

Aus der  
Neurologischen Universitätsklinik  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Balance pro-inflammatorischer und trophischer Faktoren bei Patienten mit Multipler  
Sklerose im akuten Schub

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

|               |                 |
|---------------|-----------------|
| vorgelegt von | Sarah Hassinger |
| aus           | Zweibrücken     |
| Magdeburg     | 2011            |

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

Hassinger, Sarah:

Die Balance pro-inflammatorischer und trophischer Faktoren bei Patienten mit Multipler Sklerose im akuten Schub.- 2011.- 76 Bl., 25 Abb., 3 Tab., keine Anl.

### Kurzreferat

Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) bei jungen Erwachsenen. Die MS ist eine Autoimmunerkrankung, bei der aktivierte T-Zellen eine Entzündungskaskade auslösen, die vor allem Oligodendrozyten, aber auch Axone schädigt. Hierbei spielen die zytotoxische Wirkung des Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) eine große Rolle. Als Gegenspieler dieser gewebsschädigenden Faktoren könnten während der akuten Entzündung sezernierte trophische Faktoren, wie ciliary neurotrophic factor (CNTF) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF), dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CNTF, BDNF, TNF  $\alpha$  und iNOS sowie MHC Klasse I in frisch isolierten peripheren mononukleären Zellen (MNZ) von MS Patienten und gesunden Probanden mittels FACS-Analyse untersucht. Dafür wurden MNZ bei Patienten im akuten Schub vor Schubtherapie mit Methylprednisolon, am Tag 4 nach dreitägiger Methylprednisolon-Therapie und am Tag 30 nach Schubbeginn analysiert.

Die Expression von CNTF konnte hier erstmals in Leukozyten gesunder Probanden und von MS-Patienten nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass CNTF der schädigenden Wirkung von TNF $\alpha$  entgegenwirken kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von TNF $\alpha$  im akuten Schub erhöht ist. Die CNTF-Expression steigt nach Glukokortikoidgabe signifikant an. Dies weist auf eine möglicherweise regenerationsfördernde Wirkung von Glukokortikoiden hin. Unter Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )-Therapie konnten zusätzlich erhöhte BDNF-Werte nachgewiesen werden. Jedoch erhöht IFN- $\beta$  auch die Expression von iNOS und MHC I. Dies demonstriert das facettenreiche immunmodulatorische Potential von IFN- $\beta$ . Außerdem wurden Interaktionen zwischen der Glukokortikoid- und der IFN- $\beta$ -Therapie festgestellt. Um das sowohl neuroprotektive als auch remyelinisierende Potential immunmodulatorischer Therapien zu unterstützen, sollten diese Interaktionen weiter untersucht werden.

### Schlüsselwörter

MS, akuter Schub, CNTF, BDNF, TNF $\alpha$ , iNOS, IFN- $\beta$ , Kortison

## Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>DOKUMENTATIONSBLATT</b> .....   | <b>2</b>   |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....   | <b>III</b> |
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....   | <b>1</b>   |
| 1.1. KLINIK DER MS .....   | 1          |
| 1.2. THERAPIEPRINZIPIEN .....  | 3          |
| 1.3. PATHOGENESE .....   | 5          |
| 1.3.1. <i>Immunmechanismus</i> .....   | 5          |
| 1.3.2. <i>Entzündung als zweischneidiges Schwert</i> .....   | 8          |
| 1.4. FRAGESTELLUNG .....   | 10         |
| 1.5. METHODENWAHL .....  | 11         |
| 1.6. STUDIENDESIGN .....   | 13         |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....  | <b>15</b>  |
| 2.1. PATIENTEN .....   | 15         |
| 2.1.1. <i>Einschlusskriterien für das Patientenkollektiv</i> .....   | 15         |
| 2.1.2. <i>Untersuchungsmaterial und Studienablauf</i> .....  | 15         |
| 2.2. EINSCHLUSSKRITERIEN UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL DES PROBANDENKOLLEKTIVS .....   | 16         |
| 2.3. ISOLIERUNG DER MNZ AUS DEM PERIPHEREN BLUT .....  | 16         |
| 2.4. CNTF-RT-PCR.....  | 17         |
| 2.5. FIXIERUNG UND ANTIKÖRPERINKUBATION DER MNZ .....  | 18         |
| 2.6. FACS-ANALYSEN .....   | 21         |
| 2.7. IMMUNZYTOCHEMIE .....   | 21         |
| 2.8. STATISTISCHE METHODEN .....   | 22         |
| <b>3. ERGEBNISSE</b> .....   | <b>23</b>  |
| 3.1. PATIENTENREKRUTIERUNG .....   | 23         |
| 3.2. ETABLIERUNG DER FACS-FÄRBUNGEN .....  | 24         |
| 3.3. EXPRESSION VON CNTF UND BDNF IN MNZ.....  | 29         |
| 3.4. CNTF-, BDNF-, TNF $\alpha$ - UND INOS-EXPRESSION BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE...32                              |            |
| 3.5. DER EINFLUSS DER INTERFERON $\beta$ -THERAPIE .....   | 37         |
| 3.6. KORRELATION VON TNF $\alpha$ - UND BDNF-WERTEN WÄHREND DES AKUTEN SCHUBES.....  | 39         |
| 3.7. INDIVIDUELLE WERTE FÜR TNF $\alpha$ -, INOS-, CNTF- UND BDNF-WERTE KORRELIEREN MIT DEM SCHWEREGRAD DER ERKRANKUNG ..... | 41         |
| <b>4. DISKUSSION</b> .....   | <b>47</b>  |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1. CNTF-EXPRESSION IN HUMANEN LEUKOZYTEN UND ERHÖHUNG DER CNTF-EXPRESSION WÄHREND EINES AKUTEN SCHUBES NACH GLUKOKORTIKOID-THERAPIE ..... | 47        |
| 4.2. BDNF-ERHÖHUNG IN INF- $\beta$ -BEHANDELTEN PATIENTEN .....   | 50        |
| 4.3. TNF $\alpha$ -ERHÖHUNG IM AKUTEN SCHUB.....  | 51        |
| 4.4. LEICHTER ANSTIEG VON INOS BEI IFN- $\beta$ -BEHANDELTEN PATIENTEN .....  | 52        |
| 4.5. IFN- $\beta$ ERHÖHT DIE MHC I-SEKRETION.....   | 53        |
| 4.6. EXPRESSION VON PROINFLAMMATORISCHEN UND NEUROTROPHEN MEDIATOREN WÄHREND DER SPÄTEREN PHASE DER SCHUBFÖRMIG-REZIDIVIERENDEN MS .....    | 54        |
| 4.7. SCHLUSSFOLGERUNGEN .....   | 55        |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>57</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| Abb.              | <b>Abbildung</b>   |
| ADEM              | <b>Akute demyelinisierende Enzephalomyelitis</b>   |
| AIMV              | Serum Free Lymphocyte Medium   |
| AMV               | <b>Avian Myeloblastosis Virus</b>  |
| APS               | <b>Ammonium Peroxidsulfat</b>  |
| APZ               | <b>Antigenpräsentierende Zelle</b>   |
| BDNF              | <b>brain derived neurotrophic factor</b>   |
| BHS               | <b>Bluthirnschranke</b>  |
| BSA               | <b>Bovines Serumalbumin</b>  |
| CADASIL           | <b>Cerebrale Autosomal Dominante Arteriopathie mit Subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie</b> |
| CD                | <b>Cluster of differentiation (Oberflächenmarker)</b>  |
| CNTF              | <b>ciliary neurotrophic factor</b>   |
| COP 1             | <b>Copolymer 1</b>   |
| CSF               | <b>Cerebrospinale Flüssigkeit</b>  |
| DNA/cDNA          | <b>Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)/complementary DNA</b>                               |
| dH <sub>2</sub> O | <b>deionisiertes Wasser</b>  |
| EAE               | <b>experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis</b>   |
| EDSS              | <b>Expanded Disability Status Scale</b>  |
| ELISA             | <b>enzyme-linked immunosorbent assay</b>   |
| FACS              | <b>fluorescence activated cell sorting</b>   |
| FGF2              | <b>fibroblast growth factor</b>  |
| FITC              | <b>flurescein isothiocyanate</b>   |
| FCS/FKS           | <b>fetal calf serum/Fötales Kälberserum</b>  |
| FSC               | <b>Forward Scatter</b>   |
| g                 | <b>Gramm oder Erdbeschleunigung 1 g = 9,81 m / s<sup>2</sup></b>                                       |
| GLAT              | <b>Glatiramacetat</b>  |
| IFN               | <b>Interferon</b>  |
| Ig                | <b>Immunglobulin</b>   |
| IL                | <b>Interleukin</b>   |
| LPS               | <b>Lipopolysaccharid</b>   |
| iNOS              | <b>Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase</b>  |
| mA                | <b>Mlliamper</b>   |

