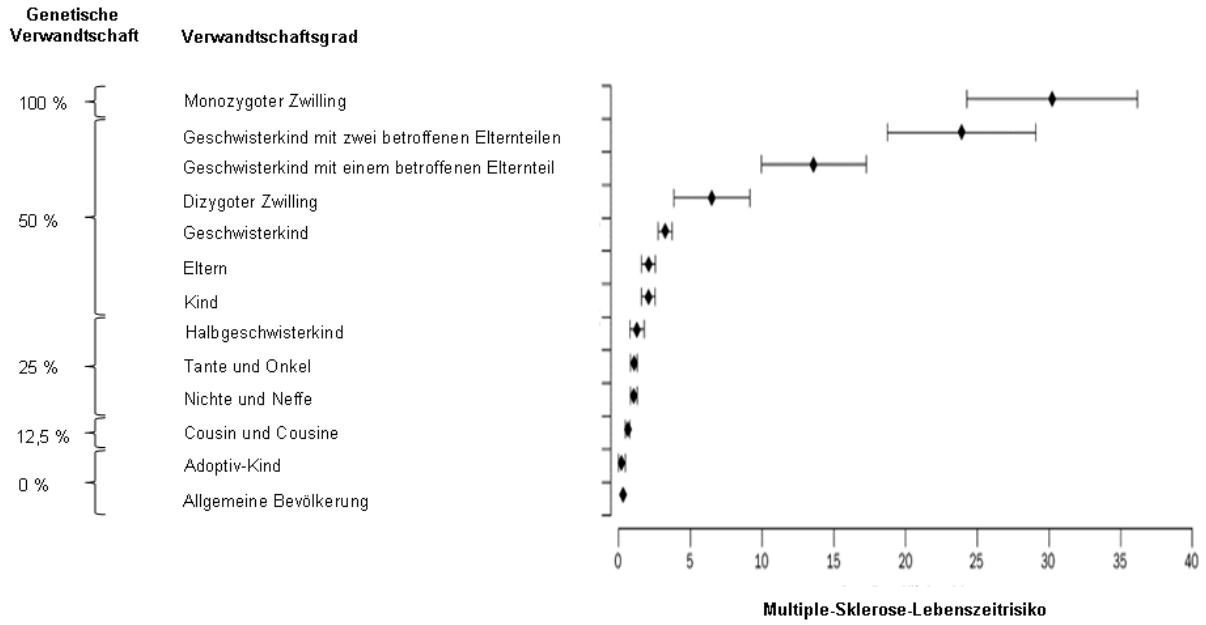


Abbildung 2 Relatives Erkrankungsrisiko für verwandte und nicht-verwandte Angehörige von MS-Patienten in Abhängigkeit vom prozentualen genetischen Verwandtschaftsgrad in Anlehnung an Sadovnick et al. [42, 45].

Das in Abbildung 2 dargestellte, insbesondere für monozygote Zwillinge deutlich erhöhte MS-Erkrankungsrisiko, weist auf den Einfluss von genetischen Faktoren hin, deren Bedeutung in zahlreichen Zwillingsstudien belegt werden konnte.

In keiner der in Abbildung 3 gezeigten Studien konnte eine Konkordanz für den Krankheitsverlauf – mit Ausnahme der PP-MS-Verlaufsform – oder eine Konkordanz für die klinische Progression gezeigt werden. Die Konkordanz für das Manifestationsalter scheint ebenfalls schwach ausgeprägt zu sein.

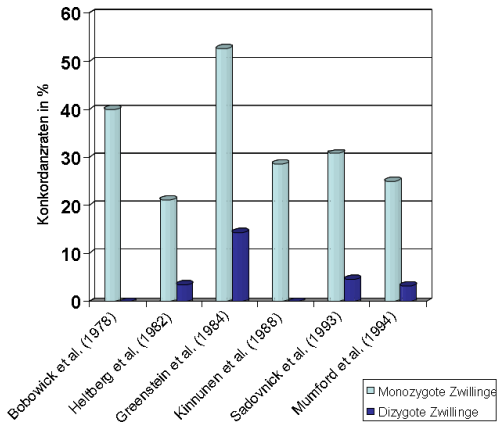


Abbildung 3 Prozentuale MS-Konkordanzraten für mono- und dizygote Zwillinge im Vergleich verschiedener Zwillingsstudien [41, 46-50].

Da in vielen Studien eine familiäre Aggregation an MS-Erkrankungen von nicht monozygot verwandten Angehörigen auf eine genetische Prädisposition hindeutete, versuchten Ebers et al. [51] im Vergleich von betroffenen mit nicht-betroffenen Familien einen spezifischen klinischen Phänotyp zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass trotz familiärer Disposition diese Patientengruppen keinen jeweils charakteristischen Krankheitsverlauf zeigten, der es ermöglichte, sie als eigene Entität abzugrenzen.

Durch das errechnete Erkrankungsrisiko (λ = recurrence risk ratio) von Angehörigen an MS erkrankter Personen – mit einem λ-Wert zwischen 20 und 50 % – ist es wahrscheinlich, dass das familiär gehäufte Auftreten der Multiplen Sklerose nicht nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wird [52]. Dieser λ-Wert weist vielmehr eine Ähnlichkeit zu komplexen, polygenen Erbgängen auf. So scheint die Suszeptibilität für MS von der Interaktion vieler verschiedener Genloki abzuhängen, von denen jedes einzelne Gen nur einen milden Effekt hat [53]. Aufgrund dieser polygenen Suszeptibilität fanden umfangreiche Genomscreenings in zahlreichen Ländern statt mit dem Ziel, sogenannte Kandidatengene zu identifizieren, die mit der Entstehung von MS verknüpft sind. Es wurden genomweite Kopplungsanalysen mit an MS erkrankten Geschwisterpaaren aus Kanada, den USA, Großbritannien und Europa durchgeführt [54-57]. Eine signifikante Assoziation zur Multiplen Sklerose wurde für HLA-Gene nachgewiesen. Diese gehören zu einem komplexen, kodominant vererbten System von Gewebeantigenen. Auf welche Weise das auch als MHC (*major histocompatibility complex*) bezeichnete System für MS prädisponiert, ist bislang pathogenetisch nicht eindeutig geklärt. Die Stärke der HLA-Assoziation zwischen einzelnen ethnischen Populationen scheint zu variieren und damit nicht den einzigen genetischen Faktor darzustellen. Es ist vorstellbar, dass auch benachbarte Gene zusätzliche Prädispositionsfaktoren sind. Darauf hinweisend ist ein starkes Kopplungsungleichgewicht im Genabschnitt der HLA-Allele, das zeigt, dass die hier lokalisierten Gene nachweislich häufiger als erwartet gemeinsam vererbt werden.
Verschiedene unabhängige Studien zeigen das HLA-Cluster als den DNS-Lokus mit dem stärksten Einfluss auf die MS-Suszeptibilität. Durch die Analyse der Ähnlichkeit von HLA-Genen in Zwillingsstudien wurde der Anteil an der gesamten genetischen Suszeptibilität auf 20 % bis 60 % geschätzt [58].
Wesentliche Fortschritte in der MS-Genetik konnten durch genomweite Assoziationsstudien erzielt werden. Gregory et al. konnten für die α-Kette des Interleukin-7-Rezeptors (IL7R) eine allelische und funktionelle Assoziation zur Multiplen Sklerose in vier unabhängigen Familien- und Fall-Kontroll-Studien zeigen. Durch einen exonischen Polymorphismus kommt

es zu unterschiedlicher Genexpression, die darüber hinaus ein unterschiedliches Verteilungsverhältnis zwischen membran-gebundenem und löslichem IL7R-Protein bedingt [59]. Andere Forschungsgruppen zeigten eine Assoziation von Polymorphismen im Gen der α-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL2RA) [60].

Genomweite Assoziationsanalysen und Untersuchungen von Kandidatengenen bezüglich anderer humaner Autoimmunerkrankungen deuten auf eine gemeinsame „genetische Architektur“ der phänotypisch verschiedenen Krankheiten hin. Es wurde für das Gen eines Zuckerbindungsproteins (KIAA0350) und das IL7R-Gen eine Assoziation sowohl zur Multiplen Sklerose als auch zu Diabetes mellitus Typ-1 (T1D) nachgewiesen. Für das IL2RA-Gen konnte eine Assoziation zu Diabetes mellitus Typ-1, der Multiplen Sklerose, dem Morbus Basedow, dem Systemischen Lupus Erythematodes und der Rheumatoiden Arthritis gezeigt werden [61]. Für diese Überlappung genetischer Loki bei Autoimmunerkrankungen kann es verschiedene Erklärungen geben. Zum einen kann der Beitrag gemeinsamer Allele, zum anderen der Beitrag nicht-gemeinsamer, aber krankheitsspezifischer Allele oder drittens eine Kombination beider Möglichkeiten zum Risiko der individuellen Krankheiten beitragen. In diesem Zusammenhang konnte für die mit dem IL-2-Rezeptor assoziierte Krankheitssuszeptibilität gezeigt werden, dass es eine deutliche allelische Heterogenität zwischen MS und T1D gibt, die beim Auftreten der gleichen Allel-Variante mit einer Suszeptibilität für die eine Krankheit bei gleichzeitiger Resistenz für die andere Krankheit einhergeht. Für einen Polymorphismus in dem Gen des CD226-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass eine Allelform für die Suszeptibilität von MS und T1D sowie möglicherweise für die Interferon-induzierte Autoimmune Thyreoiditis und die Rheumatoide Arthritis prädisponiert. Im funktionellen Kontext konnte durch Anti-CD226-Antikörper im Maus-Modell der MS der Manifestationszeitpunkt der Krankheit und die Schwere des Krankheitsverlaufs positiv beeinflusst werden [62].

In Tabelle 1 sind die acht bedeutensten Nicht-MHC-Gene mit Assoziation zur Multiplen Sklerose nach Oksenberg et al. dargestellt [58].

Tabelle 1 Bedeutende Nicht-MHC-Gene mit Assoziation zur Multiplen Sklerose [58].

Gene (NCBI ID)	Chromosomal position	Biological function(s)	GWA screen	Validation		Overall	
			Family[‡]	*Case–control*[§]	*Combined*[‖]	*Combined*[¶]	*Odds ratio*
IL2RA, interleukin 2 receptor, alpha (3559)	10p15	Apoptosis, immune response	1×10^{-3}	1×10^{-3}	5×10^{-4}	3×10^{-8}	1.25
IL7R, interleukin 7 receptor (16197)	5p13	Cell survival, immune response	6×10^{-3}	2×10^{-2}	3×10^{-5}	3×10^{-7}	1.18
CLEC16A, C-type lectin domain family 16, A (23274)	16p13	Sugar-binding, C-type lectin	3×10^{-2}	7×10^{-3}	2×10^{-5}	4×10^{-6}	1.14
RPL5, ribosomal protein L5 (6125)	1p22	Ribosomal protein, chaperone for the 5S rRNA	4×10^{-4}	2×10^{-4}	9×10^{-4}	8×10^{-6}	1.15
DBC1, deleted in bladder cancer 1 (1620)	9q33	Cell-cycle arrest, apoptosis	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-3}	8×10^{-6}	1.17
CD58, lymphocyte function-associated antigen 3 (965)	1p13	Cell–cell adhesion, immune response	1×10^{-3}	3×10^{-5}	2×10^{-3}	2×10^{-5}	1.24
ALK, anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (238)	2p23	Tyrosine kinase receptor, brain development	1×10^{-4}	1×10^{-2}	3×10^{-3}	7×10^{-5}	1.37
FAM69A, family with sequence similarity 69, A (388650)	1p22	Protein binding	2×10^{-5}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	9×10^{-5}	1.12

In einer Genom-Konvergenz-Studie mit 9 Gen-Expressions-Studien ermittelten Gregory et al. 28 Gene, die in mindestens 2 von 9 Studien eine MS-abhängige Expression aufwiesen [59]. Die Ergebnisse werden in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2 Identifizierte Gene mit potentieller MS-Assoziation in einer Genom-Konvergenz-Studie von Gregory et al. [59].

Name	Chr.	# Exons	Transcript Size (kb)	Genomic Size (kb)	# SNPs	Publication	Description
MMP19	12q13.2	9	669	7.5	66	M. Ramanathan et al.; C. Lock et al.	Matrix metalloproteinase-19
TIMP1	Xp11.3	5	624	3.2	29	R. Bomprezzi et al.; S. M. Ibrahim et al.	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
CCL2	17q11.2	3	743	1.9	69	B. Franzen et al.; S. M. Ibrahim et al.	Chemokine (C-C motif) ligand 2
PSMB8	6p21.32	6	1346	3.9	86	S. M. Ibrahim et al.; A. Matejuk et al.	Proteasome subunit, beta type, 8
FCGR1A	1q21.2	6	3433	11.0	412	C. Lock et al.; S. M. Ibrahim et al.	Fc fragment of IgG, high affinity Ia
IGKC	2p11.2	1	321	0.3	62	C. Lock et al., S. M. Ibrahim et al.	Immunoglobulin kappa constant
IL7Rα	5p13.2	8	1802	19.9	83	R. Bomprezzi et al.; M. Ramanathan et al.	Interleukin 7 receptor
TAP1	6p21.32	11	2945	8.7	105	F. Koike et al.; B. Franzen et al.	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B
TCB_human	7q34	2	525	10.8	17	C. Lock et al.; S. M. Ibrahim et al.	T-cell receptor beta chain C region
TNFRSF7	12p13.31	6	783	6.2	75	M. P. Mycko et al.; R. Bomprezzi et al.	Tumor necrosis factor rcptr superfamily, member 7
BRF1	14q24.1	16	414	91.4	206	M. P. Mycko, et al.; R. Bomprezzi et al.	BRF1 homolog, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB
MAP2K1	15q22.31	11	2176	104.2	118	M. P. Mycko et al.; C. Lock et al.	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
PAFAH1B1	17p13.3	9	1200	16.4	65	R. Bomprezzi et al.; S. M. Ibrahim et al.	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib
IFI30	19p13.11	7	1032	4.3	55	R. Bomprezzi et al.; F. Koike et al.	Interferon, gamma-inducible protein 30
DDR1	6p21.33	20	2757	10.6	135	B. Franzen et al.; M. P. Mycko et al.	Discoidin domain receptor family, member 1
DNAJA1	9p21.1	9	1312	13.7	60	B. Franzen et al.; R. Bomprezzi et al.	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
C1QB	1p36.12	3	985	8.2	84	A. Matejuk et al.; S. M. Ibrahim et al.	Complement component 1, q subcomponent, beta
C1QG	1p36.12	3	1155	4.4	72	A. Matejuk et al.; S. M. Ibrahim et al.	Complement component 1, q subcomponent, gamma
CCL5	17q12	3	1225	8.9	25	A. Matejuk et al.; S. M. Ibrahim et al.	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CD44	11p13	18	3044	90.8	196	A. Matejuk et al.; M. P. Mycko et al.	CD44 antigen
CD53	1p13.3	8	1507	26.7	90	S. M. Ibrahim et al.; A. Matejuk et al.	CD53 antigen
ICAM1	19p13.2	7	2999	15.5	127	A. Matejuk et al.; B. Franzen et al.	Intercellular adhesion molecule 1
IFIT1	10q23.31	1	1434	1.4	38	A. Matejuk et al.; F. Koike et al.	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IRF7	11p15.5	10	1566	2.7	48	A. Matejuk et al.; F. Koike et al.	Interferon regulatory factor 7
ITGAM	16p11.2	19	3444	70.0	106	A. Matejuk et al.; M. Ramanathan et al.	Integrin, alpha M
LTB	6p21.33	4	894	1.8	137	A. Matejuk et al.; B. Franzen et al.	Lymphotoxin beta
ZAP70	2q11.2	10	2251	15.8	30	R. Bomprezzi et al.; A. Matejuk et al.	Zeta-chain associated protein kinase, 70kDa
TNFRSF1B	1p36.22	10	1387	40.9	275	A. Matejuk et al., L. W. Whitney et al.	Tumor necrosis factor rceptr superfamily, member 1B

Insgesamt ist die Anzahl weiterer Gene und Polymorphismen groß, denen auch eine mögliche Bedeutung in der Pathogenese oder für den Verlauf der Multiplen Sklerose zukommt.

Eine Alternative zur statistischen Analyse großer Genabschnitte, um Hinweise auf die Relevanz einzelner Gen-Loki zu identifizieren, stellt der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz dar, die Auswahl eines definierten zu untersuchenden Gen-Lokus nach funktionell-kausalen Kriterien. Es wird in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von Polymorphismen im Gen des CD21-Rezeptors untersucht, einem für die Immunregulation bedeutenden Komplementrezeptor, der zudem maßgeblich am EBV-Infektionsprozess von B-Zellen beteiligt ist.

2.1.4 Die Rolle exogener Faktoren in der Pathogenese der MS

Trotz intensiver Bemühungen, die Ätiologie der MS in genetischen Faktoren zu identifizieren, zeigten sich auch in Familienstudien immer wieder Hinweise auf die Existenz exogener Faktoren mit möglicherweise ätiologischer und pathogenetischer Relevanz. Neben der Varianz der Konkordanzraten in den verschiedenen Zwillingsstudien [63] spricht auch die Differenz zu 100 % der in Abbildung 3 in Abschnitt 2.1.3 dieser Arbeit dargestellten Konkordanzraten von monozygoten Zwillingen für die Existenz eines zusätzlich nicht genetisch determinierten Faktors. Es wurden neben genetischen Arbeiten umfangreiche epidemiologische Analysen und Migrationsstudien durchgeführt mit dem Ziel, prädisponierende beziehungsweise krankheitsmodulierende Umweltfaktoren zu identifizieren.

Die Multiple Sklerose hat weltweit eine Prävalenz von 1 bis 300 Erkrankungen pro 100000 Einwohner [64]. Dabei wiesen – wie in Abbildung 4 dargestellt – in den letzten Jahrzehnten die Prävalenzraten deutliche geographische Unterschiede auf mit einem kontinuierlichen Anstieg der Krankheitshäufigkeit bei steigender Entfernung zum Äquator. So konnte man in ethnisch homogenen Populationen in der nördlichen Erdhemisphäre einen Prävalenzgradienten von Nord nach Süd und auf der südlichen Erdhalbkugel ein Prävalenzgradienten von Süd nach Nord beobachten [65].

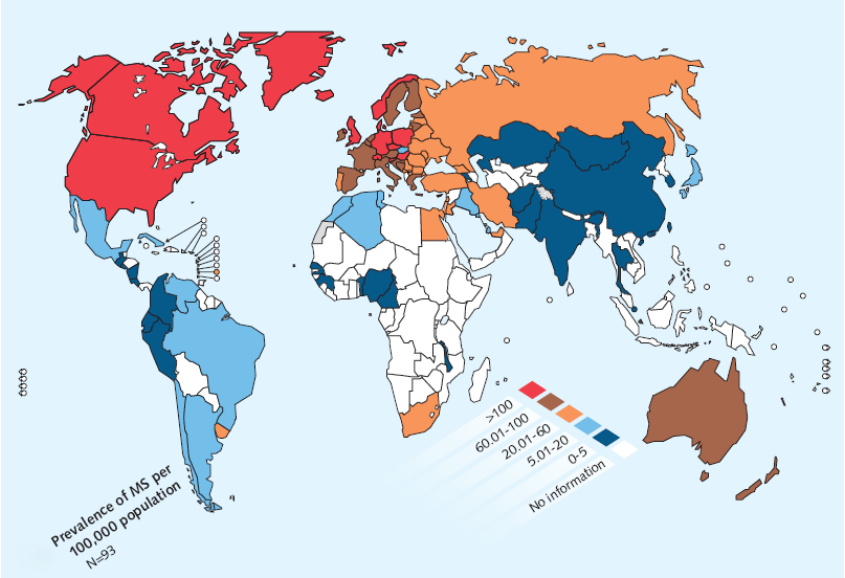


Abbildung 4 Geographische Unterschiede der MS-Prävalenz im Jahr 2008 [66].

Zu den Hochrisikogebieten zählen Nord- und Zentraleuropa, Kanada, die USA, Teile Osteuropas sowie Neuseeland und Australien. Ein mittleres Krankheitsrisiko wird in Süd- und Osteuropa, Südafrika sowie Russland beobachtet. Selten ist das MS-Vorkommen in großen Teilen Asiens, Mittelamerikas und Afrikas, soweit Prävalenzdaten vorliegen [32]. Da die populationsgenetischen Studien diese große Differenz der MS-Prävalenzraten in Abhängigkeit von der geographischen Lage nicht ausreichend erklären, deutet auch in ihnen vieles auf die Beteiligung von Umweltfaktoren hin.

Hernan et al. konnten 1999 in zwei prospektiven Studien zeigen, dass für weiße US-amerikanische Krankenschwestern, die nach 1946 geboren waren, im Gegensatz zu solchen mit Geburt vor 1946, kein MS-Prävalenzunterschied zwischen im Norden und im Süden der USA lebenden Kohorten – bei allerdings gleichbleibenden nördlichen Prävalenzraten – mehr besteht [67]. Diese Beobachtung wurde in unabhängigen Studien zur MS-Prävalenz bei US-Kriegsveteranen bestätigt [68]. Inzwischen gibt es auch in Europa Hinweise auf Abschwächung des Nord-Süd-Prävalenzgradienten mit zunehmender MS-Inzidenz in südeuropäischen Gebieten [69].

Im Jahre 1966 konnte in Migrationsstudien gezeigt werden, dass das Risiko, an MS zu erkranken, vom Aufenthaltsort bis zum 15. Lebensjahr abhängig ist. Dabei tragen erwachsene Emigranten das Erkrankungsrisiko des Ortes, an dem sie bis zur Pubertät aufgewachsen sind [70, 71]. Bei der Emigration nach Südafrika ist zum Beispiel das Risiko, im Laufe des Lebens an MS zu erkranken, für erwachsene weiße Europäer signifikant höher als für im Kindesalter

emigrierte Europäer. Auf der anderen Seite ist das Erkrankungsrisiko eines erwachsenen türkischen Immigranten in der Bundesrepublik Deutschland deutlich geringer als das Erkrankungsrisiko einer in Deutschland aufgewachsenen Person [72]. Neben diesen Beobachtungen wurde in anderen Migrationsstudien gezeigt, dass die geographische Richtung der Migration von Bedeutung ist. Das Risiko, an Multipler Sklerose zu erkranken, sinkt deutlicher für Individuen, die aus Hochrisikogebieten in Gebiete mit niedrigem MS-Erkrankungsrisiko auswandern, als die Risikosteigerung bei inverser Migration [70, 73-77]. Dieses Phänomen könnte auf einen bis dato nicht identifizierten protektiven Faktor in Niedrigprävalenzgebieten für MS hinweisen, dessen Einfluss bis zur kritischen Phase der Pubertät das spätere Erkrankungsrisiko einer Person modifiziert. Die in diesem Zusammenhang diskutierte „Poliomyelitis-Hypothese“ postuliert einen viralen Erreger als Risikofaktor für die MS-Erkrankung, der bei Infektion in der Kindheit zum Schutz des Individuums führt, bei Infektion nach der Pubertät hingegen das MS-Erkrankungsrisiko deutlich ansteigen lässt.

Andere Studien konnten neben dem sozioökonomischen Status und dem Bildungsgrad eine positive Korrelation des MS-Erkrankungsrisikos mit erst spät in der Kindheit des Individuums aufgetretenen Infektionen und anderen Parametern nachweisen, die auf eine eher geringe Stimulation der Immunabwehr durch Umwelterreger hindeuten. In diesem Kontext werden wiederum Infektionen während der Kindheit als für das Individuum potentiell MS-protektiv diskutiert. Die diesen Argumenten zugrunde liegende, umstrittene „Hygiene-Hypothese“ besagt, dass eine durch verbesserte Hygiene, Impfungen etc. reduzierte frühkindliche Auseinandersetzung mit Krankheitserregern und eine damit eingeschränkte Entwicklung von T_{H1}-Reaktionen gemäß des T_{H1}/T_{H2}-Paradigmas zu verstärkten T_{H2}-vermittelten Reaktionen führt.

Auf Island, den Orkney-, Shetland- und Faröer-Inseln wurden sogenannte MS-Epidemien beschrieben [78-80]. Diese Beobachtungen führten zu der von Kurtzke favorisierten sogenannten „Prävalenz-Hypothese“, die besagt, dass Multiple Sklerose durch ein infektiöses Agens ausgelöst wird, welches in den MS-Hochprävalenzgebieten endemisch ist.

Bis jetzt ist es in zahlreichen epidemiologischen Studien und Migrationsuntersuchungen nicht gelungen, einen eindeutig MS-assoziierten exogenen Stimulus oder andere prädisponierende Umweltfaktoren zu identifizieren. Wegen der dennoch sehr spezifischen Charakteristika des für die Pathogenese der Multiplen Sklerose in Frage kommenden infektiösen Agens fokussieren die Untersuchungen dieser Arbeit aus den im Kapitel 2.2.2 erläuterten Gründen

das Epstein-Barr-Virus als exogenen Stimulus mit potentiell ätiologischer und pathogenetischer Relevanz.

2.2 Das Epstein-Barr-Virus

2.2.1 Die Charakterisierung des Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zur Gruppe der γ-Herpesviren. Bisher konnten zwei humanpathogene Virusstämme (EBV-1 und EBV-2) identifiziert werden. Bei Kindern verläuft die EBV-Infektion meist asymptomatisch, kann jedoch mit zunehmendem Alter zum Krankheitsbild der Infektiösen Mononukleose führen. Zusätzlich ist das Virus mit einigen Tumorerkrankungen (zum Beispiel dem Burkitt-Lymphom, Nasopharynxcarcinom) assoziiert.

Als DNS-Doppelstrang mit einer Länge von 172 Kilobasen codiert das in Abbildung 5 dargestellte Genom des Epstein-Barr-Virus für 85 Gene, die in Abhängigkeit der B-Zell-Reifungsstufe exprimiert werden.

Abbildung 5 Genom des Epstein-Barr-Virus in Anlehnung an Murray et al. [81].

Das Epstein-Barr-Virus tritt über das Epithel des Oro- und Nasopharynx in den Körper ein und infiziert dort naive B-Zellen [82]. Die initiale Bindung erfolgt über den viralen Glykoprotein-Komplex gp220/350 an den EBV-Rezeptor CD21. Danach kommt es zur Zell-Virus-Fusion mit Hilfe der Korezeptorinteraktionen zwischen den viralen Glykoproteinen gp25, gp42 und gp85 und den zellulären HLA-Klasse-II-Molekülen HLA-DP, -DQ und -DR [83].

Die Infektion einer naiven B-Zelle führt zur Translation latenter Gene, wodurch es zur Expression der EBNA-(1, 2, 3a, 3b, 3c, LP)-Proteine und LMP-(1, 2a, 2b)-Proteine kommt. Durch die Expression dieser Proteine entwickelt sich die naive B-Zelle ohne weitere Stimuli zum aktivierten B-Zell-Blast und wandert in einen Lymphfollikel ein. Im Reifungszentrum

(*germinal center*) des Lymphfollikels ändert sich das Expressionsmuster der infizierten B-Zelle, sodass alle EBV-Gene abgeschaltet sind, wenn diese als Memory-B-Zelle den Lymphknoten verlässt. Dadurch können diese infizierten Zellen nicht mehr vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden und stellen wahrscheinlich das Reservoir für die wiederholte Reaktivierung des Virus dar [84]. Nur wenn sich die infizierte Memory-B-Zelle teilt, wird EBNA-1 aktiviert und das EBV-Genom an beide Tochterzellen weitergegeben. Nach der Teilung wird die EBNA-1-Expression wieder eingestellt. Durch antigen-abhängige Aktivierung der infizierten Memory-B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor entwickeln sich diese zu Plasmazellen [85]. Dieser Prozess führt zur EBV-Reaktivierung, zur Expression aller viralen Proteine des lytischen Zyklus und letztendlich zu der Freisetzung des Virus. Die Abbildung 6 stellt diese vom Reifungsgrad der B-Zellen abhängige Expression der EBV-Proteine dar.

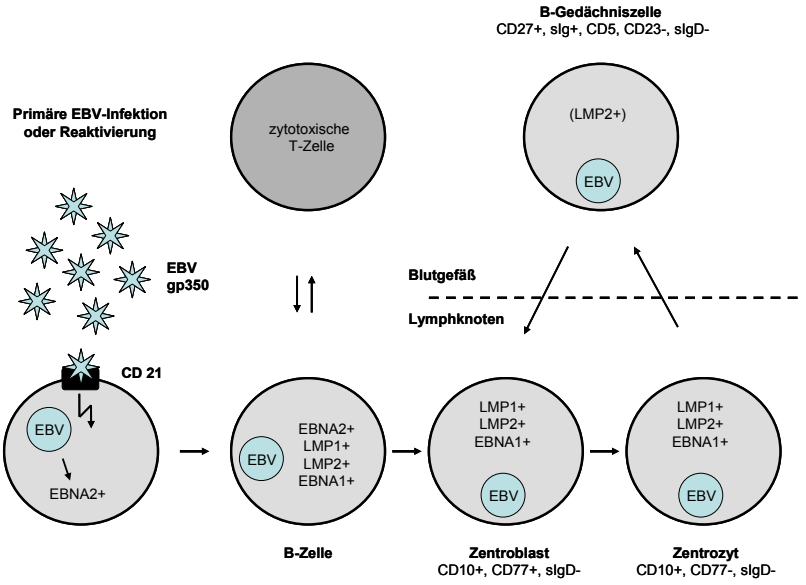


Abbildung 6 Expression der EBV-Proteine in Abhängigkeit vom B-Zell-Reifungsgrad [86].

Obwohl EBV einen starken Trophismus für B-Zellen hat, können auch andere Zellen, wie zum Beispiel Epithelzellen, infiziert werden [87]. Allerdings ist diese Infektion wesentlich weniger effizient, da sie unabhängig von CD21 und HLA-Klasse-II-Molekülen erfolgt.

2.2.2 Die Rolle des EBV in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

In den im Abschnitt 2.1.4 dieser Arbeit erläuterten populationsgenetischen Studien wurde das weltweite Vorkommen der Multiplen Sklerose nachgewiesen. Auf der Suche nach einem Virus, das ubiquitär vorkommt, zu einer latenten Infektion des Wirtes führt und endogen

reaktiviert werden kann, haben sich epidemiologische Untersuchungen schon früh mit der Rolle von Herpesviren bei der MS-Erkrankung auseinandergesetzt [88]. Im Gegensatz zu anderen Herpesviren [89] konnte für das Epstein-Barr-Virus in geographisch unabhängigen Populationen durch viele epidemiologische Studien eine signifikant erhöhte Seropositivität für EBV bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen nachgewiesen werden [90-93]. Insbesondere scheint die als EBV-Paradoxon bezeichnete Beobachtung relevant, dass das MS-Erkrankungsrisiko bei EBV-seronegativen Individuen sehr gering ist [94-97].

Die in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung hohe EBV-Prävalenz von über 95 % erschwerte in vielen Studien den Nachweis einer Assoziation zwischen EBV-Infektion und der MS-Erkrankung. Zudem führte die Tatsache, dass nur sehr wenige der EBV-infizierten Individuen die MS-Erkrankung entwickeln, häufig zu Zweifeln an einem möglichen Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und MS-Entstehung.

Publikation	MS-Patienten	Kontrollen
Sumaya et al. (1980)	155/157 (99%)	75/81 (93%)
Bray et al. (1983)	309/313 (99%)	363/406 (89%)
Larsen et al. (1985)	93/93 (100%)	78/93 (84%)
Sumaya et al. (1985)	104/104 (100%)	99/104 (95%)
Munch et al. (1997)	137/138 (99%)	124/138 (90%)

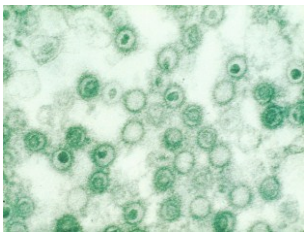


Abbildung 7 Übersicht zu Ergebnissen der EBV-Serumpositivität im Vergleich von MS-Patienten zu gesunden Kontrollpersonen (links) [91-93, 98, 99]. Charakteristische Pfeifferzellen (EBV-infizierte humane B-Lymphozyten) im Serum (rechts).

Im linken Teil der Abbildung 7 sind verschiedene Studiendaten zur prozentualen EBV-Seropositivität im Vergleich von MS-Patienten und Kontrollpersonen gezeigt. Im rechten Teil der Abbildung 7 sind die charakteristischen Pfeifferzellen im humanen Serum nach EBV-Infektion dargestellt. Bereits Jahre vor der Erstmanifestation der Multiplen Sklerose wurden bei späteren MS-Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen EBV-Antigene beschrieben [100]. Insgesamt scheinen schwere Krankheitsverläufe der Infektiösen Mononukleose gehäuft vor Manifestation einer MS aufzutreten [19]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Geschwisterexposition mit EBV in der frühen Kindheit nicht nur einen protektiven Effekt bezüglich des Auftretens von Pfeifferschem Drüsenfieber hat, sondern auch die Inzidenz von Multipler Sklerose senkt [18]. Auch die altersabhängige Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Epstein-Barr-Virus scheint eine bedeutsame Rolle zu spielen. Vor allem einer späten EBV-Infektion wird eine Assoziation zur MS zugeschrieben [101-103].

Zusammenfassend unterstützen diese Studienergebnisse die sogenannte „EBV-Variante der Hygiene-Hypothese“. Eine vergleichbar starke Evidenz für die Assoziation zur MS-Erkrankung konnte für keine andere virale Infektion gefunden werden (Herpes-simplex-Virus -1, Varizella-zoster-Virus, Masernvirus, Mumpsvirus, Rötelnvirus u. a.) [104, 105].

Immunpathogenetisch wurde 2003 die „Hypothese EBV-infizierter autoreaktiver B-Lymphozyten“ veröffentlicht, die postuliert, dass bei genetisch prädisponierten Individuen EBV-infizierte B-Lymphozyten im ZNS autoreaktive Antikörper synthetisieren und durch die Synthese kostimulatorischer Signale die Immunantwort autoreaktiver T-Lymphozyten aufrechterhalten können. Während bei gesunden Individuen selten B-Lymphozyten im Liquor cerebrospinalis zu finden sind, konnte bei MS-Patienten die klonale Vermehrung von B-Lymphozyten im Liquor nachgewiesen werden. In einer Studie von Serafini et al. konnten post mortem im ZNS von nahezu 100 % der untersuchten MS-Patienten EBV-infizierte B-Zellen und Plasmazellen nachgewiesen werden. Bei Patienten mit PP-MS-Verlaufsform wurden ektopische B-Zell-Follikel in den Meningen als Ort potentieller EBV-Persistenz identifiziert. Neben der Expression latenter Virusproteine im ZNS konnte in ektopischen B-Zell-Follikeln sowie in akuten zerebralen MS-Läsionen die virale Reaktivierung gezeigt werden. Die Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen wurde an Orten mit akkumulierten EBV-infizierten B-Zellen gefunden. [39]
Bis dato ist ungeklärt, ob EBV-infizierte B-Zellen primär im ZNS von MS-Patienten vorkommen oder ob sie im Rahmen eines krankheitsassoziierten Prozesses sekundär ins ZNS einwandern.

