



Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Medizinische Fakultät

Rektor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. MA (Soz.) Alfons Labisch
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab

Immunpharmakologie der Multiplen Sklerose –
Wirkmechanismen aktueller und künftiger Therapieansätze

Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. med. Oliver Neuhaus

aus Köln

2006

„The surest way to lose a reputation in neurology is to advocate a treatment for multiple sclerosis.“ (H. Houston Merritt)

Diese Arbeit ist meiner Frau Eva und meinen Kindern Paula und Tom gewidmet, die sehr oft viel Geduld für mich aufbringen mussten.

Wesentliche Anteile dieser Habilitationsschrift wurden publiziert [1,2]. Besonderer Dank gilt meinen Mentoren Prof. Reinhard Hohlfeld und Prof. Hans-Peter Hartung.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	11
1.1. Multiple Sklerose	11
1.1.1. Epidemiologie	11
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese	12
1.1.3. Klinische Manifestation	15
1.1.4. Zusatzbefunde	15
1.1.5. Diagnosekriterien	16
1.2. Therapie der Multiplen Sklerose	17
1.2.1. Therapie des akuten Schubes	18
1.2.2. Symptomatische Therapie	19
1.2.3. Immunmodulierende Langzeittherapie	19
1.2.4. Immunsuppressive Langzeittherapie	20
1.2.5. Künftige Therapieansätze	20
1.2.5.1. Adhäsionsmolekülantikörper	21
1.2.5.2. Statine	22
1.3. Wirkmechanismen von Therapeutika gegen Multiple Sklerose	24
1.3.1. Warum Wirkmechanismen?	24
1.3.2. Bisherige Kenntnisse	24
1.3.2.1. Interferon- β	26
1.3.2.2. Glatiramerazetat	26
1.3.2.3. Mitoxantron	28
1.3.2.4. Adhäsionsmolekülantikörper	29
1.3.2.5. Statine	29
1.4. Fragestellung	31
2. Material und Methoden	32
2.1. Patienten und Kontrollen	32

2.2.	Reagenzien und Medien	33
2.3.	Zellkultur	34
2.3.1.	T-Zell-Linien	35
2.3.2.	PBL-Kurzkultur	36
2.3.3.	B-Lymphozytenkultur	37
2.3.4.	Monozytenkultur	37
2.4.	Durchflusszytometrie	37
2.4.1.	Expression von Oberflächenmarkern	37
2.4.2.	Intrazelluläre Expression von Zytokinen	39
2.5.	Proliferationsmessung	41
2.6.	Zelltodmechanismen	41
2.7.	ELISA	42
2.8.	Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Glatiramerazetat	43
3.1.1.	Isolation und Charakterisierung GA-reaktiver TZL: keine Kreuzproliferation mit MBP	43
3.1.2.	Querschnittstudie: das Zytokinprofil GA-reaktiver TZL ist bei GA-behandelten MS-Patienten vornehmlich TH-2, bei unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen vornehmlich TH-1	44
3.1.3.	Längsschnittstudie: das Zytokinprofil GA-reaktiver TZL vor und unter GA-Behandlung ist heterogen	51
3.1.4.	Zytokinsekretion GA-reaktiver TZL nach Kreuzstimulation mit MBP	52
3.2.	Mitoxantron	54
3.2.1.	Antigen-spezifische und -unspezifische Proliferation wird durch Mitoxantron inhibiert	54
3.2.2.	Mitoxantron hat keinen signifikanten Einfluss auf Oberflächenmarker und die Expression intrazellulärer Zytokine	56

3.2.3.	Mitoxantron verursacht apoptotischen Zelltod in niedrigen und nekrotischen Zelltod in hohen Konzentrationen	58
3.3.	Statine	62
3.3.1.	Statine reduzieren die Proliferation von T-Lymphozyten, aber nicht die von B-Lymphozyten	62
3.3.2.	Die T-Lymphozyten-Proliferation wird durch Inhibierung der Isoprenylierung gehemmt	64
3.3.3.	Statine beeinflussen Oberflächenmarker in aktivierten, aber nicht in nicht aktivierten T-Lymphozyten	65
4.	Diskussion	70
4.1.	Glatiramerazetat	70
4.2.	Mitoxantron	74
4.3.	Statine	79
4.4.	Schlussfolgerungen und Aussichten	84
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	88-100

Abkürzungsverzeichnis

Wegen der auch in der deutschsprachigen Literatur oft üblichen Anwendungsweise englischer Abkürzungen werden diese auch hier mit einem Hinweis auf die englische Bedeutung verwendet.

Abkürzung	Bedeutung	Englische Bedeutung
Ag	Antigen	<i>Antigen</i>
APC	Antigen präsentierende Zellen	<i>Antigen presenting cells</i>
BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
CIITA-IV	Klasse-II-Transaktivator-IV-Promoter	<i>Class II transactivator IV promoter</i>
COP	Copolymer-1	<i>Copolymer-1</i>
cpm	β -Zerfälle pro Minute	<i>Counts per minute</i>
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EDSS	Erweiterte Skala des Grades der Behinderung	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	<i>Ethylenediaminetetraacetate</i>
ELISA	Enzym-verbundener Immunassay (Nachweis von Zytokinen in Überständen)	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	Enzym-verbundener Immunassay (Nachweis Zytokin sezernierender Einzelzellen)	<i>Enzyme linked immunospot assay</i>
FITC	Fluoreszeineisothiozyanat	<i>Fluoresceineisothiocyanate</i>
FTI	Farensyltransferase-Inhibitor	<i>Farensyl transferase inhibitor</i>
GA	Glatirameracetat	<i>Glatiramer acetate</i>
GGTI	Geranylgeranyltransferase-Inhibitor	<i>Geranylgeranyl transferase inhibitor</i>
GTP	Guanosintriphosphat	<i>Guanosinetriphosphate</i>
HD	Gesunde Kontrollperson	<i>Healthy donor</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen	<i>Human leukocyte antigen</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A	<i>3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A</i>
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon	<i>Interferon</i>
Ig	Immunglobulin	<i>Immunoglobulin</i>
IL	Interleukin	<i>Interleukin</i>
IVIg	Intravenöse Immunglobuline	<i>Intravenous immunoglobulins</i>

LFA	Leukozyten-Funktionsantigen	<i>Leukocyte function antigen</i>
MBP	Basisches Myelinprotein	<i>Myelin basic protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MRT	Magnetresonanztomographie	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MS	Multiple Sklerose	<i>Multiple sclerosis</i>
MSFC	Zusammengesetzte MS-Funktionsskala	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe	<i>Multiple sclerosis therapy consensus group</i>
NAA	N-acetyl-aspartat	<i>N-acetyl aspartate</i>
NK	Natürliche Killer (-Zelle)	<i>Natural killer (cell)</i>
NO	Stickstoffmonoxid	<i>Nitric oxide</i>
n.d.	Nicht durchgeführt	<i>Not determined</i>
ns	Nicht signifikant	<i>Not significant</i>
OG	Oligodendrozyt	<i>Oligodendrocyte</i>
PBL	Periphere Blutlymphozyten	<i>Peripheral blood lymphocytes</i>
PE	Phycoerythrin	<i>Phycoerithrin</i>
PFA	Paraformaldehyd	<i>Paraformaldehyde</i>
PHA	Phytohämagglutinin	<i>Phytohemagglutinine</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-azetat	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie	<i>Progressive multifocal leukencephalopathy</i>
PPMS	Primär chronisch progredient verlaufende Multiple Sklerose	<i>Primary progressive multiple sclerosis</i>
PRMS	Progredient verlaufende Multiple Sklerose mit aufgesetzten Schüben	<i>Progressive relapsing multiple sclerosis</i>
PWM	Pokeweed-Mitogen	<i>Pokeweed mitogen</i>
RRMS	Schubförmig verlaufende Multiple Sklerose	<i>Relapsing remitting multiple sclerosis</i>
SI	Stimulationsindex	<i>Stimulation index</i>
SPMS	Sekundär chronisch progredient verlaufende Multiple Sklerose	<i>Secondary progressive multiple sclerosis</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor	<i>T-cell receptor</i>
TdT	Terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT)	<i>Terminal deoxynucleotide transferase</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor	<i>Transforming growth factor</i>
TH	T-Helfer (-Zelle)	<i>T helper (cell)</i>
TNF	Tumornekrosefaktor	<i>Tumor necrosis factor</i>
TT	Tetanustoxoid	<i>Tetanus toxoid</i>

TZL	T-Zell-Linie	<i>T-cell line</i>
VLA	Sehr spät (exprimiertes) Antigen	<i>Very late antigen</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem	<i>Central nervous system</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathogenetisches Konzept der MS
Abbildung 2	MRT-Veränderungen bei MS
Abbildung 3	Stufenschema der Therapie der MS nach MSTKG
Abbildung 4	Eigenschaften von Glatiramerazetat
Abbildung 5	Eigenschaften von Mitoxantron
Abbildung 6	Eigenschaften der Statine
Abbildung 7	Gewinnung von T-Zell-Linien
Abbildung 8	Bestimmung des Zytokinprofils durch intrazelluläre Durchflusszytometrie
Abbildung 9	Proliferation GA- und MBP-reaktiver TZL
Abbildung 10	Zytokinprofil GA-reaktiver TZL
Abbildung 11	Zytokinprofil GA-, TT- und PPD-reaktiver TZL
Abbildung 12	Proliferation und Zytokinsekretion GA-reaktiver TZL nach Kreuzstimulation durch MBP
Abbildung 13	Einfluss von Mitoxantron auf die Lymphozyten-Proliferation
Abbildung 14	Einfluss von Mitoxantron auf Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation
Abbildung 15	Zelltodmechanismen bei Mitoxantron
Abbildung 16	Einfluss der Statine auf die Lymphozyten-Proliferation
Abbildung 17	Kontrollexperimente: Statine und Proliferation
Abbildung 18	Phänotypische Effekte der Statine
Abbildung 19	Hypothetischer Wirkmechanismus von Glatiramerazetat
Abbildung 20	Hypothetische Wirkorte von Mitoxantron
Abbildung 21	Hypothetischer Wirkmechanismus der Statine

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Wirkmechanismen aktueller und künftiger Therapeutika gegen MS
Tabelle 2	Immunologische Effekte von Statinen
Tabelle 3	Charakteristika der untersuchten MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen
Tabelle 4	Verwendete Reagenzien
Tabelle 5	Verwendete monoklonale Antikörper zur Durchflusszytometrie
Tabelle 6	Phänotypische Effekte von Mitoxantron
Tabelle 7	Phänotypische Effekte von Lovastatin

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste zu bleibender Behinderung führende neurologische Erkrankung des jüngeren Erwachsenenalters [3]. Seit Erstbeschreibung der Erkrankung vor über 170 Jahren durch J. Cruveilhier („sclérose en taches, en îles par masses disséminées“) [4] haben sich die pathogenetischen Konzepte kontinuierlich verändert. Insbesondere seit den 1990er Jahren konnten hierbei bedeutende Fortschritte erzielt werden [5].

- Entzündung weist nicht nur destruktive, sondern auch neuroprotective Eigenschaften auf (das Konzept der „neuroprotektiven Immunität“ [6]).
- Im Gegensatz zu früheren Theorien wird die Mehrheit der in MS-Läsionen vorhandenen T-Lymphozyten durch CD8-positive Zellen gebildet [7].
- Axonaler Schaden ist verantwortlich für permanente Behinderung [8,9].

Parallel zu den neuen pathogenetischen Erkenntnissen wurde das therapeutische Arsenal für die Patienten erheblich erweitert.

- Zur Therapie der schubförmig verlaufenden MS stehen mehrere immunmodulierende Wirkstoffe zur Verfügung [10].
- Auch für die Behandlung der sekundär chronisch progredienten MS liegen Immuntherapien vor [10].
- Neue viel versprechende therapeutische Konzepte sind in Entwicklung [5,11,12].

1.1.1. Epidemiologie

In Deutschland liegt die Prävalenz der MS bei 100/100000 Einwohner, insgesamt sind also etwa 80000 Menschen an MS erkrankt. Weltweit sind mehr als eine Million Menschen betroffen. Die sozioökonomischen Kosten der MS liegen allein in Deutschland jährlich im Milliarden-Euro-Bereich [13].

1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

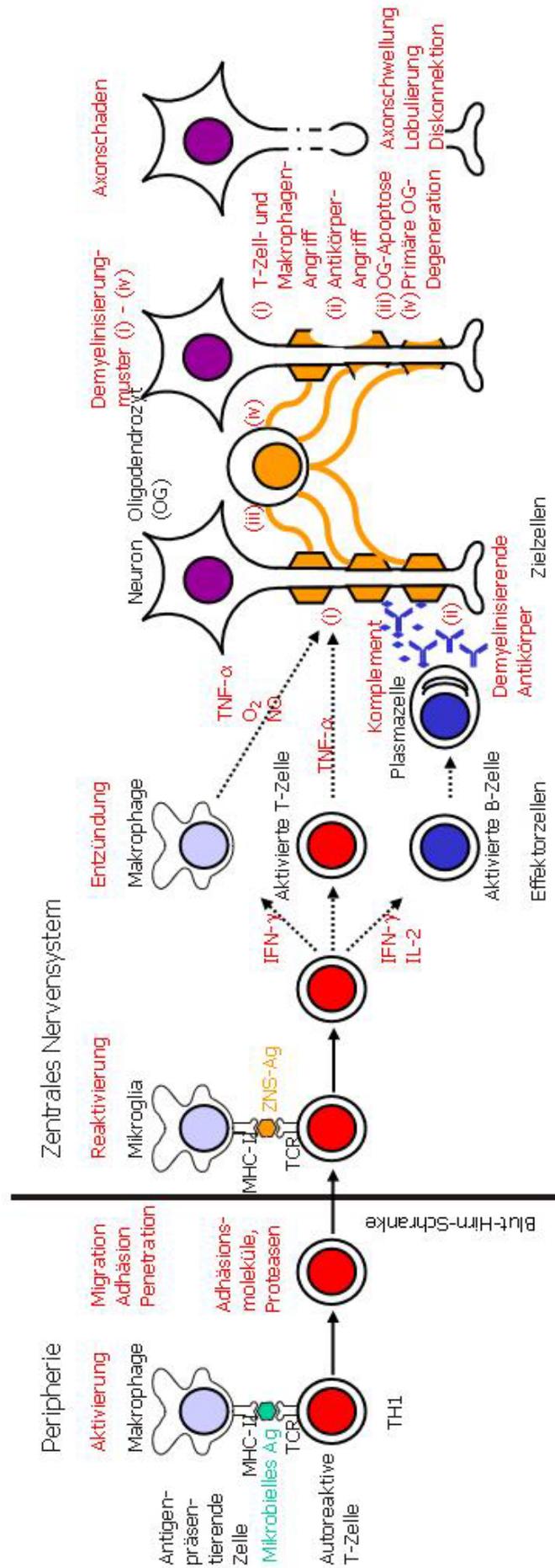
Eine Vielzahl immunologischer Veränderungen werden bei MS beschrieben, was auf eine zentrale Rolle des Immunsystems in der Pathogenese hinweist [14-16]. Immunantworten tragen zur Bildung und zum Erhalt der MS-Läsion bei [17]; auf der anderen Seite wurden auch neuroprotektive Effekte der Neuroinflammation beobachtet ("neuroprotektive Immunität") [6]. Parallel zur Entzündung im zentralen Nervensystem werden als pathologische Hauptelemente auch Demyelinisierung (also Entmarkung der die Axone umhüllenden Markscheiden, die durch die Oligodendrozyten gebildet werden) sowie eine Schädigung der Axone selbst (Neurodegeneration) beschrieben [3,15].

Eine Übersicht über das gegenwärtige pathogenetische Konzept der MS wird in **Abbildung 1** gezeigt [18]. Alle Menschen tragen T-Lymphozyten in sich, die für Antigene des Zentralen Nervensystems (ZNS) autoreaktiv sind. Bei Individuen mit einer genetisch determinierten Suszeptibilität für MS (MS wird als polygenetische Erkrankung angesehen [19,20]) kommt es durch bisher ungeklärte Mechanismen zu einem „Toleranzverlust“ und zu einer Aktivierung dieser autoreaktiven T-Lymphozyten, möglicherweise durch so genanntes molekulares Mimikry, also Kreuzreaktion zwischen ZNS-Autoantigenen und mikrobiellen Antigenen [21]. Diese aktivierten ZNS-autoreaktiven T-Zellen sind in der Lage, auch eine intakte Bluthirnschranke zu überwinden und das ZNS zu erreichen [22]. Hier werden sie reaktiviert und sezernieren pro-entzündliche Mediatoren, was eine entzündliche Kaskade auslöst, an der nicht nur T-Lymphozyten vom CD4⁺ T-Helfer-Typ und zytotoxischen CD8⁺-Typ [23], sondern auch B-Lymphozyten und Makrophagen beteiligt sind. Folge ist die Zerstörung der Myelinschicht, die nach pathologischen Gesichtspunkten insgesamt vier Mustern folgt [17]:

1. T-Zell- und Makrophagen-assoziierte Demyelinisierung;
2. Antikörper-medierte Demyelinisierung mit Komplementaktivierung;
3. Distale Oligodendrozytenschädigung mit Apoptose (programmiertem Zelltod) der Oligodendrozyten;
4. Primäre Oligodendrozytendegeneration.

Parallel zu dieser autoaggressiven entzündlichen die Demyelinisierung verursachenden Phase tritt axonaler Schaden auf, der für die irreversible Behinderung verantwortlich ist. Axonaler Schaden wird bereits früh in der Krankheitsentwicklung beobachtet und nimmt im weiteren Krankheitsverlauf eine zunehmend dominierende Rolle ein [8,15,24,25]. Bisher ist es unklar, ob der axonale Schaden Folge eines primären aktiven Zerstörungsprozesses der Axone durch Makrophagen oder zytotoxische CD8⁺ T-Zellen ist oder ob er eine pathologische Reaktion der Axone auf die Demyelinisierung ist [8]. Auch wird ein primär neurodegenerativer Prozess als Ursache des axonalen Schadens bei MS mit möglicherweise sekundärer Entzündung diskutiert [25]. Axonaler Schaden beginnt mit einer erhöhten Membranpermeabilität mit konsekutiv erhöhtem Kalziumeinfluss. Hierunter kommt es zu gestörtem axonalem Transport und zu Veränderung der Zytoarchitektur mit Schwellung, Läppchenbildung und schließlich Kontinuitätsunterbrechung [26].

Folgende Seite: **Abbildung 1.** Pathogenetisches Konzept der MS. Über ihren T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR) werden pro-entzündliche T-Lymphozyten in der Peripherie durch fremde oder eigene Antigene (Ag), die auf Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC; z.B. Makrophagen) auf ihrem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*) Klasse II (MHC-II) präsentiert werden, aktiviert. Die aktivierten T-Lymphozyten migrieren zur Bluthirnschranke, adhären hier und penetrieren sie. Für diesen Schritt sind Adhäsionsmoleküle, Proteasen und Chemokine verantwortlich. Innerhalb des Zentralen Nervensystems (ZNS) werden die T-Lymphozyten durch ZNS-Ag reaktiviert, die auf MHC-II durch andere APC, vor allem Mikroglia-Zellen, präsentiert werden. Die reaktivierten T-Lymphozyten sezernieren pro-entzündliche Zytokine wie Interferon (IFN)- γ oder Interleukin (IL)-2 und verursachen eine Entzündung des ZNS durch die Aktivierung von Makrophagen, anderen T-Zellen und B-Lymphozyten. Makrophagen und T-Lymphozyten greifen die Myelinscheide der Oligodendrozyten (OG) an, indem sie zytotoxische Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Sauerstoffradikale (O₂) und Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen. B-Zellen differenzieren sich in Plasmazellen, die demyelinisierende Antikörper sezernieren. Diese können Makrophagen aktivieren und die Komplementkaskade initiieren, die schließlich zu Zerstörungen der Myelinmembranen führt. Aus [18].



1.1.3. Klinische Manifestation

Prinzipiell kann MS jeden Teil des ZNS betreffen und deshalb – dem Namen entsprechend – zu multiplen, bei jedem Patienten unterschiedlichen, klinischen Manifestationen führen. Hauptsymptome sind Seh-, Gang-, und Koordinationsstörungen, motorische und sensible Ausfälle sowie Beeinträchtigungen der Harnblasenentleerung. Auch kognitive Einschränkungen sowie Fatigue-Symptome sind häufig. Die klinischen Verlaufsformen der MS wurden durch internationalen Konsensus definiert [27]. Etwa 85 % der Patienten haben als Erstmanifestation einen oder mehrere so genannte Schübe (neurologische Störung, die mehr als 24 Stunden andauert) mit anschließender vollständiger oder unvollständiger Erholung. Diese klinische Form wird schubförmig verlaufende MS genannt (*relapsing-remitting MS*, RRMS). Über einen Zeitraum von zehn Jahren verändert sich der Verlauf in 50 % dieser Patienten in einen graduell chronisch progredienten Verlauf mit oder ohne aufgesetzte Schübe. Diese klinische Form wird sekundär chronisch progredient verlaufende MS (*secondary progressive MS*, SPMS) genannt. Etwa 10 % der Patienten haben einen Verlauf, der von Anfang an progredient ist ohne schubförmige Verschlechterungen, die primär chronisch progredient verlaufende MS (*primary progressive MS*, PPMS). Die seltenste Form (etwa 5 %) ist durch einen primär progredienten Verlauf mit später aufgesetzten Schüben gekennzeichnet. Diese klinische Form wird als progredient verlaufende MS mit aufgesetzten Schüben (*progressive-relapsing MS*, PRMS) bezeichnet.

1.1.4. Zusatzbefunde

Neben den klinischen Manifestationen liegen regelhaft eine Reihe Auffälligkeiten in zusatzdiagnostischen Untersuchungen vor. Die wichtigste technische Untersuchung bei MS ist die Magnetresonanztomographie (MRT), die neben Ausmaß und Anzahl entzündlicher Läsionen auch Aussagen über deren Aktivität treffen kann (**Abbildung 2**) [28]. Auch lassen sich lokale (so genannte „*black holes*“ in der T1-Wichtung) und globale (Atrophie) Prozesse axonalen Schadens erfassen. Einen weiterhin wichtigen Stellenwert nehmen die visuell, akustisch, motorisch sowie somatosensibel evozierten

Potenziale ein, die mit hoher Sensitivität auch subklinische Beeinträchtigungen der entsprechenden Bahnen (Sehbahn, Hörbahn, Pyramidenbahn und Afferenzen) messen können [29]. Die Liquoruntersuchung zeigt oft eine leichte Pleozytose und Befunde einer Schrankenstörung sowie zu mehr als 95 % mit positiven oligoklonalen Immunglobulin-Banden in der isoelektrischen Fokussierung den Hinweis auf eine autochthone intrathekale Immunglobulin-Synthese [30].

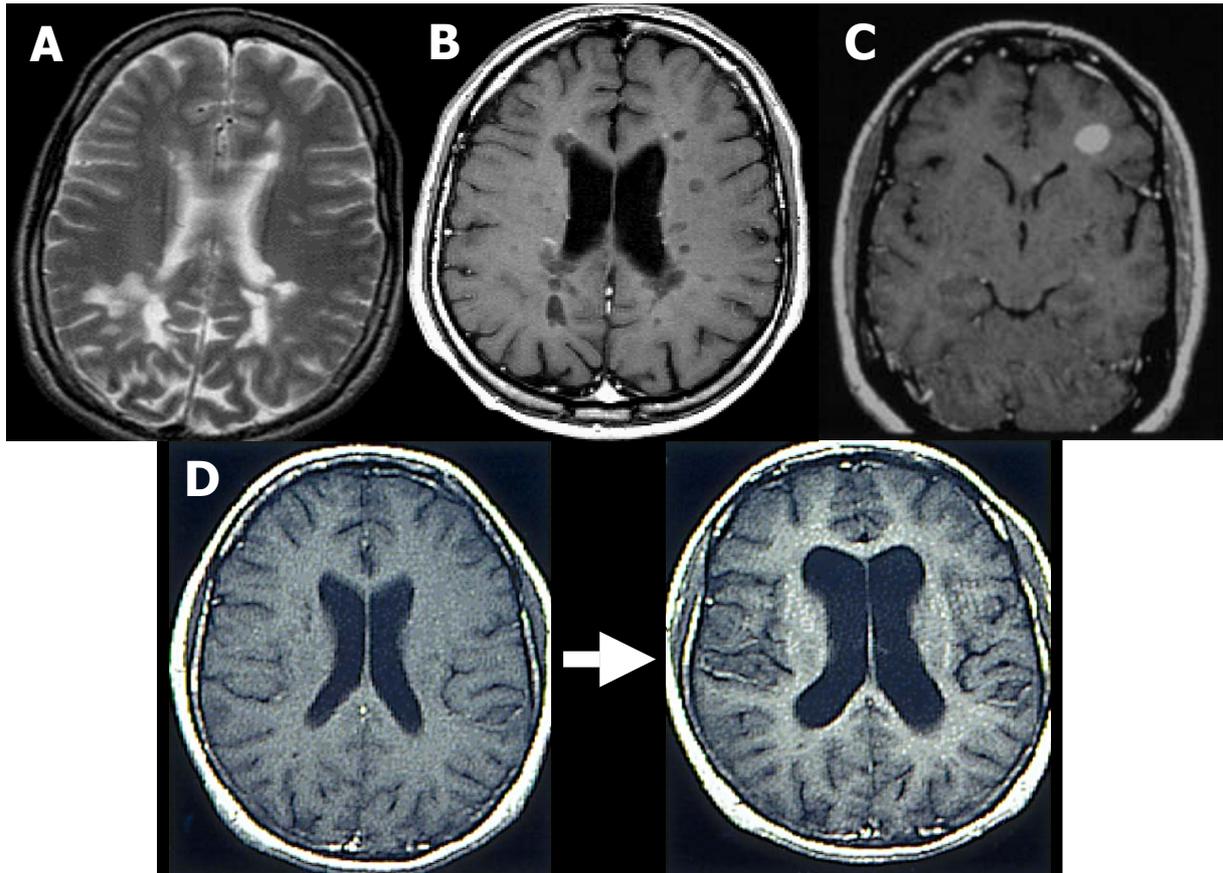


Abbildung 2. MRT-Veränderungen bei MS. (A) Konfluierende Läsionen in der T2-Wichtung. (B) Lokaler axonaler Schaden („black holes“ in der T1-Wichtung). (C) Kontrastmittel aufnehmende Läsion in der T1-Wichtung als Zeichen aktiver Entzündung mit Bluthirnschrankenstörung. (D) Entwicklung globalen axonalen Schadens (Hirnatrophie) eines MS-Patienten über fünf Jahre.

1.1.5. Diagnosekriterien

Keiner der zusatzdiagnostischen Befunde ist spezifisch für MS, weshalb die Diagnose anhand definierter Kriterien zu stellen ist. Gegenwärtig gültig sind die Diagnosekriterien nach McDonald, die 2005 überarbeitet wurden [31,32], in denen

klinisch und/oder MRT-morphologisch sowohl örtliche als auch zeitliche Dissemination vorliegen müssen, um die Diagnose MS stellen zu können.

1.2. Therapie der Multiplen Sklerose

Da MS als chronische Erkrankung eine chronische Behandlung erforderlich macht, ist die optimale Behandlungsstrategie für jeden einzelnen Patienten oft schwierig zu treffen. Zur Vereinfachung der Therapieentscheidung liegen Empfehlungen der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) der Ärztlichen Beiräte der deutschen, österreichischen und schweizerischen MS-Gesellschaften vor, die regelmäßig aktualisiert werden und denen sich mittlerweile auch MS-Gesellschaften anderer Länder angeschlossen haben [10,33-35]. Grundprinzip ist dabei ein Stufenschema, anhand dessen je nach Wirksamkeit die Therapie verschärft werden („Eskalation“) oder auch bei klinischer Stabilisierung eine Deeskalation erfolgen kann (**Abbildung 3**).

