

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

**Interferon β -1a-induzierte Expression von
Brain-derived neurotrophic factor
in humanen T-Lymphozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Zarlascht Karmand

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Oliver Neuhaus

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Scheu

Meinen lieben Eltern Marghalay und Dr. Sultan Mangal,
meinem lieben Ehemann Khesraw
und unseren Kindern Talis, Mina und Aeneas
gewidmet.

ZUSAMMENFASSUNG

Interferon (IFN) β -1a ist als Immunmodulator ein unverzichtbares Element der Basistherapie der Multiplen Sklerose (MS). Neben den bisher bekannten Wirkungsmechanismen wie der Immunmodulation sorgt ein neuer Aspekt, die Neuroprotektion, für viel Aufmerksamkeit. Eine entscheidende Rolle hat dabei *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), das von T-Lymphozyten sezerniert wird und eine essenzielle Bedeutung beim neuronalen Überleben sowie bei Wachstum und Differenzierung neuer Neurone nach postinflammatorischer Schädigung hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer IFN β -1a-induzierten Expression von BDNF, um die Hypothese einer Neuroprotektion durch IFN β -1a zu unterstützen. Hierzu wurde zunächst der Einfluss von IFN β -1a auf *in vitro* mitogen-aktivierte periphere Blutlymphozyten (PBL) von gesunden Probanden untersucht. Es wurden Proliferationsanalysen mit unterschiedlichen Konzentrationen angefertigt, um das T-Zellwachstum zu erfassen, und anschließend wurde die BDNF-Expression mittels standardisierten *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition der PBL-Proliferation durch IFN β -1a. Gleichzeitig konnte eine Induktion der BDNF-Expression durch die Anwesenheit von IFN β -1a nachgewiesen werden. Die Höchstwerte wurden bei mittleren Konzentrationen zwischen 1000 und 5000 IU/ml erreicht. Patienten mit MS, die mit IFN β -1a behandelt wurden, zeigten im Serum signifikant niedrigere BDNF-Werte als unbehandelte MS-Patienten.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse daraufhin, dass IFN β -1a durch Induktion der Expression von BDNF eine Neuroprotektion begünstigen kann; deren Bedeutung *in vivo* bleibt jedoch offen.

Summary

Interferon β -1a as an immunomodulatory agent is an indispensable element of the basic therapy in multiple sclerosis. In addition to the previously known mechanisms of action such as immunomodulation a new aspect, neuroprotection, attracts much attention. A decisive role in this process is played by *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) which is secreted by T lymphocytes. Furthermore, BDNF has an essential function in neuronal survival as well as in growth and differentiation of new neurons after postinflammatory damage. The aim of this doctoral thesis was the detection of IFN β -1a-induced expression of BDNF to undermine the hypothesis of IFN β -1a-associated neuroprotection. For this purpose, the influence of IFN β -1a on *in vitro* activated peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy donors was first tested. Proliferation analyses were made at different concentrations to detect T-cell growth. Afterwards BDNF expression was measured by standard ELISA. A concentration-dependent inhibition of PBL proliferation by IFN β -1a was shown. Furthermore, IFN β -1a-induced BDNF expression could be detected. The maximum values were achieved at medium concentrations between 1000 and 5000 IU/ml. Patients with MS treated with IFN β -1a exhibited significantly lower BDNF serum levels than untreated MS patients.

In summary, the results suggest that IFN β -1a can promote neuroprotection by inducing BDNF expression, but their importance *in vivo* remains open.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme;</i> Angiotensin konvertierendes Enzym
ADEM	Akute demyelinisierende Enzephalomyelitis
AEP	Akustisch evozierte Potenziale
Ag	Antigen
ANA	Antinukleärer Antikörper
APC	<i>Antigen presenting cell;</i> Antigen präsentierende Zelle
Aqua dest.	<i>Aqua destillata;</i> destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor;</i> „aus dem Gehirn stammender neurotropher Faktor“
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BZ	Blutzucker
CADASIL	Cerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie
CIS	<i>Clinically isolated syndrom;</i> klinisch isoliertes Syndrom
cMRT	Craniale Magnetresonanztomographie
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor;</i> ziliärer Neurotropher Faktor
ConA	Concanavalin A

cpm	<i>Counts per minute</i> ; β -Zerfälle pro Minute
CRP	C-reaktives Protein
DC	<i>Dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> ; erweiterte Skala zur Messung der Behinderung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent Assay</i> ; enzymverbundener Immunadsorption-Assay
ENA	<i>Extractable nuclear antigen</i> ; extrahierbares nukleäres Antigen
FCS	<i>Fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
g	Gramm
GA	Glatirameracetat
Gd	Gadolinium
GNDF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> ; „von Gliazellen stammender neurotropher Faktor“
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> ; Granulozytenkolonien stimulierender Faktor
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> ; Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen

HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. m.	Intramuskulär
IU	<i>International Unit</i> ; Internationale Einheit
i. v.	Intravenös
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
kg	Kilogramm
KKNMS	Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose
KM	Kontrastmittel
l	Liter
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> ; Leukämie inhibierender Faktor
m	Männlich
M.	Morbus
MΦ	Makrophage
MAG	Myelinassoziertes Glykoprotein
MBP	<i>Myelin basic protein</i> ; basisches Myelinprotein
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> ; Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
MEP	Motorisch evozierte Potenziale
mg	Milligramm
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II

min	Minute
ml	Milliliter
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MPB	Myelin basisches Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite;</i> funktioneller Multiple-Sklerose-Test
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
NAB	Neutralisierende Antikörper
NF	Neurotropher Faktor
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve growth factor;</i> Nervenwachstumsfaktor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Neurotrophin
OL	Oligodendrozyt
p	Signifikanzwert
PAF	<i>Platelet activating factor;</i> Plättchen aktivierender Faktor
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>Phosphate buffered saline;</i> phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-azetat

PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
p. o.	Per os
PPMS	<i>Primary progressive multiple sclerosis;</i> Primär progrediente Multiple Sklerose
PRMS	<i>Progressive relapsing multiple sclerosis;</i> Progredient schubförmige Multiple Sklerose
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom
ROS	<i>Reactive oxygen species;</i> Sauerstoffradikale
RRMS	<i>Relapsing remitting multiple sclerosis;</i> Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
s. c.	Subkutan
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
SI	Stimulationsindex
SPMS	<i>Secondary progressive multiple sclerosis;</i> Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSEP	Somatosensibel evoziertes Potenzial
TGF-β	<i>Transforming growth factor β;</i> transformierender Wachstumsfaktor β
Th0	Naive T-Helferzelle
Th1	T-1-Helferzelle
Th2	T-2-Helferzelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TPHA	Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-Assay
T-reg-Zellen	Regulatorische T-Zelle
TrkB-Rezeptor	Tyrosinkinase-Rezeptor B

V	Volumen
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> ; vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEP	Visuell evoziertes Potenzial
VF	Verdünnungsfaktor
Vit.	Vitamin
VLCFA	<i>Very long chain fatty acid</i> ; überlangkettige Fettsäure
w	Weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiopathogenese.....	1
1.1.3 Diagnostik.....	6
1.1.4 Klinische Manifestation der MS	10
1.1.5 Aktuelle Therapie.....	13
1.2 Interferon β-1a	20
1.3 Neurotrophe Faktoren und <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>.....	21
1.3.1 Neurotrophe Faktoren	21
1.3.2 Brain-derived neurotrophic factor	22
1.3.3 Leukemia inhibitory factor.....	24
1.3.4 Neurotrophin 3	25
1.3.5 Effekte von MS-Therapeutika auf neurotrophe Faktoren	26
1.4 Zytokine	27
1.4.1 Interferon- γ	27
1.4.2 Interleukin 2	28
1.4.3 Interleukin 4	29
1.4.4 Interleukin 10.....	29
1.4.5 Interleukin 13.....	30
1.5 Fragestellung.....	31
2. MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 Patienten und Kontrollen.....	33
2.2 Reagenzien und Medien.....	34
2.3 ELISA Kits	34

2.4	Material und Geräte	35
2.5	Vorbereitung der Medien und Puffer	36
2.5.1	Kurzkultur aus peripheren Blutlymphozyten	36
2.5.2	Zellgewinnung mittels Zentrifugierungs-Dichtegradienten	37
2.5.3	Zählung der Lymphozyten.....	38
2.5.4	Plattenvorbereitung, T-Zellaktivierung und Inkubation	39
2.6	Proliferationsmessungen	39
2.7	Gewinnung von Serum aus humanem Frischblut.....	40
2.8	Quantifizierung von Neurotrophen und Zytokinen mittels ELISA.....	40
2.8.1	ELISA Prinzip.....	40
2.8.2	BDNF-ELISA aus Patientenseren/Überständen der PBL Kurzkulturen	41
2.8.3	IFN- γ ELISA aus Patientenseren/Überständen der PBL Kurzkulturen.....	45
2.8.4	IL-2 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen.....	46
2.8.5	IL-4 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen.....	48
2.8.6	IL-10 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen.....	50
2.8.7	IL-13 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen.....	51
2.8.8	LIF ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen.....	53
2.8.9	NT-3 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen	54
2.9	Statistische Auswertung.....	56
3.	ERGEBNISSE	57
3.1	Proliferationsmessungen	57
3.1.1	Erhöhte Proliferation durch mitogene Zellaktivierung <i>in vitro</i>	57
3.1.2	IFN β -1a inhibiert in höheren Konzentrationen die PBL-Proliferation.....	59
3.2	Expression von BDNF.....	63
3.2.1	IFN β -1a-induzierte Expression von BDNF.....	63
3.2.2	Kinetik der BDNF-Expression <i>in vitro</i>	64
3.3	Expression verschiedener neurotropher Faktoren und Zytokine	66

3.4	Vergleich unbehandelte und behandelte MS-Patienten	70
3.4.1	Inhibition der BDNF-Expression durch IFN β -1a <i>in vivo</i>	70
3.4.2	IFN- γ Serumspiegel von MS-Patienten im Vergleich.....	72
4.	DISKUSSION	73
5.	SCHLUSSFOLGERUNG.....	81
6.	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	82
7.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	106

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose, auch bekannt als Encephalomyelitis disseminata, ist in Europa und Nordamerika die häufigste Ursache für neurologisch bedingte, dauerhafte Behinderungen des jungen Erwachsenenalters. Es handelt sich hierbei um eine chronisch entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Pathogenese trotz langjähriger Forschung noch immer weitgehend ungeklärt ist. Erstmals beschrieben wurden die Läsionen am Rückenmark Mitte des 19. Jahrhunderts durch R. Carswell und J. Cruveilhier (Carswell, 1838; Cruveilhier, 1835).

1.1.1 Epidemiologie

Zur Erstmanifestation kommt es häufig im Alter zwischen 20-40 Jahren. Einen Gipfel erreicht die Erkrankung im 30. Lebensjahr, aber auch bei immer mehr Kindern und Jugendlichen wird die MS diagnostiziert (Ruggieri et al., 1999). Die Verteilung zwischen Frauen und Männern liegt bei 2.1:1 (Kotzamani et al., 2012). In Deutschland wird die Prävalenz auf ca. 149 pro 100000 Einwohner geschätzt (T. Hein and Hopfenmüller, 2012), die Zahl der weltweit an MS erkrankten Menschen liegt bei ca. 2.5 Millionen.

1.1.2 Ätiopathogenese

Hinsichtlich der Ursache und Entstehung der MS sind noch viele Fragen unbeantwortet. Fachleute sind sich aber einig, dass es sich bei dieser

Erkrankung um einen chronisch entzündlichen Autoimmunprozess handelt, dessen Genese multifaktoriell erklärt wird.

Ein deutlich erkennbares Muster zeigt sich bei der Betrachtung der geografischen Verteilung der MS. Die dazu bisher weit akzeptierte Theorie, die Prävalenz folge in der nördlichen Hemisphäre einem Nord-Süd-Gradienten, bzw. in der südlichen Hemisphäre einem Süd-Nord-Gradienten, wird seit einigen Jahren von vielen Seiten angefochten (Koch-Henriksen et Sørensen, 2010; Pugliatti et al., 2002). Außerdem wurde in einigen Populationen, die in Gebieten mit einer hohen Prävalenz für MS lebten, eine relative „Resistenz“ gegenüber MS nachgewiesen (u. a. die Maori in Neuseeland (Skegg et al., 1987), die Hutterer und Einheimische in West-Kanada (McFarlin and Lachmann, 1989)). Andere Thesen stellen ein infektiöses Antigen (möglicherweise ein Virus), das in mäßigen Klimagebieten endemisch ist, als Ursache für den Longitudinal-Effekt (Miller et al., 1990) in den Vordergrund. Entscheidend ist jedenfalls eine Interaktion zwischen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Ein Zusammenhang mit bakteriellen oder viralen Infektionen ist aber auch nicht auszuschließen (Willer and Ebers, 2000).

Die MS folgt dem Vererbungsmuster einer polygenetischen Erkrankung (Oksenberg et al., 2001). Betrachtet man die Verteilung innerhalb einer Familie, so zeigt sich, dass die Vererbung zwar nicht ausschlaggebend für die Entwicklung der Erkrankung ist, aber genetische Faktoren in der Prädisposition dennoch eine signifikante Rolle spielen. Das absolute Risiko liegt für biologische Verwandte ersten Grades 20 bis 40-mal höher als für den Rest der Bevölkerung. Geschwister oder Kinder unterliegen einem höheren Risiko als Verwandte zweiten und dritten Grades (Sadovnick et al., 1988). Hinzu kommt eine

Konkordanzrate für MS von 25-30 % bei monozygoten Zwillingen und 3-5 % bei dizygoten Zwillingen im Vergleich zu einem allgemeinen Risiko von 0.1-0.4 % (Sadovnick and Ebers, 1993).

Unabhängige Untersuchungen des kompletten Genoms auf der Suche nach einem oder mehreren verbunden Genlocus oder -loci für MS bestätigten bisherige Berichte über die Verbindung zum humanen Leukozytenantigen (HLA) DR2-Locus (Ebers et al., 1996; Sawcer et al., 1996). Eine vollständige Erklärung für die Suszeptibilität für MS ergibt sich hierdurch aber nicht, zumal monozygote Zwillinge mit den gleichen genetischen Voraussetzungen immer noch eine Diskordanz für MS von 70-75 % vorweisen. In dieser Hinsicht wurde auch die Rolle anderer Gene, die in Verbindung mit MS stehen könnten, untersucht (Chataway et al., 1998).

Im Gegensatz zu anderen entzündlichen Erkrankungen des ZNS zeichnet sich die Pathologie der MS durch das Auftreten von multifokalen Entmarkungsherden, axonaler Destruktion und Bildung reaktiver Gliose aus (Hemmer et al., 2003; Lassmann et al., 2001). Prädilektionsstellen sind vor allem die Sehnerven, der Hirnstamm, das Rückenmark, das Kleinhirn und die periventrikuläre weiße Hirnsubstanz.

Eine zentrale Rolle im Krankheitsprozess spielt das Immunsystem. Verschiedene Arbeiten konnten durch die Beschreibung unterschiedlicher Immunprozesse diese Aussage untermauern (Hemmer et al., 2002; Hohlfeld, 1997). So finden sich in den aktiven inflammatorischen Läsionen, neben wenigen B-Lymphozyten und Plasmazellen, vor allem Infiltrationen von T-Lymphozyten und Makrophagen. Die Initiierung der Inflammation geht vorrangig von den CD4⁺ T-1-Helfer (Th1)-Zellen aus. Ihre Differenzierung aus naiven T-Zellen (Th0-Zellen)

wird durch Interferon (IFN)- γ und Interleukin (IL)-12 stimuliert. Die proinflammatorischen Produkte der Th1-Zellen, zu denen IFN- γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α zählen, hemmen wiederum die Differenzierung von CD4⁺ T-2-Helfer (Th2)-Zellen aus naiven Th0-Zellen und damit die Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Morel and Oriss, 1998). Nach Aktivierung durch eigene oder fremde Antigene (Ag) in der Peripherie und anschließender Migration zur Blut-Hirn-Schranke (BHS) durchwandern die T-Lymphozyten mithilfe von Adhäsionsmolekülen, Proteasen und Chemokinen diese Barriere (Kieseier et al., 1999). Im ZNS setzen die Th1-Zellen nach Reaktivierung durch ZNS-Ag die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-2 frei und induzieren durch die Aktivierung weiterer proinflammatorischer Zellen eine Entzündung mit nachfolgender Destruktion der Myelinscheiden. Diese Immunantwort sowie das Ansprechen auf eine Immuntherapie, aber auch die Krankheitsverläufe und Veränderungen in der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen im interindividuellen Vergleich große Unterschiede und können durch das Prinzip der Heterogenität in der Pathogenese (Lassmann et al., 2001; Lucchinetti et al., 2000) erklärt werden. So konnte z. B. bei der Autopsie eines Patienten dasselbe Muster der Demyelinisierung in allen aktiven Läsionen nachgewiesen werden. Im Vergleich mit anderen MS-Patienten jedoch ergaben sich essentielle Unterschiede (Lassmann et al., 2003).

Der Mechanismus der Demyelinisierung wurde bisher in vier Mustern beschrieben (Lassmann et al., 2001).

Muster 1: Makrophagen-vermittelte Demyelinisierung

Makrophagen setzen nach T-Zell-vermittelter Aktivierung zytotoxische Mediatoren wie $\text{TNF-}\alpha$, Sauerstoffradikale (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) frei und führen zu einer Schädigung der Myelinscheide.

Muster 2: Antikörper-vermittelte Demyelinisierung

Myelinspezifische Antikörper werden von B-Lymphozyten (bzw. Plasmazellen) sezerniert und führen über die Aktivierung von Makrophagen und die Aktivierung der Komplementkaskade zur Destruktion der Myelinscheiden.

Muster 3: Distale Oligodendrogliepathie und Apoptose

Distale Oligodendrozytendegeneration mit nachweislichem Verlust von myelinassoziierten Glykoproteinen (MAG) und anschließender Apoptose (programmierter Zelltod).

Muster 4: Primäre Oligodendrozytendegeneration

Primäre Oligodendrozytendegeneration in der perilesionären weißen Substanz, gefolgt von nicht Apoptose-vermittelter Destruktion der Myelinscheide.

Neben Entzündung und Demyelinisierung tritt als drittes pathogenetisches Element die Neurodegeneration in den Vordergrund. Der zunehmende Axonschaden wird als pathogenetisches Korrelat der primären oder sekundären chronischen Progredienz der Behinderung im Verlauf der MS angesehen. Im Gegensatz zu früheren Annahmen tritt die Neurodegeneration nicht erst spät im Krankheitsverlauf auf, sondern bereits in frühen und sogar sehr frühen Stadien. Daher gilt es neue Therapieansätze zu finden, die sich neben der Hemmung der Entzündungsreaktion auch gezielt auf die Neurodegeneration ausrichten. Es wird davon ausgegangen, dass bisherige Behandlungsstrategien das langfristige

Auftreten von neurologischen Behinderungen nicht verhindern können.

1.1.3 Diagnostik

Aufgrund der Mannigfaltigkeit der Symptome und Verwechselbarkeit mit anderen Erkrankungen, wie z. B. Vaskulitiden, multiplen Schlaganfällen, paraneoplastischen Syndromen, chronischen viralen oder rheumatischen Hirnerkrankungen, Vitaminmangel, Lupus oder Enzephalitiden, kann die Diagnosestellung nach Auftreten der ersten Symptome durchaus Monate bis Jahre andauern. Ausschlaggebend sind eine gründliche Anamnese, die körperliche und vor allem die klinisch-neurologische Untersuchung. Außerdem obligat ist der präzise Ausschluss von Differentialdiagnosen. Eine Empfehlung von Klotz et al. zum Vorgehen bei Verdacht auf MS wird in

Abb. 1 geschildert.

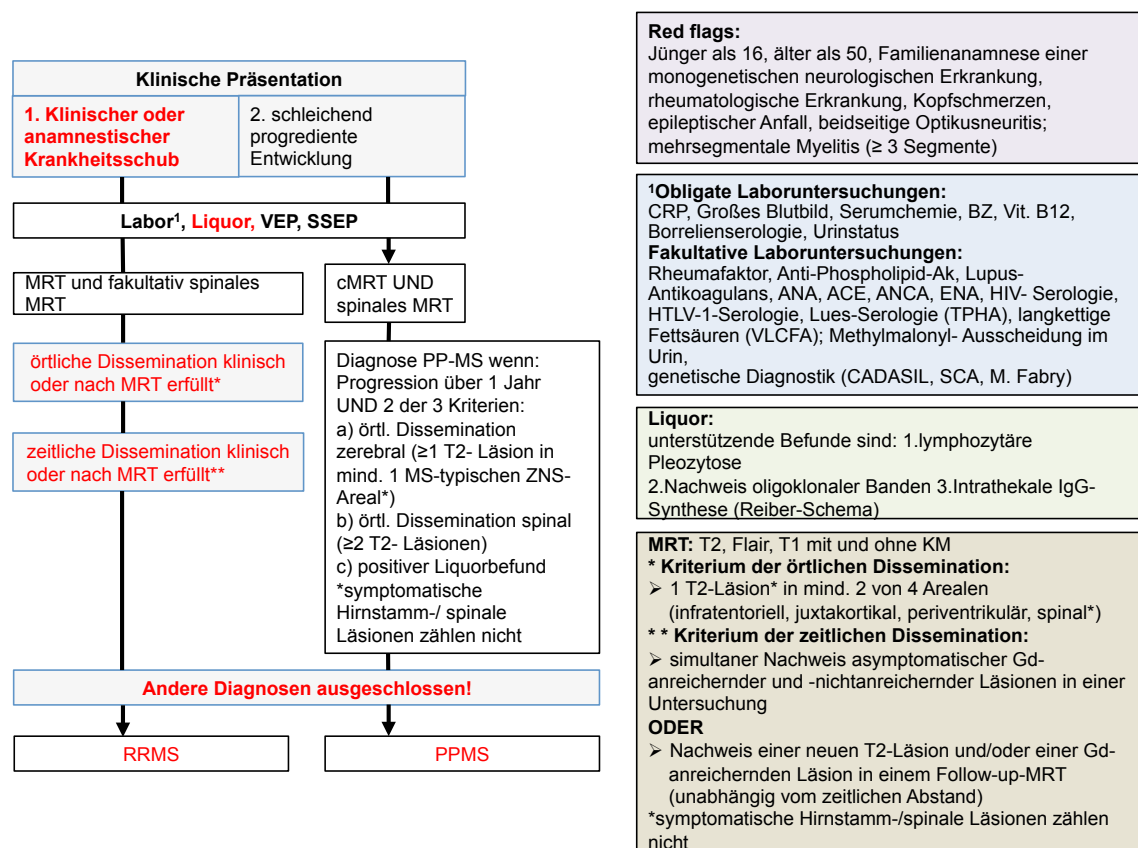


Abb. 1: Praktisches Vorgehen bei Verdacht auf MS: Empfehlungen in Deutschland

VEP: Visuell evoziertes Potenzial, SSEP: Somatosensibel evoziertes Potenzial, MRT: Magnetresonanztomographie, cMRT: Craniale Magnetresonanztomographie, PPMS: Primär progrediente Multiple Sklerose, RRMS: Schubförmig remittierende Multiple Sklerose, CRP: C-reaktives Protein, BZ: Blutzucker, Vit. B12: Vitamin B12, KM: Kontrastmittel, ANA: Antinukleärer Antikörper, ACE: Angiotensin converting enzyme, ENA: *Extractable nuclear antigen*, HIV: Humanes Immundefizienz-Virus, HTLV-1: Humanes T-lymphotropes Virus 1, TPHA: Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-Assay, VLCFA: *Very long chain fatty acid*, CADASIL: Cerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie, SCA: Spinozerebelläre Ataxie, M. Fabry: Morbus Fabry, Ig: Immunglobulin, Gd: Gadolinium.

Aus Klotz et al., 2011, mit freundlicher Genehmigung vom Springer-Verlag GmbH.

Die wichtigste technische Untersuchung ist die MRT. Mit ihr können nicht nur Plaques und entzündliche Läsionen in unterschiedlichen Bereichen des ZNS erkannt werden, sondern auch zwischen alten und neuen Läsionen sowie ihrer Aktivität unterschieden werden. Außerdem sehr aussagekräftig ist die Erfassung visuell, akustisch, motorisch sowie somatosensibel evozierter Potenziale (VEP,

AEP, MEP, SSEP). Die durch die Demyelinisierung verzögert detektierten Potenziale können in verschiedenen Anteilen des ZNS erfasst werden und damit auch subklinische Beeinträchtigungen, die durch klinisch-neurologische Untersuchungen nicht erkannt werden, nachweisen. Des Weiteren wird die Diagnostik durch eine Liquoranalyse ergänzt, um eine chronisch entzündliche Ätiopathogenese nachzuweisen. Etwa 60 % der Patienten weisen eine lymphozytäre Pleozytose auf, die kleiner als 50/ μ l sein sollte (McDonald et al., 2001); ca. 20-30 % der Patienten haben eine Schrankenfunktionsstörung (Reiber, 1998). Bei 95 % der Patienten kommt eine intrathekale Antikörpersynthese mit oligoklonalen Immunglobulin (Ig) G-Banden in der isoelektrischen Fokussierung vor. Die Diagnose wird international einheitlich nach den zuletzt 2010 überarbeiteten McDonald-Kriterien gestellt (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2011, 2005), da keiner der Einzelbefunde spezifisch für MS ist (Tabelle 1). Demnach müssen zur Diagnosestellung eine klinische und/oder MRT-morphologische örtliche und zeitliche Dissemination der für MS typischen Befunde vorliegen.