Für die Immunreaktion von B-Zellen wurden kreuzreaktive Antikörper zwischen Myelin-Peptiden und EBV-Antigenen im Liquor und im Serum von MS-Patienten nachgewiesen [106, 107]. Die oligoklonale Stimulation zirkulierender autoreaktiver Immunzellen durch ein EBV-assoziiertes Superantigen und die EBV-assoziierte Transaktivierung eines Retrovirus wurde beschrieben [108, 109]. Die in Abbildung 8 gezeigten Ergebnisse von Cepok et al. zeigen auf humoraler Ebene eine erhöhte Immunreaktivität gegen EBV-Proteine in Liquor und Serum von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen [38].

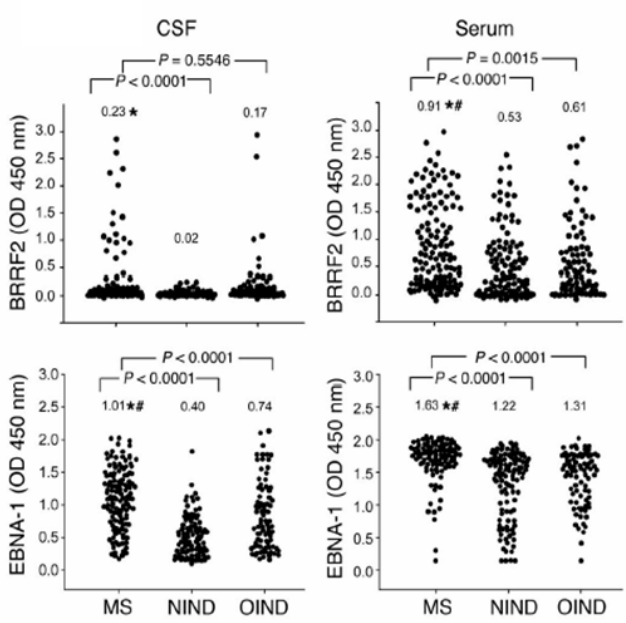


Abbildung 8 Antikörperkonzentrationen gegen die EBV-Proteine BRRF2 und EBNA-1 im Liquor und im Serum von MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen mit anderen entzündlichen (OIND) und nicht-entzündlichen (NIND) neurologischen Krankheiten [38].

Zusammenfassend zeigen zahlreiche Untersuchungen, dass eine erhöhte Immunreaktivität gegen EBV bei der Multiplen Sklerose besteht. Bisher konnte allerdings nicht eindeutig bewiesen werden, dass diese erhöhte Immunreaktivität pathogenetisch relevant ist.

2.3 Der CD21-Rezeptor

2.3.1 Die Charakterisierung des CD21-Rezeptors

Der CD21-Rezeptor, auch genannt CR2- oder C3DR-Rezeptor, ist ein 140 kDa großes Zelloberflächenprotein. Als ein Mitglied der RCA-Familie (*receptor of complement activation family)* bindet er an die C3d-, iC3b- und C3dg-Fragmente von Immunkomplexen [110] und ist in seiner Funktion als Komplementrezeptor an zahlreichen Zellinteraktionen beteiligt. Des Weiteren bindet das Epstein-Barr-Virus an diesen Rezeptor und initiiert dadurch die effiziente Fusion mit der Zelle [111].

Der CD21-Rezeptor ist auf reifen B-Lymphozyten exprimiert, allerdings weder auf Lymphozyten in Pro- oder Prä-B-Zellstadien noch auf Lymphozyten in späten Entwicklungsstadien [112]. Weitere CD21-positive Zellen sind Pharynxepithelien [113], fetale Astrozyten [114], follikulär-dendritische Zellen [115, 116] des Marginalsinus der Milz und T-Lymphozyten im Thymus [117, 118].

In Abbildung 9 ist das CD21-Gen auf dem humanen Chromosom 1 in der Zytobande 1q32 dargestellt.

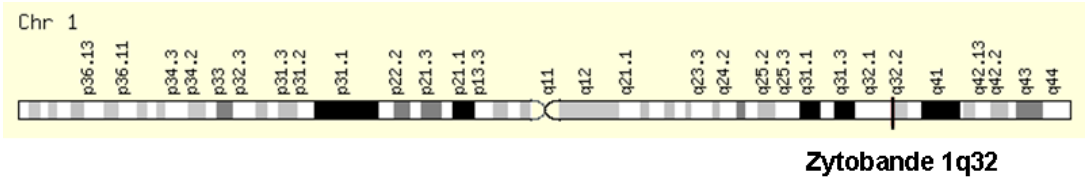


Abbildung 9 Lokalisation des CD21-Gens auf dem humanen Chromosom 1 [119].

Das Gen besteht aus fünfzehn bis sechzehn SCR-Fragmenten (SCR = *short consensus repeat*), die jeweils 60 bis 70 Aminosäuren lange, strukturell ähnliche komplement-kontrollierende Proteine (CCP = *complement control protein*) codieren. Neben der extrazellulären CCP-Region des Rezeptors besitzt dieser eine einzelne Transmembrandomäne aus 28 Aminosäuren und einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus aus 34 Aminosäuren [120]. Die beiden durch SCR1 und SCR2 codierten N-terminalen komplement-kontrollierende Proteine sind die Bindungsstellen sowohl für die Komplementfragmente als auch für das Epstein-Barr-Virus [111]. Die Promoterregion des CD21-Rezeptors befindet sich in der mRNS-Position -315 (Intron) bis +75, das heißt mit einer Basensequenzlänge von 390 bis 15 Basen in Richtung des 5'-Endes vor dem Startcodon AUG der CD21-DNS-Sequenz [121]. Die Aktivität des Promoters wird unter anderem durch die Methylierung von Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin-Inseln (CpG-Inseln) reguliert. In reifen B-Zellstadien korreliert die steigende Expression des CD21-Rezeptors mit einer Demethylierung der CpG-Inseln in der Promotersequenz [122, 123]. Durch mögliche *Splicing*-Varianten des CD21-Gens entstehen drei verschiedene Isoformen des Rezeptors, deren Zellexpression in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert [116]. In Abbildung 10 sind die strukturellen Eigenschaften des CD21-Rezeptorproteins schematisch dargestellt.

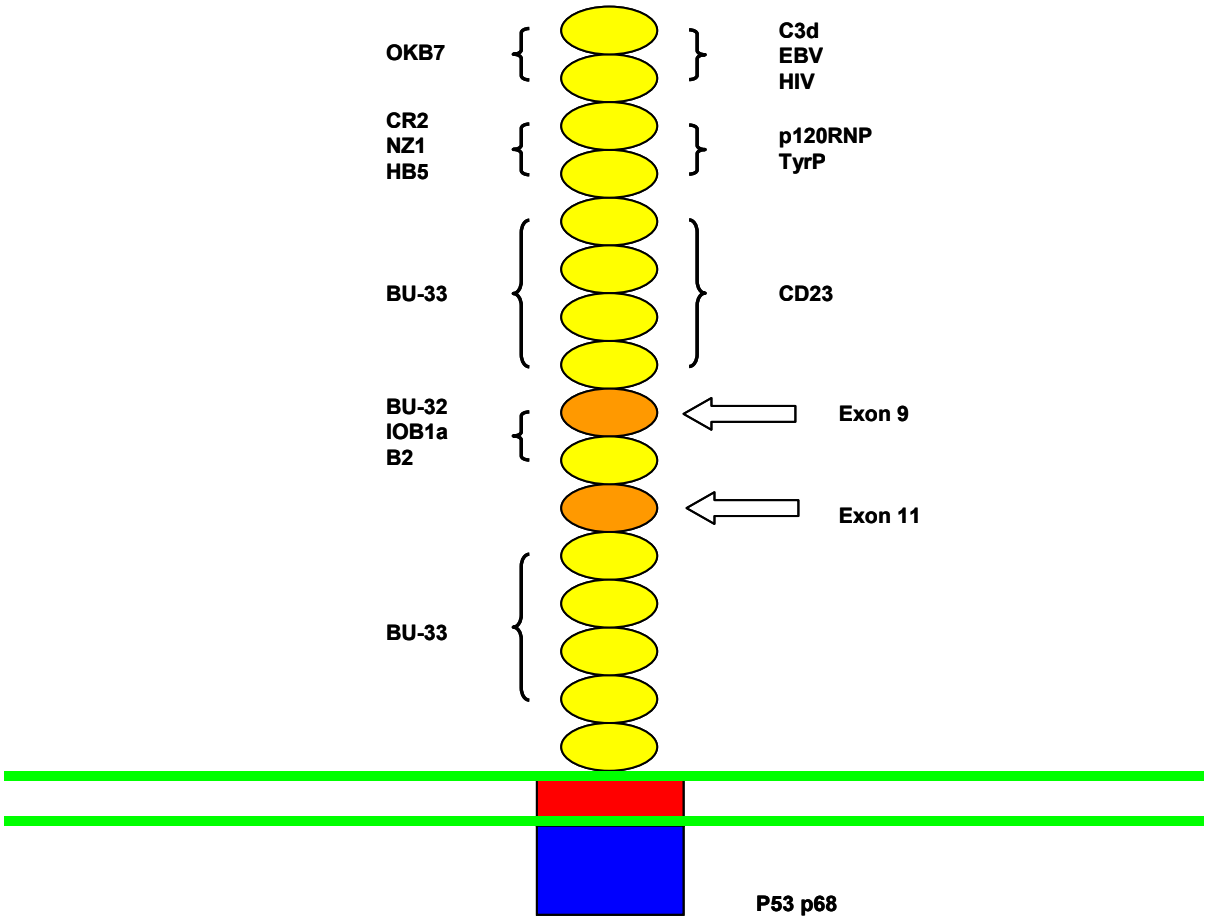


Abbildung 10 Strukturelle Eigenschaften des CD21-Rezeptorproteins in Anlehnung an Masilamani et al. [124]. Als Ovale dargestellt sind die für die extrazelluläre Rezeptordomäne codierenden Exone, orange markiert sind die isoform-abhängigen Sequenzen der Exone 9 und 11 und seitlich lokalisiert sind potentielle Liganden.

Das CD21-Rezeptorprotein wird im Rahmen der B-Zell-Aktivierung [125] durch bisher nicht näher charakterisierte Serin- und Metalloproteasen [126] von der Zelloberfläche abgetrennt (*shedding*) und findet sich als lösliches CD21-Protein (sCD21) im humanen Serum. In der Normalbevölkerung scheint die durchschnittliche sCD21-Serumkonzentration altersabhängig zwischen 100 und 477 ng/ml [127] zu liegen und im Zusammenhang mit follikulär-dendritische Zellen zu stehen [128].

2.3.2 Die Funktionen des CD21-Rezeptors

2.3.2.1 CD21 als Komplementrezeptor

Die Funktionen des CD21-Proteins als Komplementrezeptor sind vielfältig und sollen an dieser Stelle nur kurz erläutert werden.

Während die Funktion des CD21-Rezeptors auf B-Lymphozyten und follikulär-dendritischen Zellen die Erkennung und Bindung von Immunkomplexen beinhaltet, ist sie auf T-

Lymphozyten und anderen Zellarten nicht genau bekannt (Fischer et al 1999). Die durch die CD21-Liganden-Bindung vermittelten Signale sind bedeutsam für die normale B-Zellantwort [129]. Die Wechselwirkung des CD21-Rezeptors mit dem Komplementfaktor C3d oder anderen spezifischen Antikörpern führt zum Beispiel in Anwesenheit von T-Zellfaktoren zu B-Zell-Proliferation und B-Zell-Differenzierung [130]. Eine Interaktion des CD21-Rezeptors mit membrangebundenem Immunglobulin M (IgM) führt hingegen zu T-Zell-unabhängiger Proliferation von B-Zellen [131, 132]. Diese Bindung an membrangebundenes IgM scheint neben der Akkumulation von Bcl-2 [133] zusätzlich eine Schlüsselrolle im Rahmen der B-Zell-Apoptose zu spielen [134]. Zusammen mit den B-Zell-Oberflächenproteinen CD18, CD81 und Leu-13 formt das CD21-Rezeptorprotein einen nicht-kovalenten membranösen Signaltransduktionskomplex, der die Antigen-Stimulation des B-Zellrezeptors und dadurch die Menge an erforderlichem Antigen für die Initiierung einer B-Zell-Proliferation verringert [135, 136]. Durch die Internalisierung C3d-gebundener Antigene initiiert der CD21-Rezeptor eine normale Immunantwort der Klasse-II (*processing pathway*) [136, 137]. Die auf follikulär-dendritische Zellen exprimierten CD21-Rezeptormoleküle verhindern die Apoptose antigen-aktivierter B-Zellen [88, 112], deren somatische Hypermutation [138, 139] und einen Klassenwechsel [140]. Die C3d-Bindung an follikuläre CD21-Rezeptoren verstärkt die Antigenpräsentation der FDCs und hält durch die verstärkte wechselseitige Interaktion das B-Zell-Gedächtnis aufrecht [141].

2.3.2.2 CD21 als lösliches Plasmaprotein

Das lösliche CD21-Protein entspricht nahezu der gesamten extrazellulären Domäne des CD21-Rezeptors und scheint weiterhin Komplementfragment- und EBV-Bindungskapazität [142] zu besitzen. Durch eine Bindung potentieller CD21-Rezeptor-Liganden an das lösliche Plasmaprotein könnte die sCD21-Serumkonzentration einen immunmodulatorischen Einfluss haben. Eine über die Interaktion des sCD21-Proteins mit zellulären CD23-Rezeptoren erfolgende Aktivierung und Differenzierung von humanen Monozyten konnte nachgewiesen werden [143].

Die Bindung von sCD21 an den löslichen CD23-Rezeptor (sCD23) inhibiert signifikant die IgE-Synthese von B-Zellen [144]. Mit dem zellulären CD21-Rezeptorprotein konkurriert das lösliche CD21-Plasmaprotein um die Bindung an C3d [145]. Bei Patienten mit chronischer B-Zell-Leukämie (B-CLL), dem Immundefizienzsyndrom CVID (*common variable immunodeficiency*) und der Agammaglobulinämie vom Typ Bruton konnte eine klinische

Korrelation mit den sCD21-Serumkonzentrationen beobachtet werden [146, 147]. Sowohl bei B-Zell-Lymphomen als auch bei anderen lymphoblastischen Tumoren sowie bei EBV-Infektionen und EBV-assoziierten Tumoren wurden erhöhte sCD21-Serumkonzentrationen nachgewiesen [148] [124]. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten verschiedener Autoimmunerkrankungen erniedrigte Werte der sCD21-Serumkonzentration auf [127, 149]. Im Zusammenhang der häufig diskutierten Remission von Autoimmunerkrankungen während der Schwangerschaft untersuchten Masilamani et al. die sCD21-Serumkonzentrationen von Schwangeren. Die Ergebnisse zeigten, dass die sCD21-Serumkonzentrationen während der Schwangerschaft deutlich erniedrigt sind und es erst nach sechs Wochen bis zu einem Jahr post partum zu einer Normalisierung der sCD21-Konzentrationen im Serum der Frauen kommt [150].

Bezüglich der EBV-Rezeptorfunktion des CD21-Proteins konnte gezeigt werden, dass das lösliche CD21-Plasmaprotein mit der Virus-Zell-Fusion konkurriert und dadurch vor der EBV-Infektion humaner B-Zellen schützt [151]. Zusätzlich führt sowohl die B-Zell-aktivierung im Allgemeinen als auch die EBNA-1-Expression auf B- und T-Lymphozyten im Besonderen zu erhöhter sCD21-Freisetzung [125, 152]. In Hinblick auf die potentielle Bedeutung des Epstein-Barr-Virus in der Pathogenese der MS-Erkrankung erschienen im Rahmen dieser Studie daher neben den molekulargenetischen Veränderungen der CD21-Rezeptorstruktur auch mögliche Veränderungen im Vorkommen des vorhandenen löslichen CD21-Rezeptors im Serum von MS-Patienten interessant.

2.3.2.3 CD21 als EBV-Rezeptor

Der CD21-Rezeptor ermöglicht zusammen mit verschiedenen viralen Glykoproteinen und anderen zellulären Mediatoren den direkten Eintritt des Epstein-Barr-Virus in CD21-positive Zellen. Durch die Bindung des EBV-Hüllproteins gp220/350 an den CD21-Rezeptor kommt es zum ersten Kontakt zwischen dem Virus und der Zellmembran. Ist diese Bindung stabilisiert, fusioniert das Epstein-Barr-Virus wie in Abbildung 11 dargestellt durch die Interaktion zwischen den viralen Glykoproteinen (gp25-gp85-gp42) und den zellulären HLA-Komplexen (HLA-DR, HLA-DP und HLA–DQ) mit der Zelle.

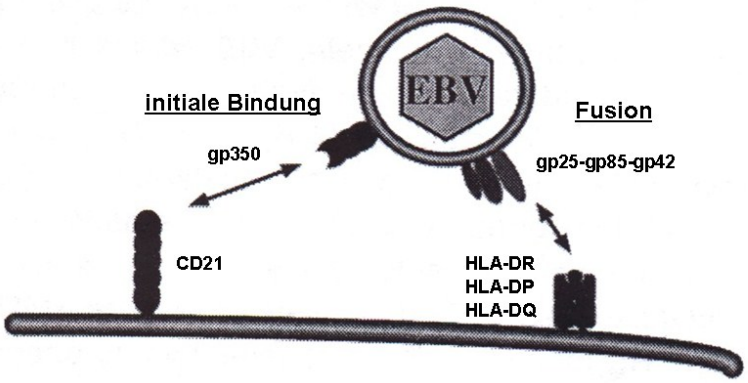


Abbildung 11 EBV-Infektion humaner B-Lymphozyten über initiale Bindung an den CD21-Rezeptor [153].

Ein Unterschied in der molekulargenetischen Struktur des Rezeptors könnte über die strukturelle Veränderung des CD21-Rezeptorproteins zu einem veränderten Bindungsverhalten zwischen Epstein-Barr-Virus und dem CD21-Rezeptor führen und so die EBV-Infektion des Wirtsorganismus beeinflussen.

2.3.3 Einzelbasenpolymorphismen des CD21-Gens

Eine mögliche Ursache einer molekular unterschiedlich determinierten CD21-Rezeptorstruktur ist das Vorhandensein von Polymorphismen im CD21-Gen [154]. Das Auftreten einer gemeinsamen genetisch determinierten Suszeptibilität für eine EBV-Infektion und die Erkrankung an Multipler Sklerose könnte darüber hinaus eine potentielle Erklärung des in Kapitel 2.2.2 erläuterten EBV-Paradoxons sein. In dieser Arbeit wurde daher das Auftreten von Polymorphismen im CD21-Gen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Im Rahmen der zufälligen, natürlichen Genverteilung in der Bevölkerung kommt es aufgrund von Mutationen zu Nukleotidvariationen in der DNS-Sequenz. Als Einzelnukleotid-polymorphismus (SNP) wird der Austausch eines einzelnen Nukleotids in der DNS-Sequenz bezeichnet, wenn die Auftretenswahrscheinlichkeit der Allele an diesem Genlokus das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt. SNPs kommen in der DNS-Sequenz durchschnittlich alle 200 – 1000 Nukleotide vor [155, 156]. Es wurden im menschlichen Genom bislang 1,42 Millionen SNPs durch das Humane Genomprojekt und 1,22 Millionen durch die Firma *Celera Genomics [157, 158]* identifiziert. Tritt der Nukleotidaustausch in beiden Allelen auf, spricht man von einem homozygoten SNP, findet der Basenaustausch in einem Allel statt, von einem heterozygoten Wildtyp/Mutant-Genotyp (WT/SNP). Die Mehrzahl der Polymorphismen tritt heterozygot auf. SNPs, die innerhalb von codierenden Genabschnitten liegen, werden als cSNPs bezeichnet. Durch EST-Sequenzierung (*expressed sequence tags*), dem Sequenzvergleich von kurzen cDNS-Abschnitten, konnte eine große Zahl an cSNPs auf exprimierten Genen identifiziert werden [159]. Bei cSNPs kann sich durch den erfolgten Basentausch die Information des zugehörigen Codons ändern und dieses für eine andere Aminosäure (AS) codieren. Ein so entstandener Unterschied in der AS-Sequenz kann die Faltung und die Eigenschaften der Quartärstruktur des codierten Proteins beeinflussen.

In der Analyse von SNPs hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entstehung von Krankheiten unterscheidet man zwischen Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien. In den meisten Fällen handelt es sich um Assoziationsstudien, bei denen nach einem signifikant häufigeren Auftreten eines bestimmten Gen-Polymorphismus in der Gruppe der erkrankten Individuen gegenüber der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen gesucht wird [160, 161]. Bei Kopplungsstudien wird für Eltern und Kinder oder unter Geschwistern, die sich hinsichtlich eines Merkmals (Krankheit) ähnlich sind, untersucht, ob ein bestimmter genetischer Marker häufiger als statistisch erwartet vererbt wird. Je geringer der Abstand zwischen einem Marker und einem das Merkmal beeinflussenden Gen ist, desto stärker weicht diese Häufigkeit der Vererbung vom theoretischen Wert ab.

Tabelle 3 Validierte SNPs für den codierenden Bereich des CD21-Gens in Anlehnung an die NCBI-Datenbank für SNPs [162].

Region	mRNA-Position	db SNP-Cluster ID	Funktion	db SNP-Allele	Protein	Codon-Position	AS-Position
Exon 1	24	rs3813946	5`UTR	A/G			
Exon 10	1870	rs1048971	synonym	A	Leucin	3	592
			contig reference	G	Leucin	3	592
	2010	rs17615	nicht synonym	A	Asparagin	2	639
			contig reference	G	Serin	2	639
Exon 11	2081	rs4308977	nicht synonym	C	Prolin	1	663
			contig reference	T	Serin	1	663
	2106	rs17616	nicht synonym	A	Histidin	2	671
			contig reference	G	Arginin	2	671
Exon 14	2743	rs1143665	synonym	C	Glycin	3	883
			contig reference	T	Glycin	3	883
Exon 18	3248	rs17258982	nicht synonym	G	Valin	1	1052
			contig reference	A	Isoleucin	1	1052
	3279	rs6540433	nicht synonym	A	Glutamat	2	1062
			contig reference	C	Alanin	2	1062
Exon 20	3817	rs9429940	3`UTR	C/T			

In dem Gen des CD21-Rezeptors liegen die in Tabelle 3 aufgelisteten und in Abbildung 12 dargestellten SNPs auf den 20 für das Rezeptorprotein codierenden Exonen. Berücksichtigt wurden dabei alle SNP-Daten, die durch mehrfache unabhängige Ergebnisse validiert wurden und SNP-Informationen, die durch Allel- und Genotypbestimmungen gesichert wurden.

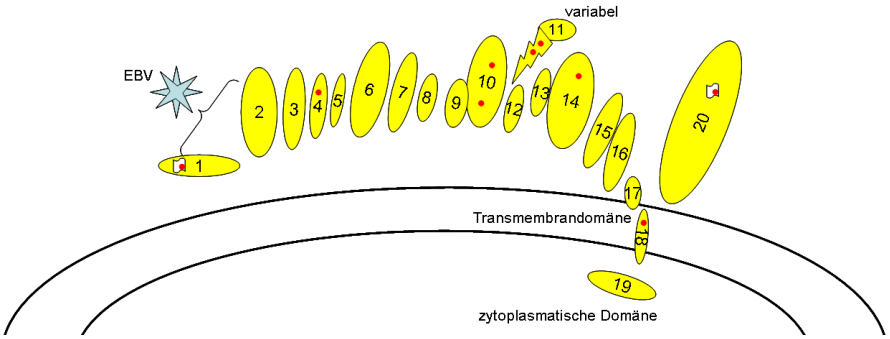


Abbildung 12 Schematische Darstellung der für die jeweilige Rezeptorstruktur codierenden Genabschnitte. Dabei symbolisieren die gelben Ovale die Exone, der weiße Bereich in ihnen deutet untranslatierte DNS-Sequenzen an und die roten Punkte stellen die Polymorphismen dar.

3 AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollen das Auftreten und die Frequenz von Polymorphismen im CD21-Gen von MS-Patienten molekulargenetisch untersucht und mit dem Auftreten bei Kontrollpersonen verglichen werden. Ziel ist es, charakteristische Veränderungen im CD21-Gen von MS-Patienten zu identifizieren und eine potentielle Assoziation mit der Erkrankung an Multiple Sklerose auszuarbeiten. Es soll damit die Voraussetzung geschaffen werden, zielgerichtet den möglichen Einfluss spezieller SNPs auf eine Veränderung des CD21-Rezeptorproteins zu untersuchen.

Es sollen die codierenden Abschnitte und die Promoterregion des CD21-Gens von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sequenziert werden und bekannte Polymorphismen bestätigt sowie gegebenenfalls neue Polymorphismen identifiziert werden. Für zwei besonders interessante SNP-Loki soll in einem großen MS- und Kontroll-Kollektiv untersucht werden, ob unterschiedliche Allel- oder Genotypverteilungen zwischen den MS-Patienten und der Kontrollpersonengruppe vorliegen. Es soll im Rahmen des erweiterten Kollektivs darüber hinaus festgestellt werden, ob die Allel- beziehungsweise Genotypverteilungen dieser beiden SNPs mit dem HLA-DR15-Lokus assoziiert sind.

Zusätzlich ist durch einen Nachweis der spezifischen mRNS-Sequenzen zu klären, ob alle drei Isoformen des CD21-Rezeptors bei MS-Patienten vorkommen. Dazu soll die mRNS des CD21-Rezeptors von 50 MS-Patienten durch eine *exon spanning* PCR auf das Vorliegen der Exonsequenz 9 und 13 hin untersucht werden, in dem sich die drei Isoformen unterscheiden.

In einer weiteren Fragestellung soll untersucht werden, ob das CD21-Rezeptormolekül auf Proteinebene unterschiedlich bei MS-Patienten und Kontrollpersonen reguliert ist. Dazu soll die Konzentration des löslichen CD21-Rezeptorproteins im Serum von MS-Patienten und Kontrollpersonen mittels ELISA bestimmt und verglichen werden. Des Weiteren soll im Rahmen dieser Untersuchung auch der Einfluss der gängigen Interferon-beta-Therapie auf die sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten bestimmt werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Rekrutierung des Patienten- und Kontrollpersonen-Kollektivs

4.1.1 Kollektiv für die SNP-Analyse

Das MS-Kollektiv wurde aus Patienten der Schloßbergklinik in Bad Laasphe (n = 222), des medizinischen Zentrums für Nervenheilkunde der Philipps-Universität Marburg (n = 203), der Wicker Klinik Bad Wildungen (n = 28) und des Pflege- und Betreuungsheims Gladenbach (n = 9) zusammengestellt. Das gesamte Kollektiv umfasste insgesamt 462 Personen und ist in Abbildung 13 dargestellt.

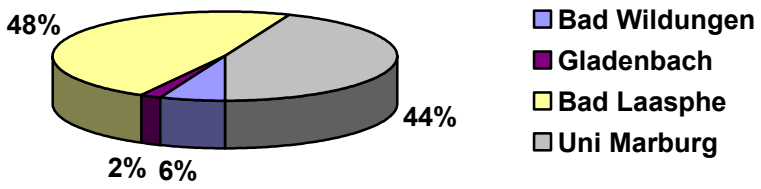


Abbildung 13 Prozentuale Aufteilung der MS-Patienten aus den verschiedenen Kliniken.

Das Kontroll-Kollektiv setzte sich aus nicht-verwandten Angehörigen von Patienten mit neurologischen Erkrankungen, Mitarbeitern und Besuchern des medizinischen Zentrums für Nervenheilkunde der Philipps-Universität Marburg und der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie Studenten, Sportgruppen und anderen Interessierten zusammen. Es bestand aus insgesamt 266 Personen.

Die MS-Patienten wurden alle bezüglich einer Familienanamnese für MS befragt und nur ein Mitglied pro Familie wurde in die Fall-Kontroll-Studie eingeschlossen. Die Diagnose MS wurde nach den von Poser et al. [9] veröffentlichten diagnostischen Kriterien gestellt. Alle MS-Patienten hatten entweder die klinisch sichere MS (CDMS), oder – wenn die Diagnose mit Hilfe positiver Liquorergebnisse gestellt wurde – eine laborunterstützt sichere MS (LSDMS). Als positive Liquorergebnisse wurden nur oligoklonale Banden und/oder autochtone IgG-Erhöhungen gewertet, andere Erkrankungen, die zu diesen Liquorveränderungen führen können, wurden ausgeschlossen. Die laborgestützt sichere

Diagnose der Multiplen Sklerose ist der klinisch sicher gestellten Diagnose gleichwertig [9]. Alle gesunden Kontrollpersonen wurden bezüglich neurologischer Symptome und zuvor bestehender neurologischer oder autoimmunologischer Erkrankungen befragt. Personen mit neurologischen Erkrankungen oder einer positiven Familienanamnese wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Die Gruppe der Kontrollpersonen wurde bezüglich Alter, Geschlecht und Herkunft dem MS-Kollektiv angepasst.

Alle Teilnehmer der Studie erklärten sich schriftlich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden. Die Ethik-Kommissionen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Philipps-Universität Marburg genehmigten die Studie.

Die aus anderen Studien bereits in der HapMap-Datenbank [163] veröffentlichten Daten zur SNP-Frequenz im CD21-Gen in der europäischen Bevölkerung wurden gesondert in den Vergleich einbezogen. Die Allel- und Genotypfrequenzen in der europäischen Bevölkerung wurden dabei, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, als relative Häufigkeiten angegeben. Durch Rundungen bei der Umrechnung ergeben sich Abweichungen für die zweite Nachkommastelle.

4.1.2 Kollektiv für den sCD21-ELISA

Für das MS-Kollektiv des sCD21-ELISA wurden 56 Patienten in zwei gleich große Alterskohorten von 20 Jahren bis 39 Jahren [Lebensjahr 20; 39] und von 40 Jahren bis 59 Jahren [Lebensjahr 40; 59] eingeteilt. In beiden Altersgruppen befanden sich jeweils 14 mit Interferon-beta behandelte MS-Patienten (MS_{IFN}) und 14 nicht mit Interferon-beta behandelte MS-Patienten ($MS_{n\text{-}IFN}$). Alle vier Kollektive wurden so gewählt, dass sie aus jeweils 7 MS-Patienten mit RR-Verlaufsform und 7 MS-Patienten mit SP-Verlaufsform bestanden. Aufgrund der strikten Alters- und Geschlechtskonformität der gewählten Kollektive konnte keine ausreichende Anzahl von MS-Patienten mit PP-Verlaufsform rekrutiert werden. Zusätzlich wurden die Serumproben von 8 mit Interferon-beta behandelten MS-Patienten vor und nach Therapiebeginn analysiert.

Das Kontroll-Kollektiv des sCD21-ELISA setzte sich zusammen aus 56 Patienten mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen (other inflammatory neurological diseases, OIND), bestehend aus 28 HIV-Patienten und 28 Patienten mit viralen Enzephalitiden, sowie aus 56 Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen (non-inflammatory neurological diseases, NIND), bestehend aus 18 Patienten mit peripheren Paresen, 16 Patienten mit Bandscheibenvorfällen, 16 Epilepsie-Patienten und 6 Patienten mit Normaldruck-Hydrocephalus. Sowohl die OIND-Kontrollgruppe als auch beide

Subpopulationen wurden mit 28 beziehungsweise 14 Patienten so zusammengestellt, dass beide Alterskohorten [Lebensjahr 20;39] und [Lebensjahr 40;59] die gleiche Personenanzahl aufwiesen. Auch die NIND-Kontrollgruppe wurde mit je 28 Personen im Alter zwischen 20 und 39 Jahren [Lebensjahr 20;39] sowie 28 Personen zwischen 40 und 59 Jahren [Lebensjahr 40;59] in die gleichen Alterskohorten identischer Personenzahl eingeteilt. Alle Patienten des sCD21-ELISA-Kollektivs wurden in der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert und erklärten sich schriftlich mit ihrer Teilnahme einverstanden. Die Studie wurde von der Ethikkomission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

4.2 DNS-Isolation und RNS-Isolation aus humanem Serum

Die genomische DNS wurde aus 200 µl EDTA-Blut von allen MS-Patienten und Kontrollpersonen mit dem QIAamp DNA Blood Midi Kit der Firma Qiagen isoliert und bis zum Gebrauch in gepufferter Lösung bei - 80 °C aufbewahrt.

Die DNS-Isolation erfolgte dabei nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie. Zur Zell-Lyse wurden zunächst 5 ml EDTA-Blut in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 15 ml Aqua bidest. und 5 ml C1-Puffer des Qiagen-Kits versetzt, leicht geschüttelt, bis eine deutliche Zell-Lyse einsetzte, und dann für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das lysierte Blut bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 1300 min^{-1} 15 Minuten zentrifugiert, das Reaktionsgemisch dekantiert und der Überstand aus Zellresten und Hämoglobin verworfen. Der Ansatz wurde nun zum zweiten Mal mit 3 ml Aqua bidest. und 1 ml C1-Puffer vermischt und nach erneuter Inkubation für 10 Minuten auf Eis nochmals bei 1300 min^{-1} für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Zur Lyse der Zellkernmembran und dem Verdau von Zellproteinen, insbesondere intranukleären Enzymen, wurde die Phenol/Chloroform-Fällung nach Sambrook et al. angewandt [164], nach der das entstandene Zellpellet mit 5 ml G2-Puffer des Qiagen-Kits und 100 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg/ml) versetzt und für 6 Stunden bei 50 °C in einem Schüttelbad inkubiert wurde, bis das Lysat keine Trübung mehr aufwies. Falls dennoch weiterhin Partikel vorhanden waren, wurden diese abzentrifugiert. Das Lysat wurde für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte 100-G-Qiagen-Säule gegeben, durch die genomische DNS mit einer mittleren Fragmentlänge von 50 bis 140 Kb gewonnen werden kann. Diese Säule wurde nach Zugabe der DNS zweimal mit jeweils 7,5 ml QC-Puffer gewaschen und die DNS dann mit 5 ml QF-Puffer bei 50 °C eluiert.

Durch Schütteln des mit 3,5 ml Isopropanol versetzten Eluats wurde die DNS-Präzipitation erreicht. Dann wurde die Probe für 15 Minuten bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 1500 min^{-1} zentrifugiert. Nach dem erneuten Dekantieren des Überstands wurde das Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %) vermischt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der abschließenden Zentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 3000 min^{-1} für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand vollständig abgenommen und das sichtbare DNS-Pellet luftgetrocknet. Danach wurde die isolierte DNS je nach Größe des DNS-Pellets in 200 µl bis 350 µl TE-Puffer durch Inkubation über 12 Stunden auf der Schüttelplatte gelöst.

Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie wurde die Konzentration der gewonnenen DNS-Lösung bestimmt, indem die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gemessen wurde. Dazu wurden 4,5 µl der DNS-Stocklösung im Verhältnis 1 zu 20 mit Aqua bidest. versetzt. Die DNS-Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{DNS-Konzentration [ng/ml]} = OD_{260} \times 20 \times 50$$

Als Richtwert wurde nach erfolgreicher Extraktion eine DNS-Konzentration von 100 µg/ml bis 1000 µg/ml DNS erwartet. Der Reinheitsgrad der Probe konnte mit Hilfe des OD_{260}/OD_{280}-Quotienten überprüft werden. Die DNS-Extraktion war erfolgreich, wenn dieser zwischen 1,7 und 2,0 lag. DNS-Proben mit kleineren Werten wurden nicht verwendet, da diese auf eine Verunreinigung zum Beispiel durch Proteine hinweisen.
Die RNS-Isolation erfolgte analog mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen aus dem Serum von 50 MS-Patienten nach dem im Kit beschriebenen Protokoll [165].

4.3 Primer

Primer sind kurze, zu definierten DNS-Segmenten komplementäre Oligonukleotide, die sich bei einer primerspezifischen Temperatur an die vorher durch Denaturierung getrennten DNS-Einzelstränge anlagern. Es wird zwischen einem Primer, der mit dem 5'-Ende seiner Nukleotidsequenz (*forward primer*) an die DNS hybridisiert, und einem an das 3'-Ende bindenden Primer (*reverse primer*) unterschieden. Eine optimale DNS-Amplifikation im Rahmen der PCR-Technik ist von der Nukleotidsequenz der verwendeten Primer und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur abhängig, da diese die *annealing* Temperatur im Anlagerungsschritt der Primer an den DNS-Einzelstrang bestimmt. Die Schmelztemperatur hängt von der Anzahl der Basen, dem Anteil an G/C-Basen in der Primersequenz und der Ionenstärke der Lösung ab. Näherungsweise kann die Schmelztemperatur (T_m) über die

folgende Formel berechnet werden. Es entspricht dabei G der Anzahl an Guanin-, C der an Cytosin-, A der an Adenin- und T der Anzahl an Thymin-Basen.

$$T_m \text{ (in °C)} = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2] \text{ (in °C)}$$

Die in den Polymerase-Kettenreaktionen dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 4 dargestellt. Basierend auf der CD21-Gensequenz in der Datenbank Ensembl [163] wurden die Primersequenzen entworfen. Diese Oligonukleotid-Sequenzen wurden mit der Internetsoftware Oligo Calc [166] berechnet und in einigen Fällen mit der Software Primer Express [167] modifiziert. Dann wurden die Primersequenzen mittels der Internetsoftware BLAST [168] im gesamten menschlichen Genom auf andere Hybridisierungsstellen getestet, die zu unerwünschter Amplifikation anderer Fragmente führen würden. Wenn keine anderen Hybridisierungstellen auftraten, wurden die Primer-Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Alle verwendeten Primer hatten eine Sequenzlänge zwischen 20 und 33 Oligonukleotiden. Vor Einsatz in der PCR wurden die Primer im Verhältnis 1 zu 20 mit Aqua bidest. verdünnt und zwischen den Experimenten bei - 20 °C aliquotiert aufbewahrt.

Tabelle 4 Charakterisierung der verwendeten Primer-Oligonukleotide zur Amplifikation der einzelnen Exone des CD21-Gens. In der Tabelle wird die Abkürzung F verwendet für den 5' *forward* Primer, R für den 3' *reverse* Primer, Ex für Exon, Bp für Basenpaar, GC [%] für den Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen und T_m [°C] für die Schmelztemperatur.

DNS-Lokus	Primersequenz	Bp	GC [%]	T_m [°C]
Ex 1	F GAACTAGCACGTGTGCCGGACACTATTTAAG	31	48,4	68,2
	R CTTTGCATCGCGGCACAGAAACTTTCCCTG	30	53,3	69,5
Ex 2	F CACCATGATCAGTATGCCTACCAAGTTCC	29	48	62
	R CAA CCT CCC AAC CCA GCT TTC TTT TCA TAC TC	32	47	63
Ex 3	F CCAGGGAAGCCAAAAGATTGGAC	23	52,2	62,4
	R CACCACGCACACACAAGACAAATG	24	50	62,7
EX 4	F CCCACATGTGAAGGTACCCTAAATTTA	28	42,9	63,7
	R CACCACGCACACACAAGACAAATG	24	50	62,7
Ex 5	F CTGATAAAAGGAACAGATGCACACTG	26	42,3	61,6
	R GAGTCTGTAAGGTAATGACTGAACC	25	44	61,3
Ex 6	F GATCTTGTCATTTCTTTCTGCAATTCCCC	29	41,4	63,9
	R CTTTTCTGAGTACCGGAACACTCAC	25	48	63
Ex 7 & Ex 8	F CTTAAGCAGTTATGTTTTGTTTTTGTCCTTTC	32	31,3	61,8
	R CAGACTAAGTCAGCCTTCACTCAC	24	50	62,7
Ex 9	F GGCAAAATGACATACGTGACTCTGTCTC	28	46,4	65,1
	R CAGCTCCTATATCATTTTTGCTACTCACC	29	41,4	63,9
Ex 10	F GGAACTCAATTCTACAGTATCTTTTCATCTCTC	33	36,4	64,5
	R CCTTTTTTCCCCCTTATTGGGTTTTTACC	29	41,4	63,9
Ex 11 & Ex 12	F CTGTCCAATGTTGTACACTTAGTGTTC	27	40,7	61,9
	R GACAAGTTGAAGGTCAAGTTAATCCAC	27	40,7	61,9
Ex 13	F CAGGAAATGCATTATAATCTGTCTCTCTG	29	37,9	62,4
	R CATTGTCAGGCTTTTATTTTTTCTAACTTACC	32	31,3	61,8
Ex 14	F CTGAAGTAGAACTCCCTAAATCTCTTCTGC	30	43,3	65,4
	R CCCATAACTTATCCCTTCCAAGTATCTTACC	31	41,9	65,5
Ex 15	F GAGTTAAAGACCCTTTCTTATTGGTGTC	28	39,3	62,2
	R CCAACTGGATATATCTATTTGGCACAAATTTG	27	34,4	63,1
Ex 16	F GCCAAAATATGACTGTGCTTGAATTAG	27	37	60,4
	R CTTCTCTCCGTTAGCCAGTTACAAG	25	48	63
Ex 17	F GTGGGGCTACATTGAATTATGACACTATACTG	32	40,6	65,6
	R CATCAGATAGGATATAGGACCTCTAGCATTAC	32	40,6	65,6
Ex 18	F GCAATCAGTCAGAACAATGTAGG	23	43,5	58,8
	R GGTTTCGGCTTCTTGTCTGA	20	50	60,4
Ex 19	F CTGCTACATTGAAACATGGTCAATGAG	27	40,7	61,9
	R GCTACGCTTATTGATAAATACAAGTTGAAGG	31	35,5	62,9
Ex 20 Teil I	F CCAGCTGTAACTGGTATGTAAAGAGAATG	29	41,4	63,9
	R GAGTATGCTGATTTCAAAAAGAAGATGGGTC	31	38,7	64,2
Ex 20 Teil II	F GTTTTGCCCTTTTTAAGGAAGGCAC	25	44	61,3
	R CTGTTATCGAAGAGTTCATTGACTCC	26	42,3	61,6
Promoter	F CACTGCTTTTTCAAACTGGGAGATGAATCCAC	32	43,8	66,9
	R CCGGTGCGACGAGAGCCAAGAAAAC	25	60	67,9

4.4 DNS-Sequenzierung

Es wurde das Prinzip der Kettenabbruch-DNS-Sequenzierung nach Sanger [169] verwendet, um für jeweils 8 MS-Patienten und 8 gesunde Kontrollpersonen die Sequenz aller 20 Exone des CD21-Rezeptorgens zu ermitteln und zu vergleichen.

Zur Aufklärung der Basenabfolge werden dabei zunächst enzymatisch zur ursprünglichen DNS-Sequenz komplementäre DNS-Sequenzen erzeugt und verlängert, bis ein zum Abbruch führendes fluoreszierendes Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTPs) eingebaut wird. Durch den geringen Gehalt an ddNTPs im Verhältnis zu Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) in dem verwendeten Reaktionsansatz, entsteht in jedem Verlängerungsschritt eine kleine Fraktion fluoreszenzmarkierter, nicht verlängerbarer DNS-Sequenzen. Wird das Reaktionsgemisch nun anhand der Länge der Fragmente aufgetrennt, so lässt sich

spektroskopisch für jedes der Fragmente die DNS-Base des am 5'-Ende eingebauten ddNTPs identifizieren. In einem weiteren Schritt kann aufgrund der Komplementarität des Replikats zur DNS-Matrize für jede Position der ursprünglichen DNS-Sequenz die vorhandene Base bestimmen werden.

In dieser Arbeit wurden zunächst die Kopienzahlen des zu sequenzierenden DNS-Segmentes in den in Tabelle 9 beschriebenen Polymerase-Kettenreaktionen vervielfältigt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Systems der Firma Qiagen aufgereinigt. Dazu wurden 100 µl PB-Puffer des Qiagen-Kits mit ungefähr 23 µl des PCR-Produktes vermischt und auf die Säulen gegeben. Diese wurden anschließend für 1 Minute bei 13000 min^{-1} zentrifugiert. Der PB-Puffer bewirkte die Bindung der Produkte an die Membran der Aufreinigungssäulen. Der Überstand wurde verworfen. Unerwünschte Salze wurden durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer und anschließende Zentrifugation bei 13000 min^{-1} für 2 Minuten entfernt. Auch dieser Überstand wurde verworfen. Eine wiederholte Zentrifugation bei 13000 min^{-1} für 1 Minute wurde genutzt, um letzte Reste von Pufferlösung und Salzen zu entfernen. Zur Elution der DNS von den Säulen wurden 20 µl EP-Puffer zugegeben und die Säulen bei 13000 min^{-1} für 1 Minute zentrifugiert. Um die Konzentration und Reinheit der DNS in den Proben zu analysieren, wurden 5 µl des Eluats verdünnt in 4 ml Loading-Dye-Lösung auf ein Agarose-Gel (2 %) aufgetragen und elektrophoretisch bei einer anliegenden Spannung von 100 Volt aufgetrennt.
Als einzelsträngige DNS-Matrize der Sequenzierungsreaktion wurde in 20 verschiedenen Reaktionsansätzen die Sequenz jedes der 20 Exone mit bis zu 15 vorausgehenden Basen durch die Wahl des jeweils spezifischen Primers definiert. Die verwendeten Primer entsprachen den in Tabelle 4.1 aufgelisteten *forward* Primern.

Zur Sequenzierungsreaktion wurde nach Abschätzung des erhaltenen reinen DNS-Produktes zwischen 2,5 µl und 6 µl DNS-Lösung mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 6 µl verdünnt und mit 1 µl Lösung des Exon-spezifischen *forward* Primers (5 pmol/µl) sowie mit 3 µl Big-Dye-Lösung der Firma Qiagen vermischt. Anschließend wurde die Sequenzierungsreaktion entsprechend dem in Abbildung 14 dargestellten PCR-Zyklus durchgeführt.

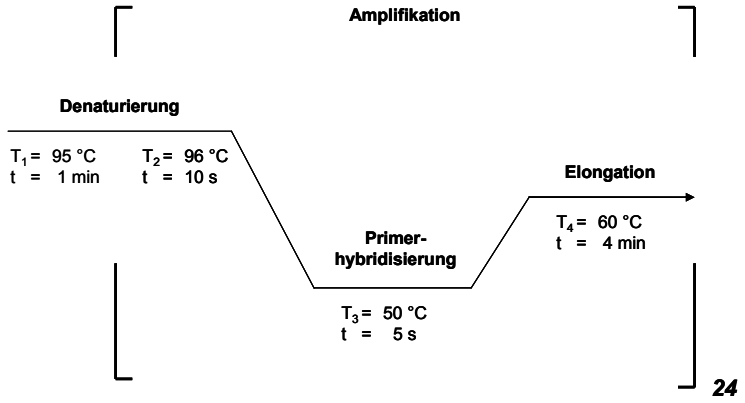


Abbildung 14 Cycler-PCR-Zyklus der Sequenzierungsreaktion.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in 24 Amplifikationszyklen bei den in Abbildung 14 aufgeführten Reaktionstemperaturen. Das Sequenzierungsprodukt wurde danach bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

Die erhaltenen Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden anschließend mit Hilfe des DyeEx 2.0 Spin Kits der Firma Qiagen aufgereinigt. Dazu wurde das Gesamtvolumen der Sequenzierungsreaktion auf Centri-Sept-Spin-Säulen aufgetragen und 2 Minuten bei 3000 min^{-1} zentrifugiert. Danach wurden 4 µl des gereinigten Sequenzierungsproduktes mit 16 µl HIDI-Lösung verdünnt und die Sequenz mittels Fluoreszenzmessung durch den ABI Prism 3100 Sequencer der Firma Applied Biosystems detektiert. Bei nicht eindeutig identifizierbarer Basensequenz wurde die DNS-Sequenzierung der reversen Sequenz mit den in Tabelle 4.1 angegebenen *reverse* Primern wiederholt.

4.4.1 Identifikation von Polymorphismen im Gen des CD21-Rezeptors

Zunächst wurde die DNS-Sequenz jedes Exons des CD21-Gens bei 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen durch DNS-Sequenzierung ermittelt. Zur Identifikation von SNP-Loki wurden in einem zweiten Schritt die DNS-Sequenzen jeweils eines Exons für 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sowie die NCBI-Referenzsequenz dieses Exons in das Programm SeqMan der Firma DNASTAR [170] eingegeben und in der dargestellten Übersicht miteinander verglichen. Als Referenz der DNS-Sequenz wurde die Sequenz mit der Ensembl Transcript ID ENST00000358875 [163] verwendet.

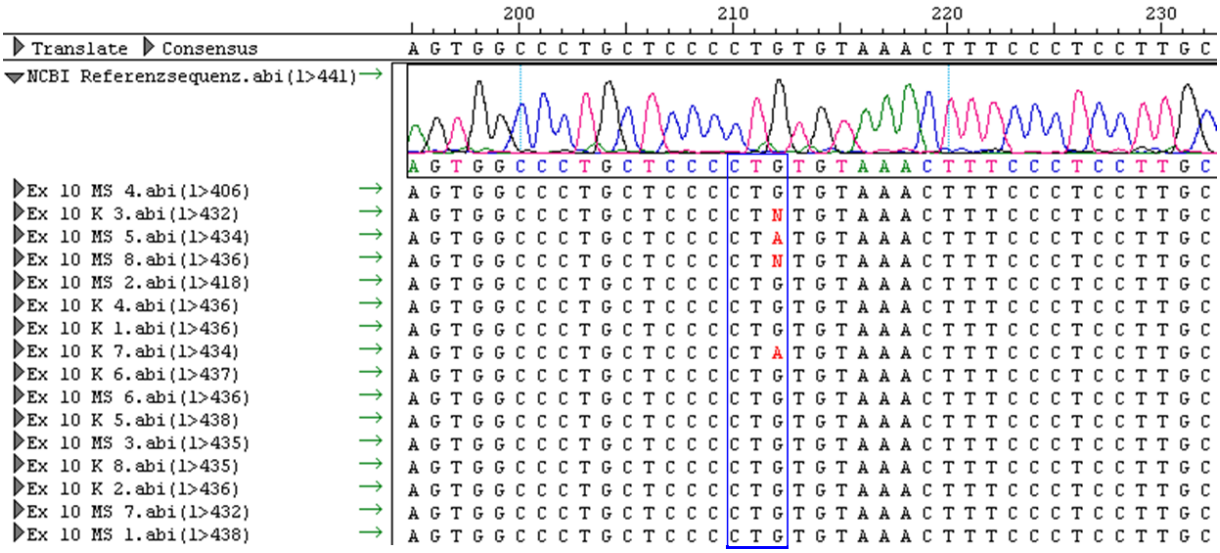


Abbildung 15 Strategie zur Identifikation von SNPs im CD21-Rezeptorgen. Dargestellt ist exemplarisch der DNS-Sequenzvergleich des Exons 10 von 8 MS-Patienten (Ex 10 MS 1 bis 8) mit 8 Kontrollpersonen (Ex 10 K 1 bis 8). Gekennzeichnet ist das Codon (CTG) der Aminosäureposition 529 mit dem SNP rs1048971 (G/A) in dritter Codonposition. Das Auftreten eines heterozygoten DNS-Lokus ist mit N gekennzeichnet. Die Nukleotide sind in Abhängigkeit des amplifizierten DNS-Sequenzbereichs nummeriert.

Die Abbildung 15 zeigt den Vergleich einer DNS-Sequenz von 8 MS-Patienten mit 8 Kontrollpersonen mit dem Auftreten verschiedener Nukleotide an der Basenposition 212 der ermittelten DNS-Sequenz. In Detailansicht zeigt die Abbildung 16 eine DNS-Sequenz mit einem homozygoten G/G-Lokus und eine andere DNS-Sequenz mit einem heterozygoten G/A-Lokus an dritter Stelle der dargestellten Basensequenz.

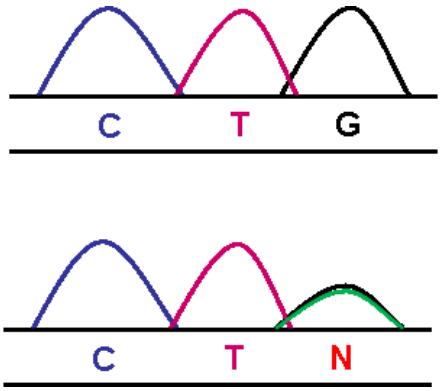


Abbildung 16 Chromatogramm einer Sequenzierungsreaktion mit Darstellung einer DNS-Sequenz mit homozygotem G/G-DNS-Lokus (oben) und einer DNS-Sequenz mit heterozygotem G/A-DNS-Lokus (unten).

Nach Identifikation von DNS-Sequenzveränderungen wurden die Frequenzen der vorliegenden DNS-Sequenzveränderungen jeweils im Kollektiv der untersuchten MS-Patienten sowie der untersuchten Kontrollpersonen bestimmt.

Um die potentiell identifizierten SNPs von einer Mutation zu unterscheiden, wurde das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes überprüft. Ausgehend von der beobachteten Allelverteilung in den einzelnen Gruppen wurde die theoretische Genotypverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet. Dies ist beispielhaft in Tabelle 5 für das Auftreten des als SNP rs4308977 identifizierten Basentausches in der MS-Population dargestellt.

Tabelle 5 Theoretische Genotypverteilung eines identifizierten Basentausches (SNP rs4308977) in der MS-Population. H_n ist die absolute Häufigkeit der beobachteten Genotypen beziehungsweise Allele. A und a sind die Variablen des Hardy-Weinberg-Gesetzes.

		rs4308977			
		wt	wt / mt	mt	n_{ges}
H_n (Genotypen)	beobachtet	10	5	1	16 (n)
H_n (Allele)	beobachtet	25 (A)		7 (a)	32 (2n)
	erwartet für n = 1024	625 (A^2)	350 (2Aa)	49 (a^2)	1024 ($A^2 + 2Aa + a^2$)
H_n (Genotypen)	erwartet für n = 16	9,765625	5,46875	0,765625	16 (n)
	erwartet für n = 16 (gerundet)	10	5	1	16 (n)

Die theoretisch erwartete Genotypverteilung wurde mittels Cochran-Armitage-Trend-Test mit der vorliegenden Genotypverteilung verglichen. Beim Vorliegen eines Polymorphismus unterschieden sich die theoretisch erwartete Genotypverteilung und die durch DNS-Sequenzierung ermittelte Genotypverteilung nicht voneinander.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur in vitro Vermehrung (Amplifikation) exon-spezifischer DNS-Sequenzen des CD21-Gens von MS-Patienten und Kontrollpersonen wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR = *polymerase chain reaction*) durchgeführt.

Nach dem von Kary Mullis 1986 entwickelten Prinzip werden im ersten Schritt der PCR die Doppelstränge der DNS durch Denaturierung bei hoher Temperatur getrennt. Nach dem Abkühlen auf eine für jedes Primerpaar spezifische Temperatur kommt es zur Anlagerung der Primernukleotide an die DNS-Einzelstränge (a*nnealing*). Ausgehend von den Primer-DNS-Hybriden als Start-Erkennung synthetisiert im nächsten sogenannten Elongationsschritt eine thermostabile DNS-Polymerase durch Anlagerung von dNTPs einen neuen Komplementärstrang. Die drei Reaktionsschritte Denaturierung, Primer-Anlagerung an die

DNS und Elongation werden in der PCR zyklisch wiederholt. Da sich in jedem Zyklus die Stoffmenge des zu amplifizierenden DNS-Abschnitts (Matrize) verdoppelt, wächst die Stoffmenge an Elongationsprodukt bei ausreichender DNS-Polymerase und dNTP-Konzentrationen exponentiell und es können innerhalb weniger Stunden 10^5 bis 10^6 Kopien der urprünglichen DNS-Sequenz erzeugt werden.

Pro Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 25-µl-Ansatz verwendet, der aus den in den Tabellen 6 bis 9 darstellten Komponenten bestand. Es wurden die DNS-Polymerasen AmpliTaq (N808-0171) der Firma Applied Biosystems, Taq Polymerase rec. (10342-020) der Firma Invitrogen, HotstarTaq Polymerase (203205) der Firma Qiagen und der Platinum® PCR SuperMix (11306-016) der Firma Invitrogen verwendet.

Tabelle 6 PCR-Reaktionsansatz mit AmpliTaq-DNS-Polymerase.

PCR-Reaktionsansatz: Amplitaq		
1 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	5 pmol/µl
1 µl	Primer reverse	5 pmol/µl
2,5 µl	dNTPs	100 mM
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
0,125 µl	DNS-Polymerase Amplitaq	0,625 units
16,875 µl	Aqua bidest.	

Tabelle 7 PCR-Reaktionsansätze mit Taq-DNS-Polymerase.

PCR-Reaktionsansatz: Taq I		
1 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	5 pmol/µl
1 µl	Primer reverse	5 pmol/µl
1 µl	$MgCl_2$	50 mM
2,5 µl	dNTPs	100 mM
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
0,125 µl	DNS-Polymerase Taq	0,625 units
15,875 µl	Aqua bidest.	

PCR-Reaktionsansatz: Taq II		
1 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	5 pmol/µl
1 µl	Primer reverse	5 pmol/µl
1 µl	DMSO	
2,5 µl	dNTPs	100 mM
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
0,125 µl	DNS-Polymerase Taq	0,625 units
15,875 µl	Aqua bidest.	

Tabelle 8 PCR-Reaktionsansatz mit PCR-Supermix Platinum.

PCR-Reaktionsansatz: Platinum		
22 µl	PCR-Supermix	
1 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	5 pmol/µl
1 µl	Primer reverse	5 pmol/µl

Tabelle 9 PCR-Reaktionsansatz mit HotstarTaq-DNS-Polymerase.

PCR-Reaktionsansatz: HotstarTaq		
1 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	5 pmol/µl
1 µl	Primer reverse	5 pmol/µl
2,5 µl	dNTPs	100 mM
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
0,125 µl	DNS-Polymerase HotstarTaq	0,625 units
15,875 µl	Aqua bidest.	

Tabelle 10 Angaben zur Amplifikation der DNS-Zielsequenz vor der Sequenzierungsreaktion.

DNS-Lokus	Annealing-Temperatur [°C]	Amplifikationszyklen (n)	PCR-Reaktionsansatz
Ex 1	68	40	Taq I
Ex 2	63	34	Taq II
Ex 3	63	34	Taq I
Ex 4	64	34	Taq I
Ex 5	60	40	Amplitaq
Ex 6	60	34	Amplitaq
Ex 7 & Ex 8	63	34	Taq II
Ex 9	63	34	Amplitaq
Ex 10	64	34	Amplitaq
Ex 11 & Ex 12	61	40	Taq I
Ex 13	63	34	Amplitaq
Ex 14	63	34	Taq II
Ex 15	63	34	Amplitaq
Ex 16	63	34	Amplitaq
Ex 17	64	34	Taq II
Ex 18	58	34	Taq I
Ex 19	58	34	Taq II
Ex 20 Teil I	62	34	Taq I
Ex 20 Teil II	60	34	Taq I
Promoter	66	40	Platinum

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden auf den Thermocyclern T_1, $T_{Gradient}$ oder $T_{personal}$ der Firma Biometra oder dem Thermocycler Gene Amp® PCR Systems 9700 der Firma PE Applied Biosystems durchgeführt.

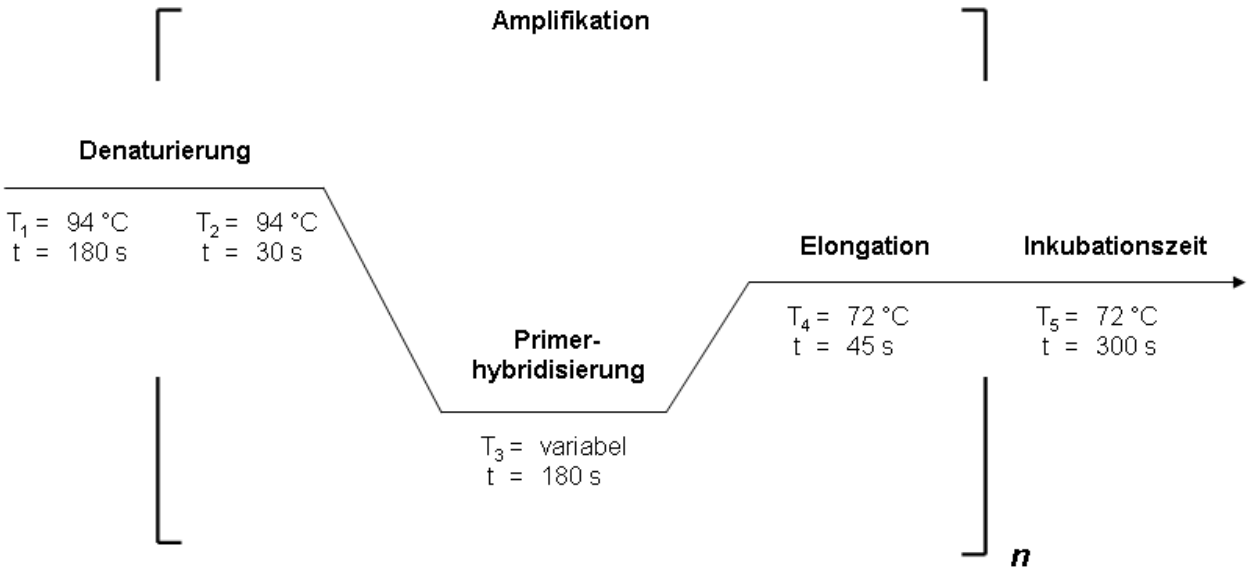


Abbildung 17 Schematische Darstellung der PCR-Programme.

Für die PCR-Reaktionsansätze Amplitaq, Taq und Platinum bestand das in Abbildung 17 dargestellte PCR-Programm aus einem initialen Denaturierungsschritt (94 °C für 180 s), 34 bis 40 Amplifikationszyklen (94 °C für 30 s, einer primer-spezifischen *annealing* Temperatur für 30 s, 72 °C für 45 s) und einer abschließenden Inkubationszeit (72 °C für 300 s). Abweichend davon wurde für den PCR-Reaktionsansatz HotstarTaq zur Enzymaktivierung eine initiale Denaturierung von 10 Minuten bei 94 °C durchgeführt.

4.5.1 ARMS-PCR

Zur Identifikation und Frequenzanalyse des SNP rs17615 (Wildtyp G / Mutant A) erfolgte die Durchführung einer ARMS-PCR mit den in Tabelle 17 gezeigten Primer-Oligonukleotiden.

Die ARMS-Reaktion (*amplification refractory mutation system*, System der amplifizierungsresistenten Mutationen) wird auch als "PCR-Amplifikation von spezifischen Allelen (PASA)" oder „allel-spezifische PCR (ASP)" bezeichnet. Die SNP-Typisierung mittels ARMS-PCR ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt. In dieser Reaktion werden ähnlich einer konventionellen PCR zwei Primer eingesetzt, von denen der eine am freien 3'-Ende eine Base trägt, die dem Allelzustand eines dort lokalisierten SNP entspricht. Dieser allel-spezifische Primer und ein zweiter, der DNS-Originalsequenz komplementärer Primer, werden in zwei parallelen PCR-Ansätzen verwendet. Eine nicht 3'-5'-korrekturlesende DNS-Polymerase verlängert den allel-spezifischen Primer nur dann, wenn seine Sequenz derjenigen der Matrizen-DNS komplementär ist, insbesondere der am 3'-Ende [171, 172]. Eine

Amplifikation zeigt somit den Allelzustand des SNP in der Matrizen-DNS an und wird durch die Länge des elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkts nachgewiesen.

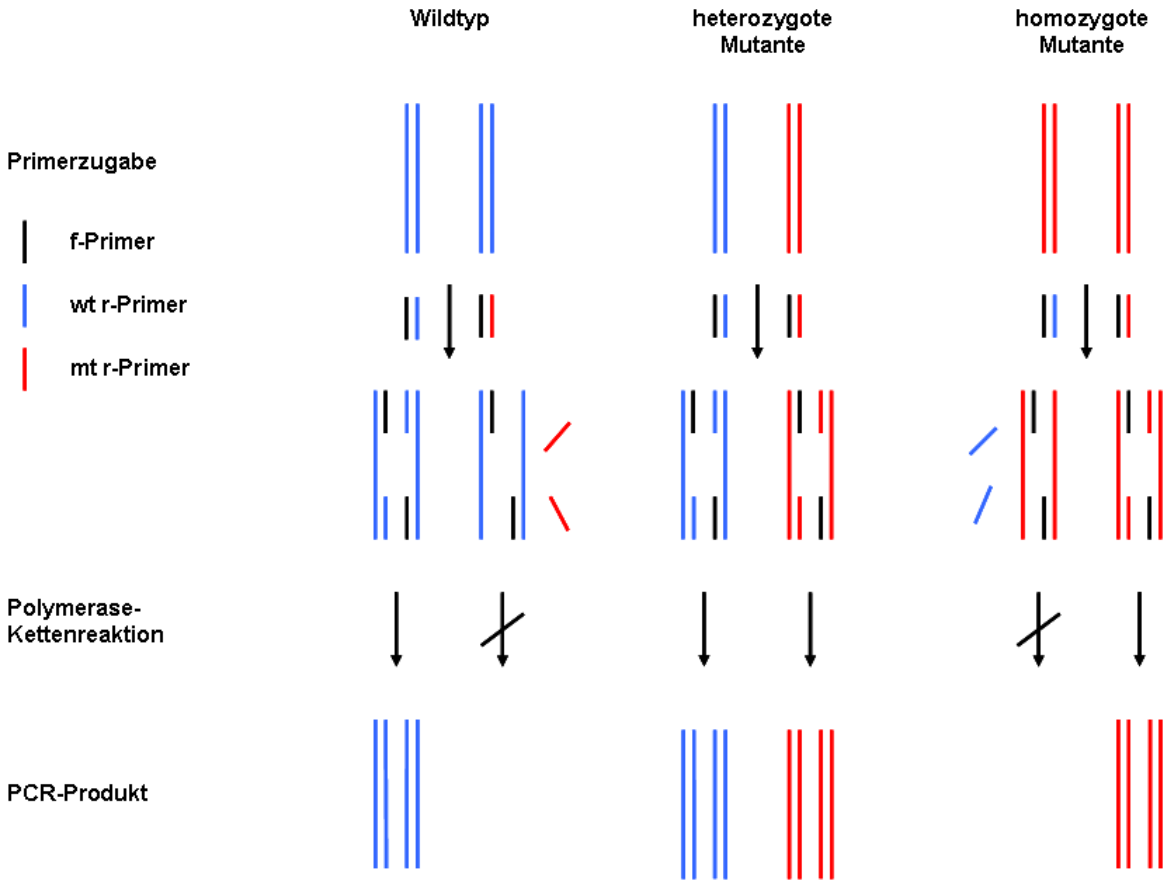


Abbildung 18 Schematische Darstellung der SNP-Typisierung mittels ARMS-PCR. In der Abbildung wird die Abkürzung f für *forward* Primer, wt für *wildtype* Primer und mt für *mutant* Primer verwendet.

Zum Nachweis der Allelform des SNP rs 17615 wurden von jeder DNS-Probe 2 µl DNS (20 ng/µl) mit jeweils 23 µl PCR-Reaktionsansatz (wt) und 23 µl PCR-Reaktionsansatz (mt) in zwei verschiedene Reaktionsgefäße gegeben (Tabelle 11).

Tabelle 11 Primer-Oligonukleotide der ARMS-PCR. In der Tabelle wird die Abkürzung f verwendet für den *forward* Primer, wt r für den *wildtype* 3‘ *reverse* Primer, mt r für den *mutant* 3‘ *reverse* Primer, Bp für Basenpaar, GC [%] für den Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen und T_m [°C] für die Schmelztemperatur.

DNS-Lokus	Primersequenz	Bp	GC [%]	T_m [°C]
f-Primer	TGGGGCACACACCGGGAGTTCCTTAGAAGATTTTCCATATGGAACCACGG	50	52	74,3
wt r-Primer	GTAGTCAGATTCGTTGCAAAGCTGATAACACCTGGGATCCTGAAAT	46	43,5	73,0
mt r-Primer	ATAGTCAGATTCGTTGCAAAGCTGATAACACCTGGGATCCTGAAAT	46	41,3	72,1

Danach wurden beide Reaktionsansätze zusammen mit dem in Abbildung 19 dargestellten PCR-Programm in einem Thermocycler amplifiziert. Zur Auswertung wurden die PCR-

Produkte (wt) und (mt) nebeneinander auf einem Agarose-Gel (2 %) aufgetragen und beide Produkte nach einer Auftrennung bei 80 Volt verglichen.

Tabelle 12 AMRS-PCR-Reaktionsansätze.

ARMS-PCR-Reaktionsansatz (wt)		
2 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	2 mM
1 µl	Primer reverse (wt)	2 mM
2,5 µl	dNTPs	100 mM
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
0,125 µl	DNS-Polymerase HotstarTaq	0,625 units
15,875 µl	Aqua bidest.	

ARMS-PCR-Reaktionsansatz (mt)		
2 µl	DNS	20 ng/µl
1 µl	Primer forward	2 mM
1 µl	Primer reverse (mt)	2 mM
2,5 µl	dNTPs	100 mM
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
0,125 µl	DNS-Polymerase HotstarTaq	0,625 units
15,875 µl	Aqua bidest.	