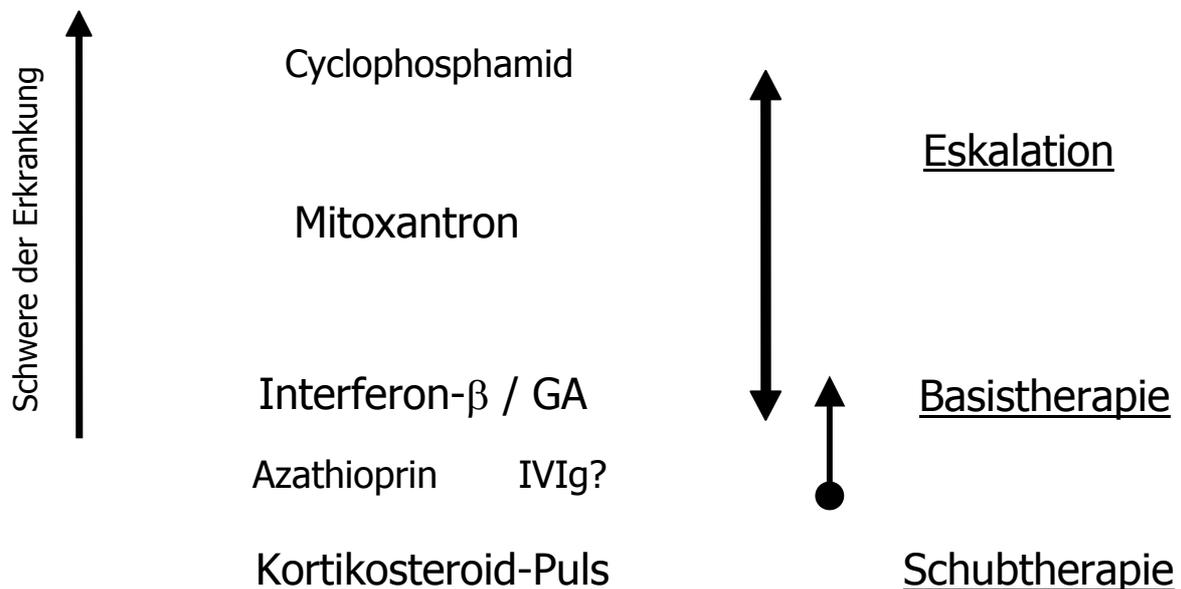


Abbildung 3. Stufenschema der Therapie der MS nach MSTKG. Schübe werden mit einem Kortikosteroid-Puls behandelt. Als immunmodulatorische Basistherapie stehen als Mittel der ersten Wahl drei Interferon-β-Präparate und Glatiramerazetat (GA) zur Verfügung. Mittel der zweiten Wahl sind Azathioprin und intravenöse Immunglobuline (IVIg). Ist eine Eskalation erforderlich, also bei zunehmender Schwere der Erkrankung trotz Basistherapie, wird Mitoxantron empfohlen. Cyclophosphamid dient als Reservemittel, falls trotz Mitoxantrons eine weitere Eskalation notwendig wird. Aus [10].

Lange Zeit standen in pharmakologisch-therapeutischer Hinsicht lediglich Glukokortikosteroide zur Verfügung, die als erstes therapeutisches Standbein die Schubdauer verkürzen und die Schubintensität reduzieren. Langzeitmedikamente konnten nur „Off Label“, also ohne Zulassung für diese Indikation, verschrieben werden. Ein zweites, für einen großen Anteil der Betroffenen (vor allem in chronisch progredienten Stadien) nach wie vor wichtigstes therapeutisches Standbein war und ist die symptomatische Behandlung der MS [36]. Seit den 1990er Jahren hat sich als drittes Standbein der pharmakologischen MS-Therapie die immunmodulierende bzw. immunsuppressive Langzeittherapie mit den zugelassenen Wirkstoffen Interferon (IFN)- β oder Glatirameracetat bzw. mit Mitoxantron etabliert. Das Immunsuppressivum Azathioprin ist in Deutschland ebenfalls für die Behandlung der MS zugelassen, hat jedoch wegen relativ schwacher Evidenzlage gegenüber den anderen Medikamenten an Bedeutung verloren. Für die immunmodulierend wirkenden intravenösen Immunglobuline (IVIg), laut MSTKG Mittel der zweiten Wahl, liegt gegenwärtig keine Zulassung zur Behandlung der MS vor.

Neben den genannten drei pharmakologischen Therapiestrategien dürfen die nicht pharmakologischen Ansätze nicht unerwähnt bleiben, die den Kernbestandteil der Rehabilitation von MS-Patienten darstellen.

1.2.1. Therapie des akuten Schubes

Glukokortikosteroide sind nach wie vor Mittel der ersten Wahl zur Behandlung von Schüben mit dem Ziel, die Schubintensität und die Schubdauer einzudämmen. Intravenöse Gabe von 1000 mg Methylprednisolon an drei bis fünf aufeinander folgenden Tagen wird empfohlen [10].

1.2.2. Symptomatische Therapie

Vor allem in fortgeschrittenen Stadien der MS, die mit axonalem Schaden vergesellschaftet sind, steht die symptomatische Therapie im Vordergrund [37]. Auch wenn hierdurch keine kausale Behandlung erfolgt, ist oftmals eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität zu erzielen. Beispiele sind Spastik oder Blasenentleerungsstörungen. Andere Symptome wie Ataxie oder Fatigue sind häufig weniger gut medikamentös beeinflussbar. Kürzlich wurde eine ausführliche Empfehlung der MSTKG verfasst [36]. Bei den meisten Symptomen greifen auch nicht pharmakologische Behandlungen wie Physiotherapie oder Ergotherapie.

1.2.3. Immunmodulierende Langzeittherapie

Ziel von langzeittherapeutischen Strategien der MS ist neben der Verkürzung und Abmilderung von Schüben sowie der Reduktion der Schubfrequenz ein positiver Einfluss auf das Fortschreiten der Behinderung, also auf die Krankheitsprogression. Immunomodulatoren unterdrücken im Gegensatz zu Immunsuppressiva das Immunsystem nicht generell, sondern verschieben die Immunantwort von einem pro-entzündlichen Milieu (durch T-Helfer (TH)-1-Zytokine vermittelt), zu einem anti-entzündlichen Milieu (durch TH-2-Zytokine vermittelt) [38].

Drei IFN- β -Präparate (IFN- β 1a, Avonex[®] und Rebif[®]; IFN- β 1b, Betaferon[®]) [39-41] sowie Glatiramerazetat (Copaxone[®]) [42,43] weisen immunmodulatorische Wirkungen auf und wurden in mehreren Plazebo-kontrollierten Studien untersucht. Die Evidenzlage bezüglich ihrer Wirkung auf die Schubfrequenz und ihrer MRT-Effekte ist hoch (Klasse-I-Evidenz). Für die beiden IFN- β 1a-Präparate wurde außerdem für die Studiendauer ein signifikant verlangsamender Effekt auf die Krankheitsprogression gezeigt [40,41]. Ob die immunmodulierende Behandlung darüber hinaus spätere Behinderung verhindert, ist für alle Präparate aus mehreren Gründen weiterhin nicht sicher geklärt, zumal Schubrate und Entzündung zu Beginn der Erkrankung nur gering mit dem späteren Grad der Behinderung korrelieren [44]. Die Dauer der meisten Studien ist zu kurz, um anhaltende Veränderungen des Behinderungsgrades zu messen. Längere Plazebo-kontrollierte Studien sind jedoch

aus ethischen Gründen nicht realisierbar. Zusätzlich sind die Zielparameter zum Erfassen des Grades der Behinderung, darunter in erster Linie *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) [45] und *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) [46], aufgrund ihrer jeweiligen Schwächen nicht unumstritten. MRT-Parameter sind zwar bei der Beurteilung von Medikamentenwirkungen essenziell, deren Korrelation mit der Krankheitsprogression befindet sich jedoch weiterhin in der Validierungsphase [47].

1.2.4. Immunsuppressive Langzeittherapie

Immunsuppressiva sind Inhibitoren essenzieller Komponenten des Immunsystems, die zu einer generalisierten immunologischen Funktionsstörung führen. Die erwünschten anti-entzündlichen Effekte werden durch unerwünschte Nebenwirkungen wie erhöhtes Tumor- oder Infektionsrisiko relativiert. Mitoxantron (Ralenova[®]) steht in der Eskalation der Behandlung von Patienten mit aktiven Formen schubförmig verlaufender oder sekundär chronisch progredienter MS an vorderer Stelle [33,34] und weist mit Klasse-I-Evidenz Wirksamkeit bei diesen aktiven Verlaufsformen auf [48,49].

1.2.5. Künftige Therapieansätze

Die drei Standbeine der MS-Therapie haben in den letzten Jahren zu einer erheblichen Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten der MS geführt, in vielen Fällen bleibt das Therapieergebnis jedoch weiterhin leider unbefriedigend. Schübe können oft nicht vollständig verhindert werden (die Reduktion der Schubrate bei allen zugelassenen Immunmodulatoren liegt nur bei etwa 30 %). Problematisch bleibt darüber hinaus die oft nicht aufzuhaltende Krankheitsprogression. Schubbehandlung und immunmodulierende bzw. -suppressive Therapie beeinflussen vornehmlich die entzündlichen Vorgänge in der Pathogenese der MS. Nicht direkt beeinflusst werden die Demyelinisierung sowie der axonale Schaden, der mit der Behinderungsprogression korreliert [8,9]. Für viele Patienten ist ein weiteres Problem die parenterale Applikation der Immunmodulatoren mit teils lokalen oder systemischen Nebenwirkungen.

Neue Therapieansätze versuchen, die Defizite der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Wirkstoffe zu reduzieren. Übersichten über neue viel versprechende therapeutische Konzepte werden in [5,11,12] wiedergegeben. Exemplarisch sollen zwei Kandidaten diskutiert werden.

1.2.5.1. Adhäsionsmolekülantikörper

Adhäsionsmoleküle umfassen mehrere Molekülfamilien, die für im Prinzip alle zellulären Interaktionen von Bedeutung sind [50,51]. Hierzu zählen u.a. die Selektine, die Integrine und die Cadherine. Antikörper gegen einzelne Adhäsionsmoleküle können wesentliche Schritte der MS-Pathogenese blockieren, dabei in erster Linie die Lymphozytenmigration. In der klinischen Prüfung an vorderster Stelle steht Natalizumab [52], ein "humanisierter" monoklonaler Antikörper gegen α 4-Integrin (*Very late antigen*, VLA-4). „Humanisiert“ bedeutet, dass ein Maus-Antikörper-Klon mit einem humanen Immunglobulinfragment verbunden wird, um die Immunogenität zu reduzieren [52]. Die Effektivität von Natalizumab wurde in klinischen Phase-II-Studien gezeigt [53,54], und auch die Einjahresdaten bisher gelaufener kontrollierter Phase-III-Studien von Natalizumab bei schubförmig verlaufender MS waren viel versprechend. In einer Monotherapie-Studie wurde die Schubfrequenz im Vergleich zu Placebo um 66 % gesenkt. In einer Kombinationsstudie mit Interferon- β 1a, in der Patienten, bei denen unter bestehender Therapie mit Avonex[®] ein oder mehrere Schübe aufgetreten waren, randomisiert wurden und zusätzlich Natalizumab oder Placebo erhielten, reduzierte Natalizumab im Vergleich zu Placebo die Schubrate um 54 %. Seit November 2004 war Natalizumab in den USA zur Behandlung der schubförmig verlaufenden MS zugelassen [55]. Leider musste das Medikament bereits Ende Februar 2005 vom Markt genommen werden, da bei insgesamt drei behandelten Patienten als Nebenwirkung eine schwere entzündliche ZNS-Erkrankung, die viral vermittelte Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML), aufgetreten war. Gegenwärtig wird das Risikoprofil von Natalizumab evaluiert, um die Behandlungschance dieses wirksamen Medikamentes bei MS zu beurteilen [56].

1.2.5.2. Statine

Statine sind Hemmstoffe des bei der Bildung von Cholesterin notwendigen Enzyms 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase und werden seit fast zwei Jahrzehnten weit verbreitet als Cholesterinsenker verschrieben. Das gut bekannte Nebenwirkungsprofil der Statine ist gering und umfasst neben einem dosisabhängigen Transaminasenanstieg (ca. 2 %) auch eine dosisunabhängige Myopathie (ca. 0.5 %), die in sehr seltenen Fällen zu einer schweren Rhabdomyolyse führen kann.

Innerhalb kurzer Zeit sind mehrere Arbeiten erschienen, die belegten, dass Statine bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der MS, das Ausbrechen der Krankheit verhinderten oder ihren Verlauf abmilderten sowie die histopathologischen Veränderungen deutlich reduzierten [57-61]. Auf immunologischer Ebene wurde jeweils beobachtet, dass Statine dabei zu einer Verschiebung eines pro-entzündlichen zu einem anti-entzündlichen Milieu beitragen, also immunmodulierend wirken. In einer anderen Studie wurden die immunologischen Effekte von Statinen auf menschliche Blutzellen *in vitro* untersucht [62]. Auch hier wurde überwiegend die bei der EAE beobachtete Verschiebung von pro-entzündlich nach anti-entzündlich dokumentiert, teilweise fanden sich allerdings auch bei der MS ungewünschte pro-inflammatorische Effekte der Statine (Steigerung der Sekretion von IFN- γ und Interleukin (IL)-12). Im direkten Vergleich mit IFN- β 1b hatten Statine interessanterweise nicht nur ähnliche immunologische Wirkungen, sondern in der Kombination sogar additive Effekte. Dies weist auf die Möglichkeit einer Kombinationstherapie der MS aus einem Immunmodulator mit einem Statin hin.

Inzwischen liegen auch Ergebnisse von zwei kleinen klinischen Studien über Statine bei MS vor.

- In einer offenen Studie wurden sieben Patienten mit schubförmiger MS und mindestens zwei Schüben innerhalb von zwei Jahren für 12 Monate mit 20 mg Lovastatin 1 x täglich per os behandelt. Ernsthaftige Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Auch wenn es bei den wenigen Patienten unter der

niedrigen Lovastatin-Dosis keine klinischen Veränderungen gab, so wurden doch partielle MRT-Therapieeffekte beobachtet [63].

- In einer offenen einarmigen Studie wurden 28 Patienten mit schubförmig verlaufender MS untersucht, die während einer 3-monatigen Beobachtungsphase mit monatlichen MRT-Untersuchungen mindestens eine Kontrastmittel anreichernde Läsion (siehe **Abbildung 2**) aufwiesen. Diese Patienten erhielten 80 mg Simvastatin 1 x täglich per os, die höchste zugelassene Tagesdosis, für sechs Monate. Serielle MRT-Untersuchungen in den Monaten 4, 5 und 6 zeigten eine signifikante Abnahme der mittleren Anzahl sowie des mittleren Volumens der neuen Kontrastmittel aufnehmenden Läsionen um 44 % bzw. um 41 %. Klinische Veränderungen wurden nicht beobachtet, das Medikament wurde gut vertragen [64].

Zur weiteren Evaluierung der Statine bei MS sind prospektive, Plazebo-kontrollierte klinische Studien dringend erforderlich. Sie werden zeigen, ob die Cholesterinsenker – entweder in Kombination mit einem etablierten immunmodulatorischen Medikament oder alleine – eine neue wirksame Therapieoption bei MS darstellen [65]. Gegenwärtig ist bezüglich der klinischen Einschätzung von Statinen bei MS die Evidenzlage aber noch erheblich zu schwach. Vor einer Therapieempfehlung sind deshalb unbedingt die Ergebnisse dieser prospektiven kontrollierten Studien abzuwarten.

Im Falle positiver Studienergebnisse wären die besonderen Vorteile eines Einsatzes von Statinen bei MS:

- additive Effekte zu etablierten immunmodulierenden Medikamenten;
- orale Applikation;
- durch langjährige Erfahrungen der etablierten Statine gut bekanntes, bis auf die seltene Rhabdomyolyse relativ geringes Nebenwirkungsprofil.

1.3. Wirkmechanismen von Therapeutika gegen Multiple Sklerose

1.3.1. Warum Wirkmechanismen?

Aus drei Gründen ist es von großer Bedeutung, Kenntnisse über die Wirkmechanismen der gegen die MS eingesetzten Wirkstoffe zu besitzen:

1. Sinnvolle Kombinationen lassen sich herausarbeiten, indem synergistische Effekte gefördert und sich behindernde Effekte vermieden werden. Ein wesentlicher Punkt liegt auch in der Kenntnis toxischer Effekte, die in möglichen Kombinationen addiert oder potenziert werden können.
2. Nur die Kenntnis der Wirkmechanismen erlaubt eine auf den individuellen Patienten „maßgeschneiderte“ Therapiestrategie. Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Ätiologie und Pathogenese der MS und ihrer Heterogenität wird einer „individualisierten“ Patientenbehandlung zunehmende Bedeutung beigemessen. Hierbei kann das Wissen über die Wirkmechanismen der einzelnen Substanzen bei der Therapieentscheidung helfen. Auch werden durch die Kenntnis der Wirkmechanismen sowohl die Begründung der Therapieverordnung für den Arzt als auch Verständnis und Compliance des Patienten, das Medikament einzunehmen, gestärkt.
3. Durch die Kenntnis der Wirkmechanismen der einzelnen Wirkstoffe können auch deren Defizite erkannt und durch wirksamere Nachfolgepräparate reduziert werden. Auf diese Weise kann eine nächste Generation effektiver Therapeutika gegen MS heranwachsen.
4. Ein zusätzlicher Vorteil der Kenntnis der Wirkmechanismen von Therapeutika gegen MS liegt in der Definition relevanter gegenüber irrelevanten Mechanismen. Gelingt diese Unterscheidung, so kann auch ein tieferes Verständnis der Pathogenese selbst gelingen.

1.3.2. Bisherige Kenntnisse

Über die zugelassenen und viel versprechenden künftigen Therapeutika gegen MS ist bereits eine Reihe von Wirkmechanismen bekannt. Eine Übersicht wird in **Tabelle 1** wiedergegeben [18,66].

Tabelle 1. Wirkmechanismen laufender und möglicher künftiger Therapeutika gegen MS.

Wirkstoff	Wirkmechanismen
Glukokortikosteroide	<ul style="list-style-type: none"> ↓ T-Lymphozyten-Aktivierung ↓ T-Lymphozyten-Proliferation ↓ Produktion pro-entzündlicher Zytokine ↑ Produktion anti-entzündlicher Zytokine ↓ Adhäsion neutrophiler Leukozyten an Endothelzellen ↓ Endothelzell-Aktivierung Versiegelung der Bluthirnschranke Apoptose autoreaktiver T-Lymphozyten
Interferon (IFN)-β	<ul style="list-style-type: none"> ↓ T-Lymphozyten-Proliferation ↓ IFN-γ-induzierte Hochregulierung von MHC Klasse II ↓ Produktion pro-entzündlicher Zytokine ↑ Produktion anti-entzündlicher Zytokine ↓ Monozyten-Aktivierung ↓ Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) ↓ Oberflächen-exprimierte Adhäsionsmoleküle ↑ Lösliche Adhäsionsmoleküle ↓ Migrationspotenzial von T-Lymphozyten
Glatiramerazetat (GA)	<ul style="list-style-type: none"> Aktivierung und Toleranzinduktion in ZNS-Antigen-spezifischen T-Lymphozyten (Prinzip des veränderten Peptidliganden) Induktion GA-reaktiver regulatorischer T-Lymphozyten, die ein lokales anti-entzündliches Milieu bilden (Bystander-Suppressionseffekt) Sekretion neurotropher Faktoren durch GA-reaktive T-Lymphozyten
Mitoxantron	<ul style="list-style-type: none"> Starkes Immunsuppressivum ↓ Proliferation von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten ↑ T-Suppressor-Funktionen ↑ Apoptose von B-Lymphozyten und anderen APC ↑ Nekrose von Immunzellen ↓ Produktion pro- und anti-entzündlicher Zytokine
Adhäsionsmolekülantikörper	↓ Lymphozytenmigration
Statine	Siehe Tabelle 2.

↓ = inhibierender Effekt; ↑ = verstärkender Effekt; APC = Antigen präsentierende Zellen; MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex; ZNS = Zentrales Nervensystem.

1.3.2.1. Interferon- β

Menschliches IFN- β ist ein von Fibroblasten produziertes und sezerniertes Polypeptid, das nach Stimulation von praktisch allen Säugerzellen produziert werden kann. IFN- β hat immunomodulierende Eigenschaften, antivirale und antiproliferative Effekte und fördert die Zelldifferenzierung [67]. Die wesentlichen Effekte werden durch einen transmembranösen IFN-Rezeptor vermittelt, der eine Auf- oder Abregulierung von Zielgenen einleitet [68,69]. Zu den beschriebenen Immuneffekten von IFN- β zählen [67,70]:

- Suppression von T-Lymphozyten-Proliferation [71,72];
- Reduktion der IFN- γ -induzierten Aufregulierung der Expression von Haupt-histokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II [73,74];
- Reduktion des Migrationspotenzials von T-Lymphozyten durch Herunterregulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [75-77] und oberflächengebundenen Adhäsionsmolekülen [78] sowie Hochregulation löslicher Adhäsionsmoleküle [77];
- Induktion der Produktion von TH-2-Zytokinen und Reduktion der Synthese von TH-1-Zytokinen [79,80];
- Inhibition der Monozytenaktivierung [81].

1.3.2.2. Glatiramerazetat

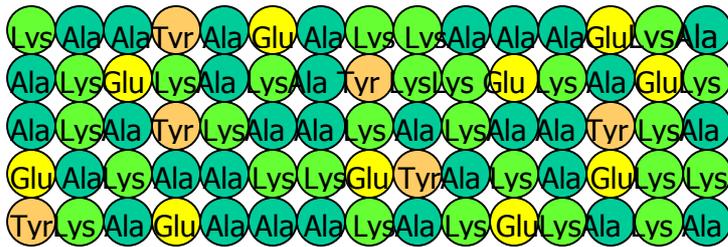
Glatiramerazetat (GA) (**Abbildung 4**) ist das Essigsäuresalz einer standardisierten, randomisierten Mischung synthetischer Polypeptide. Nach subkutaner Gabe wird Glatiramerazetat schnell in freie Aminosäuren und kleine Oligopeptide degradiert. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die wesentlichen immunologischen Effekte im peripheren Immunsystem initiiert werden. Im Gegensatz zu den pleiotropen, jedoch Antigen-unabhängigen immunologischen Effekten von IFN- β , basiert das immunomodulierende Potenzial von Glatiramerazetat auf Immunzellen, die eine Spezifität für basisches Myelinprotein (*myelin basic protein*, MBP) und wahrscheinlich andere Myelinantigene aufweisen [67,82]. Die wesentlichen Mechanismen beruhen auf:

- Aktivierung und Toleranzinduktion MBP-spezifischer T-Zellen durch die Wirkung als veränderter Peptidligand [83];
- Induktion GA-reaktiver anti-entzündlicher regulatorischer T-Zellen, die im ZNS durch Bildung eines anti-entzündlichen Milieus einen lokalen so genannten Bystander-Suppressionseffekt aufweisen [83-85].

In den letzten Jahren sind mehrere Hinweise aufgekommen, dass GA auch neuroprotektive Eigenschaften aufweisen kann. Die Evidenzlage in dieser Frage ist jedoch noch schwach.

- GA vermindert signifikant die Anzahl von mit axonalem Schaden vergesellschafteten „*black holes*“ in T1-gewichteten MRT-Untersuchungen (siehe **Abbildung 2**) bei MS-Patienten [86].
- Magnetresonanztomographisch wurde ein höheres N-acetyl-aspartat (NAA)-Kreatin-Verhältnis in GA-behandelten als in unbehandelten Patienten gemessen [87].
- GA-behandelte Patienten weisen langfristig eine geringere Hirnatrophie auf als unbehandelte Patienten [88].
- Humane aktivierte GA-reaktive T-Lymphozyten sezernieren den neurotrophen Faktor BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) [89]. Aktivierte T-Zellen mit anderer Spezifität sezernieren ebenfalls BDNF, jedoch in niedrigeren Konzentrationen [90].
- Der Serumspiegel von BDNF ist in Patienten mit RRMS erniedrigt und wird durch GA-Behandlung erhöht [91].
- In einem EAE-Modell wurde gezeigt, dass GA-spezifische T-Zellen in das ZNS migrieren und *in situ* BDNF sezernieren [92,93].
- In einem anderen EAE-Modell wurde eine Reduktion des axonalen Schadens durch Behandlung mit GA beobachtet [94].

Molekulargewicht: 4.7-11.0 kDa



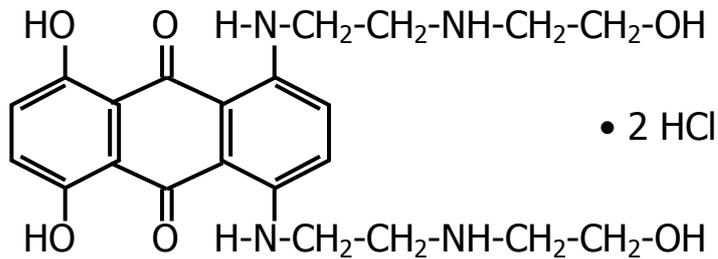
Randomisiertes Poly- $\{L\text{-Glu}^{13-15}, L\text{-Lys}^{30-37}, L\text{-Ala}^{39-46}, L\text{-Tyr}^{8,6-10}\}, n\text{CH}_3\text{COOH}$

Abbildung 4. Eigenschaften von Glatiramerazetat (GA). GA ist das Essigsäuresalz einer standardisierten randomisierten Mischung synthetischer Polypeptide, die aus L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin mit einem definierten molaren Verhältnis von 0.14 : 0.34 : 0.43 : 0.09 und einer durchschnittlichen Länge von 45 bis 100 Aminosäuren gebildet werden. Eine Beispielsequenz wird hier angegeben.

1.3.2.3. Mitoxantron

Neben seinen zytotoxischen Effekten wurden bei Mitoxantron (**Abbildung 5**) immunsuppressive, antivirale und sogar antibiotische Eigenschaften beobachtet. Da mehrere umschriebene immunologische Effekte bekannt sind [95], wurde spekuliert, dass Mitoxantron auch immunmodulierend wirken kann [49,96]. Seit Jahrzehnten bekannt, ist Mitoxantron ein potentes Immunsuppressivum, das die Proliferation von Immunzellen hemmt [97-100]. Auch induziert es den programmierten Zelltod von B-Lymphozyten [101]. Blutlymphozyten von MS-Patienten, die entweder vor oder unmittelbar nach einer Mitoxantrongabe gewonnen wurden, zeigten eine erhöhte Nekroserate nach Mitoxantron [102]. *Ex vivo* Analysen des Zytokinprofils von Immunzellen, die von MS-Patienten vor und unter Behandlung mit Mitoxantron gewonnen worden waren, erbrachten nach sechs Monaten Behandlung einen Abfall der IL-10-Expression in Monozyten (anti-entzündliches Zytokin) und einen Abfall der IL-2-Rezeptor- β 1-Expression (pro-entzündlich) in T-Lymphozyten [103].

Molekulargewicht: 517.4 Da



1,4-Dihydroxy-5,8-bis-[[2-[(2-hydroxyethyl)-amino]-ethyl]-amino]-anthrachinon-Dihydrochlorid ($C_{22}H_{28}N_4O_6 \cdot 2HCl$)

Abbildung 5. Eigenschaften von Mitoxantron. Mitoxantron ist ein Anthrazendion-Derivat, das mit den Anthrazyklinen Doxorubizin und Daunorubizin verwandt ist. Es interagiert mit dem Enzym Topoisomerase-2 und verursacht Einzel- und Doppelstrangabbrüche durch Interkalierung der DNA.

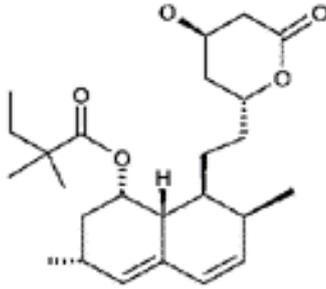
1.3.2.4. Adhäsionsmolekülantikörper

Antikörper gegen einzelne Adhäsionsmoleküle zielen spezifisch auf die Lymphozytenmigration [104,105].

1.3.2.5. Statine

Die immunologischen Wirkmechanismen der Statine (**Abbildung 6**) sind noch unklar, diskutiert werden HMG-CoA-Reduktase-abhängige Effekte [106,107] oder auch direkte Einflüsse auf Immunrezeptoren [108]. Auf diese Weise wird zum Beispiel die Transkription von MHC Klasse II-Genen blockiert, indem Statine den sog. Klasse-II-Transaktivator-IV-Promoter (CIITA IV) hemmen [58,109]. Die verminderte MHC Klasse II-Expression inhibiert die Aktivierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten und damit deren Möglichkeit, zu proliferieren und pro-entzündliche Zytokine zu sezernieren. Eine Übersicht der immunologischen Effekte der Statine wird in **Tabelle 2** wiedergegeben.

Molekulargewicht: 418.6 Da



{(1S)-1,2,3,7,8 α ,8 α β -
Hexahydro-3 α ,7 β -dimethyl-8-
{2-[(2S,4S)-tetrahydro-4-
hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl]-
ethyl}-1-naphthyl}-2,2-
dimethylbutanoat (C₂₅H₃₈O₅)

Abbildung 6. Eigenschaften der Statine. Als Beispiel wird Simvastatin dargestellt.

Tabelle 2. Immunologische Effekte von Statinen.

Effekte	Referenz
↓ Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine	[58,110]
Verschiebung des Zytokinprofils von T-Helfer (TH)-1 nach TH-2	[58]
↓ MHC-Klasse-II-Expression	[58,62,109]
↓ Makrophagen-Proliferation	[111,112]
↓ Expression von Adhäsionsmolekülen	[62,113-115]
↓ Expression und Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP)	[62,112]
↓ Sekretion von Chemokinen	[116]
↓ Expression von Chemokinrezeptoren	[62]
↓ B-Lymphozyten-Aktivierung	[117,118]
↓ T-Lymphozyten-Proliferation	[58-60,62,119]
↓ Lymphozyten-Migration	[60]
Neuroprotektion in einem Ischämie-Reperfusion-Modell	[115]

↓ = inhibierender Effekt; MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex.