---

|                |  |
|----------------|--|
| MAZT           | <b>M</b> agnet- <b>a</b> ssistierter <b>Z</b> elltrennung  |
| MBP            | <b>M</b> yelin- <b>B</b> asisches <b>P</b> rotein  |
| min            | <b>M</b> inuten  |
| MSFC           | <b>M</b> ultiple <b>S</b> clerosis functional <b>C</b> omposite Score  |
| MHC            | <b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex   |
| µl             | Mikroliter   |
| ml             | <b>M</b> illiliter   |
| mM             | <b>m</b> illimolar   |
| MNZ            | (periphere) <b>m</b> ononukleäreäre <b>Z</b> ellen   |
| MOG            | <b>M</b> yelin- <b>O</b> ligodendrozyten- <b>G</b> lykoprotein   |
| MR             | <b>M</b> agnetresonanz, MRT (Magnetresonanztomographie)  |
| mRNA           | <b>m</b> essenger <b>R</b> ibonucleic acid (messenger Ribonucleinsäure)  |
| MRS            | <b>M</b> agnetresonanz <b>s</b> pektroskopie   |
| MS             | <b>M</b> ultiple <b>S</b> klerose  |
| MSSS           | <b>M</b> ultiple <b>S</b> clerosis <b>S</b> everity <b>S</b> core  |
| NGF            | <b>n</b> erve <b>g</b> rowth <b>f</b> actor  |
| NMO            | <b>N</b> euromyelitis <b>O</b> ptica   |
| NO             | Stickstoffmonoxid  |
| NT3            | <b>N</b> eurotrophin- <b>3</b>   |
| O <sub>2</sub> | Sauerstoff   |
| PDGF           | <b>P</b> latelet- <b>d</b> erived <b>g</b> rowth <b>f</b> actor  |
| PHA            | <b>P</b> hyto- <b>H</b> äm- <b>A</b> gglutinin   |
| PBS            | <b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)                                 |
| PFA            | <b>P</b> araformaldehyd  |
| PMA            | <b>P</b> horbol- <b>m</b> yrystate- <b>a</b> ccetat  |
| PPMS           | <b>P</b> rimary <b>p</b> rogressive <b>M</b> S (primär chronisch-progrediente MS)                                  |
| rpm            | <b>R</b> evolutions <b>p</b> er <b>m</b> inute (Umdrehungen pro Minute)  |
| RRMS           | <b>r</b> elapsing- <b>r</b> emitting <b>M</b> S (schubförmig-rezidivierende MS)                                    |
| RT-PCR         | <b>R</b> eal- <b>T</b> ime- <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction (Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion) |
| SD             | Standardabweichung   |
| SDS            | <b>S</b> odium <b>d</b> odecylsulfat   |
| SLE            | <b>S</b> ystemischer <b>L</b> upus <b>e</b> rythematodes   |
| SPMS           | <b>s</b> econdary <b>p</b> rogressive <b>M</b> S (sekundär chronisch-progrediente MS)                              |
| SSC            | <b>S</b> ide <b>S</b> catter   |
| Tab.           | <b>T</b> abelle  |
| TBS            | Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <b>T</b> RIS <b>b</b> uffered <b>s</b> aline)                                     |

|              |  |
|--------------|--|
| TEMED        | <b>T</b> etramethylethylendi <b>a</b> min  |
| Tfl          | <b>T</b> hermus <b>f</b> lavus   |
| TGF          | <b>T</b> ransforming <b>g</b> rowth <b>f</b> actor (transformierender Wachstumsfaktor) |
| Th           | <b>T</b> -Helferzellen   |
| TNF $\alpha$ | <b>T</b> umornekrosefaktor <b><math>\alpha</math></b>                                  |
| Treg         | <b>R</b> egulatorische <b>T</b> -Zelle   |
| Tris         | <b>T</b> ris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| TZR          | <b>T</b> -Zellrezeptor   |
| VLA          | sehr spät exprimiertes ( <b>“very late”</b> ) <b>A</b> ntigen = $\beta$ 1-Integrine    |
| ZNS          | <b>Z</b> entralnervensystem  |

# 1. Einleitung

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). Sie befällt oft junge nordeuropäische Frauen (w : m = 2:1). Mit einer Prävalenz von 120 pro 100 000 und einer Inzidenz von 7 pro 100 000 pro Jahr ist MS die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter und wichtigste Ursache für neurologisch bedingte Behinderung in dieser Altersgruppe. Bezüglich der Prävalenz von MS wurden deutliche geographische Unterschiede gefunden, wobei es entscheidend ist, in welcher Region die Patienten aufgewachsen sind. So weisen nördlichere Regionen wie Nordeuropa und Kanada eine wesentlich höhere MS Inzidenz auf als Südeuropa und Afrika. Ursächlich für die Manifestation einer Multiplen Sklerose werden eine genetische Prädisposition (Zamvil & Steinman 2003) und Umwelteinflüsse, wie z.B. virale Erkrankungen (Noseworthy et al. 2000) diskutiert.

## 1.1. Klinik der MS

Frühsymptome sind oft durch die Schädigung der vorderen Sehbahn entstandene Sehstörungen. Aber auch Paresen, Dysästhesien und Ataxien treten häufig früh auf. Diese klinischen Symptome geben meist schon die ersten diagnostischen Hinweise.

Als Anfangsstadium der klinischen Erkrankung wird das sogenannte „klinisch-isolierte Syndrom“ beschrieben. Hier fehlt nach erstmaligem Auftreten einer neurologischen Symptomatik, die auf ein demyelinisierendes Ereignis hindeutet, die zeitliche Dissemination. Zu diesem Zeitpunkt deuten multifokale MR (Magnetresonanztomographie) -Läsionen auf ein erhöhtes Risiko, zu einer MS zu konvertieren, hin. Eine manifeste MS verläuft bei der Mehrzahl der Patienten (80%) schubförmig (relapsing-remitting MS, RRMS) mit abwechselnden Phasen des Schubes, der Persistenz von Symptomen und der Remission. Ein Schub ist definiert als eine Episode neurologischer Störungen, bei denen die ursächlichen Läsionen wahrscheinlich entzündlich und demyelinisierend sind. Es sollte ein subjektiver (von objektiven Befunden gestützter) Bericht oder eine objektivierbare Beobachtung vorliegen, dass das Ereignis mindestens 24 Stunden anhält (McDonald et al. 2001). Ein neuer Schub muss mit einem Zeitintervall von 30 Tagen zum Beginn vorausgegangener Schübe auftreten und darf nicht durch Änderungen der Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen) oder im Rahmen von Infektionen erklärbar sein. Das Risiko eines erneuten Schubes ist doppelt so hoch nach viraler Exposition (Buljevac et al. 2002), besonders nach oberen Atemwegserkrankungen (Adenoviren) und gastrointestinalen Infektionen (Andersen et al. 1993). Im Gegensatz dazu scheint ein persistierender Parasitenbefall vor Krankheitsaktivität zu schützen,

was möglicherweise auf die Unterstützung der T-regulatorischer-Zell Aktivität zurückzuführen ist (Correale & Farez 2007). Impfungen vermögen die Krankheitsaktivität der MS nicht zu beeinflussen (Confavreux et al. 2001). Die Schubrate verhält sich invers zur Krankheitsdauer (Lhermitte et al. 1973). Auf den schubförmigen folgt ein sekundär chronisch progredienter Verlauf (secondary progressive MS; SPMS), bei dem vereinzelt noch Schübe „aufgesetzt“ vorkommen können. Der Übergang in diese Krankheitsphase wird klinisch meist durch ein Schubsymptom verdeutlicht, das sich nicht mehr vollständig zurückbildet. Hier ist die Schädigung dann bereits irreversibel (Confavreux & Compston 2005).