Durch die neuen Kriterien und damit Vereinfachung ihrer Anwendung ist eine noch frühzeitigere Diagnosestellung und damit auch schnellere Initiierung einer immunmodulierenden Therapie möglich, ohne dass es zu einer Verminderung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität kommt (Tur et al., 2008). So kann der gleichzeitige Nachweis asymptomatischer Gadolinium (Gd) anreichernder und nicht anreichernder Läsionen in der MRT-Untersuchung von Patienten mit typischem *Clinically isolated syndrom* (CIS), also einmaligem Schubereignis, zur Erfüllung der revidierten Kriterien zur Diagnosestellung ausreichend sein (Montalban et al., 2010; Rovira et al., 2009; Swanton et al., 2007). In der

neuesten Revision der McDonald Kriterien von 2017 wird der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor ebenfalls als Zeichen der zeitlichen Dissemination anerkannt, was die Frühdiagnose der MS weiter erleichtert (Thompson et al., 2017). Für die Diagnose einer primär progredienten MS (PPMS) (Tabelle 2) aber ist der Nachweis einer MS-typischen Liquorkonstellation weiterhin bedeutsam (Polman et al., 2011).

Tabelle 1: McDonald-Kriterien 2010 der RRMS

Klinische Präsentation	Erforderliche Zusatzdiagnostik
≥2 Schubereignisse und klinisch objektivierbarer Nachweis ≥2 Läsionen oder objektivierbarer Nachweis 1 Läsion plus anamnestische Evidenz für stattgehabtes Schubereignis	Keine
≥2 Schubereignisse und klinisch objektivierbarer Nachweis 1 Läsion	Nachweis der örtlichen Dissemination durch ^{T2} _{SEP} – ≥1 T2-Läsion in ≥2 MS-typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) ODER – Nachweis einer weiteren klinischen Manifestation in einer anderen Lokalisation
1 Schubereignis und klinisch objektivierbarer Nachweis ≥2 Läsionen	Nachweis der zeitlichen Dissemination durch ^{T2} _{SEP} – gleichzeitigen Nachweis asymptomatischer Gd-anreichernder und -nichtanreichernder Läsionen ODER – eine neue T2 und/oder Gd-anreichernde Läsion im <i>follow-up</i> -MRT ODER – zweites klinisches Ereignis

1 Schubereignis und klinisch objektivierbarer Nachweis 1 Läsion (klinisch-isoliertes Syndrom)	Nachweis der örtlichen Dissemination durch – ≥ 1 T2-Läsion in ≥ 2 MS-typischen Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) ODER – Nachweis einer weiteren klinischen Manifestation in einer anderen Lokalisation PLUS Nachweis der zeitlichen Dissemination durch – gleichzeitigen Nachweis asymptomatischer Gd-anreichernder und -nicht anreichernder Läsionen ODER – eine neue T2- und/oder Gd-anreichernde Läsion im <i>follow-up</i> -MRT ODER – zweites klinisches Ereignis
--	---

MS: Multiple Sklerose, Gd: Gadolinium, MRT: Magnetresonanztomographie.

Aus Klotz et al., 2011, mit freundlicher Genehmigung vom Springer-Verlag GmbH.

Tabelle 2: MS-Diagnose nach den McDonald-Kriterien bei PPMS

2005	2010
1. Klinische Progression über mindestens 1 Jahr (prospektive oder retrospektive Evaluation)	1. Klinische Progression über mindestens 1 Jahr (prospektive oder retrospektive Evaluation)
2. PLUS 2 von 3 der folgenden Kriterien: a) Nachweis der örtlichen Dissemination zerebral durch: ≥ 9 T2-Läsionen bzw. ≥ 4 T2-Läsionen plus pathologische VEPs b) Nachweis der örtlichen Dissemination spinal durch ≥ 2 T2-spinale-Läsionen c) Positiver Liquorbefund (Nachweis oligoklonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung und/oder autochthone IgG-Synthese)	2. PLUS 2 von 3 der folgenden Kriterien: a) Nachweis der örtlichen Dissemination zerebral durch ≥ 1 T2-Läsion in mindestens einem der Areale periventrikulär, juxtakortikal oder infratentoriell b) Nachweis der örtlichen Dissemination spinal durch ≥ 2 T2-spinale-Läsionen^a c) Positiver Liquorbefund (Nachweis oligoklonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung und/oder autochthone IgG-Synthese)

^a Symptomatische Hirnstamm-/spinale Läsionen zählen nicht. VEP: Visuell evozierte Potenziale, Ig: Immunglobulin. Aus Klotz et al., 2011, mit freundlicher Genehmigung vom Springer-Verlag GmbH.

1.1.4 Klinische Manifestation der MS

In der klinischen Manifestation zeigt die MS eine große Variabilität an neurologischen und psychiatrischen Symptomen. Die Symptome reichen typischerweise von sensorischen Störungen, unilateraler Optikusneuritis,

Doppelbildern, Visusminderung, Parästhesien bis zu spastischen Paresen, Extremitäten- und Gangataxie, Blasen- und Sexualfunktionsstörungen sowie der häufig beschriebenen Fatigue. Seltener werden Aphasie, Apraxie, frühe Demenz, Chorea und Rigidität beschrieben (McAlpine and Compston, 2005). Etwa 50 % der Betroffenen sind 15 Jahre nach Beginn der Erkrankung aufgrund schwerer Behinderung nicht in der Lage sich ohne Unterstützung fortzubewegen (Noseworthy et al., 2000). Grundsätzlich lassen sich vier Stadien und Verlaufsformen unterscheiden (Abb. 2):

- a) die schubförmige (*relapsing remitting MS, RRMS*),
- b) die sekundär progrediente (*secondary progressive MS, SPMS*),
- c) die primär progrediente (*primary progressive MS, PPMS*) und
- d) die progredient schubförmige (*progressive relapsing MS, PRMS*)

Verlaufsform (Lublin et Reingold, 1996).

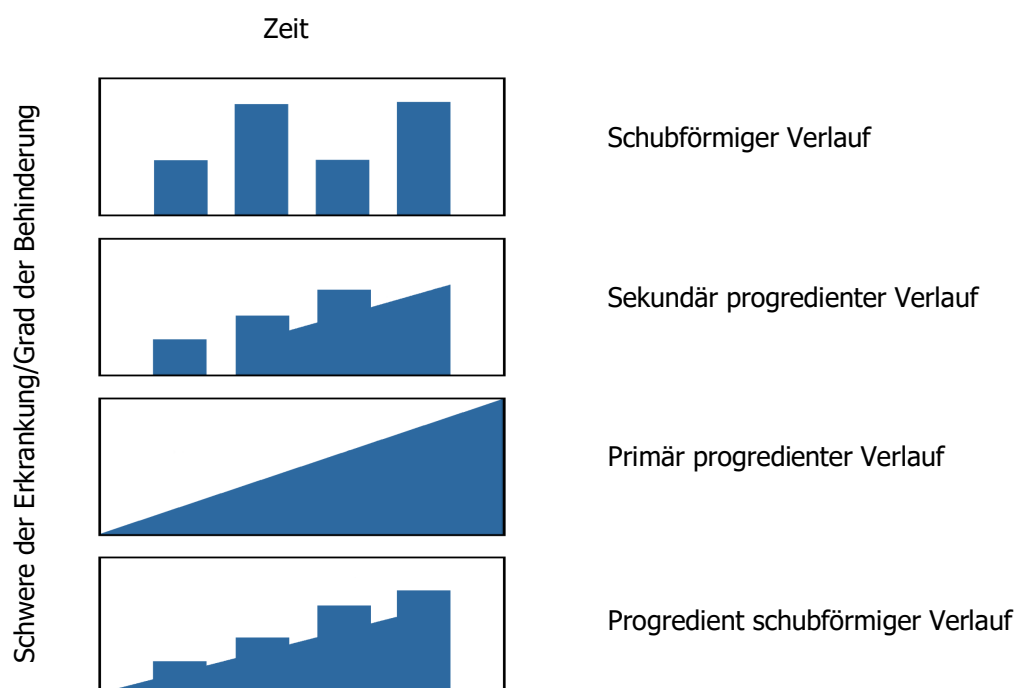


Abb. 2: Verlaufsformen der MS (nach Lublin and Reingold, 1996)

Die RRMS, die sich durch wiederkehrende Schübe mit teilweiser oder vollständiger Remission kennzeichnet, ist mit ca. 80-90 % die häufigste Form (Weinshenker et al., 1989). Als Schub wird das Auftreten neuer bzw. das Wiederauftreten bereits bekannter Symptome definiert, die mehr als 24 Stunden anhalten und durch eine entzündliche Degeneration des ZNS verursacht werden. Die Dauer und Schwere eines Schubes variiert von Patient zu Patient, von Schub zu Schub, wie auch die Abstände zwischen den Schüben variieren. Nach durchschnittlich zehn Jahren nimmt der Verlauf bei ca. 50 % der Patienten eine sekundär progrediente Form (SPMS) an. Diese wird durch ein Fortschreiten der Erkrankung durch Progression der neurologischen Dysfunktionen und unvollständiger Remission der Symptome beschrieben. Bei nur 10 % der Patienten manifestiert sich die MS von Beginn an in einer primär progredienten Form, bei der es zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Klinik ohne Schübe kommt (Lublin and Reingold, 1996). Seltener ist die progredient schubförmig verlaufende MS, die sich anfangs durch einen progredienten Verlauf mit späteren aufgesetzten Schüben kennzeichnet. In der heutigen Nomenklatur bezeichnet man die Erstepisode einer MS als klinisch isoliertes Syndrom (CIS, *Clinically isolated syndrom*). Diese kann mono- oder multifokal auftreten.

Noch früher als das CIS wird das so genannte RIS (radiologisch isoliertes Syndrom) beobachtet, also wenn die (aus anderen Gründen durchgeführte) MRT MS-typische Veränderungen zeigt ohne dass ein klinisches Ereignis aufgetreten ist.

Um den Schweregrad einer Behinderung zu erfassen und für die Progression der Erkrankung einen Verlaufsparemeter zu erhalten haben sich im Rahmen der

Diagnostik international zwei Skalen durchgesetzt, die *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) (Kurtzke, 1983) und der *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) (Rudick et al., 2002). Die EDSS bestimmt die Beeinträchtigung in acht Funktionssystemen des ZNS, wie z. B. Motorik, Sensibilität, Kleinhirn, mentale Funktionen. Die Werte reichen von 0 (keine neurologischen Defizite) bis 10 (Tod durch MS). Zur Ergänzung hat sich in den letzten Jahren der MSFC etabliert. Durch ihn werden die kognitiven und funktionellen Fähigkeiten bestimmt.

1.1.5 Aktuelle Therapie

Die Möglichkeit einer kausalen Therapie der MS gibt es aufgrund der ungeklärten Pathogenese nach wie vor nicht. Prinzipiell kann die Behandlung in vier Bereiche gegliedert werden:

- a) Die Schubtherapie,
- b) die verlaufsmodifizierende Immuntherapie (Langzeittherapie),
- c) die symptomatische Therapie und
- d) die funktionale Behandlung und Förderung durch Rehabilitation.

Im akuten Schub ist zur Suppression der Entzündungsreaktion ein Glukokortikosteroid-Puls Mittel der ersten Wahl. Empfohlen wird die intravenöse (i. v.) Gabe von 500-1000 mg Methylprednisolon an drei bis fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Burton et al., 2012; Rieckmann et al., 2004).

Zur Vorbeugung weiterer Schübe bzw. Verminderung der Schweregrade und langfristigen Reduktion der Läsionsentstehung im ZNS und damit akkumulierender klinischer Beeinträchtigungen im Sinne von bleibenden

Behinderungen ist in der Langzeittherapie der MS eine optimale Behandlungsstrategie notwendig. Die Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG), die sich 1999 aus den Ärztlichen Beiräten der deutschen, österreichischen und schweizerischen MS-Gesellschaften zusammengeschlossen hatte, veröffentlicht zur Vereinfachung und Vereinheitlichung der Behandlung regelmäßig überarbeitete Empfehlungen. Für die Behandlung der RRMS wurde ein Stufenschema erstellt, mittels dessen man auf der Grundlage einer Basistherapie und dem Prinzip einer Eskalierungs- bzw. Deeskalierungstherapie die Behandlung je nach Ergebnis verändern kann (MSTKG, 2008). Inzwischen werden die Therapieempfehlungen nicht mehr von der MSTKG, sondern von dem Krankheitsbezogenen Kompetenznetz Multiple Sklerose, KKNMS, fortgeführt (Abb. 3).

Indikation	CIS		RRMS ¹			SPMS ¹	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		1. Wahl -Alemtuzumab -Fingolimod -Natalizumab	2. Wahl - Mitoxantron (-Cyclophosphamid) ⁴	3. Wahl -Experimentelle Verfahren	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
	Milde/ Modifizierte Verlaufsform	-Glatirameracetat -Interferon β-1a i.m. -Interferon β-1a s.c. -Interferon β-1b s.c.	-Dimethylfumarat -Glatirameracetat -Interferon β-1a i.m. -Interferon β-1a s.c. -Interferon β-1b s.c. -PEG-IFN β-1a s.c. -Teriflunomid (-Azathioprin) ² (-IVIg) ³			-Interferon β-1a s.c. -Interferon β-1a s.c. -Mitoxantron (-Cyclophosphamid) ⁴	-Mitoxantron (-Cyclophosphamid) ⁴
Schubtherapie	2. Wahl - Plasmaseparation						
	1. Wahl - Methylprednisolonpuls						

Bei Versagen einer verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patienten wie eine aktive MS behandelt.

¹Substanzen in alphabetischer Reihenfolge; die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens)

²zugelassen wenn Interferon β nicht möglich oder unter Azathioprin-Therapie stabiler Verlauf erreicht

³Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen

⁴zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur ausgewiesenen MS-Zentren

CIS: Clinically isolated syndrom, RRMS: Relapsing remitting MS, SPMS: Secondary-progressive MS, i.m.: Intramuskulär, s.c.: Subkutan, IVIg: Intravenöse Immunglobuline

Abb. 3: Stufentherapie der MS (nach KKNMS, 2014)

In der Basistherapie sind als Immunmodulatoren fünf Interferon- β -Präparate (Rebif[®] und Avonex[®] (beides IFN β -1a), Betaferon[®] und Extavia[®] (beides IFN β -1b), Plegridy[®] (pegyliertes IFN β -1a)) sowie zwei Glatiramerazetat-Präparate (GA, Copaxone[®], Clift[®]) als Mittel der ersten Wahl zugelassen. Die IFN- β -Präparate und Glatiramerazetat werden parenteral appliziert. 2013 und 2014 wurden mit Teriflunomid (Aubagio[®]) und Dimethylfumarat (Tecfidera[®]) zwei orale Medikamente zur Basistherapie der schubförmigen MS zugefügt.

Alle fünf IFN- β -Präparate konnten in ihrer Effektivität, bezogen auf die Reduktion der Schubfrequenz- und -stärke, durch Evidenz-Klasse-I Studien belegt werden (MSTKG, 2008). Nach neueren Kenntnissen wurden außerdem Betaferon[®], Extavia[®] und Avonex[®] zur frühzeitigen Therapie von Patienten mit CIS zugelassen. Weiterhin zeigte die dreijährige BENEFIT Studie sowie die Follow-up-Studie nach 11 Jahren anhand von Messungen des EDSS, dass Patienten mit CIS erheblich von einer frühzeitigen Behandlung mit IFN- β profitieren (Kappos et al., 2007, 2016).

Vergleichsstudien konnten in der Anwendung von GA und IFN- β -Präparaten keine bedeutenden Unterschiede in der Effektivität feststellen (Haas and Firzlaff, 2005; Khan et al., 2001). Bei Intoleranz oder Therapieversagen unter IFN- β -Behandlung durch Auftreten von Neutralisierenden Antikörpern (NAB) besteht die Möglichkeit einer Umstellung auf einen anderen Wirkstoff. Die suppressive und protektive Wirkung von GA wurde bereits vor einigen Jahren im Rahmen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der MS, gezeigt (Sela, 1999; Teitelbaum et al., 1972; 1996). Seitdem auch die positiven Effekte auf den klinischen Verlauf und die MRT-morphologischen Hirnläsionen bei MS-Patienten belegt wurden, bekam GA 2001

die Zulassung zur Behandlung der RRMS (Teitelbaum et al., 1997; Ziemssen et al., 2001). Zur Therapie erhalten die Patienten entweder 20 mg täglich oder 40 mg dreimal wöchentlich subkutan.

Aufgrund der mangelnden Studienlage wird in Deutschland die Gabe von Azathioprin als Immunsuppressivum weiterhin nur in zweiter Linie empfohlen (MSTKG, 2008; KKNMS, 2014). Bei Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten der bisher erwähnten Vorgehensweisen können im so genannten *off-label*-Bereich, also ohne Zulassung für diese Indikation, intravenöse Immunglobuline (IVIg) in Erwägung gezogen werden. Auch wenn die Qualität einer Zulassungsstudie noch nicht erreicht wurde, wurde die Anwendung von IVIg bereits durch wichtige Metaanalysen bekräftigt (Haas et al., 2005; Sorensen et al., 2002). Darüber hinaus ist bei Versagen der Basistherapie eine Verschärfung (Eskalation) der Behandlung mit Mitoxantron (Ralenova®) möglich. Seit 2002 wurde das eigentlich als Zytostatikum verwendete Medikament auch zur Behandlung der schubförmigen und sekundär progredienten MS (EDSS 3-6) zugelassen und konnte in der Wirksamkeit, bezogen auf eine Schubreduktion und eine Verlangsamung der Krankheitsprogression, durch mehrere Studien belegt werden (Edan et al., 1997; Hartung et al., 2002).

Als Alternative in der Eskalierungstherapie empfiehlt die MSTKG außerdem den Einsatz von Natalizumab, einem "humanisierten" monoklonalen Antikörper gegen $\alpha 4$ -Integrin unter dem Handelsnamen Tysabri® (Tubridy et al., 1999). Nach einer 2003 erfolgreich abgeschlossenen Phase-II-Studie (Miller et al., 2003) wurden zwei Phase-III-Studien mit positiven Ergebnissen veröffentlicht (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Nur drei Monate nach der Markteinführung 2004 wurde der Verkauf jedoch unterbrochen, nachdem bei

drei behandelten MS-Patienten die Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML, eine schwere entzündliche Erkrankung des ZNS) diagnostiziert wurde. Nach umfangreichen Sicherheitsüberprüfungen wird inzwischen die Anwendung von Natalizumab nach individueller PML-Risikoeinschätzung bei einem schweren Verlauf der RRMS oder bei anhaltender Krankheitsaktivität unter Behandlung mit einer Basistherapie empfohlen (MSTKG, 2008).

Ebenso nur bei der hochaktiven Form der RRMS oder nach erfolgloser IFN-Therapie zugelassen ist Fingolimod (Gilenya®), eines der ersten oralen immunmodulatorischen Therapeutika, das seit 2011 im Handel ist. In zwei Phase-III-Studien konnte eine signifikante Reduktion der jährlichen Schubrate im Vergleich zum Placebo sowie einem i. m.-IFN β -1a-Präparat nachgewiesen werden (Cohen et al., 2013; Devonshire et al., 2012). Wegen möglicher kardialer Nebenwirkungen wird die Ersteinnahme unter kardialer Überwachung empfohlen.

Zwei weitere neue, seit 2013 zugelassene MS-Therapeutika sind Teriflunomid (Aubagio®) und Alemtuzumab (Lemtrada®). Teriflunomid wirkt über Hemmung der Pyrimidin-Synthese proliferationsinhibierend auf Immunzellen (Warnke et al., 2013). Neben einer Reduktion der Schubrate konnte in zwei Phase-III-Studien (TEMPO, TOWER) auch eine Verlangsamung der Behinderungsprogression unter der Gabe von 14 mg Teriflunomid pro Tag p. o. bestätigt werden (Warnke et al., 2013), so dass Teriflunomid bereits in der Basistherapie der RRMS zur Verfügung steht. Das Behandlungsschema unter Alemtuzumab, einem monoklonalen Anti-CD52-Antikörper, weicht deutlich von den bisherigen Behandlungsschemata ab. Als Eskalationsalternative bei RRMS sind in der 1. Phase der Therapie die i. v.-Gabe von 12 mg Alemtuzumab an

fünf aufeinanderfolgenden Tagen sowie in der 2. Phase nach 12 Monaten 12 mg Alemtuzumab an drei aufeinanderfolgenden Tagen vorgesehen (Cohen et al., 2012).

2016 erfolgte die Zulassung eines weiteren Medikamentes für RRMS, Daclizumab (Zinbryta®), ein monoklonaler Antikörper gegen CD25 (Rezeptor des proinflammatorischen IL-2). 2017 wurde diese Zulassung wegen eines Todesfalles durch akutes Leberversagen auf die Eskalationstherapie der RRMS eingeschränkt.

Ein weiterer Wirkstoff zur Behandlung der aktiven RRMS Cladribin (Mavenclad®) kam 2017 auf den Markt. Auch hier ist die Medikamentengabe ungewöhnlich, da sie nur an je einer Woche der ersten beiden Monate im ersten Jahr und an je einer Woche der ersten beiden Monate im zweiten Jahr erfolgt.

Ocrelizumab (Ocrevus®) ist als monoklonaler Antikörper gegen das B-Lymphozyten-Oberflächenmolekül CD20 gerichtet und wurde 2018 zugelassen. Neben einer Wirksamkeit bei RRMS sind erstmals belastbare Studiendaten hinsichtlich einer Verlangsamung der Behinderungsprogression bei PPMS vorhanden.

Tabelle 3: Zugelassene Medikamente für die Immuntherapie der MS

Wirkstoff	Handelsname	Dosierung	Anwendung	Indikation	Zulassung
Alemtuzumab	Lemtrada®	12 mg	1. Phase 5 d i. v., 2. Phase (12 Monate später) 3 d i. v.	RR	2013
Azathioprin	Imurek®	2.5 mg/kg KG	täglich p. o.	RR	2001
Cladribin	Mavenclad®	3.5 mg/kg KG kumulativ	4 Phasen à 5 d p. o. Monat 1, 2, 13, 14	RR	2017
Daclizumab	Zinbryta®	150 mg	1x monatlich s. c.	RR	2016
Dimethylfumarat	Tecfidera®	240 mg	2x täglich p. o.	RR	2013
Fingolimod	Gilenya®	0.5 mg	täglich p. o.	RR	2011
Glatiramerazetat	Copaxone®	20 mg bzw.	täglich s. c. bzw.	RR	2001

		40 mg	3x/Woche s. c.		2014
Glatiramerazetat	Clift®	20 mg	täglich s. c.	RR	2016
Interferon β-1a	Avonex®	30 μ g	1x/Woche i. m.	CIS, RR	1997
Interferon β-1a	Plegridy®	125 μ g	alle 2 Wochen s. c.	RR	2014
Interferon β-1a	Rebif®	22/44 μ g	3x/Woche s. c.	RR	1998
Interferon β-1b	Betaferon®	250 μ g	alle 2 Tage s. c.	RR, SP	1995
Interferon β-1b	Extavia®	250 μ g	alle 2 Tage s. c.	RR, SP	2010
Mitoxantron	Ralenova®	12 mg/kg KG	alle 3 Monate i. v.	RR, SP	2002
Natalizumab	Tysabri®	300 mg	alle 4 Wochen i. v.	RR	2006
Ocrelizumab	Ocrevus®	600 mg	alle 6 Monate i. v.	RR, PP	2018
Teriflunomid	Aubagio®	14 mg	täglich p. o.	RR	2013

MS: Multiple Sklerose, mg: Milligramm, kg: Kilogramm, KG: Körpergewicht, μ g: Mikrogramm, p. o.: *Per oral*, s. c.: Subkutan, i. m.: Intramuskulär, i. v.: Intravenös, RR: *Relapsing remitting*, SP: *Secondary progressive*, PP: *Primary progressive*, CIS: *Clinically isolated syndrome*.

Neben der Schubtherapie und der verlaufsmodulierenden Langzeittherapie spielt die symptomatische Therapie eine wichtige Rolle in der Behandlung. Ihr Ziel ist die Linderung bzw. Beseitigung von Krankheitssymptomen, die funktionelle Fähigkeiten der erkrankten Patienten und deren Lebensqualität beeinträchtigen (MSTKG, 2004). Die ausschlaggebenden Symptome sind vor allem Spastik, Ataxie, Schmerzen/Dysästhesien, Blasenstörung und Fatigue. Neben der symptomorientierten medikamentösen Therapie haben die physiotherapeutische Behandlung und die multidisziplinäre Rehabilitation insbesondere durch den Einfluss auf die Langzeitergebnisse einen hohen Stellenwert im Therapiekonzept. So können z. B. die Verbesserungen der Mobilität, die Wiedererlangung der Koordination und Kraft und die Erhaltung der vorhanden funktionellen Fähigkeiten, aber auch der routinierte Einsatz von Hilfsmitteln, den Patienten in kleinen Schritten wieder zur Selbstständigkeit und Selbstbestimmung in ihrem alltäglichen Leben verhelfen. Diese „Autonomie“ trägt eine große Bedeutung in Definition der Lebensqualität.

1.2 Interferon β -1a

Interferone sind Zytokine, die als Antwort auf eine virale Infektion oder andere Pathogene zu einer antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Aktivität des Immunsystems führen. Die ersten Anwendungen in der Therapie der MS gingen auf die Theorie zurück, dass rezidivierende oder anhaltende Krankheitsaktivität in Verbindung mit einer Viruspersistenz oder -latenz im ZNS zu bringen sind (Jacobs et al., 1981; Knobler et al., 1984; Panitch et al., 1987). Heutzutage sind zwei Formen von rekombinantem IFN- β , nämlich IFN β -1a und IFN β -1b, in der MS-Behandlung zugelassen.