1.4. Fragestellung

Aufgabe dieser Habilitationsarbeit ist es, das Wissen über die Wirkmechanismen dreier Therapeutika gegen MS zu erweitern. Zum einen soll als Vertreter der Immunmodulatoren Glatiramerazetat untersucht werden, zum zweiten als Vertreter der Immunsuppressiva Mitoxantron. Drittens soll eine viel versprechende Substanzgruppe mit realistischem Einsatzpotenzial untersucht werden, nämlich die Statine.

Angewandt wurden bei allen drei Wirkstoffen mehrere Methoden, die Phänotyp und Funktion menschlicher Immunzellen *in vitro* untersuchten. Bei Glatiramerazetat wurden darüber hinaus *ex vivo* Untersuchungen durchgeführt, d.h. immunologische Medikamenteneffekte wurden zwischen unbehandelten und behandelten MS-Patienten verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Kontrollen

Insgesamt drei Teilprojekte wurden durchgeführt, an denen nach Aufklärung und Einwilligung jeweils unterschiedliche Probandengruppen teilnahmen. **Tabelle 3** gibt in einer Übersicht die jeweiligen Charakteristika der Patienten und Kontrollen wieder.

Tabelle 3. Charakteristika der untersuchten MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.

Teilprojekt	Gruppe	Anzahl	Behandlung	Geschlecht	Mittleres Alter	EDSS
Glatiramerazetat (GA)	MS	4	Keine	f:m = 2:2	32	1.0-3.5
	MS → GA	6	Keine → GA	f:m = 6:0	36	1.0-2.5
	MS-GA	15	GA	f:m = 12:3	34	1.0-6.0
	MS-IFN-β	1	IFN-β	f:m = 1:0	35	4.0
	HD	4	-	f:m = 2:2	31	-
Mitoxantron	MS	15	Keine	f:m = 11:4	36	0.0-4.5
	MS-IFN-β	17	IFN-β	f:m = 13:4	37	0.0-6.0
	HD	9	-	f:m = 5:4	31	-
Statine	MS	8	Keine, IFN-β, GA	f:m = 5:3	33	0.0-5.5
	HD	6	-	f:m = 5:1	34	-

EDSS = *Expanded Disability Status Scale* [45]; HD = Gesunde Kontrollperson; IFN = Interferon.

2.2. Reagenzien und Medien

Die Herkunft der verwendeten Reagenzien wird in **Tabelle 4** angegeben.

Tabelle 4. Verwendete Reagenzien.

Reagenz	Herkunft (Firma)	Ort
Annexin-V	Trevigen	Gaithersburg, USA
Anti-CD3-Antikörper (funktionell)	NatuTec	Frankfurt
Anti-HLA-DQ-Antikörper (funktionell)	Immunotech	Marseille, Frankreich
Anti-HLA-DR-Antikörper (funktionell)	American Type Culture Collection	Rockville, USA
Ciprofloxacin	Bayer-Vital	Leverkusen
Dexamethason	Merck	Darmstadt
Enzym-verbundene Immunassays (ELISAs)	Endogen	Woburn, USA
Farensyltransferase-Inhibitor (FTI)-277	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Fluvastatin	Bayer	Leverkusen
Fötale Kälberserum	Gibco	Gaithersburg, USA
Geranylgeranyltransferase-Inhibitor (GGTI)-298	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Glatiramerazetat (GA)	Teva Pharmaceutical Industries	Petah Tiqva, Israel
Glutamin	Gibco	Gaithersburg, USA
Humanes Serum der Blutgruppe AB	Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes	Baden-Baden
Interleukin (IL)-2	Hoffmann-La Roche	Nutley, USA
Ionomycin	Sigma	St. Louis, USA
Lovastatin	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Lymphoprep [®]	Axis-Shield	Oslo, Norwegen
Maus IgG2a Isotyp (funktionell)	NatuTec	Frankfurt
[Methyl- ³ H]-Thymidin	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Mevalonat	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Mevastatin	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Mitoxantron	Wyeth-Lederle	Newbridge, Irland
Monensin	Sigma	St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt
Paramagnetische Partikel (Dynabeads [®])	Dynal	Oslo, Norwegen
Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA)	Sigma	St. Louis, USA
Phosphatpuffer (PBS)	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma	St. Louis, USA

Fortsetzung **Tabelle 4.**

Reagenz	Herkunft (Firma)	Ort
Penicillin	Gibco	Gaithersburg, USA
Pokeweed Mitogen (PWM)	Sigma	St. Louis, USA
PPD (Tuberkulinderivat)	Statens Serum Institut	Kopenhagen, Dänemark
Propidiumjodid	Sigma	St. Louis, USA
RPMI 1640-Medium	Gibco	Gaithersburg, USA
Saponin	Sigma	St. Louis, USA
Simvastatin	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Squalen	Merck/Calbiochem	Darmstadt
Streptomycin	Gibco	Gaithersburg, USA
Terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT)	Trevigen	Gaithersburg, USA
Tetanustoxoid (TT)	Massachusetts Biologic Laboratories	Worcester, USA
Trypsin-Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Gibco	Gaithersburg, USA

Sämtliche Zellkulturen wurden mit RPMI 1640-Medium durchgeführt. Die Langzeit-Kulturen (T-Zell-Linien, TZL) erhielten als Serumzusatz 5 % Hitze-inaktiviertes (1 Stunde Wasserbad, 56 °C) humanes Serum der Blutgruppe AB. Alle Kurzzeit-Kulturen bis 7 Tage erhielten 5 % Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum. Zugewetzt wurden 2 mM Glutamin sowie als Kontaminationsprophylaxe 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 20 µg/ml Ciprofloxacin. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre gehalten.

2.3. Zellkultur

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden durch einen Zentrifugierungs-Dichtegradienten aus mit Ethylendiamintetraazetat (EDTA) ungerinnbar gemachtem Vollblut isoliert. Zur Isolation wurde Lymphoprep[®] mit einer Dichte von 1.077 g/ml verwendet [1].

2.3.1. T-Zell-Linien

Für Langzeit-Kulturen wurden aus T-Lymphozyten TZL etabliert (**Abbildung 7**) [120]. Hierzu wurden PBL (2×10^5 /Napf) mit GA (Chargennummern 242992997 und 242992899; 50 $\mu\text{g/ml}$), basischem Myelinprotein (MBP; 30 $\mu\text{g/ml}$), Tetanustoxoid (TT; 2 $\mu\text{g/ml}$) oder dem Tuberkulinderivat PPD (*protein purified derivative*; 10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. IL-2 wurde jeden 3. bis 4. Tag in einer finalen Konzentration von 15 U/ml hinzugefügt. Nach zwei bis drei Wochen wurden autologe PBL gewonnen, mit 40 Gy bestrahlt (Stabiloplan 2; Siemens, Erlangen) und als Antigen präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC) eingesetzt. Diese bestrahlten APC (1×10^5 /Napf, pro Probe der Primärkultur in zwei Nöpfen) wurden für eine Stunde entweder mit dem jeweiligen Antigen (GA, MBP, TT oder PPD) oder ohne Antigen vorinkubiert. Jeder Napf der Primärkultur wurde auf die zwei Nöpfe verteilt. Zunächst wurde die Antigenreaktivität mikroskopisch erfasst (Bildung von Proliferationsnestern im Antigen enthaltenden Napf); anschließend wurden spezifische TZL mittels Proliferationsassay (siehe 2.5.) ermittelt. Spezifische proliferative TZL wurden durch IL-2 in einer finalen Konzentration von 30 U/ml expandiert und alle zwei bis drei Wochen mit ihrem Antigen auf bestrahlten APC restimuliert. Kreuzreaktionen GA-reaktiver TZL wurden mit folgenden Antigenen untersucht: MBP (finale Konzentration: 30 $\mu\text{g/ml}$) war nach Standardmethoden aus menschlichem Gehirn extrahiert worden [121]. Überlappende Peptide des humanen MBP-Moleküls (10 $\mu\text{g/ml}$) wurden automatisch synthetisiert (431A; Applied Biosystems, Foster City, USA). Die extrazelluläre Domäne von humanem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG; 15 $\mu\text{g/ml}$) sowie das Ratten-Astrozyten-Protein S100 β (15 $\mu\text{g/ml}$) wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert [122]. TT (2 $\mu\text{g/ml}$) und PPD (10 $\mu\text{g/ml}$) wurden käuflich erworben (siehe **Tabelle 4**). Als Positivkontrolle wurde das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA; 10 $\mu\text{g/ml}$) verwendet.

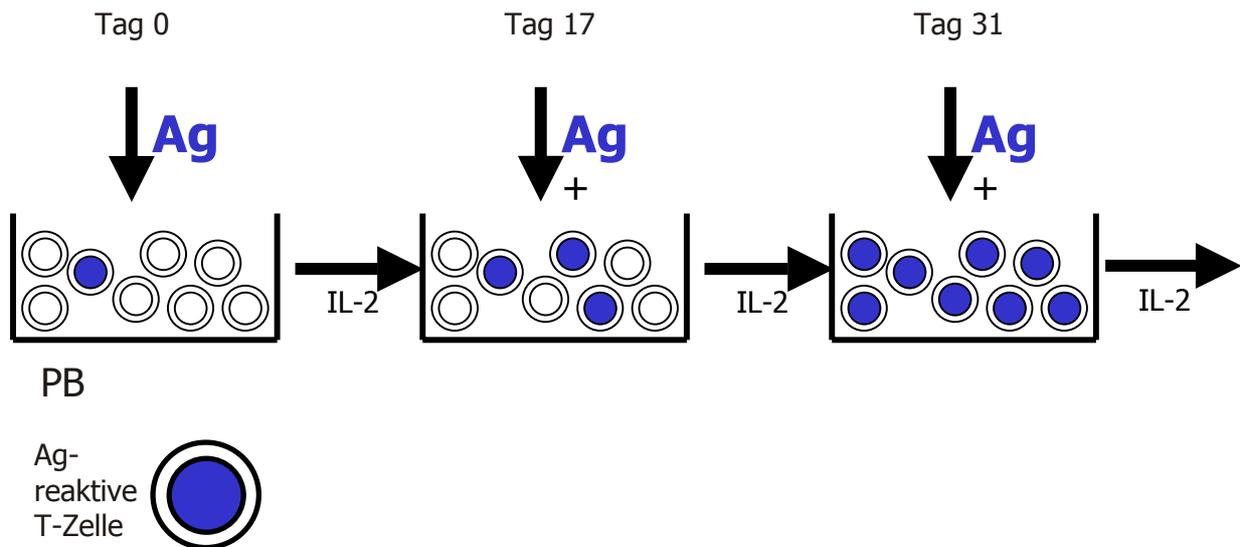


Abbildung 7. Gewinnung von T-Zell-Linien (TZL). Durch repetitive Restimulationen mit dem jeweiligen Antigen (Ag) auf Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) werden Antigen-reaktive T-Lymphozyten isoliert. Zwischen den Restimulationen, die alle zwei bis drei Wochen durchgeführt wurden, wurden die TZL unspezifisch durch Interleukin (IL)-2 aktiviert [120].

2.3.2. PBL-Kurzkultur

Frisch isolierte PBL (1.5×10^5 /Napf) wurden in einer U-Boden-Platte mit PHA (10 $\mu\text{g/ml}$) für fünf Tage inkubiert. Mitoxantron wurde in verschiedenen Konzentrationen (0.02-2000 ng/ml) am vierten Tag hinzugefügt, da die Inkubation mit Mitoxantron für die vollen fünf Tage in einer Konzentration oberhalb 2 ng/ml den Zelltod verursachte. Alternativ wurden PBL für 48 Stunden mit PHA aktiviert und mit Mitoxantron in den o.g. Dosen behandelt. Unaktivierte PBL wurden nach 24 Stunden bis fünf Tagen analysiert. Simvastatin, Lovastatin, Mevastatin und Fluvastatin wurden bei den fünftägigen Kurzkulturen in verschiedenen Konzentrationen (0.1-10 μM) an den Tagen 0, 1 oder 4 hinzugefügt. Statine wurden in einem alternativen T-Zell-Aktivierungssystem, nämlich der Kostimulation mit funktionellen Anti-CD3-Antikörpern (0.1 $\mu\text{g/ml}$) sowie der mit 40 Gy bestrahlten Monozytenlinie THP-1 (freundliche Gabe von Frau Dr. A. Bierhaus, Universität Heidelberg; 1×10^4 /Napf) als zweitem Signal. Kontrollexperimente (*Rescue*-Experimente zur Neutralisierung von Statin-Effekten) wurden mit Mevalonat (100 μM) oder Squalen (100 μM) durchgeführt. FTI-277 (Farensyltransferase-Inhibitor 277) und GGTI-298

(Geranylgeranyltransferase-Inhibitor 298) wurden eingesetzt (je 10 μM), um im direkten Vergleich mit den Statinen die Isoprenylierungswege zu blockieren.

2.3.3. B-Lymphozytenkultur

B-Lymphozyten wurden aus PBL durch negative Isolierung mittels Antikörperbeschichteter paramagnetischer Partikel (Dynabeads[®]) angereichert. Die Aktivierung erfolgte für fünf Tage mit Pokeweed-Mitogen (PWM; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Mitoxantron wurde in Konzentrationen von 0,2 bis 2000 ng/ml am vierten Tag hinzugefügt. Simvastatin, Lovastatin und Mevastatin wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM an den Tagen 0 oder 4 hinzugefügt.

2.3.4. Monozytenkultur

Monozyten wurden durch ihre Eigenschaft zu adhären angereichert. Dazu wurden PBL in 100-ml-Kulturflaschen für zwei bis drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhären Zellen (= Lymphozyten) entfernt, die adhären Zellen (= Monozyten) mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst und erneut gewaschen. Diese angereicherten Monozyten wurden mit Mitoxantron (0,02-2000 ng/ml) für 24 bis 48 Stunden inkubiert.

2.4. Durchflusszytometrie

2.4.1. Expression von Oberflächenmarkern

Zur phänotypischen Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern gefärbt (**Tabelle 5**). Dazu wurden 1×10^5 TZL oder PBL in PBS gewaschen und für 20 Minuten bei 4 °C in einer V-Boden-Platte mit den markierten Antikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden sie mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und entweder unmittelbar analysiert oder bis zur Analyse bis 7 Tage bei + 4 °C im Dunkeln asserviert. Mit einem FACScalibur-Gerät (Becton Dickinson, San Jose, USA) wurden

die Daten von 5000 bis 10000 Zellen erfasst und die jeweilige relative Fluoreszenzintensität ausgewertet.

Tabelle 5. Verwendete monoklonale Antikörper zur Durchflusszytometrie.

Antikörper	Farbstoff	Firma	Ort
CCR5	Unkonjugiert	Becton Dickinson	San Jose, USA
CCR6	Unkonjugiert	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD3	FITC	DAKO	Hamburg
CD3	PE	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD4	PE	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD8	FITC	DAKO	Hamburg
CD8	PE	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD11a	FITC	PharMingen	Hamburg
CD14	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD19	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD20	PE	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD27	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD45RO	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD45RA	PE	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD64	FITC	Medarex	Annandale, USA
CD69	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD80	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
CD86	FITC	PharMingen	Hamburg
CXCR3	Unkonjugiert	Becton Dickinson	San Jose, USA
CXCR4	Unkonjugiert	Becton Dickinson	San Jose, USA
HLA-DR	FITC	PharMingen	Hamburg
ICAM-1	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
IFN- γ	FITC	PharMingen	Hamburg
IL-4	PE	PharMingen	Hamburg
Maus IgG1 Isotyp	FITC	Immunotech	Marseille, Frankreich
Maus IgG1 Isotyp	PE	Becton Dickinson	San Jose, USA
Maus IgG2a Isotyp	Unkonjugiert	Cymbus	Chandlers Ford, USA
Maus IgG2b Isotyp	Unkonjugiert	Cymbus	Chandlers Ford, USA
TCR V β 2	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 3	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 3.1	Unkonjugiert	T-Cell Diagnostics	Woburn, USA
TCR V β 5.3	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich

Fortsetzung **Tabelle 5.**

Antikörper	Farbstoff	Firma	Ort
TCR V β 5a	Unkonjugiert	T-Cell Diagnostics	Woburn, USA
TCR V β 5b	Unkonjugiert	T-Cell Sciences	Cambridge, USA
TCR V β 6.7	Unkonjugiert	T-Cell Diagnostics	Woburn, USA
TCR V β 7	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 7.1	Unkonjugiert	Labgen	Frankfurt
TCR V β 8	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 9	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 11	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 12	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 13.6	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 14	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 16	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 17	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 18	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 20	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 21.3	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 22	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
TCR V β 23	Unkonjugiert	Immunotech	Marseille, Frankreich
VLA-4	FITC	Becton Dickinson	San Jose, USA
Ziege-anti Maus IgG	FITC	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA

FITC = Fluoreszeinisothiozyanat; HLA = Humanes Leukozytenantigen; ICAM-1 = Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; IFN = Interferon; IgG = Immunglobulin G; IL = Interleukin; PE = Phycoerythrin; TCR = T-Zell-Rezeptor; VLA-4 = *Very late antigen-4* = α 4-Integrin.

2.4.2. Intrazelluläre Expression von Zytokinen

Das Zytokinprofil der TZL wurde 8-10 Tage nach Restimulation in Abwesenheit lebender APC untersucht, bei PBL-Kurzkultur nach insgesamt fünf Tagen. Die TZL (1×10^5 /Napf) wurden mit Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA, 2.5 μ g/ml) und Ionomycin (250 ng/ml) für drei Stunden inkubiert, darunter die letzten zwei Stunden in Anwesenheit des Proteinsekretionsblockers Monensin (2 nmol/ml). Anschließend wurden die T-Lymphozyten mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0.1 % Saponin-PBS permeabilisiert. Mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 (einem TH-2-Zytokin) oder IFN- γ (einem TH-1-

Zytokin) und ihren entsprechenden Isotypenkontrollen wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen gefärbt (20 Minuten, 4 °C), gewaschen, im Dunkeln asserviert und mit einem FACScalibur-Gerät ausgewertet. Hierzu wurden die Daten von jeweils 5000 Zellen ausgewertet (**Abbildung 8**). Um das vorherrschende Zytokinprofil jeder TZL zu bestimmen, wurde folgender Algorithmus angewendet: nur solche lymphoiden Zellen, die entweder für IFN- γ , IL-4 oder für beide Zytokine positiv waren, also eine hohe relative Fluoreszenzintensität aufwiesen, wurden als „aktiviert eingestuft“. Sofern eine einfach positive Fraktion a) die Mehrheit mindestens 50 % aller „aktivierter“ Zellen stellte, b) mindestens 20 % höher war als die andere einfach positive Fraktion, und c) aus mindestens 100 Einzelereignissen bestand, wurde die TZL entsprechend als „TH-1“ (IFN- γ) oder „TH2“ (IL-4) eingestuft. Alle übrigen TZL wurden als „TH0“ eingestuft.

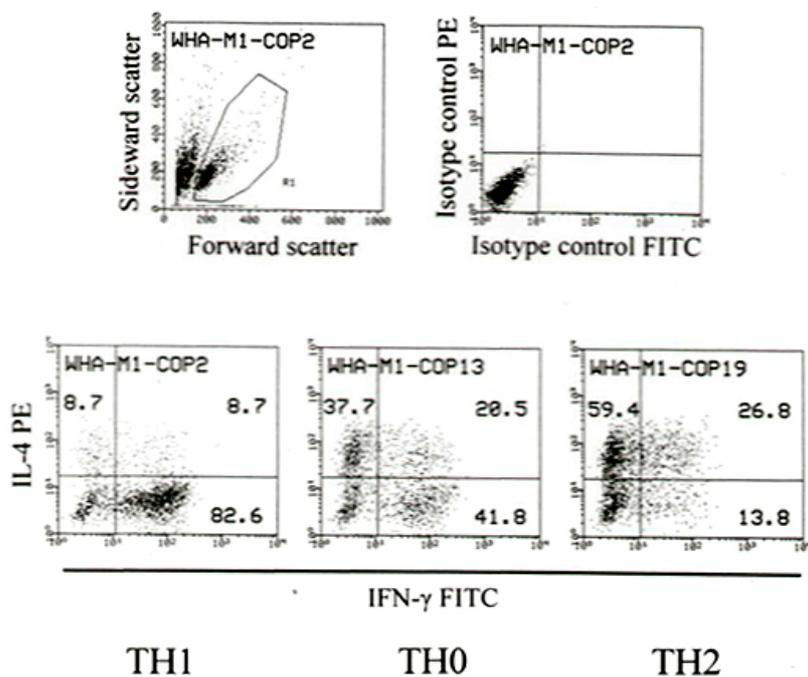


Abbildung 8. Bestimmung des Zytokinprofils durch intrazelluläre Durchflusszytometrie. T-Lymphozyten wurden aktiviert, fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Interleukin (IL)-4 und Interferon (IFN)- γ gefärbt. Oben links: Lymphoide Zellen wurden markiert und analysiert, um tote Zellen auszuschließen. Oben rechts: Isotypenkontrollen. Unten: Zytokinprofil von drei repräsentativen T-Zell-Linien (TZL). Die jeweils entweder einfach positiv oder doppelt positiv gefärbten Zellen wurden als „aktiviert“ angesehen. Die Zahlen geben die jeweiligen prozentualen Anteile der drei Gruppen wieder. Die Zuordnung nach TH-1, TH-0 und TH-2 der einzelnen TZL wurde nach dem im Text beschriebenen Algorithmus durchgeführt. Aus [1]. GA-reaktive TZL wurden „COP-reaktive TZL“ genannt (Copolymer-1 ist der frühere Name von GA).

2.5. Proliferationsmessung

Zur Analyse der Zellproliferation wurden Kurzkulturen angelegt oder Antigen-spezifische TZL für 48 Stunden mit APC restimuliert. 16-18 h vor Beendigung der Inkubation wurde [Methyl-³H]-Thymidin (0.5 µCi pro Probe) hinzugefügt. Die Zellen wurden auf Nitrozellulosefilter geerntet, und der Einbau von [Methyl]-³H-Thymidin in die DNA wurde mittels Szintillationszählung gemessen (Packard BioScience, Meriden, USA). Nur TZL mit mehr als 500 β-Zerfällen pro Minute (bei Restimulation mit ihrem Antigen auf APC) und einem minimalen Stimulationsindex (SI) von 3.0 wurden als Antigen-spezifisch eingestuft. Der SI ist der Quotient aus der Zahl der β-Zerfälle pro Minute bei Antigenstimulation und der Zahl der β-Zerfälle pro Minute bei TZL-Kontakt mit den APC, jedoch ohne Antigen.

Zur Bestimmung der MHC-Restriktion wurden blockierende monoklonale Antikörper gegen HLA-DR und HLA-DQ eingesetzt, die mit den APC für 45 Minuten in einer finalen Konzentration von 20 µg/ml vorinkubiert wurden, bevor das Antigen hinzugefügt wurde.

Für funktionelle Experimente mit Mitoxantron wurden entweder die TZL oder die APC separat mit Mitoxantron für 24 Stunden vorinkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Antigen für weitere 48 Stunden koinkubiert.

2.6. Zelltodmechanismen

Apoptotische Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie durch den Einsatz Fluoreszenzfarbstoff-markierten Annexin-V detektiert. Annexin-V bindet selektiv an Phosphatidylserin, das auf der Oberfläche früher apoptotischer Zellen exponiert wird [123]. Zusätzlich wurde die DNA-Fragmentierung als weiteres Kennzeichen der Apoptose ermittelt, indem in die DNA inkorporierte Biotin-markierte Nukleotide durch das Enzym Terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) mittels Durchflusszytometrie detektiert wurden [124]. Der nekrotische Zelltod wurde durch die intrazelluläre Aufnahme von Propidiumjodid (2 µg/ml) gemessen.

2.7. ELISA

Die Sekretion von IFN- γ und IL-4 wurde mittels standardisiertem Enzymverbundenen Immunassay (ELISA) gemessen. Hierzu wurden die Überstände der Proliferationsassays der Experimente mit den TZL verwendet. Zytokin-Konzentrationen von mindestens zwei Standardabweichungen über dem Hintergrundsignal wurden als positiv eingestuft. Nach Angaben des Herstellers lag die Sensitivität bei < 2 pg/ml (sowohl IFN- γ als auch IL-4).

2.8. Statistik

Bei der Bestimmung des Zytokinprofils der TZL wurde folgender Algorithmus angewendet: Jede TZL erhielt eine Zahl, nämlich -1 für TH-1 TZL, 0 für TH-0 TZL sowie $+1$ für TH-2 TZL. Für jedes Individuum wurde dann ein "Präferenzintensitätsindex (I)" nach folgender Formel berechnet:

$$I = \frac{(+1) \times n_{(TH-2)} + (0) \times n_{(TH-0)} + (-1) \times n_{(TH-1)}}{n_{(TH-2)} + n_{(TH-0)} + n_{(TH-1)}}$$

$n_{(TH-2)}$, $n_{(TH-0)}$ und $n_{(TH-1)}$ repräsentierten die Anzahl der TH-2-, TH-0- und TH-1-TZL, die aus einem Individuum zu einem definierten Zeitpunkt isoliert worden waren. $I = +1$ würde beispielsweise bedeuten, dass alle TZL eines Donors vom TH-2-Typ sein würden. Auf diese Weise beschreibt die Variable "I" den relativen Anteil der TH-1- ($I < 0$) bzw. der TH2-TZL ($I > 0$), und zwar unabhängig von der absoluten Zahl der TZL pro Donor. Die Kovarianz wurde mit dem ANCOVA-Test analysiert.

Bei den übrigen Experimenten wurde das Signifikanzniveau mittels zweiseitigem Student- t -Test ermittelt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3. Ergebnisse

3.1. Glatiramerazetat

3.1.1. Isolation und Charakterisierung GA-reaktiver TZL: keine Kreuzproliferation mit MBP

Insgesamt wurden aus 3031 Ansätzen 721 GA-reaktive TZL isoliert (23.8 %), darunter 160 TZL von unbehandelten MS-Patienten, 300 TZL von GA-behandelten MS-Patienten und 90 TZL von gesunden Kontrollpersonen. Zusätzlich wurden 171 TZL nach Beginn der GA-Therapie von zuvor unbehandelten MS-Patienten gewonnen. Alle GA-reaktiven TZL zeigten eine proliferative Antwort auf GA (mittlerer SI 78.2, medianer SI 44.7, Spannweite 3.0-1826), aber keine der untersuchten TZL hatte eine signifikante proliferative Antwort ($SI \geq 3.0$) auf MBP, MBP-Peptide, MOG, S100 β oder TT, also weder auf die untersuchten Myelin-Antigene noch auf Kontrollantigene (**Abbildung 9**). Umgekehrt zeigten 31 MBP-reaktive TZL (davon 25 TZL von zwei unbehandelten MS-Patienten und sechs TZL aus zwei gesunden Kontrollpersonen) eine proliferative Antwort auf MBP, jedoch nicht auf GA (**Abbildung 9**).

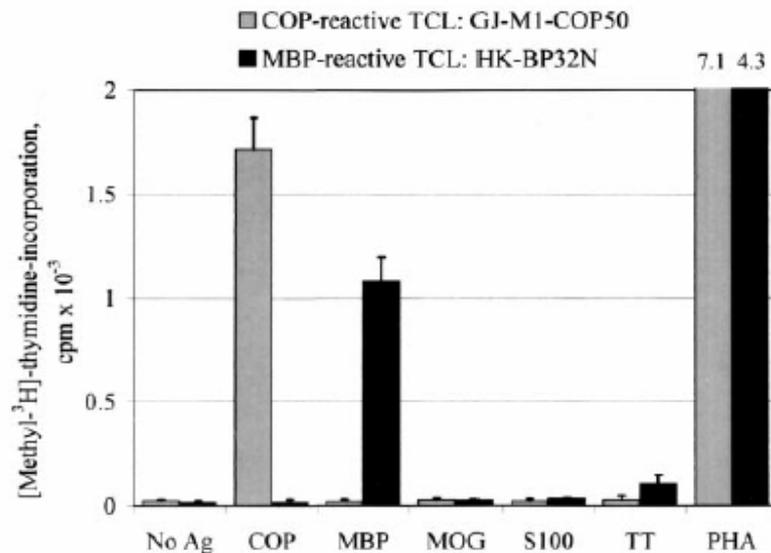


Abbildung 9. Proliferation GA- und MBP-reaktiver TZL. Die Inkorporation von [Methyl-³H]-Thymidin wurde nach Präsentation verschiedener Antigene durch autologe APC gemessen (Angabe in *Counts per minute* (cpm = β -Zerfälle pro Minute)). Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment. Aus [1]. MBP = basisches Myelinprotein; MOG = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; PHA = Phycohämagglutinin; S100 = Astrozytenprotein S100; TT = Tetanustoxoid.