Der Zeitraum zwischen schubförmiger und sekundär chronischer Krankheitsform ist individuell verschieden. Nach zehn Jahren sind ca. 50% der RRMS-Patienten in die sekundär chronisch progrediente Phase der Krankheit übergetreten, während geschätzt wird, dass 90% der RRMS-Patienten nach 20-25 Jahren in ein progredientes Krankheitsstadium übergegangen sind (Weinshenker et al. 1989). Bezüglich der klinische Progression werden auch Unterschiede in der Genexpression diskutiert. Achiron et al. (2007) fanden heraus, dass an Hand von hierarchischer Clusteranalyse (unsupervised hierarchical cluster analysis) an mehr als 1500 Genen unterschieden werden kann, ob sich ein Patient im akuten Schub oder bereits in der Remissionsphase nach einem Schub befindet.

Seltener (20%) ist die primär chronisch progrediente (primary progressive MS; PPMS), irreversible Krankheitsform, welche auch eine eigenständige degenerative Erkrankung mit sekundärer Entzündung darstellen könnte. Bei diesem Verlauf findet sich häufig eine über Jahre zunehmende spastische Gangstörung, seltener auch ein progredientes zerebelläres Syndrom (Thompson et al. 2000).

Zur Diagnose der MS werden derzeit die Kriterien nach McDonald et al. (2001) genutzt, die von Polman et al. (2005) überarbeitet wurden. Danach kann die Diagnose der MS klinisch nach zwei Krankheitsschüben gestellt werden, wenn diese auf räumlich unterschiedliche objektivierbare Läsionen zurückgehen und die Symptome nicht durch eine andere neurologische Erkrankung zu erklären sind. Kernspintomographische und elektrophysiologische Zusatzbefunde sowie die Liquoranalyse mit dem für die Multiple Sklerose typischen Nachweis oligoklonaler Banden sind sehr wichtig zum Beweis der räumlichen und zeitlichen Dissemination, besonders wenn die Diagnose nach den McDonald-Kriterien nach nur einem klinischen Ereignis gestellt wird (Polman et al. 2005).

Differentialdiagnostisch von der MS abzugrenzen ist die akute und/oder rezidivierende demyelinisierende Enzephalomyelitis (ADEM) (Menge et al. 2005), während die Neuromyelitis optica (NMO) durch den Nachweis der hochspezifischen Aquaporin-Antikörper ein gut definiertes Krankheitsbild darstellt und nach den modifizierten Kriterien von Wingerchuk diagnostiziert wird (Pittock et al. 2006, Wingerchuk et al. 1999). Weitere Differentialdiagnosen sind systemische Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematodes (SLE), Sarkoidose und Morbus

Behcet sowie in speziellen Fällen ZNS-Lymphome oder Leukoenzephalopathien, z.B. die Cerebrale Autosomal Dominante Arteriopathie mit Subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CADASIL) und die Adrenoleukodystrophie. Viral oder bakteriell verursachte Erkrankungen mit ähnlichen Symptomen, wie z.B. Lues, humanes Immundefizienz-Virus (HIV) und Borreliose, können serologisch ausgeschlossen werden.

Der Krankheitsverlauf wird mit verschiedenen Evaluationsskalen quantifiziert. Die Expanded Disability Status Scale (EDSS), welche von Kurtzke (1983) etabliert wurde, ist am weitesten verbreitet und gibt Auskunft über den Grad der Behinderung. Zur Quantifizierung weiterer Funktionsbereiche hat sich der Multiple Sclerosis functional Composite Score (MSFC) etabliert (Cutter et al. 1999, Schwid et al. 2000). Keine der Skalen berücksichtigt die Krankheitsdauer. Der MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score) verwendet EDSS und Krankheitsdauer, um eine Aussage über den Schweregrad der MS zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt zu treffen (Roxburgh et al. 2005). Für die Bestimmung des MSSS wurde eine Verteilungskurve für eine große Gruppe von MS-Patienten erstellt, die den EDSS in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer darstellt. Der MSSS gibt an, in welcher Perzentile des Vergleichskollektivs sich ein einzelner Patient befindet.

## 1.2. Therapieprinzipien

Die Therapie der MS kann man in zwei Gruppen einteilen: die akute Schubtherapie und die verlaufsmodifizierende Therapie, welche stufenartig in Basistherapien und Eskalationstherapien unterteilt wird.

Als Therapie im akuten Schub gilt die dreitägige Hochdosistherapie mit je 1g Methylprednisolon als Goldstandard (Goodin et al. 2002). Über eine Vielzahl von Mechanismen, u.a. die Abdichtung der Bluthirnschranke, die veränderte Expression von Zelloberflächenmolekülen und entzündlichen Mediatoren sowie über Apoptose der T-Zellen, werden die akute Entzündungsreaktion (Gold et al. 2001) und somit auch die akut aufgetretenen, neurologischen Symptome zurückgedrängt.

Therapeutische Plasmapherese ist bei Patienten mit antikörper- und komplement-assoziiierter Gewebeerstörung, bei denen die Steroidtherapie versagt hat, sehr effektiv. Bei Patienten mit anderen Schädigungsmustern wirkt diese Form der Therapie nicht (Keegan et al. 2005).

Zur verlaufsmodifizierenden Basistherapie der MS stehen derzeit in erster Linie verschiedene Interferon- $\beta$ -Präparate (IFN) und Glatiramacetat zur Verfügung.

INF- $\beta$  ist ein Zytokin, welches über multiple Mechanismen die Immunreaktion bei der MS verändert (Rieckmann et al. 2004). So beeinflusst es u.a. die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Von Boutros et al. wurde bereits 1997 bewiesen, dass INF- $\beta$  die nerve growth factor (NGF)-Produktion von Astrozyten stark induziert. INF- $\beta$  hat blockierende Effekte gegenüber dem pro-inflammatorischen Zytokin INF- $\gamma$ , reduziert die Expression verschiedener Aktivierungsmarker auf Immunzellen und verbessert die Suppressorfunktion von T-Zellen. Außerdem induziert IFN- $\beta$  Th2-Zytokine wie IL-10, senkt die Migrationsrate von Monozyten (Seguin et al. 2003) und Th1- aber nicht von Th2-Lymphozyten (Prat et al. 2005) durch menschliche Hirnendothelzellen und vermindert die Induktion löslicher Adhäsionsmoleküle (Avolio et al. 2003). Zur immunmodulatorischen Therapie der RR-MS und der SP-MS sind sowohl Interferon- $\beta$  1a (Avonex®, Rebif®), als auch Interferon- $\beta$  1b (Betaferon®) zugelassen. Dabei entspricht Interferon- $\beta$  1a dem natürlichen Zytokin, während bei Interferon- $\beta$  1b zwei Aminosäuren durch Deglykosylierung modifiziert wurden.

Glatirameracetat (GLAT) (Copaxone®), ursprünglich Copolymer-1 (COP 1) genannt, ist ein synthetisches Oligopeptid, bestehend aus den vier Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin in zufälliger Mischreihenfolge und unterschiedlicher Länge. GLAT moduliert die Antigenpräsentation, induziert die Produktion von Th2-Lymphozyten (Prat et al. 2005, Hohlfeld & Wekerle 2004), verstärkt die Produktion von IL-4, IL-6 und IL-10 und fördert die Neurotrophinsekretion durch T-Zellen (Hohlfeld & Wekerle 2004).