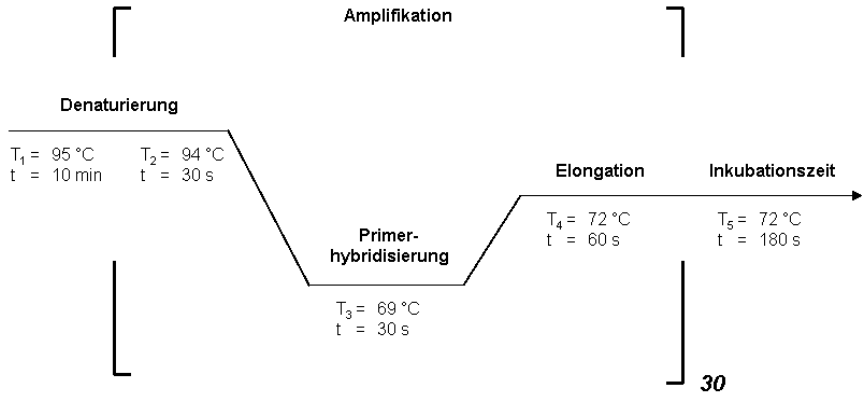


Abbildung 19 Schematische Darstellung des ARMS-PCR-Programms.

4.5.2 RFLP-PCR

Zur Identifikation und Frequenzanalyse des SNP rs6540433 (Wildtyp A / Mutant C) erfolgte die Durchführung einer RFLP-PCR mit den in Tabelle 4 für Exon 18 gezeigten Primer-Oligonukleotiden.

Die Methode der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-PCR (*restriction fragment length polymorphism* PCR, RFLP-PCR) eignet sich zum Nachweis von Punktmutationen, welche eine Restriktionsschnittstelle erzeugen oder zerstören. Im ersten Schritt dieser PCR-Methode wird die DNS-Zielsequenz, in der ein solcher SNP vorhanden ist, mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird dann zum enzymatischen Verdau inkubiert. Es wird ein Restriktionsenzym (Restriktionsendonuklease) verwendet, das die zu untersuchende DNS-Sequenz erkennen und hochspezifisch spalten kann. Nach dem Restriktionsverdau der zuvor amplifizierten DNS-Sequenz werden die Restriktionsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch die unterschiedlichen Längen der entstandenen DNS-Spaltsequenzen werden die zwei verschiedenen Allele des RFLPs unterschieden.

Die Auswahl des Restriktionsenzyms für die DNS-Sequenz von Exon 18 des CD21-Gens erfolgte mit Hilfe der Software Webcutter 2.0 [173], in der die entsprechende Sequenz eingegeben und auf unterschiedliche Schnittstellen durch Restriktionsenzyme im Vergleich zwischen Mutant- und Wildtyp-Sequenz untersucht wurde.

Dabei wurde festgestellt, dass die DNS-Sequenz mit dem wt-Allel des SNP rs6540433 von der Restriktionsendonuklease BsiHKAI erkannt und geschnitten wird.

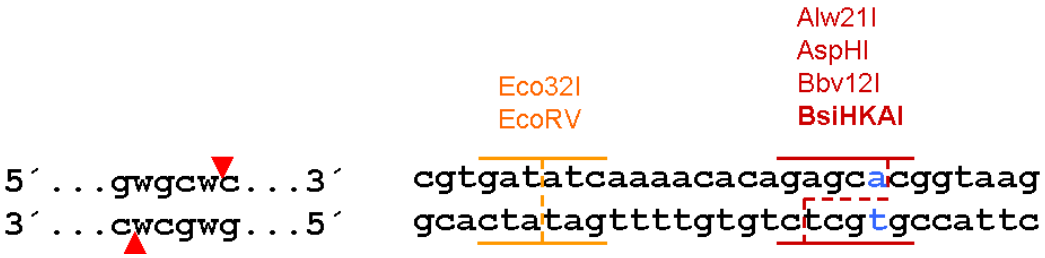


Abbildung 20 Darstellung der Palindrom-Sequenz des Restriktionsenzyms BsiHKAI (links), dabei entspricht w den Basen Adenin oder Thymin. Darstellung einer DNS-Teilsequenz von Exon 18 des CD21-Gens, an der die Restriktionsendonuklease BsiHKAI schneidet (rechts).

Zuerst erfolgte die Amplifikation der DNS-Sequenz des Exons 18 analog zum ersten Schritt der Sequenzierungsreaktion. Anschließend fand der in Tabelle 13 gezeigte Enzymverdau des PCR-Produktes statt.

Tabelle 13 Restriktionsansatz für 96 DNS-Proben.

94 µl	10 x BSA	
94 µl	1 x NE Buffer 3	
37,5 µl	BsiHKAI	375 units
432,5 µl	Aqua bidest.	

Für den Restriktionsansatz wurde die Restriktionsendonuklease BsiHKAI der Firma New England Biolabs (NEB Inc. R0570S) mit einem enzymspezifischen Puffer (1 x NEBuffer 3) verwendet. Jedes Reaktionsgefäß wurde mit 10 µl Restriktionsansatz und 4 µl PCR-Produkt gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37 °C wurden die Fragmente zur Darstellung und anschließenden Identifizierung des Genprodukts anhand der Basensequenzlänge auf ein Agarose-Gel (2 %) aufgetragen und bei einer anliegenden Spannung von 80 Volt aufgetrennt.

4.5.3 RT-PCR

Die Bestimmung der Isoformen des CD21-Rezeptors erfolgte anhand der vorhandenen mRNS-Sequenzen nach Isolation der mRNS-Sequenzen aus 50 Serumproben von MS-Patienten mittels RT-PCR.
Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine hochempfindliche molekularbiologische Methode, um die Genexpression in Zellen, Geweben oder Blutserum auf RNS-Ebene zu untersuchen und gegebenenfalls zu quantifizieren. Dabei kombiniert die Methode der RT-PCR die reverse Transkription der in den Proben vorhandenen mRNS-Framente in cDNS mit der Vervielfältigung der erstellten Produkte. Im Rahmen einer gezielten Genexpressions-Analyse ermöglicht die cDNS, auch Informationen darüber zu erhalten, ob das zugehörige Gen in verschiedenen Isoformen exprimiert wird. Denn bei Eukaryoten wird die mRNS bereits nach ihrer Transkription modifiziert und gespleißt. Dementsprechend können verschiedene Isoformen als unterschiedliche Spleiß-Varianten auf mRNS – beziehungsweise auf cDNS-Ebene – nachgewiesen werden.

Für das CD21-Rezeptorprotein sind drei Isoformen bekannt, die sich durch die Existenz der von den Exonen 9 und 11 codierten Aminosäuren unterscheiden. Zur Identifikation und Analyse der CD21-Rezeptor-Isoformen bei MS-Patienten wurde zunächst die cDNS aus den

Serumproben synthetisiert. Diese reverse Transkription erfolgte in den in Tabelle 14 dargestellten Reaktionsansätzen bei den in Abbildung 21 gezeigten Temperaturschritten.

Tabelle 14 RT-PCR-Reaktionsansätze.

RT-PCR-Reaktionsansatz 1		
5 µl	poly(A)-RNS in sterilem H_2O	1 µg
5 µl	Aqua bidest.	
1 µl	dNTP Mix	10 mM
1 µl	oligo(dT)12-18 Primer-Lösung	50 µM

RT-PCR-Reaktionsansatz 2		
4 µl	First-strand Buffer	5 x
2 µl	DTT	0,1 M
1 µl	Rec RNase Inhibitor	40 units
0,2 µl	SuperScript III RT	40 units

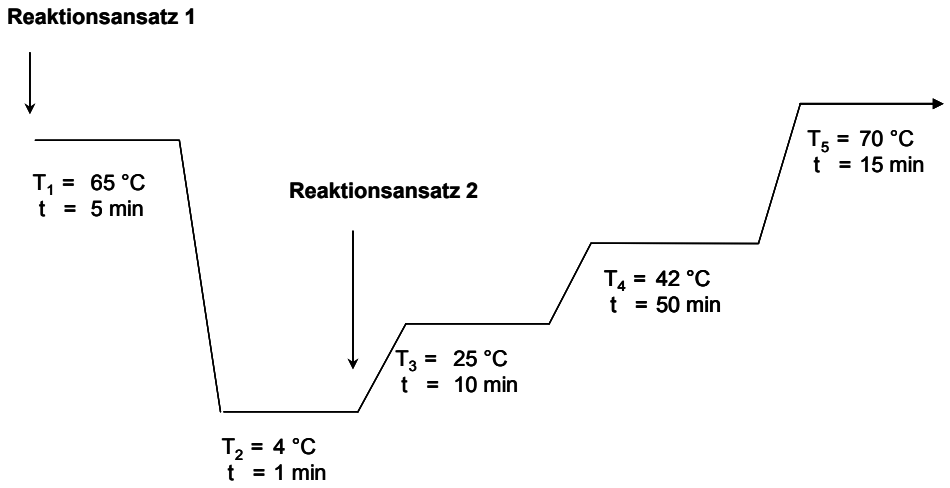


Abbildung 21 Reaktionsschritte der reversen Transkription.

Danach wurden zum gezielten Nachweis der exprimierten Isoformen zwei Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt, bei denen die Primersequenzen jeweils so gewählt wurden, dass sie mit den benachbarten Exonen hybridisieren (*exon spanning* PCR).

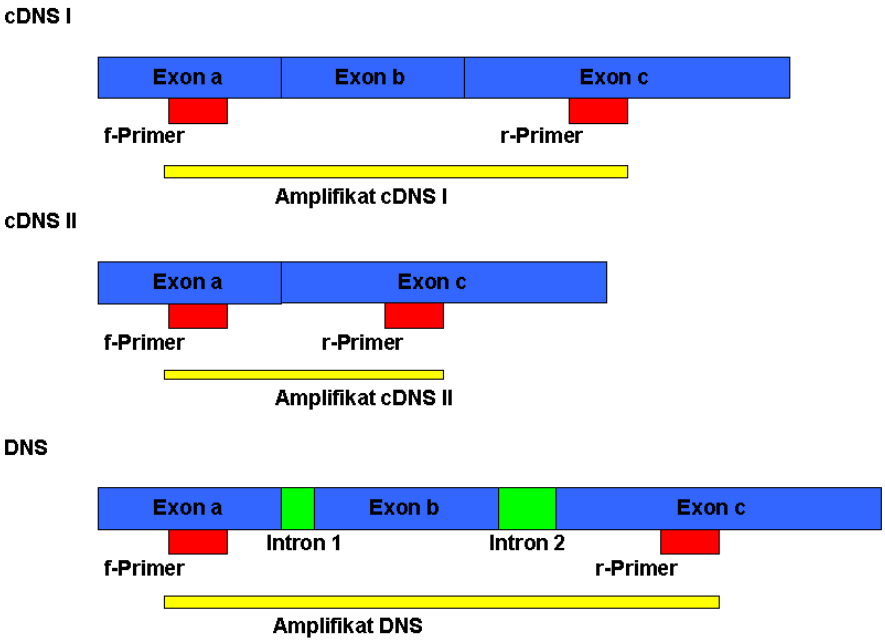


Abbildung 22 Schematische Darstellung der *exon spanning* PCR.

Für die *exon spanning* PCR zum Nachweis von Exon 9 wurde der PCR-Reaktionsansatz Taq I mit dem in Tabelle 15 dargestellten Primerpaar verwendet.

Tabelle 15 Primerpaar für die *exon spanning* PCR (Exon 9).

DNA-Lokus	Primersequenz	Bp	GC [%]	T_m [°C]
f-Primer (auf Exon 8)	GAAGGCAACTCTTGACAAAACCCCAGCAC	29	52	63
r-Primer (auf Exon 10)	CCGGTGTGTGCCCCATTGTAGATAACAG	28	54	63

Für die *exon spanning* PCR zum Nachweis von Exon 11 wurde der PCR-Reaktionsansatz Platinum mit dem in Tabelle 16 dargestellten Primerpaar verwendet.

Tabelle 16 Primerpaar für die *exon spanning* PCR (Exon 11).

DNA-Lokus	Primersequenz	Bp	GC [%]	T_m [°C]
f-Primer (auf Exon 10)	GTCAGATTCGTTGCAAAGCTGATAACACCTG	31	45	62
r-Primer (auf Exon 12)	CTTGGCAGGACGTATTAACTAGCTCCACAC	30	50	63

Für beide *exon spanning* Polymerase-Kettenreaktionen wurde der in Abbildung 23 gezeigte Temperaturzyklus verwendet. Der Nachweis der vorhandenen Isoformen erfolgte anhand der Länge des Amplifikationsprodukts nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

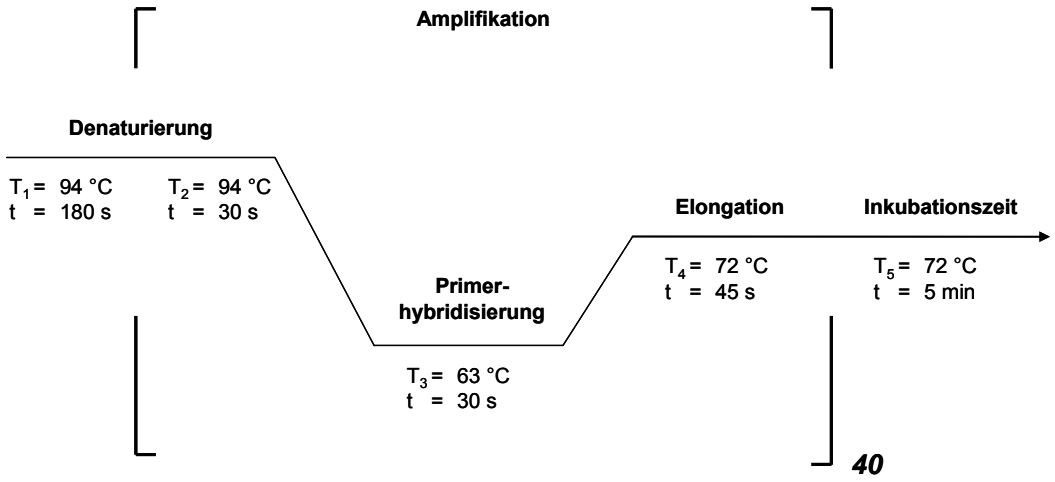


Abbildung 23 PCR-Programm der *exon spanning* PCR.

4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Darstellung der in den unterschiedlichen PCR-Reaktionen synthetisierten Amplifikationsprodukte erfolgte im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktionen eine Agarose-Gelelektrophorese.

In diesen Experimenten wurden hauptsächlich Agarose-Gele (2 %) verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden 4 g SeaKem® LE Agarose (BioWhittaker Molecular Applications) mit 20 ml TBE-Puffer (GibcoBril Life Technologies) und 180 ml entmineralisiertem Wasser aufgegossen und in der Mikrowelle für drei Minuten erhitzt. Dieses Gemisch wurde nach einminütiger Abkühlzeit mit 4 µl SYBR® Gold NucleicAcid Gel Stain (Molecular Probes) gefärbt und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Auskühlen des Gels wurden je 5 µl der zu untersuchenden DNS-Proben in 2 µl Ladepuffer der Firma Qiagen (Loading Dye Gel Pilot 5x 1037650, 20 % verdünnt mit Aqua bidest.) aufgenommen und auf das Agarose-Gel aufgetragen.

Bei einer anliegenden Spannung von 70 bis 100 Volt trennten sich die Proben elektrophoretisch entsprechend ihrer Basensequenzlänge in unterschiedlicher Zeit auf und wurden danach mit dem E.A.S.Y. 429 K Transilluminator (Herolab, Molekulare Trenntechnik) unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht. Als Referenz wurde die 100 Bp DNS-Leiter der Firma Invitrogen verwendet.

4.7 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Rezeptorproteins von MS-Patienten und Kontrollpersonen wurde ein *two antibody* ELISA (*sandwich* ELISA) mit dem sCD21 ELISA-KIT der Firma Diaclone Research durchgeführt.

Die ELISA-Methode, die zu den selektivsten und empfindlichsten der analytischen Biochemie zählt, beruht auf dem quantitativen kolorimetrischen Nachweis einer zu bestimmenden Proteinmenge durch spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, die mit einer enzymatischen Farbreaktion gekoppelt werden. Bei der durchgeführten Sandwich-ELISA-Technik wurden zwei Antikörper verwendet, die unterschiedliche Epitope des sCD21-Proteins erkennen. Beide Antiköper enthalten dementsprechend verschiedene Paratope, wobei einer zusätzlich mit einem Enzym gekoppelt ist.

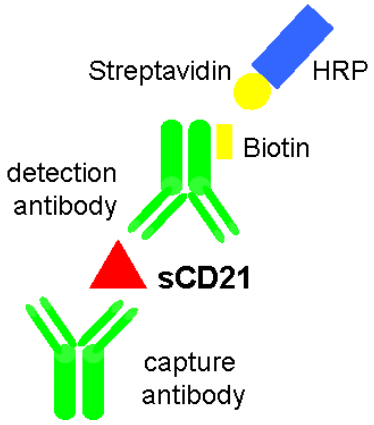


Abbildung 24 Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.

In einem ersten Reaktionsschritt wurden je 25 µl Serum mit 100 µl Standard Buffer Diluent verdünnt. Davon wurden nacheinander je 100 µl Serum-Lösung pro Vertiefung auf insgesamt zwei 96-Well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Diese eigens für ELISA entwickelten 96-Well-ELISA-Mikrotiterplatten (Polystyrol-Plastikplatten mit 96 Vertiefungen) wurden von der Firma zuvor mit einem sCD21-spezifischen ersten Antikörper (*capture antibody*) beschichtet. Die Anordnung der Serumproben auf den ELISA-Platten erfolgte zufällig. Auf jeder der beiden ELISA-Platten wurden eine Negativ-Kontrolle (*blanc*) sowie folgende Standardreihe S_1 bis S_6 aufgetragen: S_1 100 U/ml, S_2 50 U/ml, S_3 25 U/ml, S_4 12,5 U/ml, S_5 6,25 U/ml, S_6 3,12 U/ml

In alle Vertiefungen wurden zusätzlich 50 µl eines zweiten, biotin-markierten Antikörpers (*detection antibody*) zugegeben und die ELISA-Platten für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen unter stetigem Schütteln inkubiert. In drei Waschschritten mit je 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung und Waschschritt wurden danach die nicht an die feste Phase der Polystyrol-Plastikplatten gebundenen Reagenzien entfernt. Vor einer zweiten Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz wurden 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung pro Vertiefung aufgetragen. Durch das Enzym Streptavidin erfolgte daraufhin die Spaltung der an den Detektionsantikörper gebundenen Biotinmoleküle. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die ELISA-Platten mit je 100 µl ready-to-use TMB-Lösung pro Vertiefung unter Lichtschutz bei einer Inkubationszeit von 28 Minuten entwickelt. Nach Blaufärbung der Reaktionslösungen wurden 100 µl H_2SO_4 pro Vertiefung zugegeben und die optische Dichte der Proben bei 450 nm mit einem ELISA Reader Safire2™ der Firma Tecan gemessen. Die Auswertung und Bestimmung der Serum-Konzentrationen anhand der Standardwerte erfolgte mit der Magellan™-Software der Firma Tecan.

4.8 Statistik

4.8.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In jeder Gruppe wurden – für die MS-Patientengruppe und die Kontrollpersonengruppe getrennt – beim Auftreten verschiedener Allele in den DNS-Sequenzen die Auftretenswahrscheinlichkeiten auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts überprüft, um Polymorphismen von potentiellen Mutationen zu unterscheiden.

In den Jahren 1908 und 1909 zeigten der Engländer Hardy und der Stuttgarter Weinberg unabhängig voneinander, dass die Häufigkeit homozygoter (AA oder aa) und heterozygoter (Aa) Individuen über Generationen hinweg konstant bleibt, wenn:

1) die Population sehr groß ist,
2) die Individuen sich uneingeschränkt paaren können,
3) es keine Selektion bestimmter Allele gibt,
4) keine Genmigrationen vorkommen und
5) keine Mutationen auftreten.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p+q)^2 = 1$$

Dabei stellen p und q die Häufigkeiten der Allele dar. Betrachtet man diese genauer, so erkennt man, dass die Auftretenswahrscheinlichkeiten von Genen in Populationen zueinander in einem stabilen Gleichgewicht stehen. Dabei kann die Zahl der Allele pro Gen in einer Population beliebig hoch sein und das Genom eines Individuums stellt eine zufällige Auswahl aus diesem gesamten Genpool dar. In einer Population kommen folglich die Genotypen AA, Aa und aa vor, deren Auftretenswahrscheinlichkeiten nach folgender Formel im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zueinander stehen:

$$AA + 2Aa + aa = 1$$

Daher lässt sich durch die Berechnung des Hardy-Weinberg-Äquilibriums bestimmen, ob ein DNS-Sequenzunterschied als Polymorphismus oder Mutation zu werten ist.

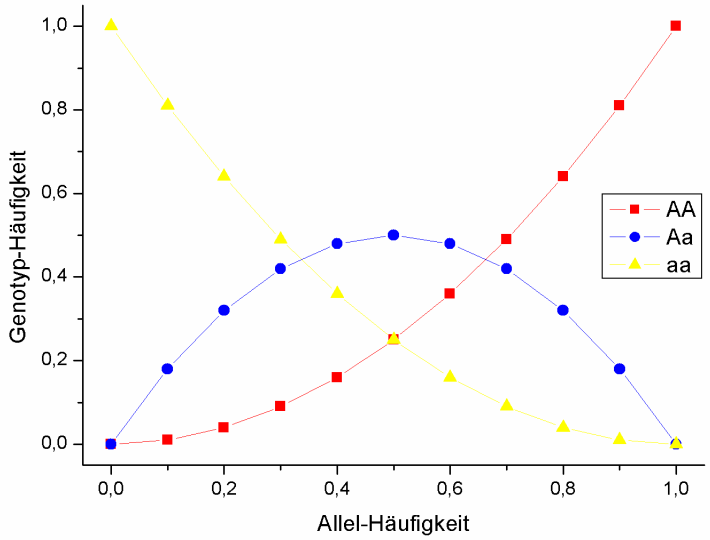


Abbildung 25 Beziehung zwischen Allel- und Genotyp-Häufigkeit einer Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Auftretenswahrscheinlichkeiten von verschiedenen Allelen wurden in dieser Arbeit mit dem zweiseitigen Fisher-Exact-Test (Fisher-Freeman-Halton-Test) aus dem Programm StatXact 7 der Firma Cytel Software Corporation auf Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts überprüft und sind in Tabelle 18 im Abschnitt 5.1 angegeben.

4.8.2 Zweiseitiger Fisher-Exact-Test

Um eine mögliche Assoziation aufzeigen zu können, wurde das Verhältnis der SNP-Allelfrequenz zu der Wildtyp-Allelfrequenz in der Gruppe der MS-Patienten und in der Kontrollpersonengruppe berechnet und es wurden die Allelverteilungen mit dem zweiseitigen

Fisher-Exact-Test für alle auf dem CD21-Gen untersuchten Polymorphismen verglichen. Bei allen Analysen wurde der zweiseitige Fisher-Exact-Test aus dem Programm GraphPad Prism 4 der Firma GraphPad Software Inc. verwendet.
Der Fisher-Exact-Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in einer Kontingenztafel. Im Gegensatz zum Chi-Square-Test liefert dieser auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate. Aus den beiden Merkmalen – dem Genpool der zu untersuchenden Population und dem Genpool einer Kontrollgruppe – mit je zwei Kategorien (mit SNP / ohne SNP) resultieren vier Teilgruppen, für die man die beobachteten Häufigkeiten in eine Kreuztabelle einträgt.
Mit dem zweiseitigen Fisher-Exact-Test wird dann die Hypothese überprüft, dass die beobachteten Merkmale voneinander unabhängig sind (Nullhypothese).

4.8.3 Cochran-Armitage-Trend-Test

Um die Genotypverteilung in der Gruppe der MS-Patienten mit der Genotypverteilung der Kontrollpersonen zu vergleichen, wurde in dieser Studie der Cochran-Armitage-Trend-Test aus dem Programm StatXact 7 der Firma Cytel Software Corporation verwendet. Dazu wurde aus den beiden Merkmalen – dem Genpool der zu untersuchenden Population und dem Genpool einer Kontrollgruppe mit je drei Kategorien (Wildtyp / Heterozygot / Mutant) – eine Kontingenztabelle aus sechs Zellen erstellt und anhand des exakten p-Werts die Gültigkeit der Nullhypothese überprüft.
Der Cochran-Armitage-Test ist ein Trend-Test für binomial verteilte Variablen über die Ebenen einer zweiten kategorialen Variable und kann für beliebige (2 x k)- oder (k x 2)-Kontingenztafeln verwendet werden [174]. Er wird häufig als genotyp-basierter Test eingesetzt, um Kandidatengene auf Abhängigkeit zu prüfen [175, 176]. Die Genauigkeit dieses Testverfahrens zur SNP-Genotypisierung gegenüber dem Chi-Square-Test wurde insbesondere bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen bestätigt [177].

4.8.4 Mann-Whitney-Test

Zur Ermittlung eines sCD21-Konzentrationunterschieds im Serum von MS-Patienten und Kontrollpersonen wurde der Mann-Whitney-Test unter der Voraussetzung durchgeführt, dass metrische Daten geringen Umfangs vorliegen, deren Verteilung bisher nicht bekannt ist. Es wurde der zweiseitige nichtparametrische Mann-Whitney-Test aus dem Programm GraphPad Prism 4 der Firma GraphPad Software Inc. verwendet.

Der Mann-Whitney-Test (U-Test) ist ein Signifikanztest, der einen Zusammenhang zwischen einer zweistufig nominal skalierten Variablen und einer ordinal skalierten Variablen oder auch den Unterschied zwischen zwei unabhängigen Stichprobenverteilungen (A und B) hinsichtlich einer ordinal skalierten Variablen überprüfen kann. Bei dem einseitigen Testverfahren werden die unabhängigen Stichproben auf einen Größenunterschied bezüglich der ordinalen Variablen geprüft (A > B beziehungsweise A < B); bei Verwendung des zweiseitigen Tests wird der Zusammenhang A = B geprüft. Es handelt sich um einen parameterfreien Test, der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt [178].

4.8.5 Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Zum Einzelvergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von insgesamt 8 MS-Patienten jeweils vor und während der IFN-beta-Therapie wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test aus dem Programm GraphPad Prism 4 der Firma GraphPad Software Inc. verwendet.
Der Wilcoxon-Test ist ein statistischer Test für die Häufigkeitsverteilung gepaarter Stichproben. Dabei berücksichtigt dieser Test sowohl die Richtung als auch die Stärke der Differenzen zwischen zwei gepaarten Stichproben.

4.8.6 Multiples Testen

Gemäß den Empfehlungen der *European Medicines Agency* (EMEA) [179] wurden für die statistischen Aussagen in der vorliegenden Arbeit die Kriterien des Multiplen Testens beachtet. Das Vorgehen wurde gewählt, weil bei der Betrachtung verschiedener Endpunkte beziehungsweise Zielkriterien sowie der Analyse von Subgruppen innerhalb einer Studie die Problematik des „Multiplen Testens“ entsteht [180, 181].

Es treten bei der Überprüfung eines Modells, das aus mehreren Hypothesen besteht, folgende Effekte auf:

1. Je mehr Hypothesen getestet werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein möglicher, aber nicht vorhandener Unterschied „aufgedeckt“ wird. (Fehler 1. Art)
2. Je mehr Hypothesen getestet werden, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein tatsächlich vorhandener Unterschied „aufgedeckt“ wird. (Fehler 2. Art)

In dieser Arbeit wurden daher zur Berücksichtigung des Multiplen Testens, für Ergebnisse aus mehrfach analysierten Daten – ausschließlich des Surveys – zusätzlich adjustierte p-Werte ($p_{adj.}$) angegeben. Die Adjustierung der p-Werte erfolgte nach dem Benjamini-Hochberg-Algorithmus in der Software „R“ [182].

5 ERGEBNISSE

5.1 Polymorphismen im CD21-Gen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der CD21-Rezeptor auf molekulargenetische Veränderungen bei MS-Patienten untersucht. Es wurden zunächst alle zwanzig Exone des CD21-Gens von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sequenziert und bereits bekannte SNPs validiert sowie neue SNPs identifiziert.

Die Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse unter Berücksichtigung der zu diesem Zeitpunkt bereits veröffentlichten SNP-Daten (Stand 16.08.2007). Bei den SNPs auf Exon 1, 10, 14, 18 und 20 handelt es sich um in Internetdatenbanken gelistete SNPs. Der beschriebene SNP rs1143665 auf Exon 14 konnte in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Sequenzen des MS- und Kontroll-Kollektivs nicht bestätigt werden. Der SNP auf Exon 11 wurde neu identifiziert und ist bei Fertigstellung dieser Arbeit als SNP rs17616 in den Internet-Datenbanken gelistet. Der SNPs rs17616 und der SNP rs4308977 traten in allen untersuchten Sequenzen beider Populationen gleichzeitig auf.

Tabelle 17 SNPs auf den Exonen des CD21-Rezeptorgens.

Region	mRNA-Position	db SNP-Cluster ID	db SNP-Allele	Codon-Position	Aminosäure	AS-Position	Ergebnis
Exon 1	24	rs3813946	A/G				bestätigt
Exon 10	1870	rs1048971	A	3	Leucin	592	bestätigt
			G	3	Leucin	592	bestätigt
	2010	rs17615	A	2	Asparagin	639	bestätigt
			G	2	Serin	639	bestätigt
Exon 11	2081	rs4308977	C	1	Prolin	663	bestätigt
			T	1	Serin	663	bestätigt
	2106	rs17616	A	2	Histidin	671	bestätigt
			G	2	Arginin	671	bestätigt
Exon 14	2743	rs1143665	C	3	Glycin	883	bestätigt
			T	3	Glycin	883	nicht bestätigt
Exon 18	3248	rs17258982	G	1	Valin	1052	bestätigt
			A	1	Isoleucin	1052	bestätigt
	3279	rs6540433	A	2	Glutamat	1062	bestätigt
			C	2	Alanin	1062	bestätigt
Exon 20	3817	rs9429940	C/T				bestätigt

Es wurden die Frequenzen der identifizierten Sequenzveränderungen jeweils im Kollektiv der untersuchten MS-Patienten sowie der untersuchten Kontrollpersonen bestimmt. Ausgehend von der beobachteten Allelverteilung in den einzelnen Gruppen wurde die theoretische Genotypverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet. Die theoretisch erwartete

Genotypverteilung wurde danach mittels Cochran-Armitage-Trend-Test mit der vorliegenden Genotypverteilung verglichen. Dabei wurde, wie in Tabelle 18 gezeigt, für keine DNS-Sequenzänderung bei den untersuchten MS-Patienten oder Kontrollpersonen eine signifikante Abweichung ($p < 0,05$) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festgestellt. Alle auf dem CD21-Rezeptorgen identifizierten Basenaustausche konnten auf diese Weise als „echte“ SNPs bestätigt werden.

Tabelle 18 Vergleich der theoretischen und der beobachteten Genotypverteilung mittels Cochran-Armitage-Trend-Test.

SNP	p-Werte	
	MS	Kontrollen
rs4308977	1	0,8022
rs17616	1	0,8022
rs1048971	1	1
rs17615	1	0,8187
rs3813946	1	1
rs17258982	1	1
rs9429940	1	1
rs6540433	0,8153	1
rs17615 (großes Kollektiv)	0,08699	0,1756
rs6540433 (großes Kollektiv)	0,1151	0,8565

5.1.1 Frequenzanalyse von bekannten SNPs im CD21-Gen bei 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen

Die beobachteten Allel- und Genotypfrequenzen werden im Folgenden für die in der HapMap-Datenbank beschriebenen SNPs des CD21-Rezeptorgens einzeln angegeben und es werden die Ergebnisse der Verteilungsanalyse zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen beschrieben [183]. Es handelt sich dabei um die SNPs auf den Exonen 1, 10, 11, 14, 18 und 20.

5.1.1.1 SNP rs3813946

Der Polymorphismus rs3813946 tritt mit einem Basenaustausch von Thymin (wt) zu Cytosin (mt) in der 5’-untranslatierten Sequenz von Exon 1 an der mRNS-Position 25 des CD21-Gens auf.

Da der CD21-Promoter, wie in Abbildung 26 gezeigt, von Ulgiati [184] in der mRNS-Position –315 bis +75 des CD21-Gens lokalisiert wurde, erschien der SNP rs3813946 interessant im Hinblick auf einen möglichen Einfluss in der CD21-Promoterregion.

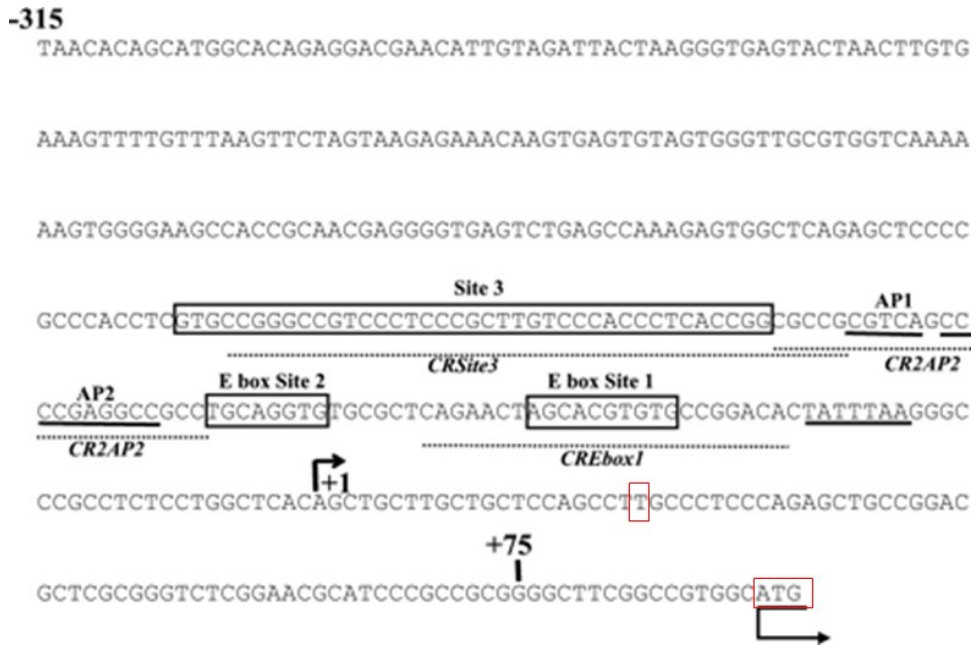


Abbildung 26 Promotersequenz des CD21-Rezeptorgens in der DNS-Position –315 (Intron) bis DNS-Position +75 (Exon). Zur Orientierung wurden das Startcodon und der SNP rs3813946 rot markiert, in Anlehnung an Ulgiati [121].

Hinsichtlich der mRNS-Sequenz stimmen die Angaben von Ulgiati bis dato nicht mehr mit der NCBI- und Ensembl-Referenzsequenz [163] des CD21-Rezeptorgens überein, denn die mRNS-Sequenz beginnt in beiden Internetdatenbanken bereits an der DNS-Position -318 mit CAC.