In einer Untergruppe der TZL wurden weitere phänotypische Untersuchungen durchgeführt, auch bezüglich ihrer MHC-Restriktion und Expression der variablen β -Kette ihrer T-Zell-Rezeptoren (*T-cell receptor*, TCR). Zwei von 40 untersuchten TZL waren je zur Hälfte vom $CD4^+$ und vom $CD8^+$ Typ, die anderen 38 TZL waren mehrheitlich $CD4^+$ (im Mittel 87.4 % aller Zellen, Median 93.4 %). Alle von zwölf untersuchten TZL waren bezüglich ihres MHC HLA-DR-restringiert (49-99 % Inhibierung durch einen Anti-HLA-DR-Antikörper im Vergleich zu 3-12 % Inhibierung durch einen Anti-HLA-DQ-Antikörper. Die variable $V\beta$ -Kette ihrer TCR (untersucht in zehn TZL) war sehr heterogen. Exprimiert wurden die Ketten $V\beta 3$, $V\beta 5$, $V\beta 6$, $V\beta 7$, $V\beta 8$, $V\beta 9$, $V\beta 11$, $V\beta 13$, $V\beta 14$, $V\beta 16$, $V\beta 17$ und $V\beta 20$.

3.1.2. Querschnittstudie: das Zytokinprofil GA-reaktiver TZL ist bei GA-behandelten MS-Patienten vornehmlich TH-2, bei unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen vornehmlich TH-1

In 693 der 721 GA-reaktiven TZL wurden mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie die Zytokinprofile ermittelt. Die TZL waren meist zwei oder drei Mal mit GA auf APC restimuliert worden und wiesen einen proliferativen SI von ≥ 3.0 auf. Um einen Einfluss durch Kulturbedingungen zu minimieren, wurden die TZL gleichen Bedingungen unterworfen. Alle TZL wurden 8-10 Tage nach der letzten Restimulierung untersucht, um die Präsenz lebender APC auszuschließen; die letzte Aktivierung mit IL-2 erfolgte durchgehend zwei bis drei Tage vor der durchflusszytometrischen Untersuchung. Longitudinale Vergleichs-untersuchungen einzelner TZL (insgesamt neun Linien) zeigte ein überwiegend stabiles Zytokinprofil: sieben der neun Linien blieben bis zu ihrer 16. Restimulation bei ihrem Zytokinprofil, lediglich zwei von ihnen verschoben ihr Zytokinprofil von TH-1 (3. Restimulation) nach TH-0 (8.-11. Restimulation).

Um diese Methode zu validieren, wurde die GA-induzierte Sekretion von $IFN-\gamma$ und IL-4 im Überstand von 164 TZL durch ELISA gemessen. Praktisch alle der untersuchten TZL (98 %) wiesen eine entsprechend nachweisbare GA-induzierte Zytokinsekretion auf.

Abbildung 10 zeigt die Zytokinprofile aller 693 untersuchten GA-reaktiven TZL. Wenn man die drei Gruppen vergleicht (GA-behandelte MS-Patienten vs. unbehandelte MS-Patienten vs. gesunde Kontrollpersonen), erbrachte die Kovarianzanalyse einen signifikanten Effekt [$F(2, 29) = 10.26$, Signifikanz von $F = 0.001$]. Die Kovariable „Alter“ spielte offensichtlich keine Rolle. Der mittlere Präferenzintensitätsindex in GA-behandelten MS-Patienten ($I = +0.23$) war positiv (entspricht einem Überwiegen von TH-2) und signifikant höher als der in unbehandelten MS-Patienten ($I = -0.42$) und in unbehandelten Kontrollpersonen ($I = -0.65$), die beide negativ sind (Überwiegen von TH-1) (Kontrasttest, $p < 0.05$). Wenn man die beiden unbehandelten Gruppen zusammennimmt und den mittleren Präferenzintensitätsindex ($I = -0.48$) mit dem der GA-behandelten MS-Patienten ($I = +0.23$) vergleicht, so sind nach ANCOVA auch hier signifikante Unterschiede zu finden [$F(1, 29) = 20.40$, Signifikanz von $F < 0.0001$]. Die Ergebnisse weisen auf eine Verschiebung des Zytokinprofils von TH-1 (GA-reaktive TZL von unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen) in Richtung TH-2 hin (GA-reaktive TZL von GA-behandelten MS-Patienten).

Folgende Seiten: **Abbildung 10**. Zytokinprofil GA-reaktiver TZL. Rot = TH-1; grau = TH-0; grün = TH-2; Algorithmus siehe Text. Jeder Balken repräsentiert eine TZL. Die Dauer der GA-Behandlung in Monaten ist angegeben. **(A)** Gesunde Kontrollpersonen. **(B)** Unbehandelte MS-Patienten. **(C)** Querschnittstudie: GA-behandelte MS-Patienten. **(D)** Längsschnittstudie: MS-Patienten vor und unter GA-Behandlung. **(E)** Längsschnittstudie: GA-behandelte MS-Patienten im Verlauf. **(F)** Präferenzintensitätsindex (I) aller untersuchten Personen (Berechnung: siehe Text). Links: (♦) unbehandelte MS-Patienten und (▲) gesunde Kontrollpersonen; rechts: (♦) GA-behandelte MS-Patienten. $I < 0$ zeigt eine Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung TH-1 an, $I > 0$ eine Verschiebung in Richtung TH-2, und zwar unabhängig von der absoluten Anzahl der TZL pro untersuchter Person. (□) Mittlerer Präferenzintensitätsindex \pm Standardabweichung unbehandelter und GA-behandelter Personen. Die Linien zeigen die intra-individuellen Veränderungen vor und unter GA-Behandlung. Aus [1].

(A) Gesunde Kontrollpersonen

WH	CH	CB	VV
WH-COP1	CH-COP1	CB-COP3	VV-COP2
WH-COP2	CH-COP2	CB-COP4	VV-COP3
WH-COP3	CH-COP4	CB-COP5	VV-COP4
WH-COP4	CH-COP5	CB-COP6	VV-COP5
WH-COP5	CH-COP6	CB-COP8	VV-COP7
WH-COP6	CH-COP7	CB-COP11	VV-COP8
WH-COP7	CH-COP8	CB-COP12	VV-COP9
WH-COP8	CH-COP9	CB-COP13	VV-COP10
WH-COP9	CH-COP10	CB-COP16	VV-COP11
WH-COP11	CH-COP11	CB-COP20	VV-COP12
WH-COP12	CH-COP12	CB-COP21	VV-COP13
WH-COP13	CH-COP13	CB-COP22	VV-COP14
WH-COP14	CH-COP14	CB-COP23	VV-COP15
WH-COP15	CH-COP15	CB-COP24	VV-COP16
WH-COP16	CH-COP16	CB-COP25	VV-COP17
WH-COP17	CH-COP17	CB-COP26	VV-COP18
WH-COP18	CH-COP18	CB-COP27	VV-COP19
WH-COP19		CB-COP28	
WH-COP20		CB-COP29	
WH-COP21		CB-COP30	
WH-COP22		CB-COP31	
WH-COP23		CB-COP32	
WH-COP24		CB-COP34	
WH-COP25		CB-COP35	
WH-COP26		CB-COP37	
WH-COP27		CB-COP38	
WH-COP28		CB-COP39	
WH-COP29			
WH-COP30			

Th1
Th0
Th2

(B) Unbehandelte MS-Patienten

SSt	HK	AZ	HM	SW
SSt-COP1	HK-COP1	AZ-COP2	HM-COP1	SW-COP1
SSt-COP2	HK-COP4	AZ-COP3	HM-COP2	SW-COP2
SSt-COP4	HK-COP8	AZ-COP4	HM-COP3	SW-COP3
SSt-COP5	HK-COP15	AZ-COP6	HM-COP4	SW-COP7
SSt-COP6	HK-COP17	AZ-COP7	HM-COP5	SW-COP8
SSt-COP7	HK-COP18	AZ-COP9	HM-COP6	SW-COP9
SSt-COP8	HK-COP19	AZ-COP10	HM-COP7	SW-COP10
SSt-COP12	HK-COP28	AZ-COP11	HM-COP8	SW-COP11
SSt-COP13	HK-COP29	AZ-COP12	HM-COP9	
SSt-COP16		AZ-COP13	HM-COP10	
SSt-COP17		AZ-COP15	HM-COP11	
SSt-COP18		AZ-COP16	HM-COP12	
SSt-COP20		AZ-COP17	HM-COP13	
SSt-COP21			HM-COP14	
SSt-COP22			HM-COP15	
SSt-COP26			HM-COP16	
SSt-COP28			HM-COP17	
SSt-COP33			HM-COP18	
SSt-COP34			HM-COP19	
SSt-COP35			HM-COP20	
			HM-COP21	

Th1
Th0
Th2

(C) GA (COP)-behandelte MS-Patienten (Querschnitt)

BG Monat 36	UB Monat 27	US Monat 18	SH Monat 15	BS Monat 1
BG-M36-COP1	UB-M27-COP1	US-M18-COP1	SH-M15-COP1	BS-M1-COP1
BG-M36-COP2	UB-M27-COP4	US-M18-COP2	SH-M15-COP2	BS-M1-COP2
BG-M36-COP3	UB-M27-COP6	US-M18-COP3	SH-M15-COP3	BS-M1-COP3
BG-M36-COP4	UB-M27-COP9	US-M18-COP5	SH-M15-COP4	BS-M1-COP4
BG-M36-COP5	UB-M27-COP10	US-M18-COP6	SH-M15-COP5	BS-M1-COP5
BG-M36-COP6		US-M18-COP7	SH-M15-COP6	BS-M1-COP6
BG-M36-COP7		US-M18-COP8	SH-M15-COP7	BS-M1-COP8
BG-M36-COP8		US-M18-COP9	SH-M15-COP8	BS-M1-COP9
BG-M36-COP9		US-M18-COP10	SH-M15-COP9	BS-M1-COP10
BG-M36-COP10			SH-M15-COP10	BS-M1-COP11
BG-M36-COP11			SH-M15-COP11	BS-M1-COP12
BG-M36-COP12			SH-M15-COP12	BS-M1-COP13
BG-M36-COP13			SH-M15-COP13	BS-M1-COP14
BG-M36-COP14			SH-M15-COP14	BS-M1-COP15
BG-M36-COP15			SH-M15-COP15	BS-M1-COP16
BG-M36-COP16				
BG-M36-COP17				
BG-M36-COP18				

(C) GA (COP)-behandelte MS-Patienten (Querschnitt, Fortsetzung)

KR Monat 1	RD Monat 1	RM Monat 1	IB Monat 1	MB Monat 1
KR-M1-COP1	RD-M1-COP1	RM-M1-COP1	IB-M1-COP1	MB-M1-COP2
KR-M1-COP2	RD-M1-COP2	RM-M1-COP2	IB-M1-COP5	MB-M1-COP4
KR-M1-COP3	RD-M1-COP3	RM-M1-COP3	IB-M1-COP8	MB-M1-COP5
KR-M1-COP4	RD-M1-COP4	RM-M1-COP4	IB-M1-COP9	MB-M1-COP6
KR-M1-COP5	RD-M1-COP5	RM-M1-COP5	IB-M1-COP13	MB-M1-COP7
KR-M1-COP6	RD-M1-COP6	RM-M1-COP6	IB-M1-COP14	MB-M1-COP8
KR-M1-COP7	RD-M1-COP7	RM-M1-COP7	IB-M1-COP16	MB-M1-COP9
KR-M1-COP8	RD-M1-COP8	RM-M1-COP8		MB-M1-COP10
KR-M1-COP9	RD-M1-COP9	RM-M1-COP9		MB-M1-COP11
KR-M1-COP10	RD-M1-COP10	RM-M1-COP10		MB-M1-COP12
KR-M1-COP11	RD-M1-COP11	RM-M1-COP11		MB-M1-COP14
KR-M1-COP12	RD-M1-COP13			MB-M1-COP15
KR-M1-COP13	RD-M1-COP14			MB-M1-COP17
KR-M1-COP14	RD-M1-COP15			MB-M1-COP18
	RD-M1-COP16			Th1
	RD-M1-COP17			Th0
	RD-M1-COP18			Th2

(D) MS-Patienten vor GA (COP)-Behandlung

CS	GJ	WHa	HC	SZ	LN
CS-COP1	GJ-COP1	WHa-COP1	HC-COP1	SZ-COP1	LN-COP1
CS-COP2	GJ-COP2	WHa-COP2	HC-COP2	SZ-COP2	LN-COP2
CS-COP3	GJ-COP3	WHa-COP5	HC-COP3	SZ-COP3	LN-COP3
CS-COP7	GJ-COP4	WHa-COP6	HC-COP6	SZ-COP4	LN-COP4
CS-COP12	GJ-COP8	WHa-COP7	HC-COP7	SZ-COP5	LN-COP5
CS-COP13	GJ-COP10		HC-COP8	SZ-COP10	LN-COP6
CS-MOP14	GJ-COP12		HC-COP11	SZ-COP11	LN-COP7
CS-COP15	GJ-COP13		HC-COP12	SZ-COP13	LN-COP8
	GJ-COP14		HC-COP13	SZ-COP15	LN-COP9
	GJ-COP15		HC-COP14	SZ-COP17	LN-COP10
	GJ-COP18		HC-COP15	SZ-COP18	LN-COP11
	GJ-COP19		HC-COP16	SZ-COP19	LN-COP12
			HC-COP17	SZ-COP20	LN-COP13
			HC-COP18		LN-COP14
			HC-COP19		LN-COP15
			HC-COP20		LN-COP16
			HC-COP21		LN-COP17
			HC-COP22		LN-COP18
			HC-COP23		
			HC-COP24		
			HC-COP25		
			HC-COP26		
			HC-COP28		

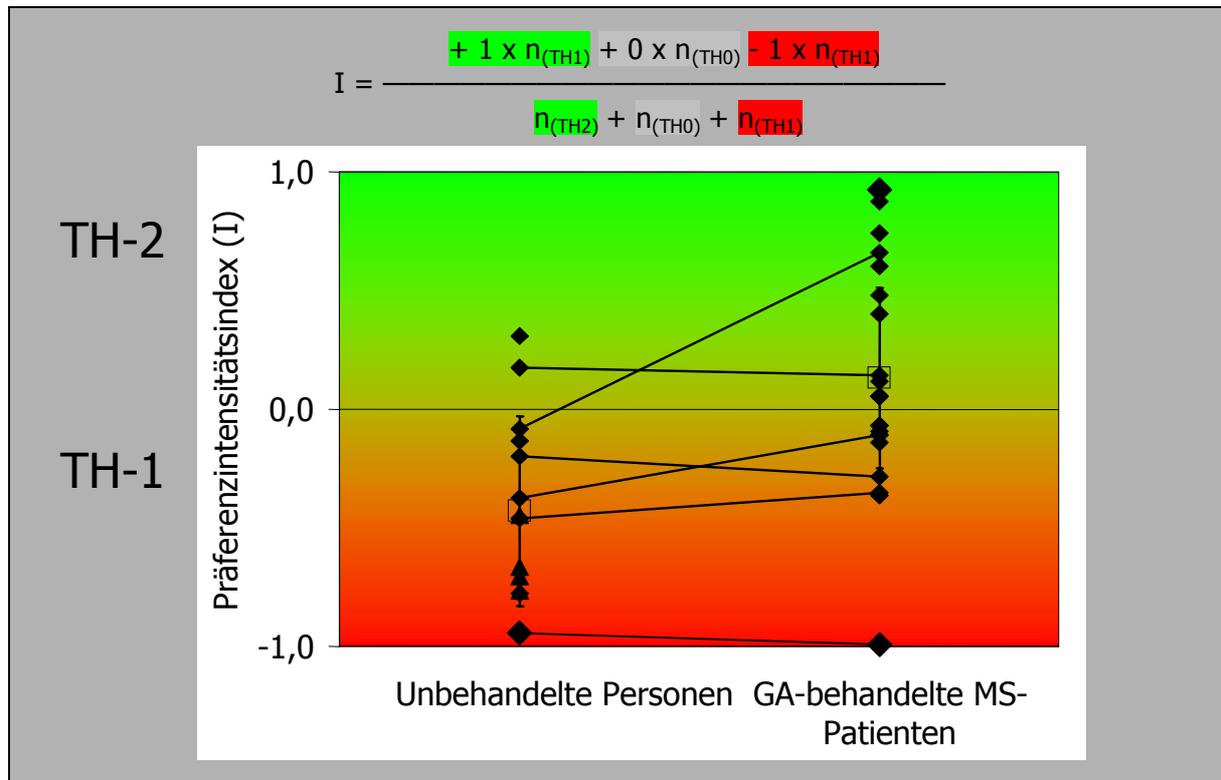
(D) MS-Patienten unter GA (COP)-Behandlung (Fortsetzung)

CS Monat 1	GJ Monat 1	WHa Monat 1	HC Monat 1	SZ Monat 1	LN Monat 2
CS-M1-COP1	GJ-M1-COP1	WHa-M1-COP1	HC-M1-COP2	SZ-M1-COP1	LN-M2-COP2
CS-M1-COP2	GJ-M1-COP2	WHa-M1-COP2	HC-M1-COP3	SZ-M1-COP2	LN-M2-COP3
CS-M1-COP3	GJ-M1-COP3	WHa-M1-COP3	HC-M1-COP4	SZ-M1-COP3	LN-M2-COP4
CS-M1-COP4	GJ-M1-COP5	WHa-M1-COP4	HC-M1-COP5	SZ-M1-COP4	LN-M2-COP5
CS-M1-COP5	GJ-M1-COP8	WHa-M1-COP5	HC-M1-COP8	SZ-M1-COP5	LN-M2-COP6
CS-M1-COP6	GJ-M1-COP10	WHa-M1-COP6	HC-M1-COP9	SZ-M1-COP6	LN-M2-COP8
CS-M1-COP7	GJ-M1-COP12	WHa-M1-COP7	HC-M1-COP10	SZ-M1-COP7	LN-M2-COP9
CS-M1-COP8	GJ-M1-COP14	WHa-M1-COP8	HC-M1-COP11	SZ-M1-COP8	LN-M2-COP10
CS-M1-COP9	GJ-M1-COP18	WHa-M1-COP9	HC-M1-COP12	SZ-M1-COP9	LN-M2-COP11
CS-M1-COP10	GJ-M1-COP20	WHa-M1-COP10	HC-M1-COP13	SZ-M1-COP10	LN-M2-COP12
CS-M1-COP11	GJ-M1-COP23	WHa-M1-COP11	HC-M1-COP14	SZ-M1-COP11	LN-M2-COP13
CS-M1-COP12	GJ-M1-COP26	WHa-M1-COP12	HC-M1-COP15	SZ-M1-COP12	LN-M2-COP14
CS-M1-COP13	GJ-M1-COP28	WHa-M1-COP13	HC-M1-COP16	SZ-M1-COP13	LN-M2-COP15
CS-M1-COP15	GJ-M1-COP29	WHa-M1-COP14	HC-M1-COP17	SZ-M1-COP14	LN-M2-COP16
CS-M1-COP16	GJ-M1-COP33	WHa-M1-COP15		SZ-M1-COP15	LN-M2-COP17
CS-M1-COP17	GJ-M1-COP36	WHa-M1-COP16		SZ-M1-COP16	LN-M2-COP18
CS-M1-COP18	GJ-M1-COP38	WHa-M1-COP17		SZ-M1-COP17	LN-M2-COP19
	GJ-M1-COP40	WHa-M1-COP18			LN-M2-COP20
	GJ-M1-COP42	WHa-M1-COP19			LN-M2-COP21
CS Monat 2	GJ-M1-COP45	WHa-M1-COP20			LN-M2-COP22
CS-M2-COP1	GJ-M1-COP46	WHa-M1-COP21			
CS-M2-COP2	GJ-M1-COP48	WHa-M1-COP22			
CS-M2-COP3	GJ-M1-COP49	WHa-M1-COP23			
CS-M2-COP4	GJ-M1-COP58	WHa-M1-COP24			Th1
CS-M2-COP5		WHa-M1-COP25			Th0
CS-M2-COP6	GJ	WHa-M1-COP26			Th2
CS-M2-COP7	Monat 3	WHa-M1-COP27			
CS-M2-COP8	GJ-M3-COP1				
CS-M2-COP9	GJ-M3-COP2	WHa			
CS-M2-COP10	GJ-M3-COP3	Monat 3			
CS-M2-COP11	GJ-M3-COP4	WHa-M3-COP5			
CS-M2-COP12	GJ-M3-COP5	WHa-M3-COP7			
	GJ-M3-COP6	WHa-M3-COP8			
	GJ-M3-COP8	WHa-M3-COP10			
CS Monat 6	GJ-M3-COP9	WHa-M3-COP11			
CS-M6-COP1	GJ-M3-COP10	WHa-M3-COP13			
CS-M6-COP2	GJ-M3-COP11	WHa-M3-COP15			
CS-M6-COP3		WHa-M3-COP16			
CS-M6-COP4					
CS-M6-COP5					
CS-M6-COP6					
CS-M6-COP7					
CS-M6-COP8					
CS-M6-COP9					
CS-M6-COP10					
CS-M6-COP11					
CS-M6-COP12					
CS-M6-COP13					
CS-M6-COP14					
CS-M6-COP15					
CS-M6-COP16					

(E) GA (COP)-behandelte MS-Patienten (Längsschnitt)

MC Monat 1	BK Monat 1	RR Monat 1	RO Monat 1	AF Monat 1	
MC-M1-COP1	BK-M1-COP5	RR-M1-COP2	RO-M1-COP2	AF-M1-COP1	
MC-M1-COP2	BK-M1-COP7	RR-M1-COP9	RO-M1-COP6	AF-M1-COP3	
MC-M1-COP3	BK-M1-COP12	RR-M1-COP12	RO-M1-COP9	AF-M1-COP4	
MC-M1-COP4	BK Monat 3	RR Monat 2	RO-M1-COP10	AF-M1-COP5	
MC-M1-COP5			RO-M1-COP12	AF-M1-COP6	
MC-M1-COP8			RO-M1-COP13		
MC-M1-COP9	BK-M3-COP2	RR-M2-COP2	RO-M1-COP16	AF Monat 8	
MC-M1-COP10	BK-M3-COP3	RR-M2-COP4			
MC-M1-COP11	BK-M3-COP4	RR-M2-COP5	RO Monat 6	AF-M8-COP1	
		RR-M2-COP7		RO-M6-COP1	AF-M8-COP2
		RR-M2-COP8		RO-M6-COP2	AF-M8-COP3
MC Monat 6	BK Monat 6		RO-M6-COP3	AF-M8-COP4	
MC-M6-COP1	BK-M6-COP1	RR Monat 9	RO-M6-COP4	AF-M8-COP6	
MC-M6-COP4	BK-M6-COP2		RR-M9-COP1	RO-M6-COP5	AF-M8-COP7
MC-M6-COP5	BK-M6-COP3		RR-M9-COP2	RO-M6-COP6	AF-M8-COP8
MC-M6-COP6	BK-M6-COP4	RR-M9-COP3	RO-M6-COP7	AF-M8-COP10	
MC-M6-COP8	BK-M6-COP5	RR-M9-COP4	RO-M6-COP8	AF-M8-COP11	
MC-M6-COP10	BK-M6-COP6	RR-M9-COP5	RO-M6-COP9	AF-M8-COP12	
MC-M6-COP11	BK-M6-COP7	RR-M9-COP6	RO-M6-COP10	AF-M8-COP13	
	BK-M6-COP8	RR-M9-COP7	RO-M6-COP11	AF-M8-COP14	
MC Monat 9	BK-M6-COP9	RR-M9-COP8	RO-M6-COP12	AF-M8-COP15	
MC-M9-COP1	BK-M6-COP10	RR-M9-COP9	RO Monat 9	AF-M8-COP16	
MC-M9-COP2	BK-M6-COP11	RR-M9-COP10		RO-M9-COP1	AF-M8-COP17
MC-M9-COP3	BK-M6-COP12	RR-M9-COP11		RO-M9-COP2	AF-M8-COP18
MC-M9-COP4	BK-M6-COP13	RR-M9-COP12	RO-M9-COP3	AF-M8-COP19	
MC-M9-COP5	BK-M6-COP14	RR-M9-COP13			
MC-M9-COP6	BK-M6-COP15	RR-M9-COP14	RO-M9-COP4		
MC-M9-COP7	BK-M6-COP16	RR-M9-COP15	RO-M9-COP5		
MC-M9-COP8	BK-M6-COP17	RR-M9-COP16	RO-M9-COP6		
MC-M9-COP9			RO-M9-COP7		
MC-M9-COP10		RR Monat 12	RO-M9-COP8		
MC-M9-COP11			RR-M12-COP1	RO-M9-COP9	
MC-M9-COP12			RR-M12-COP2	RO-M9-COP10	
MC-M9-COP13		RR-M12-COP3	RO-M9-COP11		
MC-M9-COP14		RR-M12-COP4	RO-M9-COP12		
MC-M9-COP15		RR-M12-COP5	RO-M9-COP13		
		RR-M12-COP6	RO-M9-COP14		
		RR-M12-COP7	RO-M9-COP15		
		RR-M12-COP8	RO-M9-COP16		
		RR-M12-COP9	RO-M9-COP17		
		RR-M12-COP10	RO-M9-COP18		
		RR-M12-COP11	RO-M9-COP20		
		RR-M12-COP12	RO-M9-COP21		
		RR-M12-COP13			
		RR-M12-COP14			
		RR-M12-COP15		Th1	
		RR-M12-COP16		Th0	
		RR-M12-COP17		Th2	

(F) Präferenzintensitätsindex



3.1.3. Längsschnittstudie: das Zytokinprofil GA-reaktiver TZL vor und unter GA-Behandlung ist heterogen

Insgesamt sechs MS-Patienten wurden longitudinal beobachtet, also vor Beginn der GA-Behandlung sowie im Verlauf zu verschiedenen Zeitpunkten (**Abbildung 10D**). Insgesamt waren die Verläufe der Zytokinprofile sehr heterogen. TZL von einem Patienten (GJ) hatten vor Behandlung ein ausgeglichenes Zytokinprofil ($I = -0,08$; TH-0), welches sich bereits nach einem Behandlungsmonat nach TH-2 verschob ($I = +0,92$); nach drei Behandlungsmonaten war das Zytokinprofil wieder bei TH-0 ($I = -0,10$). Ein anderer Patient (CS) behielt ein TH-1-Profil von vor der GA-Behandlung ($I = -0,38$) bis zum zweiten Behandlungsmonat ($I = -0,42$) und verschob es am sechsten Behandlungsmonat in Richtung TH-2 ($I = +0,19$). Vier weitere Patienten (WHa, HC, SZ und LN) verschoben ihr Zytokinprofil nicht bis zum ersten bis dritten Behandlungsmonat.

Auch die Zytokinprofile von GA-behandelten MS-Patienten im Verlauf waren sehr heterogen und zeigten Verschiebungen in beide Richtungen (sowohl von TH-1 nach TH-2 als auch umgekehrt; **Abbildung 10E**).

Die Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung TH-2 in GA-behandelten MS-Patienten war spezifisch für GA-reaktive TZL. Als Kontrollen wurden sieben PPD- und fünf TT-reaktive TZL von zwei GA-behandelten Patienten mit untersucht (**Abbildung 11**). Während die 31 GA-reaktiven TZL dieser Patienten nur vom TH-0- oder vom TH-2-Typ waren, waren die PPD- bzw. TT-reaktiven TZL, die zum selben Zeitpunkt isoliert worden waren, ausschließlich vom TH-1-Typ.

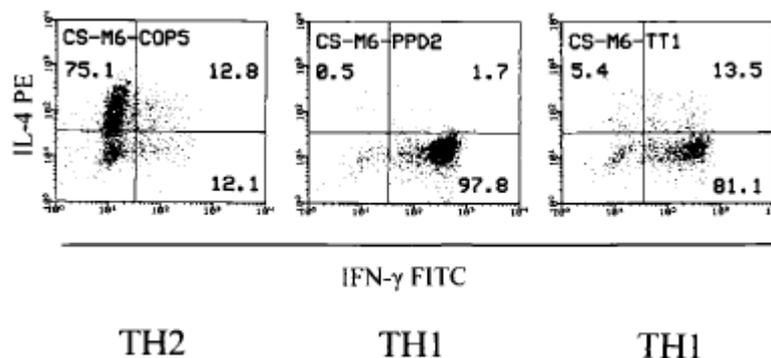


Abbildung 11. Zytokinprofil GA-, TT- und PPD-reaktiver TZL. Die drei TZL wurden von einem GA-behandelten Patienten isoliert. Die Zahlen repräsentieren prozentuale Anteile der einzelnen Quadranten im Vergleich zur Gesamtzahl der aktivierten Zellen. Die Zuordnung nach TH-1, TH-0 und TH-2 der einzelnen TZL wurde nach dem im Text beschriebenen Algorithmus durchgeführt. Aus [1].