IFN β -1a ist ein Glykoprotein aus 166 Aminosäuren, das hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert wird, praktisch aber auch nach Stimulation von allen anderen Säugerzellen produziert werden kann. Als rekombinantes humanes IFN β -1a wird es von gentechnisch veränderten Ovarialzellen chinesischer Hamster sezerniert und ist im Gegensatz zu IFN β -1b identisch mit der im Menschen natürlich vorkommenden Form. Seit 1998 in der subkutanen Applikationsform für die Therapie der RRMS zugelassen, wird es MS-Patienten 3x wöchentlich als subkutane Injektion in den Dosen 22 μ g oder 44 μ g verabreicht.

In der Peripherie beeinflusst IFN- β die Antigenpräsentation durch Modulierung der Expression von Molekülen, die hierzu notwendig sind. Es blockiert die IFN- γ -induzierte Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II-Molekülen (MHC-II) auf Antigen präsentierenden Zellen (*Antigen presenting cell*; APC) (Arnason et al., 1996; Lu et al., 1995). Außerdem konnte bei MS-Patienten eine Umkehr der erhöhten Expression von kostimulierenden CD80-Molekülen auf B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Genç et al., 1997). Zusätzlich kann es die

T-Zellaktivierung durch Veränderung des Kostimulationsweges auf der Ebene der dendritischen Zellen (DC, *dendritic cells*) unterbrechen (Huang et al., 2001). IFN- β hemmt die T-Zellproliferation (Noronha et al., 1993) und induziert die Expression anti-apoptotischer Proteine mit der Folge Zelltod zu verhindern (Sharief et al., 2001). Auch die Reduktion von T-Lymphozyten, die reaktiv auf basische Myelinprotein (MBP, *myelin basic protein*) sind, konnte auf eine Behandlung mit IFN- β zurückgeführt werden (Zang et al., 2000). Des Weiteren hemmt es die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie IFN- γ und TNF- α (Noronha et al., 1993) und stimuliert die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-4 (Rudick et al., 1998). Im ZNS initiiert IFN- β eine Suppression der Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Chemokinrezeptoren und Matrix-Metalloproteasen, und führt zu einer Stabilisierung der BHS und damit Reduktion der Migration von Immunzellen ins ZNS (Leppert et al., 1996; Sellebjerg and Sørensen, 2003).

1.3 Neurotrophe Faktoren und *Brain-derived neurotrophic factor*

1.3.1 Neurotrophe Faktoren

Die Neurotrophen Faktoren (NF) bilden eine Familie aus strukturverwandten Proteinen, die essentiell für die Entwicklung des ZNS und des peripheren Nervensystems sind. Neben dem Einfluss auf das neuronale Überleben regulieren die NF zahlreiche neuronale und gläre Funktionen wie das Wachstum von Axonen und Dendriten, die Bildung synaptischer Strukturen, die zur neuronalen Plastizität essentiell ist, und die Expression von

Neurotransmittern (Lewin et Barde, 1996; Lu, 2004). Darüber hinaus beeinflussen viele NF Immunzellen in ihrer Funktion, wie z. B. in der Migration, Aktivierung, Differenzierung und lokalen Antigenpräsentation (Flügel et al., 2001; Schuhmann et al., 2005). Die NF werden in drei Gruppen eingeteilt.

1. *Nerve growth factor* (NGF)-assoziierte NF oder auch Neurotrophine: NGF, BDNF, Neurotrophin (NT)-3 und NT-4/5
2. *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF)-Familie: GDNF, Neuroturin, Artemin und Persephin (Airaksinen and Saarma, 2002)
3. Neuropoetische Zytokine: *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und *Leukemia inhibitory factor* (LIF) (Ip, 1998)

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf BDNF. Daneben wurden auch NT-3 und LIF untersucht.

1.3.2 Brain-derived neurotrophic factor

BDNF ist ein Protein aus der Gruppe der Neurotrophine, das nicht nur seinem Namen entsprechend im Gehirn vorkommt, sondern auch im gesamten ZNS, in der Retina, in den Motoneuronen, den Nieren, der Prostata und im menschlichen Speichel zu finden ist. BDNF wird ein supportiver Effekt auf das Überleben von Neuronen im Rahmen traumatischer oder postinflammatorischer Schädigungen sowie auf das Wachstum und der Differenzierung neuer Neurone zugeschrieben (Pencea et al., 2001).

Neben den neuronalen Zellen wird BDNF auch durch verschiedenen Zellen des peripheren Immunsystems wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten und Mikrogliazellen exprimiert (Kerschensteiner et al.,

1999). Nach Antigen vermittelter Stimulation wird die Expression von BDNF durch Th1-Zellen und Th2-CD4⁺ Zelllinien, die für Myelin-Autoantigene wie z. B. MBP und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) spezifisch sind, gesteigert (Kerschensteiner et al., 1999; Ziemssen et al., 2002). Zusätzlich zur protektiven Wirkung auf neuronale Zellen konnte eine Zunahme der Oligodendrozytenproliferation und Myelinisierung nachgewiesen werden (McTigue et al., 1998). In den Hirnläsionen von Patienten mit akuter disseminierter Enzephalomyelitis (ADEM) und Patienten mit MS wurden außerdem inflammatorische Zellen gefunden, in denen ebenfalls die Expression von BDNF nachgewiesen werden konnte (Kerschensteiner et al., 1999; Stadelmann et al., 2002). BDNF bindet mit hoher Affinität am gp145-Tyrosinkinase-Rezeptor B (gp145trkB), der auf neuronalen Zellen exprimiert wird (Bothwell, 1995), sowie mit niedriger Affinität am p75-Rezeptor, den es sich mit den anderen Neurotrophinen teilt. Stadelmann et al. beschrieben weiterhin, dass der gp145trkB-Rezeptor auf MS-Läsionen angrenzenden Neuronen und in reaktiven Astrozyten innerhalb der Plaques nachgewiesen werden konnte (Stadelmann et al., 2002). BDNF entsteht, wie auch die anderen NF, durch proteolytische Spaltung aus Präkursor-Proteinen, den Proneurotrophinen, die wiederum vorzugsweise am p75-Rezeptor binden und über diesen den Zelltod vermitteln (Abb. 4) (Hohlfeld et al., 2007). Bislang ist jedoch unklar, ob die anti-apoptotische oder die pro-apoptotische Aktivität überwiegt und unter welchen physiologischen Bedingungen beide begünstigt werden (Hohlfeld et al., 2007).

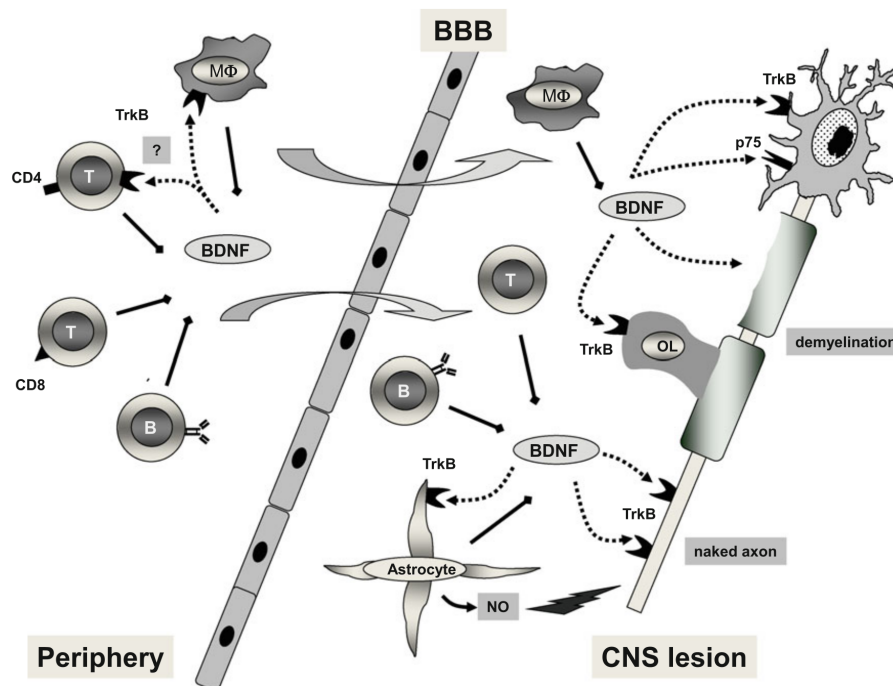


Abb. 4: BDNF im Prozess der autoimmunen Demyelinisierung

Autoreaktive T-Zellen werden in der Peripherie aktiviert, überqueren die BHS und ebnen den Weg für die anschließende Infiltration des ZNS durch Monozyten/Makrophagen und B-Zellen. Alle Lymphozytensubpopulationen sind in der Lage im aktivierten Zustand BDNF zu produzieren. Zusätzlich wird BDNF im ZNS durch Neuronen und Astrozyten sezerniert. BDNF wirkt vermutlich neuroprotektiv über die Bindung an seinen TrkB-Rezeptor auf Axonen und Oligodendrozyten. Durch Bindung am TrkB-Rezeptor auf Astrozyten induziert es die Produktion von Stickstoffmonoxid und die daraus folgende sekundäre neuronale Degeneration. BDNF kann außerdem an TrkB-Rezeptoren binden, die durch Immunzellsubpopulationen exprimiert werden. Das Ergebnis dieser Interaktion ist aber bislang unklar. Aus Lühder et al., 2013, mit freundlicher Genehmigung vom Springer-Verlag GmbH.

BHS: Blut-Hirn-Schranke, MΦ: Monozyt/Makrophage, TrkB-Rezeptor: Tyrosinkinase-Rezeptor B, T: T-Lymphozyt, p75: p75-Rezeptor, BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, B: B-Lymphozyt, OL: Oligodendrozyt, NO: Stickstoffmonoxid, ZNS: Zentrales Nervensystem.

1.3.3 Leukemia inhibitory factor

LIF ist ein neuropoetisches Zytokin aus der Familie der NF. Seinem Namen entsprechend kann es die terminale Differenzierung myeloisch leukämischer Zellen induzieren. Daneben sind bis heute eine Breite an weiteren Funktionen

bekannt, wie der stimulierende Effekt auf die Bildung von Thrombozyten, die Proliferation von hämatopoetischen Zellen, der Einfluss auf den Knochenbau, die neuronale Differenzierung, die Embryogenese und die Stimulation von Akute-Phase-Proteinen (Hilton, 1992; Metcalf, 2003). Im Serum von Probanden mit einem gesunden Nervensystem ist LIF nicht messbar (Slaets et al., 2010). Hingegen wurde eine erhöhte Expression von LIF bei Patienten in unterschiedlichen Situationen von neuronalem Stress, wie Nervenverletzungen, Ischämien, Rückenmarksverletzungen und auch in MS-Läsionen bestätigt (Banner et al., 1997; Dowsing et al., 2001; Kurek et al., 1998; Vanderlocht et al., 2006). Im MS-Maus-Modell EAE ist außerdem nachgewiesen worden, dass LIF die autoimmuninduzierte Demyelinisierung und den Verlust von Oligodendrozyten limitiert (Butzkueven et al., 2002, 2006) und den Prozess der Selbsterneuerung neuronaler Stammzellen begünstigt (Bauer and Patterson, 2006; Mashayekhi and Salehi, 2011).

1.3.4 Neurotrophin 3

NT-3, ebenfalls aus der Familie der NF, wurde in den 1990er Jahren nach BDNF und NGF als drittes Protein dieser Familie zugeordnet (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990). Zu seinen Funktionen zählen neben der Begünstigung des Überlebens und der Differenzierung bereits existierender Neurone außerdem die Induktion des Wachstumes und der Differenzierung neuer Neurone. Es wird hauptsächlich von Neuronen, T- und B-Lymphozyten sezerniert (Kalinowska-Łyszczarz et al., 2011). McTigue et al. postulierten, dass NT-3 im Bereich spinaler Verletzungen ebenso wie BDNF die Bildung von neuen Oligodendrozyten herbeiführt (McTigue et al., 1998).

1.3.5 Effekte von MS-Therapeutika auf neurotrophe Faktoren

Um zu klären, ob die Neurodegeneration, die bereits in frühen Stadien der MS auftritt, therapeutisch beeinflussbar ist, wurde die Induktion von NF, insbesondere BDNF, durch etablierte MS-Medikamente in den Focus genommen.

Eines dieser Medikamente ist Glatirameracetat (GA), ein Essigsäuresalz, das aus einem Gemisch synthetischer Polypeptide besteht. Unter täglichen subkutanen GA-Injektionen konnten die Schubfrequenz sowie die auch im MRT nachweisliche Entstehung aktiver Hirnläsionen bei Patienten mit RRMS reduziert werden (Filippi et al., 2001). Auch konnte mittels MRT eine Verzögerung der Entstehung von Hirnatrophien und die Entwicklung von permanenten axonalen Schäden aus aktiven Läsionen, den sog. „*black holes*“, dokumentiert werden (Filippi et al., 2001; Rovaris et al., 2005). Zur Frage der neuroprotektiven Wirkung von GA rückte bereits in der Arbeit von Azoulay et al (Azoulay et al., 2005) die Induktion von BDNF durch GA in den Vordergrund. In diesem Zusammenhang wurden zum einen in Serien von Patienten mit RRMS erniedrigte BDNF-Werte nachgewiesen. Zum anderen zeigte sich eine Normalisierung der BDNF-Werte bei RRMS-Patienten unter GA-Behandlung. Dieser Effekt, und damit die Beteiligung von BDNF bei protektiven Mechanismen gegen neuronale Degeneration, ist auf die erhöhte Sekretion von BDNF durch periphere Blutlymphozyten (PBL) und die Wirkung GA-spezifischer T-Lymphozyten auf die Produktion von BDNF zurückzuführen (Ziemssen et al., 2002).

Nicht ganz einheitlich stellt sich die Studienlage über den Einfluss von IFN β -1a

auf BDNF dar. In einigen Publikationen wurde kein Zusammenhang zwischen IFN β -1a und einer Induktion von BDNF gesehen (Caggiula et al., 2006; Petereit et al., 2003). Demgegenüber zeigten andere Arbeiten eine von IFN β -1a abhängige erhöhte Sekretion von BDNF (Hamamcioglu and Reder, 2007). Auch diese Arbeit befasst sich über die Bestimmung von BDNF im Serum von IFN β -1a-behandelten RRMS-Patienten und gesunden Kontrollgruppen mit dem Thema der neuroprotektiven Wirkung von IFN β -1a.

1.4 Zytokine

1.4.1 Interferon- γ

IFN- γ ist ein proinflammatorisches Glykoprotein aus 143 Aminosäuren, das wie auch IFN- β zur Familie der Interferone gehört und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems spielt. Im Gegensatz zu IFN- β , das mit IFN- α , IFN- ω und IFN- τ zur Klasse I der Interferone gehört, ist IFN- γ wegen seiner abweichenden Struktur und eines eigenen Rezeptors der alleinige Vertreter der Klasse II-Interferone. IFN- γ ist ein wichtiger Bestandteil in der unspezifischen (angeborenen) und spezifischen (erworbenen) Immunabwehr des Menschen. Es hat antivirale, immunmodulatorische und antitumorale Eigenschaften. Neben den CD4⁺ Th1-Zellen, CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wird es auch von B-Lymphozyten und APC sezerniert (Carnaud et al., 1999; Frucht et al., 2001; Yoshimoto et al., 1998). Die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen und APC ist wahrscheinlich in der Frühreaktion des Immunsystems gegen Infektionen von Bedeutung, während

die T-Lymphozyten vor allem in der spezifischen Immunreaktion die Hauptquelle für IFN- γ darstellen (Frucht et al., 2001). Zu den physiologischen Funktionen gehört die Makrophagenaktivierung, wodurch direkt mikrobielle und antitumorale Mechanismen ebenso wie eine Hochregulation der Antigenprozessierung und -präsentation in Gang gesetzt werden (Schroder et al., 2004). Ferner führt die Stimulation von CD4⁺ Th0-Zellen zu Th1-Zell-Differenzierung. Diese wiederum sezernieren über eine positive Rückkopplung weiter IFN- γ . Kontrolliert wird die Produktion von IFN- γ über Zytokine (wie IL-12 und IL-18), die von APC ausgeschüttet werden. Eine hemmende Wirkung auf die Produktion von IFN- γ haben IL-4, IL-10, der transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und Glukokortikosteroide (Fukao et al., 2000, 2001; Sen, 2001).

1.4.2 Interleukin 2

In den 1970er Jahren war IL-2 das erste Interleukin, das als solches identifiziert und charakterisiert wurde (Gordon and Maclean, 1965; Kasakura and Lowenstein, 1965). Aus 133 Aminosäuren bestehend ist es am Wachstum und der Differenzierung von T- und B-Lymphozyten beteiligt und fördert darüber hinaus die Proliferation und zytolytische Funktion von NK-Zellen (García-Tuñón et al., 2003). Im Thymus ist IL-2 außerdem für die Reifung regulatorischer T-Lymphozyten (T-reg-Zellen) verantwortlich. T-reg-Zellen supprimieren, durch Hemmung der IL-2-Produktion in autoreaktive Zellen, die Fähigkeit von T-Lymphozyten körpereigene Antigene zu erkennen bzw. auf diese zu reagieren, und dämmen auf diesem Weg Autoimmunität ein (Sakaguchi et al., 2008; Shevach, 2009). In den zerebralen Läsionen von MS-Patienten konnte eine

weite Verbreitung von IL-2 nachgewiesen werden (Sivieri et al., 1998).

1.4.3 Interleukin 4

IL-4 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, dessen Hauptquelle Th2-Zellen und Mastzellen sind. Es induziert die Differenzierung der Th0-Zellen zu Th2-Zellen und führt über eine positive Rückkopplung zur Steigerung der Sezernierung von IL-4 und hemmt gleichzeitig die Produktion von Th1-Zellen, Makrophagen, IFN- γ und IL-12 aus DC (Morel and Oriss, 1998). Ferner ist IL-4 durch Stimulierung bereits aktivierter B-Lymphozyten der Auslöser für einen Immunglobulin-Klassenwechsel (*class switch*) von IgM hin zu IgE und IgG (Holter et al., 1992). Im Rahmen einer Infektion oder Entzündung hat es eine entscheidende Rolle in der Verlagerung einer unspezifischen in eine spezifische Immunreaktion. Seit dem Nachweis von IL-4 in chronischen und aktiven MS-Läsionen wird versucht, den Einfluss IL-4 auf die Pathogenese oder das Ausmaß der MS zu ergründen (Cannella and Raine, 1995). So konnte bereits im Tierversuch gezeigt werden, dass der Ausbruch der EAE bei Mäusen durch die Anwesenheit von IL-4 verhindert wird (Racke et al., 1994).

1.4.4 Interleukin 10

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das aus 178 Aminosäuren besteht und eine wichtige Rolle in der Vorbeugung überschießender Entzündungsreaktionen und Gewebsschädigungen spielt. Heute ist bekannt, dass IL-10 sowohl von Zellen der spezifischen als auch der unspezifischen Immunabwehr synthetisiert werden kann. Die Hauptquelle sind Monozyten,

eher weniger Th2-Lymphozyten, T-reg-Zellen, Mastzellen und B-Lymphozyten. IL-10 hemmt durch aktivierte Monozyten und Makrophagen die Produktion u. a. von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *Macrophagen colony-stimulating factor* (M-CSF), TNF, LIF und *Platelet-activating factor* (PAF) (Moore et al., 2001). Weiterhin verhindert es während einer Entzündungsreaktion die Rekrutierung von Monozyten, DC, Neutrophilen und T-Lymphozyten, in dem es die Expression der, die Rekrutierung induzierenden, Chemokine hemmt (de Waal Malefyt et al., 1991; Kasama et al., 1994; Moore et al., 2001). Außerdem sind neben einer Verminderung der Antigenpräsentation von Makrophagen und DC (Enk et al., 1993) eine Inhibition der Expression von MHC-II wie CD54 (ICAM-1), CD80 (B7) und CD86 (B7.2) auf Monozyten sowie die daraus folgende Induktion dieser Moleküle durch IL-4 oder IFN- γ beschrieben worden (Moore et al., 2001). Van Boxel-Dezaire et al. berichteten von einer Hochregulation von IL-10 bei MS-Patienten innerhalb einer Remissionsphasen und einer Herunterregulation zum Zeitpunkt erneuter Schübe (van Boxel-Dezaire et al., 1999). Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen war die basale Expression von IL-10 bei MS-Patienten nachweislich erniedrigt (van Boxel-Dezaire et al., 1999).

1.4.5 Interleukin 13

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen hat IL-13. IL-13 ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich von CD4⁺ Th2-Lymphozyten sezerniert wird. Neuere Untersuchungen wiesen außerdem auf eine IL-13-Produktion durch NK-Zellen, Mastzellen, Basophile und Eosinophile hin (Krause

et al., 2006; Skowron-Zwarg et al., 2007).

Zu den Wirkungsmechanismen von IL-13 zählen vor allem die Herunterregulation der Makrophagenaktivität, die Induktion der Differenzierung von Monozyten und die Initiierung des Immunglobulin-Klassenwechsel, ähnlich wie auch bei IL-4 in Richtung IgG und IgE (McKenzie et al., 1993). Des Weiteren hemmt IL-13 Makrophagen und Monozyten in der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, wie Prostaglandine, ROS, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und IL-12 (de Vries, 1998; Doherty et al., 1993; Endo et al., 1996). Ein anderer wichtiger Aspekt ist der Einfluss auf nicht hämatopoetische Zellen, wie z. B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen (Hershey, 2003). Es induziert in Endothelzellen das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM)-1, das wichtig für die Rekrutierung von Eosinophile ist, hemmt die Proliferation und die cholinerg induzierte Kontraktion von glatten Muskelzellen *in vitro* und induziert die Synthese von Kollagen-Typ I in humanen Hautfibroblasten (Hershey, 2003).

1.5 Fragestellung

Es ist bekannt, dass im Rahmen einer MS die Neurodegeneration mit der Progression der Behinderung korreliert (Hemmer et al., 2002). In diesen Prozess kann IFN β -1a durch Immunmodulation eingreifen und das Ausmaß der körperlichen Behinderung nachhaltig beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit ist es den Wirkungsmechanismus von IFN β -1a unter dem Aspekt der Neuroprotektion zu untersuchen. Hierzu wurde zum einen die

direkte Wirkung von IFN β -1a auf periphere Blutlymphozyten (PBL) gesunder Probanden *in vitro* untersucht. Außerdem erfolgte die Bestimmung von BDNF als wichtiges Neurotrophin im Rahmen ischämischer, entzündlicher oder traumatischer neuronaler Schädigung. BDNF wurde dazu mittels standardisiertem enzymverbundenem Immunadsorptions-Assay (ELISA) in den Überständen von PBL-Kurzkulturen gesunder Probanden, die *in vitro* mit IFN β -1a in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt worden waren, quantifiziert. Neben den *in vitro* Analysen sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die Transkription und Sekretion von BDNF *in vivo* widerspiegeln würde. Zu diesem Zweck wurden die Seren zweier MS-Patientengruppen (mit IFN β -1a behandelte und unbehandelte Patienten) mittels standardisiertem ELISA-Verfahren miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollen

Für die *ex vivo* Analysen wurden nach Aufklärung und Einwilligung 12 Patienten mit schubförmig verlaufender MS (davon sechs unbehandelte und sechs mit IFN β -1a behandelte) sowie 15 gesunde Probanden ausgewählt. Zwischen den beiden Patientengruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Es handelte sich hierbei um sieben weibliche und fünf männliche Patienten. Tabelle 4 gibt in einer Übersicht die jeweiligen Charakteristika der Patientengruppen wieder. Unter den gesunden Probanden befanden sich sieben Frauen und acht Männer.

Tabelle 4: Charakteristika der MS-Patienten und gesunden Probanden

	unbehandelte Patienten	mit IFN β-1a behandelte Patienten	gesunde Probanden
Anzahl	6	6	15
Geschlecht [w:m]	3:3	4:2	7:8
Mittleres Alter [Jahre]	38.5	41.0	29.2
MS-Form	RR	RR	-
Mittlere Erkrankungsdauer [Jahre]	5.7	6.0	-
Mittlere EDSS	1.9	2.2	-
Mittlere Behandlungsdauer [Jahre]	-	2.5	-

w: weiblich, m: männlich, MS: Multiple Sklerose, EDSS: *Expanded Disability Status Scale* (Kurtzke, 1983) IFN: Interferon, RR: *Relapsing remitting*.