Die Allel- und Genotypfrequenzen des SNP rs3813946 sind in der Tabelle 19 dargestellt. Das MS-Kollektiv zeigte bezüglich des SNP rs3813946 eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,84 (T) zu 0,16 (C) und eine Genotypverteilung von 0,69 (T/T), 0,31 (T/C) und 0,0 (C/C). Die Kontrollgruppe wies eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,81 (T) zu 0,19 (C) und eine Genotypverteilung von 0,69 (T/T), 0,25 (T/C) und 0,06 (C/C) auf.

Im Vergleich der MS-Patienten zu den Kontrollpersonen unterschieden sich weder die vorhandenen Allelverteilungen mit einem p-Wert von p = 1,0 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test noch die Genotypverteilungen mit einem p-Wert von p = 1,0 im Cochran-Armitage-Trend-Test signifikant voneinander.

Die in der europäischen Bevölkerung detektierte Genotypfrequenz liegt bei 0,62 (T/T), 0,37 (T/C) und 0,01 (C/C), die Allelfrequenz bei 0,8 für Thymin und 0,2 für Cytosin (ss7861069, HapMap-CEU [183]).

Tabelle 19 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs3813946.

rs3813946					
	T	C	T/T	T/C	C/C
MS-Patienten	27	5	11	5	0
relative Häufigkeit	*0,84*	*0,16*	*0,69*	*0,31*	*0,00*
Kontrollpersonen	26	6	11	4	1
relative Häufigkeit	*0,81*	*0,19*	*0,69*	*0,25*	*0,06*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,83*	*0,17*	*0,69*	*0,28*	*0,03*
europäische Bevölkerung	135	33	52	31	1
relative Häufigkeit	*0,80*	*0,20*	*0,62*	*0,37*	*0,01*

Die Frequenzergebnisse der sequenzierten Kontrollpersonen unterschieden sich bezüglich der Allelverteilung mit einem p-Wert von p = 1,0 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test sowie bezüglich der Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 1,0 im Cochran-Armitage-Trend-Test nicht signifikant von der europäischen Bevölkerung. Insgesamt wurde auch kein signifikanter Verteilungsunterschied der europäischen Bevölkerung zu den MS-Patienten bezüglich der Allelverteilung mit einem p-Wert von p = 0,8061 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test und bezüglich der Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 0,606 im Cochran-Armitage-Trend-Test festgestellt.

Andere SNPs in der Promoterregion und der Sequenz von Exon 1 des CD21-Rezeptorgens wurden im Rahmen dieser Sequenzierung nicht gefunden.

5.1.1.2 SNP rs1048971

Der Polymorphismus rs1048971 tritt mit einem Basenaustausch von Guanin (wt) zu Adenin (mt) in der 3. Codonposition an der Aminosäureposition 592 (L → L) in der Sequenz von Exon 10 des CD21-Gens auf.

Die homozygote Expression (A/A) des Mutant-Allels rs1048971 zeigte sich, wie in Tabelle 20 dargestellt, in der DNS-Sequenz von einem MS-Patienten und einer Kontrollperson. Zusätzlich konnte auch die heterozygote Expression (G/A) des SNP rs1048971 jeweils bei einer Kontrollperson und einem MS-Patienten nachgewiesen werden. Bei den anderen 6 MS-Patienten und 6 Kontrollpersonen lag die homozygote Expression des Wildtyp-Allels (G/G) vor. Dieses Ergebnis deutet an, dass die MS-Patienten und Kontrollpersonen sich bezüglich der Expression des SNP rs1048971 nicht unterscheiden.
Für den SNP rs1048971 zeigte sich damit in beiden Kollektiven eine identische Häufigkeit von 0,8125 für das Wildtyp-Allel (G) sowie 0,1875 für das Mutant-Allel (A). Die Genotypfrequenzen wurde in beiden Populationen mit 0,75 für den homozygoten Wildtyp (G/G), 0,125 für die heterozygote SNP-Expression (G/A) und 0,125 für den homozygoten Mutant (A/A) ermittelt.

In der europäischen Bevölkerung werden die Wildtyp-Allelfrequenz (G) mit 0,71 und die Mutant-Allelfrequenz (A) mit 0,29 angegeben. Die Frequenz des homozygoten Wildtyps (G/G) ist 0,49, die Frequenz der heterozygoten SNP-Expression (G/A) ist 0,44 und die Frequenz des homozygoten Mutant-Allels ist 0,07 (A/A). (ss43889106, HapMap-CEU [183])

Tabelle 20 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs1048971.

	rs1048971				
	G	A	G/G	G/A	A/A
MS-Patienten	13	3	6	1	1
relative Häufigkeit	*0,8125*	*0,1875*	*0,7500*	*0,1250*	*0,1250*
Kontrollpersonen	13	3	6	1	1
relative Häufigkeit	*0,8125*	*0,1875*	*0,7500*	*0,1250*	*0,1250*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,8125*	*0,1875*	*0,7500*	*0,1250*	*0,1250*
europäische Bevölkerung	128	52	44	40	6
relative Häufigkeit	*0,71*	*0,29*	*0,49*	*0,44*	*0,07*

Bei einem p-Wert von p = 0,5636 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test zeigte sich kein Unterschied zwischen der beobachteten Allelfrequenz und der Allelfrequenz in der europäischen Gesamtbevölkerung. Auch bezüglich der Genotypverteilungen trat mit einem p-Wert von p = 0,558 im Cochran-Armitage-Trend-Test kein signifikanter Unterschied auf.

5.1.1.3 SNP rs17615

Der Polymorphismus rs17615 tritt mit einem Basenaustausch von Guanin (wt) zu Adenin (mt) in der 2. Codonposition an der Aminosäureposition 693 (S → N) in der Sequenz von Exon 10 des CD21-Gens auf.

Die MS-Patienten zeigten dabei eine deutlich geringere Expression, sowohl der Mutant-Allelfrequenz (A) von 0,16 als auch des homozygoten Genotyps (A/A) mit einer Frequenz von 0,06 im Vergleich zur Kontrollpopulation, in der eine Mutant-Allelfrequenz (A) von 0,33 und eine homozygote Expression des SNP rs17615 (A/A) von 0,19 vorlag.

Tabelle 21 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17615.

	rs17615				
	G	A	G/G	G/A	A/A
MS-Patienten	27	5	12	3	1
relative Häufigkeit	*0,84*	*0,16*	*0,75*	*0,19*	*0,06*
Kontrollpersonen	16	16	5	6	5
relative Häufigkeit	*0,50*	*0,50*	*0,31*	*0,38*	*0,31*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,67*	*0,33*	*0,53*	*0,28*	*0,19*
europäische Bevölkerung	137	41	52	33	4
relative Häufigkeit	*0,77*	*0,23*	*0,58*	*0,37*	*0,04*

Dieser Unterschied konnte bezüglich der Allelverteilung des SNP rs17615 zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen bei einem p-Wert von p = 0,007 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test sowie bezüglich der Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 0,022 im Cochran-Armitage-Trend-Test signifikant nachgewiesen werden.

Um diese in Tabelle 21 dargestellte Beobachtung zu verifizieren, wurde nachfolgend die Allel- und Genotypverteilung des SNP rs17615 in einem Kollektiv von 278 MS-Patienten und 266 Kontrollpersonen mittels ARMS-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind im Abschnitt 5.1.3 dieser Arbeit zusammengefasst.

5.1.1.4 SNP rs4308977

Der Polymorphismus rs4308977 tritt mit einem Basenaustausch von Thymin (wt) zu Cytosin (mt) in der 1. Codonposition an der Aminosäureposition 663 (S → P) in der Sequenz von Exon 11 des CD21-Gens auf.

Das MS-Kollektiv zeigte eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,78 (T) zu 0,22 (C) und eine Genotypverteilung von 0,63 (T/T), 0,31 (T/C) und 0,06 (C/C). Die Kontrollgruppe wies eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,66 (T) zu 0,34 (C) und eine Genotypverteilung von 0,50 (T/T), 0,31 (T/C) und 0,19 (C/C) auf. Die Allel- und Genotypverteilungen sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs4308977.

	rs4308977				
	T	C	T/T	T/C	C/C
MS-Patienten	25	7	10	5	1
relative Häufigkeit	*0,78*	*0,22*	*0,63*	*0,31*	*0,06*
Kontrollpersonen	21	11	8	5	3
relative Häufigkeit	*0,66*	*0,34*	*0,50*	*0,31*	*0,19*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,72*	*0,28*	*0,56*	*0,31*	*0,13*
europäische Bevölkerung	138	42	52	34	4
relative Häufigkeit	*0,77*	*0,23*	*0,58*	*0,38*	*0,04*

Im Vergleich der MS-Patienten zu den Kontrollpersonen unterschieden sich weder die Verteilung der vorhandenen Allelfrequenzen mit einem p-Wert von p = 0,4048 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test noch die Genotypverteilungen mit einem p-Wert von p = 0,462 im Cochran-Armitage-Trend-Test signifikant voneinander.

Die in der europäischen Bevölkerung detektierten Genotypfrequenzen sind 0,58 (T/T), 0,38 (T/C) und 0,04 (C/C), die Allelfrequenzen sind 0,77 für Thymin und 0,23 für Cytosin (ss7861069, HapMap-CEU [183]). Diese Daten zeigten bezüglich der Allelverteilung mit einem p-Wert von p = 0,1897 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test und bezüglich der Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 0,274 im Cochran-Armitage-Trend-Test keinen signifikanten Unterschied zu den sequenzierten Kontrollpersonen. Insgesamt wurde auch kein Unterschied der Allelverteilungen mit einem p-Wert von p = 1 im zweiseitigen Fisher-Exact-

Test und kein Unterschied der Genotypverteilungen mit einem p-Wert von p = 1,0 im Cochran-Armitage-Trend-Test zwischen den MS-Patienten und dem SNP-Äquilibrium in der europäischen Bevölkerung nachgewiesen.

5.1.1.5 SNP rs17616

In der DNS-Sequenz von Exon 11 des CD21-Gens trat ein Polymorphismus mit einem Basenaustausch von Guanin (wt) zu Adenin (mt) in der 2. Codonposition an der Aminosäureposition 671 (R → H) auf. Dieser war zunächst nicht in den Internet-Datenbanken publiziert, ist aber bei Fertigstellung der Arbeit als SNP rs17616 bekannt.

Das MS-Kollektiv zeigte, wie in Tabelle 23 abgebildet, eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,78 (G) zu 0,22 (A) und eine Genotypverteilung von 0,63 (G/G), 0,31 (G/A) und 0,06 (A/A). Die Kontrollpersonengruppe wies eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,66 (G) zu 0,34 (A) und eine Genotypverteilung von 0,50 (G/G), 0,31 (G/A) und 0,19 (A/A) auf. Im Vergleich der MS-Patienten zu den Kontrollpersonen unterschieden sich weder die vorhandenen Allelverteilungen mit einem p-Wert im zweiseitigen Fisher-Exact-Test von p = 0,405 noch die Genotypverteilungen mit einem p-Wert von p = 0,462 im Cochran-Armitage-Trend-Test statistisch signifikant voneinander. Die Allel- und Genotypverteilungen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Die in der europäischen Bevölkerung detektierten Frequenzen der Genotypen liegen bei 0,59 (G/G), 0,36 (G/A) und 0,05 (A/A) und die Allelfrequenzen bei 0,77 für Guanin und bei 0,23 für Adenin (ss7861068, HapMap-CEU [183]).

Tabelle 23 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17616.

	rs17616				
	G	A	G/G	G/A	A/A
MS-Patienten	25	7	10	5	1
relative Häufigkeit	*0,78*	*0,22*	*0,63*	*0,31*	*0,06*
Kontrollpersonen	21	11	8	5	3
relative Häufigkeit	*0,66*	*0,34*	*0,50*	*0,31*	*0,19*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,72*	*0,28*	*0,56*	*0,31*	*0,13*
europäische Bevölkerung	136	40	52	32	4
relative Häufigkeit	*0,77*	*0,23*	*0,59*	*0,36*	*0,05*

Damit unterschieden sich die Verteilung der Allelfrequenzen in der europäischen Bevölkerung bei einem p-Wert von p = 1 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test nicht von der Allelverteilung in der MS-Population. Auch die Genotypverteilung in der europäischen Bevölkerung wies mit einem p-Wert von p = 1 im Cochran-Armitage-Trend-Test zu denen in der MS-Population keinen signifikanten Unterschied auf. Das Gleiche gilt auch für die Kontrollpopulation mit einem p-Wert von p = 0,1814 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test bezüglich des Vergleichs der Allelverteilungen und einem p-Wert von p = 0,1913 im Cochran-Armitage-Trend-Test bezüglich des Vergleichs der Genotypverteilungen.

5.1.1.6 SNP rs1143665

Der Polymorphismus rs1143665 tritt mit einem Basenaustausch von Cytosin (wt) zu Thymin (mt) in der 3. Codonposition an der Aminosäureposition 883 (G → G) in der Sequenz von Exon 14 des CD21-Gens auf.
In keiner der sequenzierten DNS-Proben von den MS-Patienten und den Kontrollpersonen konnte das Auftreten des heterozygoten Genotyps (C/T) oder der homozygoten Mutant-Form (T/T) des SNP rs1143665 bestätigt werden. Damit lag zu 100 % eine homozygote Wildtyp-Expression (C/C) in beiden Populationen vor. Zusammenfassend wurde weder das Auftreten des SNP rs1143665 noch für eine andere Basenposition des Exons 14 ein Unterschied zwischen den MS-Patienten und den Kontrollpersonen beobachtet.
Die Frequenz von 1,0 für das Cytosin-Allel und für die Expression des homozygoten Wildtyps (C/C) des SNP rs1143665 entsprach der Frequenz in der europäischen Bevölkerung (ss48420082, HapMap-CEU [183]).

5.1.1.7 SNP rs17258982

Der Polymorphismus rs17258982 tritt mit einem Basenaustausch von Adenin (wt) zu Guanin (mt) in der 1. Codonposition an der Aminosäureposition 1052 (I → V) in der Sequenz von Exon 18 des CD21-Gens auf.

Das MS-Kollektiv zeigte eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,81 (A) zu 0,19 (G) und eine Genotypverteilung von 0,63 (A/A), 0,38 (A/G) und 0 (G/G).
Die Kontrollgruppe wies eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,94 (A) zu 0,06 (G) und eine Genotypverteilung von 0,88 (A/A), 0,13 (A/G) und 0 (G/G) auf. Die Allel- und Genotypverteilungen sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17258982.

rs17258982					
	A	G	A/A	A/G	G/G
MS-Patienten	13	3	5	3	0
relative Häufigkeit	*0,81*	*0,19*	*0,63*	*0,38*	*0,00*
Kontrollpersonen	15	1	7	1	0
relative Häufigkeit	*0,94*	*0,06*	*0,88*	*0,13*	*0,00*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,88*	*0,13*	*0,75*	*0,25*	*0,00*
europäische Bevölkerung	157	17	70	17	0
relative Häufigkeit	*0,90*	*0,10*	*0,80*	*0,20*	*0,00*

Im Vergleich der MS-Patienten zu den Kontrollpersonen unterschieden sich weder die vorhandenen Allelverteilungen mit einem p-Wert von p = 0,5996 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test noch die Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 1 im Cochran-Armitage-Trend-Test signifikant voneinander.

Die in der europäischen Bevölkerung detektierten Frequenzen der Genotypen liegen bei 0,8 (A/A), 0,2 (A/G) und 0 (G/G) und die Allelfrequenzen bei 0,9 für Adenin und 0,1 für Guanin (ss48420080, HapMap-CEU [183]).
Die Allelverteilung in der europäischen Bevölkerung zeigte weder zu der Allelverteilung bei den MS-Patienten mit einem p-Wert von p = 0,384 noch zu der Allelverteilung der sequenzierten Kontrollpersonen mit einem p-Wert von p = 1,0 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test einen signifikanten Unterschied. Auch bezüglich der Genotypverteilung wurde mit einem p-Wert von p = 0,359 im Vergleich zu den MS-Patienten beziehungsweise mit einem p-Wert von p = 0,702 im Vergleich zu den Kontrollpersonen kein signifikanter Unterschied im Cochran-Armitage-Trend-Test festgestellt.

5.1.1.8 SNP rs6540433

Der Polymorphismus rs6540433 tritt mit einem Basenaustausch von Adenin (wt) zu Cytosin (mt) in der 2. Codonposition an der Aminosäureposition 1062 (E → A) in der Sequenz von Exon 18 des CD21-Gens auf.
Das MS-Kollektiv zeigte eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,56 (A) zu 0,44 (C) und eine Genotypverteilung von 0,38 (A/A), 0,38 (A/C) und 0,25 (C/C). Die Kontrollpersonengruppe

wies eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,84 (A) zu 0,16 (C) und eine Genotypverteilung von 0,69 (A/A), 0,31 (A/C) und 0 (C/C) auf. Die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs6540433.

	rs6540433				
	A	C	A/A	A/C	C/C
MS-Patienten	18	14	6	6	4
relative Häufigkeit	*0,56*	*0,44*	*0,38*	*0,38*	*0,25*
Kontrollpersonen	27	5	11	5	0
relative Häufigkeit	*0,84*	*0,16*	*0,69*	*0,31*	*0,00*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,70*	*0,30*	*0,53*	*0,34*	*0,13*
europäische Bevölkerung	142	38	55	32	3
relative Häufigkeit	*0,79*	*0,21*	*0,61*	*0,36*	*0,03*

Der Vergleich der Allelverteilung des SNP rs6540433 in der MS-Population mit der Kontrollpopulation war bei einem p-Wert von p = 0,0272 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test signifikant, der Unterschied in der Genotypverteilung im MS- und Kontroll-Kollektiv war mit einem p-Wert von p = 0,043 im Cochran-Armitage-Trend-Test ebenfalls signifikant.

Aufgrund dieses gefundenen Verteilungsunterschieds zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen wurden die Allelfrequenzen des SNP rs6540433 in einem großen Kollektiv aus 469 MS-Patienten und 266 Kontrollpersonen untersucht. Die Ergebnisse sind im Abschnitt 5.1.4 dieser Arbeit zusammengefasst.

5.1.1.9 SNP rs9429940

Der Polymorphismus rs9429940 tritt mit einem Basenaustausch von Cytosin (wt) zu Thymin (mt) in der 3'-untranslatierten Sequenz von Exon 20 des CD21-Gens auf.

Das MS-Kollektiv zeigte eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,94 (C) zu 0,06 (T) und eine Genotypverteilung von 0,88 (C/C), 0,13 (C/T) und 0 (T/T). Die Kontrollpersonengruppe wies eine Verteilung der Allelfrequenz von 0,81 (C) zu 0,19 (T) und eine Genotypverteilung von 0,63 (C/C), 0,38 (C/T) und 0 (T/T) auf. Bei einem p-Wert von p = 1 im zweiseitigen Fisher-

Exact-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Allelverteilung der MS-Patienten und der Allelverteilung der Kontrollpersonen festgestellt werden. Auch die Genotypverteilungen unterschieden sich zwischen den MS-Patienten und der Kontrollpopulation mit einem p-Wert von p = 0,5692 im Cochran-Armitage-Trend-Test nicht signifikant voneinander. Die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs9429940.

	rs9429940				
	C	T	C/C	C/T	T/T
MS-Patienten	15	1	7	1	0
relative Häufigkeit	*0,94*	*0,06*	*0,88*	*0,13*	*0,00*
Kontrollpersonen	13	3	5	3	0
relative Häufigkeit	*0,81*	*0,19*	*0,63*	*0,38*	*0,00*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,88*	*0,13*	*0,75*	*0,25*	*0,00*
europäische Bevölkerung	147	33	59	29	2
relative Häufigkeit	*0,82*	*0,18*	*0,66*	*0,32*	*0,02*

Die in der europäischen Bevölkerung detektierten Frequenzen der Genotypen lagen bei 0,66 (C/C), 0,32 (C/T) und 0,02 (T/T) und der Allele bei 0,82 für Cytosin und 0,18 für Thymin (ss41298881, HapMap-CEU [183]).

Weder die MS-Patienten mit einem p-Wert von p = 0,3148 noch die Kontrollpersonen mit einem p-Wert von p = 1 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test wiesen einen signifikanten Unterschied bezüglich der Allelverteilung des SNP rs9429940 auf. Der Vergleich der Genotypverteilungen mit einem p-Wert von p = 0,2982 bei den MS-Patienten und mit einem p-Wert von p = 1 bei den sequenzierten Kontrollpersonen im Cochran-Armitage-Trend-Test ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu der Genotypverteilung in der europäischen Bevölkerung.

5.1.2 Korrelation der SNPs rs17616 und rs4308977

Da sich in den 16 zunächst sequenzierten DNS-Proben von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen ausschließlich ein Zusammentreffen der Mutant-Allele der SNPs rs17616

und rs4308977 zeigte, wurden weitere DNS-Proben von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sequenziert.

Tabelle 27 Absolute und relative Häufigkeiten des verbundenen Auftretens von SNP rs17616 und SNP rs4308977 auf Exon 11 dargestellt für das sequenzierte Gesamtkollektiv.

Exon 11			
	wt	wt / mt	mt
SNP rs17616	18	10	4
relative Häufigkeit	*0,56*	*0,31*	*0,13*
SNP rs4308977	18	10	4
relative Häufigkeit	*0,56*	*0,31*	*0,13*
beide SNPs	18	10	4
relative Häufigkeit	*0,56*	*0,31*	*0,13*

Es wurde in 4 von insgesamt 32 DNS-Sequenzen beobachtet, dass die homozygote Mutant-Allelform (C/C) des SNP rs4308977 jeweils gemeinsam mit der homozygoten Mutant-Allelform (A/A) des SNP rs17616 auftrat. Zudem wurde in 10 von insgesamt 32 Sequenzen das Auftreten des heterozygoten Genotyps (T/C) des SNP rs4308977 ausschließlich gemeinsam mit dem Auftreten des heterozygoten Genotyps (G/A) des SNP rs17616 detektiert. In den übrigen 18 Sequenzen lag in beiden Fällen der homozygote Wildtyp des jeweiligen SNP vor. Die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung sind in Tabelle 27 dargestellt.

Zusammenfassend ergibt sich daraus in 32 untersuchten DNS-Sequenzen ausnahmslos ein gemeinsames Auftreten der beschriebenen beiden Polymorphismen des Exons 11. Daher scheint es wahrscheinlich, dass der SNP rs4308977 und der SNP rs17616 auf Exon 11 miteinander verbunden sind.

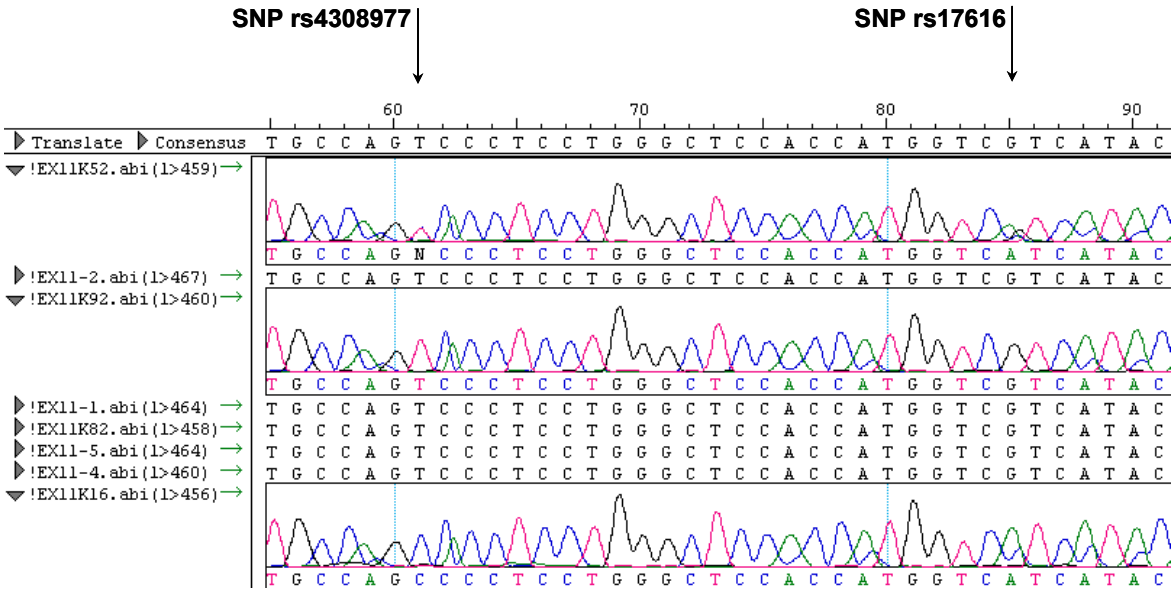


Abbildung 27 Darstellung des abhängigen Auftretens des SNP rs4308977 und des SNP rs17616 in einer SeqMan-Detailansicht des sequenzierten DNS-Kollektivs.

Die Beschreibung des abhängigen Auftretens von SNP rs4308977 und SNP rs17616 konnte in keiner der Datenbanken gefunden werden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sind weitere Experimente in unabhängigen Kollektiven notwendig.

Die in Abbildung 27 dargestellte Beobachtung des ausschließlich gemeinsamen Auftretens beider SNPs – sowohl in der Gruppe der MS-Patienten, als auch im Kontroll-Kollektiv – zeigt, dass ein Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin in Position 663 des CD21-Rezeptorproteins mit einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin in Position 671 verbunden ist. Das heißt, die CD21-Rezeptorstruktur ändert sich scheinbar nur in Abhängigkeit des gemeinsamen Einflusses von Serin und Arginin oder Prolin und Histidin auf die CD21-Rezeptorkonformation. Durch die nahezu identische Allelverteilung beider SNPs im MS- und Kontroll-Kollektiv scheint diese komplexe Veränderung der CD21-Rezeptorstruktur jedoch nicht MS-spezifisch zu sein.

5.1.3 Frequenzanalyse des SNP rs17615 im großen MS- und Kontroll-Kollektiv

In Abschnitt 5.1.1.3 wurde für das Auftreten des SNP rs17615 gezeigt, dass ein signifikanter Unterschied bezüglich der Allelverteilung zwischen 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen bei einem p-Wert von p = 0,007 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test sowie bezüglich der Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 0,022 im Cochran-Armitage-Trend-Test bestand. Die MS-Patienten zeigten dabei eine deutlich geringere Frequenz sowohl des Mutant-Allels (A) von 0,16 als auch des homozygoten Genotyps (A/A) von 0,06 im

Vergleich zu den Kontrollpersonen, bei denen eine Mutant-Allelfrequenz (A) von 0,33 und eine Frequenz des homozygoten Genotyps (A/A) des SNP rs17615 von 0,19 vorlag.

Es wurden daher die Allel- und Genotypverteilungen des SNP rs17615 in einem Kollektiv bestehend aus 278 MS-Patienten und aus 266 Kontrollpersonen untersucht. Die Bestimmung der vorliegenden Genotypform erfolgte, wie in Abbildung 28 gezeigt, mittels ARMS-PCR. Mit jeder DNS-Probe wurden zwei unabhängige Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. In der einen PCR wurde ein *reverse* Primer verwendet, der am 3'-Ende die zur Wildtyp-Allelform G des SNP rs 17615 komplementäre Base Cytosin trägt. In der zweiten PCR entsprach das 3'-Nukleotid des *reverse*-Primers der zur Mutant-Allelform A des SNP rs17615 komplementären Base Thymin. Eine Amplifikation der DNS-Sequenz erfolgte bei heterozygoter Expression in der für die Allelform jeweils spezifischen PCR und bei Expression beider Allelformen des SNP rs17615 in beiden Polymerase-Kettenreaktionen.

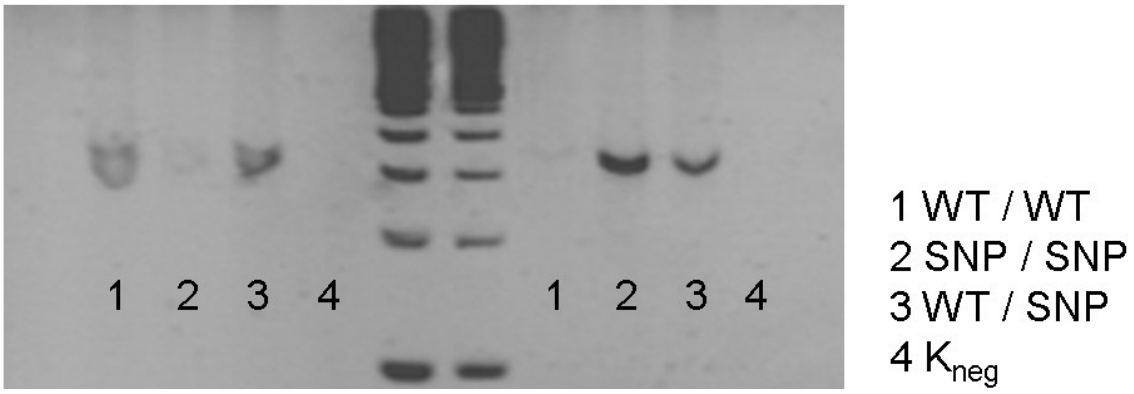


Abbildung 28 Elektrophoretische Auftrennung der ARMS-PCR-Produkte von jeweils drei DNS-Proben unterschiedlicher Genotypen des wt-PCR-Ansatzes (links) und des mt-PCR-Ansatzes (rechts).

Die Abbildung 28 zeigt die auf einem Agarose-Gel aufgetragenen ARMS-PCR-Produkte von jeweils drei DNS-Proben unterschiedlicher Genotypen. Durch zwei 100 Bp DNS-Leitern getrennt sind im linken Bereich der Abbildung die Amplifikate der DNS-Proben nach PCR mit dem *wildtype reverse* Primer und im rechten Bereich der Abbildung die Amplifikate der gleichen DNS-Proben nach PCR mit dem *mutant reverse* Primer dargestellt. Die DNS-Probe 1 wurde nur in der Wildtyp-PCR amplifiziert und trägt folglich die homozygote Wildtyp-Allelform des SNP rs17615. Die DNS-Probe 2 wurde im Gegensatz dazu nur in der Mutant-PCR amplifiziert und trägt entsprechend homozygot das Mutant-Allel des SNP rs17615. In der DNS-Probe 3 sind beide Allelformen vorhanden, da sie in beiden PCRs amplifiziert

werden konnte. Die Nummer 4 kennzeichnet die Negativ-Kontrolle, als den jeweiligen PCR-Reaktionsansatz ohne zugegebene DNS-Probe.
Die in der ARMS-PCR ermittelte Allelverteilung des SNP rs17615 wies im großen Kollektiv mit einem p-Wert von p = 0,077 ($p_{adj.}$ = 1,0) im zweiseitigen Fisher-Exact-Test bei einer Wildtyp-Allelfrequenz (G) von 0,71 und einer Mutant-Allelfrequenz (A) von 0,29 in der Gruppe der MS-Patienten sowie einer Wildtyp-Allelfrequenz (G) von 0,66 und einer Mutant-Allelfrequenz (A) von 0,34 in der Gruppe der Kontrollpersonen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Populationen auf.

Bei einem beobachteten Verteilungsmuster der Genotypen von 0,55 (G/G), 0,33 (G/A) und 0,12 (A/A) bei den MS-Patienten sowie von 0,47 (G/G), 0,38 (G/A) und 0,15 (A/A) bei den Kontrollpersonen unterschieden sich die Genotypverteilungen bezüglich des SNP rs17615 zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen mit einem p-Wert von p = 0,104 ($p_{adj.}$ = 1,0) im Cochran-Armitage-Trend-Test nicht. Die Ergebnisse der Allel- und Genotypverteilung sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17615 im großen Kollektiv.

	rs17615				
	G	A	G/G	G/A	A/A
MS-Patienten	396	160	152	92	34
relative Häufigkeit	*0,71*	*0,29*	*0,55*	*0,33*	*0,12*
Kontrollpersonen	352	180	126	100	40
relative Häufigkeit	*0,66*	*0,34*	*0,47*	*0,38*	*0,15*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,69*	*0,31*	*0,51*	*0,35*	*0,14*
europäische Bevölkerung	137	41	52	33	4
relative Häufigkeit	*0,77*	*0,23*	*0,58*	*0,37*	*0,04*

Zur statistischen Analyse wurden gemäß der Testtheorie die Ergebnisse als absolute Zahlen aus Tabelle 28 verwendet, die graphische Darstellung in Abbildung 29 erfolgte mit den relativen Häufigkeiten (h_n) der Ergebnisse.

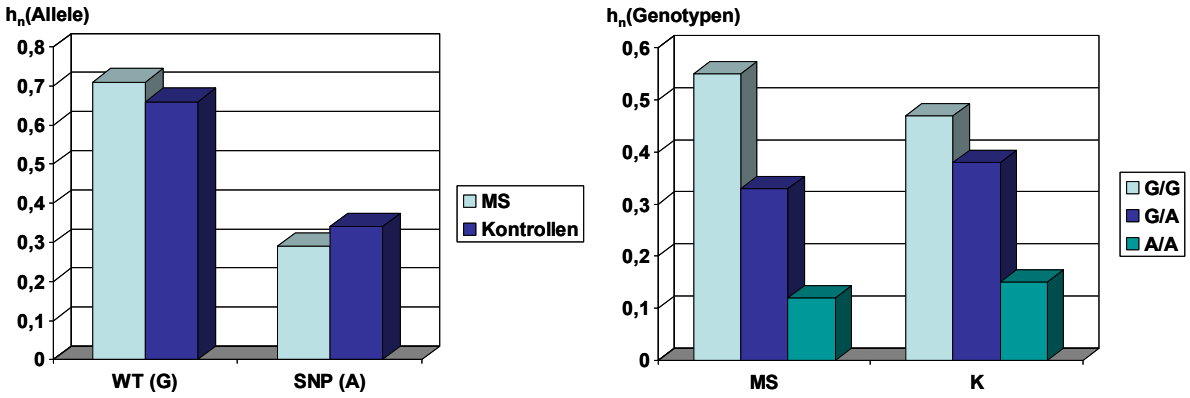


Abbildung 29 Vergleich der relativen Allel-Häufigkeit (links) und der relativen Genotyp-Häufigkeit (rechts) des SNP rs17615 zwischen MS-Patienten (MS) und Kontrollpersonen (K) im großen Kollektiv.

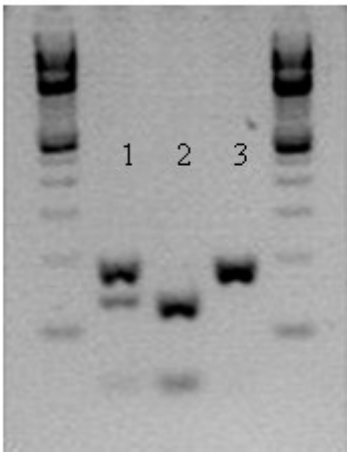
Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass auch der durch die Existenz des SNP rs17615 eintretende Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin in der Aminosäuresequenz des CD21-Rezeptorproteins bei MS-Patienten und Kontrollpersonen nicht unterschiedlich häufig auftritt.