3.1.4. Zytokinsekretion GA-reaktiver TZL nach Kreuzstimulation mit MBP

Wie bereits erwähnt (siehe 3.1.1.), zeigte keine der GA-reaktiven TZL eine proliferative Antwort auf MBP und umgekehrt. Frühere Beobachtungen im EAE-Modell hatten ebenfalls gezeigt, dass GA-reaktive TZL von GA-behandelten Mäusen keine MBP-induzierte Proliferation aufwiesen [84], doch wurde beobachtet, dass einige dieser GA-reaktiven TZL insofern durch MBP kreuzstimulierbar waren, als sie IL-4 sezernierten. Aufgrund dieser Befunde wurde untersucht, ob auch humane GA-reaktive TZL durch Stimulation mit MBP zur Zytokinsekretion angeregt werden

können. In der Tat wiesen einige GA-reaktive TZL eine Kreuzstimulation durch MBP auf, indem sie niedrige durch ELISA messbare Mengen von IL-4 und IFN- γ (abhängig von ihrem vorherrschenden Zytokinprofil) sezernierten. Insgesamt 111 GA-reaktive TZL wurden auf IL-4-Sekretion und 53 TZL auf IFN- γ -Sekretion überprüft. Von diesen zeigten 9/111 (8.1 %) und 8/53 (15.1 %) TZL eine MBP-induzierte Sekretion von IL-4 bzw. IFN- γ auf signifikantem Niveau, d.h. mehr als zwei Standardabweichungen über dem Hintergrund. Die Quelle der TZL spielte dabei keine Rolle (behandelte oder unbehandelte MS-Patienten, gesunde Kontrollpersonen) (**Abbildung 12**). Auf der anderen Seite sezernierte eine von sieben getesteten MBP-reaktiven TZL IL-4 nach Restimulation mit GA (5.5 pg/ml gegenüber 0 pg/ml ohne Antigen). Zusätzlich wurden zwölf GA-reaktive TZL bezüglich ihrer Kreuzreaktion mit MOG überprüft. Zwei von diesen produzierten in der Tat IFN- γ (27.0 pg/ml mit MOG vs. 3.7 pg/ml ohne Antigen bzw. 18.1 pg/ml mit MOG vs. 3.3 pg/ml ohne Antigen).

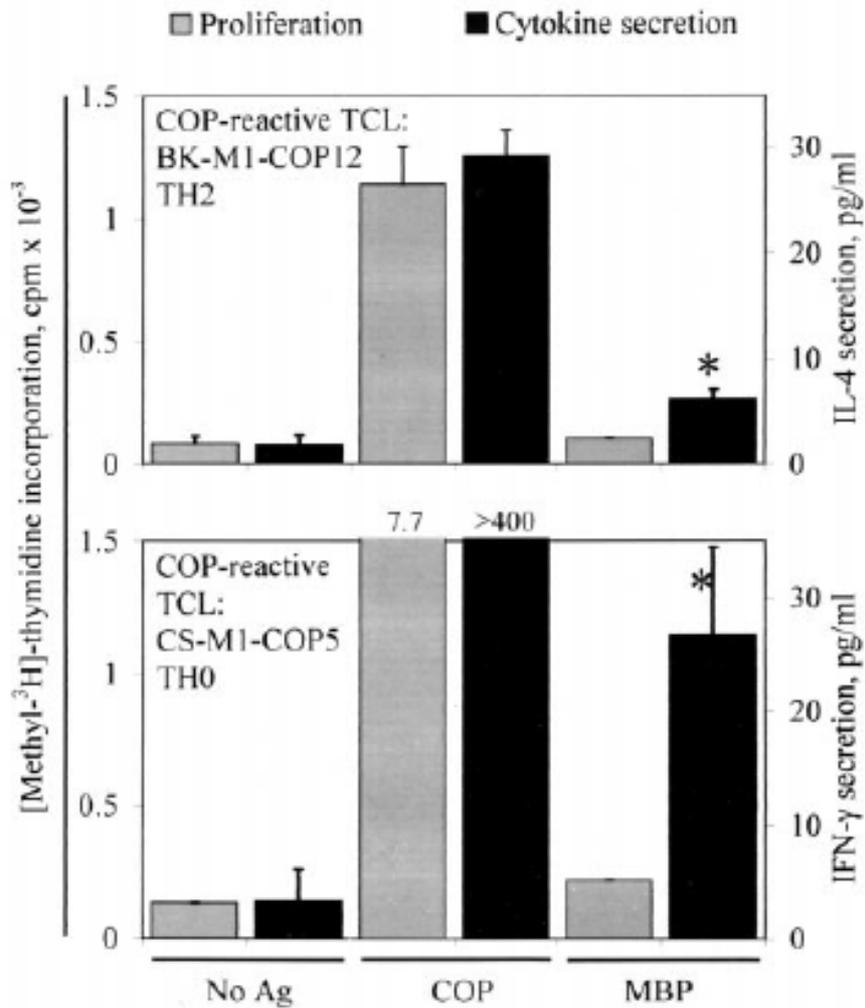


Abbildung 12. Proliferation und Zytokinsekretion GA-reaktiver TZL nach Kreuzstimulation durch MBP. Die linke vertikale Achse (graue Balken) zeigt die Proliferation, während die rechte vertikale Achse (schwarze Balken) die durch ELISA aus den Überständen der identischen Experimente gemessene Zytokinsekretion zeigt. Oben: IL-4-Sekretion durch eine TH-2 GA-reaktive TZL. Unten: IFN-γ-Sekretion durch eine TH-0 GA-reaktive TCL. *Zytokinkonzentration > 2 Standardabweichungen über dem Hintergrundsignal. Die Sensitivität der ELISA-Tests liegt bei < 2 pg/ml. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment. Aus [1].

3.2. Mitoxantron

3.2.1. Antigen-spezifische und -unspezifische Proliferation wird durch Mitoxantron inhibiert

Mitoxantron inhibierte die Proliferation PHA-aktivierter PBL dosisabhängig, aber unabhängig von der Herkunft der PBL, also unabhängig davon, ob die PBL von IFN-β-behandelten oder unbehandelten MS-Patienten oder von gesunden

Kontrollpersonen stammten (**Abbildung 13A**). Auch die Proliferation PWM-aktivierter B-Lymphozyten wird dosisabhängig von Mitoxantron inhibiert, und zwar zu Dosen, die vergleichbar mit denen sind, die die PBL-Proliferation inhibieren (signifikant ab 20 ng/ml; **Abbildung 13B**).

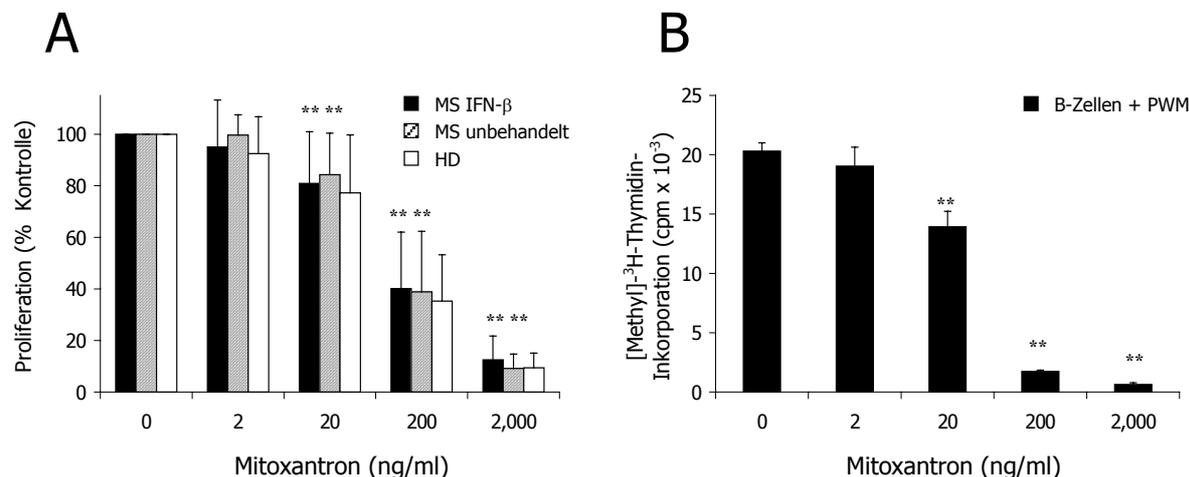


Abbildung 13. Einfluss von Mitoxantron auf die Lymphozyten-Proliferation. **(A)** PBL wurden mit PHA für 5 Tage stimuliert und mit Mitoxantron an Tag 4 behandelt. Die Proliferation wird als relativer Prozentsatz gegenüber der durch PHA-Stimulation induzierten Proliferation ohne Mitoxantron-Behandlung angegeben. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert + Standardabweichung von n=15 IFN-β-behandelten MS-Patienten (schwarze Balken), n=12 unbehandelte MS-Patienten (gestreifte Balken) und n=6 gesunde Kontrollpersonen (HD; weiße Balken). **(B)** B-Lymphozyten-Proliferation. B-Zellen wurden aus PBL durch paramagnetische Partikel gegen (Nicht-B-Zellen) angereichert und mit Pokeweed-Mitogen (PWM) aktiviert. Die Proliferation wird als die mittlere Zahl der β-Zerfälle (*counts per minute*, cpm) + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben. Hierbei wurde der B-Lymphozytenanteil auf 44.2 % der lymphoiden Zellen angereichert. Das Signifikanzniveau wurde durch den zweiseitigen Student-*t*-Test ermittelt, indem unbehandelte Zellen (0 ng/ml) mit Mitoxantron-behandelten Zellen verglichen wurden (*p<0.05; **p<0.01).

Die Antigen-spezifische Proliferation von TZL wurde ebenfalls inhibiert (**Abbildung 14A**), allerdings wurde interessanterweise bereits bei 10-fach geringeren Dosen (ab 2 ng/ml) das Signifikanzniveau erreicht. In einem funktionellen Experiment wurden zum einen die autologen APC (entweder isolierte B-Lymphozyten, Monozyten oder bestrahlte PBL), zum anderen die TZL selbst mit Mitoxantron vorinkubiert, anschließend gewaschen und dann für 48 Stunden kokubiert. Die Mitoxantron-Vorbehandlung der APC erbrachte eine signifikant höhere inhibierende Wirkung auf

die TZL-Proliferation als die Vorbehandlung der TZL selbst. Hieraus wird abgeleitet, dass APC gegenüber T-Lymphozyten eine höhere Mitoxantron-Suszeptibilität besitzen (**Abbildung 14B**).

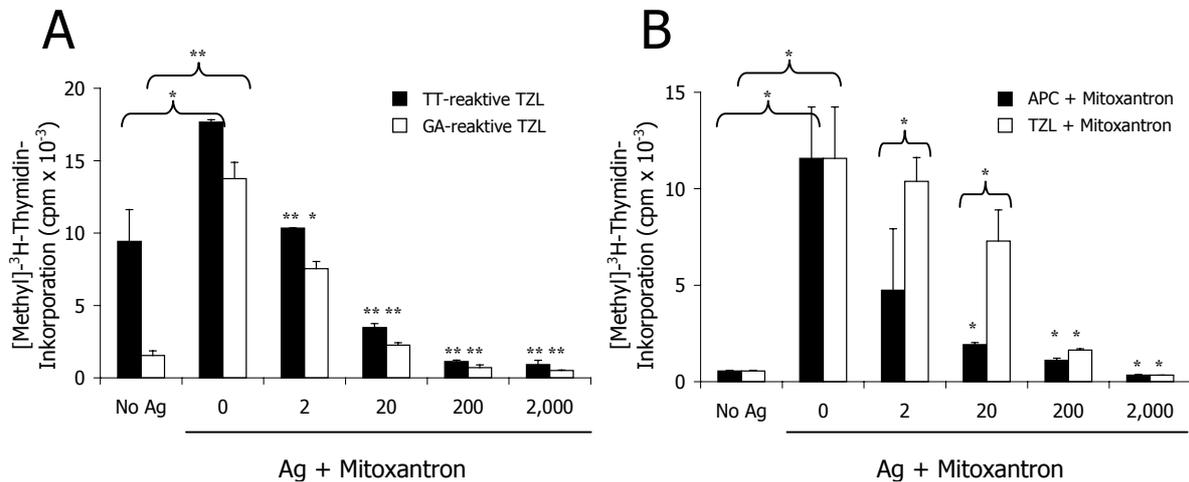


Abbildung 14. Einfluss von Mitoxantron auf Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation. **(A)** TZL mit Reaktivität gegen Tetanustoxoid (TT, n=2) oder Glatiramerazetat (GA, n=9) wurden mit ihrem jeweiligen Antigen (Ag) auf bestrahlten autologen Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) stimuliert. Die Inkubation mit oder ohne Mitoxantron erfolgte über 48 Stunden. Die Proliferation wird als mittlere Zahl der β -Zerfälle (cpm) + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben. Mit TT ist die Hintergrund-Proliferation ohne Ag gewöhnlich hoch. **(B)** Zur funktionellen Untersuchung wurden entweder die TZL als Effektorzellen oder die APC separat mit Mitoxantron für 24 Stunden vorinkubiert, anschließend gewaschen und dann mit GA für weitere 48 Stunden koinkubiert. Die Proliferation wird als mittlere Zahl der β -Zerfälle (cpm) + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben. Bei niedrigeren Konzentrationen (2-20 ng/ml) inhibierte Mitoxantron die Proliferation signifikant effektiver, wenn es mit den APC vorinkubiert wurde. Zweiseitige Student-*t*-Tests verglichen (i) Mitoxantron-unbehandelte TZL mit und ohne Ag (jeweils die ersten beiden Säulen), und (ii) Mitoxantron-unbehandelte Ag-stimulierte TZL (jeweils die zweiten Säulen) mit den jeweiligen Mitoxantron-behandelten TZL (Säulen drei bis sechs; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.2.2. Mitoxantron hat keinen signifikanten Einfluss auf Oberflächenmarker und die Expression intrazellulärer Zytokine

Sowohl in PHA-stimulierten PBL, in für fünf Tage unstimuliert gelassenen PBL als auch in PBL oder isolierten Monozyten, die für 24 Stunden kultiviert worden waren,

wurden weder die Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen noch die intrazelluläre Produktion von IL-4 und IFN- γ durch Mitoxantron wesentlich beeinflusst (**Tabelle 6**).

Tabelle 6. Phänotypische Effekte von Mitoxantron.

Marker	Inkubationsdauer	PHA-stimulierte PBL		Unstimulierte PBL		Unstimulierte Monozyten			
		5 Tage		5 Tage		24 Stunden	24 Stunden		
Lebende Zellen ^a	∅	97.8 ± 1.6		99.4 ± 0.9		99.7 ± 0.3		89.5 ± 4.7	**
	M	96.4 ± 2.9	ns	96.0 ± 4.0	ns	97.0 ± 0.7	ns	12.2 ± 9.3	
Annexin-V	∅	1.7 ± 0.6		1.1 ± 0.4		6.0 ± 2.0		3.2 ± 0.6	ns
	M	3.4 ± 1.7	ns	0.8 ± 0.0	ns	7.3 ± 0.8	ns	2.8 ± 2.9	
CD3	∅	84.8 ± 6.3		73.6 ± 24.7		67.4 ± 8.3		0.1 ± 0.1	ns
	M	83.1 ± 6.3	ns	77.7 ± 25.9	ns	75.8 ± 5.3	ns	0.3 ± 0.2	
CD4	∅	48.7 ± 14.9		43.1 ± 17.9		36.4 ± 10.5		n.d.	
	M	56.8 ± 20.1	ns	57.6 ± 7.9	ns	32.4 ± 5.6	ns		
CD8	∅	31.8 ± 13.8		19.2 ± 7.3		31.6 ± 4.7		n.d.	
	M	23.6 ± 10.8	ns	18.3 ± 7.1	ns	38.2 ± 0.5	ns		
CD19	∅	4.9 ± 3.3		7.5 ± 3.5		7.2 ± 2.4		n.d.	
	M	4.7 ± 2.7	ns	4.3 ± 3.6	ns	9.3 ± 3.6	ns		
CD20	∅	n.d.		n.d.		9.9 ± 2.9		n.d.	
	M					12.4 ± 4.1	ns		
CD27	∅	44.6 ± 22.1		24.3 ± 22.9		58.0 ± 6.1		n.d.	
	M	41.2 ± 18.6	ns	30.4 ± 23.0	ns	63.8 ± 0.4	ns		
CD45RO	∅	76.5 ± 12.1		39.1 ± 8.4		38.4 ± 7.9		n.d.	
	M	70.8 ± 10.8	ns	43.6 ± 8.9	ns	46.4 ± 14.8	ns		
CD45RA	∅	14.1 ± 8.4		41.1 ± 4.2		50.6 ± 11.9		n.d.	
	M	16.2 ± 8.5	ns	34.5 ± 6.5	*	34.6 ± 11.6	ns		
CD69	∅	5.4 ± 9.3		0.7 ± 1.2		14.6 ± 6.3		96.4 ± 0.9	ns
	M	11.3 ± 16.0	ns	1.7 ± 2.4	ns	25.6 ± 15.9	ns	97.8 ± 1.0	
CD14	∅	n.d.		n.d.		1.1 ± 0.8		89.5 ± 8.9	ns
	M					1.7 ± 0.6	ns	92.2 ± 10.6	
CD64	∅	n.d.		n.d.		2.5 ± 0.6		88.4 ± 0.5	ns
	M					4.2 ± 0.9	ns	87.8 ± 6.2	
CD80	∅	n.d.		n.d.		3.2 ± 3.9		94.4 ± 6.5	ns
	M					11.2 ± 7.7	ns	95.9 ± 4.7	

Fortsetzung **Tabelle 6.**

Marker	Inkubationsdauer	PHA-stimulierte PBL	Unstimulierte PBL	Unstimulierte PBL	Unstimulierte Monozyten		
		5 Tage	5 Tage	24 Stunden	24 Stunden		
CD86	∅	7.2	1.7	7.8 ± 3.0	95.2 ± 2.2	ns	ns
	M	5.8	3.0	14.0 ± 4.5	96.8 ± 3.4		
HLA-DR	∅	5.4 ± 3.7	6.3 ± 1.3	15.2 ± 5.9	96.6 ± 4.0	ns	ns
	M	6.2 ± 3.2	4.5 ± 1.8	19.7 ± 6.4	99.0 ± 0.2		
CD11a	∅	n.d.	n.d.	97.9 ± 0.4	84.5 ± 9.0	ns	ns
	M			97.3 ± 0.3	89.5 ± 2.0		
VLA-4	∅	88.6 ± 5.5	68.6 ± 8.7	85.5 ± 9.4	29.3 ± 9.2	ns	ns
	M	87.3 ± 6.7	60.5 ± 24.8	88.9 ± 3.5	28.3 ± 7.3		
ICAM-1	∅	31.0 ± 20.3	2.4 ± 2.1	4.9 ± 2.2	80.6 ± 6.0	**	ns
	M	29.3 ± 21.1	3.8 ± 0.8	12.7 ± 1.3	77.7 ± 5.8		
IL-4	∅	6.7 ± 3.6	n.d.	3.8 ± 1.0	n.d.	ns	
	M	7.1 ± 3.3		2.6 ± 0.4			
IFN-γ	∅	0.3 ± 0.2	n.d.	9.7 ± 4.7	n.d.	ns	
	M	0.2 ± 0.2		8.4 ± 7.2			

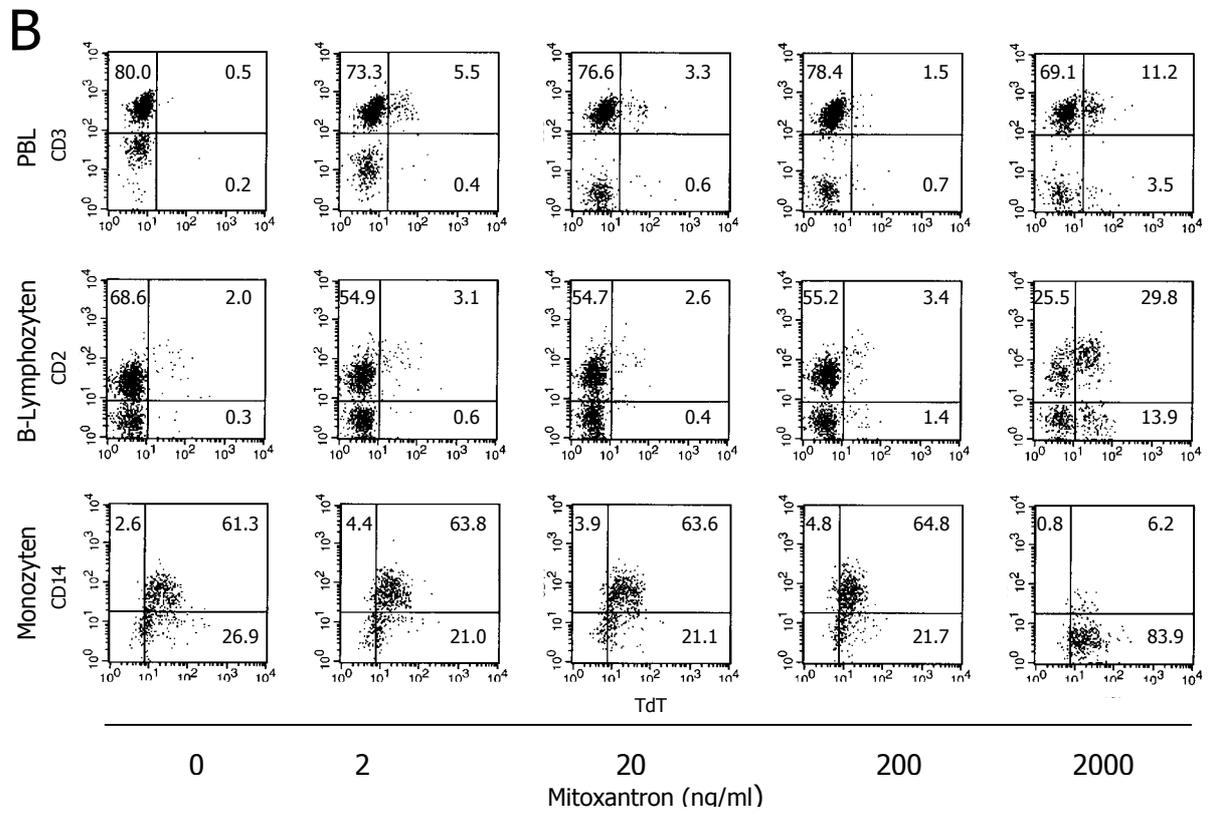
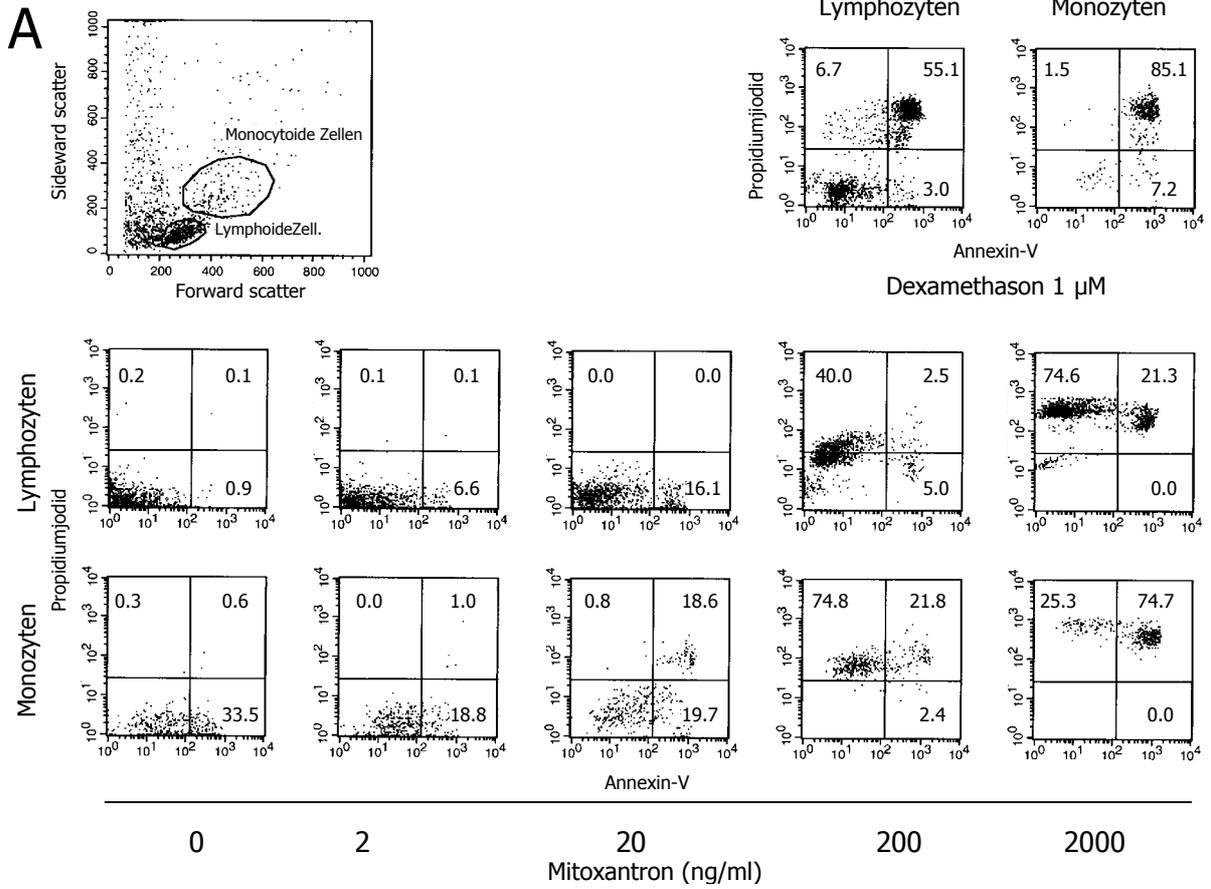
^a Propidiumjodid-negative Zellen. ∅ = ohne Mitoxantron; M = Mitoxantron 200 ng/ml; ns = nicht signifikant; n.d. = nicht durchgeführt. *p<0.05; **p<0.01. Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardabweichung von bis zu 11 Experimenten (5-Tages-Protokoll) bzw. 8 Experimenten (24-Stunden-Protokoll) angegeben (%). PBL von n=4 IFN-β-behandelten MS-Patienten, n=5 unbehandelten MS-Patienten und n=6 gesunden Kontrollpersonen wurden untersucht.

3.2.3. Mitoxantron verursacht apoptotischen Zelltod in niedrigen und nekrotischen Zelltod in hohen Konzentrationen

Mittels Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Annexin-V als frühem Marker für Apoptose und Propidiumjodid als Marker nekrotischen Zelltodes wurden die Effekte von Mitoxantron auf Zelltodmechanismen untersucht. Es erschien, dass Mitoxantron einen zweifach gerichteten Zelltodmechanismus aufweist, abhängig von der Konzentration (**Abbildung 15**): Bei *in vitro* Dosen unter 20 ng/ml war Apoptose vorherrschend, während bei Dosen über 200 ng/ml der nekrotische Zelltod verursacht wurde. Der direkte Vergleich lymphoider Zellen mit Monozyten desselben Spenders zeigte eine höhere Empfindlichkeit der Monozyten gegenüber dem Mitoxantron-induzierten

Zelltod. Während sich bei 20 ng/ml 16 % der Lymphozyten und 20 % der Monozyten im frühen apoptotischen Stadium befanden, waren 0 % der Lymphozyten und 19 % der Monozyten Propidiumjodid-positiv, d.h. waren bereits der späten Apoptose unterzogen worden oder sogar dem nekrotischen Zelltod (**Abbildung 15A**). Bei höheren Mitoxantron-Dosen waren die Prozentsätze der Annexin-V/Propidiumjodid doppelt positiven (also spät apoptotischen oder nekrotischen) Monozyten weit höher als die der entsprechenden Lymphozyten (**Abbildung 15A**). Passend zu diesen Beobachtungen zeigte die phänotypische Untersuchung eine Reduktion der Propidiumjodid-negativen, also lebenden Monozyten von 90 % (ohne Mitoxantron) auf 12 % (200 ng/ml Mitoxantron), ohne dass ihr Phänotyp selbst beeinflusst wurde (**Tabelle 6**), als Hinweis auf eine höhere Suszeptibilität von Monozyten als Lymphozyten gegenüber dem Mitoxantron-induzierten Zelltod. Interessanterweise wurde allein durch die Kultur der Monozyten (also bereits ohne Mitoxantron) ein hoher Prozentsatz apoptotischer Zellen induziert, sowohl was Annexin-V betrifft als auch die durch TdT gemessene DNA-Fragmentierung (**Abbildung 15B**). Monozyten scheinen also per se im Vergleich zu Lymphozyten eine höhere Suszeptibilität gegenüber apoptogenen Signalen aufzuweisen.