2.2 Reagenzien und Medien

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Medien

Produkt	Herkunft	Ort
BSA Albumin Fraktion V	Roth	Karlsruhe
Concanavalin A	Sigma	Steinheim
Ciprofloxacin	Bayer	Leverkusen
Ethylendiamintetraazetat	Gibco	Gaithersburg, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco	Gaithersburg, USA
Glatirameracetat	Teva Pharmaceutical Industries	Petah Tiqva, Israel
Lymphoprep®	Axis-Shield	Oslo, Norwegen
[Methyl- ³ H]-Thymin	Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
Penicillin	Gibco	Paisley, UK
Phorbol-12-myristat-13-azetat	Calbiochem	Darmstadt
Phosphatpuffer	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Phytohämagglutinin	Calbiochem	Darmstadt
Rebif® (Interferon β -1a)	Merck/Serono	Darmstadt
RPMI Medium 1640/L-Glutamin	Gibco	Paisley, UK
Streptomycin	Gibco	Paisley, UK
Trypanblau 0.08 %	Sigma Aldrich	Steinheim
Tween 20	Sigma Aldrich	Steinheim

2.3 ELISA Kits

Tabelle 6: Verwendete ELISA Kits

ELISA Kit	Herkunft	Ort
ChemiKine™ NT-3 Sandwich ELISA Kit	Chemicon® International	Temecula, USA
DuoSet® ELISA human BDNF	R&D Systems	Abingdon, UK
DuoSet® ELISA human IFN- γ	R&D Systems	Abingdon, UK
Quantikine® human IL-2	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt

Quantikine® human IL-4	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human IL-10	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human IL-13	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human LIF	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt

2.4 Material und Geräte

Tabelle 7: Verwendetes Material und Geräte

Produkt	Herkunft	Ort
96 Well Platte	BD Bioscience	Heidelberg
BD Falcon® Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	BD BioScience	Heidelberg
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf AG	Hamburg
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr	Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus Instruments	Hanau
Inkubator (+37 °C)	Heraeus Instruments	Hanau
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr	Ochsenhausen
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie	Jena
MULTISKAN® EX PRIMARY EIA V. 2.3	Thermo Fisher	Vantaa
ELISA-Reader	Scientific Oy	Finnland
Neubauer® Zählkammer	Scherf Präzision	Meiningen
Primary EIA, Cutoff and Cubic spline	Thermo Fisher	Vantaa,
calculation programs	Scientific Oy	Finnland
Spritzenvorsatzfilter Minisart® 0.2 µm	Sartorius	Göttingen
Standard Reaktionsgefäß	Eppendorf	Hamburg
Sterile Werkbank	Heraeus Instruments	Hanau
Szintillationszähler	Packard BioScience	Meriden, USA
Zentrifuge	Heraeus Instruments	Hanau

2.5 Vorbereitung der Medien und Puffer

Zubereitung der 10x phosphatgepufferten Salz (PBS)-Stammlösung

80.0 g NaCl (137 mM), 2.0 g KCl (27 mM), 2.0 g KH_2PO_4 (43 mM) und 11.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (14 mM) wurden in 1000 ml H_2O aufgelöst. Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 7.2 eingestellt, mit einem Minisart-Filter (0.22 μm) sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Zubereitung der 1x PBS-Gebrauchslösung

10x PBS wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit Aqua dest. (destilliertem Wasser) gemischt und auf pH 7.2 eingestellt.

Zubereitung des RPMI Mediums

500 ml RPMI 1640 Medium wurden zur Kontaminationsprophylaxe mit Penicillin 1 %, Streptomycin 1 % und Ciprofloxacin 1 % versetzt.

Zubereitung des FCS-Mediums 5 %

25 ml fötales Kälberserum (FCS) (inaktiv) in 475 ml RPMI 1640 Medium/L-Glutamin wurden zur Kontaminationsprophylaxe mit Penicillin 1 %, Streptomycin 1 % und Ciprofloxacin 1 % versetzt. Die Lösung wurde mittels Minisart-Filter (0.22 μm) sterilfiltriert. Die Inaktivierung des FCS erfolgte im Vorfeld in einem Hitzebad bei 53.5 °C für 30 min.

2.5.1 Kurzkultur aus peripheren Blutlymphozyten

Für alle Kulturen wurde RPMI 1640-Medium mit 2 mM L-Glutamin und 5 %

hitzeinaktiviertem FCS verwendet. Weiterhin wurden zur Kontaminationsprophylaxe 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 200 µg/ml Ciprofloxacin zugesetzt. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre gehalten. Alle Versuche wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

2.5.2 Zellgewinnung mittels Zentrifugierungs-Dichtegradienten

Das in Ethylendiamintetraazetat (EDTA)-Monovetten frisch gewonnene venöse Vollblut der Probanden wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit einem PBS-Puffer in einem Verhältnis von 1:2 (1:2 = je ein Teil) aufgefüllt. In einem weiteren Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml Lymphoprep[®] mit einer Dichte von 1,077 g/ml vorgelegt und das Blut/PBS-Gemisch vorsichtig mit einer Pipette aufgeschichtet (Abb. 5). Durch 45-minütige Zentrifugation (1800 Umdrehungen/min ohne forcierte Dezeleration) bei 18 °C wurden die Erythrozyten und Thrombozyten durch Sedimentation (entsprechend ihrer Dichte) von den mononukleären Zellen getrennt. Diese stellten sich als eine Interphase zwischen der Lymphoprep[®]-Phase und der Plasma-Phase dar. Nach Entfernen des Überstandes konnte die Interphase vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem PBS-Puffer in einem Verhältnis von 1:2 aufgefüllt werden. Die so gewonnenen PBL wurden anschließend durch erneute Zentrifugation (1600 Umdrehungen/min mit voller Dezeleration) bei 4 °C für 20 min gewaschen, der Überstand entfernt und verworfen und das Zellpellet in 5 ml FCS-Medium aufgenommen.

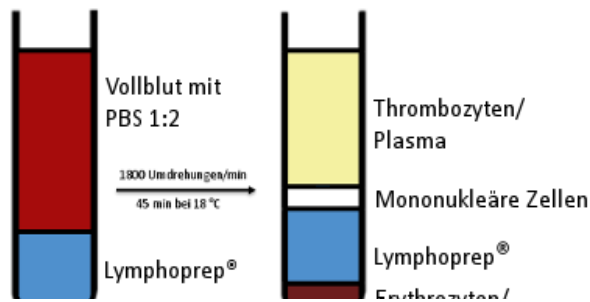


Abb. 5: Zellgewinnung im Zentrifugationsröhrchen

Vollblut/PBS-Gemisch wurde auf 15 ml Lymphoprep® aufgelegt und 45 min mit 1800 Umdrehungen/min bei 18 °C zentrifugiert.

PBS: *Phosphate buffered saline*, min: Minute.

2.5.3 Zählung der Lymphozyten

Zur Bestimmung der Zahl vitaler Zellen wurde der Zellsuspension ein Probevolumen (20 µl) entnommen und in einem Verhältnis von 1:10 mit 0.08 % Trypan-Blau verdünnt. Trypan-Blau führte in den abgestorbenen Zellen zu einer Zellkernfärbung und ermöglichte auf diesem Weg eine unter dem Lichtmikroskop sichtbare Unterscheidung von den vitalen Zellen. Zur Standardisierung der Auszählung wurde eine Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0.1 mm; 0.0025 mm²) verwendet und ein Mittelwert ermittelt. Die genaue Zellzahl berechnete sich folgendermaßen.

$$\text{Gesamtzellzahl (ml)} = n \times \text{VF} \times 10^4 \times V$$

(ml: Milliliter, n: Mittelwert der Zellen, VF: Verdünnungsfaktor, V: Gesamtvolumen)

Die Zellzahl wurde auf 1.5×10^4 Zellen/100 µl eingestellt.

2.5.4 Plattenvorbereitung, T-Zellaktivierung und Inkubation

Zunächst wurden die frisch isolierten PBL ($1.5 \times 10^4/100 \mu\text{l}/\text{Well}$) in eine U-Boden-Platte mit 96 Wells überführt. Den PBL wurde nach Aktivierung mit Concanavalin A (ConA, $5 \mu\text{l}/\text{ml}$) bzw. ohne Aktivierung IFN β -1a in unterschiedlichen Konzentrationen (0-20000 IU/ml) zugefügt. Zur Optimierung der Aktivierung wurden im Vorfeld drei Mitogene miteinander verglichen, ConA, Phytohämagglutinin (PHA) und Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA). Aufgrund der unter ConA besten Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche ConA verwendet. Nach der Präparation der Platten wurden die Zellen im Wärmeschrank bei 37°C in einer 5 %igen CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Suspensionen pro Gruppe je in einem sterilen Eppendorf Reaktionsgefäß zusammengefasst und mit 1400 Umdrehungen/min für 4 min zentrifugiert. Der Überstand und das feuchte Pellet wurden voneinander getrennt und bei -21°C tiefgefroren.

2.6 Proliferationsmessungen

Die Proliferation von Zellen erfolgt proportional zur DNA-Neusynthese. Infolge dieser Tatsache konnte durch Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin die Proliferation der Lymphozyten verfolgt werden. Zur Analyse wurde bei der Plattenvorbereitung der Lymphozyten-Kurzkulturen pro Gruppe ein Triplett für die Proliferation angesetzt. 16-18 Stunden vor Beendigung der Inkubation der gesamten Kurzkultur wurden die Triplets mit [Methyl- ^3H]-Thymidin ($0.5 \mu\text{Ci}$ pro Probe) versetzt. Anschließend wurden die Zellen auf

einen Nitrozellulosefilter geerntet und der Einbau von [Methyl-³H]-Thymidin in die DNA mittels Szintillationszählung ermittelt. Die gemessene Radioaktivität wurde als cpm (*Counts per minute*, β -Zerfälle pro Minute) ausgegeben.

2.7 Gewinnung von Serum aus humanem Frischblut

Die Seren wurden aus Frischblut der 12 MS-Patienten gewonnen. Dazu wurde das Patientenblut direkt in einem Serum-Röhrchen abgenommen und zur Förderung der Gerinnung 3 Stunden in liegender Position bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde das Blut für 10 min mit 1200 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand (hier: Serum) vorsichtig in ein Reaktionsgefäß abpipettiert und bei -21 °C eingefroren.

2.8 Quantifizierung von Neurotrophenen und Zytokinen mittels ELISA

2.8.1 ELISA Prinzip

Zur Bestimmung der Expression von Neurotrophenen bzw. Zytokinen durch T-Lymphozyten wurden enzymverbundene Immunadsorptions-Assays (ELISA) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden aus den Zellüberständen der PBL-Kurzzeitkulturen 13 gesunder Spender sowie aus 12 Patientenseren gewonnen. Es wurde ausschließlich das Verfahren des mehrschichtigen (Sandwich-) ELISA angewandt. Bei dieser Technik werden zwei Antikörper

eingesetzt, die beide spezifisch an das nachzuweisende Zytokin binden.

Je nach Fragestellung wurden verschiedene Neurotrophine/Zytokine (BDNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, LIF, NT-3) in den Überständen aus den Proliferationsmessungen der PBL bzw. den Patientenseren untersucht. Die Herstellerangaben dienten bei jedem ELISA-Verfahren als Vorlage. Zum grundsätzlichen Aufbau eines Versuches gehörte eine Standardreihe in doppelter Ausführung mit sieben definierten Neurotrophin/Zytokin-Konzentrationen, mit deren Hilfe zur Ermittlung der Probenkonzentrationen eine Kalibrierungskurve erstellt wurde. Die zu untersuchenden Proben wurden (verdünnt/unverdünnt) ebenfalls als Duplikate getestet. Nach Abschluss jedes Verfahrens wurde eine Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm (540 nm Referenzfilter) fotometrisch im ELISA-Reader gemessen.

Bis auf geringe Unterschiede sind die einzelnen ELISA vom Aufbau und der Durchführung fast identisch. Im Folgenden werden die einzelnen ELISA genauer beschrieben.

2.8.2 BDNF-ELISA aus Patientenseren/Überständen der PBL Kurzkulturen

Vorbereitung:

Als Proben wurden entweder die Überstände aus den PBL-Kurzkulturen oder die Patienten-Seren verwendet.

PBL-Kurzkultur: Überstand im Duplikat unverdünnt und mit bovinem Serum Albumin (BSA) in 1:5 Verdünnung

Patientenseren: Serum im Duplikat mit BSA in 1:10 und 1:100

Verdünnung

Waschpuffer: 0.05 % Tween®20 in PBS; 0.05 ml Tween®20 in 1000 ml 1x PBS pH 7.2-7.4

Reagenzverdünner: 1 % BSA in PBS; 1 g BSA in 100 ml PBS, pH 7.2-7.4

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

Folgende Reagenzien waren im DuoSet® ELISA human BDNF enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet.

Fänger-Antikörper: Monoklonaler Maus anti-humaner BDNF-Antikörper mit 1 ml PBS zu einer Konzentration von 360 µg/ml rekonstituiert; Verdünnung mit PBS zu einer Arbeitskonzentration von 2 µg/ml

BDNF-Standard: BDNF-Standard mit 0.5 ml BSA zu einer Konzentration von 230 ng/ml rekonstituiert; Verdünnung mit BSA zu einer Arbeitskonzentration von 2500 pg/ml

Standardreihe: Vorlegen von 220 µl BSA in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 220 µl des BDNF-Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 220 µl aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (2500 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten Konzentration; BSA als Null-Standard

Standardreihe [pg/ml]: 2500, 1250, 625, 312.5,

156.25, 78.125, 39.0625, 0 (Abb. 6)

Detektionsantikörper: Biotinylierter polyklonaler Maus anti-humaner BDNF Antikörper mit 1 ml Reagenz-Verdünner zu einer Konzentration von 4.5 µg/ml rekonstituiert; Verdünnung mit dem Reagenz-Verdünner zu einer Arbeitskonzentration von 25 ng/ml

Streptavidin-HRP: 1 ml Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin mit BSA in 1:200 Verdünnung

Substratlösung: 1:1 Mixtur aus Farblösung A (H₂O₂) und Farblösung B (Tetramethylbenzidin)

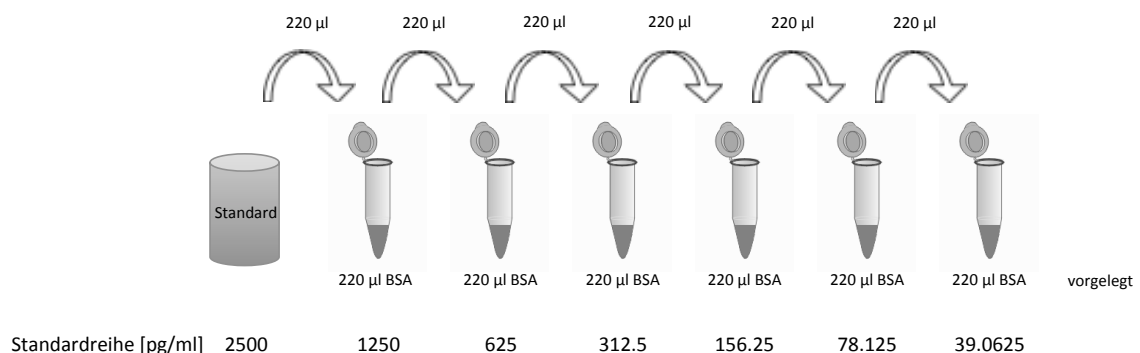


Abb. 6: Standardreihe zum Erstellen einer Kalibrierungskurve

Anfertigung einer ELISA-Standardreihe nach Herstelleranweisung.

µl: Mikroliter, BSA: Bovines Serumalbumin, pg: Pikogramm, ml: Milliliter.

Tag 1:

Pro Well wurden 100 µl der Fänger-Antikörper mit einer Konzentration von 2.0 µg/ml auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen, die Platte mit einer Folie abgeklebt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Tag 2:

Die Flüssigkeit in den Wells wurde aspiriert und verworfen, die Mikrotiterplatte

dreimal mit einem Waschpuffer (400 µl/Well) aus einer Spritzflasche gewaschen und auf Fließpapier vorsichtig trocken geklopft. Anschließend wurde die Platte pro Well mit 300 µl des Reagenz-Verdünners geblockt, die bis dahin freien Bindungsstellen an der Platte auf diesem Wege gesättigt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen und trocken geklopft. Im nächsten Schritt wurden 100 µl jeder Probe und jedes Standards in die Wells pipettiert, die Mikrotiterplatte mit einer adhäsiven Folie abgeklebt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die an die Platte angebundenen Antikörper verbanden sich in dieser Phase mit den in den Proben vorhandenen Antigenen (hier: BDNF). Durch Wiederholung des Waschvorganges (s. o.) wurden nicht gebundene Antigene von der Platte entfernt.

Anschließend wurde jedem Well 100 µl des Detektionsantikörpers in einer Konzentration von 25 ng/ml zugeführt, so dass dieser nach Abkleben der Platte mit einer neuen adhäsiven Folie während einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur an das Antigen binden konnte. Es folgte ein erneuter Waschgang in bekannter Vorgehensweise. Anschließend wurden jedem Well 100 µl mit HRP konjugiertem Streptavidin zugegeben, wodurch es zu einer Kopplung an die Detektionsantikörper kam. Wiederum wurden die Platten gewaschen, die überschüssigen Detektionsantikörper entfernt und eine Substratlösung mit 100 µl pro Well zugefügt. Durch die HRP in der Substratlösung wurde die Reduktion von H_2O_2 katalysiert, woraufhin die freigewordenen Protonen das vorher farblose Tetramethylbenzidin in sein blaues Endprodukt oxidierten. Nach 20-minütiger Inkubation in Dunkelheit wurde die Farbreaktion durch Zugabe einer Stopplösung mit 50 µl/Well und

damit Einsetzen eines Farbumschlages von blau auf gelb beendet. Die Auswertung wurde im ELISA-Reader durchgeführt.

2.8.3 IFN- γ ELISA aus Patientenseren/Überständen der PBL Kurzkulturen

Vorbereitung:

Die Vorbereitungen erfolgten wie beim BDNF-ELISA beschrieben.

Folgende Reagenzien waren im DuoSet® ELISA human IFN- γ enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet.

Fänger-Antikörper:	Monoklonaler Maus anti-humaner IFN- γ Antikörper mit 1 ml PBS zu einer Konzentration von 720 μ g/ml rekonstituiert; Verdünnung mit PBS zu einer Arbeitskonzentration von 4 μ g/ml
IFN- γ Standard:	IFN- γ Standard mit 0.5 ml Reagenz-Verdünner zu einer Konzentration von 30 ng/ml rekonstituiert; Verdünnung mit dem Reagenz-Verdünner zu einer Arbeitskonzentration von 1000 pg/ml
Standardreihe:	Vorlegen von 220 μ l Reagenz-Verdünner in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 220 μ l des IFN- γ Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 220 μ l aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (1000 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten Konzentration;

	Reagenz-Verdünner als Null-Standard
	<u>Standardreihe [pg/ml]:</u> 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 0
Detektionsantikörper:	Biotinylierter polyklonaler Ziegen anti-humaner IFN- γ -Antikörper mit 1 ml Reagenz-Verdünner zu einer Konzentration von 18 μ g/ml rekonstituiert; Verdünnung mit dem Reagenz-Verdünner zu einer Arbeitskonzentration von 100 ng/ml
Streptavidin-HRP:	1 ml HRP konjugiertes Streptavidin mit BSA in 1:200 Verdünnung
Substratlösung:	1:1 Mixtur aus Farblösung A (H ₂ O ₂) und Farblösung B (Tetramethylbenzidin)

Durchführung:

Die Versuchsdurchführung war identisch mit der des BDNF-ELISA.

2.8.4 IL-2 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen

Vorbereitung:

Probe: Überstände im Duplikat mit dem Probenverdünner RD1A in 1:10 Verdünnung

Folgende Reagenzien waren im Quantikine® human IL-2 ELISA-Kit enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die 96-Well Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen Maus anti-IL-2 Antikörper beschichtet.

Probenverdünner: Gebrauchsfertig

Waschpuffer:	Lösen der Kristallisierungen durch leichtes Schwenken bei Raumtemperatur; 1:25 Verdünnung mit Aqua dest.
Detektions-Antikörper:	Polyklonaler IL-2 Antikörper konjugiert an HRP, gebrauchsfertig
Substratlösung:	1:1 Mixtur aus Farblösung A (H ₂ O ₂) und Farblösung B (Tetramethylbenzidin)
Kalibrierungslösung:	Kalibrierungslösung RD5, gebrauchsfertig
IL-2 Standard:	IL-2 Standard mit 5 ml 1x Kalibrierungslösung RD5 zu einer Konzentration von 2000 pg/ml rekonstituiert
Standardreihe:	Vorlegen von 500 µl 1x Kalibrierungslösung RD5 in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 500 µl des IL-2 Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 500 µl aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (2000 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten Konzentration; Kalibrierungslösung als Null-Standard <u>Standardreihe [pg/ml]:</u> 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0
Stopplösung:	2 N H ₂ SO ₄

Durchführung:

Die Abdeckfolie wurde von der beschichteten 96-Well Mikrotiterplatte entfernt

und 100 µl Proben-Verdünner jedem Well zugeführt. Anschließend wurden 100 µl jeder Probe und jedes Standards (in doppelter Ausfertigung) in die Wells pipettiert, die Mikrotiterplatte mit einer adhäsiven Folie abgeklebt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die an der Platte angebundenen Antikörper verbanden sich in dieser Phase mit den in den Proben vorhandenen Antigenen (IL-2). Daraufhin wurde die Flüssigkeit in den Wells aspiriert und verworfen, die Mikrotiterplatte dreimal mit einem Waschpuffer (400 µl/Well) gewaschen und auf Fließpapier vorsichtig trocken geklopft. Danach wurden jedem Well 200 µl des konjugierten Detektions-Antikörpers zugegeben und die Platte nach Abkleben mit einer adhäsiven Folie für 2 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde in bekannter Vorgehensweise wiederholt. Im nächsten Schritt wurde jedem Well 200 µl Substratlösung zugefügt und die Platte 20 min in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die im BDNF-ELISA beschriebene Farbreaktion durch Zugabe der Stopplösung mit 50 µl/Well und damit Einsetzen eines Farbumschlages von blau auf gelb beendet. Die Auswertung des Versuches erfolgte im ELISA-Reader. Laut Herstellerangaben lag die Sensitivität für IL-2 im verwendeten Kit bei <7 pg/ml.

2.8.5 IL-4 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen

Probe: Überstände im Duplikat mit dem Probenverdünner
RD1-32 in 1:10 Verdünnung

Folgende Reagenzien waren im Quantikine® human IL-4 ELISA-Kit enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die 96-Well Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen Maus anti-IL-4 Antikörper

beschichtet.

Probenverdünner: Lösen der Ausfällung durch Mischen

Waschpuffer: Lösen der Kristallisierungen durch leichtes Schwenken bei Raumtemperatur; 1:25 Verdünnung mit Aqua dest.

Detektions-Antikörper: Polyklonaler IL-4 Antikörper konjugiert an HRP, gebrauchsfertig

Substratlösung: 1:1 Mixtur aus Farblösung A (H_2O_2) und Farblösung B (Tetramethylbenzidin)

Kalibrierungslösung: 20 ml der 5x Kalibrierungslösung RD5L mit 80 ml Aqua dest. zu 1x Kalibrierungslösung verdünnt

IL-4 Standard: IL-4 Standard mit 1 ml 1x Kalibrierungslösung RD5L zu einer Konzentration von 2000 pg/ml rekonstituiert

Standardreihe: Vorlegen von 500 μl 1x Kalibrierungslösung RD5L in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 500 μl des IL-4 Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 500 μl aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (2000 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten Konzentration; Kalibrierungslösung als Null-Standard
Standardreihe [pg/ml]: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0

Stopplösung: 2 N H_2SO_4

Durchführung:

Die Vorgehensweise war mit Ausnahme der Proben-/Standardgröße identisch mit der des IL-2 ELISA. Statt 100 µl wurde als Volumen 50 µl jeder Probe bzw. jedes Standards verwendet. Laut Herstellerangaben lag die Sensitivität für IL-4 im verwendeten Kit bei <10 pg/ml.

2.8.6 IL-10 ELISA aus Überständen der PBL-KurzkulturenVorbereitung:

Probe: Überstände im Duplikat mit 1x Kalibrierungslösung
RD5C in 1:10 Verdünnung

Folgende Reagenzien waren im Quantikine® human IL-10 ELISA-Kit enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die 96-Well Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen Maus anti-IL-10 Antikörper beschichtet.

Waschpuffer: Lösen der Kristallisierungen durch leichtes
Schwenken bei Raumtemperatur; 1:25 Verdünnung
mit Aqua dest.

Detektions-Antikörper: Polyklonaler IL-10 Antikörper konjugiert an HRP,
gebrauchsfertig

Substratlösung: 1:1 Mixtur aus Farblösung A (H₂O₂) und Farblösung
B (Tetramethylbenzidin)

Kalibrierungslösung: 20 ml der 5x Kalibrierungslösung RD5C mit 80 ml
Aqua dest. zu 1x Kalibrierungslösung verdünnt

IL-10 Standard: IL-10 Standard mit 5 ml 1x Kalibrierungslösung
RD5C zu einer Konzentration von 500 pg/ml

rekonstituiert

- Standardreihe: Vorlegen von 500 µl Kalibrierungslösung RD5C in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 500 µl des IL-10 Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 500 µl aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (500 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten Konzentration; Kalibrierungslösung als Null-Standard
- Standardreihe [pg/ml]: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 0
- Stopplösung: 2 N H₂SO₄

Durchführung:

Die Vorgehensweise war mit wenigen Veränderungen identisch mit der des IL-2 ELISA. Statt 100 µl wurden 200 µl als Probe-/Standardvolumen verwendet. Außerdem lag die Inkubationszeit nach Zugabe des Detektions-Antikörpers bei 1 Stunde und nach Zugabe der Substratlösung bei 30 min. Laut Herstellerangaben lag die Sensitivität für IL-10 im verwendeten Kit bei <3.9 pg/ml.

2.8.7 IL-13 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen

Vorbereitung:

Probe: Überstände im Duplikat mit 1x Probenverdünner

RD1W in 1:10 Verdünnung

Folgende Reagenzien waren im Quantikine® human IL-13 ELISA-Kit enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die 96-Well Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen Maus anti-IL-13 Antikörper beschichtet.