Azathioprin (Imurek®), ein Purinanalogon, wird heute nur noch als Reservepräparat verwendet. Durch Blockierung der RNA- und DNA-Synthese, hemmt Azathioprin die Vermehrung von B- und T-Zellen. Azathioprin findet vor allem Anwendung bei der Koinkidenz mit anderen Autoimmunerkrankungen, bei Unverträglichkeit der primären Basistherapeutika, bei Ablehnung von Spritzen Therapien und als Mittel der Wahl bei der NMO.

Intravenöse Immunglobuline (Ig) werden in Einzelfällen ebenfalls als Reservetherapeutikum eingesetzt. Die polyvalenten 7S-Immunglobuline neutralisieren die von Komplement vermittelten Effekte, hemmen die überschießende Komplementaktivierung und erhöhen die Katabolie von pathogenem IgG. Außerdem könnten sie inhibitorische Antikörper unwirksam machen und vermindern die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (Stangel et al. 1999).

Bei anhaltender Krankheitsaktivität unter Behandlung mit den primären Basistherapeutika oder in Ausnahmefällen bei initial hochaktiver MS steht seit wenigen Jahren Natalizumab zur Verfügung.

Natalizumab (Tysabri®) ist humanisierter Antikörper gegen Alpha-4-Integrin, einen Bestandteil des VLA-4-Moleküls. Durch die Blockade des Alpha-4-Integrins auf der Oberfläche von Leukozyten wird die Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke inhibiert. Zusätzlich ist vermutlich die Leukozytenwanderung im ZNS zu den Axonen hin behindert.

Die momentane anti-inflammatorische, immunmodulatorische oder immunsuppressive Therapie ist im Anfangsstadium der MS zumindest teilweise effektiv. Aber je weiter die Krankheit zum chronisch progredienten Verlauf hin fortgeschritten ist, desto weniger profitieren die Patienten von dieser Therapie (Noseworthy et al. 2000).

Zur Eskalationstherapie bei rascher Behinderungsprogredienz dient Mitoxantron, ein synthetisches Anthrazendionderivat. Es bewirkt über eine Interaktion mit der Topoisomerase-2 Einzel- und Doppelstrangbrüche und führt so zur Inhibition der Nukleinsäuresynthese. Es inhibiert die T-Zell-Proliferation, induziert Apoptose in B-Zellen und deaktiviert Makrophagen (Chan et al. 2005).

## 1.3. Pathogenese

### 1.3.1. Immunmechanismus

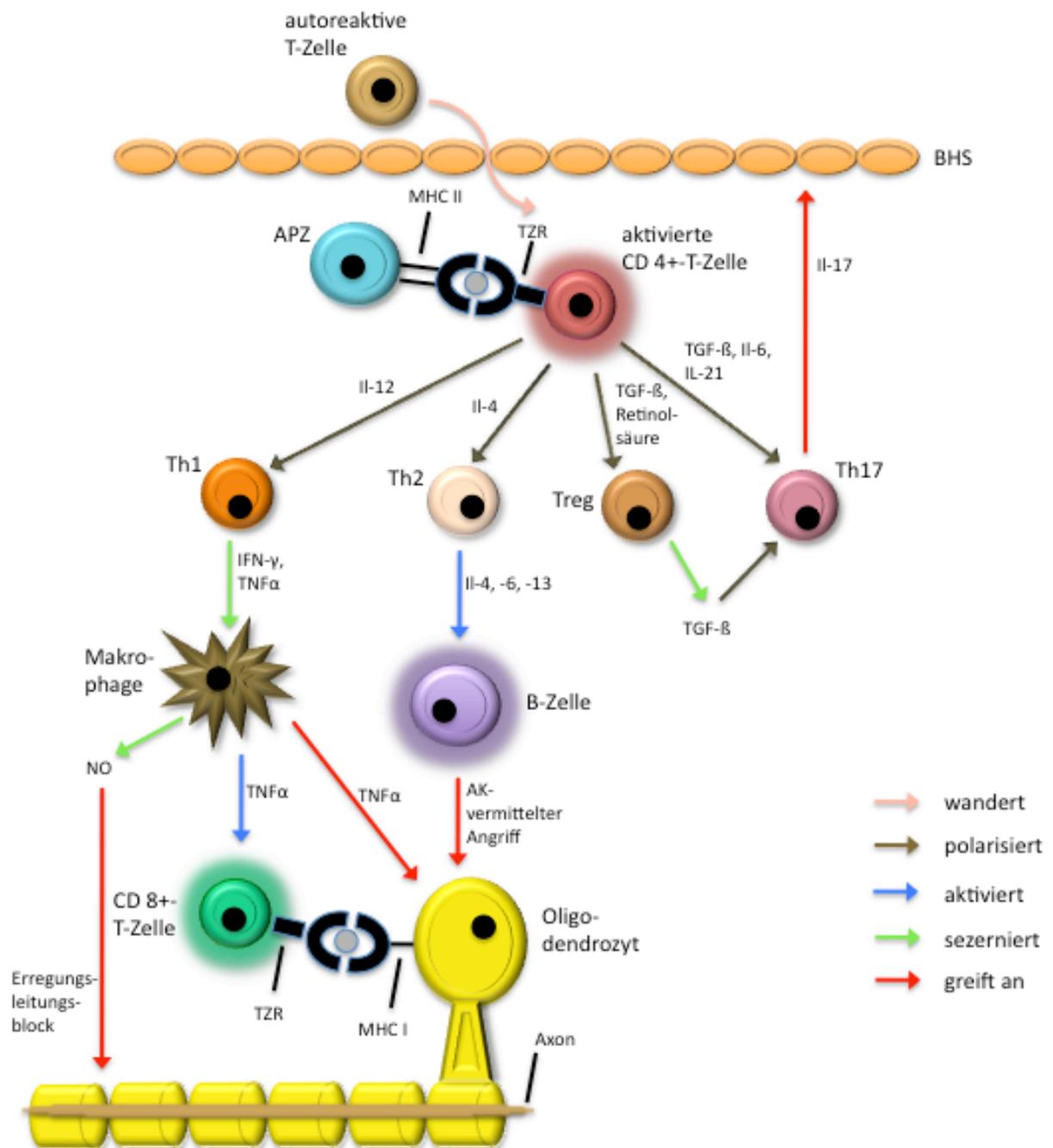
Die Pathogenese der MS-Erkrankung ist multifaktoriell. Lange wurde lediglich den CD (cluster of differentiation) 4+-T-Zellen eine tragende Rolle zugeschrieben. Doch mittlerweile hat sich der allgemeine Denkansatz zur Pathogenese der MS hin zu Th17- und B-Zellen verlagert.

Autoreaktive, naive T-Zellen wandern durch die BHS. Hier treffen sie auf antigenpräsentierende Zellen (APZ). APZs, wie z.B. dendritische Zellen, Monozyten oder Makrophagen, erkennen Pathogene und präsentieren sie den T-Zellen. Über den MHC II (Major Histocompatibility Complex II) -TZR (T-Zellrezeptor)-Komplex verbindet sich die APZ mit der naiven CD4+-T-Zelle und über den MHC I-TZR-Komplex mit der CD8+-T-Zelle (Abb.1.1).

Verbunden mit dem MHC II-Molekül auf APZs, werden die CD4+-T-Zellen zur Proliferation und unter dem zusätzlichen Einfluss von Immunglobulinen zur Polarisation angeregt. So veranlasst IL-12 die Polarisation von naiven CD4+-T-Zellen zu Th1-Zellen, IL-4 die Polarisation zu Th2-Zellen und steht die CD4+-T-Zellen unter dem Einfluss von IL-6, IL-21 und transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), dann polarisiert sie zu einer Th17-Zelle. Unterhalten wird die TH17 von IL-23 (Kimura 2007). TGF- $\beta$  in Kombination mit Retinolsäure veranlassen eine Polarisation der CD4+-T-Zelle hin zu einer regulatorischen T-Zelle (Treg). Diese produziert IL-10 und TGF- $\beta$  und kann somit regulatorisch auf die Produktion von TH17 einwirken. MS-Patienten fehlt die Fähigkeit Treg-Antworten und -Kontrollen zu beherrschen (Haas et al. 2005). Somit fehlt auch die Kontrolle über die TH 17-Tellen, welche unter Anwesenheit von IL-23 IL-17 produzieren. IL-17 unterbricht zusammen mit IL-22 die BHS und ermöglicht es den Th17-Zellen über die BHS ins ZNS zu gelangen. Th 17-Zellen wird somit eine tragende Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben (Tzartos et al. 2008).