In der europäischen Bevölkerung wurde eine Frequenz der Genotypverteilung von 0,58 (G/G), 0,37 (G/A) und 0,04 (A/A) sowie eine Allelfrequenz von 0,77 für Guanin zu 0,23 für Adenin detektiert (ss48420083, HapMap-CEU [183]). Die Verteilung der Allelfrequenzen unterschied sich bei einem p-Wert von p = 0,148 ($p_{adj.}$ = 1,0) im zweiseitigen Fisher-Exact-Test nicht signifikant von der Verteilung der Allelfrequenzen in dem erweiterten MS-Kollektiv. Auch die Genotypverteilung in der europäischen Bevölkerung wies mit einem p-Wert von p = 0,177 ($p_{adj.}$ = 1,0) im Cochran-Armitage-Trend-Test zu der in der MS-Population keinen signifikanten Unterschied auf. Für die Kontrollpersonen zeigte sich bezüglich des Vergleichs der Allelverteilung des SNP rs17615 mit einem p-Wert von p = 0,134 ($p_{adj.}$ = 1,0) im zweiseitigen Fisher-Exact-Test und bezüglich des Vergleichs der Genotypverteilung des SNP rs17615 mit einem p-Wert von p = 0,680 ($p_{adj.}$ = 1,0) im Cochran-Armitage-Trend-Test kein signifikanter Unterschied zu der europäischen Bevölkerung.

5.1.4 Frequenzanalyse des SNP rs6540433 im großen MS- und Kontroll-Kollektiv

Im Abschnitt 5.1.1.8 wurde für das Auftreten des SNP rs6540433 gezeigt, dass ein signifikanter Unterschied bezüglich der Allelverteilung zwischen 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen bei einem p-Wert von p = 0,027 im zweiseitigen Fisher-Exact-Test sowie bezüglich der Genotypverteilung mit einem p-Wert von p = 0,043 im Cochran-Armitage-Trend-Test auftrat.

Es wurden deshalb im Folgenden die Allel- und Genotypfrequenzen des SNP rs6540433 in in einem Kollektiv von 469 MS-Patienten und 266 Kontrollpersonen untersucht. Die Bestimmung der vorliegenden Genotypform erfolgte mittels RFLP-PCR.



	Restriktionsprodukte	Allele	DNS-Fragmente [Bp]		
1	heterozygot wt / mt	C / A	188	141	47
2	homozygot wt / wt	A / A		141	47
3	homozygot mt / mt	C / C	188		

Abbildung 30 Gelektrophoretische Auftrennung der RFLP-PCR-Produkte zur Bestimmung der vorliegenden Genotypform des SNP rs6540433.

Die Abbildung 30 zeigt die Restriktionsprodukte von drei DNS-Proben unterschiedlicher Genotypen. Im linken Bereich des Agarose-Gels ist eine DNS-Probe mit heterozygoter Allelform des SNP rs6540433 aufgetragen. Das Restriktionsprodukt besteht aus der ungespaltenen DNS-Sequenz von Exon 18 mit der Mutant-Allelform C des SNP rs6540433 sowie den gespaltenen DNS-Fragmenten aus der Wildtyp-Allelsequenz. Die DNS-Probe in der Mitte stellt eine homozygote Wildtyp-Allelform des SNP rs6540433 dar, da ausschließlich gespaltene DNS-Fragmente vorliegen. Im rechten Bereich des Agarose-Gels ist eine DNS-Probe mit homozygoter Mutant-Allelform des SNP rs6540433 aufgetragen. Die DNS-Sequenzen dieser Probe sind auch nach Restriktionsverdau in der ursprünglichen Basensequenzlänge von 188 Basen erhalten, da die Restriktionsendonuklease die Mutant-Allelform des SNP rs6540433 nicht erkennen und spalten konnte.

Zur statistischen Analyse wurden gemäß der Testtheorie als Ergebnisse die absoluten Zahlen aus Tabelle 29 verwendet, die graphische Darstellung erfolgte mit den relativen Häufigkeiten der Ergebnisse in der Abbildung 31.

Tabelle 29 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs6540433 im großen Kollektiv.

	rs6540433				
	A	C	A/A	A/C	C/C
MS-Patienten	762	176	301	160	8
relative Häufigkeit	*0,81*	*0,19*	*0,64*	*0,34*	*0,02*
Kontrollpersonen	431	101	173	85	8
relative Häufigkeit	*0,81*	*0,19*	*0,65*	*0,32*	*0,03*
relative Häufigkeit (gesamt)	*0,81*	*0,19*	*0,64*	*0,33*	*0,02*
europäische Bevölkerung	142	38	55	32	3
relative Häufigkeit	*0,79*	*0,21*	*0,61*	*0,36*	*0,03*

Der Vergleich der Allel- und Genotypverteilungen des SNP rs6540433 im großen Kollektiv ergab, dass sich die zuvor für die MS-Patienten und die Kontrollpersonen unterschiedlich detektierten Verteilungen einander stark annäherten.

Sowohl die Relation der in Abbildung 31 dargestellten Allelverteilungen in beiden Kollektiven mit einem p-Wert von $p = 0{,}945$ ($p_{adj.} = 1{,}0$) im zweiseitigen Fisher-Exact-Test als auch der dargestellte Vergleich der Genotypverteilungen mit einem p-Wert von $p = 0{,}942$ ($p_{adj.} = 1{,}0$) im Cochran-Armitage-Trend-Test zeigten, dass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des SNP rs6540433 zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen bestehen.

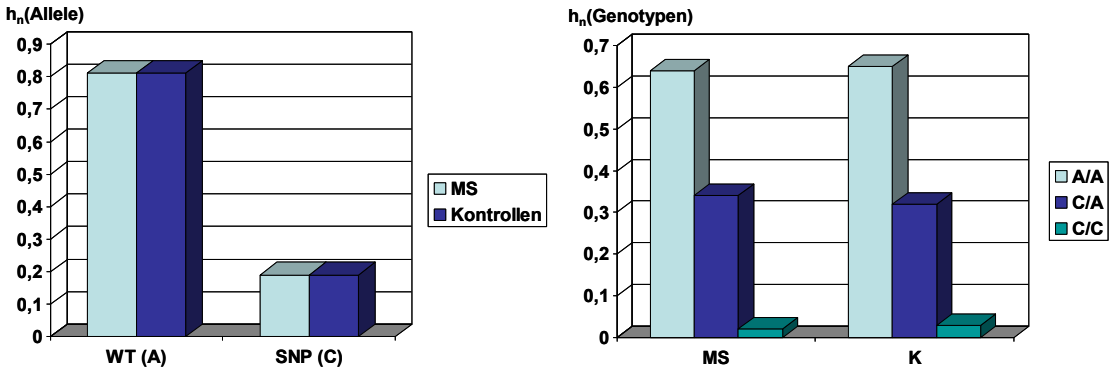


Abbildung 31 Vergleich der relativen Allel-Häufigkeit (links) und der relativen Genotyp-Häufigkeit (rechts) des SNP rs6540433 zwischen MS-Patienten (MS) und Kontrollpersonen (K) im großen Kollektiv.

In der europäischen Bevölkerung wurde eine Genotypverteilung von 0,61 (A/A), 0,36 (A/C) und 0,03 (C/C) sowie eine Allelfrequenz von 0,79 für Adenin zu 0,21 für Cytosin detektiert. Sowohl das große MS-Kollektiv mit einem p-Wert von p = 0,4697 ($p_{adj.}$ = 1,0) als auch das große Kontroll-Kollektiv mit einem p-Wert von p = 0,587 ($p_{adj.}$ = 1,0) zeigten im zweiseitigen Fisher-Exact-Test keinen signifikanten Unterschied zu der in der europäischen Bevölkerung detektierten Allelverteilung. Auch die Genotypverteilungen unterschieden sich im Vergleich der MS-Patienten mit einem p-Wert von p = 0,444 ($p_{adj.}$ = 1,0) und im Vergleich der Kontrollpersonen mit einem p-Wert von p = 0,578 ($p_{adj.}$ = 1,0) im Cochran-Armitage-Trend-Test nicht von der Genotypverteilung in der europäischen Bevölkerung.
Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der durch den SNP rs6540433 bedingte Aminosäureaustausch in Position 1062 des CD21-Rezeptorproteins von Glutamat zu Alanin bei den MS-Patienten und Konrollpersonen nicht signifikant unterschiedlich auftritt und nicht MS-spezifisch vorzukommen scheint.

5.1.5 Korrelation der SNPs rs17615 und rs6540433 zum HLA-DR15-Lokus

In unabhängigen genetischen Studien wird seit Langem, wie in Kapitel 2.1.3 erläutert, das HLA-Gen-Cluster als der DNS-Lokus mit der stärksten MS-Suszeptibilität beschrieben. Aufgrund dieser positiven Assoziation von HLA-DR15 zur Multiplen Sklerose wurden alle hinsichtlich HLA-DR15 stratifizierten MS-Patienten und Kontrollpersonen auf eine Korrelation zwischen HLA-DR15 und den gefundenen Allel- beziehungsweise Genotypverteilungen des SNP rs17615 und des SNP rs6540433 untersucht. Aufgrund der geringen Kollektivgröße wurden die Allel- beziehungsweise Genotypverteilungen der SNPs nicht hinsichtlich MS-Patienten und Kontrollpersonen stratifiziert.

Es konnten für den SNP rs17615 insgesamt 87 Datensätze ausgewertet werden, bestehend aus 48 MS-Patienten und 39 Kontrollpersonen. Die Tabelle 30 zeigt die Allel- beziehungsweise Genotypverteilungen des SNP rs17615 stratifiziert nach HLA-DR15.

Tabelle 30 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs17615 stratifiziert nach HLA-DR15.

rs17615 ~ HLA-DR15					
	G	A	G/G	G/A	A/A
HLA-DR15 (- / -)	65	47	25	15	16
relative Häufigkeit	*0,58*	*0,42*	*0,45*	*0,27*	*0,29*
HLA-DR15 (+ / -)	42	16	17	8	4
relative Häufigkeit	*0,72*	*0,28*	*0,59*	*0,28*	*0,14*
HLA-DR15 (+ / +)	4	0	2	0	0
relative Häufigkeit	*1,00*	*0,00*	*1,00*	*0,00*	*0,00*

Es wurde im zweiseitigen Fisher-Exact-Test keine signifikante Korrelation der Allel- beziehungsweise Genotypverteilung des SNP rs17615 mit dem vorliegenden HLA-DR15-Genotyp gefunden ($p = 0{,}062$; $p_{adj.} = 0{,}992$ beziehungsweise $p = 0{,}401$; $p_{adj.} = 1$). Zur statistischen Analyse wurden gemäß der Testtheorie die absoluten Zahlen verwendet, die graphische Darstellung der Ergebnisse in der Abbildung 32 erfolgte mit den relativen Häufigkeiten.

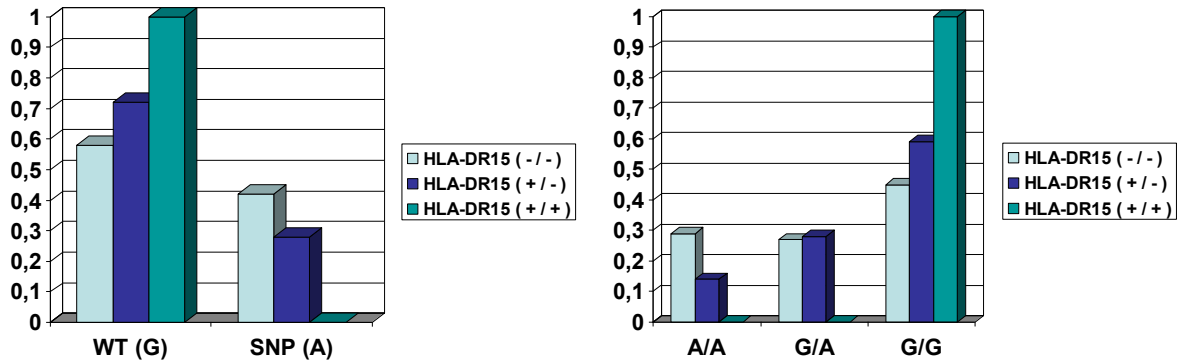


Abbildung 32 Vergleich der relativen Allel-Häufigkeit (links) und Genotyp-Häufigkeit (rechts) des SNP rs17615 stratifiziert nach HLA-DR15.

Es konnten für den SNP rs6540433 insgesamt 105 Datensätze ausgewertet werden, bestehend aus 66 MS-Patienten und 39 Kontrollpersonen.

Die Tabelle 31 zeigt die Allel- beziehungsweise Genotypfrequenzen des SNP rs6540433 stratifiziert nach HLA-DR15.

Tabelle 31 Absolute und relative Häufigkeiten des SNP rs6540433 stratifiziert nach HLA-DR15.

rs6540433 ~ HLA-DR15					
	C	A	C/C	C/A	A/A
HLA-DR15 (- / -)	21	89	1	19	35
relative Häufigkeit	*0,19*	*0,81*	*0,02*	*0,35*	*0,64*
HLA-DR15 (+ / -)	15	77	1	13	32
relative Häufigkeit	*0,16*	*0,84*	*0,02*	*0,28*	*0,70*
HLA-DR15 (+ / +)	2	6	0	2	2
relative Häufigkeit	*0,25*	*0,75*	*0,00*	*0,50*	*0,50*

Es wurde im zweiseitigen Fisher-Exact-Test keine signifikante Korrelation der Allel- beziehungsweise Genotypverteilungen des SNP rs6540433 mit dem vorliegenden HLA-DR15-Genotyp gefunden ($p = 0{,}688$; $p_{adj.} = 1$ beziehungsweise $p = 0{,}801$; $p_{adj.} = 1$).

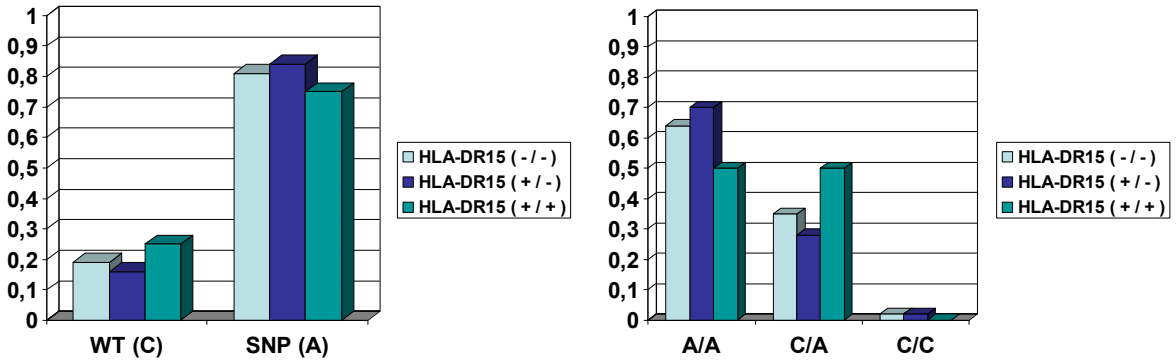


Abbildung 33 Vergleich der relativen Allel-Häufigkeit (links) und Genotyp-Häufigkeit (rechts) des SNP rs6540433 stratifiziert nach HLA-DR15.

Zur statistischen Analyse wurden gemäß der Testtheorie die absoluten Zahlen verwendet, die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 33 erfolgte mit den relativen Häufigkeiten.

5.1.6 Sequenzierung der Exone des CD21-Gens ohne bekannte SNPs bei 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen

Es wurden zusätzlich die Exone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17 und 19 des CD21-Rezeptorgens von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sequenziert, für die in der Internet-

Datenbank HapMap keine validierten SNPs publiziert waren. In diesen Abschnitten des CD21-Rezeptorgens konnte weder in den DNS-Sequenzen der 8 MS-Patienten noch in den DNS-Sequenzen der 8 Kontrollpersonen ein Polymorphismus nachgewiesen werden. Die DNS-Sequenzen dieser 14 Exone waren jeweils in allen 16 sequenzierten Proben identisch und entsprachen der Ensembl-Referenzsequenz des CD21-Rezeptorgens [163]. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der DNS-Sequenz der oben genannten Exone zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen erschien damit unwahrscheinlich.

5.2 Isoformen des CD21-Rezeptors

Es sind drei Isoformen des CD21-Rezeptors bekannt, die sich durch die Existenz der von den Exonen 9 und 11 codierten Aminosäuren unterscheiden.
Um festzustellen, ob die für alle drei Isoformen des CD21-Rezeptorproteins codierenden mRNS-Abschnitte bei MS-Patienten vorhanden sind, wurden mittels einer *exon spanning* PCR die entsprechenden mRNS-Sequenzen von 50 MS-Patienten auf das Vorhandensein der Sequenzen beider Exone untersucht.

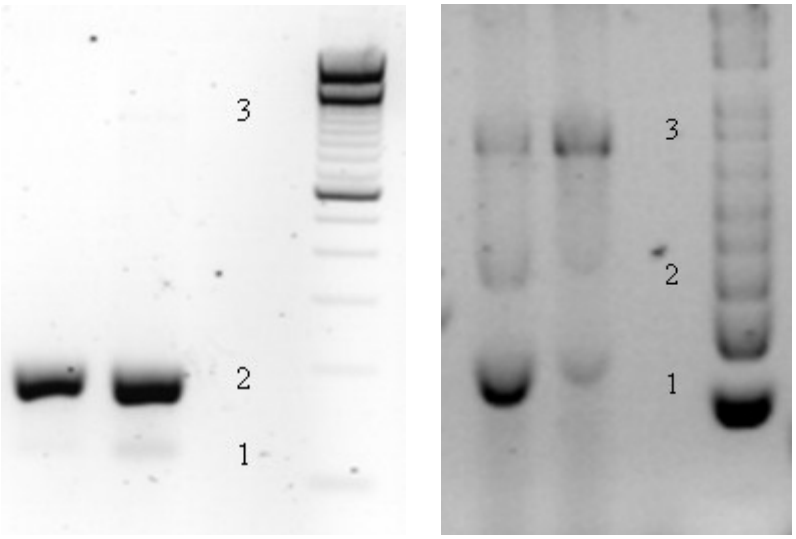


Abbildung 34 Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte zum Nachweis von Exon 9 (links): 1. Amplifikat ohne Exon 9 (119 Bp), 2. Amplifikat mit Exon 9 (196 Bp), 3. genomische DNS (1847 Bp) sowie von Exon 11 (rechts): 1. Amplifikat ohne Exon 11 (144 Bp), 2. Amplifikat mit Exon 11 (325 Bp), 3. genomische DNS (795 Bp).

Die Abbildung 34 zeigt die PCR-Produkte der *exon spanning* PCR von Exon 9 und Exon 11. Es sind zwei mRNS-Proben links neben einer Negativ-Kontrolle auf den Agarose-Gelen aufgetragen. Mit den Nummern 1 bis 3 sind die unterschiedlichen Basensequenzlängen gekennzeichnet. Bei einer Länge von 119 beziehungsweise 144 Basen kennzeichnet die Nummer 1 die amplifizierten mRNS-Sequenzen ohne die Sequenz von Exon 9 beziehungweise Exon 11. Die Nummer 2 stellt Amplifikate von mRNS-Sequenzen dar, die mit einer Länge von 196 beziehungsweise 325 Basen die Exonsequenzen von Exon 9 und Exon 11 enthalten. Die Nummer 3 kennzeichnet unvollständig entfernte DNS-Sequenzen von 1847 beziehungsweise 795 Basen in den verwendeten Proben.

Es konnte festgestellt werden, dass bei allen 50 untersuchten MS-Patienten mRNS-Sequenzen mit der Basensequenz von Exon 9 vorhanden waren. Dabei wurden bei 21 MS-Patienten nur mRNS-Sequenzen mit der Information von Exon 9 detektiert und bei 29 MS-Patienten lagen gleichzeitig beide mRNS-Sequenzen vor, das heißt mRNS-Sequenzen mit und mRNS-Sequenzen ohne die Information von Exon 9.

Des Weiteren konnten bei 26 MS-Patienten nur mRNS-Sequenzen mit der Information von Exon 11 detektiert werden. Das gleichzeitige Auftreten von mRNS-Sequenzen mit und ohne die Information von Exon 11 konnte bei 24 MS-Patienten nachgewiesen werden.

Diesen Versuchsergebnissen entsprechend hatten 16 MS-Patienten mRNS-Sequenzen aller drei Rezeptor-Isoformen, 14 MS-Patienten mRNS-Sequenzen der Rezeptor-Isoform ENST 00000358875, 12 MS-Patienten mRNS-Sequenzen der Rezeptor-Isoformen ENST 00000358875 und ENST 00000344994 und 7 MS-Patienten mRNS-Sequenzen der Rezeptor-Isoform ENST 00000324539. Die insgesamt am häufigsten vorkommende mRNS der Rezeptor-Isoform ENST 00000358875 (*long form*) enthält die Information aller 20 Exone des CD21-Rezeptorgens.

Diese in Abbildung 35 dargestellten Ergebnisse entsprechen dem für die europäische Bevölkerung beschriebenen Auftreten der CD21-Isoformen.

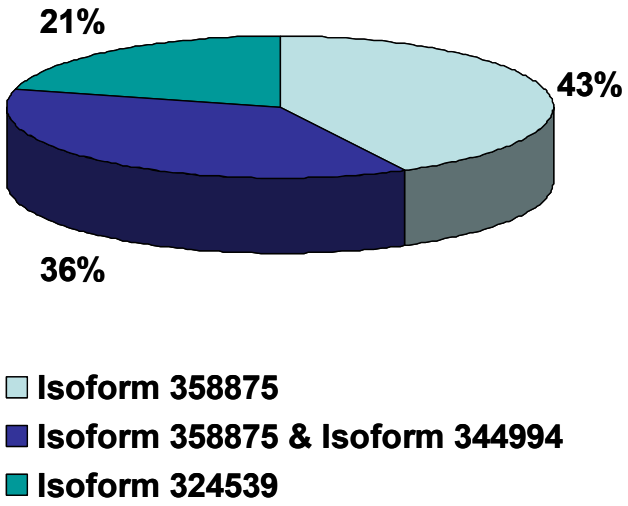


Abbildung 35 Prozentuale Verteilung der CD21-Isoform-Expression bei 50 MS-Patienten.

Das variabel beobachtete Auftreten von mRNS-Sequenzen verschiedener Isoformen in der MS-Population deutet darauf hin, dass potentiell alle Rezeptor-Isoformen bei MS-Patienten exprimiert werden und dass nicht der Expression einer einzelnen Rezeptor-Isoform eine MS-spezifische Rolle zuzukommen scheint.

5.3 Lösliches CD21-Protein

Die extrazelluläre Domäne des CD21-Rezeptorproteins wird in einem noch nicht genau charakterisierten enzymatischen Prozess von der Zelloberfläche abgetrennt. Das resultierende sCD21-Protein kann mittels Sandwich-ELISA im Serum nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten und Kontrollpersonen gemessen und verglichen. Gemäß der Theorie des Multiplen Testens sind die adjustierten p-Werte als $p_{adj.}$ separat angegeben.

5.3.1 sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten

Zunächst wurden die Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Proteins von 28 unbehandelten MS-Patienten gegenüber Kontrollpersonen untersucht. Die Kontrollpopulation bestand dabei aus 56 Patienten mit anderen nicht-inflammatorischen neurologischen Krankheiten (NIND) und 56 Patienten mit anderen inflammatorischen neurologischen Krankheiten (OIND).

Es zeigte sich, dass die sCD21-Serumkonzentrationen der unbehandelten MS-Patienten (n = 28) mit einer großen Verteilungsbreite zwischen 47 U/ml und 422 U/ml (Median = 109 U/ml) schwankten. Auch das Kontroll-Kollektiv (n = 112), bestehend aus Patienten mit OIND und Patienten mit NIND, wies eine große Verteilungsbreite der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 48 U/ml und 543 U/ml (Median = 142 U/ml) auf.

Im Vergleich der sCD21-Serumspiegel der unbehandelten MS-Patienten mit den sCD21-Serumspiegeln des Kontroll-Kollektivs zeigten sich, wie in Abbildung 36 dargestellt, vor Korrektur bezüglich des Multiplen Testens geringere sCD21-Serumkonzentrationen der MS-Patienten gegenüber den Kontrollpersonen (p = 0,0475; $p_{adj.}$ = 0,6175 im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test).

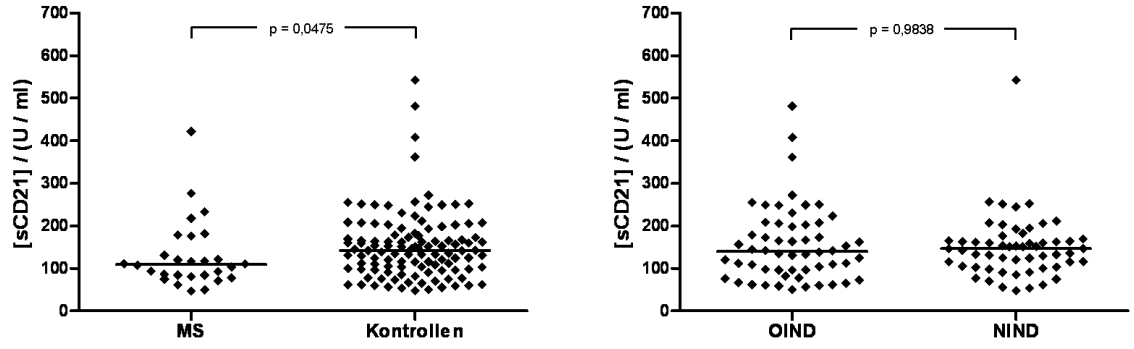


Abbildung 36 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 unbehandelten MS-Patienten und 112 Kontrollpersonen (links) und zwischen den Untergruppen des Kontroll-Kollektivs bestehend aus 56 OIND-Patienten und 56 NIND-Patienten (rechts).

Das Kontroll-Kollektiv wurde anschließend in die unterschiedlichen Gruppen der Patienten mit NIND und OIND aufgeteilt. Dabei wurden für die Patienten mit NIND (n = 56) sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 48 U/ml und 543 U/ml (Median = 147 U/ml) und für die Patienten mit OIND (n = 56) sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 50 U/ml und 482 U/ml (Median = 140 U/ml) gemessen. Im Vergleich unterschieden sich diese Teilpopulationen der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant voneinander ($p = 0{,}9838$; $p_{adj.} = 1$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test).
Die OIND-Kontrollpopulation bestand zu gleichen Anteilen aus Patienten mit viralen Enzephalitiden ($OIND_{viral}$; n = 28) und HIV-Patienten mit neurologischer Symptomatik ($OIND_{HIV}$; n = 28). Dabei schwankten die sCD21-Serumkonzentrationen der Patienten mit viralen Enzephalitiden zwischen 51 U/ml und 408 U/ml (Median = 123 U/ml) und die sCD21-Serumkonzentrationen der HIV-Patienten zwischen 61 U/ml und 482 U/ml (Median = 159 U/ml). Bei dem Vergleich dieser OIND-Untergruppen deutete sich vor Korrektur bezüglich des Multiplen Testens ein tendenzieller Unterschied zwischen HIV-Patienten und Patienten mit viralen Enzephalitiden an ($p = 0{,}1102$; $p_{adj.} = 1$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test). Innerhalb der NIND-Kontrollpopulation waren die einzelnen Untergruppen zu klein, um sie zu differenzieren.

Berücksichtigt man, wie in Abbildung 37 dargestellt, den Unterschied zwischen den Untergruppen des Kontroll-Kollektivs im Vergleich zu unbehandelten MS-Patienten, zeigte sich vor Korrektur bezüglich des Multiplen Testens ein signifikanter Unterschied der sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten zu HIV-Patienten ($p = 0{,}0287$; $p_{adj.} = 0{,}4879$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test) und zu NIND-Patienten ($p = 0{,}0391$; $p_{adj.} = 0{,}5865$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen unbehandelten MS-Patienten und Patienten mit viralen Enzephalitiden ($p = 0{,}6405$; $p_{adj.} = 1$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test).

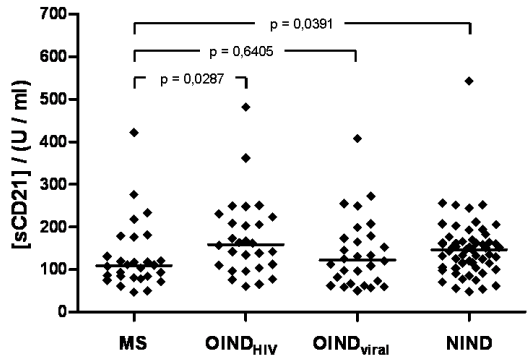


Abbildung 37 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 unbehandelten MS-Patienten mit den Teilgruppen der OIND-Patienten (bestehend aus 28 HIV-Patienten und 28 Patienten mit viralen Enzephalitiden) und der Gesamtgruppe der NIND-Patienten.

5.3.2 sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten unter IFN-beta-Therapie

Um einen möglichen Einfluss der Interferon-beta-Therapie, die bei MS-Patienten erfolgreich zur Reduktion der Krankheitsschübe eingesetzt wird, auf das sCD21-Serumprotein zu ermitteln, wurden die sCD21-Serumkonzentrationen der unbehandelten MS-Patienten denen von IFN-beta-behandelten Patienten gegenübergestellt.

Bei dem Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten ($MS_{n\text{-}IFN}$; n = 28) mit denen von MS-Patienten unter Interferon-beta-Therapie (MS_{IFN}; n = 28) fiel auf, dass die mit Interferon-beta behandelten Patienten eine geringere Verteilungsbreite der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 34 U/ml und 152 U/ml (Median = 53 U/ml) aufwiesen und die sCD21-Serumkonzentrationen dieser Gruppe, wie in Abbildung 38 dargestellt, statistisch signifikant ($p < 0{,}0001$; $p_{adj.} = 0{,}0027$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test) unter den sCD21-Serumkonzentrationen der MS-Patienten ohne IFN-beta-Therapie mit einer Verteilungsbreite zwischen 47 U/ml und 422 U/ml (Median = 109 U/ml) lagen. Beide Kollektive waren bei einer Gruppengröße von jeweils 28 Patienten nicht normalverteilt.

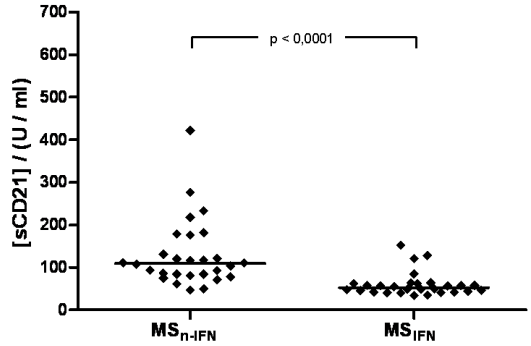


Abbildung 38 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 nicht IFN-beta-behandelten MS-Patienten ($MS_{n\text{-}IFN}$) mit 28 MS-Patienten unter IFN-beta-Therapie (MS_{IFN}).

Der in Abbildung 39 dargestellte Einzelvergleich der sCD21-Serumkonzentration von 8 MS-Patienten jeweils vor und während der IFN-beta-Therapie zeigte im Wilcoxon-Test (*matched-pairs signed-ranks*) statistisch signifikant (p = 0,0078) erniedrigte sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 40 U/ml und 152 U/ml (Median = 61 U/ml) unter IFN-beta-Therapie. Dieselben Patienten wiesen vor der IFN-beta-Therapie sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 50 U/ml und 213 U/ml (Median = 84 U/ml) auf. Es fand keine Adjustierung der p-Werte bezüglich des Multiplen Testens statt, da diese Hypothese an einem separaten Kollektiv gestestet wurde.

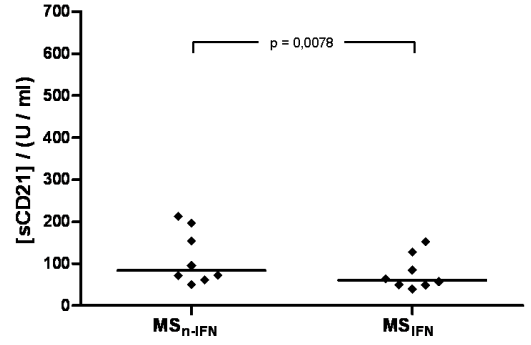


Abbildung 39 Einzelvergleich derselben 8 MS-Patienten vor und während der IFN-beta-Therapie.

Die sCD21-Serumkonzentrationen der mit Interferon-beta behandelten MS-Patienten unterschieden sich im Vergleich zur Kontrollpopulation, wie in Abbildung 40 gezeigt, zu allen Untergruppen statistisch signifikant ($p < 0,0001$; $p_{adj.} = 0,0027$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test). Insbesondere konnte ein Unterschied der IFN-beta-behandelten MS-Patienten auch zu Patienten mit viralen Enzephalitiden nachgewiesen werden ($p < 0,0001$; $p_{adj.} = 0,0027$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test).

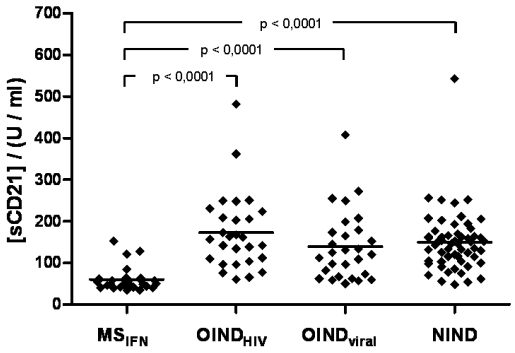


Abbildung 40 Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 28 IFN-beta-behandelten MS-Patienten mit Teilgruppen der OIND-Patienten (bestehend aus 28 HIV-Patienten und 28 Patienten mit viralen Enzephalitiden) und der Gesamtgruppe der NIND-Patienten.

5.3.3 sCD21-Serumkonzentrationen bei verschiedenen MS-Verlaufsformen

Anschließend wurden die MS-Patienten in Untergruppen mit verschiedenen MS-Verlaufsformen unterteilt und die sCD21-Serumkonzentrationen der jeweiligen Gruppen verglichen.

Unabhängig von der IFN-beta-Therapie zeigte sich, wie in Abbildung 41 dargestellt, kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0{,}7554$; $p_{adj.} = 1$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test) zwischen den MS-Patienten mit RR-Verlaufsform (RR-MS; n = 29) gegenüber den MS-Patienten mit SP-Verlaufsform (SP-MS; n = 27) bei einer Verteilungsbreite der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 35 U/ml und 277 U/ml (Median = 81 U/ml), beziehungsweise zwischen 34 U/ml und 422 U/ml (Median = 62 U/ml).

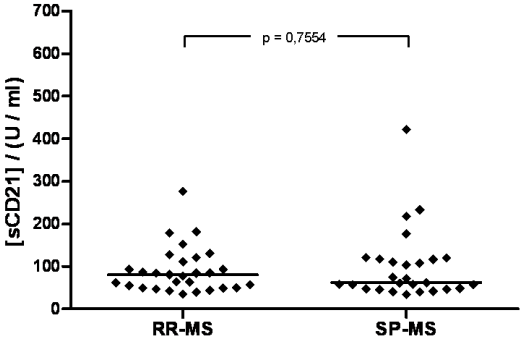


Abbildung 41 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich zwischen MS-Patienten mit RR- und mit SP-Verlaufsform.