Probenverdünner:	Gebrauchsfertig
Waschpuffer:	Lösen der Kristallisierungen durch leichtes Schwenken bei Raumtemperatur; 1:25 Verdünnung mit Aqua dest.
Detektions-Antikörper:	Polyklonaler IL-13 Antikörper konjugiert an HRP, gebrauchsfertig
Substratlösung:	1:1 Mixtur aus Farblösung A (H ₂ O ₂) und Farblösung B (Tetramethylbenzidin)
Kalibrierungslösung:	Kalibrierungslösung RD5R, gebrauchsfertig
IL-13 Standard:	IL-13 Standard mit 5 ml 1x Kalibrierungslösung RD5R zu einer Konzentration von 4000 pg/ml rekonstituiert
Standardreihe:	Vorlegen von 500 µl 1x Kalibrierungslösung RD5R in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 500 µl des IL-13 Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 500 µl aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (4000 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten

Konzentration; Kalibrierungslösung als Null-Standard

Standardreihe [pg/ml]: 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 0

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

Durchführung:

Die Versuchsdurchführung war bis auf wenige Veränderungen identisch mit der des IL-2 ELISA. Die Inkubationszeit nach Zugabe der Substratlösung betrug 30 min. Laut Herstellerangaben lag die Sensitivität für IL-13 im verwendeten Kit bei <32 pg/ml.

2.8.8 LIF ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen

Vorbereitung:

Probe: Überstände im Duplikat mit 1x Kalibrierungslösung
RD5-5 in 1:10 Verdünnung

Folgende Reagenzien waren im Quantikine® human LIF ELISA-Kit enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die 96-Well Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen Maus anti-LIF Antikörper beschichtet.

Probenverdünner: Gebrauchsfertig

Waschpuffer: Lösen der Kristallisationen durch leichtes Schwenken bei Raumtemperatur; 1:25 Verdünnung mit Aqua dest.

Detektions-Antikörper: Polyklonaler LIF Antikörper konjugiert an HRP, gebrauchsfertig

Substratlösung: 1:1 Mixtur aus Farblösung A (H₂O₂) und Farblösung

	B (Tetramethylbenzidin)
Kalibrierungslösung:	Kalibrierungslösung RD5R, gebrauchsfertig
LIF Standard:	LIF Standard mit 5 ml 1x Kalibrierungslösung RD5-5 zu einer Konzentration von 2000 pg/ml rekonstituiert
Standardreihe:	Vorlegen von 500 µl 1x Kalibrierungslösung RD5-5 in sechs fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße; 500 µl des LIF Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 500 µl aus dem ersten in das zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Ausgangs-Standard (2000 pg/ml) dient als Standard mit der höchsten Konzentration; Kalibrierungslösung als Null-Standard <u>Standardreihe [pg/ml]:</u> 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0
Stopplösung:	2 N H ₂ SO ₄

Durchführung:

Die Vorgehensweise war bis auf wenige Veränderungen identisch mit der des IL-2 ELISA. Als Probe-/Standardvolumen wurden 200 µl verwendet. Die Inkubationszeit für den Detektionsantikörper betrug 1 Stunde. Laut Herstellerangaben lag die Sensitivität für LIF im verwendeten Kit bei <8 pg/ml.

2.8.9 NT-3 ELISA aus Überständen der PBL-Kurzkulturen

Vorbereitung:

Probe: Überstände im Duplikat mit 1x Kalibrierungslösung

RD5-5 in 1:10 Verdünnung

Folgende Reagenzien waren im ChemiKine™ NT-3 Sandwich ELISA-Kit enthalten und wurden wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Die 96-Well Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen Schaf anti-NT-3-Antikörper beschichtet.

Waschpuffer:	1:10 Verdünnung mit Aqua dest.
Detektions-Antikörper:	Biotinylierter, polyklonaler Maus anti-human NT-3 Antikörper mit dem Probenverdünner in 1:1000 Verdünnung
Streptavidin:	HRP konjugiertes Streptavidin und Probenverdünner in 1:1000
Substratlösung:	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
NT-3 Standard:	NT-3 Standard mit Aqua dest. zu einer Konzentration von 2000 pg/ml rekonstituiert
Standardreihe:	Vorlegen von 225 µl Probenverdünner in das erste von sieben fortlaufend nummerierte Reaktionsgefäße und 150 µl in die restlichen sechs Gefäße; 75 µl des NT-3 Standards in das erste Reaktionsgefäß überführen und resuspendieren; Transfer von 150 µl aus dem ersten ins zweite Reaktionsgefäß, resuspendieren; Fortführen der Verdünnung in gleicher Weise; Probenverdünner dient als Null-Standard
	<u>Standardreihe [pg/ml]:</u> 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 0

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

Durchführung:

Die Versuchsdurchführung war bis auf einer 15 statt 20-minütigen Farbreaktion in Dunkelheit identisch mit der des IL-2 ELISA. Laut Herstellerangaben lag die Sensitivität für NT-3 im verwendeten Kit bei <15.6 pg/ml.

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Zur Beurteilung der Inhibition der BDNF-Expression durch IFN β -1a *in vivo* wurden die beiden Patientengruppen mittels zweiseitigem *Student-T-Test* verglichen. Die Testergebnisse werden als p-Wert angegeben. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$ (=signifikant).

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationsmessungen

3.1.1 Erhöhte Proliferation durch mitogene Zellaktivierung *in vitro*

Um einen geeigneten T-Zellaktivator für die folgenden Versuchsreihen zu finden, wurden die Mitogene PHA, PMA und ConA in mehreren Experimenten miteinander verglichen. Dazu wurden aus den PBL-Kurzkulturen gesunder Probanden nach viertägiger Inkubation Proliferationsanalysen (n=9) durchgeführt. Die Proliferation wurde mittels Szintillationszählung ermittelt und in β -Zerfällen pro Minute (cpm, *Counts per minute*) ausgedrückt. Die nicht aktivierten PBL zeigten nach 4 Tagen eine geringe proliferatorische Aktivität mit Werten im Bereich zwischen 440-1380 cpm. Im Vergleich hierzu lag der Stimulationsindex (SI) für PHA und PMA durchschnittlich bei 5.6 bzw. 6.9 (Abb. 7). Der SI ist der Quotient aus der Zahl der β -Zerfälle pro Minute nach Stimulation und der β -Zerfälle pro Minute ohne Zellaktivierung. Eine signifikant höhere Proliferation wurde durch die T-Zellaktivierung mit ConA hervorgerufen (Abb. 8). Die β -Zerfälle pro Minute unter ConA lagen zwischen 13500-62200. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte in allen weiteren Experimenten die T-Zellaktivierung durch ConA (5 μ g/ml).

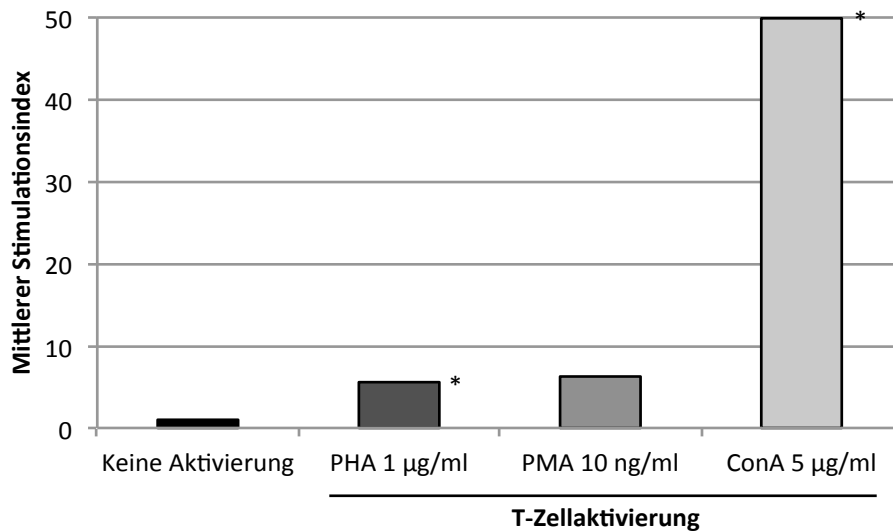


Abb. 7: Steigerung der Proliferation durch mitogene T-Zellaktivierung

Die Proliferation aus n=9 Versuchen wurde hier durch den mittleren Stimulationsindex (SI) dargestellt. SI ist der Quotient aus der β -Zerfälle pro Minute nach Stimulation und der β -Zerfälle pro Minute ohne Zellaktivierung. Die T-Zellaktivatoren PHA, PMA und ConA wurden in Bezug auf eine Kontrolle (nicht aktivierte PBL) miteinander verglichen. Alle Proliferationsmessungen wurden mit frisch isolierten PBL gesunder Probanden durchgeführt. Durch ConA und PHA aktivierte T-Zellen zeigten eine signifikant höhere Proliferation.

PHA: Phytohämagglutinin, PMA: Phorbol-12-myristat-13-azetat, ConA: Concanavalin A, µg: Mikrogramm, ml: Milliliter, ng: Nanogramm, *: Stimulation im Vergleich zu Säule 1 signifikant höher.

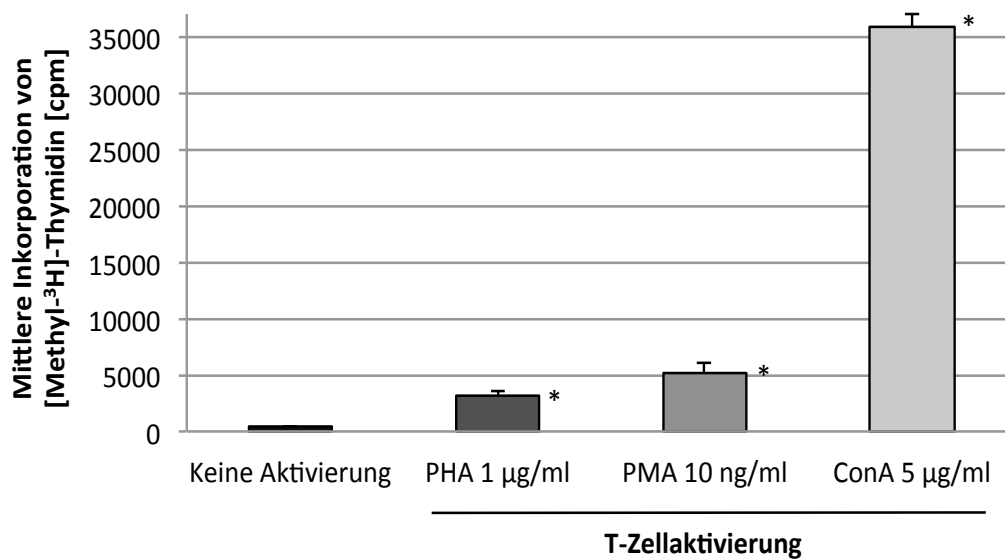


Abb. 8: Proliferation mitogenaktivierter T-Lymphozyten *in vitro*

PBL gesunder Probanden blieben ohne Aktivierung (1. Säule) oder wurden mit PHA, PMA oder ConA (Säulen 2-4) aktiviert. Der Einbau von [Methyl-³H]-Thymidin in die DNA wurde mittels Szintillationszählung gemessen. Die Proliferation wird als mittlere Zahl der β -Zerfälle + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben. Die aktivierten T-Zellen zeigten eine signifikant höhere Proliferation.

Cpm: *Counts per minute*, PHA: Phytohämagglutinin, μ g: Mikrogramm, ml: Milliliter, PMA: Phorbol-12-myristat-13-azetat, ng: Nanogramm, *: Proliferation in Bezug zu Säule 1 signifikant höher.

3.1.2 IFN β -1a inhibiert in höheren Konzentrationen die PBL-Proliferation

IFN β -1a führte dosisabhängig zur Hemmung der PBL-Proliferation. Nach der Zellaktivierung mit 5 μ g/ml ConA wurden PBL mit IFN β -1a in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. In den ersten Versuchsreihen wurden die Konzentrationen 10, 100, 1000 und 10000 IU/ml verwendet. Zur Kontrolle erfolgte jeweils zeitgleich eine Untersuchung mit nicht aktivierten Zellen unter identischer IFN β -1a Gabe. Die Ergebnisse ließen erkennen, dass unter zunehmender IFN β -1a Konzentration die Proliferation der PBL abnahm (Abb. 9). Ein deutlicher Sprung zeigte sich zwischen 1000 und 10000 IU/ml. Hier sank die Zahl der β -Zerfälle fast um 50 % im Vergleich zu den aktivierten Zellen ohne IFN β -1a. Bei den nicht aktivierten Kontrollen wirkte sich dieser Effekt schwächer aus.

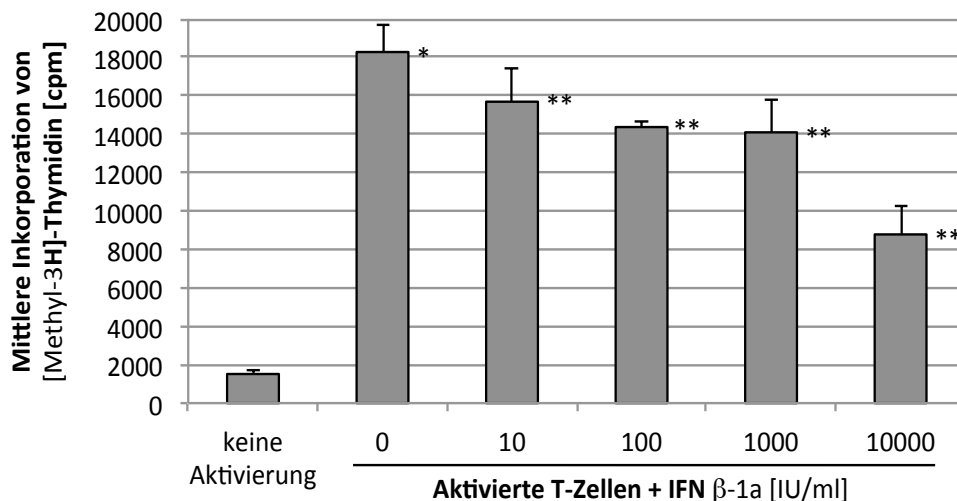


Abb. 9: Inhibition der Proliferation *in vitro* durch Interferon β -1a

Frisch isolierte PBL verblieben inaktiviert (1. Säule) oder wurden mit 5 μ g/ml ConA aktiviert (Säulen 2-6). IFN β -1a wurde in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die Proliferation wurde mittels Szintillationszählung gemessen und als mittlere Zahl der β -Zerfälle + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben.

Cpm: *Counts per minute*, IFN: Interferon, IU: *International Unit*, ml: Milliliter, *: Proliferation in Bezug zu Säule 1 signifikant höher, **: Proliferation in Bezug zu Säule 2 signifikant niedriger.

Die Versuchsreihe wurde weiterentwickelt und in den folgenden Experimenten zwei zusätzlich zu untersuchende IFN β -1a Konzentrationen (5000 und 20000 IU/ml) verwendet. Wiederholt zeigte sich eine Hemmung der PBL-Proliferation durch IFN β -1a vor allem in den höheren Konzentrationen (5000 bis 20000 IU/ml) (Abb. 10). In der Stimulationsindexkurve (Abb. 11) dargestellt fiel der SI ab 5000 IU/ml IFN β -1a auf ca. 15 bei einem Ausgangswert von ca. 26 nach T-Zellaktivierung ohne IFN β -1a Gabe.

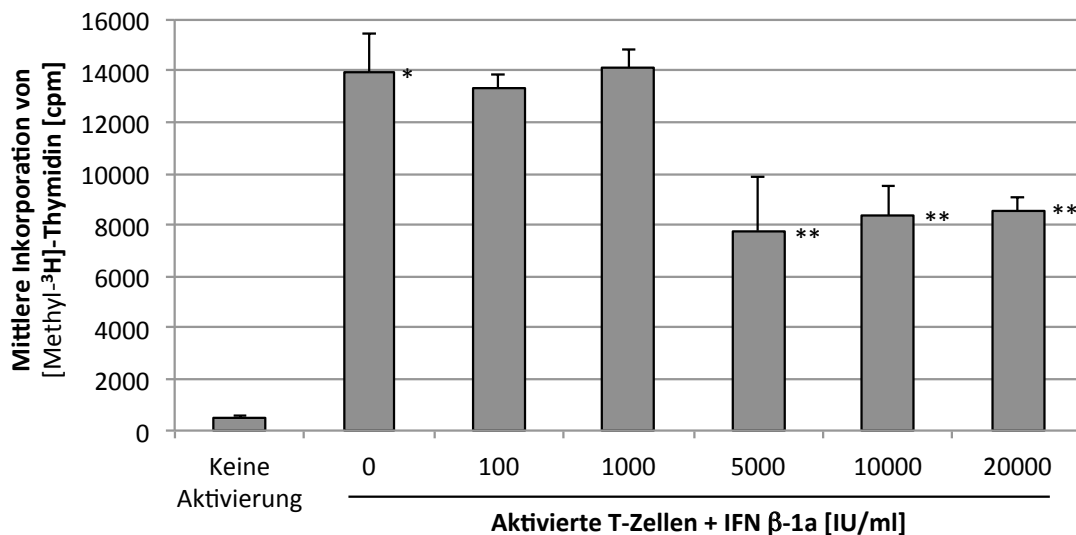


Abb. 10: Inhibition der Proliferation *in vitro* durch IFN β -1a in höheren Konzentrationen

Frisch isolierte PBL verblieben inaktiviert (1. Säule) oder wurden mit 5 μ g/ml ConA aktiviert (Säulen 2-7). IFN β -1a wurde in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die Proliferation wurde mittels Szintillationszählung gemessen und als mittlere Zahl der β -Zerfälle + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben.

Cpm: *Counts per minute*, IFN: Interferon, IU: *International Unit*, ml: Milliliter, *: Proliferation in Bezug zu Säule 1 signifikant höher, **: Proliferation in Bezug zu Säule 2 signifikant niedriger.

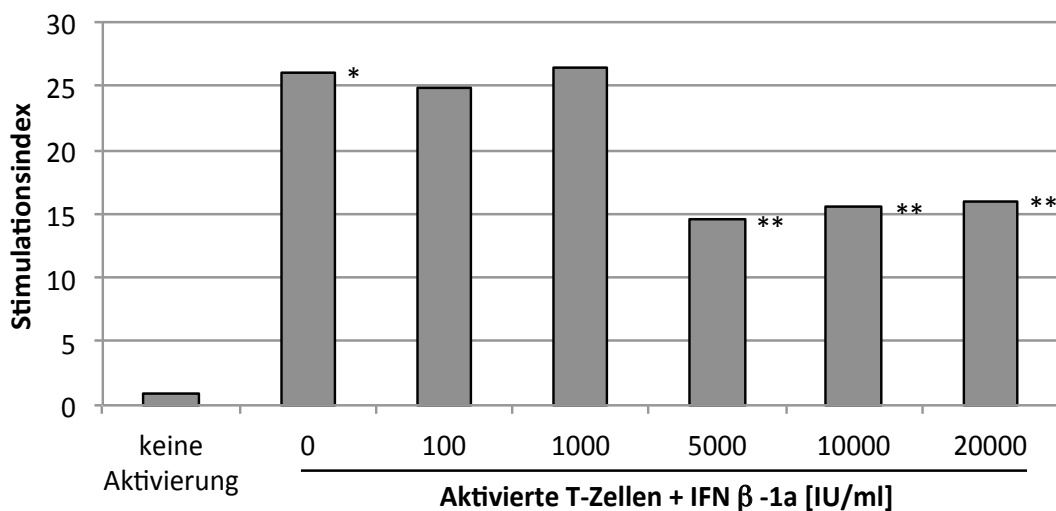


Abb. 11: Stimulationsindexkurve der Inhibition der Proliferation durch IFN β -1a

Das Proliferationsdiagramm aus Abb. 10 ist hier durch den Stimulationsindex (SI) eines repräsentativen Experimentes dargestellt. SI ist der Quotient aus der β -Zerfälle pro Minute nach Stimulation und der β -Zerfälle pro Minute ohne Zellaktivierung. Als T-Zellaktivatoren wurde

ConA (5 µg/ml) verwendet. Alle Proliferationsmessungen wurden mit frisch isolierten PBL gesunder Probanden durchgeführt.

IFN: Interferon, IU: *International Unit*, ml: Milliliter, *: Stimulation in Bezug zu Säule 1 signifikant höher, **: Stimulation in Bezug zu Säule 2 signifikant niedriger.

Durch die Erhöhung der Konzentrationsschritte auf 50000 und 100000 IU/ml IFN β-1a wurde die Tendenz zur weiteren Verstärkung der Hemmung deutlich (Abb. 12). Der SI fiel um 42-48 % seines Ausgangswertes (T-Zellaktivierung ohne IFN β-1a Gabe).

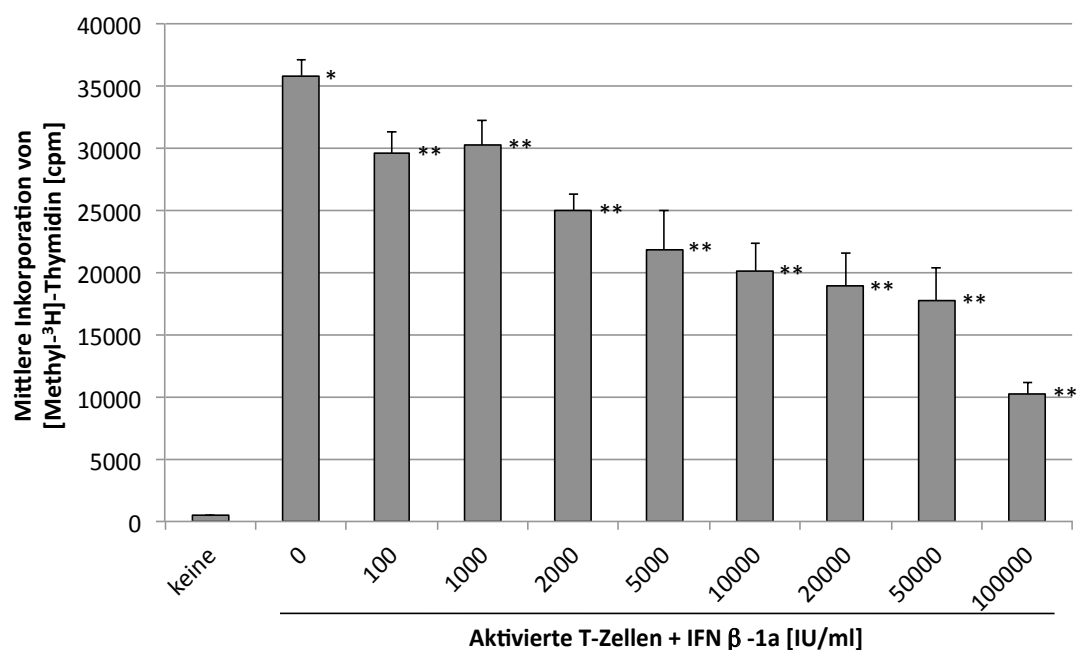


Abb. 12: Inhibition der Proliferation *in vitro* durch IFN β-1a in höheren Konzentrationen

Frisch isolierte PBL verblieben inaktiviert (1. Säule) oder wurden mit 5 µg/ml ConA aktiviert (Säulen 2-9). IFN β-1a wurde in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die Proliferation wurde mittels Szintillationszählung gemessen und als mittlere Zahl der β-Zerfälle + Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes angegeben.

Cpm: *Counts per minute*, IFN: Interferon, IU: *International Unit*, ml: Milliliter, *: Proliferation in Bezug zu Säule 1 signifikant höher, **: Proliferation in Bezug zu Säule 2 signifikant niedriger.

3.2 Expression von BDNF

3.2.1 IFN β -1a-induzierte Expression von BDNF

Um die Expression von BDNF durch PBL zu messen, wurden Überstände aus PBL-Kurzkulturen gesunder Probanden untersucht. Die T-Zellen wurden in vitro mit ConA (5 μ g/ml) aktiviert (Abb. 13), oder verblieben ohne Aktivierung (Abb. 14), und wurden anschließend mit IFN β -1a in den Konzentrationen 100, 1000, 5000, 10000 und 20000 IU/ml behandelt, bzw. verblieben unbehandelt. In jeder Probe konnte BDNF nachgewiesen werden. Eine deutliche Induktion der Expression wurde insbesondere in den mittleren Konzentrationen (1000 und 5000 IU/ml) verzeichnet. Durch IFN β -1a Konzentrationen unter 1000 IU/ml und über 5000 IU/ml wurde eine geringere Expression von BDNF induziert.

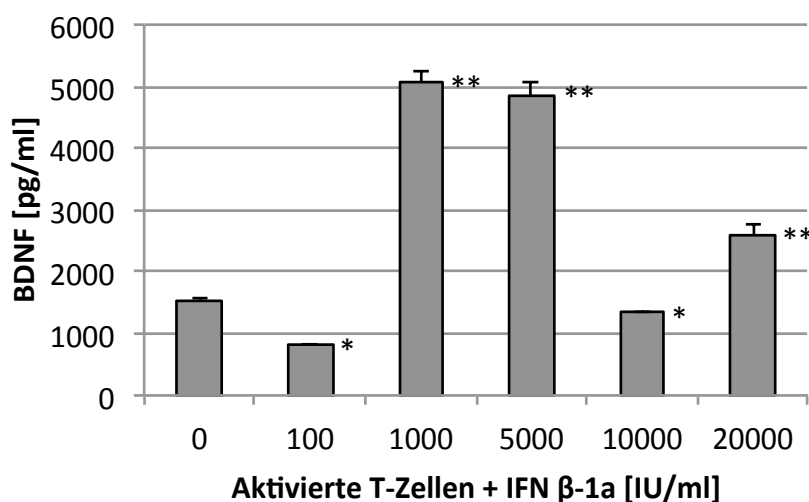


Abb. 13: IFN β -1a induzierte Expression von BDNF durch aktivierte T-Zellen

Humane PBL wurden mit ConA (5 μ g/ml) aktiviert und IFN β -1a in unterschiedlicher Konzentration hinzugefügt. Eine deutliche Zunahme der BDNF-Konzentration zeigte sich vor allem im mittleren Bereich der IFN β -1a Gabe (Säulen 3-4), hier durch ein repräsentatives Experiment dargestellt. Die BDNF-Konzentration wurde mittels Standard-ELISA ermittelt.