TH1-Zellen sezernieren unter anderem IL-15, IFN- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  wirken auf Makrophagen, welche toxische Makrophagenprodukte, wie NO, O<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  und Exotoxine ausschütten. Außerdem aktivieren Makrophagen über TNF $\alpha$  CD8+-T-Zellen, die über MHC I-Moleküle direkt an Oligodendrozyten binden und somit auch schädigen können. CD8+-T-Zellen ist es des Weiteren möglich, Axone zu durchtrennen und die Gefäßpermeabilität zu steigern (Kasper & Shoemaker 2010). Sie erhöhen die Permeabilität der Gefäße, die sie als Zellinfiltrate umgeben, und bilden sogenannte Plaques. Hauptsächlich finden sich Plaques um die Seitenventrikel und den Corpus Callosum herum, im Kortex und in der subkortikalen weißen Masse, im Sehnerv und dem Hirnstamm, sowie durchgehend im Rückenmark.

Th2-Zellen sezernieren unter anderem IL-4, -6, und -13 und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Follikel von B-Lymphozyten sammeln sich in den Meningen an und unterhalten dort eine humorale Immunantwort, die es vermag die intrathekale Antikörperproduktion zu veranlassen und den benachbarten Kortex zu schädigen (Magliozzi et al. 2007).



**Abb. 1.1: MS-Immunpathologie**

Autoreaktive T-Zellen wandern über die BHS. Hier treffen sie auf APZ, die ihnen ein putatives MS-Antigen über den MHC II-TZR-Komplex präsentieren und die CD4+-T-Zelle somit aktivieren und zur Proliferation anregen. Unter der Anwesenheit verschiedener Immunglobuline oder Wachstumsfaktoren polarisiert die CD4+-Zelle in vier Subtypen: Th1, Th2, Treg und Th17. Die regulatorische T-Zelle (Treg) sezerniert ihrerseits TGF-β und unterstützt so die Polarisation von CD4+-T-Zellen zu Th17-Zellen. Th17-Zellen sezernieren IL-17, was auf die BHS wirkt, so dass T-Zellen leichter die BHS passieren können. Th1-Zellen sezernieren unter anderem TNFα, was die Makrophagen ebenfalls zur Sekretion von TNFα anregt. TNFα vermag Oligodendrozyten direkt anzugreifen oder aktiviert die zytotoxischen CD8+-T-Zellen, welche über den MHC I-TZR-Komplex an den Oligodendrozyten angreifen können. Makrophagen sezernieren auch NO, was einen reversiblen Erregungsleitungsblock an den Axonen herbeiführen kann. Th2-Zellen sezernieren IL-4, -6 und -13 und aktivieren so B-Zellen, die antikörpervermittelt Oligodendrozyten angreifen.

### 1.3.2. Entzündung als zweischneidiges Schwert

Mit einer Entzündungsreaktion wird meist etwas Krankhaftes, Zerstörerisches assoziiert. So werden auch im Rahmen der MS-Erkrankung eine Reihe von inflammatorischen Entzündungsmediatoren diskutiert, die zur Gewebsschädigung in MS-Läsionen beitragen. Hierbei liefert das Zytokin TNF $\alpha$  die überzeugendsten Daten zur Krankheitsaktivität (Beck et al. 1988, Sharief & Hentges 1991, Rieckmann et al. 1995, Monteyne & Sindic 1998). Eine große Menge an TNF $\alpha$  wird sowohl bei der MS als auch bei der EAE von aktivierten T-Zellen, welche das ZNS infiltrieren, produziert (Olsson 1995). Die Expression von TNF $\alpha$  kann in aktiven MS-Läsionen immunzytochemisch gezeigt werden: vorherrschend in Astrozyten, in aktivierter Mikroglia und in das ZNS infiltrierenden Makrophagen (Hofman et al. 1989, Selmaj et al. 1991, Selmaj et al. 1991). Neben der führenden Rolle im Ablauf der inflammatorischen Kaskade kommt TNF $\alpha$  ebenso eine direkt toxische Wirkung für Oligodendrozyten zu (Selmaj & Raine 1988, Zajicek et al. 1992, D'Souza et al. 1995). Außerdem ist es TNF $\alpha$  möglich, zusammen mit IL-1 und IFN- $\gamma$  die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) zu aktivieren, ein anderes zytotoxisches Effektormolekül.

Wie TNF $\alpha$  kann auch iNOS mRNA und die Proteinexpression in Mitten aktiv geschädigter MS-Läsionen nachgewiesen werden, hier besonders in Makrophagen und Mikroglia (Bagasra et al. 1995, De Groot et al. 1997). Außerdem lässt sich ein Anstieg von stabilen Reaktionsprodukten von NO in der zerebrospinalen Flüssigkeit und möglicherweise auch im Serum von MS-Patienten erkennen (Johnson et al. 1995, Yamashita et al. 1997, Giovannoni et al. 1997). Die Produktion von NO konnte in der Zellkultur von MNZ bei MS-Patienten im akuten Schub nachgewiesen und durch Lipopolysaccharide (LPS) vermehrt werden (Sarchielli et al. 1997). Zudem ist es NO möglich reversibel die Erregungsleitung an Axonen zu blockieren (Redford et al. 1997). In *in vitro*-Versuchen wurde bereits gezeigt, dass NO neurotoxisch ist (Golde et al. 2002). Aber noch viel bedeutender war die Entdeckung, dass NO axonale Degeneration hervorruft, wenn die Axone hochfrequent stimuliert werden (Smith et al. 2001). Folglich könnte NO nicht nur verschiedene Symptome im akuten Schub verursachen sondern auch an der beobachteten axonalen Schädigung mitwirken.

Obwohl die Zytotoxizität der Entzündung bei der MS bereits gut untersucht ist, wurde bisher immer noch kein deutlicher Zusammenhang zwischen inflammatorischer Aktivität und dem Behinderungsgrad von MS Patienten gefunden (Confavreux & Compston 2006).

Inmitten einer Entzündung entstehen jedoch auch neue Wachstumsfaktoren. Neuroprotektive Effekte der Entzündung wurden bereits bei ZNS-Trauma (Moalem et al. 1999, Hammarberg et al. 2000) und auch bei der Rückenmarksschädigung (Hauben et al. 2000) entdeckt. Hinzu kommen immer mehr positive Effekte der Inflammation auf die Remyelinisierung. Während die Depletion von Makrophagen (Kotter et al. 2001) oder T-Zellen (Bieber et al. 2003) die Remyelinisierung nach

Lysolecithin-induzierter Demyelinisierung vermindert, wird die Remyelinisierung durch Schaffung einer entzündlichen Umgebung mittels Läsion (Foote & Blakemore 2005) oder auch durch Injektion von Zymosan zusammen mit Oligodendrozyten-Vorläuferzellen-Transplantaten in die Retina (Setzu et al. 2006) gefördert. Undifferenzierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen umgeben MS-Läsionen (Scolding et al. 1998, Wolswijk 1998). So dienen sie als Quelle für Zellen, die remyelinisierend auf nackte Axone wirken können (Chandran et al. 2008). Durch den Nachweis von BDNF-Expression in Leukozyten, war es Kerschensteiner et al. (1999) zum ersten Mal möglich einen solchen Mechanismus der „protektiven Immunität“ im Menschen nachzuweisen. Schrittweise wurde auch die Expression von Neurotrophin-3 (NT3) und verschiedenen anderen Neurotrophin-Rezeptoren in menschlichen PMZ gezeigt (Besser & Wank 1999). BDNF und sein Rezeptor gp145trkB wurden immunhistochemisch in MS-Läsionen nachgewiesen (Stadelmann et al. 2002). Von Ziemssen et al. (2002) wurde eine Verstärkung der BDNF-Sekretion in T-Zellen nach der Stimulation mit Glatiramerazetat, eines der immunmodulatorischen Medikamente zugelassen für die Therapie bei der schubförmig remittierenden (RRMS) MS, nachgewiesen.