In einem weiteren Schritt wurde die Möglichkeit unterschiedlicher Effekte der Interferon-beta-Therapie auf die sCD21-Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Verlaufsform untersucht. Dafür wurden die sCD21-Serumkonzentrationen der Patientengruppen beider Verlaufsformen – getrennt nach Patienten mit und ohne Interferon-beta-Therapie – verglichen und in Abbildung 42 aufgetragen. Es zeigte sich weder für die unbehandelte MS-Patientengruppe ($p = 0{,}2414$; $p_{adj.} = 1$) noch für die IFN-beta-behandelte MS-Patientengruppe ($p = 0{,}0973$; $p_{adj.} = 1$) ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der sCD21-Serumkonzentrationen der beiden Krankheitsverlaufsformen.

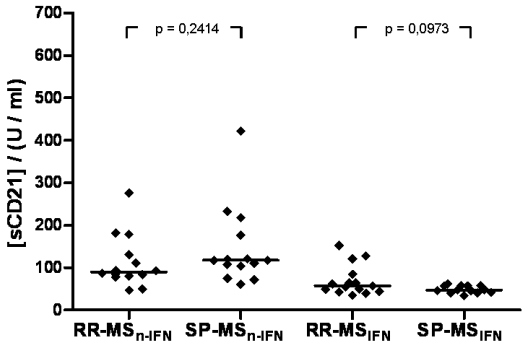


Abbildung 42 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich zwischen MS-Patienten mit RR- und mit SP-Verlaufsform vor und während der IFN-beta-Therapie.

Die sCD21-Serumkonzentrationen der unbehandelten MS-Patienten schwankten bei der RR-Verlaufsform zwischen 47 U/ml und 277 U/ml (Median = 90 U/ml) und bei der SP-Verlaufsform zwischen 61 U/ml und 422 U/ml (Median = 117 U/ml). Unter IFN-beta-Therapie schwankten die sCD21-Serumkonzentrationen der MS-Patienten mit RR-Verlaufsform zwischen 35 U/ml und 152 U/ml (Median = 58 U/ml) und die sCD21-Serumkonzentrationen der MS-Patienten mit SP-Verlaufsform zwischen 34 U/ml und 62 U/ml (Median = 48 U/ml). Unter IFN-beta-Therapie zeigte sich, wie in Abbildung 43 dargestellt, für die Patienten beider Verlaufsformen eine Abnahme der sCD21-Serumkonzentrationen ($p = 0{,}0155$; $p_{adj} = 0{,}2945$ und $p < 0{,}0001$; $p_{adj} = 0{,}0027$).

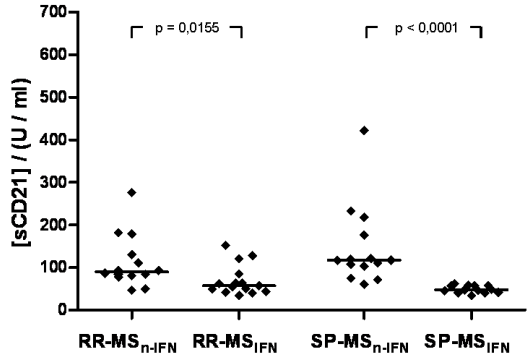


Abbildung 43 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich von MS-Patienten mit RR- und mit SP-Verlaufsform vor und unter IFN-beta-Therapie.

5.3.4 Abhängigkeit der sCD21-Serumkonzentrationen vom Lebensalter

Um die bereits beschriebene Altersabhängigkeit der sCD21-Serumkonzentrationen zu überprüfen, wurden das Gesamtkollektiv sowie jede existierende Untergruppe in zwei Alterskohorten (n = 14) eingeteilt und die sCD21-Serumkonzentrationen beider Alterskollektive verglichen. Der ersten Altersgruppe [20;39] wurden alle Patienten mit einem Alter zwischen 20 und 39 Lebensjahren zugewiesen. Die zweite Altersgruppe [40;59] umfasst alle Patienten mit einem Alter zwischen 40 und 59 Lebensjahren. Im Vorfeld wurden die Patienten so gewählt, dass das Durchschnittsalter jeder Untergruppe – wie in Tabelle 32 dargestellt – näherungsweise identisch war.

Tabelle 32 Altersdurchschnitt im sCD21-ELISA-Kollektiv.

Altersdurchschnitt in Jahren		
	[20;39]	[40;59]
$MS_{n\text{-}IFN}$	33	47
MS_{IFN}	32	47
$OIND_{HIV}$	32	46
$OIND_{viral}$	29	49
NIND	31	51
$Kollektiv_{gesamt}$	31	48

Eine altersabhängige Abnahme der sCD21-Serumkonzentration deutete sich im Gesamtkollektiv zwischen dem Altersintervall [20;39] mit einer Verteilungsbreite zwischen 40 U/ml und 542 U/ml (Median = 112 U/ml) und dem Altersintervall [40;59] mit einer

Verteilungsbreite zwischen 34 U/ml und 481 U/ml (Median = 103 U/ml) vor Korrektur bezüglich des Multiplen Testens an ($p = 0{,}0415$; $p_{adj.} = 0{,}5865$).

Die Abnahme der sCD21-Serumkonzentrationen in der Untergruppe der NIND-Patienten zwischen dem Altersintervall [20;39] mit einer Verteilungsbreite zwischen 54 U/ml und 543 U/ml (Median = 160 U/ml) und dem Altersintervall [40;59] mit einer Verteilungsbreite zwischen 48 U/ml und 211 U/ml (Median = 118 U/ml) war statistisch signifikant ($p = 0{,}0013$; $p_{adj.} = 0{,}0286$) und ist in Abbildung 44 dargestellt.

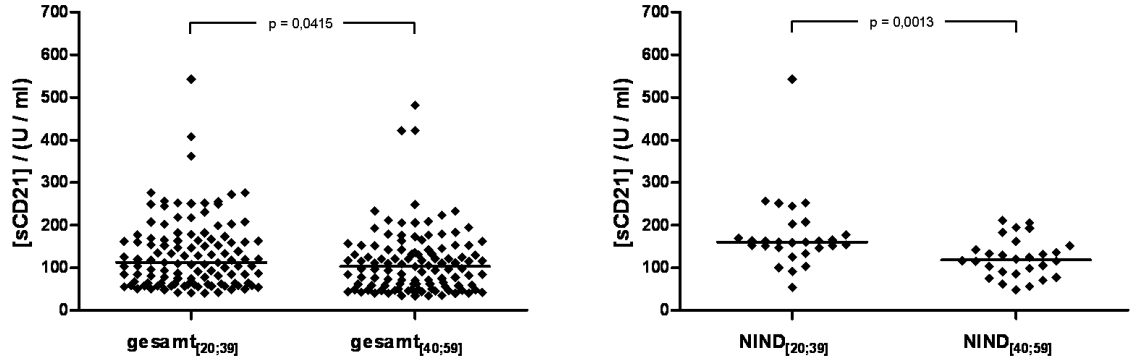


Abbildung 44 Altersabhängigkeit der sCD21-Serumkonzentration im Gesamtkollektiv (links) und in der Kontrollgruppe der NIND-Patienten (rechts).

In der gesamten MS-Patientengruppe, bestehend aus unbehandelten und IFN-beta-behandelten MS-Patienten (Abbildung 45) wurden mit den Verteilungsbreiten zwischen 40 U/ml und 277 U/ml (Median = 76 U/ml) im Altersintervall [20;39] und zwischen 34 U/ml und 422 U/ml (Median = 67 U/ml) im Altersintervall [40;59] keine altersabhängig erniedrigten sCD21-Serumkonzentrationen gemessen ($p = 0{,}5944$; $p_{adj.} = 1$).

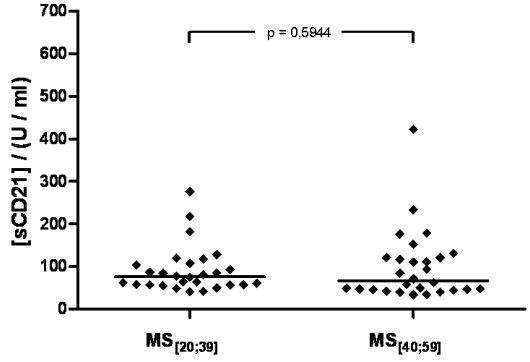


Abbildung 45 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich von MS-Patienten beider Alterskohorten.

In der Untergruppe der unbehandelten MS-Patienten zeigte sich mit den Verteilungsbreiten zwischen 61 U/ml und 277 U/ml (Median = 98 U/ml) im Altersintervall [20;39] und zwischen 47 U/ml und 422 U/ml (Median = 114 U/ml) im Altersintervall [40;59] mit einem p-Wert von p = 0,5658 ($p_{adj.}$ = 1) keine signifikante Altersabhängigkeit der sCD21-Serumkonzentrationen. Der in Abbildung 46 (rechts) dargestellte Vergleich zwischen den Altersintervallen der Gruppe IFN-beta-behandelter MS-Patienten verfehlte mit einer Verteilungsbreite zwischen 40 U/ml und 128 U/ml (Median = 58 U/ml) im Altersintervall [20;39] sowie zwischen 34 U/ml und 152 U/ml (Median = 46 U/ml) im Altersintervall [40;59] das Signifikanzniveau (p = 0,0849; $p_{adj.}$ = 1 im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test).

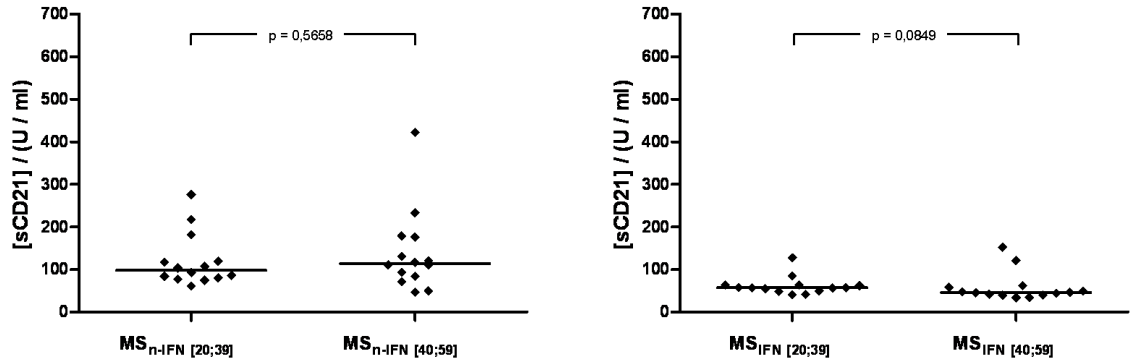


Abbildung 46 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich der Alterskohorten von MS-Patienten vor (links) und unter IFN-beta-Therapie (rechts).

In der Gesamtgruppe der OIND-Patienten bestand mit einem p-Wert von p = 0,0945 ($p_{adj.}$ = 1) bei einer Verteilungsbreite der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 50 U/ml und 408 U/ml (Median = 162 U/ml) im Altersintervall [20;39] sowie zwischen 59 U/ml und 482 U/ml (Median = 124 U/ml) im Altersintervall [40;59] keine altersabhängig signifikante Verringerung der sCD21-Konzentrationen. In der Teilpopulation der OIND-Patienten mit viralen Enzephalitiden deutete sich vor Korrektur bezüglich des Multiplen Testens ein statistisch signifikanter altersabhängiger Unterschied (p = 0,0271; $p_{adj.}$ = 0,4878 im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test) mit einer Verteilungsbreite der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 50 U/ml und 408 U/ml (Median = 173 U/ml) im Altersintervall [20;39] und einer Verteilungsbreite der sCD21-Serumkonzentrationen zwischen 59 U/ml und 165 U/ml (Median = 97 U/ml) im Altersintervall [40;59] an. In der OIND-Teilpopulation der HIV-Patienten konnte mit einer Verteilungsbreite zwischen 61 U/ml und 362 U/ml (Median = 150 U/ml) im Altersintervall [20;39] und zwischen 66 U/ml und 482 U/ml (Median = 160 U/ml) im Altersintervall [40;59] kein statistisch signifikanter Unterschied (p > 0,9999; $p_{adj.}$ = 1) nachgewiesen werden.

5.3.5 Potentielle Geschlechtsspezifität der sCD21-Serumkonzentrationen

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied der sCD21-Serumkonzentrationen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gesamtkollektiv sowie jede existierende Untergruppe nach Geschlecht unterteilt und es wurden die sCD21-Serumkonzentrationen verglichen. Es war aufgrund der zur Verfügung stehenden Serumproben jedoch nicht möglich, die Anzahl männlicher und weiblicher Patienten für jede Untergruppe identisch zu wählen. Bei den MS-Patienten waren die IFN-beta-behandelten Patienten mit je 14 Frauen und 14 Männern paritätisch verteilt, das Kollektiv der unbehandelten MS-Patienten bestand jedoch aus 19 Frauen und 9 Männern. Im OIND-Kollektiv standen für die HIV-Gruppe nur männliche Patienten zur Verfügung. Es ist daher bei dem im Folgenden dargestellten Ergebnis das nur eingeschränkt repräsentative Kollektiv zu beachten.

Es deutete sich, wie in Abbildung 47 gezeigt, eine geschlechtsspezifische Reduktion der sCD21-Serumkonzentrationen an im Vergleich aller weiblichen Personen (n = 76) mit der Verteilungsbreite zwischen 34 U/ml und 422 U/ml (Median = 106 U/ml) zu allen männlichen Personen (n = 92) mit der Verteilungsbreite zwischen 40 U/ml und 543 U/ml (Median = 129 U/ml) mit einem p-Wert von p = 0,0332; $p_{adj.}$ = 0,5312 im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test an. Diese Tendenz bezüglich des geschlechtsspezifischen Unterschieds konnte aber in keiner der Untergruppen zum Signifikanzniveau von p = 0,05 bestätigt werden. So war auch in der Gruppe der MS-Patienten als eine der Untergruppen mit einem p-Wert von p = 0,9265 ($p_{adj.}$ = 1) keine geschlechtsspezifische Erniedrigung der sCD21-Serumkonzentration nachzuweisen.

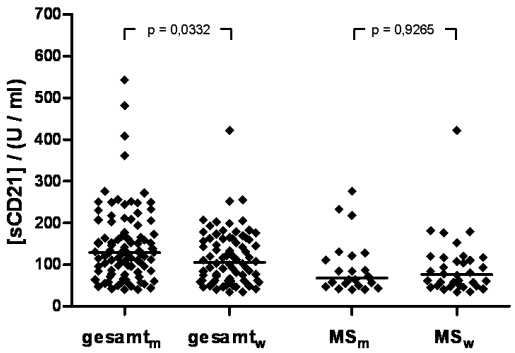


Abbildung 47 sCD21-Serumkonzentrationen im Vergleich von männlichen und weiblichen Patienten des Gesamtkollektivs (links) und im Vergleich von männlichen und weiblichen MS-Patienten (rechts).

6 DISKUSSION

Im ersten Teil der Arbeit wurden die codierenden Abschnitte des CD21-Rezeptorgens und der CD21-Promoterregion von 8 MS-Patienten und 8 Kontrollpersonen sequenziert und das Auftreten von Polymorphismen untersucht.
Es wurden die bekannten Polymorphismen auf den Exonen 1, 10, 11, 18 und 20 des CD21-Rezeptorgens bestätigt. Bei den Polymorphismen SNP rs17615 auf Exon 10 und SNP rs6540433 auf Exon 18 zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied bezüglich der Allel- und Genotypverteilungen im Vergleich von MS-Patienten und Kontrollpersonen. Das Auftreten beider Polymorphismen wurde daraufhin separat in einem großen MS- und Kontroll-Kollektiv untersucht.

Im Rahmen der DNS-Sequenzierung wurde zusätzlich ein neuer Polymorphismus mit einem Basenaustausch von Guanin (wt) zu Adenin (mt) in der 2. Codonposition an der Aminosäureposition 671 (R → H) in der Sequenz von Exon 11 des CD21-Rezeptorgens identifiziert. Bei Veröffentlichung dieser Arbeit ist der Polymorphismus bereits als SNP rs17616 in der HapMap-Datenbank publiziert. Im DNS-Sequenzvergleich von MS-Patienten mit Kontrollpersonen wurde bezüglich des SNP rs17616 eine sehr ähnliche Allel- beziehungsweise Genotypverteilung in beiden Kollektiven beobachtet. Es wurde zusätzlich festgestellt, dass der als SNP rs17616 bekannte Polymorphismus sowohl in der Gruppe der MS- als auch im Kontroll-Kollektiv ausschließlich gemeinsam mit dem SNP rs4308977 auftrat. Durch diese Beobachtung in insgesamt 16 DNS-Sequenzen deutete sich an, dass der SNP rs4308977 und der SNP rs17616 auf Exon 11 miteinander verbunden sein könnten. Folglich würde die Aminosäure Serin beziehungsweise Prolin in Position 663 der Aminosäuresequenz des CD21-Rezeptorproteins scheinbar jeweils zusammen mit der Aminosäure Arginin beziehungsweise Histidin in Position 671 der Aminosäuresequenz des CD21-Rezeptorproteins codiert. Die CD21-Rezeptorstruktur könnte sich dann – falls dieses nicht durch posttranslationale und posttranskriptionale Modifikationen beeinflusst wird – in Abhängigkeit des gemeinsamen Einflusses von Serin und Arginin beziehungsweise Prolin und Histidin ändern. Durch die nahezu identischen Allelverteilungen beider SNPs im MS- und Kontroll-Kollektiv scheint diese potentiell gekoppelte Veränderung der CD21-Rezeptorstruktur jedoch nicht MS-spezifisch zu sein und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Der SNP rs1143665 auf Exon 14 wurde in keiner der 16 sequenzierten DNS-Sequenzen detektiert. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde für alle im Rahmen der DNS-Sequenzierung identifizierten Basenänderungen nachgewiesen und diese wurden somit als Polymorphismen bestätigt. Es wurden auf den Exonen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17 und 19 keine weiteren Polymorphismen in den DNS-Sequenzen der 8 MS-Patienten und der 8 Kontrollpersonen nachgewiesen.

Um den signifikanten Unterschied bezüglich der Allelverteilung sowie der Genotypverteilung des SNP rs6540433 zwischen den DNS-Sequenzen der 8 MS-Patienten und den DNS-Sequenzen der 8 Kontrollpersonen näher zu untersuchen, wurde das Auftreten des SNP rs6540433 in einem Kollektiv bestehend aus 469 MS-Patienten und 266 Kontrollpersonen mittels RFLP-PCR untersucht. Im großen MS- und Kontroll-Kollektiv zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Allel- beziehungsweise Genotypverteilung des SNP rs6540433. Daraus lässt sich ableiten, dass auch der durch den SNP rs6540433 bedingte Aminosäureaustausch in Position 1062 des CD21-Rezeptorproteins von Glutamat zu Alanin in beiden Populationen nicht signifikant unterschiedlich auftritt und daher nicht MS-spezifisch ist.

Das Auftreten des SNP rs17615 auf Exon 10 wurde nach dem signifikanten Unterschied bezüglich der Allelverteilung sowie der Genotypverteilung zwischen den DNS-Sequenzen der 8 MS-Patienten und den DNS-Sequenzen der 8 Kontrollpersonen in einem Kollektiv bestehend aus 278 MS-Patienten und 266 Kontrollpersonen mittels ARMS-PCR untersucht. Die im großen Kollektiv ermittelten Frequenzen des SNP rs17615 wiesen bezüglich der Allel- und Genotypverteilungen keinen signifikanten Unterschied zwischen MS-Patienten und Kontrollpersonen auf. Es scheint daher auch der durch den SNP rs17615 eintretende Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin an Aminosäureposition 639 im CD21-Rezeptorprotein in beiden Populationen nicht unterschiedlich häufig aufzutreten.
Zusammenfassend wurde kein Hinweis auf das Auftreten eines MS-spezifischen Polymorphismus in der für das CD21-Rezeptorprotein codierenden DNS-Sequenz gefunden. Es wurde deutlich, dass die bei geringer Kollektivgröße zunächst detektierten genetischen Unterschiede zwischen den MS-Patienten und den Kontrollpersonen in einem großen Kollektiv nicht signifikant waren.

Verschiedene genetische Studien zeigen seit Langem eine Assoziation des HLA-DR15-Lokus mit dem Auftreten der Multiplen Sklerose. In einer Assoziationsstudie im Rahmen dieser Arbeit, in der die DNS-Proben nach HLA-DR15 stratifiziert wurden, konnte keine Korrelation der Allel- und Genotypverteilung des SNP rs17615 mit dem HLA-DR15-Genotyp nachgewiesen werden. Für die Allel- und Genotypverteilung des SNP rs6540433 konnte ebenfalls keine Korrelation mit dem HLA-DR15-Genotyp gefunden werden.

Für den CD21-Rezeptor sind aus anderen molekulargenetischen Untersuchungen [116] drei verschiedene Isoformen in der Allgemeinbevölkerung bekannt. Diese Isoformen unterscheiden sich in der von Exon 9 und Exon 11 codierten Aminosäuresequenz. Es wurde in Kapitel 5.2 gezeigt, dass potentiell alle mRNS-Sequenzen der drei verschiedenen Isoformen des CD21-Rezeptors auch bei MS-Patienten exprimiert werden. Dieses beobachtete variable Auftreten von mRNS-Sequenzen verschiedener Isoformen des CD21-Rezeptors in der MS-Population deutet darauf hin, dass nicht der Expression einer einzelnen Rezeptor-Isoform eine spezifische Rolle in der Multiplen Sklerose zuzuordnen ist. Ob im Rahmen der quantitativ unterschiedlichen Expression einer spezifischen Isoform des CD21-Rezeptorproteins bei MS-Patienten eine besondere Bedeutung zukommt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob das CD21-Rezeptorprotein bei MS-Patienten und Kontrollpersonen durch enzymatische Abspaltung von der Zelloberfläche unterschiedlich reguliert wird. Dazu wurden die Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Rezeptorproteins von MS-Patienten und Kontrollpersonen mittels ELISA gemessen.
Im Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen deutet sich an, dass bei unbehandelten Patienten mit Multipler Sklerose eine Abnahme der löslichen CD21-Serumkonzentrationen gegenüber Kontrollpersonen vorliegt. Das Kollektiv der untersuchten Kontrollpersonen bestand zu gleicher Anzahl aus Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen sowie mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen. Das Kollektiv aus Patienten mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen wurde dabei zu gleichen Anteilen aus HIV-Patienten und Patienten mit viralen Enzephalitiden gebildet. Die HIV-Patienten hatten zum Messzeitpunkt der sCD21-Serumkonzentrationen klinisch keine infektiöse ZNS-Affektion. Im Vergleich dieser beiden Untergruppen deuteten sich verringerte sCD21-Serumkonzentrationen der Patienten mit viralen Enzephalitiden im Vergleich zu HIV-Patienten an. Im Kollektiv der Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen konnten keine Untergruppen differenziert werden.

Durch den tendenziellen Unterschied zwischen den sCD21-Serumkonzentrationen von HIV-Patienten und Patienten mit viralen Enzephalitiden wurden die sCD21-Serumkonzentrationen beider Untergruppen mit den sCD21-Serumkonzentrationen der unbehandelten MS-Patienten verglichen. Die sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten waren im Vergleich zu den sCD21-Serumkonzentrationen von HIV-Patienten verringert. Diese Abnahme der sCD21-Serumkonzentration von unbehandelten MS-Patienten war auch im Vergleich zu Kontrollpersonen mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen zu beobachten.
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass sich die sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten und die sCD21-Serumkonzentrationen von Patienten mit viralen Enzephalitiden nicht deutlich voneinander unterschieden. Epidemiologisch ist die Assoziation von einigen viralen Infektionen – insbesondere von EBV-Infektionen – mit dem vermehrten Auftreten von Krankheitsschüben im Rahmen der MS-Erkrankung beschrieben. In dieser Hinsicht ist der gezeigte fehlende Unterschied zwischen den sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten und den sCD21-Serumkonzentrationen von Patienten mit viralen Enzephalitiden im Gegensatz zu dem deutlichen Unterschied der sCD21-Serumkonzentration von unbehandelten MS-Patienten zu den sCD21-Serumkonzentrationen von HIV-Patienten ohne infektiöse ZNS-Affektion und Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen interessant. Ob die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten verringerten sCD21-Serumkonzentrationen bei unbehandelten MS-Patienten auf einen ätiologischen Zusammenhang mit einer viralen Infektion des ZNS hindeuten oder im Rahmen anderer immunpathogenetischer Konzepte zu berücksichtigen sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Gegensatz zu den Kontrollpersonen bei MS-Patienten keine altersabhängige Veränderung der sCD21-Konzentrationen auftritt. Die bekannte altersabhängige Abnahme der sCD21-Serumkonzentration konnte im Vergleich der Alterskohorten von 20 bis 39 Lebensjahren zu 40 bis 59 Lebensjahren im Kontroll-Kollektiv gezeigt werden.

Im Folgenden war zu klären, ob dieser nicht-vorhandene Alterseinfluss bei den unbehandelten MS-Patienten aufgrund der geringen und damit potentiell weniger repräsentativen Kollektivgröße auftrat oder als krankheitsspezifisch gedeutet werden kann. In diesem Zusammenhang zeigte sich der im Nachfolgenden näher charakterisierte Einfluss der

gängigen immunmodulatorischen Behandlung von MS-Patienten mit Interferon-beta auf die sCD21-Serumkonzentrationen.

Bei einem Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten mit denen von mit Interferon-beta behandelten MS-Patienten wurde nachgewiesen, dass es unter Interferon-beta-Therapie zu einer deutlichen Verringerung der sCD21-Serumkonzentrationen kommt. Die Abnahme des löslichen CD21-Rezeptorproteins unter Interferon-beta-Therapie konnte auch im Einzelvergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von 8 MS-Patienten vor und unter Interferon-beta-Therapie bestätigt werden. Damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals die bereits aus der Therapie anderer Patienten bekannten reduzierten sCD21-Serumkonzentrationen unter Interferon-beta-Therapie auch bei MS-Patienten.
Die Beobachtung, dass sowohl die B-Zellaktivierung im Allgemeinen sowie die EBNA-1-Expression in B-Lymphozyten im Besonderen zu erhöhter sCD21-Freisetzung führt, deutet möglicherweise auf eine reduzierte B-Zellaktivierung bei verringerten sCD21-Serumkonzentrationen hin. Da die Interferon-beta-Therapie prophylaktisch zur Senkung der MS-Schubfrequenz in der Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzt wird und mit verringerten sCD21-Serumspiegeln einhergeht, könnten die sCD21-Serumkonzentration möglicherweise als wertvoller laborchemischer Parameter zur Bestimmung des Interferon-beta-Einflusses auf die Krankheitsaktivität bei MS-Patienten eingesetzt werden.
Unterstützt werden können diese Beobachtungen durch die von Masilamani et al. beschriebene Verringerung der sCD21-Serumkonzentrationen bei gesunden Frauen in der Schwangerschaft. Bei MS-Patientinnen ist die relative Krankheitsstabilität während der Schwangerschaft bekannt. Peri- und postpartal kommt es bei MS-Patientinnen zu einem vermehrten Auftreten von Krankheitsschüben. Der Nachweis verringerter sCD21-Konzentrationen bei MS-Patientinnen in der Schwangerschaft könnte wiederum den Zusammenhang zwischen verringerten sCD21-Serumkonzentrationen und veränderter Krankheitsaktivität zeigen.

In einem Vergleich der sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen zeigte sich weder für Interferon-beta-behandelte MS-Patienten noch für unbehandelte MS-Patienten ein deutlicher Unterschied zwischen MS-Patienten mit SP-Verlaufsform und RR-Verlaufsform. Es zeigten sich unter Interferon-beta-Therapie jedoch tendenziell eine stärkere Reduktion der sCD21-Serumkonzentrationen bei MS-Patienten mit SP-Verlaufsform und eine deutlich verringerte Schwankungsbreite der

sCD21-Serumkonzentrationen. Diese Beobachtung könnte auf eine unterschiedliche Wirkung der Interferon-beta-Therapie in Abhängigkeit von der MS-Verlaufsform hindeuten.

Interessanterweise sind die Ausgangswerte der sCD21-Serumkonzentrationen bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen verringert. Dieses Ergebnis deutet eine nicht ausschließlich im Rahmen der Interferon-beta-Therapie zu wertende relevante Rolle verringerter sCD21-Serumkonzentrationen an. Die prophylaktische Wirkung der Interferon-beta-Therapie sowie die positive Wirkung der Schwangerschaft auf die MS-Schubfrequenz könnten beide indirekte Hinweise sein, dass den verringerten sCD21-Serumkonzentrationen eine funktionell protektive Wirkung im Rahmen der MS-Erkrankung zukommt. Von besonderem Interesse wäre diese Beobachtung auch im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel dem Systemischen Lupus Erythematodes und der Rheumatoiden Arthritis, für die verringerte sCD21-Serumkonzentrationen beschrieben sind.
Zunächst erscheinen die Beobachtungen paradox, dass zum einen die prophylaktische Wirkung der beta-Interferone bei MS-Patienten mit verringerten sCD21-Serumspiegeln zusammenfällt oder im kausalen Zusammenhang zu diesen steht und sich auf der anderen Seite MS-Patienten vor Therapie durch erniedrigte sCD21-Serumkonzentrationen von Kontrollpersonen unterscheiden. Eine mögliche Deutung wäre, dass sCD21 durch die Bindung an ein bis dato unbekanntes Agens am MS-Krankheitsprozess beteiligt sein könnte. Die Serumkonzentration an freiem sCD21-Protein wäre dann bei unbehandelten MS-Patienten verringert. Bedingt die Interferon-beta-Therapie jedoch auf anderem Wege eine Reduktion des freien sCD21-Proteins, so könnte dies die Bindung des unbekannten Liganden und einen möglicherweise resultierenden pathologischen Prozess verhindern.

Unabhängig von der Betrachtung der sCD21-Serumkonzentrationen im Zusammenhang mit beta-Interferonen ist eine Reduktion der sCD21-Serumkonzentrationen im Rahmen verschiedener Mechanismen vorstellbar: der verringerten Abspaltung des zellulären CD21-Rezeptors, der verringerten Expression von zellulärem CD21-Rezeptor mit konsekutiv verringerter Abspaltung, des vermehrten Abbaus des sCD21-Proteins oder im Rahmen der Bindung des löslichen CD21-Rezeptorproteins an einen Liganden, durch den das vorliegende sCD21-Protein im ELISA nicht mehr detektiert werden kann. Um die deutlichen Unterschiede der sCD21-Serumkonzentrationen von unbehandelten MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen besser zu verstehen, wäre es interessant, den zugrunde liegenden Regulationsprozess näher zu identifizieren.

Unter der Voraussetzung, dass die Expression des zellulären CD21-Rezeptors sich bei MS-Patienten und Kontrollpersonen nicht signifikant voneinander unterscheidet, müsste der Bindung des sCD21 an einen bis jetzt nicht näher charakterisierten Schlüsselfaktor oder dem verstärkten Abbau des sCD21-Rezeptors und der dadurch verhinderten sCD21-Wirkung eine besondere Bedeutung zukommen. Für das sCD21-Rezeptorprotein ist die Bindung an das C3d-Protein, an das lösliche oder zelluläre CD23-Rezeptorprotein und an die EBV-Bindungsproteine bekannt. Eine Interaktion des sCD21-Proteins mit den EBV-Glykoproteinen, die sonst an den zellulären CD21-Rezeptor binden würden, könnte den Infektionsprozess möglicherweise entscheidend beeinflussen. Es wurde nachgewiesen, dass die Bindung des sCD21-Rezeptorproteins an EBV-Glykoproteine im Blut die EBV-Bindung an den zellulären CD21-Rezeptor verringert und dadurch humane B-Lymphozyten vor EBV-Infektion schützt. Diese Erklärung könnte durch den Nachweis erhöhter Konzentrationen von sCD21-EBV-Glykoprotein-Komplexen im Serum von MS-Patienten unterstützt werden. Da die Expression von zellulärem CD21-Rezeptor bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen bis dato nicht eindeutig charakterisiert ist, könnten die verringerten sCD21-Serumkonzentrationen bei MS-Patienten auch ein indirekter Hinweis auf eine höhere Anzahl nicht-abgespaltener, zellulärer CD21-Rezeptoren sein, die u. a. eine EBV-Infektion der B-Zellen begünstigen würde. In Bezug auf die in neueren Studien gezeigte potentielle Relevanz von EBV-infizierten B-Zellen im Rahmen der MS-Pathogenese könnten die in dieser Arbeit beschriebenen verringerten sCD21-Serumkonzentrationen bei MS-Patienten in funktionellem Zusammenhang mit der Immunreaktion im Rahmen der Multiplen Sklerose stehen.