Folgende Seite: **Abbildung 15**. Zelltodmechanismen bei Mitoxantron. **(A)** PBL wurden für 48 Stunden mit PHA stimuliert, davon die letzten 18 Stunden in Anwesenheit von Mitoxantron oder Dexamethason 1 μ M als Positivkontrolle inkubiert. Frühe Apoptose wurde durch Annexin-V gemessen, Nekrose wurde durch die Aufnahme von Propidiumjodid erfasst. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment. Oben links: Definition lymphoider und monozytoider Zellen. Andere „dot plots“: Annexin-V-Bindung vs. Aufnahme von Propidiumjodid. Die Zahlen repräsentieren % lymphoide/monozytoide Zellen. Dexamethason induziert Apoptose (die Annexin-V⁺/Propidiumjodide⁺ Zellen befinden sich bereits in der späten apoptotischen Phase). **(B)** PBL, angereicherte B-Lymphozyten oder Monozyten wurden für 24 Stunden mit Mitoxantron koinkubiert. Die DNA-Fragmentierung wurde durch den TdT-Assay (siehe Text) gemessen und der Expression von CD3, CD20 und CD14 gegenübergestellt. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment. Aus [2].



Die am meisten ausgeprägten Effekte wurden bei der höchsten eingesetzten *in vitro* Dosis, nämlich 2000 ng/ml, gesehen. Nach einer 48-stündigen Kultur mit PHA war es zu nekrotischem Zelltod bei praktisch allen Lymphozyten und Monozyten gekommen, wobei das Verhältnis Annexin-V-negativer und -positiver Zellen bei Lymphozyten und Monozyten invers war (75 : 21 in Lymphozyten vs. 25 : 75 in Monozyten; **Abbildung 15A**). In einer 24-stündigen Kultur ohne Mitogen war durch TdT messbare DNA-Fragmentierung in 11 % der CD3⁺ T-Lymphozyten und in 30 % der CD20⁺ B-Lymphozyten festzustellen (**Abbildung 15B**). Monozyten wurden durch Mitoxantron in dieser Höchstdosis vollständig desintegriert, was sich durch den Verlust der CD14-Expression zeigte (**Abbildung 15B**), was bei der 10-fach niedrigeren Dosis von 200 ng/ml nicht der Fall war (**Abbildung 15B, Tabelle 6**).

3.3. Statine

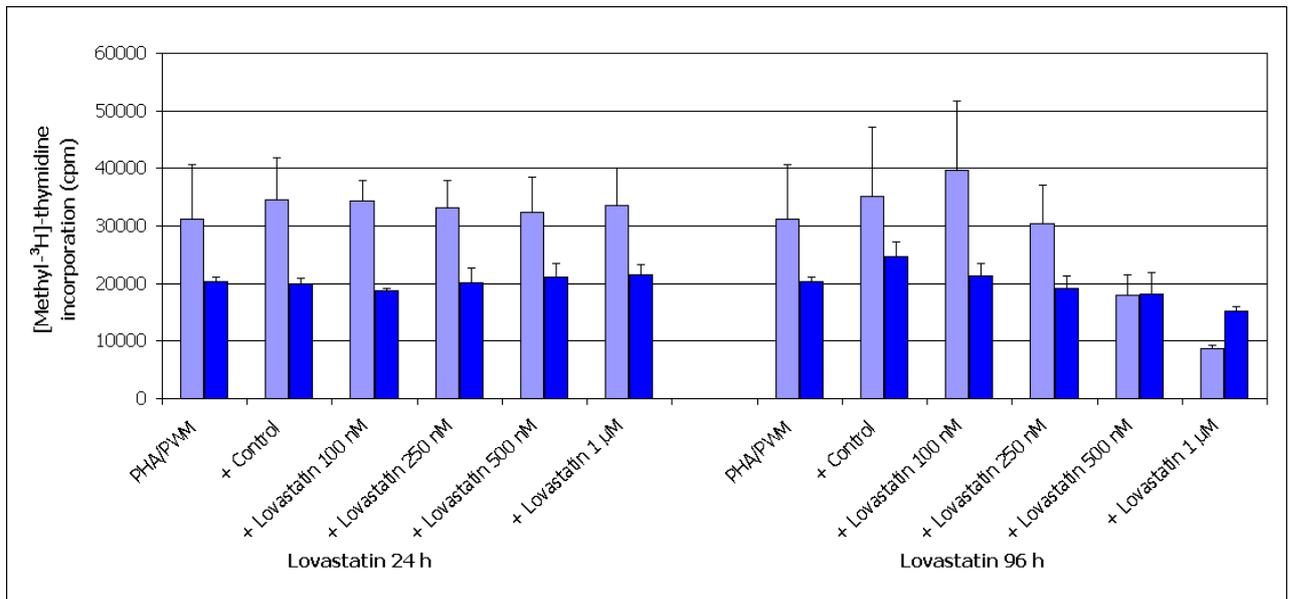
3.3.1. Statine reduzieren die Proliferation von T-Lymphozyten, aber nicht die von B-Lymphozyten

Statine reduzierten dosisabhängig die Proliferation PHA-aktivierter T-Lymphozyten. Bei nur 24-stündiger Inkubation (von Tag 4 bis Tag 5) waren die Statine ohne Einfluss auf die Proliferation. Wurden die Statine an Tag 0 oder Tag 1 hinzugefügt, so wurde die T-Lymphozyten-Proliferation inhibiert (**Abbildung 16A**). Im Gegensatz hierzu war die Proliferation PWM-aktivierter B-Lymphozyten von Statinen gleicher Dosis nicht beeinflusst, auch nicht bei 5-tägiger Inkubation (**Abbildung 16A**).

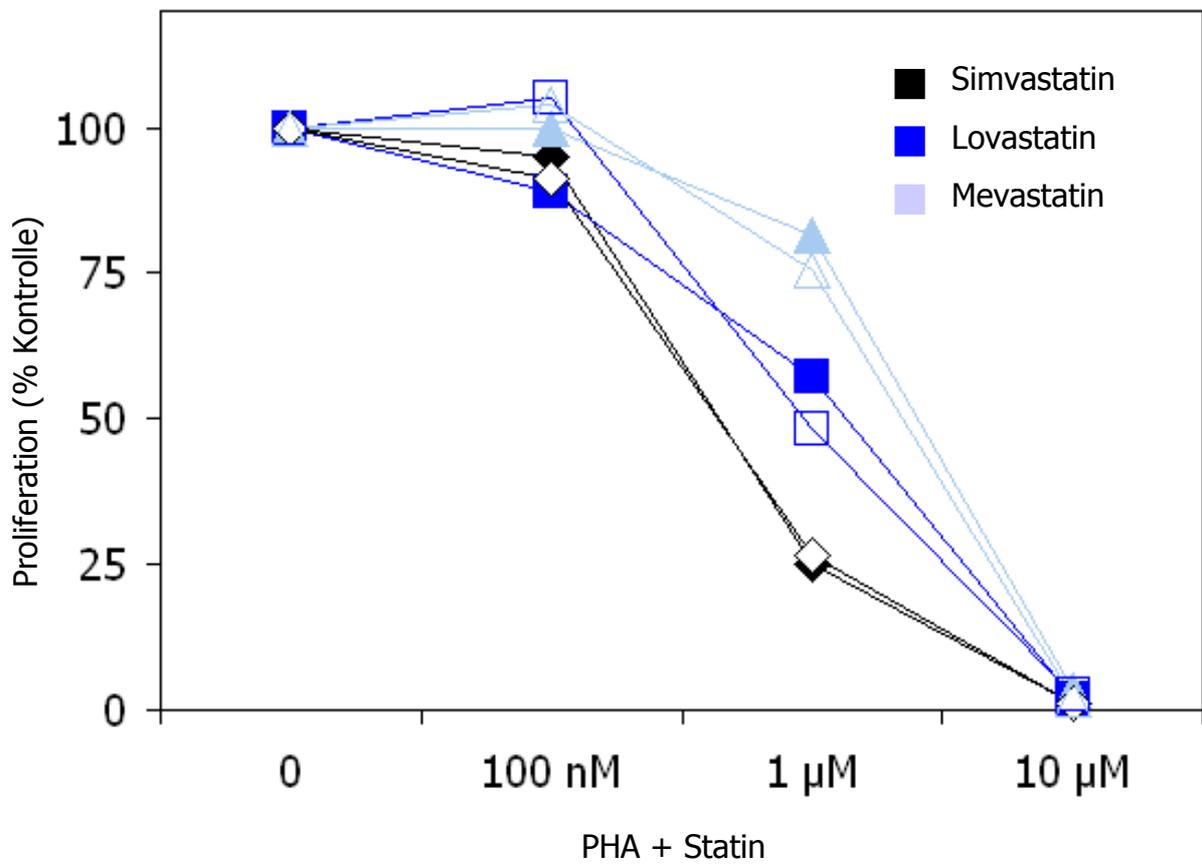
Unabhängig von der Herkunft der PBL (MS-Patienten oder gesunde Kontrollpersonen) inhibierten alle drei untersuchten Statine die Proliferation PHA-aktivierter PBL, wobei das lipophile Simvastatin am potentesten war, gefolgt von Lovastatin und dem hydrophilen Mevastatin (**Abbildung 16B**).

Folgende Seite: **Abbildung 16**. Einfluss der Statine auf die Lymphozyten-Proliferation. **(A)** Vergleich zwischen T- und B-Lymphozyten. PBL (hellblaue Säulen) und angereicherte B-Lymphozyten (dunkelblaue Säulen wurden mit PHA bzw. mit PWM aktiviert und mit Lovastatin für 24 Stunden (links) oder 96 Stunden (rechts) behandelt. Nach 96 Stunden wurden die Zellen für weitere 16 Stunden mit [Methyl-³H]-Thymidin markiert. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment. **(B)** PBL von n=8 MS-Patienten (geschlossene Symbole) und n=6 gesunden Kontrollpersonen (offene Symbole) wurden mit PHA aktiviert und mit verschiedenen Konzentrationen von Simvastatin (schwarze Rauten), Lovastatin (dunkelblaue Quadrate) oder Mevastatin (hellblaue Dreiecke) inkubiert. Die Proliferation wird als Prozentsatz der PHA-induzierten Proliferation ohne Statin-Behandlung angegeben.

A



B



3.3.2. Die T-Lymphozyten-Proliferation wird durch Inhibierung der Isoprenylierung gehemmt

Um die Wirkungsweise von Statinen genauer einzugrenzen, wurden mehrere Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden Intermediate des Cholesterinbiosyntheseweges *in vitro* hinzugefügt, um die Effekte der Statine vollständig oder teilweise aufzuheben (so genannte Rettungs- oder *Rescue*-Experimente). Mevalonat, das Produkt der HMG-CoA-Reduktase, konnte die Inhibierung der T-Lymphozyten-Proliferation auch der Statin-Höchstdosis (10 μ M) vollständig aufheben (**Abbildung 17**). Squalen als wichtiges Intermediat zur Cholesterinsynthese selbst, jedoch distal von den für die Isoprenylierung notwendigen Intermediaten, war nicht in der Lage, die Inhibierung der T-Lymphozyten-Proliferation durch Statine zu verhindern (**Abbildung 17**).

Um Effekte der Statine auf die Isoprenylierung zu untersuchen, wurden Isoprenylierungs-Inhibitoren eingesetzt. FTI-277 konnte die Proliferation partiell inhibieren, GGTI-298 jedoch nicht, ein Hinweis, dass die Farnesylierung von Proteinen zur T-Lymphozyten-Proliferation beiträgt (**Abbildung 17**).

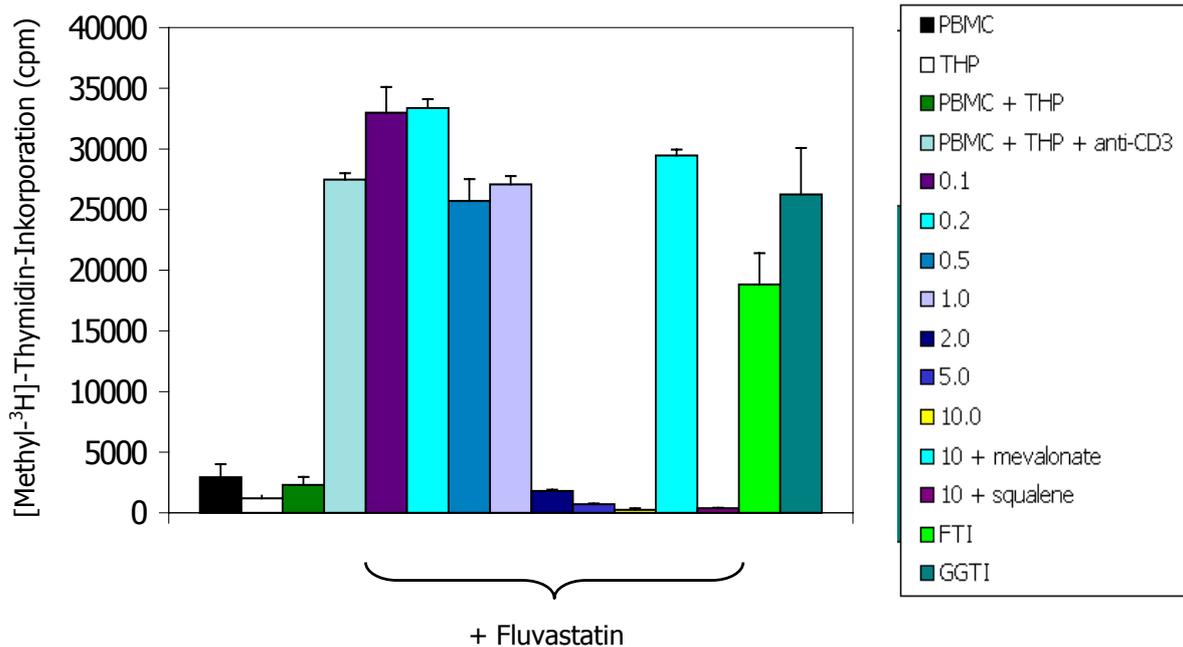


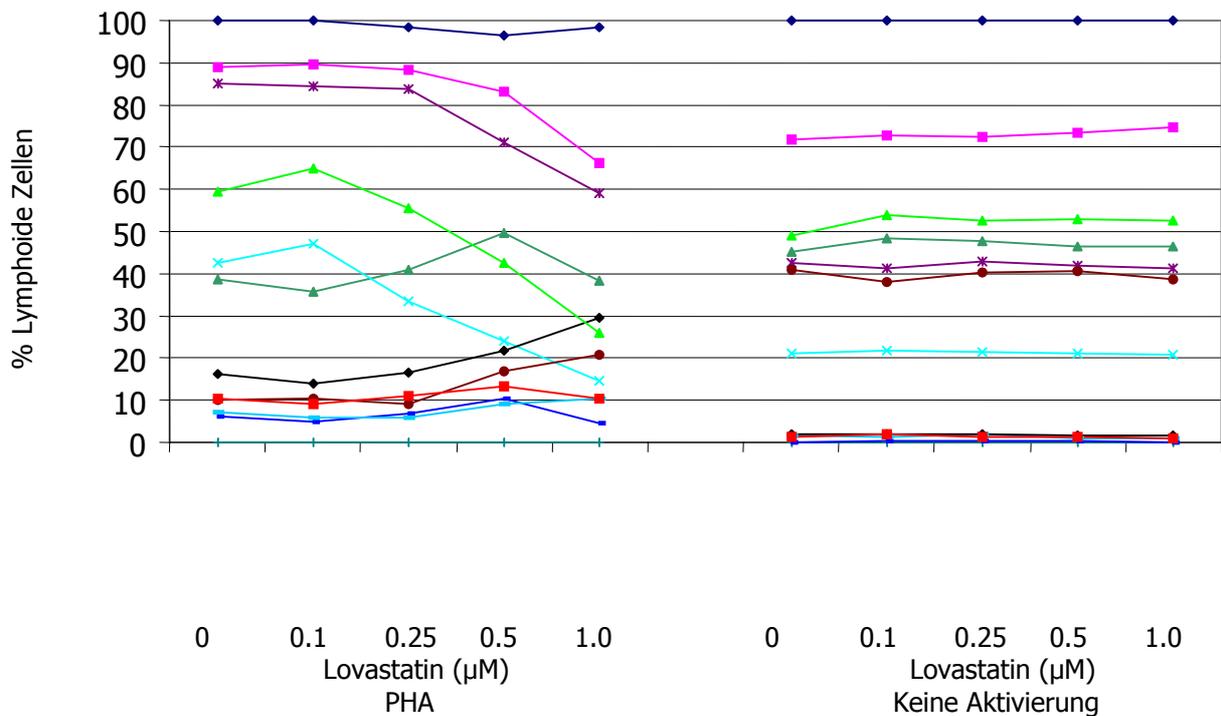
Abbildung 17. Kontrollexperimente: Statine und Proliferation. In einem T-Zell-Aktivierungssystem mit funktionellen Anti-CD3-Antikörpern und der bestrahlten Monozytenlinie THP-1 als zweitem Signal wurden Kontrollexperimente durchgeführt (Inkubationsdauer 5 Tage). Fluvastatin hatte in niedrigsten Dosen (0.1-0.2 μM ; lila und linker hellblauer Balken) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (graublauer Balken) verstärkende Effekte auf die PBL-Proliferation. In höheren Dosen (2-10 μM) nahm die Proliferation ab. Mevalonat (100 μM) hob die Proliferations-Inhibition durch Fluvastatin (10 μM) vollständig auf (gelber vs. rechter hellblauer Balken), während Squalen (100 μM ; violetter Balken) keine Wirkung hatte. FTI-277 (Farensyltransferase-Inhibitor 277; hellgrüner Balken) inhibierte die Proliferation partiell, während GGTI-298 (Geranylgeranyltransferase-Inhibitor 298; dunkelgrüner Balken) ohne Wirkung war. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment.

3.3.3. Statine beeinflussen Oberflächenmarker in aktivierten, aber nicht in nicht aktivierten T-Lymphozyten

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde, wurde durch Statine in PHA-aktivierten T-Lymphozyten teilweise deutlich beeinflusst (**Abbildung 18A**), bei statistischer Auswertung bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ allerdings mit wenigen Ausnahmen (CD3^+ PBL) nicht signifikant (**Tabelle 7**). Der prozentuale Anteil von CD45RO^+ -Zellen (aktivierte und so genannte Memory-T-Lymphozyten) wurde durch die Präsenz der Statine dosisabhängig vermindert, wohingegen der Prozentsatz der CD45RA^+ -Zellen

(ruhende T-Lymphozyten) vermehrt wurde (**Abbildung 18B**). Im Gegensatz zu diesem Befund war das CD45RO⁺/CD45RA⁺-Verhältnis in nicht aktivierten T-Lymphozyten praktisch unverändert. Höhere Statin-Dosen (1 µM) näherten das CD45RO⁺/CD45RA⁺-Verhältnis PHA-aktivierter Zellen dem von nicht aktivierten Zellen an (**Abbildung 18B**). Weitere Aktivierungsmarker, Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren wurden durch die Anwesenheit der Statine *in vitro* beeinflusst (**Abbildung 18A, Tabelle 7**), wiederum vornehmlich in PHA-aktivierten Zellen. Global betrachtet scheint sich der Phänotyp Statin-behandelter aktivierter T-Lymphozyten demjenigen nicht aktivierter T-Lymphozyten anzunähern (**Abbildung 18B**), was auf einen „deaktivierenden“ Effekt von Statinen hinweist.

A



- ◆ Lebende Zellen
- % CD3
- ▲ % CD4
- × % CD8
- * % CD45RO
- % CD45RA
- + % CD80
- + % CD3+CD86+
- × % CD86
- % CD69
- % CD69+CD27+
- ▲ % CD27

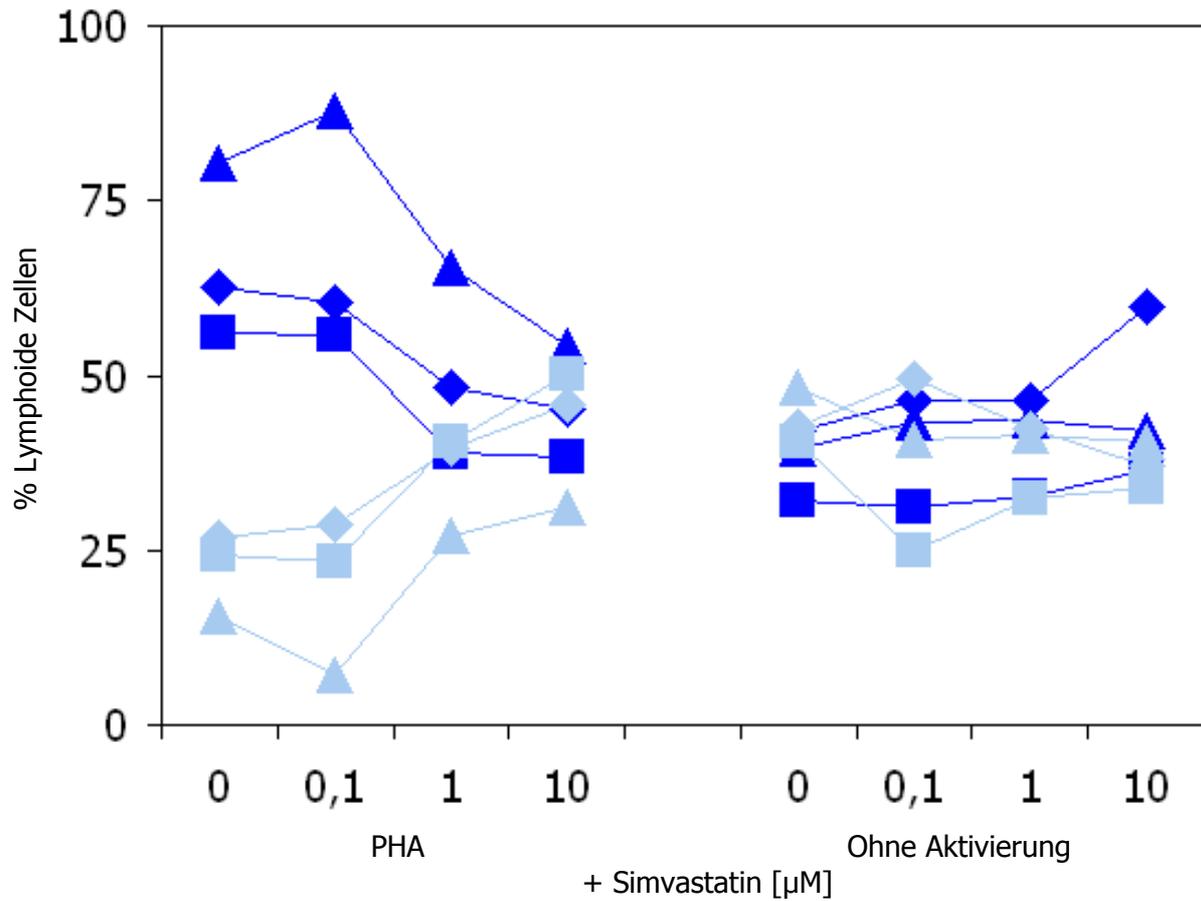
B


Abbildung 18. Phänotypische Effekte der Statine. **(A)** PBL wurden für 5 Tage mit PHA aktiviert (links) oder unaktiviert belassen (rechts). Lovastatin wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Verschiedene Oberflächenmarker wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment. **(B)** PBL von drei Individuen wurden PHA-aktiviert oder unaktiviert belassen. Simvastatin wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen bezüglich der Expression von CD45RO (dunkelblaue Symbole) und CD45RA (hellblaue Symbole) mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Tabelle 7. Phänotypische Effekte von Lovastatin.

Marker	Gruppe	PHA-stimulierte PBL 5 Tage	Signifikanz	Nicht stimulierte PBL 5 Tage	Signifikanz
Lebende Zellen ^a	∅	98.6 ± 1.2	ns	99.2 ± 1.1	ns
	Lovastatin 1 µM	97.5 ± 2.3		99.2 ± 1.2	
CD3	∅	87.0 ± 2.7	*	79.7 ± 4.5	ns
	Lovastatin 1 µM	78.6 ± 7.3		81.2 ± 4.3	
CD4	∅	49.0 ± 14.7	ns	43.1 ± 14.7	ns
	Lovastatin 1 µM	55.9 ± 13.3		45.4 ± 15.1	
CD8	∅	31.9 ± 14.0	ns	19.2 ± 7.3	ns
	Lovastatin 1 µM	20.0 ± 6.5		20.5 ± 7.3	
CD19	∅	5.0 ± 3.7	ns	6.6 ± 2.9	ns
	Lovastatin 1 µM	5.1 ± 2.5		5.8 ± 2.3	
CD27	∅	41.2 ± 16.3	ns	23.9 ± 22.1	ns
	Lovastatin 1 µM	28.2 ± 11.0		27.2 ± 22.3	
CD45RO	∅	75.8 ± 13.1	ns	43.0 ± 7.9	ns
	Lovastatin 1 µM	60.8 ± 15.4		41.0 ± 3.2	
CD45RA	∅	15.2 ± 8.6	ns	40.9 ± 4.6	ns
	Lovastatin 1 µM	25.6 ± 16.6		40.9 ± 5.0	
CD69	∅	22.2 ± 5.9	ns	2.4 ± 0.8	ns
	Lovastatin 1 µM	28.2 ± 7.5		2.4 ± 1.3	
CD86	∅	7.2		1.7	
	Lovastatin 1 µM	10.4		1.0	
VLA-4	∅	88.6 ± 5.5	ns	68.6 ± 8.7	ns
	Lovastatin 1 µM	91.2 ± 3.6		64.2 ± 11.4	
ICAM-1	∅	31.0 ± 20.3	ns	2.4 ± 2.1	ns
	Lovastatin 1 µM	28.4 ± 18.5		4.3 ± 4.9	
CCR5	∅	9.4 ± 3.6	ns	4.8 ± 1.9	ns
	Lovastatin 1 µM	4.1 ± 0.2		4.6 ± 4.8	
CCR6	∅	83.8 ± 3.4	ns	82.9 ± 1.9	ns
	Lovastatin 1 µM	81.8 ± 3.1		77.7 ± 2.2	
CXCR3	∅	86.7 ± 2.0	ns	77.4 ± 10.3	ns
	Lovastatin 1 µM	80.0 ± 7.0		79.7 ± 11.0	
CXCR4	∅	75.5 ± 3.6	ns	84.0 ± 3.3	ns
	Lovastatin 1 µM	76.0 ± 2.5		85.7 ± 3.9	

^a Propidiumjodid-negative Zellen. \emptyset = ohne Antigen; ns = nicht signifikant. * $p < 0.05$. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung von bis zu 6 Experimenten angegeben (% lymphoide Zellen). PBL von $n=2$ IFN- β -behandelten MS-Patienten, $n=2$ unbehandelten MS-Patienten und $n=2$ gesunden Kontrollen wurden analysiert. Parallele Experimente mit Simvastatin und Mevastatin zeigten vergleichbare Ergebnisse.

4. Diskussion

4.1. Glatiramerazetat

Die Analyse einer großen Anzahl GA-reaktiver TZL zeigte, dass sich das Zytokinprofil der GA-reaktiven TZL von TH-1 vor Behandlung nach TH-2 unter GA-Behandlung verschob. Außerdem reagierten etwa 10 % der GA-reaktiven TZL auf MBP durch Zytokinsekretion, wenn auch nicht durch Proliferation. Beide Befunde passen gut zu früheren EAE-Daten [84,125]. Auch wurde praktisch zeitgleich zur Originalpublikation der hier dargestellten Daten [1] von zwei weiteren Arbeitsgruppen die Zytokinverschiebung von TH-1 nach TH-2 beschrieben [83,85]:

- Duda und Kollegen untersuchten TZL, die nach einem Kurzzeit-Protokoll isoliert worden waren [85]: PBL wurden in Anwesenheit von GA inkubiert und an den Tagen 5 und 7 jeweils mit einem PHA-freien T-Zell-Stimulationsmedium („T-Stim“) unspezifisch aktiviert. An Tag 12 wurden die GA-stimulierten Zellen mit bestrahlten autologen PBL als APC restimuliert sowie mittels Proliferationsassay deren Spezifität überprüft. Das Zytokinprofil wurde sowohl durch ELISA als auch durch eine verwandte Methode, dem so genannten ELISPOT (*enzyme linked immunospot* assay; Nachweis einzelner Zytokin-sezernierender Zellen), untersucht. Unter GA-Behandlung reduzierte sich die Sekretion des TH-1-Zytokins IFN- γ signifikant, während das TH-2-Zytokin IL-5 einen Trend zum Anstieg zeigte [85].
- Gran und Kollegen untersuchten ebenfalls Kurzzeit-TZL, die mit einer ähnlichen Methode generiert worden waren (Inkubation von PBL mit GA, unspezifische Aktivierung durch IL-2 an Tag 8, Restimulation mit GA auf bestrahlten PBL als APC an Tag 15, Kontrolle der Spezifität durch Proliferationsassay, Untersuchung des Zytokinprofils durch ELISA). Auch Gran und Kollegen zeigten in diesen GA-reaktiven TZL die Reduktion der Sekretion von IFN- γ und die parallele Induktion der Sekretion von IL-4 und IL-5 *in vitro* [83].

Bereits zuvor waren in GA-behandelten MS-Patienten erhöhte Serumtitere des anti-entzündlichen Zytokins IL-10 sowie eine erhöhte mRNA-Expression für IL-4 und Transformierenden Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF)- β , beides ebenfalls anti-entzündliche Zytokine, beschrieben worden [126].