Diverse Studien über BDNF bei Patienten mit Multipler Sklerose zeigen kontroverse Ergebnisse. In den Studien an Patienten mit RRMS wurden entweder die BDNF mRNA oder die Protein-Expression sowohl von frisch isolierten als auch von kultivierten mononukleären Zellen untersucht. Außerdem wurde die BDNF-Konzentration im Serum, im Plasma und in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) an RRMS Erkrankten erforscht. Die Studienergebnisse zeigten entweder herabgesetzte (Azoulay et al. 2005, Azoulay et al. 2008, Lalive et al. 2008, Comini et al. 2009) erhöhte (Gielen et al. 2003, Petereit et al. 2003, Liguori et al. 2009) oder gleichbleibende (Sarchielli et al. 2002) BDNF-Werte während der klinisch stabilen Phase. Im akuten Schub dagegen stiegen die BDNF-Wertniveaus bei MS Patienten ohne immunmodulatorische Therapie deutlich an (Sarchielli et al. 2002, Sarchielli et al. 2007, Caggiola et al. 2005). Patienten, die mit IFN- $\beta$ , einem bewährten immunmodulatorischen Medikament bei RRMS, behandelt wurden, schienen BDNF vermehrt zu exprimieren (Lalive et al. 2008, Azoulay et al. 2009).

Ein anderes Neurotrophin hat die Aufmerksamkeit durch eine Studie, welche die unterschiedlichen mRNA-Expressionen im Kortex von MS Patienten untersuchte, auf sich gezogen. Dutta et al. fanden 2007 heraus, dass die Expression von neun Genen, die mit dem CNTF-Signalweg in Verbindung gebracht werden, erhöht war unter anderem der CNTF-Rezeptor  $\alpha$  und CNTF aus Neuronen im unverletzten Kortex. Die Autoren weisen darauf hin, dass die Rolle des CNTF-Sekretionsweges möglicherweise darin besteht, die Schädigung der Axone und der weißen Substanz zu kompensieren. CNTF ist wichtig für die Differenzierung von Oligodendrozyten und Neuronen (Barres et al. 1993, Arakawa et al. 1990, Sendtner et al. 1992). In einzelnen Fällen ist es CNTF möglich, den TNF $\alpha$ -induzierten Untergang von Oligodendrozyten zu reduzieren (D'Souza et al. 1996, Barres et al. 1992, Louis et al. 1993). Des Weiteren wird CNTF in Schwann Zellen in der Peripherie und in Astrozyten im ZNS exprimiert (Oppenheim et al. 1991, Stöckli et al. 1991,

Sleeman et al. 2000). Patienten mit einer entzündlichen Krankheit des Nervensystems, MS-Patienten eingeschlossen, zeigen eine CNTF-Erhöhung im CSF (Massaro et al. 1997). Die *in vivo*-Expression von CNTF durch periphere mononukleären Zellen (MNZ) wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Zu den Eigenschaften von CNTF zählt es, der Degeneration von axotomierten Neuronen vorzubeugen und auch motorische Defizite bei Mäusen mit verschiedenen neuromuskulären Schwächen abzumildern (Sendtner et al. 1990, Clatterbuck et al. 1993, Mitsumoto et al. 1994, Curtis et al. 1993, Sendtner et al. 1992). Bei Mäusen, denen CNTF fehlt, resultierte eine MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein)-induzierte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) mit einer schwereren axonalen Schädigung, einer höheren Zahl von apoptotischen Oligodendrozyten und einer reduzierten Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen, begleitet von einem früheren Auftreten der Symptome und einem höheren Behinderungsgrad (Linker et al. 2002). Kontinuierliche intraperitoneale Gabe von rekombinantem CNTF bei Mäusen mit MOG-induzierter EAE schützte Oligodendrozyten und Neurone durch Verdichtung der BHS und durch Abschwächung der Entzündung im ZNS. Außerdem wurde die Zahl der Oligodendrozytenvorläuferzellen erhöht (Kuhlmann et al. 2006). Eine Mutation, welche die Inaktivierung des CNTF-Gens im Menschen bewirkt, wurde bereits 1994 von Takahashi entdeckt (Takahashi et al. 1994). Diese Mutation beeinflusst nicht die Anfälligkeit an MS zu erkranken (Hoffmann et al. 2002), aber sie wurde mit einem früheren Ausbruch und einem verstärkten Krankheitsgrad in einer deutschen Kohorte in Verbindung gebracht (Giess et al. 2002).

#### 1.4. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von proinflammatorischen Effektoren und trophischen Faktoren in humanen Lymphozyten von Patienten mit MS im akuten Schub sowie deren Beeinflussung durch immunmodulatorische Behandlung zu untersuchen. Es wurden einerseits zwei Faktoren gewählt, die, wie oben beschrieben, als wichtige Effektoren der Gewebsschädigung durch die akute Entzündung diskutiert werden. Dabei wurde für  $\text{TNF}\alpha$  schon eine erhöhte Expression der mRNA mittels Real-Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) und des Proteins mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) beschrieben, so dass an diesem Zytokin unsere Messmethode validiert werden konnte. In dieser Arbeit wurde die Expression von induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) durch *in vivo* stimulierte Leukozyten getestet, zumal die Produktion von Stickstoffmonoxid für stimulierte humane mononukleäre Zellen in Kultur bereits gezeigt wurde. Da Entzündungszellen aber auch wichtig für die Stimulation der endogenen Regeneration sind und diese vermutlich zeitig im akuten

Schubgeschehen am effizientesten angestoßen wird (Eltayeb et al. 2007), testeten wir die Expression von BDNF und CNTF. Für BDNF ist die Expression in humanen Leukozyten schon gut dokumentiert. Wir wählten CNTF, welches die Regeneration geschädigter Axone und die Remyelinisierung fördert und, wie oben beschrieben, in MS-Läsionen eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Für CNTF war die Expression in humanen mononukleären Zellen während der Durchführung dieser Arbeit noch nicht bekannt. Als Kontrolle für Proteine, deren Expression durch Immunmodulation verändert werden sollten, testeten wir zudem die Expression von MHC-Molekülen.

Mit dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob immunmodulatorische Substanzen proinflammatorische Botenstoffe im akuten Schub vermindern können ohne dabei gleichzeitig die Sekretion trophischer Faktoren zu reduzieren.

## 1.5. Methodenwahl

Um die Expression der oben genannten Faktoren zu untersuchen, wählten wir die Methode der Durchflusszytometrie (Fluorescence-assisted cell sorting, FACS). Diese erlaubt eine hoch quantitative Analyse der Expression bezogen auf einzelne Zellen oder Zellpopulationen, wie die folgende Beschreibung verdeutlicht:

Die zu untersuchende Zellsuspension wird durch den vom FACS Gerät (FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) aufgebauten Druck durch die 50-100µm große Öffnung einer Kapillare gedrückt. Die Kapillare verjüngt sich nach oben hin. Dort, wo die Zellsuspension die Kapillare verlässt, trifft sie auf die vorbeiströmende Trägerflüssigkeit. So wirken Scherkräfte auf die Zellen, die dazu führen, dass die Zellhaufen zerrissen werden und die Zellen hiernach einzeln den Laserstrahl passieren.

Die Zellen werden zunächst gezählt. Gleichzeitig wird das auf die Zellen treffende Laserlicht gestreut und die Fluorochrome werden zur Lichtemission angeregt (Fluoreszenz). Dabei ist der Forward Scatter (FSC) ein Maß für das Volumen der Zelle, die den Laserstrahl passiert. Der FSC ergibt sich aus der Streulichtmenge, die in einem kleinen Winkel von der Ausgangsrichtung des Laserstrahls abgelenkt wird. Eine orthograde Streuung des Laserstrahls wird durch die Granularität der Zellen bewirkt. Aus der Stärke dieser orthograden Streuung lässt sich der Side Scatter (SSC) als Maß der Granularität einer Zelle bestimmen.