Verringerte sCD21-Serumkonzentrationen bei verminderter zellulärer CD21-Expression im Vergleich von MS-Patienten zu Kontrollpersonen und die konsekutiv prozentual verringerte Abspaltung sowie ein potentiell vermehrter Abbau des sCD21-Rezeptorproteins oder die Bindung an andere Liganden könnten auf eine mögliche Schlüsselrolle des CD21-Rezeptors in seiner Funktion als Komplementfaktor bei MS-Patienten hindeuten. Im Rahmen der multiplen Konsequenzen für die komplexe B-Zellantwort seien nur stellvertretend die Wirkungen im Rahmen der C3d-CD21-abhängigen B-Zell-Proliferation und Differenzierung in Anwesenheit von T-Zellen, die IgM-CD21-abhängige T-Zell-unabhängige B-Zellproliferation und der durch Akkumulation von Bcl-2-bedingte Einfluss auf die B-Zell-Apoptose genannt.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit zum einen die Beobachtung, dass eine Verringerung der Serumkonzentrationen des löslichen CD21-Rezeptors bei MS-Patienten im Zusammenhang mit der Interferon-beta-Therapie steht. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die sCD21-Serumkonzentrationen auch bei unbehandelten MS-Patienten und damit unabhängig von der Interferon-beta-Wirkung im Vergleich zu Kontrollpersonen erniedrigt waren. Diese Beobachtungen deuten auf eine mögliche Schlüsselrolle des CD21-Rezeptors – entweder des löslichen oder des zellulär gebundenen Rezeptorproteins – bei MS-Patienten hin. Insbesondere konnte kein Unterschied zwischen den sCD21-Serumkonzentrationen von MS-Patienten und den sCD21-Serumkonzentrationen von Patienten mit viralen Enzephalitiden nachgewiesen werden. Diese Beobachtung und der genaue funktionelle Zusammenhang der verringerten sCD21-Serumkonzentrationen mit der Immunpathogenese der Multiplen Sklerose müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
APC	antigen presenting cell
ARMS	*amplification refractory mutation system*
AS	Aminosäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bp	Basenpaar
Bcl-2	*b-cell lymphoma 2 protein*
C	Cytosin
CCP	*complement control protein*
CD	*cluster of differentiation*
cDNS	komplementäre DNS
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin
CSF	Liquor cerebrospinalis
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
EAE	*experimental autoimmune encephalomyelitis*
EBNA	E*pstein barr virus nuclear antigen*
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
EMEA	*european medicines agency*
EST	*expressed sequence tags*
Ex	Exon
f-Primer	*forward primer*
FDC	Follikulär-dendritische Zellen
G	Guanin
gp	Glykoprotein
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	*human leukocyte antigene*
H_n	absolute Häufigkeit
h_n	relative Häufigkeit

HRP	*horseradish peroxidase*
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Kontrollpersonen
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MBP	Myelin-basisches-Protein
min	Minuten
MHC	*major histocompatibility complex*
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNS	*messenger* RNS
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
mt	Mutant
NIND	*non-inflammatory neurological disease*
NCBI	*national center for biotechnology information*
OD	optische Dichte
OIND	*other inflammatory neurological disease*
OKB	Oligoklonale Banden
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP-MS	*primary progressive* MS, primär chronisch progrediente MS
r-Primer	*reverse primer*
RCA	*receptor of complement activation family*
RFLP	*restriction fragment length polymorphism*
RNS	Ribonukleinsäure
RR-MS	*relapsing remitting* MS, schubförmige MS
RT-PCR	*reverse transcriptase* PCR
s	Sekunden
sCD21	löslicher CD21-Rezeptor
SCR	*short consensus repeat*
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SP-MS	*secondary progressive* MS, sekundär chronisch progrediente MS

T	Thymin
T1D	Diabetes mellitus Typ 1
TCR	T-Zell-Rezeptor
T_H	T-Helferzelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
U	Uracil
UTR	*untranslated region*
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Noseworthy, J.H. et al., *Medical progress: Multiple sclerosis.* New England Journal of Medicine, 2000. **343**(13): p. 938-952.
2. Compston, A. et al., *Multiple sclerosis.* Lancet, 2002. **359**(9313): p. 1221-1231.
3. Orton, S.M. et al., *Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study.* Lancet Neurology, 2006. **5**(11): p. 932-936.
4. Koch-Henriksen, N., *The Danish Multiple Sclerosis Registry: a 50-year follow-up.* Multiple Sclerosis, 1999. **5**(4): p. 293-296.
5. Koch-Henriksen, N. et al., *Epidemiology of Multiple-Sclerosis - Incidence and Prevalence Rates in Denmark 1948-64 Based on the Danish Multiple-Sclerosis Registry.* Acta Neurologica Scandinavica, 1988. **78**(5): p. 369-380.
6. Mayr, W.T. et al., *Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000.* Neurology, 2003. **61**(10): p. 1373-1377.
7. Weinshenker, B.G. et al., *The Influence of Pregnancy on Disability from Multiple-Sclerosis - a Population-Based Study in Middlesex-County, Ontario.* Neurology, 1989. **39**(11): p. 1438-1440.
8. McFarland, H.F. et al., *Using Gadolinium-Enhanced Magnetic-Resonance-Imaging Lesions to Monitor Disease-Activity in Multiple-Sclerosis.* Annals of Neurology, 1992. **32**(6): p. 758-766.
9. Poser, C.M. et al., *New Diagnostic-Criteria for Multiple-Sclerosis - Guidelines for Research Protocols.* Annals of Neurology, 1983. **13**(3): p. 227-231.
10. McDonald, W.I. et al., *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis.* Annals of Neurology, 2001. **50**(1): p. 121-127.
11. Martin, R. et al., *Immunotherapy of multiple sclerosis: Where are we? Where should we go?* Nature Immunology, 2001. **2**(9): p. 785-788.
12. Goodin, D.S. et al., *Disease modifying therapies in multiple sclerosis - Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines.* Neurology, 2002. **58**(2): p. 169-178.
13. Brosnan, C.F. et al., *Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis.* Brain Pathology, 1996. **6**(3): p. 243-257.
14. Lucchinetti, C. et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination.* Annals of Neurology, 2000. **47**(6): p. 707-717.
15. Weiner, H.L., *The Challenge of Multiple Sclerosis: How Do We Cure A Chronic Heterogeneous Disease?* Annals of Neurology, 2009. **65**(3): p. 239-248.
16. Baranzini, S.E. et al., *B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions.* Journal of Immunology, 1999. **163**(9): p. 5133-5144.
17. Owens, G.P. et al., *The immunoglobulin G heavy chain repertoire in multiple sclerosis plaques is distinct from the heavy chain repertoire in peripheral blood lymphocytes.* Clinical Immunology, 2001. **98**(2): p. 258-263.
18. Owens, G.P. et al., *Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid.* Journal of Immunology, 2003. **171**(5): p. 2725-2733.
19. Qin, Y.F. et al., *Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis.* Laboratory Investigation, 2003. **83**(7): p. 1081-1088.

20. Qin, Y.F. et al., *Clonal expansion and somatic hypermutation of V-H genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.* Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(5): p. 1045-1050.
21. Owens, G.P. et al., *The B cell response in multiple sclerosis.* Neurological Research, 2006. **28**(3): p. 236-244.
22. Gilden, D.H., *A search for virus in multiple sclerosis.* Hybridoma and Hybridomics, 2002. **21**(2): p. 93-97.
23. Miller, D.J. et al., *A monoclonal natural autoantibody that promotes remyelination suppresses central nervous system inflammation and increases virus expression after Theiler's virus-induced demyelination.* International Immunology, 1996. **8**(1): p. 131-141.
24. Johnson, R.T., *The Virology of Demyelinating Diseases.* Annals of Neurology, 1994. **36**: p. 54-60.
25. Fernandez-Munoz, R. et al., *Virus and demyelination why suspect that a virus maybe involved in the aetiology of multiple sclerosis?* Revista De Neurologia, 2002. **35**(10): p. 964-972.
26. Hindinger, C. et al., *Mice with a decoy IFN-gamma receptor on astrocytes exhibit increased EAE severity.* Journal of Neuroimmunology, 2004. **154**(1-2): p. 80.
27. Neighbour, P.A. et al., *Interferon Responses of Leukocytes in Multiple-Sclerosis.* Neurology, 1981. **31**(5): p. 561-566.
28. Jacobson, S. et al., *Impaired Measles Virus-Specific Cyto-Toxic T-Cell Responses in Multiple-Sclerosis.* Journal of Experimental Medicine, 1985. **162**(3): p. 839-850.
29. Noseworthy, J.H. et al., *IV immunoglobulin does not reverse established weakness in MS - A double-blind, placebo-controlled trial.* Neurology, 2000. **55**(8): p. 1135-1143.
30. Murthy, J.M.K., *Acute disseminated encephalomyelitis.* Neurology India, 2002. **50**(3): p. 238-243.
31. Piyasirisilp, S. et al., *B-cell responses to myelin basic protein and its epitopes in autoimmune encephalomyelitis induced by Semple rabbies vaccine.* Journal of Neuroimmunology, 1999. **98**(2): p. 96-104.
32. Hemmer, B. et al., *Multiple Sklerose*, in *Neurogenetik*, O. Rieß and L. Schöls, Editors. 2002, Springer Verlag. p. 135-155.
33. Wekerle, H. et al., *Animal-Models.* Annals of Neurology, 1994. **36**: p. S47-S53.
34. Fujinami, R.S. et al., *Molecular Mimicry in Virus-Infection - Crossreaction of Measles-Virus Phosphoprotein or of Herpes-Simplex Virus Protein with Human Intermediate Filaments.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1983. **80**(8): p. 2346-2350.
35. Fujinami, R.S. et al., *Molecular Mimicry as a Mechanism for Virus-Induced Autoimmunity.* Immunologic Research, 1989. **8**(1): p. 3-15.
36. Davies, J.M. et al., *Mimicry between Htlv-I and Myelin Basic-Protein - No Response in Htlv-I-Associated Myelopathy Patients.* Journal of Neuroimmunology, 1992. **41**(2): p. 239-243.
37. Wucherpfennig, K.W. et al., *Molecular Mimicry in T-Cell-Mediated Autoimmunity - Viral Peptides Activate Human T-Cell Clones Specific for Myelin Basic-Protein.* Cell, 1995. **80**(5): p. 695-705.
38. Cepok, S. et al., *Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis.* Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(5): p. 1352-1360.
39. Serafini, B. et al., *Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain.* Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(12): p. 2899-2912.
40. Ebers, G.C. et al., *The MHC and multiple sclerosis susceptibility - several levels of complexity.* Journal of Neuroimmunology, 2004. **154**(1-2): p. 8.

41. Sadovnick, A.D. et al., *A Population-Based Study of Multiple-Sclerosis in Twins - Update.* Annals of Neurology, 1993. **33**(3): p. 281-285.
42. Sadovnick, A.D. et al., *The Familial Nature of Multiple-Sclerosis - Age-Corrected Empiric Recurrence Risks for Children and Siblings of Patients.* Neurology, 1988. **38**(6): p. 990-991.
43. Sadovnick, A.D. et al., *Multiple sclerosis and birth order: a longitudinal cohort study.* Lancet Neurology, 2005. **4**(10): p. 611-617.
44. Sadovnick, A.D. et al., *Sibling risks for multiple sclerosis.* Neurology, 1996. **46**(2): p. 34001.
45. Sadovnick, A.D., *Familial Recurrence Risks and Inheritance of Multiple-Sclerosis.* Current Opinion in Neurology and Neurosurgery, 1993. **6**(2): p. 189-194.
46. Greenstein, J.I. et al., *A 5-Year Clinical and Immunological Follow-up-Study of Twins with Multiple-Sclerosis.* Annals of Neurology, 1984. **16**(1): p. 140.
47. Heltberg, A. et al., *Concordance in Twins and Recurrence in Sibships in Multiple-Sclerosis.* Lancet, 1982. **1**(8280): p. 1068.
48. Kinnunen, E. et al., *Genetic Susceptibility to Multiple-Sclerosis - A Co-Twin Study of a Nationwide Series.* Archives of Neurology, 1988. **45**(10): p. 1108-1111.
49. Mumford, C.J. et al., *The British-Isles Survey of Multiple-Sclerosis in Twins.* Neurology, 1994. **44**(1): p. 11-15.
50. Bobowick, A.R. et al., *Twin Study of Multiple-Sclerosis - Epidemiologic Inquiry.* Neurology, 1978. **28**(10): p. 978-987.
51. Ebers, G.C. et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 8: Familial multiple sclerosis.* Brain, 2000. **123**: p. 641-649.
52. Robertson, N.P. et al., *Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis.* Brain, 1996. **119**: p. 449-455.
53. Phillips, J.T., *Regression-Analysis of Multiple-Sclerosis Population-Data Predicts Multigenic Interaction and Minor Combined Effects of Hla and T-Cell Receptor Genes.* Neurology, 1993. **43**(4): p. 205.
54. Ebers, G.C. et al., *A full genome search in multiple sclerosis.* Nature Genetics, 1996. **13**(4): p. 472-476.
55. Seboun, E. et al., *Linkage analysis of candidate myelin genes in familial multiple sclerosis.* Neurogenetics, 1999. **2**(3): p. 155-162.
56. Chataway, J. et al., *The genetics of multiple sclerosis: principles, background and updated results of the United Kingdom systematic genome screen.* Brain, 1998. **121**: p. 1869-1887.
57. Kuokkanen, S. et al., *Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families.* American Journal of Human Genetics, 1997. **61**(6): p. 1379-1387.
58. Oksenberg, J.R. et al., *The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis.* Nature Reviews Genetics, 2008. **9**(7): p. 516-526.
59. Gregory, S.G. et al., *Interleukin 7 receptor a chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis.* Nature Genetics, 2007. **39**(9): p. 1083-1091.
60. Yamanouchi, J. et al., *Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity.* Nature Genetics, 2007. **39**(3): p. 329-337.
61. Maier, L.M. et al., *IL2RA Genetic Heterogeneity in Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes Susceptibility and Soluble Interleukin-2 Receptor Production.* Plos Genetics, 2009. **5**(1).
62. Hafler, J.P. et al., *CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases.* Genes and Immunity, 2009. **10**(1): p. 5-10.
63. Alperovitch, A. et al., *Multiple-Sclerosis in 54 Twinships - Concordance Rate Is Independent of Zygosity.* Annals of Neurology, 1992. **32**(6): p. 724-727.

64. Rosati, G., *The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update.* Neurological Sciences, 2001. **22**(2): p. 117-139.
65. Hammond, S.R. et al., *The Epidemiology of Multiple-Sclerosis in 3 Australian Cities - Perth, Newcastle and Hobart.* Brain, 1988. **111**: p. 1-25.
66. World Health Organisation et al., *Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World*. 2008, WHO Press.
67. Hernan, M.A. et al., *Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women.* Neurology, 1999. **53**(8): p. 1711-1718.
68. Wallin, M.T. et al., *Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: Race, sex, and geography.* Annals of Neurology, 2004. **55**(1): p. 65-71.
69. Pugliatti, M. et al., *Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk.* Acta Neurologica Scandinavica, 2001. **103**(1): p. 20-26.
70. Alter, M. et al., *Risk of Multiple Sclerosis Related to Age at Immigration to Israel.* Archives of Neurology, 1966. **15**(3): p. 234-237.
71. Gale, C.R. et al., *Migrant studies in multiple sclerosis.* Progress in Neurobiology, 1995. **47**(4-5): p. 425-448.
72. Lauer, K. et al., *Epidemiological Investigations into Multiple-Sclerosis in Southern Hesse. 2. The Distribution of Cases in Relation to Exogenous Features.* Acta Neurologica Scandinavica, 1984. **70**(4): p. 266-273.
73. Dean, G., *Annual Incidence Prevalence and Mortality of Multiple Sclerosis in White South-African-Born and in White Immigrants to South Africa.* British Medical Journal, 1967. **2**(5554): p. 724.
74. Kurtzke, J. et al., *A method for estimating the age at immigration of white immigrants to South Afrika, with an example of its importance.* South African Medical Journal, 1970(44): p. 663-669.
75. Hammond, S.R. et al., *The age-range of risk of developing multiple sclerosis - Evidence from a migrant population in Australia.* Brain, 2000. **123**: p. 968-974.
76. Alter, M. et al., *Migration and Risk of Multiple-Sclerosis.* Neurology, 1978. **28**(11): p. 1089-1093.
77. Kurtzke, J.F. et al., *Epidemiology of Multiple-Sclerosis in United-States Veterans. 3. Migration and the Risk of MS.* Neurology, 1985. **35**(5): p. 672-678.
78. Kurtzke, J.F., *Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? Lectio Doctoralis.* Neurological Sciences, 2000. **21**(6): p. 383-403.
79. Poskanzer, D.C. et al., *Multiple-Sclerosis in Orkney and Shetland Islands. 2. Viral Antibody Titers, History of Infection, and Etiology.* Neurology, 1977. **27**(4): p. 372.
80. Rothwell, P.M. et al., *High incidence and prevalence of multiple sclerosis in south east Scotland: evidence of a genetic predisposition.* Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 1998. **64**(6): p. 730-735.
81. Murray, P. et al., *The Epstein–Barr virus (EBV) genome.* Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001: p. 1-2.
82. Lassmann, H. et al., *Immunopathology of multiple sclerosis: Report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna.* Journal of Neuroimmunology, 1998. **86**(2): p. 213-217.
83. Haan, K.M. et al., *Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor.* Journal of Virology, 2000. **74**(5): p. 2451-2454.
84. Peterson, J.W. et al., *Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions.* Annals of Neurology, 2001. **50**(3): p. 389-400.
85. Rudick, R.A. et al., *Management of multiple sclerosis.* New England Journal of Medicine, 1997. **337**(22): p. 1604-1611.

86. Middeldorp, J.M. et al., *Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders.* Critical Reviews in Oncology Hematology, 2003. **45**(1): p. 1-36.
87. Hemmer, B. et al., *New strategies for the treatment of multiple sclerosis.* Medizinische Klinik, 2001. **96**: p. 23-28.
88. Hollsberg, P. et al., *Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B DNA in multiple sclerosis patients: associations with disease activity.* Acta Neurologica Scandinavica, 2005. **112**(6): p. 395-402.
89. Qin, D.H. et al., *Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses.* Journal of Immunology, 1998. **161**(9): p. 4549-4554.
90. Lauer, K., *The Risk of Multiple-Sclerosis in the USA in Relation to Sociogeographic Features - a Factor-Analytic Study.* Journal of Clinical Epidemiology, 1994. **47**(1): p. 43-48.
91. Bray, P.F. et al., *Epstein-Barr Virus-Infection and Antibody-Synthesis in Patients with Multiple-Sclerosis.* Archives of Neurology, 1983. **40**(7): p. 406-408.
92. Sumaya, C.V. et al., *Increased Prevalence and Titer of Epstein-Barr Virus-Antibodies in Patients with Multiple-Sclerosis.* Annals of Neurology, 1985. **17**(4): p. 371-377.
93. Larsen, P.D. et al., *Epstein-Barr Nuclear Antigen and Viral Capsid Antigen-Antibody Titers in Multiple-Sclerosis.* Neurology, 1985. **35**(3): p. 435-438.
94. Ponsonby, A.L. et al., *Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis.* Jama-Journal of the American Medical Association, 2005. **293**(4): p. 463-469.
95. Munch, M. et al., *The implications of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis - A review.* Acta Neurologica Scandinavica, 1997. **95**: p. 59-64.
96. Granieri, E. et al., *Common childhood and adolescent infections and multiple sclerosis.* Neurology, 1997. **49**(2): p. 42-54.
97. Ascherio, A. et al., *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection.* Annals of Neurology, 2007. **61**(4): p. 288-299.
98. Munch, M. et al., *The significance of Epstein-Barr virus seropositivity in multiple sclerosis patients?* Acta Neurologica Scandinavica, 1998. **97**(3): p. 171-174.
99. Sumaya, C.V. et al., *Epstein-Barr Virus-Antibodies in Multiple-Sclerosis.* Archives of Neurology, 1980. **37**(2): p. 94-96.
100. Levin, L. et al., *Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis - Reply.* Jama-Journal of the American Medical Association, 2003. **290**(2): p. 193.
101. Operskalski, E.A. et al., *A Case-Control Study of Multiple-Sclerosis.* Neurology, 1989. **39**(6): p. 825-829.
102. Martyn, C.N. et al., *Symptomatic Epstein-Barr-Virus Infection and Multiple-Sclerosis.* Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 1993. **56**(2): p. 167-168.
103. Haahr, S. et al., *Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection - A historical prospective study.* Acta Neurologica Scandinavica, 1997. **95**: p. 70-75.
104. Thacker, E.L. et al., *Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis.* Annals of Neurology, 2006. **59**(3): p. 499-503.
105. Poskanzer, D.C. et al., *Multiple-Sclerosis in the Orkney and Shetland Islands. 4. Viral Antibody-Titers and Viral-Infections.* Journal of Epidemiology and Community Health, 1980. **34**(4): p. 258-264.
106. Bray, P.F. et al., *Antibodies against Epstein-Barr Nuclear Antigen (Ebna) in Multiple-Sclerosis Csf, and 2 Pentapeptide Sequence Identities between Ebna and Myelin Basic-Protein.* Neurology, 1992. **42**(9): p. 1798-1804.

107. Vaughan, J.H. et al., *An Epstein Barr virus-related cross reactive autoimmune response in multiple sclerosis in Norway.* Journal of Neuroimmunology, 1996. **69**(1-2): p. 95-102.
108. Haahr, S. et al., *A Putative New Retrovirus Associated with Multiple-Sclerosis and the Possible Involvement of Epstein-Barr-Virus in This Disease.* Slow Infections of the Central Nervous System, 1994. **724**: p. 148-156.
109. Sutkowski, N. et al., *An Epstein-Barr virus-associated superantigen.* Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(3): p. 971-980.
110. Weis, J.J. et al., *Identification of a 145,000 Mr Membrane-Protein as the C3d Receptor (Cr-2) of Human Lymphocytes-B.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1984. **81**(3): p. 881-885.
111. Lowell, C.A. et al., *Mapping of the Epstein-Barr Virus and C3dg Binding-Sites to a Common Domain on Complement Receptor Type-2.* Journal of Experimental Medicine, 1989. **170**(6): p. 1931-1946.
112. Tedder, T.F. et al., *Expression of C3d Receptors during Human B-Cell Differentiation - Immunofluorescence Analysis with the Hb-5 Monoclonal-Antibody.* Journal of Immunology, 1984. **133**(2): p. 678-683.
113. Shao, X.Y. et al., *Expression of an Epstein-Barr-virus receptor and Epstein-Barr-virus-dependent transformation of human nasopharyngeal epithelial cells.* International Journal of Cancer, 1997. **71**(5): p. 750-755.
114. Gasque, P. et al., *Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes.* Journal of Immunology, 1996. **156**(6): p. 2247-2255.
115. Reynes, M. et al., *Human Follicular Dendritic Cells Express Cr-1, Cr-2, and Cr3 Complement Receptor Antigens.* Journal of Immunology, 1985. **135**(4): p. 2687-2694.
116. Liu, Y.J. et al., *Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform.* Journal of Experimental Medicine, 1997. **185**(1): p. 165-170.
117. Tsoukas, C.D. et al., *Expression of Cr2/Ebv Receptors on Human Thymocytes Detected by Monoclonal-Antibodies.* European Journal of Immunology, 1988. **18**(8): p. 1299-1302.
118. Fischer, E. et al., *Expression of Cr-2 (the C3dg/Ebv Receptor, Cd21) on Normal Human Peripheral-Blood Lymphocytes-T.* Journal of Immunology, 1991. **146**(3): p. 865-869.
119. Yeda Research and Development Company Ltd., GeneCards database, http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CR2&search=cd21
120. Weis, J.J. et al., *The Identification of N-Linked Oligosaccharides on the Human Cr2/Epstein-Barr Virus Receptor and Their Function in Receptor Metabolism, Plasma-Membrane Expression, and Ligand-Binding.* Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(25): p. 3824-3830.
121. Ulgiati, D. et al., *Functional analysis of the human complement receptor 2 (CR2/CD21) promoter: Characterization of basal transcriptional mechanisms.* Journal of Immunology, 2002. **168**(12): p. 6279-6285.
122. Schwab, J. et al., *Silencing of CD21 expression in synovial lymphocytes is independent of methylation of the CD21 promoter CpG island.* Rheumatology International, 2001. **20**(4): p. 133-137.
123. Schwab, J. et al., *Regulation of CD21 expression by DNA methylation and histone deacetylation.* International Immunology, 2001. **13**(5): p. 705-711.
124. Masilamani, M., *Dissertation "Immunological Investigation of Human Complement Receptor Type II (CR2/CD21). Serum Soluble CD21 in Health and Disease"*. 2002, Universität Konstanz.

125. Masilamani, M. et al., *B cell activation leads to shedding of complement receptor type II (CR2/CD21).* European Journal of Immunology, 2003. **33**(9): p. 2391-2397.
126. Aichem, A. et al., *Redox regulation of CD21 shedding involves signaling via PKC and indicates the formation of a juxtamembrane stalk.* Journal of Cell Science, 2006. **119**(14): p. 2892-2902.
127. Masilamani, M. et al., *Decreased levels of serum soluble complement receptor-II (CR2/CD21) in patients with rheumatoid arthritis.* Rheumatology, 2004. **43**(2): p. 186-190.
128. Ling, N.R. et al., *Origin and properties of soluble CD21 (CR2) in human blood.* Clinical and Experimental Immunology, 1998. **113**(3): p. 360-366.
129. Fearon, D.T. et al., *Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex.* Annual Review of Immunology, 2000. **18**: p. 393-422.
130. Nemerow, G.R. et al., *Binding of Monoclonal-Antibody to the Epstein-Barr Virus (Ebv)/Cr2 Receptor Induces Activation and Differentiation of Human Lymphocytes-B.* Journal of Immunology, 1985. **135**(5): p. 3068-3073.
131. Carter, R.H. et al., *Complement Receptor Type-2 (Cd21) Enhances Migm-Induced B-Cell Activation.* Faseb Journal, 1988. **2**(4): p. 872.
132. Fingeroth, J.D. et al., *Proliferation of Resting B-Cells Is Modulated by Cr-2 and Cr-1.* Immunology Letters, 1989. **21**(4): p. 291-302.
133. Roberts, T. et al., *Cutting edge: Recruitment of the CD19/CD21 coreceptor to B cell antigen receptor is required for antigen-mediated expression of Bcl-2 by resting and cycling hen egg lysozyme transgenic B cells.* Journal of Immunology, 1999. **162**(8): p. 4377-4380.
134. Kozono, Y. et al., *Co-Ligation of Mouse Complement Receptor-1 and Receptor-2 with Surface Igm Rescues Splenic B-Cells and Weht-231 Cells from Antisurface Igm-Induced Apoptosis.* European Journal of Immunology, 1995. **25**(4): p. 1013-1017.
135. Dempsey, P.W. et al., *Complement: Instructing the acquired immune system through the CD21/CD19 complex.* Research in Immunology, 1996. **147**(2): p. 71-75.
136. Cherukuri, A. et al., *The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens.* Journal of Immunology, 2001. **167**(1): p. 163-172.
137. Mezzanzanica, D. et al., *Human Ovarian-Carcinoma Lysis by Cyto-Toxic T-Cells Targeted by Bispecific Monoclonal-Antibodies - Analysis of the Antibody Components.* International Journal of Cancer, 1988. **41**(4): p. 609-615.
138. Apel, M. et al., *Somatic Mutations in Antibodies Expressed by Germinal Center B-Cells Early after Primary Immunization.* International Immunology, 1990. **2**(9): p. 813-819.
139. Song, H.F. et al., *Antibody feedback and somatic mutation in B cells: regulation of mutation by immune complexes with IgG antibody.* Immunological Reviews, 1998. **162**: p. 211-218.
140. Croix, D.A. et al., *Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors.* Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**(4): p. 1857-1864.
141. Toapanta, F.R. et al., *Complement-mediated activation of the adaptive immune responses - Role of C3d in linking the innate and adaptive immunity.* Immunologic Research, 2006. **36**(1-3): p. 197-210.
142. Ling, N.R. et al., *Properties of Soluble Cr-2 in Human Serum.* Immunobiology, 1992. **185**(2-4): p. 403-414.
143. Fremeaux-Bacchi, V. et al., *Functional properties of soluble CD21.* Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 31-37.

144. Fremeaux-Bacchi, V. et al., *Soluble CD21 (sCD21) forms biologically active complexes with CD23: sCD21 is present in normal plasma as a complex with trimeric CD23 and inhibits soluble CD23-induced IgE synthesis by B cells.* International Immunology, 1998. **10**(10): p. 1459-1466.
145. Fremeaux-Bacchi, V. et al., *Human lymphocyte shed a soluble form of CD21 (the C3dg/Epstein-Barr virus receptor, CR2) that binds iC3b and CD23.* European Journal of Immunology, 1996. **26**(7): p. 1497-1503.
146. Lowe, J. et al., *Soluble Forms of Cd21-Antigen and Cd23-Antigen in the Serum in B-Cell Chronic Lymphocytic-Leukemia.* Immunology Letters, 1989. **20**(2): p. 103-110.
147. Ling, N. et al., *Cellular-Origins of Serum Complement Receptor Type-2 in Normal Individuals and in Hypogammaglobulinemia.* Clinical and Experimental Immunology, 1991. **84**(1): p. 16-22.
148. Huemer, H.P. et al., *Determination of Soluble Cd21 as a Parameter of B-Cell Activation.* Clinical and Experimental Immunology, 1993. **93**(2): p. 195-199.
149. Masilamani, M. et al., *Reduction of soluble complement receptor 2/CD21 in systemic lupus erythomatosus and Sjogren's Syndrome but not juvenile arthritis.* Scandinavian Journal of Immunology, 2004. **60**(6): p. 625-630.
150. Masilamani, M. et al., *Systemic reduction of soluble complement receptor II/CD21 during pregnancy to levels reminiscent of autoimmune disease.* Rheumatology International, 2008. **28**(11): p. 1137-1141.
151. Moore, M.D. et al., *Inhibition of Epstein-Barr-Virus Infection Invitro and Invivo by Soluble Cr-2 (Cd21) Containing 2 Short Consensus Repeats.* Journal of Virology, 1991. **65**(7): p. 3559-3565.
152. Larcher, C. et al., *Expression of Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen-2 (Ebna2) Induces Cd21/Cr2 on B-Cell and T-Cell Lines and Shedding of Soluble Cd21.* European Journal of Immunology, 1995. **25**(6): p. 1713-1719.
153. Volsky, D.J. et al., *Expression of Epstein-Barr Virus (Ebv) DNA and Cloned DNA Fragments in Human-Lymphocytes Following Sendai Virus Envelope-Mediated Gene-Transfer.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1984. **81**(19): p. 5926-5930.
154. Fujisaku, A. et al., *Genomic Organization and Polymorphisms of the Human C3d/Epstein-Barr Virus Receptor.* Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(4): p. 2118-2125.
155. Cooper, D.N. et al., *An Estimate of Unique DNA-Sequence Heterozygosity in the Human Genome.* Human Genetics, 1985. **69**(3): p. 201-205.
156. Landegren, U. et al., *Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis.* Genome Research, 1998. **8**(8): p. 769-776.
157. Subramanian, G. et al., *Implications of the human genome for understanding human biology and medicine.* Jama-Journal of the American Medical Association, 2001. **286**(18): p. 2296-2307.
158. Venter, J.C. et al., *The sequence of the human genome.* Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-1351.
159. Irizarry, K. et al., *Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences.* Nature Genetics, 2000. **26**(2): p. 233-236.
160. Cargill, M. et al., *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes (vol 22, pg 231, 1999).* Nature Genetics, 1999. **23**(3): p. 373.
161. Halushka, M.K. et al., *Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis.* Nature Genetics, 1999. **22**(3): p. 239-247.
162. NCBI, single nucleotide polymorphism database, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=1380

163. The European Bioinformatics Institute and Genome Research Limited, Ensembl Genome Browser Database, http://www.ensembl.org
164. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition)*. 1989: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
165. Qiagen, Handbuch zum Qiagen RNeasy Mini Kit, http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000291
166. Buehler, E., *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*, http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
167. Biosystems, A., *Primer Express® v2.0*
168. NCBI, BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
169. Sanger, F. et al., *Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA-Polymerase.* Journal of Molecular Biology, 1975. **94**(3): p. 441-446.
170. DNASTAR, *SeqMan Software zum Vergleich von DNS-Sequenzen*, http://www.dnastar.com
171. Newton, C.R. et al., *Analysis of Any Point Mutation in DNA - the Amplification Refractory Mutation System (Arms).* Nucleic Acids Research, 1989. **17**(7): p. 2503-2516.
172. Auerbach, A.D. et al., *New molecular diagnostic tests for two congenital forms of anemia.* Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1997. **11**(1): p. 17-22.
173. Heiman, M., *Webcutter 2.0* 1997. http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/
174. Altenburg, H.-P., *SAS-Anwenderhandbuch im Netz: Trend-Test nach Cochran-Armitage* Abteilung Klinische Epidemiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, http://www.urz.uni-heidelberg.de/statistik/sas-ah/
175. Agresti, A. et al., *The analysis of contingency tables under inequality constraints.* Journal of Statistical Planning and Inference, 2002. **107**(1-2): p. 45-73.
176. Agresti, A., *Categorical Data Analysis, Second edition*: Wiley.
177. Ahn, K. et al., *The Effects of SNP Genotyping Errors on the Power of The Cochran-Armitage Linear Trend Test for Case/Control Association Studies.* Annals of Human Genetics, 2007. **71**(2): p. 249-261.
178. Billetter, E.P., *Grundlagen der erforschenden Statistik. Statistische Testtheorie, Springer-Verlag*. 1972.
179. EMEA et al., *Points to Consider on multiplicity issues in clinical trials. London, UK: Committee for Proprietary Medicinal Products. Adoption by the CPMP September 2002.* CPMP/EWP/908/99.
180. Horn, M. et al., *Multiple Tests und Auswahlverfahren.* 1995, Stuttgart, Jena, New York: Fisher.
181. Horn, M. et al., *Manual for the determination of sample sizes for multiple comparisons - formulas and tables.* Informatik, Biometrie und Epidemiologie in Medizin und Biologie, 2001. **32**: p. 1-28.
182. R Development Core Team, *R: A language and environment for statistical computing,* 2008. R Foundation for Statistical Computing, http://www.R-project.org
183. International HapMap Project, http://www.hapmap.org
184. Ulgiati, D. et al., *Characterization of the CR2/CD21 proximal promoter: Functional role for AP1/AP2 sites and two adjacent Ebox motifs.* Faseb Journal, 2000. **14**(6): p. 1035.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt und somit zum Gelingen beigetragen haben. Im Besonderen danke ich …

….. Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Hemmer, der die Entwicklung dieser Arbeit mit wertvollen Anregungen und Ideen stets begleitet hat. Er ist mir mit seinem enormen Wissen und hohen Maß an Effektivität, seinem Enthusiasmus und seiner Aufrichtigkeit Vorbild in Klinik und Forschung.

….. Dr. rer. nat. Sabine Cepok für die besondere Zusammenarbeit, die vielen fachlichen Anregungen und inspirierenden Diskussionen, die mein wissenschaftliches Denken geschärft haben.

….. Rajneesh Srivastava, M. Sc., der für mich immer ansprechbar war und mich bezüglich dieser Arbeit jederzeit inhaltlich und methodisch unterstützt hat, für die spannenden Einblicke in die Proteinchemie, in Datenbanken und Programme.

….. Dun Zhou, Ph. D. für seine große Bereitschaft, mich bei den genetischen Experimenten zu unterstützen.

….. Verena Grummel für die besondere Einarbeitung ins Laborleben und die daraus entstandene, für mich sehr wichtige Freundschaft.

….. Sonja Hochgesandt für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung der ELISA-Experimente.

….. Dr. med. Dipl. Bioinf. Steve Hoffmann für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der genetischen Daten, insbesondere für seine große Geduld in unseren Diskussionen zur Multiplen Testtheorie und dem Exkurs in die Programmiersprache „R“.

….. PD Dr. med. Axel Methner für den Vorschlag und die Bereitstellung der verwendeten Software zur Auswertung der DNS-Sequenzen.

….. dem Neurowissenschaftlichen Graduiertenkolleg GK320 „Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Reifenberger für das begleitende lehrreiche Studienprogramm und die finanzielle Unterstüzung dieser Arbeit.

….. allen weiteren Mitarbeitern unserer Abteilung im Life Science Center für die gute Zusammenarbeit und die stets kollegiale Arbeitsatmosphäre.

….. meiner Familie dafür, dass sie mich beruflich und privat immer unterstützt und ein wesentlicher Teil meines Lebens ist.

….. meinem Freund Malte, weil er an mich glaubt, mein Leben bereichert und die Garantie dafür ist, jederzeit die nötige Ruhe und Kraft zum Erreichen meiner Ziele zu finden.