Ein wichtiger technischer Aspekt ist die Analyse des Zytokinprofils GA-reaktiver TZL durch intrazelluläre Durchflusszytometrie. Hierdurch konnte das Zytokinprofil jeder einzelnen Linie quantifiziert und jedem einzelnen Donor ein Präferenzintensitätsindex zugeordnet werden, der sich auf einer kontinuierlichen Skala von -1 (100 % TH-1 TZL) bis $+1$ (100 % TH-2 TZL) erstreckt. Parallele Untersuchungen mittels ELISA in einem Teil der TZL waren konsistent mit den durchflusszytometrischen Daten. Auch wenn die beobachtete Zytokinverschiebung vor allem in der Querschnittstudie, also dem Direktvergleich behandelter und unbehandelter Individuen, signifikant ist, ergibt auch die Längsschnittstudie Hinweise auf eine Verschiebung von TH-1 nach TH-2 unter GA-Behandlung. Einzelne Patienten wiesen jedoch auch unter GA-Behandlung durchaus ein TH-1-Profil auf oder entwickelten ein solches im Verlauf der Behandlung (**Abbildung 10**). Diese Beobachtung passt zu der klinischen und MRT-gestützten Erfahrung, dass GA einige Monate zur vollen Wirksamkeit benötigt [43,127].

Die vorliegenden Daten erlauben noch nicht zu beantworten, ob die dokumentierte GA-induzierte TH-2-Zytokinverschiebung mit klinischen und MRT-Daten korreliert. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist die, ob eine Zytokinverschiebung *in vitro* zur Differenzierung klinischer „Responder“ von „Nonrespondern“ erlaubt, eine aus klinischen und ökonomischen Gesichtspunkten sehr wichtige Frage. Im Vorfeld der Therapieplanung bei MS feststellen zu können, ob die langjährige Gabe eines Medikamentes auch den gewünschten Effekt bringen wird, wäre natürlich von großem Vorteil. Einen wichtigen Ansatz hierzu zeigen die Untersuchungen von Farina und Kollegen [128,129]: Sie entwickelten einen kombinierten Test aus Proliferationsassay und ELISPOT-Assay bezüglich IFN- γ - und IL-4-sezernierender PBL nach *in vitro* Stimulation verschiedener Konzentrationen von GA und stellten drei Kriterien einer GA-„Response“ auf [128]:

1. Reduzierte PBL-Proliferationsrate nach Stimulation mit GA in GA-behandelten Patienten;

2. *In vitro* Aktivierung von IFN- γ -sezernierenden PBL bei hohen GA-Konzentrationen (100 $\mu\text{g/ml}$);
3. *In vitro* Aktivierung von IL-4-sezernierenden PBL bei mehreren GA-Konzentrationen (12.5 bis 100 $\mu\text{g/ml}$).

In einer prospektiven Studie mit 15 klinischen GA-„Respondern“ und neun GA-„Nonrespondern“ (unveränderte oder erhöhte Schubrate oder Entwicklung einer SPMS unter laufender Therapie mit GA, geplanter Therapieabbruch mit GA) war feststellbar, dass dreizehn der 15 „Responder“ zwei der drei immunologischen „Response“-Kriterien aufwiesen, aber nur zwei der neun „Nonresponder“, ein klar signifikanter Unterschied [129]. Diese interessanten Daten weisen darauf hin, dass die klinische Wirksamkeit von GA mit immunologischen Parametern korrelieren kann. MRT-Parameter wurden bisher noch nicht untersucht. Wertvoll wären weitere Untersuchungen, ob solche immunologischen Parameter auch im Vorfeld einer geplanten Therapie mit GA oder zumindest kurzzeitig nach Therapiebeginn (z.B. nach drei bis sechs Monaten) bezüglich der Aussage einer Wirksamkeit verwendbar sein werden.

Der Mechanismus der nun von mehreren Gruppen gezeigten TH-2-Verschiebung bleibt unbekannt. In Frage kommen Veränderungen auf zellulärer Ebene (Verschiebung des Zytokinprofils einzelner Zellen) oder ganzer Zellpopulationen (z.B. klonale Expansion antiinflammatorischer TH-2 T-Lymphozyten). Prinzipiell sind APC in der Lage, die Entwicklung von T-Helfer-Zellen zu beeinflussen [130]. Da GA subkutan appliziert wird, können die dendritischen Langerhans-Zellen der Haut als lokale APC eine Rolle spielen. In der Tat ist die Fähigkeit der Langerhans-Zellen bekannt, eine TH-2-Antwort zu induzieren [131,132]. Wichtige zusätzliche Hinweise auf die Wirkung von GA auf APC geben Weber und Kollegen [133]. Sie untersuchten die Effekte von GA auf die Aktivierung von Monozyten, professionelle APC, *in vitro* (Expression Aktivierungs-assoziiertes Oberflächenmarker sowie Sekretion von TNF- α) und zeigten, dass die Monozyten-Aktivierung durch GA inhibiert wird. In einer *ex vivo* Untersuchung wurden Monozyten aus GA-behandelten MS-Patienten in Vergleich zu solchen aus unbehandelten MS-Patienten oder gesunden Kontrollpersonen mit

Lipopolisaccharid (LPS) *in vitro* aktiviert. Auch hier zeigte sich eine Inhibierung der Monozyten-Aktivierung durch die GA-Behandlung [133].

Etwa 10 % der GA-reaktiven TZL kreuzreagierten auf MBP durch Zytokinsekretion, jedoch nicht durch Proliferation. Diese Beobachtung stimmt mit ähnlichen Befunden im EAE-Modell überein [84,125]. Aharoni und Kollegen isolierten GA-reaktive TZL aus Mäusen, die mit GA immunisiert worden waren. Diese T-Lymphozyten wiesen ein klares TH-2-Zytokinprofil auf und sezernierten nach Stimulation mit GA die anti-entzündlichen Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, jedoch nicht die pro-entzündlichen Zytokine IL-2 und IFN- γ . Einige der GA-reaktiven TZL der Mäuse wiesen die Kreuzreaktion mit MBP auf, wieder nur mit Zytokinsekretion, jedoch nicht mit Proliferation [84].

Aus den insgesamt gewonnenen Erkenntnissen resultiert ein hypothetisches Szenario, wie GA bei MS und EAE wirken könnte (**Abbildung 19**): Die tägliche subkutane Applikation von GA induziert – wahrscheinlich über den Einfluss von GA auf die APC – GA-reaktive anti-inflammatorische T-Lymphozyten vom TH-2-Typ. Diese werden durch die chronische Stimulation durch GA aktiviert und dadurch in die Lage versetzt, die Bluthirnschranke zu durchqueren [22]. Innerhalb des ZNS werden die GA-reaktiven T-Lymphozyten mit Produkten des physiologischen Myelin-Umsatzes konfrontiert, die auf lokalen APC präsentiert werden. Ein Teil der GA-reaktiven T-Lymphozyten reagiert auf MBP (und möglicherweise andere Myelin-Antigene wie MOG) durch Sekretion von TH-2-Zytokinen, was zu einem lokalen anti-entzündlichen Milieu („Bystander-Suppressionseffekt“) führt [82,84,134].

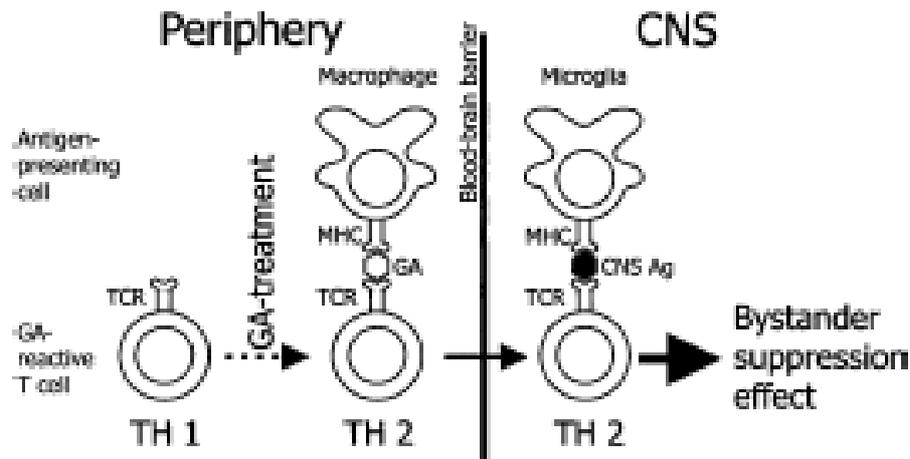


Abbildung 19. Hypothetischer Wirkmechanismus von Glatirameracetat. Siehe Text.

Die Kernergebnisse der Untersuchungen mit Glatirameracetat sind:

- GA induziert eine Zytokinverschiebung von einem pro-entzündlichen Milieu (TH-1) in ein anti-entzündliches Milieu (TH-2).
- Etwa 10 % der GA-reaktiven T-Lymphozyten kreuzreagieren mit Myelin-Antigenen durch Zytokinsekretion, jedoch nicht durch Proliferation.

Mehrere Fragen bleiben bezüglich des Wirkmechanismus von GA offen:

- Sind anti-entzündliche GA-reaktive T-Lymphozyten auch wirklich in GA-behandelten MS-Patienten nachweisbar?
- Korrelieren die immunologischen Befunde mit klinischen und MRT-Befunden? Gibt es Biomarker für eine „Response“ auf GA?
- Weisen GA-reaktive T-Lymphozyten wirklich neuroprotektive Effekte auf?
- Welches sind die molekularen Mechanismen? Wie kann ein heterogenes Peptidgemisch wie GA definierte, Antigen-spezifische Effekte ausüben?

Bezüglich einiger dieser Fragen gibt es bereits erste Antworten, die jedoch zunächst Gegenstand kontroverser Diskussion sind [134]. GA-reaktive T-Lymphozyten sezernieren zwar in der Tat den neurotrophen Faktor BDNF [89-91], doch ist diese BDNF-Sekretion nicht GA-spezifisch. Die Frage der Neuroprotektion durch GA lässt

sich nur durch prospektive Studien mit etablierten Markern für Neurodegeneration (z.B. Hirnatrophie) sicher beantworten.

4.2. Mitoxantron

Mitoxantron inhibierte dosisabhängig sowohl die Antigen-unspezifische Proliferation aktivierter PBL als auch die Antigen-spezifische Proliferation. Die Quelle der PBL spielte keine Rolle, d.h. es bestanden keine Unterschiede zwischen unbehandelten MS-Patienten, IFN- β -behandelten MS-Patienten oder gesunden Kontrollpersonen. Diese Ergebnisse überraschen insofern, als IFN- β antiproliferative Effekte auf mehrere Zelltypen aufweist, weshalb ein additiver Effekt mit der antiproliferativen Wirkung von Mitoxantron zu erwarten wäre. Zwei Überlegungen resultieren aus diesen Befunden:

1. Synergistische Effekte einer möglichen Kombinationstherapie aus Mitoxantron und IFN- β auf das Proliferationsverhalten enzephalitogener T- und B-Lymphozyten werden durch die vorliegenden Daten nicht gestützt.
2. Antiproliferative Effekte von Mitoxantron sind nicht spezifisch für die Krankheit MS. Positive klinische Effekte auch in anderen neoplastischen und entzündlichen Erkrankungen können hierdurch erklärt werden.

Die Signifikanzanalyse zeigte, dass Mitoxantron auf das Proliferationsverhalten verschiedener Leukozytenpopulationen unterschiedliche inhibitorische Effekte aufweist. Der proliferationshemmende Effekt von Mitoxantron auf Mitogen-, also Antigen-unspezifisch aktivierte T- und B-Lymphozyten war gegenüber dem auf Antigen-spezifisch aktivierte T-Lymphozyten signifikant geringer (**Abbildung 13**). Dieser Befund könnte die Tatsache mit erklären, dass Mitoxantron in klinischen Studien zwar einen signifikanten Effekt auf die Schubrate und Krankheitsprogression bei MS aufweist, jedoch keine generelle Immunsuppression mit entsprechenden Nebenwirkungen zeigt [48].

Die Antigen-spezifische TZL-Proliferation wurde bereits bei Mitoxantron-Konzentrationen signifikant inhibiert, die 10-fach niedriger waren als die Konzentrationen mit signifikanter Inhibition Antigen-unspezifischer T- und B-

Lymphozyten-Proliferation (**Abbildung 14A**). Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass dieser Effekt auf der hemmenden Wirkung von Mitoxantron auf die APC beruht (**Abbildung 14B**). Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass die antiproliferative Mitoxantron-Suszeptibilität von zwei Faktoren abhängt, nämlich

1. dem Typ der Zielzelle;
2. der Stärke des Stimulus.

Phänotypische Untersuchungen erbrachten nur marginale Einflüsse von Mitoxantron in Dosen, die bereits sehr effektiv waren, die Proliferation zu inhibieren. In T- und B-Lymphozyten verbleiben sowohl die Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern als auch die intrazelluläre Expression von Zytokinen praktisch unverändert (**Tabelle 6**). Diese Befunde sind zunächst schwierig zu erklären, zumal einer der stärksten Effekte von Mitoxantron bei MS die Unterbrechung neuer MRT-Aktivität darstellt [135,136], welche mit der Verminderung von T-Zell-Migration und -Aktivierung einhergeht [137]. Spekuliert wird, dass andere Aktivierungsmarker als die getesteten mit den MRT-Effekten von Mitoxantron zusammen hängen. Auch spielt der Zeitpunkt der *in vitro* Gabe von Mitoxantron eine Rolle: bei den fünftägigen Kurzulturen wurde Mitoxantron erst an Tag 4 hinzugefügt, da eine längere Inkubationsdauer bereits in niedrigen Dosen zu hohen Zelltodraten führte. Durch diese relativ späte Zugabe von Mitoxantron zu bereits seit vier Tagen PHA-aktivierten PBL können möglicherweise nur noch eingeschränkte phänotypische Effekte erfolgen. Andererseits werden auch in 24-stündigen Kurzulturen mit Präsenz von Mitoxantron für die gesamte Inkubationsdauer keine wesentlichen phänotypischen Effekte erreicht.

In T- und B-Lymphozyten scheinen die Mitoxantron-induzierten Zelltodmechanismen auf Apoptose bei niedrigeren Konzentrationen und auf Nekrose bei höheren Konzentrationen zu beruhen. Chan und Kollegen verglichen in einer *ex vivo* Studie die Mitoxantron-Wirkung auf den Zelltod von Lymphozytensubgruppen und beobachteten eine vorherrschende Suszeptibilität CD19-positiver B-Lymphozyten [102]. In Monozyten fand sich hier nekrotischer Zelltod bereits bei niedrigeren Konzentrationen (**Abbildung 15**). Zusätzlich weist die Anwesenheit apoptotischer Monozyten allein unter Zellkulturbedingungen, d.h. bereits ohne Mitoxantron, auf die besondere Fragilität dieses Zelltyps hin.

Frühere pharmakokinetische Studien in der Onkologie erbrachten maximale Serumkonzentrationen von Mitoxantron zwischen 308 und 839 ng/ml und biologische Halbwertzeiten zwischen 38.4 und 71.5 Stunden bei intravenösen Dosen von 12-15 mg/m² Körperoberfläche [138-140]. Umgerechnet liegen innerhalb der ersten 3.9 bis 5.4 Halbwertzeiten oder 8.6 bis 11.8 Tage nach der Infusion die maximalen Mitoxantron-Serumkonzentrationen höher als 20 ng/ml, während im Anschluss, also ungefähr 80 Tage bei dreimonatiger Applikation, die Serumkonzentrationen unterhalb 20 ng/ml liegen. Es bleibt unklar, ob der hauptsächliche Einfluss von Mitoxantron bei MS auf kurzzeitigen immunsuppressiven Effekten durch Inhibition der Proliferation von Immunzellen beruht [97,98]. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung weisen auf zusätzliche immunologische Effekte bei niedrigeren Mitoxantron-Konzentrationen hin, also auch im späteren Verlauf nach der Applikation. Passend hierzu ist die Beobachtung, dass klinische Effekte noch bis zu einem Jahr nach Beendigung einer Mitoxantron-Therapie festzustellen waren [141].

Als Schlussfolgerung der Untersuchungen mit Mitoxantron kann festgehalten werden, dass Mitoxantron eine zytotoxische Substanz ist, die verschiedene Zelltypen mit verschiedenen Suszeptibilitäten und Fragilitäten trifft. In den Proliferationsassays (**Abbildung 13, 14**) könnte die dosisabhängige Verminderung der Proliferation schlicht darauf beruhen, dass weniger Zellen [Methyl-³H]-Thymidin in ihre DNA einbauen, weil sie dem Zelltod unterliegen. Phänotypische Untersuchungen (**Tabelle 6**) zeigten lediglich marginale Effekte, was neben der kurzen Inkubation mit Mitoxantron auch darauf beruhen könnte, dass in der Durchflusszytometrie tote Zellen nicht analysiert werden. Zusammengefasst können die vorliegenden Befunde davon abhängen, ob die Zielzellen von Mitoxantron sterben oder nicht, was auf einen Wirkmechanismus von Mitoxantron hinweist, der auf Zytotoxizität mit selektiven Zielzell-Suszeptibilitäten beruht und nicht auf spezifisch immunmodulatorischen Eigenschaften. **Abbildung 20** zeigt die hypothetischen Wirkorte von Mitoxantron.

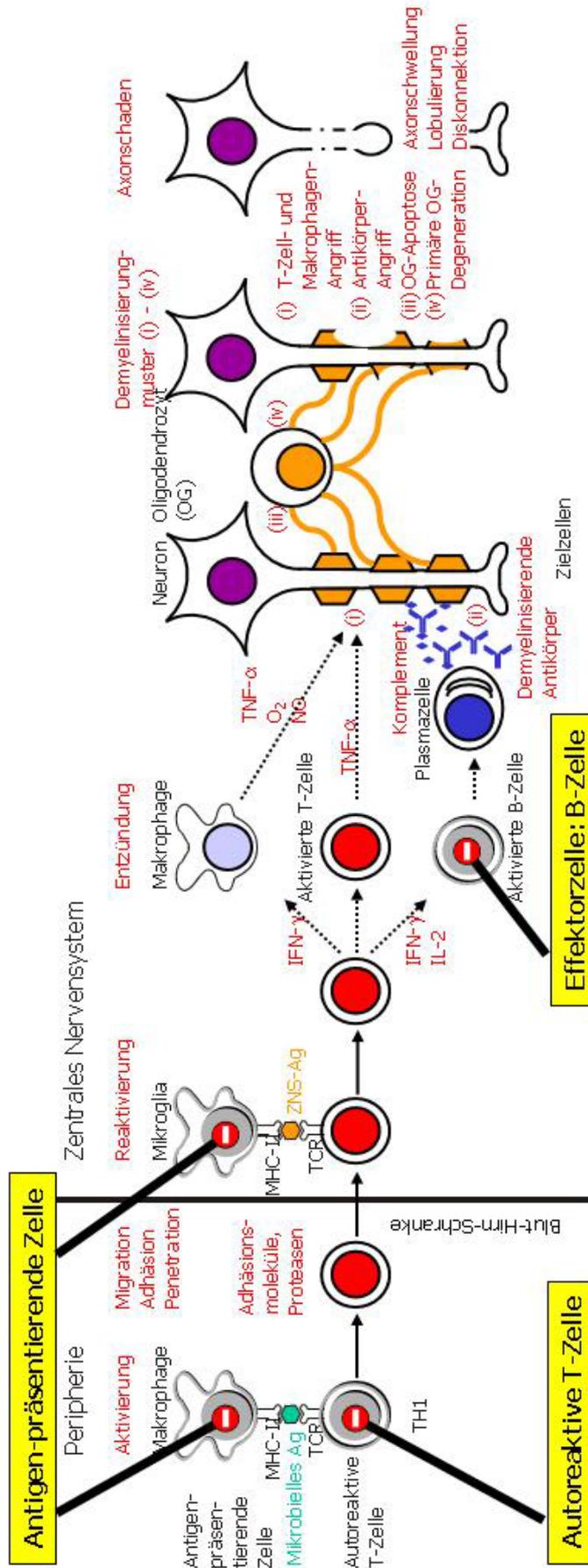


Abbildung 20. Hypothetische Wirkorte von Mitoxantron. Siehe Text.

Die Kernergebnisse der Untersuchungen mit Mitoxantron sind:

- Mitoxantron inhibiert die Proliferation von Immunzellen abhängig von der Mitoxantron-Dosis.
- Mitoxantron inhibiert die Proliferation von Immunzellen abhängig von der Art der Zielzelle. Die Suszeptibilität von Antigen präsentierenden Zellen gegenüber der Wirkung von Mitoxantron ist am größten.
- Mitoxantron weist *in vitro* nur marginale phänotypische Effekte in Immunzellen auf.
- Mitoxantron induziert Apoptose in niedrigeren und Nekrose in höheren Konzentrationen.

Folgende Fragen bleiben bezüglich des Wirkmechanismus von Mitoxantron offen:

- Wie erklärt sich die erhöhte Suszeptibilität bestimmter Zellpopulationen gegenüber Mitoxantron?
- Wie induziert Mitoxantron Apoptose? Welches sind die molekularen Mechanismen?
- Welcher Zelltodmechanismus ist vorherrschend – Apoptose oder Nekrose?
- Besitzt Mitoxantron doch auch immunmodulatorische Eigenschaften?

4.3. Statine

Vergleichbar mit Mitoxantron inhibierten die Statine die Proliferation von PHA-aktivierten PBL dosisabhängig (vgl. **Abbildung 13** und **Abbildung 16**). Erneut spielte die Herkunft der PBL keine Rolle (MS-Patienten mit oder ohne immunmodulatorische Behandlung oder gesunde Kontrollpersonen). Einen Einfluss auf den Grad der Proliferationshemmung hatte die Lipo- bzw. Hydrophilität des Statins: das lipophile Simvastatin war am potentesten, gefolgt von Lovastatin und dem hydrophilen Mevastatin, vergleichbar zu früheren *in vitro* Untersuchungen [62]. Hieraus resultiert die wichtige Frage, welches Statin für einen eventuellen Einsatz bei MS optimal erscheint und welche Dosis erforderlich ist [62,119]. Der für die MS optimale Statin-Kandidat bleibt zunächst anhand des EAE-Modells zu definieren und anschließend in kontrollierten Studien bei MS zu überprüfen.

Viele *in vitro* Studien weisen den systematischen Fehler auf, dass Effekte bei hohen Wirkstoffkonzentrationen beobachtet werden, die für einen Einsatz am Menschen *in vivo* nicht erreicht werden können oder jenseits der Toxizitätsgrenze liegen. Für die zur Behandlung der Hypercholesterinämie zugelassenen Statine ist eine maximale Tagesdosis von 40-80 mg erlaubt, in der Regel werden 10-20 mg täglich verabreicht. In einer Plazebo-kontrollierten Studie bei 67 Patienten mit Hypercholesterinämie ohne entzündliche Zusatzerkrankung, die für sechs Monate entweder 20 mg Lovastatin oder Plazebo erhielten, wurden eine Reihe immunologischer Marker untersucht (Absolutzahlen von Lymphozytensubgruppen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), T-Zell-Proliferation, zytotoxische NK-Zell-Aktivität, IL-2-Produktion): keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren festzustellen [142]. Auf der anderen Seite wurden in EAE-Modellen klare klinische und pathologische Effekte in Dosen von 1 mg/kg Körpergewicht gesehen, was beim Menschen einer Tagesdosis von 80 mg entspricht [58].

Interessanterweise wurden B-Lymphozyten (im Gegensatz zu Mitoxantron, vgl. **Abbildung 13** und **Abbildung 16**) durch Statindosen, die einen klaren anti-proliferativen Effekt auf T-Lymphozyten zeigten, nicht in ihrer proliferativen Aktivität beeinflusst. Die Ursachen einer erhöhten Suszeptibilität von T-Lymphozyten gegenüber Statinen als B-Lymphozyten bleiben zu klären. Bei Mitoxantron können die anti-proliferativen Eigenschaften auf dessen zytotoxische Effekte zurückzuführen sein (vgl. 4.2.). Statine führten dagegen bei Konzentrationen bis 10 μM (also mit maximaler Hemmung der T-Lymphozyten-Proliferation) nicht zu apoptotischem oder nekrotischem Zelltod (**Tabelle 7**, nicht gezeigte Daten). Auch weist das Nebenwirkungsprofil aller zugelassenen Statine auch in Höchstdosen (bis 80 mg pro Tag) keine immunologischen Veränderungen mit Krankheitswert auf, wie z.B. eine erhöhte Infektionsrate [143].

Die Proliferationsuntersuchungen und phänotypischen Befunde weisen auf eine Verhinderung der T-Lymphozyten-Aktivierung hin (**Abbildung 18**). Wie erwähnt, bleiben B-Lymphozyten unbeeinflusst, auch werden die phänotypischen Charakteristika nicht aktivierter T-Lymphozyten nicht verändert. Noch zu klären

bleibt, ob es sich um eine (wahrscheinlichere) Verhinderung der Aktivierung oder alternativ um eine "Deaktivierung" handelt, also um eine Rückbildung bereits eingeleiteter molekularer Prozesse.

Das gegenwärtige Konzept der molekularen Wirkung der Statine beruht auf drei Standbeinen, davon sind die ersten beiden Mevalonat-abhängig und das dritte Mevalonat-unabhängig [106-108,144].

1. Inhibierung der Isoprenylierung;
2. Desintegrierung von cholesterinhaltigen Lipid-Mikrodomänen;
3. Direkte Blockade von Leukozyten-Funktionsantigen (LFA)-1.

Die Mevalonat-Abhängigkeit bezieht sich auf die eigentliche Wirkung der Statine, die Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase, des Schlüsselenzyms des Cholesterinbiosyntheseweges (**Abbildung 21**). Da Mevalonat das Produkt der HMG-CoA-Reduktase ist, können die meisten Effekte der Statine durch Mevalonat aufgehoben werden, d.h. diese Effekte sind Mevalonat-abhängig.

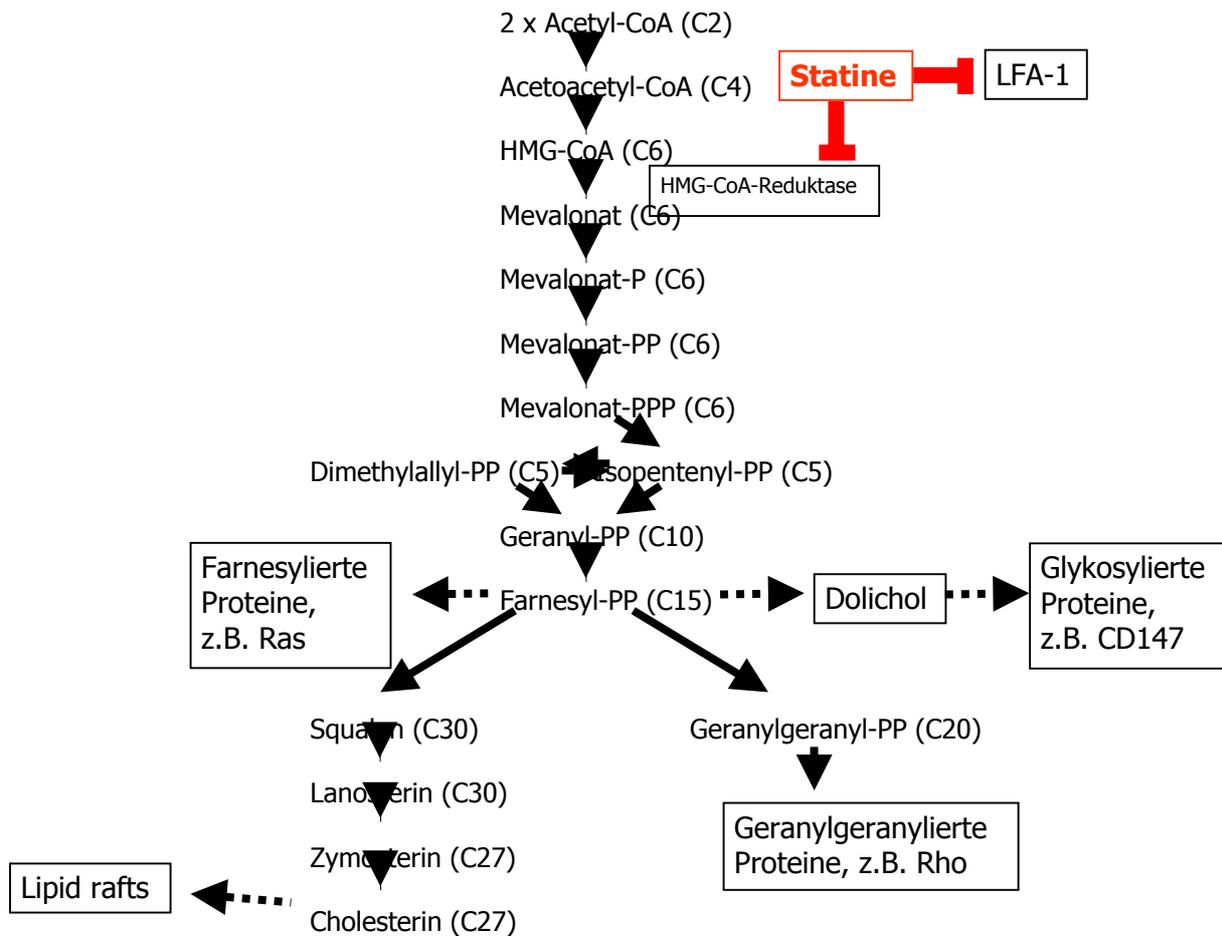


Abbildung 21. Hypothetischer Wirkmechanismus der Statine. Siehe Text. P = Phosphatrest; C = Zahl der Kohlenstoffatome.