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU:

International Unit, *: Induktion in Bezug zu Säule 1 signifikant niedriger, **: Induktion in Bezug zu Säule 1 signifikant höher.

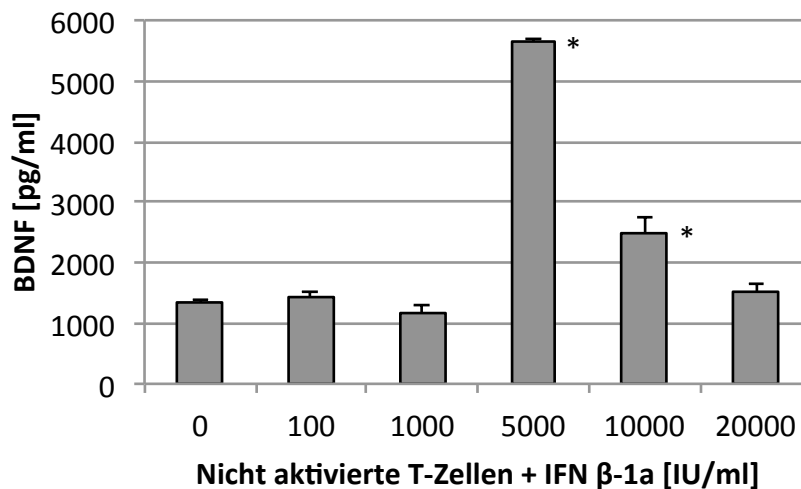


Abb. 14: IFN β -1a induzierte Expression von BDNF durch nicht aktivierte T-Zellen

Humane PBL wurden mit IFN β -1a in unterschiedlicher Konzentration behandelt. Eine deutliche Zunahme der BDNF-Konzentration zeigte sich vor allem ab einer IFN β -1a Konzentration von 5000 IU/ml, hier durch ein repräsentatives Experiment dargestellt. Die BDNF Konzentration wurde mittels Standard-ELISA ermittelt.

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU: *International Unit*, *: Induktion in Bezug zu Säule 1 signifikant höher.

3.2.2 Kinetik der BDNF-Expression *in vitro*

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Kinetik der BDNF-Expression untersucht. Hierzu wurde eine PBL-Kurzkultur nach bekannter Vorgehensweise vorbereitet und in dreifacher Ausfertigung angelegt. Nach 1 Tag, nach 2 Tagen und nach 4 Tagen wurden die Überstände jeweils gepoolt und bei -20 °C eingefroren. Anschließend erfolgte eine Erfassung der BDNF-Expression mittels Standard-ELISA (Abb. 15). Bei den mit ConA (5 μ g/ml) aktivierten T-Zellen wurde nach 1 Tag unabhängig von der *in vitro* IFN β -1a Behandlung eine gleichmäßig niedrige BDNF-Expression gemessen. Am 2. Tag konnte ein leichter Anstieg der Expression über alle Konzentrationen hinweg festgestellt werden.

Nach 4 Tagen war die Tendenz zu einer weiteren Zunahme der Expression besonders im mittleren Bereich der IFN β -1a Konzentrationen erkennbar.

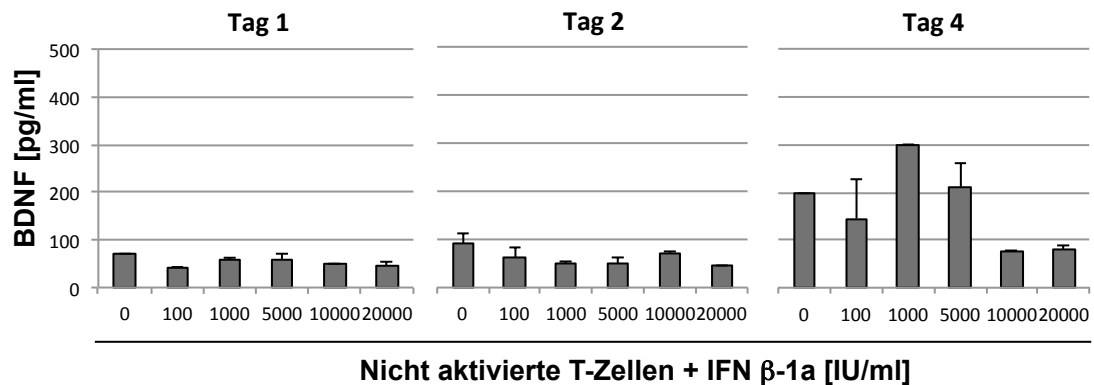


Abb. 15: Kinetik der BDNF-Expression durch aktivierte T-Zellen unter IFN β -1a Gabe *in vitro*

Überstände aus PBL-Kurzkulturen (Dauer: 1 Tag, 2 Tage, 4 Tage) mit aktivierten (5 μ g/ml ConA) und IFN β -1a behandelten T-Zellen wurden einem Standard-ELISA unterzogen. Nach 4 Tagen zeigte sich eine dosisabhängige Expression von BDNF mit einer Zunahme vorrangig im Bereich der mittleren IFN β -1a Konzentrationen (Tag 4, Säulen 3-4), hier durch ein repräsentatives Experiment dargestellt.

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU: *International Unit*.

Bei den nicht aktivierten T-Zellen schlug sich dieser Effekt ähnlich nieder. Erst nach 4 Tagen konnte eine Zunahme der BDNF-Expression gemessen werden und dann wiederum überwiegend durch die Anwendung der Konzentrationen 1000 und 5000 IU/m (Abb. 16).

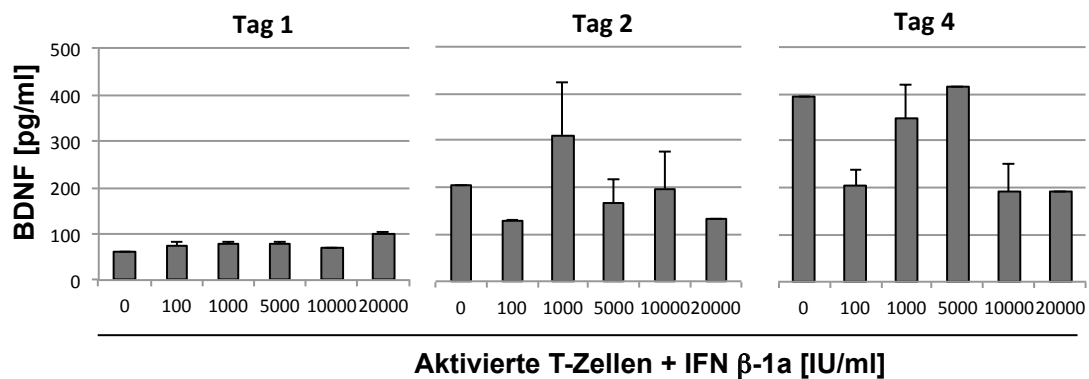


Abb. 16: Kinetik der BDNF-Expression durch nicht aktivierte T-Zellen unter IFN β -1a-Gabe *in vitro*

Überstände aus PBL-Kurzkulturen (Dauer: 1 Tag, 2 Tage, 4 Tage) mit IFN β -1a behandelten und nicht aktivierten T-Zellen wurden einem Standard-ELISA unterzogen. Nach 4 Tagen wurde eine dosisabhängige Expression von BDNF mit Zunahme vorrangig im Bereich der mittleren IFN β -1a Konzentrationen (Tag 4, Säulen 3-4) festgestellt. Dargestellt durch ein repräsentatives Experiment.

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU: *International Unit*.

3.3 Expression verschiedener neurotropher Faktoren und Zytokine

Für die Quantifizierung verschiedener NF und Zytokine mittels Standard-ELISA wurden die Überstände aus den PBL-Kurzkulturen gesunder Probanden ausgewählt (n=3). Der Versuchsaufbau war für jede dieser drei Kurzkulturen identisch. Untersucht wurden *in vitro* mit ConA (5 μ g/ml) aktivierte, bzw. nicht aktivierte T-Lymphozyten, die ebenfalls *in vitro* mit IFN β -1a in den Konzentrationen 100, 1000, 5000, 10000, 20000 IU/ml behandelt wurden bzw. unbehandelt verblieben. Aus der Gruppe der NF wurden BDNF, LIF und NT-3, unter den Zytokinen IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 und IL-13 ausgesucht. Für jeden

ELISA wurde eine Platte mit den gesamten Überständen der drei Probanden angesetzt.

Die Ergebnisse werden in der Tabelle 8 als Mittelwerte aus n=3 Experimenten zusammengefasst. Wie auch die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, induzierten insbesondere die mittleren IFN β -1a Konzentrationen die Höchstwerte für die Produktion von BDNF (3944 pg/ml für nicht aktivierte T-Zellen und 4222 pg/ml für aktivierte T-Zellen).

Im Gegensatz dazu wurden durch den NT-3 ELISA zwar in allen Überständen vergleichbar hohe Neurotrophin-Konzentrationen nachgewiesen, allerdings erreichten die Proben ohne IFN β -1a die Maximalwerte für NT-3. Durch die Zugabe von IFN β -1a ging die Expression von NT-3 durch T-Lymphozyten leicht zurück (Abb. 17). Die Werte lagen für die nicht aktivierten Proben bei 2665-3589 pg/ml und für die aktivierten zwischen 2149 und 2702 pg/ml. Im Vergleich der Ergebnisse mit und ohne T-Zellaktivierung präsentierten die nicht aktivierten T-Lymphozyten eine um 19-25 % höhere NT-3 Produktion.

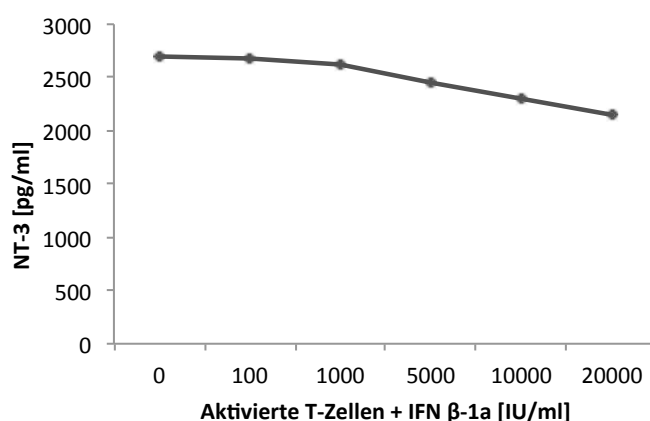


Abb. 17: Abnahme der NT-3 Expression unter IFN β -1a Behandlung *in vitro*

Langsamer Abfall der NT-3 Expression durch T-Lymphozyten *in vitro* mit Zunahme der IFN β -1a Konzentration. Die Quantifizierung erfolgte mittels Standard-ELISA. Dargestellt wurden die

Mittelwerte aus drei Experimenten.

NT: Neurotrophin, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU: *International Unit*.

Der IL-13 ELISA fiel ebenfalls positiv aus. In allen Proben wurde IL-13 nachgewiesen. Ohne Aktivierung lagen die Werte im Bereich zwischen 1950 und 2470 pg/ml, nach erfolgter Aktivierung zwischen 2083 und 2740 pg/ml. Wiederholt konnten die Höchstwerte in den Überständen ohne IFN β -1a Zusatz gemessen werden. Die Sekretion von IL-13 wurde ähnlich wie bei NT-3 durch die Anwesenheit von IFN β -1a gehemmt (Abb. 18). Der Vergleich der Ergebnisse mit und ohne T-Zellaktivierung zeigte hingegen eine um 5-11 % höhere Sekretion von IL-13 durch die aktivierten T-Zellen.

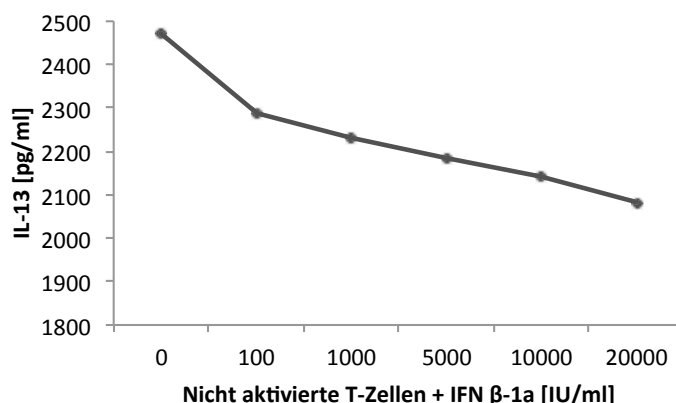


Abb. 18: Expression von IL-13 durch T-Zellen unter der Gabe von IFN β -1a *in vitro*

Die Inhibition der Expression von IL-13 steigt mit zunehmender IFN β -1a Konzentration. Die Quantifizierung von IL-13 durch T-Lymphozyten erfolgte mittels Standard-ELISA. Dargestellt wurden die Mittelwerte aus drei Experimenten.

IL: Interleukin, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU: *International Unit*.

Die Sekretion von LIF, IL-2 und IL-4 lag sowohl bei den aktivierten als auch bei den nicht aktivierten Proben unter der Nachweisgrenze des jeweiligen Zytokin-ELISA. Gleichmaßen verhielten sich die nicht aktivierten Proben. Auch hier

war das jeweilige Zytokin nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu sezernierten die T-Lymphozyten nach Aktivierung mit ConA reichlich IFN- γ (1694-5180 pg/ml). Eine Inhibition der IFN- γ Sekretion konnte durch Steigerung der IFN β -1a Dosierung erreicht werden (Abb. 19).

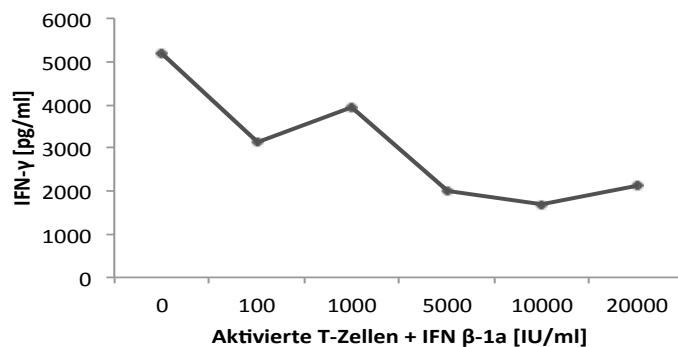


Abb. 19: IFN- γ Expression unter der Gabe von IFN β -1a

PBL wurden mit ConA (5 μ g/ml) aktiviert und IFN β -1a in unterschiedlicher Konzentration hinzugefügt. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der IFN- γ Expression mit Zunahme der IFN β -1a Konzentration. Die IFN- γ Konzentration wurde mittels Standard-ELISA ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte aus drei Experimenten.

IFN: Interferon, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IU: *International Unit*

Tabelle 8: Expression Neurotropher Faktoren und Zytokine *in vitro*

Neurotropher Faktor/ Zytokin [pg/ml]		IFN β -1a [IU/ml]					
		0	100	1000	5000	10000	20000
Nicht aktivierte T-Zellen	BDNF	1347 $\pm$ 23	1296 $\pm$ 193	1281 $\pm$ 153	3944 $\pm$ 2397	2067 $\pm$ 618	1834 $\pm$ 448
	LIF	245 $\pm$ 30	234 $\pm$ 18	235 $\pm$ 32	219 $\pm$ 12	223 $\pm$ 16	221 $\pm$ 6
	NT-3	3589 $\pm$ 92	3285 $\pm$ 287	3212 $\pm$ 55	2982 $\pm$ 175	2825 $\pm$ 182	2665 $\pm$ 60
	IFN-	71 $\pm$ 22	70 $\pm$ 22	71 $\pm$ 16	73 $\pm$ 14	84 $\pm$ 26	58 $\pm$ 18
	IL-2	453 $\pm$ 23	453 $\pm$ 25	460 $\pm$ 29	455 $\pm$ 62	445 $\pm$ 32	466 $\pm$ 44
	IL-4	251 $\pm$ 6	255 $\pm$ 8	236 $\pm$ 29	228 $\pm$ 26	251 $\pm$ 13	195 $\pm$ 25
	IL-10	105 $\pm$ 36	82 $\pm$ 42	83 $\pm$ 43	87 $\pm$ 12	87 $\pm$ 8	79 $\pm$ 8
	IL-13	2470 $\pm$ 191	2096 $\pm$ 123	2043 $\pm$ 220	2073 $\pm$ 325	1950 $\pm$ 298	1956 $\pm$ 83
Aktivierte T-Zellen	BDNF	1150 $\pm$ 534	731 $\pm$ 137	3554 $\pm$ 2160	4222 $\pm$ 871	1338 $\pm$ 6	1928 $\pm$ 927
	LIF	317 $\pm$ 68	291 $\pm$ 55	281 $\pm$ 50	260 $\pm$ 44	246 $\pm$ 28	265 $\pm$ 40
	NT-3	2702 $\pm$ 1337	3479 $\pm$ 57	3419 $\pm$ 99	3214 $\pm$ 1314	3019 $\pm$ 170	2754 $\pm$ 50
	IFN-	5180 $\pm$ 5087	4692 $\pm$ 2797	5900 $\pm$ 1864	2883 $\pm$ 331	1694 $\pm$ 1342	3141 $\pm$ 454
	IL-2	416 $\pm$ 68	442 $\pm$ 65	440 $\pm$ 43	469 $\pm$ 64	406 $\pm$ 8	466 $\pm$ 79
	IL-4	253 $\pm$ 5	275 $\pm$ 10	256 $\pm$ 3	250 $\pm$ 33	266 $\pm$ 15	236 $\pm$ 8
	IL-10	295 $\pm$ 93	164 $\pm$ 37	172 $\pm$ 76	154 $\pm$ 81	198 $\pm$ 25	213 $\pm$ 22
	IL-13	2740 $\pm$ 120	2286 $\pm$ 119	2233 $\pm$ 98	2186 $\pm$ 251	2140 $\pm$ 125	2083 $\pm$ 174

Pg: Pikogramm, ml: Milliliter, IFN: Interferon, IU: *International Unit*, BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, LIF: *Leukemia inhibitory factor*, NT: Neurotrophin, IL: Interleukin.

3.4 Vergleich unbehandelte und behandelte MS-Patienten

3.4.1 Inhibition der BDNF-Expression durch IFN β -1a *in vivo*

Zur Quantifizierung der BDNF-Expression nach einer *in vivo* Behandlung mit IFN β -1a wurden die Seren von 12 Patienten mit RRMS miteinander verglichen. Sechs der Patienten standen unter einer Therapie mit IFN β -1a und sechs waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme unbehandelt. Die durchschnittliche Behandlungsdauer der ersten sechs Patienten lag bei 2.5 Jahren. Vier dieser

Patienten erhielten 22 µg IFN β-1a s. c. 3x pro Woche, die verbliebenen zwei Patienten erhielten 44 µg IFN β-1a s. c. 3x pro Woche. Zweiundzwanzig µg entsprechen 6×10^6 IU. Die Seren aus beiden Patientengruppen wurden einem BDNF Standard-ELISA unterzogen. Der BDNF-Serumspiegel der behandelten Patienten war signifikant niedriger ($p < 0.001$) als der der unbehandelten Patienten (Abb. 20). Es konnte also keine erhöhte Induktion der Expression von BDNF durch eine INF β-1a-Behandlung nachgewiesen werden. Der Mittelwert im Serum lag bei den unbehandelten Patienten bei 21601 pg/ml und bei den behandelten bei 16615 pg/ml.

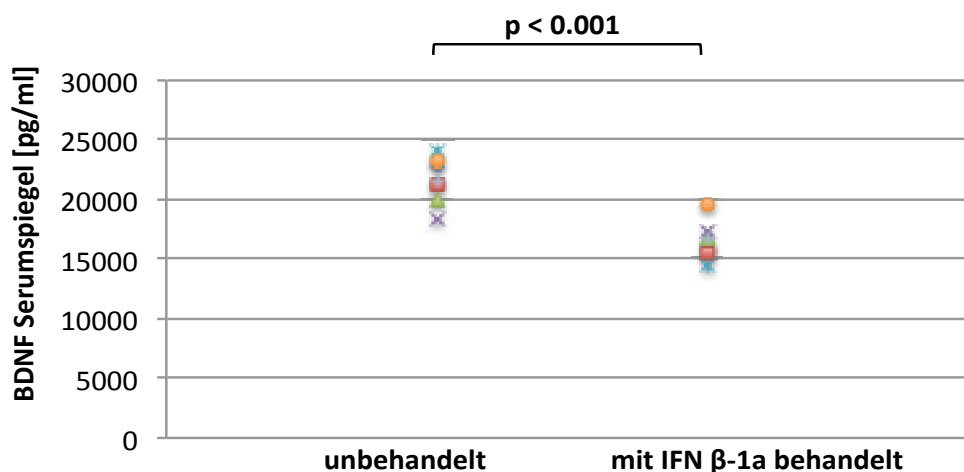


Abb. 20: BDNF Serumspiegel von MS-Patienten, unbehandelt und unter IFN β-1a Therapie

Der BDNF Serumspiegel von $n=6$ unbehandelten und $n=6$ mit IFN β-1a behandelten Patienten mit RRMS wurde mittels Standard-ELISA gemessen. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen *Student-T-Test* berechnet.

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, p: Signifikanzwert, IFN: Interferon.

3.4.2 IFN- γ Serumspegel von MS-Patienten im Vergleich

Für den Nachweis von IFN- γ im Serum unbehandelter und behandelter MS-Patienten wurden dieselben Patientengruppen (n=12), wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, untersucht. Durch den IFN- γ -Standard-ELISA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Seren und mit IFN β -1a behandelten Seren festgestellt werden (Abb. 21). Der Mittelwert für IFN- γ lag bei den unbehandelten Patienten bei 4.562 pg/ml und bei den behandelten bei 4.279 pg/ml.

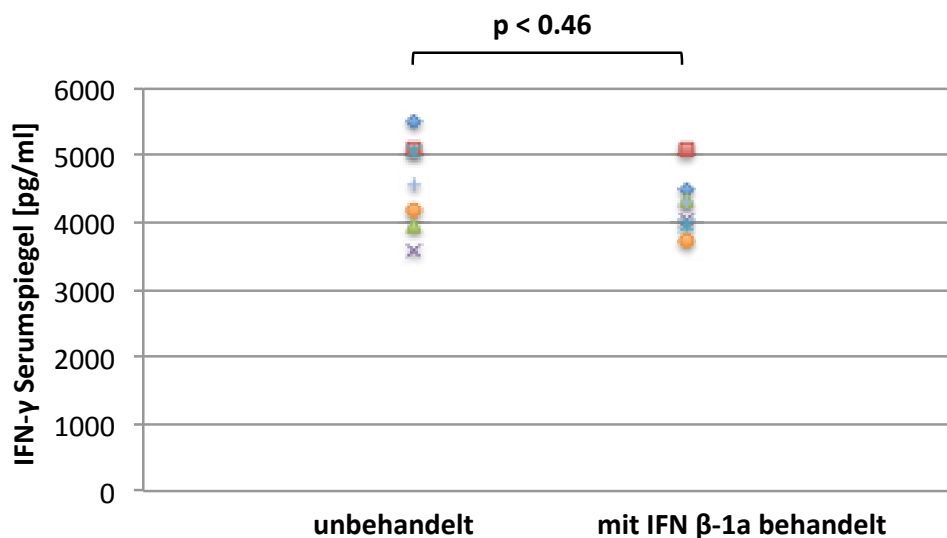


Abb. 21: IFN- γ Serumspegel von MS-Patienten, unbehandelt und unter IFN β -1a Therapie

Der IFN- γ Serumspegel von n=6 unbehandelten und n=6 mit IFN β -1a behandelten Patienten mit RRMS wurde mittels Standard-ELISA gemessen. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen *Student-T-Test* berechnet.

IFN: Interferon, pg: Pikogramm, ml: Milliliter, p: Signifikanzwert.