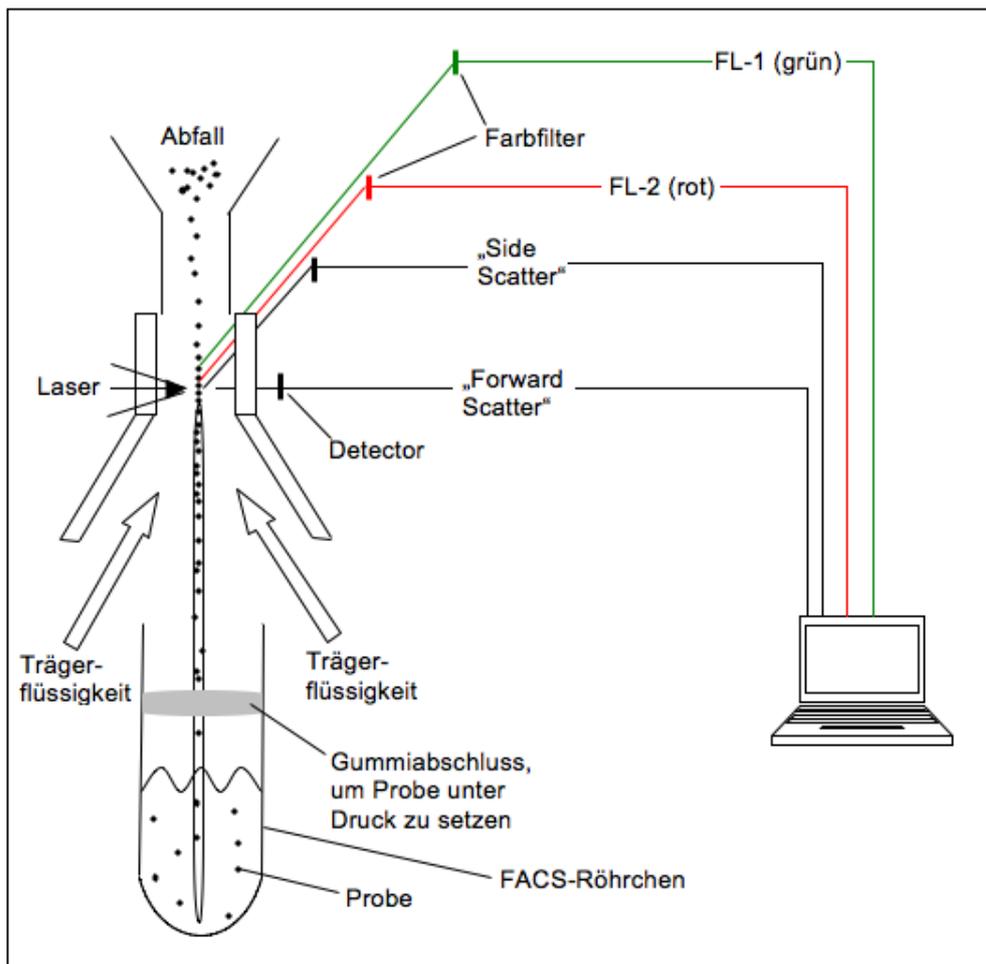
Fluorochrome sind chemische Verbindungen, die durch einen Laser definierter Wellenlänge angeregt werden und als Reaktion Licht einer höheren Wellenlänge emittieren.

| Fluoreszenzfarbstoff | Absorption (nm) | Emission (nm) |
|----------------------|-----------------|---------------|
| FITC (grün)          | 488             | 525           |
| Alexa 546 (rot)      | 546             | 573           |

**Tab. 1.1: Fluorochrome**

Das emittierte Licht wird sowohl durch dichromatische Spiegel als auch durch spezielle Farbfilter separiert. Dabei trifft das Licht einer bestimmten Wellenlänge auf einen spezifischen Photodetektor. Von unterschiedlichen Photodetektorplatten wird das Lichtsignal aufgefangen und in elektrische Impulse umgewandelt. Dabei werden die Zellen, wie bereits oben beschrieben, nach Partikelgröße (FSC), Granularität (SSC) und nach emittiertem Licht der Fluoreszenzfarbstoffe von den unterschiedlichen Detektoren aufgefangen. Ein an das Messgerät angeschalteter Computer verrechnet anschließend alle eingehenden Daten.

Je nach Färbesignal können, wie bereits erwähnt qualitative und quantitative Analysen über eine niedrige, intermediäre oder hohe Oberflächenexpression von Oberflächenproteinen einzelner Zellen gemacht werden. Dies ermöglicht die Zuordnung zu Populationen, in diesem Fall CD3, CD14 und CD19 (mit Hilfe der Cell-Quest-Pro-Software (Becton Dickinson)). Dadurch werden Stimulationsartefakte, wie z.B. nach Magnet-assistierter Zelltrennung (MAZT) vermieden (Givan 1993). Die FACS-Methode erlaubt eine spezifische, hochsensitive, quantitative und auf die einzelne Zelle bezogene Bestimmung der Proteinexpression, während die in anderen Arbeiten häufig verwendeten ELISAs zwar ebenfalls recht spezifisch und sensitiv sind, aber entweder an Zelllysaten oder am Überstand *in vitro* kultivierter Zellen durchgeführt werden. Westernblots von Zelllysaten sind ebenfalls relativ sensitiv und spezifisch, aber deutlich schwieriger exakt zu quantifizieren. Quantitative RT-PCR-Methoden sind zwar hochspezifisch und sensitiv, lassen aber keine direkten Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration zu.



**Abb. 1.2: Schema des FACS-Calibur**

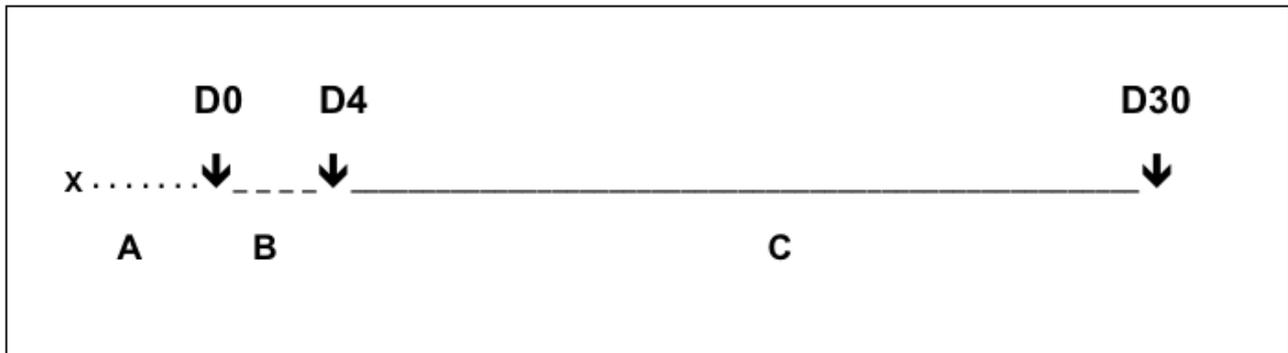
Die zu untersuchende Zellsuspension wird mit Druck durch die Öffnung einer Kapillare gedrückt. Die Zellhaufen werden zerrissen. Anschließend passieren sie einzeln den Laserstrahl und werden gezählt. Das emittierte Licht wird sowohl durch dichromatische Spiegel als auch durch spezielle Farbfiler separiert. Von Photodetektorplatten wird das Lichtsignal aufgefangen und in elektrische Impulse umgewandelt. Dabei werden die Zellen nach Partikelgröße (FSC), Granularität (SSC) und nach emittiertem Licht der Fluoreszenzfarbstoffe unterschieden. Ein an das FACS-Gerät angeschlossener Computer verrechnet anschließend alle eingehenden Daten.