Durch die Inhibierung von Mevalonat hemmen Statine auch weitere Zwischenprodukte des Cholesterinbiosyntheseweges, die bei der posttranslationalen Modifizierung („Isoprenylierung“) einer Vielzahl von Proteinen eine wichtige Rolle spielen [106]. Farnesylpyrophosphat und sein Derivat Geranylgeranylpyrophosphat bilden Lipidanlagerungen für so genannte kleine Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine wie Ras, Rac und Rho. Erst durch die Lipidanlagerung können diese Moleküle vom Zytoplasma aus in die Plasma- und Zellmembranen eingebaut werden und spezifische Aufgaben in den zellulären Bereichen Struktur, Motilität, Sekretion, Differenzierung und Proliferation ausüben. Diese Vorgänge können durch Statine inhibiert werden (**Abbildung 21**). Hierdurch lässt sich die beobachtete Inhibition der T-Lymphozyten-Aktivierung gut erklären. Auch passt zu diesem Konzept die Beobachtung, dass der Isoprenylierungs-Inhibitor FTI-277 einen partiell inhibierenden Effekt auf die T-Lymphozyten Proliferation zeigte (**Abbildung 17**), ein

Hinweis, dass die Farnesylierung von Proteinen (z.B. Ras) zur T-Lymphozyten-Proliferation beiträgt. Der Isoprenylierungs-Inhibitor GGTI-298, der auf die Geranylgeranylierung von z.B. Rho einwirkt, war im vorliegenden humanen T-Lymphozyten-Aktivierungs-Modell nicht effektiv. In der EAE haben Greenwood und Kollegen dagegen einen inhibierenden Effekt von Lovastatin auf die Lymphozyten-Migration über die Hemmung der Rho-Isoprenylierung gezeigt [60].

Der zweite, allerdings kontrovers diskutierte, Mevalonat-abhängige Effekt von Statinen ist die Desintegration von cholesterinhaltigen Lipid-Mikrodomänen, den so genannten „lipid rafts“ [144,145] (**Abbildung 21**). Diese Mikrodomänen sind Areale der zellulären Plasmamembran mit einer lokalen Anreicherung von Cholesterin und Glycosphingolipiden [146,147]. Die immunologische Besonderheit der „lipid rafts“ liegt in der hohen lokalen Konzentration zellulärer Signalmoleküle und immunologisch wichtiger Moleküle wie MHC Klasse II, die praktisch durch deren gegenseitige Nähe interagieren können [148,149]. Statine sind in der Lage, die Lipid-Mikrodomänen zu desintegrieren und somit die nahe beieinander liegenden Signal- und Immunmoleküle „auseinanderzusprengen“, was einen inhibierenden Effekt auf zelluläre Funktionen hat [144,145]. Der Nachweis von Statin-Effekten auf die „lipid rafts“ in der EAE steht allerdings noch aus.

Weitz-Schmidt und Kollegen haben einen dritten, Mevalonat-unabhängigen Effekt von Statinen beschrieben, nämlich die direkte Blockade des Adhäsionsmoleküls LFA-1 (**Abbildung 21**) [108,114]. Auch dieser Effekt muss in der EAE noch überprüft werden.

Eigene Untersuchungen geben erste Hinweise auf einen möglichen vierten, erneut Mevalonat-abhängigen Wirkmechanismus der Statine. Dolichol ist ein weiteres Nebenprodukt des Cholesterinbiosyntheseweges und ist als Kohlenhydratquelle essentiell bei der so genannten N-Glykosylierung intrazellulärer Proteine [150]. Durch die Inhibierung von Dolichol akkumulieren Vorformen der Proteine im endoplasmatischen Retikulum und können ihre Wirkung nicht entfalten [150,151]. Erste Ergebnisse zeigten, dass Statine die N-Glykosylierung des Moleküls CD147 inhibieren und zu der Expression niedrig glykosylierter Formen führen (nicht

publizierte Daten). CD147 hat die Eigenschaft, die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 abhängig von seinem Glykosylierungsstatus zu beeinflussen: in niedrig glykosylierter Form wird die Aktivität von MMP-2 und -9 gehemmt, während sie in hoch glykosylierter Form gefördert wird [152]. Statine hemmen die Aktivität von MMP-2 und -9 und damit auch die T-Lymphozyten-Aktivierung (nicht publizierte Daten).

Insgesamt liegen Daten über mehrere („pleiotrope“) Wirkmechanismen der Statine vor, die die Aktivierung von bei EAE und MS enzephalitogenen T-Lymphozyten hemmen. Hieraus resultieren gute Gründe für die Notwendigkeit kontrollierter klinischer Studien mit Statinen bei MS.

Die Kernergebnisse der Untersuchungen mit den Statinen sind:

- Statine inhibieren die Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Dosis und der Art des Statins.
- Statine halten T-Lymphozyten in einem nicht aktivierten Zustand.
- Die Proliferation von B-Lymphozyten wird durch Statine nicht beeinflusst.
- Statine wirken auf mehrere Arten, vornehmlich über Intermediate des Cholesterinbiosynthesestoffwechsels.

Folgende Fragen bleiben bezüglich des Wirkmechanismus der Statine offen:

- Welches Statin ist das „optimale“ zur möglichen Behandlung der MS?
- Welche Dosis ist erforderlich?
- Haben Statine aufgrund ihrer pleiotropen Effekte auch unerwünschte Wirkungen in der Pathogenese der MS?

4.4. Schlussfolgerungen und Aussichten

Im Bereich der Immuntherapien der MS hat es in den letzten Monaten und Jahren vor allem zwei Entwicklungen gegeben. Zum einen liegen bei den seitens der MSTKG empfohlenen und gegenwärtig eingesetzten immunmodulierenden und immunsuppressiven Therapien zunehmend Erkenntnisse über Langzeitwirkungen und

-nebenwirkungen vor. Zum anderen stehen möglicherweise (abhängig von den Ergebnissen kontrollierter Studien) weitere Alternativen zur Verfügung. Insgesamt sind die Aussichten auf eine deutliche Erweiterung des therapeutischen Spektrums bei MS sehr günstig.

Der Kenntnisstand über die Wirkmechanismen der aktuell zugelassenen, aber auch der künftigen Kandidaten, steigt ebenfalls schnell. In naher Zukunft wird das Thema „Differenzialtherapie“ auch bei der MS zunehmende Bedeutung haben. Da die MS in klinischer und pathologischer Hinsicht mehrere voneinander unterschiedliche Subentitäten umfasst [17], wird die Auswahl der Behandlungsstrategie für jeden einzelnen MS-Patienten durch das Wissen über den jeweiligen Pathomechanismus sowie die Kenntnisse über die entsprechend optimale Therapie oder Therapiekombination beeinflusst werden. Das klare Ziel ist eine „maßgeschneiderte“ Immuntherapie jedes individuellen Patienten mit MS.

Immuntherapie alleine wird mittelfristig nicht ausreichen. Mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden drei pharmakologischen Standbeinen der MS-Behandlung (Schubbehandlung durch Glukokortikosteroide, symptomatische Therapie und immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Langzeittherapie) ist zwar in den letzten Jahren eine deutliche Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten gegen die MS erreicht worden; eine alle MS-Patienten zufrieden stellende Therapieauswahl liegt jedoch weiterhin nicht vor. Prinzipiell ist das therapeutische Konzept gegen MS künftig über immunologisch wirksame Medikamente hinaus deutlich zu erweitern. Ziel ist eine Beeinflussung auch der Demyelinisierung und des axonalen Schadens [12,153].

Da nicht nur die MS in ihrer Pathogenese zum Teil eine neurodegenerative Erkrankung darstellt [8], sondern auch viele andere wichtige Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, ist die Suche nach neuroprotektiven oder gar neuroregenerativen Therapieansätzen eine sehr große Herausforderung für viele Forschungsdisziplinen [154,155]. Leider sind viel versprechende Ansätze in naher Zukunft nicht zu erwarten.

Gegenwärtig kann aus den Kenntnissen der Wirkmechanismen der zur Verfügung stehenden Therapeutika gegen MS eine Strategie gewonnen werden, geeignete Kombinationen einzusetzen. Beispielsweise weisen die vorliegenden Befunde auf synergistische Effekte von IFN- β und Statinen hin [62]. Im EAE-Modell wurden auch hohe synergistische Effekte zwischen GA und Statinen beobachtet [156], weshalb kontrollierte Studien in diesen Bereichen sicher sinnvoll sind.

Wie oben genannt, wird durch die vorliegenden Daten eine mögliche Kombination aus IFN- β und Mitoxantron nicht gestützt (siehe 4.2.). Auch wird anhand der vorliegenden Wirkmechanismus-Daten eine Kombination aus GA und Mitoxantron eher zurückhaltend beurteilt, da die im Mittelpunkt der Wirkung von GA stehenden GA-reaktiven T-Lymphozyten wahrscheinlich durch Mitoxantron in ihrer Aktivierung gehemmt werden. Auf der anderen Seite könnten sequenzielle Therapieansätze mit zunächst Mitoxantron und im Anschluss IFN- β oder GA eine vernünftige Option für diejenigen Patienten darstellen, die aufgrund der kumulativen Gesamtdosis nicht mehr mit Mitoxantron behandelt werden dürfen [49].

Die Kenntnis der Wirkmechanismen aktueller und möglicher künftiger Therapieansätze gegen MS soll schließlich erlauben, die nächste Generation von Therapeutika zu entwickeln, die bei höherer Wirksamkeit ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen sollen.

5. Zusammenfassung

Die Therapie der Multiplen Sklerose (MS) beruht auf drei Standbeinen: der Behandlung des akuten Schubes mit Glukokortikosteroiden, der symptomatischen Therapie sowie der immunmodulatorischen oder immunsuppressiven Langzeittherapie. In der letztgenannten Gruppe stehen in Deutschland gegenwärtig drei Substanzklassen zur Verfügung, Interferon- β (drei Präparate), Glatiramerazetat und Mitoxantron. Eine weitere potenzielle Kandidatengruppe zur Immuntherapie der MS – von denen der Nachweis klinischer Wirksamkeit in kontrollierten Studien noch aussteht – bilden die Statine, die so genannten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die immunmodulatorische Wirkungen besitzen. Die Wirkmechanismen dreier Substanzen gegen MS wurden an menschlichen Immunzellen *in vitro* untersucht, nämlich Glatiramerazetat, Mitoxantron und der Statine.

Glatiramerazetat (GA) induziert GA-reaktive T-Lymphozyten, die in der Lage sind, im Zentralen Nervensystem durch lokale Zytokinsekretion ein anti-entzündliches Milieu zu bilden.

Mitoxantron wirkt auf verschiedene Immunzellen suppressiv, indem es dosisabhängig zwei Arten des Zelltodes verursacht, nämlich Apoptose bei niedrigeren und Nekrose bei höheren Konzentrationen. Die Empfindlichkeit gegenüber den Mitoxantron-Wirkungen ist bei Antigen präsentierenden Zellen höher als bei T- oder B-Lymphozyten.

Statine verhindern die Aktivierung von T-Lymphozyten – ohne ihren Zelltod auszulösen – auf mehrere molekulare Arten, in erster Linie über Zwischenstufen des Cholesterinbiosyntheseweges.

Ziel ist, durch die Kenntnis der Wirkmechanismen der einzelnen Therapeutika bei paralleler Kenntnis der Pathogenese der MS das Therapiekonzept für den einzelnen Patienten individuell anzupassen und neue Generationen von Substanzen mit besserer Wirksamkeit zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, et al. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1 reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 7452-7457.
2. Neuhaus O, Wiendl H, Kieseier BC, et al. Multiple sclerosis: mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. *J. Neuroimmunol.* 2005; 168: 128-137.
3. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Medical progress: multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 938-952.
4. Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographiées et coloriées; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible: J. B. Bailliere; 1835.
5. Kieseier BC, Hemmer B, Hartung HP. Multiple sclerosis - novel insights and new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Neurol.* 2005; 18: 273-278.
6. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, et al. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune system: implications for neurological diseases. *Ann. Neurol.* 2003; 53: 292-304.
7. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 393-404.
8. Trapp BD, Ransohoff RM, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr. Opin. Neurol.* 1999; 12: 295-302.
9. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Insights into the molecular pathogenesis of progression in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 2006; 63: 25-33.
10. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis. New aspects and practical application. *J. Neurol.* 2004; 251: 1329-1339.
11. Wiendl H, Kieseier BC. Disease-modifying therapies in multiple sclerosis: an update on recent and ongoing trials and future strategies. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 2003; 12: 689-712.
12. Fox RJ, Ransohoff RM. New directions in MS therapeutics: vehicles of hope. *Trends Immunol.* 2004; 25: 632-636.

13. Flachendecker P, Rieckmann P. Health outcomes in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 2004; 17: 257-261.
14. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis: principles, problems and perspectives. *Brain* 1997; 120: 865-916.
15. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 291-301.
16. Lim ET, Giovannoni G. Immunopathogenesis and immunotherapeutic approaches in multiple sclerosis. *Exp. Rev. Neurotherapeutics* 2005; 5: 379-390.
17. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 115-121.
18. Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24: 131-138.
19. Ebers GC, Dyment DA. Genetics of multiple sclerosis. *Semin. Neurol.* 1998; 18: 295-299.
20. Sawcer S, Maranian M, Setakis E, et al. A whole genome screen for linkage disequilibrium in multiple sclerosis confirms disease associations with regions previously linked to susceptibility. *Brain* 2002; 125: 1337-1347.
21. Wekerle H, Hohlfeld R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 185-186.
22. Wekerle H, Linington C, Lassmann H, et al. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* 1986; 9: 271-277.
23. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002; 125: 538-550.
24. Coleman MP, Perry VH. Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 532-537.
25. Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 433-437.
26. Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr. Opin. Neurol.* 2001; 14: 271-278.
27. Lublin FD, Reingold SC, National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Defining the

- clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46: 907-911.
28. Matthews PM. An update on neuroimaging of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 2004; 17: 453-458.
 29. Fuhr P, Kappos L. Evoked potentials for evaluation of multiple sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 2001; 112: 2185-2189.
 30. Reiber H. Cerebrospinal fluid - physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult. Scler.* 1998; 4: 99-107.
 31. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* 2001; 50: 121-127.
 32. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann. Neurol.* 2005; 58: 840-846.
 33. Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 1999; 70: 371-386.
 34. Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose - 1. Ergänzung. *Nervenarzt* 2000; 72: 150-157.
 35. Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose - Neue Aspekte und praktische Umsetzung, März 2002. *Nervenarzt* 2002; 73: 556-563.
 36. Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 2004; 75 (Supplement 1): S2-S39.
 37. MacLean R. The challenge of managing patients with multiple sclerosis. *Nurs. Times* 2004; 100: 42-44.
 38. Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J. Neurol.* 2004; 251 (Supplement 5): V/12-V/29.
 39. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43: 655-661.
 40. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in exacerbating-remitting multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann. Neurol.* 1996; 39: 285-294.

41. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352: 1498-1504.
42. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995; 45: 1268-1276.
43. Comi G, Filippi M, Wolinsky JSatECGASG. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of Glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2001; 149: 290-297.
44. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, et al. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1430-1438.
45. Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-1452.
46. Rudick RA, Cutter G, Reingold S. The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2002; 8: 359-365.
47. Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, et al. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 158-164.
48. Hartung HP, Gonsette R, König N, et al. A placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial of mitoxantrone in progressive multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 360: 2018-2025.
49. Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther.* 2006; 109: 198-209.
50. Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 30-38.
51. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: M33-M37.
52. Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, et al. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology* 1999; 53: 466-472.
53. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 15-23.

54. Von Adrian UH, Engelhardt B. Alpha-4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 68-72.
55. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis. Mechanisms and rationale. *Neurology* 2005; Apr 7 (Epub ahead of print).
56. Tyler KL, Khalili K. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy: highlights of the International Workshop on JC Virus/PML and Multiple Sclerosis, June 3-4, 2005, Philadelphia, PA. *Rev. Neurol. Dis.* 2005; 2: 144-149.
57. Stanislaus R, Pahan K, Singh AK, et al. Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci. Lett.* 1999; 269: 71-74.
58. Youssef S, Stüve O, Patarroyo JC, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002; 420: 78-84.
59. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, et al. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 725-733.
60. Greenwood J, Walters CE, Pryce G, et al. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 2003; 17: 905-907.
61. Nath N, Giri S, Prasad R, et al. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J. Immunol.* 2004; 172: 1273-1286.
62. Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, et al. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta1b in MS. *Neurology* 2002; 59: 990-997.
63. Sena A, Pedrosa R, Morais MG. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2003; 250: 754-755.
64. Vollmer T, Key L, Durkalski V, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 363: 1607-1608.
65. Neuhaus O, Stüve O, Zamvil SS, et al. Are statins a treatment option for multiple sclerosis? *Lancet Neurol.* 2004; 3: 369-371.
66. Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. Mechanisms of action of current therapeutics and promising future candidates in multiple sclerosis. In: Columbus F, editor. Treatment and management of multiple sclerosis. New York: Nova Publishers; 2005. p. 1-32.

67. Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 2002; 59: 802-808.
68. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, et al. The structure of human interferon-beta: implications for activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 1998; 54: 1203-1216.
69. Hohlfeld R. Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1999; 354: 1697-1710.
70. Liu Z, Pelfrey CM, Coteleur A, et al. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2001; 112: 153-162.
71. Rep MHG, Hintzen RQ, Polman CH, et al. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T cells. *J. Neuroimmunol.* 1996; 67: 111-118.
72. Pette M, Pette DF, Muraro PA, et al. Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific T-helper type 1 lymphocytes. *Neurology* 1997; 49: 385-392.
73. Joseph J, Knobler RL, D'Imperio C, et al. Downregulation of interferon-gamma-induced class II expression on human glioma cells by recombinant interferon-beta: effects of dosage treatment schedule. *J. Neuroimmunol.* 1988; 20: 39-44.
74. Lu HT, Riley JL, Babcock GT, et al. Interferon (IFN) beta acts downstream of IFN-gamma-induced class II transactivator messenger RNA accumulation to block major histocompatibility complex class II gene expression and requires the 48-kD DNA-binding protein, ISGF3-gamma. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1517-1525.
75. Leppert D, Waubant E, Bürk MR, et al. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996; 40: 846-852.
76. Stüve O, Dooley NP, Uhm JH, et al. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann. Neurol.* 1996; 40: 853-863.
77. Trojano M, Avolio C, Liuzzi GM, et al. Changes of serum sICAM-1 and MMP-9 induced by rINFbeta-1b treatment in relapsing-remitting MS. *Neurology* 1999; 53: 1402-1408.
78. Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR, et al. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon-beta. *Neurology* 1997; 49: 1111-1116.
79. Rudick RA, Ransohoff RM, Peppler R, et al. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996; 40: 618-627.

80. Rep MHG, Schrijver HM, Van Lopik T, et al. Interferon (IFN)-beta treatment enhances CD95 and interleukin 10 expression but reduces interferon-gamma producing T cells in MS patients. *J. Neuroimmunol.* 1999; 96: 92-100.
81. Van Weyenbergh J, Lipinski P, Abadie A, et al. Antagonistic action of IFN-beta and IFN-gamma on high affinity Fcgamma receptor expression in healthy controls and multiple sclerosis patients. *J. Immunol.* 1998; 61: 1568-1574.
82. Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, et al. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 56: 702-708.
83. Gran B, Tranquill LR, Chen M, et al. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 2000; 55: 1704-1714.
84. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, et al. Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. *J. Neuroimmunol.* 1998; 91: 135-146.
85. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, et al. Glatiramer acetate (Copaxone®) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 967-976.
86. Filippi M, Rovaris M, Rocca MA, et al. Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into "black holes". *Neurology* 2001; 57: 731-733.
87. Khan O, Shen Y, Caon C, et al. Axonal metabolic recovery and potential neuroprotective effect of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2005; 11: 646-651.
88. Rovaris M, Comi G, Filippi M. Can glatiramer acetate reduce brain atrophy development in multiple sclerosis? *J. Neurol. Sci.* 2005; 233: 139-143.
89. Ziemssen T, Kümpfel T, Klinkert WE, et al. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain* 2002; 125: 2381-2391.
90. Chen M, Valenzuela RM, Dhib-Jalbut S. Glatiramer acetate-reactive T cells produce brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurol. Sci.* 2003; 215: 37-44.
91. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, et al. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol.* 2005; 167: 215-218.
92. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, et al. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100: 14157-14162.

93. Aharoni R, Eilam R, Domev H, et al. The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102: 19045-19050.
94. Gilgun-Sherki Y, Panet H, Holdengreber V, et al. Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C75/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci. Res.* 2003; 47: 201-207.
95. Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. Mechanisms of mitoxantrone in multiple sclerosis - what is known? *J. Neurol. Sci.* 2004; 223: 25-27.
96. Jain KK. Evaluation of mitoxantrone for the treatment of multiple sclerosis. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 2000; 9: 1139-1149.
97. Fidler JM, de Joy SQ, Gibbons JJ. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J. Immunol.* 1986; 137: 727-732.
98. Fidler JM, de Joy SQ, Smith FR, et al. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone treated mice. *J. Immunol.* 1986; 136: 2747-2754.
99. Mauch E, Kornhuber HH, Krapf H, et al. Treatment of multiple sclerosis with mitoxantrone. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1992; 242: 96-102.
100. Gbadamosi J, Buhmann C, Tessmer W, et al. Effects of mitoxantrone on multiple sclerosis patients' lymphocyte subpopulations and production of immunoglobulin, TNF-alpha and IL-10. *Eur. Neurol.* 2003; 49: 137-141.
101. Bellosillo B, Colomer D, Pons G, et al. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 1998; 100: 142-146.
102. Chan A, Weilbach FX, Toyka KV, et al. Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 139: 152-158.
103. Khoury SJ, Bharanidharan P, Bourcier K, et al. Immunologic effects of mitoxantrone therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2002; 58 (Supplement 3): A245-A246 (Abstract).
104. Archelos JJ, Hartung HP. The role of adhesion molecules in multiple sclerosis: biology, pathogenesis and therapeutic implications. *Mol. Med. Today* 1997; 3: 310-321.

105. Ursell MR, O'Connor PW. Natalizumab and other monoclonal antibodies. *Neurol. Clin.* 2005; 23: 233-246.
106. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1712-1719.
107. Neuhaus O, Stüve O, Archelos JJ, et al. Putative mechanisms of action of statins in multiple sclerosis - comparison to interferon-beta and glatiramer acetate. *J. Neurol. Sci.* 2005; 233: 173-177.
108. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23: 482-486.
109. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat. Med.* 2000; 6: 1399-1402.
110. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, et al. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2671-2679.
111. Sakai M, Kobori S, Matsumura T, et al. HMG-CoA reductase inhibitors suppress macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1997; 133: 51-59.
112. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases, and tissue factor in vivo, and in vitro. *Circulation* 2001; 103: 276-283.
113. Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int. J. Immunopharmacol.* 1996; 18: 669-675.
114. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med.* 2001; 7: 687-692.
115. Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, et al. Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch. Ophthalmol.* 2002; 120: 1707-1713.
116. Diomedea L, Albani D, Sottocorno M, et al. In vivo anti-inflammatory effects of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1327-1332.

117. Rudich SM, Mongini PKA, Perez RV, et al. HMG-CoA reductase inhibitors pravastatin and simvastatin inhibit human B-lymphocyte activation. *Transplant. Proc.* 1998; 30: 992-995.
118. Lawman S, Mauri C, Jury EC, et al. Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand Black/White F1 mice. *J. Immunol.* 2004; 173: 7641-7646.
119. Kurakata S, Kada M, Shimada Y, et al. Effects of different inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, pravastatin sodium and simvastatin, on sterol synthesis and immunological functions in human lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology* 1996; 34: 51-61.
120. Pette M, Fujita K, Kitze B, et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990; 40: 1770-1776.
121. Eylar EH, Kniskern PJ, Jackson JJ. Myelin basic proteins. *Methods Enzymol.* 1974; 32B: 323-341.
122. Brehm U, Piddlesden SJ, Gardinier MV, et al. Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J. Neuroimmunol.* 1999; 97: 9-15.
123. Hanshaw RG, Smith BD. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13: 5035-5042.
124. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods - from morphology to gene. *Prog. Histochem. Cytochem.* 2003; 38: 275-339.
125. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, et al. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 10821-10826.
126. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J. Neuroimmunol.* 1998; 92: 113-121.
127. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, et al. Extended use of glatiramer acetate (copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1998; 50: 701-708.
128. Farina C, Then Bergh F, Albrecht H, et al. Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells. *Brain* 2001; 124: 705-719.

129. Farina C, Wagenpfeil S, Hohlfeld R. Immunological assay for assessing the efficacy of glatiramer acetate (Copaxone) in multiple sclerosis A pilot study. *J. Neurol.* 2002; 249: 1587-1592.
130. Chuang YH, Chiang BL, Chou CC, et al. Different kinds of antigen-presenting cells exert different effects on T-helper cell development. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1996; 111: 366-371.
131. Hauser C, Snapper CM, Ohara J, et al. T helper cells grown by hapten-modified cultured Langerhans' cells produce interleukin 4 and stimulate IgE production by B cells. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19: 245-251.
132. Simon JC, Cruz PDJ, Bergstresser PR, et al. Low dose ultraviolet B-irradiated Langerhans cells preferentially activate CD4+ cells of the T helper 2 subset. *J. Immunol.* 1990; 145: 2087-2091.
133. Weber MS, Starck M, Wagenpfeil S, et al. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain* 2004; 127: 1370-1378.
134. Farina C, Weber MS, Meinel E, et al. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol.* 2005; 4: 567-575.
135. Edan G, Miller D, Clanet M, et al. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1997; 62: 112-118.
136. Van de Wyngaert FA, Beguin C, D'Hooge MB, et al. A double-blind clinical trial of mitoxantrone versus methylprednisolone in relapsing, secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol. Belg.* 2001; 101: 210-216.
137. Killestein J, Rep MH, Barkhof F, et al. Active MRI lesion appearance in MS patients is preceded by fluctuations in circulating T-helper 1 and 2 cells. *J. Neuroimmunol.* 2001; 118: 286-294.
138. Hu OY, Chang S, Law C, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies with mitoxantrone in the treatment of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 847-853.
139. Repetto L, Vannozzi MO, Balleari E, et al. Mitoxantrone in elderly patients with advanced breast cancer: pharmacokinetics, marrow and peripheral hematopoietic progenitor cells. *Anticancer Res.* 1999; 19: 879-884.
140. Canal P, Attal M, Chatelut E, et al. Plasma and cellular pharmacokinetics of mitoxantrone in high-dose chemotherapeutic regimen for refractory lymphomas. *Cancer Res.* 1993; 53: 4850-4854.

141. Gonsette RE. Mitoxantrone immunotherapy in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 1996; 1: 329-332.
142. Muldoon MF, Flory JD, Marsland A, et al. Effects of lovastatin on the immune system. *Am. J. Cardiol.* 1997; 80: 1391-1394.
143. Newman C, Tsai J, Szarek M, et al. Comparative safety of atorvastatin 80 mg versus 10 mg derived from analysis of 49 completed trials in 14,236 patients. *Am. J. Cardiol.* 2006; 97: 61-67.
144. Kuipers HF, Biesta PJ, Groothuis TA, et al. Statins affect cell-surface expression of major histocompatibility complex class II molecules by disrupting cholesterol-containing microdomains. *Hum. Immunol.* 2005; 66: 653-665.
145. Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE. Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 843-856.
146. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-572.
147. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998; 14: 111-136.
148. Anderson HA, Hiltbold EM, Roche PA. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunol.* 2000; 1: 156-162.
149. Goebel J, Forrest K, Flynn D, et al. Lipid rafts, major histocompatibility complex molecules, and immune regulation. *Hum. Immunol.* 2002; 63: 813-820.
150. Schenk B, Fernandez F, Waechter CJ. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. *Glycobiology* 2001; 11: 61R-70R.
151. Collier E, Carpentier JL, Beitz L, et al. Specific glycosylation site mutations of the insulin receptor alpha subunit impair intracellular transport. *Biochemistry* 1993; 32: 7818-7823.
152. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol. Biol. Cell* 2004; 15: 4043-4050.
153. Zamvil SS, Steinman L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 2003; 38: 685-688.
154. Scolding N. Regenerating myelin. *Brain* 2001; 124: 2129-2130.
155. Mitome M, Low HP, Van den Pol A, et al. Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells. *Brain* 2001; 124: 2147-2161.

156. Stüve O, Youssef S, Weber MS, et al. Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1037-1044.