4. Diskussion

Einer der Grundpfeiler in der Therapie der MS ist die Immunmodulation mit IFN- β -Präparaten. Auch wenn in den letzten Jahren neue Alternativen zur Behandlung zugelassen wurden, ist IFN β -1a aus der Basistherapie der MS nach wie vor nicht wegzudenken. Es verlangsamt erwiesenermaßen die Progression körperlicher Behinderungen, reduziert die Schubrate und senkt die MRT-morphologische Entzündungsaktivität (Rizvi and Agius, 2004). In einer der jüngeren Studien (CARE-MS I), bei der IFN β -1a als Kontrollmedikament untersucht wurde, konnte unter der Behandlung mit 44 μ g IFN β -1a 3x/Woche eine Reduktion der jährlichen Schubrate um 39 % registriert werden. 59 % der Patienten dieser Studie blieben über zwei Jahre schubfrei (Cohen et al., 2012). Dieser Effekt ließ sich auch durch entsprechende Bildgebung bestätigen. So hatten innerhalb der Studie 42 % der Patienten keine neuen oder sich vergrößernden T2-hyperintensenn Läsionen, 73 % keine neuen Gd-anreichernden Läsionen und 69 % keine neuen T1-hypointensen Läsionen. Eine genaue Erklärung dieser Effekte oder eine Klarheit über das vollständige Wirkungsprinzip von IFN β -1a gibt es bis heute nicht. Im Vordergrund der Kenntnisse standen bislang neben der Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 (Rudick et al., 1998) und der Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α (Noronha et al., 1993) die antiproliferatorische Wirkung auf T-Lymphozyten sowie die Stabilisierung der BHS und damit Hemmung der Migration von Immunzellen in das ZNS (Leppert et al., 1996; Sellebjerg and Sørensen, 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in den Proliferationsmessungen eine deutliche Hemmung des T-

Zellwachstums unter der *in vitro* Behandlung mit IFN β -1a gezeigt werden. Insbesondere bei der Anwendung der höheren Konzentration (ab 5000 IU/ml) lag die Proliferation der T-Lymphozyten um fast 50 % niedriger als die der unbehandelten Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Aussagen früherer Arbeiten von Noronha et al., die 1993 eine antiproliferative Wirkung von IFN β -1a in den Konzentrationen ab 1000 IU/ml nachwies. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten weitere Proliferationsmessungen mit Konzentrationen bis maximal 100000 IU/ml. Wiederum konnte eine zunehmende Inhibition des T-Lymphozytenwachstums nachgewiesen werden.

Seit einigen Jahren werden im Zusammenhang mit der Immunmodulation auch neuroprotektive Effekte von Medikamenten diskutiert, die insbesondere auf die Produktion neurotropher Faktoren zurückgeführt werden. In diesem Zusammenhang konnte wiederholt der positive Einfluss von BDNF auf das neuronale Überleben und das Wachstum dendritischer Zellen (Binder and Scharfmann 2004; Hauben et al. 2000) sowie die Induktion des Nachwachsens und der Regeneration von Axonen (Marini et al., 2004) belegt werden. Stadelmann et al. berichteten in ihren Arbeiten außerdem von einer zunehmenden BDNF-Immunreaktivität in MS-Läsionen, reaktiven Astrozyten und Zellen des Immunsystems, wie T-Lymphozyten und Makrophagen, und verschiedenen Neuronenarten des ZNS (Stadelmann et al., 2002). Bereits 2005 stellten Caggiula et al. die Hypothese auf, dass IFN β -1a als Immunmodulator über eine Steigerung der NF-Synthese eine indirekte Wirkung auf die Remyelinisierung ausüben kann. Ihre Studie konnte zeigen, dass MS-Patienten unter einer IFN β -1a Therapie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine signifikant höhere BDNF-Produktion vorweisen (Caggiula et al., 2006). Im

Widerspruch dazu stehen die Arbeiten von Petereit et al. und Sarchielli et al. Sie bezogen Stellung gegen einen Einfluss von IFN β -1a auf die BDNF-Expression *in vitro* und *in vivo* (Petereit et al., 2003; Sarchielli et al., 2007).

Wie auch durch die Untersuchungen von Sarchielli und Kollegen zeigten, die u. a. die Expression von BDNF durch PBL von MS-Patienten unter Therapie mit IFN β -1a gemessen haben, stützt sich auch die vorliegende Arbeit auf den Nachweis der neuroprotektiven Wirkung von BDNF (Sarchielli et al., 2007), induziert durch den Einfluss von IFN β -1a auf T-Lymphozyten. In diesem Zuge erfolgten Analysen zur Quantifizierung der BDNF-Expression durch PBL unter/ohne IFN β -1a Behandlung *in vitro*. Bereits in den ersten Versuchen zeigte sich eine durchgehende basale Ausschüttung von BDNF sowohl durch aktivierte als auch nicht aktivierte - also naive - Zellen. Hier konnte, wie auch schon durch vorhergegangenen Untersuchungen bekräftigt (Caggiula et al., 2005; Sarchielli et al., 2002, 2007), kein signifikanter Unterschied durch eine Aktivierung der PBL nachgewiesen werden. Die *in vitro* Behandlung der T-Lymphozyten mit IFN β -1a induzierte nachweislich die Expression von BDNF. Interessant war vor allem, dass durch die mittleren Konzentrationen 1000 und 5000 IU/ml die Expression noch weiter gesteigert werden konnte. Die Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass IFN β -1a dosisabhängig über die Induktion von BDNF neuroprotektiv wirken kann, jedoch nicht in sehr niedrigen und sehr hohen Konzentrationen.

Aufgrund der *in vivo* Analysen der BDNF-Serumspiegel von MS-Patienten erhärtet sich die Annahme, dass die IFN β -1a-Dosis in der Expression von BDNF eine entscheidende Rolle spielt. Ursprünglich höher erwartete BDNF-Werte konnten durch die ELISA-Untersuchungen allerdings nicht bestätigt werden. Für

die *in vivo* Analyse wurden die BDNF-Serumspiegel von MS-Patienten, die durchschnittlich bereits 2.5 Jahre 3x/Woche 22 bzw. 44 µg IFN β-1a erhalten hatten, mit den Serumspiegeln von Patienten ohne Therapie verglichen. Erwartet wurden, entsprechend der Arbeit von Azoulay, erhöhte BDNF-Serumlevel unter den mit IFN β-1a behandelten Patienten (Azoulay et al., 2005). Die Serumwerte der unbehandelten Patienten lagen in der vorliegenden Untersuchung jedoch entgegen der Annahme signifikant höher ($p < 0.001$) als die der behandelten.

Neben der Expression von BDNF wurde bereits in einigen bekannten Arbeiten auch der Einfluss von IFN β-1a auf andere NF untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden ergänzend NT-3 und LIF betrachtet. NT-3 wird ähnlich wie dem BDNF ein begünstigender Einfluss auf das neuronale Überleben und die Differenzierung dieser, sowie die Regeneration der Neuronen im Rahmen von spinalen Verletzungen zugesprochen (McTigue et al., 1998). Weiterhin wurde belegt, dass Neurotrophine MHC-II-Moleküle in Mikrogliazellen und kostimulierenden Molekülen herunterregulieren (Neumann et al., 1998; Wei and Jonakait, 1999). Zusätzlich können sie die Migration von Monozyten über die BHS regulieren, eine Balance in der Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen herstellen (Flügel et al., 2001) und die Entstehung neuer Hirnläsionen unterdrücken. Ähnlich wird auch die Wirkung von LIF beschrieben. Neben einer Limitierung der autoimmunen Demyelinisierung und des Oligodendrozytenverlust (Butzkueven et al., 2002, 2006) wurde auch der positive Einfluss auf die neuronale Regeneration (Bauer and Patterson, 2006) nachgewiesen. Caggiula und Kollegen untersuchten deshalb in ihren Untersuchungen 2005 neben BDNF u. a. auch die Expression

von NT-3 bei MS-Patienten unter IFN β -1a-Therapie. In ihren Ergebnissen demonstrierten sie eine durch IFN β -1a induzierte Expression mehrerer Neurotrophine (NGF, GDNF, NT3 und NT4) und schlussfolgerten daraus teilweise die klinische Wirksamkeit des IFN (Caggiula et al., 2006). Die Quantifizierungsanalysen der vorliegenden Arbeit können diese Aussage allerdings nicht unterstützen. Es wurde zwar eine hohe Expression von NT-3 durch sowohl aktivierte als auch nicht aktivierte PBL nachgewiesen, jedoch konnte keine wesentliche Induktion in Anwesenheit von IFN β -1a beschrieben werden. Im Gegenteil, es wurde eher ein leichter Rückgang der Expression beobachtet, bei den aktivierten PBL ebenso wie den nicht aktivierten. Zu erwähnen ist jedoch auch, dass es entscheidende Unterschiede in der Untersuchungsmethodik gab. Im Gegensatz zu Caggiula wurden in dieser Arbeit zur Ermittlung der NT-3 und LIF Konzentrationen *in vitro* behandelte PBL von gesunden Probanden verwendet. Es liegen also keine Daten von MS-Patienten vor. Ein wichtiger Aspekt, der nicht außer Acht gelassen werden kann.

Beim ELISA-Verfahren für LIF lagen die Werte sowohl bei den aktivierten als auch den nicht aktivierten PBL unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Daten stimmen mit den bisherigen Erkenntnissen überein, dass LIF im Serum von gesunden Probanden nicht messbar ist (Slaets et al., 2010).

Wie in Kapitel 1 bereits beschrieben wird nach heutiger Kenntnis ein Teil des Pathomechanismus der MS über die Aktivierung einer proinflammatorischen Immunreaktion und die daraus resultierende Destruktion der Myelinscheide erklärt. Eine wichtige Rolle hierbei spielen IFN- γ und die daran gekoppelte Aktivierungskaskade proinflammatorischer Zellen (Kieseier et al., 1999; Morel and Oriss, 1998). IFN- γ reguliert MHC-II-Moleküle auf Endothelzellen und

Astrozyten hoch und bereitet diese auf eine Antigenpräsentation vor (Lapierre et al., 1988; Massa et al., 1987). Außerdem kann es die Transkription von TNF- α steigern und mit diesem synergistisch eine Immunreaktion modulieren (Lapierre et al., 1988). Schon vor einigen Jahren wurde TNF- α in MS-Läsionen nachgewiesen und außerdem bestätigt, dass TNF- α *in vitro* Myelin- und Oligodendrozytenschädigung vermittelt (Selmaj et al., 1991). Daher ist ein Ansatz in der Anwendung von IFN β -1a die Antagonisierung bzw. Hemmung der Synthese von IFN- γ . Noronha und Kollegen konnten bereits 1993 eine Inhibition der IFN- γ Expression in Anwesenheit von IFN β -1a verzeichnen. Die damals *in vitro* verwendete IFN β -1a Konzentration betrug 1000 IU/ml. Der Effekt ließ sich sowohl in den Proben von MS-Patienten als auch den der gesunden Kontrollpersonen nachweisen (Noronha et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit fielen die Ergebnisse ähnlich aus. In der *in vitro* Untersuchung der gesunden Kontrollgruppe konnte ebenfalls erst nach einer T-Zellaktivierung der Einfluss von IFN β -1a demonstriert werden. Mit Steigerung der IFN β -1a-Dosis zeigte sich auch deutlich die Inhibition der IFN- γ -Expression. In der Vergleichsanalyse von MS-Patienten, die unter IFN β -1a-Therapie standen bzw. zum Zeitpunkt der Untersuchung unbehandelt waren, konnte die inhibierende Wirkung von IFN β -1a allerdings nicht bestätigt werden. Beide Patientengruppen hatten einen mit der gesunden Kontrollgruppe vergleichbar hohen IFN- γ Serumspiegel, ein Unterschied zwischen den behandelten und den nicht behandelten Patienten konnte aber nicht dargestellt werden.

Ergänzend wurde auch die Produktion von IL-2 untersucht. IL-2 ist u. a. am Wachstum und der Differenzierung von T- und B-Lymphozyten beteiligt. Bei MS wurde in einigen Studien eine Inhibition der IL-2-Sekretion durch PBL in

Anwesenheit von IFN- β beobachtet (Noronha et al., 1993; Rep et al., 1996). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Zwar wurden die PBL, wie auch in der Arbeit von Noronha und Kollegen, mit ConA aktiviert, die Sekretion von IL-2 lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze der Standard-ELISA. Ein Einfluss durch IFN β -1a konnte also nicht überprüft werden.

Ein weiteres Zytokin, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist IL-13, ein von Th2-Zellen sezerniertes Interleukin mit zentraler Funktion im Bereich antiinflammatorischer Reaktionen. Neu sind die Erkenntnisse u. a. von Shin et al, durch die IL-13 auch eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen wird (Shin et al., 2004). Rossi und Kollegen postulierten genauer noch, dass IL-13 vulnerable Neuronen schützt und neuronalen Verlust verhindert (Rossi et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Produktion von IL-13 durch PBL gesunder Probanden in Anwesenheit von IFN β -1a gemessen. Eine Induktion der Expression durch die *in vitro* Gabe von IFN β -1a konnte jedoch nicht belegt werden. Im Gegenteil, sowohl bei den aktivierten als auch den nicht aktivierten Zellen konnte eine signifikante Abnahme ($p < 0.005$) der IL-13-Produktion mit steigender IFN β -1a-Konzentration verzeichnet werden. Hierzu passend konnten Arbeiten von Kvarnström et al. ebenfalls keinen positiven Effekt auf IL-13 bei MS-Patienten unter IFN β -1a Therapie registrieren (Kvarnström et al., 2013).

Wie auch IL-13 zählen IL-4 und IL-10 zu den Zytokinen vom Th2-Typ und somit zu den antiinflammatorischen Mediatoren des Immunsystems. Beide Zytokine haben eine direkte oder indirekte (über die Herunterregulation der IL-12-

Produktion durch Monozyten) inhibierende Wirkung auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen und können außerdem die Synthese von IFN- γ einschränken (Del Prete et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wieweit die Anwesenheit von IFN β -1a die Produktion von IL-4 und IL-10 beeinflusst. Die Ergebnisse der ELISA für IL-4 (aus Proben von gesunden Probanden) lagen sowohl mit als auch ohne IFN β -1a unterhalb der Nachweisgrenze. IL-10 war in den nicht aktivierten Proben ebenfalls nicht messbar. In den aktivierten Proben konnten niedrige IL-10 Werte gemessen werden ohne einen Einfluss von IFN β -1a zu zeigen. Rep et al. wiesen in den Proben von MS-Patienten einen Anstieg der IL-10 Sekretion durch PBL nach, ein Einfluss auf die IL-4 Sekretion wurde hingegen nicht bestätigt (Rep et al., 1996). Andere Studien berichteten von einer Reduktion von IL-4 (Kvarnström et al., 2013; Schluep et al., 1999) unter einer IFN β -1a-Therapie oder auch einem Anstieg (Rudick et al., 1998).

Insgesamt zeigen die vorliegenden Messungen im Vergleich zur vorliegenden Literatur teils bestätigende, teils widerlegende Ergebnisse. Der antiproliferative und immunmodulierende Einfluss von IFN β -1a wurde unterstützt, der neuroprotektive Effekt über BDNF nur *in vitro* und in einer bestimmten mittleren IFN β -1a-Konzentration. Ein *in vivo* Effekt auf BDNF wurde in signifikantem Maße ebenfalls nachgewiesen, allerdings in umgekehrter Richtung im Vergleich zu der aus den *in vivo* Daten erhobenen Hypothese.

Weitere Untersuchungen sind zur Klärung der Frage eines neuroprotektiven Effektes von IFN β -1a über BDNF und andere Neurotrophine notwendig.

5. Schlussfolgerung

Neben den bisher bekannten Wirkungsmechanismen, einschließlich der Verlagerung einer proinflammatorischen, Th1-gerichteten Immunantwort in Richtung einer antiinflammatorischen Th2-Reaktion und der Modulation des Immunsystems, wäre vor allem die neuroprotektive Wirkung von IFN β -1a ein entscheidender Aspekt für den Einsatz in der MS-Behandlung. IFN β -1a würde sich damit von anderen zur Verfügung stehenden MS-Medikamenten deutlich abheben.

IFN β -1a inhibiert *in vitro* sowohl in mitogen-aktivierten als auch naiven PBL dosisabhängig die T-Zellproliferation.

IFN β -1a induziert *in vitro* sowohl in mitogen-aktivierten als auch nicht aktivierten PBL in einer mittleren Dosis die BDNF-Expression.

In vivo lagen die BDNF-Serumwerte von unbehandelten MS-Patienten signifikant höher als die der Patienten unter IFN β -1a Therapie ($p < 0.001$). Die Dosis von IFN β -1a ist damit entscheidend für eine BDNF-vermittelte neuroprotektive Wirkung.

IFN β -1a führt *in vitro* zu einer Hemmung der IFN- γ Sekretion durch mitogen-aktivierte PBL. *In vivo* konnte eine IFN β -1a vermittelte Reduktion von IFN- γ dagegen nicht bestätigt werden. Die Serumwerte von MS-Patienten mit RRMS unter IFN β -1a-Therapie unterschieden sich nicht signifikant von denen der unbehandelten Patienten. Wieder stellt sich die Frage bezüglich einer optimalen IFN β -1a Dosis.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

Airaksinen, M.S., Saarma, M., 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394.
<https://doi.org/10.1038/nrn812>

Arnason, B.G., Dayal, A., Qu, Z.X., Jensen, M.A., Genç, K., Reder, A.T., 1996. Mechanisms of action of interferon-beta in multiple sclerosis. *Springer Semin. Immunopathol.* 18, 125–148.

Azoulay, D., Vachapova, V., Shihman, B., Miler, A., Karni, A., 2005. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: Reversal by glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol.* 167, 215–218.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.07.001>

Banner, L.R., Moayeri, N.N., Patterson, P.H., 1997. Leukemia inhibitory factor is expressed in astrocytes following cortical brain injury. *Exp. Neurol.* 147, 1–9.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6536>

Bauer, S., Patterson, P.H., 2006. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12089–12099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3047-06.2006>

Binder, D.K., Scharfmann, H.E., 2004. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors Chur Switz.* 22, 123–131.
<https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>

Bothwell, M., 1995. Functional Interactions of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 223–253.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.18.030195.001255>

Burton, J.M., O'Connor, P.W., Hohol, M., Beyene, J., 2012. Oral versus

intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis, in: The Cochrane Collaboration (Ed.), Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Butzkueven, H., Emery, B., Cipriani, T., Marriott, M.P., Kilpatrick, T.J., 2006. Endogenous leukemia inhibitory factor production limits autoimmune demyelination and oligodendrocyte loss. *Glia* 53, 696–703. <https://doi.org/10.1002/glia.20321>

Butzkueven, H., Zhang, J.-G., Soilu-Hanninen, M., Hochrein, H., Chionh, F., Shipham, K.A., Emery, B., Turnley, A.M., Petratos, S., Ernst, M., Bartlett, P.F., Kilpatrick, T.J., 2002. LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat. Med.* 8, 613–619. <https://doi.org/10.1038/nm0602-613>

Caggiula, M., Batocchi, A.P., Frisullo, G., Angelucci, F., Patanella, A.K., Sancricca, C., Nociti, V., Tonali, P.A., Mirabella, M., 2006. Neurotrophic factors in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients during interferon beta therapy. *Clin. Immunol.* 118, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.09.005>

Caggiula, M., Batocchi, A.P., Frisullo, G., Angelucci, F., Patanella, A.K., Sancricca, C., Nociti, V., Tonali, P.A., Mirabella, M., 2005. Neurotrophic Factors and Clinical Recovery in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Scand. J. Immunol.* 62, 176–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01649.x>

Cannella, B., Raine, C.S., 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 37, 424–435. <https://doi.org/10.1002/ana.410370404>

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y.,

Bendelac, A., 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 4647–4650.

Carswell, S.R., 1838. *Pathological Anatomy: Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. Longman, Orme, Brown, Green and Longman.

Chataway, J., Feakes, R., Coraddu, F., Gray, J., Deans, J., Fraser, M., Robertson, N., Broadley, S., Jones, H., Clayton, D., Goodfellow, P., Sawcer, S., Compston, A., 1998. The genetics of multiple sclerosis: principles, background and updated results of the United Kingdom systematic genome screen. *Brain J. Neurol.* 121 (Pt 10), 1869–1887.

Cohen, J.A., Barkhof, F., Comi, G., Izquierdo, G., Khatri, B., Montalban, X., Pelletier, J., Eckert, B., Häring, D.A., Francis, G., 2013. Fingolimod versus intramuscular interferon in patient subgroups from TRANSFORMS - Springer. *J. Neurol.* 260, 2023–2032.

Cohen, J.A., Coles, A.J., Arnold, D.L., Confavreux, C., Fox, E.J., Hartung, H.-P., Havrdova, E., Selmaj, K.W., Weiner, H.L., Fisher, E., Brinar, V.V., Giovannoni, G., Stojanovic, M., Ertik, B.I., Lake, S.L., Margolin, D.H., Panzara, M.A., Compston, D.A.S., 2012. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* 380, 1819–1828. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61769-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61769-3)

Cruveilhier, J., 1835. *Anatomie pathologique du corps humain description, avec figures lithographiées et coloriées, des diverses altérations morbides dont le corps humain est susceptible*. 2, [EST-INT]. J.B. Baillière, Paris.

de Vries, J.E., 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and

inflammatory responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 165–169.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E., 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209–1220.

Del Prete, G., Maggi, E., Romagnani, S., 1994. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 70, 299–306.

Devonshire, V., Havrdova, E., Radue, E.W., O'Connor, P., Zhang-Auberson, L., Agoropoulou, C., Häring, D.A., Francis, G., Kappos, L., 2012. Relapse and disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: subgroup analyses of the double-blind, randomised, placebo-controlled FREEDOMS study. *Lancet Neurol.* 11, 420–428. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70056-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70056-X)

Doherty, T.M., Kastelein, R., Menon, S., Andrade, S., Coffman, R.L., 1993. Modulation of murine macrophage function by IL-13. *J. Immunol. Baltim. Md* 151, 7151–7160.

Dowsing, B.J., Romeo, R., Morrison, W.A., 2001. Expression of leukemia inhibitory factor in human nerve following injury. *J. Neurotrauma* 18, 1279–1287. <https://doi.org/10.1089/089771501317095313>

Ebers, G.C., Kukay, K., Bulman, D.E., Sadovnick, A.D., Rice, G., Anderson, C., Armstrong, H., Cousin, K., Bell, R.B., Hader, W., Paty, D.W., Hashimoto, S., Oger, J., Duquette, P., Warren, S., Gray, T., O'Connor, P., Nath, A., Auty, A., Metz, L., Francis, G., Paulseth, J.E., Murray, T.J., Pryse-Phillips, W., Nelson, R., Freedman, M., Brunet, D., Bouchard, J.P., Hinds, D., Risch, N., 1996. A full

genome search in multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 13, 472–476.
<https://doi.org/10.1038/ng0896-472>

Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C., Brochet, B., Berry, I., Rolland, Y., Froment, J.C., 1997. 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* 62, 112–118.

Endo, T., Ogushi, F., Sone, S., 1996. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md* 156, 2240–2246.

Enk, A.H., Angeloni, V.L., Udey, M.C., Katz, S.I., 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md* 151, 2390–2398.

Filippi, M., Rovaris, M., Rocca, M., 2001. Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into “black holes”. *Neurology* 57, 731–733.

Filippi, M., Wolinsky, J.S., Comi, G., CORAL Study Group, 2006. Effects of oral glatiramer acetate on clinical and MRI-monitored disease activity in patients with relapsing multiple sclerosis: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 213–220.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70327-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70327-1)

Flügel, A., Matsumuro, K., Neumann, H., Klinkert, W.E., Birnbacher, R., Lassmann, H., Otten, U., Wekerle, H., 2001. Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur. J. Immunol.* 31, 11–22.

Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., Koyasu, S., 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22, 556–560.

Fukao, T., Frucht, D.M., Yap, G., Gadina, M., O'Shea, J.J., Koyasu, S., 2001. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 4446–4455.

Fukao, T., Matsuda, S., Koyasu, S., 2000. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 64–71.

García-Tuñón, I., Ricote, M., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R., Royuela, M., 2003. Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) in in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res.* 6, R1.

Genç, K., Dona, D.L., Reder, A.T., 1997. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J. Clin. Invest.* 99, 2664–2671. <https://doi.org/10.1172/JCI119455>

Gordon, J., Maclean, L.D., 1965. A Lymphocyte-stimulating Factor produced in vitro. *Nature* 208, 795–796. <https://doi.org/10.1038/208795a0>

Haas, J., Firzlaff, M., 2005. Twenty-four-month comparison of immunomodulatory treatments – a retrospective open label study in 308 RRMS patients treated with beta interferons or glatiramer acetate (Copaxone®). *Eur. J. Neurol.* 12, 425–431. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2005.00936.x>

Haas, J., Maas-Enriquez, M., Hartung, H.-P., 2005. Intravenous immunoglobulins in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis--

results of a retrospective multicenter observational study over five years. *Mult. Scler.* Houndmills Basingstoke Engl. 11, 562–567.

Hamamcioglu, K., Reder, A., 2007. Interferon-beta regulates cytokines and BDNF: greater effect in relapsing than in progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.* <https://doi.org/10.1177/1352458506069672>

Hartung, H.-P., Gonsette, R., König, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *The Lancet* 360, 2018–2025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)12023-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)12023-X)

Hauben, E., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I.R., Schwartz, M., 2000. Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *The Lancet* 355, 286–287.

Hemmer, B., Archelos, J.J., Hartung, H.-P., 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 291–301. <https://doi.org/10.1038/nrn784>

Hemmer, B., Kieseier, B., Cepok, S., Hartung, H.-P., 2003. New immunopathologic insights into multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 3, 246–255.

Hershey, G.K.K., 2003. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 677–690; quiz 691.

Hilton, D.J., 1992. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem. Sci.* 17, 72–76.

Hohlfeld, R., 1997. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120, 865–916.

Hohlfeld, R., Kerschensteiner, M., Meinl, E., 2007. Dual role of inflammation in

CNS disease. *Neurology* 68, S58–S63.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y.-A., 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339–341.
<https://doi.org/10.1038/344339a0>

Holter, W., Majdic, O., Kalthoff, F.S., Knapp, W., 1992. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 2765–2767. <https://doi.org/10.1002/eji.1830221047>

Huang, Y.M., Stoyanova, N., Jin, Y.P., Teleshova, N., Hussien, Y., Xiao, B.G., Fredrikson, S., Link, H., 2001. Altered phenotype and function of blood dendritic cells in multiple sclerosis are modulated by IFN-beta and IL-10. *Clin. Exp. Immunol.* 124, 306–314.

Ip, N.Y., 1998. The neurotrophins and neuropoietic cytokines: two families of growth factors acting on neural and hematopoietic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 97–106.

Jacobs, L., O'Malley, J., Freeman, A., Ekes, R., 1981. Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science* 214, 1026–1028.

Kalinowska-Łyszczarz, A., Pawlak, M.A., Michalak, S., Paprzycki, W., Losy, J., 2011. Immune cell NT-3 expression is associated with brain atrophy in multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 240–241, 109–113.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.10.002>

Kappos, L., Edan, G., Freedman, M.S., Montalban, X., Hartung, H.-P., Hemmer, B., Fox, E.J., Barkhof, F., Schippling, S., Pleimes, D., Pohl, C., Sandbrink, R., Suarez, G., Wicklein, E.-M., 2016. The 11-year long-term follow-up study from the randomized BENEFIT CIS trial. *Neurology* 87, 978–987.

Kappos, L., Freedman, M.S., Polman, C.H., Edan, G., Hartung, H.-P., Miller, D.H., Montalbán, X., Barkhof, F., Radü, E.-W., Bauer, L., Dahms, S., Lanius, V., Pohl, C., Sandbrink, R., 2007. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *The Lancet* 370, 389–397. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61194-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61194-5)

Kasakura, S., Lowenstein, L., 1965. A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte cultures. *Nature* 208, 794–795.

Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1994. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 3559–3569.

Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E.F., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.-L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 1999. Activated Human T Cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865–870.

Khan, O.A., Tselis, A.C., Kamholz, J.A., Garbern, J.Y., Lewis, R.A., Lisak, R.P., 2001. A prospective, open-label treatment trial to compare the effect of IFN β -1a (Avonex), IFN β -1b (Betaseron), and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 8, 141–148. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00189.x>

Kieseier, B.C., Seifert, T., Giovannoni, G., Hartung, H.P., 1999. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology* 53, 20–25.

KKNMS, 2014. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose.

Klotz, L., Gold, R., Hemmer, B., Korn, T., Zipp, F., Hohlfeld, R., Kieseier, B.C., Wiendl, H., 2011. Diagnostik der Multiplen Sklerose 2010 Revision der McDonald-Kriterien. *Nervenarzt* 82, 1302–1309.
<https://doi.org/10.1007/s00115-011-3283-x>

Knobler, R.L., Panitch, H.S., Braheny, S.L., Sipe, J.C., Rice, G.P., Huddlestone, J.R., Francis, G.S., Hooper, C.K., Kamin-Lewis, R.M., Johnson, K.P., 1984. Systemic alpha-interferon therapy of multiple sclerosis. *Neurology* 34, 1273–1279.

Koch-Henriksen, N., Sørensen, P.S., 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 9, 520–532.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8)

Kotzamani, D., Panou, T., Mastorodemos, V., Tzagournissakis, M., Nikolakaki, H., Spanaki, C., Plaitakis, A., 2012. Rising incidence of multiple sclerosis in females associated with urbanization. *Neurology* 78, 1728–1735.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31825830a9>

Krause, S., Behrends, J., Borowski, A., Lohrmann, J., Lang, S., Myrtek, D., Lorenzen, T., Virchow, J.C., Luttmann, W., Friedrich, K., 2006. Blockade of interleukin-13-mediated cell activation by a novel inhibitory antibody to human IL-13 receptor alpha1. *Mol. Immunol.* 43, 1799–1807.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.11.001>

Kurek, J.B., Bennett, T.M., Bower, J.J., Muldoon, C.M., Austin, L., 1998. Leukaemia inhibitory factor (LIF) production in a mouse model of spinal trauma. *Neurosci. Lett.* 249, 1–4.

Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an

expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452.

Kvarnström, M., Ydrefors, J., Ekerfelt, C., Vrethem, M., Ernerudh, J., 2013. Longitudinal interferon- β effects in multiple sclerosis: Differential regulation of IL-10 and IL-17A, while no sustained effects on IFN- γ , IL-4 or IL-13. *J. Neurol. Sci.* 325, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.12.001>

Lapierre, L.A., Fiers, W., Pober, J.S., 1988. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression. Interactions with immune gamma interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leukocyte alpha and fibroblast beta interferons. *J. Exp. Med.* 167, 794–804.

Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C., 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 7, 115–121. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(00\)01909-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(00)01909-2)

Lassmann, H., Reindl, M., Rauschka, H., Berger, J., Aboul-Enein, F., Berger, T., Zurbriggen, A., Lutterotti, A., Brück, W., Weber, J.R., Ullrich, R., Schmidbauer, M., Jellinger, K., Vandeveld, M., 2003. A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 126, 1347–1357. <https://doi.org/10.1093/brain/awg127>

Leppert, D., Waubant, E., Bürk, M.R., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 1996. 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.* 40, 846–852. <https://doi.org/10.1002/ana.410400606>

Lewin, G.R., Barde, Y.A., 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 289–317. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001445>

Lu, B., 2004. Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. *Prog.*

Brain Res. 146, 137–150.

Lu, H.T., Riley, J.L., Babcock, G.T., Huston, M., Stark, G.R., Boss, J.M., Ransohoff, R.M., 1995. 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.* 182, 1517–1525.

Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907–911.

Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707–717.

Lühder, F., Gold, R., Flügel, A., Linker, R.A., 2013. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuroimmunology: Lessons Learned from Multiple Sclerosis Patients and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Models. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 61, 95–105. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0211-0>

Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D., 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446–1451.

Marini, A.M., Jiang, X., Wu, X., Tian, F., Zhu, D., Okagaki, P., Lipsky, R.H., 2004. Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor. Neurol. Neurosci.* 22, 121–130.

Mashayekhi, F., Salehi, Z., 2011. Expression of leukemia inhibitory factor in the

cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Neurosci.* 18, 951–954. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.12.031>

Massa, P.T., Ter Meulen, V., Fontana, A., 1987. Hyperinducibility of Ia antigen on astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4219–4223.

McAlpine, D., Compston, A., 2005. *McAlpine's multiple sclerosis*. Churchill Livingstone/Elsevier, [Edinburgh]; Philadelphia, PA.

McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.-P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., Van Den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121–127. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>

McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121–127.

McFarlin, D.E., Lachmann, P.J., 1989. Multiple sclerosis. Hopeful genes and immunology. *Nature* 341, 693–694. <https://doi.org/10.1038/341693a0>

McKenzie, A.N., Culpepper, J.A., Malefyt, R. de W., Brière, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S., 1993. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3735–3739. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3735>

McTigue, D.M., Horner, P.J., Stokes, B.T., Gage, F.H., 1998. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 5354–5365.

McTigue, D.M., Horner, P.J., Stokes, B.T., Gage, F.H., 1998. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 18, 5354–5365.

Metcalf, D., 2003. The Unsolved Enigmas of Leukemia Inhibitory Factor. *STEM CELLS* 21, 5–14. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-5>

Miller, D.H., Hammond, S.R., McLeod, J.G., Purdie, G., Skegg, D.C., 1990. Multiple sclerosis in Australia and New Zealand: are the determinants genetic or environmental? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 53, 903–905.

Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P.A., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., O'Connor, P.W., 2003. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 348, 15–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020696>

Montalban, X., Tintoré, M., Swanton, J., Barkhof, F., Fazekas, F., Filippi, M., Frederiksen, J., Kappos, L., Palace, J., Polman, C., Rovaris, M., de Stefano, N., Thompson, A., Yousry, T., Rovira, A., Miller, D.H., 2010. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 74, 427–434. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181cec45c>

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.

Morel, P.A., Oriss, T.B., 1998. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit.*

Rev. Immunol. 18, 275–303.

Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG), 2008. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: Current therapeutic recommendations. J. Neurol. 255, 1449–1463.
<https://doi.org/10.1007/s00415-008-0061-1>

Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG), 2004. Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose. Nervenarzt 1, S1.

Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5779–5784.

Noronha, A., Toscas, A., Jensen, M.A., 1993. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 46, 145–153.

Noronha, A., Toscas, A., Jensen, M.A., 1993. Interferon β decreases T cell activation and interferon γ production in multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 46, 145–153.

Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple Sclerosis. N. Engl. J. Med. 343, 938–952.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431307>

Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., Barcellos, L.F., Hauser, S.L., 2001. Multiple sclerosis: Genomic rewards. J. Neuroimmunol. 113, 171–184.
[https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00444-6](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00444-6)

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., Johnson, K.P., 1987. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. Neurology 37, 1097–1102.

Pencea, V., Bingaman, K.D., Wiegand, S.J., Luskin, M.B., 2001. Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Lateral Ventricle of the Adult Rat Leads to New Neurons in the Parenchyma of the Striatum, Septum, Thalamus, and Hypothalamus. *J. Neurosci.* 21, 6706–6717.

Petereit, H., Lindemann, H., Schoppe, S., 2003. Effect of immunomodulatory drugs on <i>in vitro</i> production of brain-derived neurotrophic factor. *Mult. Scler.* 9, 16–20. <https://doi.org/10.1191/1352458503ms869oa>

Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354, 899–910. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044397>

Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>

Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann. Neurol.* 58, 840–846. <https://doi.org/10.1002/ana.20703>

Pugliatti, M., Sotgiu, S., Rosati, G., 2002. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 104, 182–191.

[https://doi.org/10.1016/S0303-8467\(02\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S0303-8467(02)00036-7)

Racke, M.K., Bonomo, A., Scott, D.E., Cannella, B., Levine, A., Raine, C.S., Shevach, E.M., Röcken, M., 1994. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 180, 1961–1966.

Reiber, H., 1998. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult. Scler.* 4, 99–107.

Rep, M.H.G., Hintzen, R.Q., Polman, C.H., van Lier, R.W., 1996. Recombinant Interferon- β blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J. Neuroimmunol.* 67, 111–118.

[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(96\)00060-4](https://doi.org/10.1016/0165-5728(96)00060-4)

Rieckmann, P., Toyka, K.V., Bassetti, C., Beer, K., Beer, S., Buettner, U., Chofflon, M., Götschi-Fuchs, M., Hess, K., Kappos, L., Kesselring, J., Goebels, N., Ludin, H.-P., Mattle, H., Schluep, M., Vaney, C., Baumhackl, U., Berger, T., Deisenhammer, F., Fazekas, F., Freimüller, M., Kollegger, H., Kristoferitsch, W., Lassmann, H., Markut, H., Strasser-Fuchs, S., Vass, K., Altenkirch, H., Bamborschke, S., Baum, K., Benecke, R., Brück, W., Dommasch, D., Elias, W.G., Gass, A., Gehlen, W., Haas, J., Haferkamp, G., Hanefeld, F., Hartung, H.-P., Heesen, C., Heidenreich, F., Heitmann, R., Hemmer, B., Hense, T., Hohlfeld, R., Janzen, R.W.C., Japp, G., Jung, S., Jügel, E., Koehler, J., Kölmel, W., König, N., Lowitzsch, K., Manegold, U., Melms, A., Mertin, J., Oschmann, P., Petereit, H.-F., Pette, M., Pöhlau, D., Pohl, D., Poser, S., Sailer, M., Schmidt, S., Schock, G., Schulz, M., Schwarz, S., Seidel, D., Sommer, N., Stangel, M., Stark, E., Steinbrecher, A., Tumani, H., Voltz, R., Weber, F., Weinrich, W., Weissert, R., Wiendl, H., Wiethölter, H., Wildemann, U., Zettl, U.K., Zipp, F., Zschenderlein, R., Izquierdo, G., Kirjazovas, A., Packauskas, L., Miller, D., Koncan Vracko, B.,

- Millers, A., Orologas, A., Panellus, M., Sindic, C.J.M., Bratic, M., Svraka, A., Vella, N.R., Stelmasiak, Z., Selmaj, K., Bartosik-Psujik, H., Mitosek-Szewczyk, K., Belniak, E., Mochecka, A., Bayas, A., Chan, A., Flachenecker, P., Gold, R., Kallmann, B., Leussink, V., Mäurer, M., Ruprecht, K., Stoll, G., Weilbach, F.X., 2004. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application. *J. Neurol.* 251, 1329–1339. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0537-6>
- Rizvi, S.A., Agius, M.A., 2004. Current approved options for treating patients with multiple sclerosis. *Neurology* 63, S8-14.
- Rossi, S., Mancino, R., Bergami, A., Mori, F., Castelli, M., De Chiara, V., Studer, V., Mataluni, G., Sancesario, G., Parisi, V., Kusayanagi, H., Bernardi, G., Nucci, C., Bernardini, S., Martino, G., Furlan, R., Centonze, D., 2011. Potential role of IL-13 in neuroprotection and cortical excitability regulation in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 17, 1301–1312. <https://doi.org/10.1177/1352458511410342>
- Rovaris, M., Comi, G., Filippi, M., 2005. Can glatiramer acetate reduce brain atrophy development in multiple sclerosis? *J. Neurol. Sci.* 233, 139–143.
- Rovira, A., Swanton, J., Tintoré, M., Huerga, E., Barkhof, F., Filippi, M., Frederiksen, J.L., Langkilde, A., Miszkiel, K., Polman, C., Rovaris, M., Sastre-Garriga, J., Miller, D., Montalban, X., 2009. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 66, 587–592. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.49>
- Rudick, R.A., Cutter, G., Reingold, S., 2002. The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sclerosis trials. *Mult. Scler.* 8, 359–365.
- Rudick, R.A., Ransohoff, R.M., Lee, J.C., Pepler, R., Yu, M., Mathisen, P.M.,

- Tuohy, V.K., 1998. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1294–1300.
- Rudick, R.A., Stuart, W.H., Calabresi, P.A., Confavreux, C., Galetta, S.L., Radue, E.-W., Lublin, F.D., Weinstock-Guttman, B., Wynn, D.R., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354, 911–923.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa044396>
- Ruggieri, M., Polizzi, A., Pavone, L., Grimaldi, L.M., 1999. Multiple sclerosis in children under 6 years of age. *Neurology* 53, 478–484.
- Sadovnick, A.D., Baird, P.A., Ward, R.H., 1988. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am. J. Med. Genet.* 29, 533–541.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320290310>
- Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 1993. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 20, 17–29.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Sarchielli, P., Greco, L., Stipa, A., Floridi, A., Gallai, V., 2002. Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 132, 180–188.
- Sarchielli, P., Zaffaroni, M., Floridi, A., Greco, L., Candelieri, A., Mattioni, A., Tenaglia, S., Di Filippo, M., Calabresi, P., 2007. Production of brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon- β 1a, and high doses of immunoglobulins. *Mult. Scler.* 13, 313–331.

- Sawcer, S., Jones, H.B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N., Chataway, J., Robertson, N., Clayton, D., Goodfellow, P.N., Compston, A., 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat. Genet.* 13, 464–468. <https://doi.org/10.1038/ng0896-464>
- Schluep, M., van Melle, G., Henry, H., Städler, C., Roth-Wicky, B., Magistretti, P.J., 1999. Assessing multiple sclerosis activity: is the in vitro production of tumor necrosis factor-alpha, interleukins 2, 6, 4, and 10, and immunoglobulin G of value? *J. Neurol.* 246, 1041–1050.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- Schuhmann, B., Dietrich, A., Sel, S., Hahn, C., Klingenspor, M., Lommatzsch, M., Gudermann, T., Braun, A., Renz, H., Nockher, W.A., 2005. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J. Neuroimmunol.* 163, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.01.023>
- Sela, M., 1999. The concept of specific immune treatment against autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 18, 201–216.
- Sellebjerg, F., Sørensen, T.L., 2003. Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 61, 347–355.
- Selmaj, K., Raine, C.S., Farooq, M. t, Norton, W.T., Brosnan, C.F., 1991. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J. Immunol.* 147, 1522–1529.
- Sen, G.C., 2001. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 255–281. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.255>

- Sharief, M.K., Semra, Y.K., Seidi, O.A., Zoukos, Y., 2001. Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 120, 199–207.
- Shevach, E.M., 2009. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
- Shin, W.H., Lee, D.-Y., Park, K.W., Kim, S.U., Yang, M.-S., Joe, E.-H., Jin, B.K., 2004. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. *Glia* 46, 142–152. <https://doi.org/10.1002/glia.10357>
- Sivieri, S., Ferrarini, A.M., Gallo, P., 1998. Multiple sclerosis: IL-2 and sIL-2R levels in cerebrospinal fluid and serum. Review of literature and critical analysis of ELISA pitfalls. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 4, 7–11.
- Skegg, D.C., Corwin, P.A., Craven, R.S., Malloch, J.A., Pollock, M., 1987. Occurrence of multiple sclerosis in the north and south of New Zealand. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50, 134–139.
- Skowron-zwarg, M., Boland, S., Caruso, N., Coraux, C., Marano, F., Tournier, F., 2007. Interleukin-13 interferes with CFTR and AQP5 expression and localization during human airway epithelial cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 313, 2695–2702. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.035>
- Slaets, H., Hendriks, J.J.A., Stinissen, P., Kilpatrick, T.J., Hellings, N., 2010. Therapeutic potential of LIF in multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* 16, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.08.007>
- Sorensen, P.S., Fazekas, F., Lee, M., 2002. Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 9, 557–563.

- Stadelmann, C., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Brück, W., Hohlfeld, R., Lassmann, H., 2002. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125, 75–85. <https://doi.org/10.1093/brain/awf015>
- Swanton, J.K., Rovira, A., Tintore, M., Altmann, D.R., Barkhof, F., Filippi, M., Huerga, E., Miskiel, K.A., Plant, G.T., Polman, C., Rovaris, M., Thompson, A.J., Montalban, X., Miller, D.H., 2007. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol.* 6, 677–686. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70176-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70176-X)
- T. Hein, W.Hopfenmüller., 2012. Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland 71, 288–294.
- Teitelbaum, D., Fridkis-Hareli, M., Arnon, R., Sela, M., 1996. Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses. *J. Neuroimmunol.* 64, 209–217. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(95\)00180-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(95)00180-8)
- Teitelbaum, D., Sela, M., Arnon, R., 1997. Copolymer 1 from the laboratory to FDA. *Isr. J. Med. Sci.* 33, 280–284.
- Teitelbaum, D., Webb, C., Meshorer, A., Arnon, R., Sela, M., 1972. Protection against experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 240, 564–566.
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., Fujihara, K., Galetta, S.L., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Marrie, R.A., Miller, A.E., Miller, D.H., Montalban, X., Mowry, E.M., Sorensen, P.S., Tintoré, M., Traboulsee, A.L., Trojano, M., Uitdehaag, B.M.J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinshenker, B.G.,

- Reingold, S.C., Cohen, J.A., 2017. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Tubridy, N., Behan, P.O., Capildeo, R., Chaudhuri, A., Forbes, R., Hawkins, C.P., Hughes, R.A., Palace, J., Sharrack, B., Swingler, R., Young, C., Moseley, I.F., MacManus, D.G., Donoghue, S., Miller, D.H., 1999. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology* 53, 466–472.
- Tur, C., Tintoré, M., Rovira, A., Nos, C., Río, J., Téllez, N., Galán, I., Perkal, H., Comabella, M., Sastre-Garriga, J., 2008. Very early scans for demonstrating dissemination in time in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 14, 631–635.
- van Boxel-Dezaire, A.H., Hoff, S.C., van Oosten, B.W., Verweij, C.L., Dräger, A.M., Adèr, H.J., van Houwelingen, J.C., Barkhof, F., Polman, C.H., Nagelkerken, L., 1999. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 45, 695–703.
- Vanderlocht, J., Hellings, N., Hendriks, J.J.A., Vandenabeele, F., Moreels, M., Buntinx, M., Hoekstra, D., Antel, J.P., Stinissen, P., 2006. Leukemia inhibitory factor is produced by myelin-reactive T cells from multiple sclerosis patients and protects against tumor necrosis factor-alpha-induced oligodendrocyte apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 83, 763–774. <https://doi.org/10.1002/jnr.20781>
- Warnke, C., Hörste, G.M.Z., Menge, T., Stüve, O., Hartung, H.-P., Wiendl, H., Kieseier, P.D.B.C., 2013. Teriflunomid zur Behandlung der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 84, 724–731. <https://doi.org/10.1007/s00115-013-3779-7>
- Wei, R., Jonakait, G.M., 1999. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents

interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J. Neuroimmunol.* 95, 8–18.

Weinshenker, B.G., Bass, B., Rice, G.P.A., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C., 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study I. Clinical course and disability. *Brain* 112, 133–146.

Willer, C.J., Ebers, G.C., 2000. Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. *Curr. Opin. Neurol.* 13, 241–247.

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K., 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3400–3407.

Zang, Y.C., Yang, D., Hong, J., Tejada-Simon, M.V., Rivera, V.M., Zhang, J.Z., 2000. Immunoregulation and blocking antibodies induced by interferon beta treatment in MS. *Neurology* 55, 397–404.

Ziemssen, T., Kümpfel, T., Klinkert, W.E., Neuhaus, O., Hohlfeld, R., 2002a. Glatiramer acetate-specific T-helper 1-and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain* 125, 2381–2391.

Ziemssen, T., Kümpfel, T., Klinkert, W.E.F., Neuhaus, O., Hohlfeld, R., 2002b. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain-derived neurotrophic factor. Brain J. Neurol.* 125, 2381–2391.

Ziemssen, T., Neuhaus, O., Hohlfeld, R., 2001. Risk-benefit assessment of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Drug Saf. Int. J. Med. Toxicol. Drug Exp.* 24, 979–990.

7. **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

- Abb. 1: Praktisches Vorgehen bei Verdacht auf MS: Empfehlungen in
 Deutschland
- Abb. 2: Verlaufsformen der MS (Lublin et Reingold, 1996)
- Abb. 3: Stufentherapie der MS
- Abb. 4: BDNF im Prozess der autoimmunen Demyelinisierung
- Abb. 5: Zellgewinnung im Zentrifugationsröhrchen
- Abb. 6: Standardreihe zum Erstellen einer Kalibrierungskurve
- Abb. 7: Steigerung der Proliferation durch mitogene T-Zellaktivierung
- Abb. 8: Proliferation mitogenaktivierter T-Lymphozyten *in vitro*
- Abb. 9: Inhibition der Proliferation *in vitro* durch Interferon β -1a
- Abb. 10: Inhibition der Proliferation *in vitro* durch IFN β -1a in höheren
 Konzentrationen
- Abb. 11: Stimulationsindexkurve der Inhibition der Proliferation durch IFN β -
 1a
- Abb. 12: Inhibition der Proliferation *in vitro* durch IFN β -1a in höheren
 Konzentrationen
- Abb. 13: IFN β -1a induzierte Expression von BDNF durch aktivierte T-Zellen
- Abb. 14: IFN β -1a induzierte Expression von BDNF durch nicht aktivierte T-
 Zellen
- Abb. 15: Kinetik der BDNF-Expression durch aktivierte T-Zellen unter IFN β -1a
 Gabe *in vitro*
- Abb. 16: Kinetik der BDNF-Expression durch nicht aktivierte T-Zellen unter IFN
 β -1a-Gabe *in vitro*

Abb. 17: Abnahme der NT-3 Expression unter IFN β -1a Behandlung *in vitro*

Abb. 18: Expression von IL-13 durch T-Zellen unter der Gabe von IFN β -1a *in vitro*

Abb. 19: IFN- γ Expression unter der Gabe von IFN β -1a

Abb. 20: BDNF Serumspiegel von MS-Patienten, unbehandelt und unter IFN β -1a Therapie

Abb. 21: IFN- γ Serumspiegel von MS-Patienten, unbehandelt und unter IFN β -1a Therapie

Tabelle 1: McDonald-Kriterien 2010 der RRMS

Tabelle 2: MS-Diagnose nach den McDonald-Kriterien bei PPMS

Tabelle 3: Zugelassene Medikamente für die Immuntherapie der MS

Tabelle 4: Charakteristika der MS-Patienten und gesunden Probanden

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Medien

Tabelle 6: Verwendete ELISA Kits

Tabelle 7: Verwendetes Material und Geräte

Tabelle 8: Expression Neurotropher Faktoren und Zytokine *in vitro*

Danksagung

Vor allem gilt mein Dank meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. Oliver Neuhaus. Er stand meiner Dissertation seit den ersten Arbeitsstunden im Labor zur Seite und war mit seiner unermüdlichen Unterstützung und fachlichen Begleitung maßgeblich für die endgültige Fertigstellung verantwortlich.

Ich danke außerdem meinem ersten Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Hartung für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mit der Anfertigung meiner Promotionsarbeit beginnen zu dürfen.

Weiterhin danke ich meinen lieben Freundinnen, die mir seit dem Studium zur Seite stehen, insbesondere Dr. Carolin Pelzer für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und ständige Motivation.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie. Meinen Eltern, Marghalay und Dr. Sultan Mangal, denen ich unendlich dankbar bin für ihre grenzenlose Fürsorge. Sie ermöglichten mir das Studium und unterstützten mich all die Jahre, vor allem auch moralisch. Meinen Brüdern Adjmal und Dr. Yama Mangal, und meinen Schwiegereltern Shafigha und Rahim Karmand, die jeder auf ihre Art einen großen Teil zum Ganzen beigetragen haben.

Tief verbunden und dankbar bin ich besonders meinem besten Freund, unersetzbaren Lebensbegleiter und lieben Ehemann Khesraw Karmand. Ich danke, für die unendliche Geduld, die liebevolle Motivation und den ständigen Rückhalt in jeder Phase unseres Lebens.