## 1.6. Studiendesign

Es wurden MNZ von MS-Patienten im akuten Schub untersucht, der durch den behandelnden Neurologen festgestellt wurde. Hierzu wurde den Patienten 3 malig je 40ml Blut abgenommen. Zum ersten Mal noch bevor die Patienten die Schubtherapie von 1g Methylprednisolon intravenös (i.v.) über drei Tage erhielten (Tag 1). Zum zweiten Mal wurde einen Tag nach der drei-tägigen i.v.-Therapie (Tag 4), zum dritten Mal wurde 30 Tage nach Schubbeginn (Tag 30) Blut abgenommen. Aus dem peripheren Blut wurden MNZ isoliert und immunhistochemisch gegen die Zelloberflächenproteine CD3, CD14 und CD19 und MHC I, sowie die gegen intrazellulär exprimierte Proteine CNTF, BDNF, TNF $\alpha$  und iNOS gefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde

mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten wurden in Bezug auf die immunmodulatorische Behandlung, Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer der Patienten ausgewertet.

Die vorliegende Arbeit sollte zum Verständnis der Pathophysiologie der MS beitragen, indem sie näheren Aufschluss über die Balance zwischen immunmodulatorischen und trophischen Faktoren gibt, die möglicherweise darüber entscheiden, ob eine Läsion regeneriert oder weiter degeneriert.



**Abb. 1.3: Studiendesign**

X = Zeitpunkt des Schubbeginns

A = Zeitraum bis zur Schubtherapie

B = Zeitraum der Methylprednisolontherapie

C = Zeitraum nach der Methylprednisolontherapie

D0 = Tag der Schubdiagnose. Zeitpunkt der ersten Blutentnahme.

D4 = Tag 4 nach der dreitägigen Methylprednisolontherapie. Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme.

D30 = 30 Tage nach der Schubdiagnose. Zeitpunkt der dritten Blutentnahme.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten

#### 2.1.1. Einschlusskriterien für das Patientenkollektiv

Von Oktober 2004 bis Januar 2006 wurden 16 Patienten (davon acht Frauen) der MS-Ambulanz der Klinik für Neurologie II (jetzt Neurologische Klinik) des Universitätsklinikums Magdeburg in die Studie eingeschlossen. Fünfzehn Patienten befanden sich in einer klinisch klar schubförmigen Krankheitsphase der diagnostisch gesicherten Multiplen Sklerose, 1 Patientin zeigte einen Übergang zur sekundär-chronisch progredienten Phase mit Schüben. Es wurden die Diagnosekriterien nach McDonald (McDonald et al. 2001) und Polman (Polman et al. 2005) zu Grunde gelegt. Bei allen Patienten wurde ein akuter Schub durch den betreuenden Arzt der MS-Ambulanz laut der Definition der Deutschen Gesellschaft für Neurologie ( [www.dgn.org](http://www.dgn.org) ) klinisch verifiziert. Die Symptome bestanden mindestens 24 Stunden und der letzte Schub lag mindestens 30 Tage zurück. Das Alter der MS-Kranken lag zwischen 21 und 47 Jahren, das durchschnittliche Alter betrug 33 Jahre. Sie kamen zur dreitägigen i.v.-Schubtherapie mit Methylprednisolon in die Ambulanz. Fünf Patienten erhielten zusätzliche Dosen Methylprednisolon zwischen D4 und D30, da sie sich in einem sehr aktiven Krankheitsabschnitt befanden, wie in Tab.3.1 beschrieben. Die Patienten wurden entweder mit Rebif® (Rebif® 44µg: Interferonβ-1a, 44µg s.c. dreimal wöchentlich), Betaferon® (Betaferon®: Interferonβ-1b, 8 mIU s.c. jeden zweiten Tag), Avonex® (Avonex®: Interferonβ-1a, 30µg i.m. einmal wöchentlich) therapiert wurden oder erhielten gar keine Basistherapie zu Teil wurde, wie in Tab.3.1 beschrieben. Die Krankheitsdauer wurde vom ersten dokumentierten klinischen Schub an bemessen.

#### 2.1.2. Untersuchungsmaterial und Studienablauf

Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung wurden dreimal max. 40ml Blut von den 15 Patienten abgenommen. Die Entnahme und Verwendung des Patientenblutes wurde im Voraus durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt.

Der behandelnde Arzt in der MS-Ambulanz evaluierte den klinisch akuten Schub, bestimmte den aktuellen Behinderungsgrad mittels EDSS und entschied über eine dreitägige i.v. Methylprednisolon-Therapie, mit je 1g Methylprednisolon (aufgelöst in einer 500ml Infusion mit 0,9%igem NaCl) pro Tag (D0). Die erste Blutabnahme erfolgte am darauf folgenden Tag vor der

ersten Kortisongabe (D1). Die zweite Entnahme von max. 40ml Blut fand einen Tag nach der dritten Infusion statt (D4). Weitere Termine zur Blutabnahme (D30) wurden mit Wiedervorstellungen im Rahmen der MS-Therapie, verbunden.

Jede Blutentnahme erfolgte durch Venenpunktion mit Hilfe von vier 10ml BD Vacutainern™ (Preanalytical Solutions Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK). Jedes der vier Blutröhrchen enthielt 170 I.U. Low dose Heparin, so dass die Antikoagulation des Blutes gewährleistet war.

Schnellstmöglich wurden die in Raumtemperatur belassenen, blutgefüllten Vakutainer ins Labor gebracht.

## **2.2. Einschlusskriterien und Untersuchungsmaterial des Probandenkollektivs**

Zu den 16 Patienten wurden die 15 freiwillige und gesunde Probanden, in Alter und Geschlecht zu den MS-Kranken passend, ausgesucht. Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung wurde den Freiwilligen ebenfalls max. 40ml Venenblut abgenommen. Entnahme und Verwendung des Probandenblutes wurde ebenfalls im Voraus durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt.

Schnellstmöglich wurden die in Raumtemperatur belassenen, blutgefüllten Vakutainer ins Labor gebracht.

## **2.3. Isolierung der MNZ aus dem peripheren Blut**

Die gesamte MNZ-Isolierung fand unter sterilen Bedingungen statt.

Mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; Phosphate buffered saline) w/o (ohne)  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS-DULBECCO (1x), BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland) wurden die 40ml heparinisierten Blutes auf ein Gesamtvolumen von 60ml aufgefüllt. Diese 60ml mit PBS verdünnten Blutes wurden vorsichtig über 30ml Ficoll Separating Solution (BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland) geschichtet. Ficoll verfügt über eine höhere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und über eine geringere Dichte als Erythrozyten und Thrombozyten. Bei der anschließenden Zentrifugation (ROTANTA/TR, Hettich) (30 Minuten, 18 °C, 1540 rpm, 490g, Beschleunigung 60, ohne Bremse) entstand ein Gradient. Am Boden setzten sich Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten ab. Darüber blieb die Ficoll-Trennschicht unverändert. Direkt auf der Ficollschicht lagerten sich Lymphozyten und Monozyten ab und bildeten die Interphase, einen so genannten Zellrasen. Oberhalb dieser

Zellschicht befand sich das Blutserum (Abb.2.1). Die Zellen wurden aus der Interphase extrahiert und in PBS resuspendiert. Anschließend wurde das Pellet einmal zentrifugiert (ROTANTA/TR, Hettich) (10 Minuten, 18°C, 1380rpm, 400g, Beschleunigung 0, ohne Bremse). Daraufhin wurden die Zellen weitere dreimal in PBS gewaschen und zentrifugiert (Centrifuge 5804, eppendorf) (10 Minuten, Raumtemperatur (RT), 1350 rpm, Beschleunigung 9, Bremse 9). Die gewaschenen mononukleären Zellen wurden in 1ml PBS aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Neubauer<sup>CE</sup>, Marienfeld, Deutschland) bestimmt. Von dem Blutserumüberstand wurden 5-7ml (bei -20°C) eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal Nachmessungen anstellen zu können.

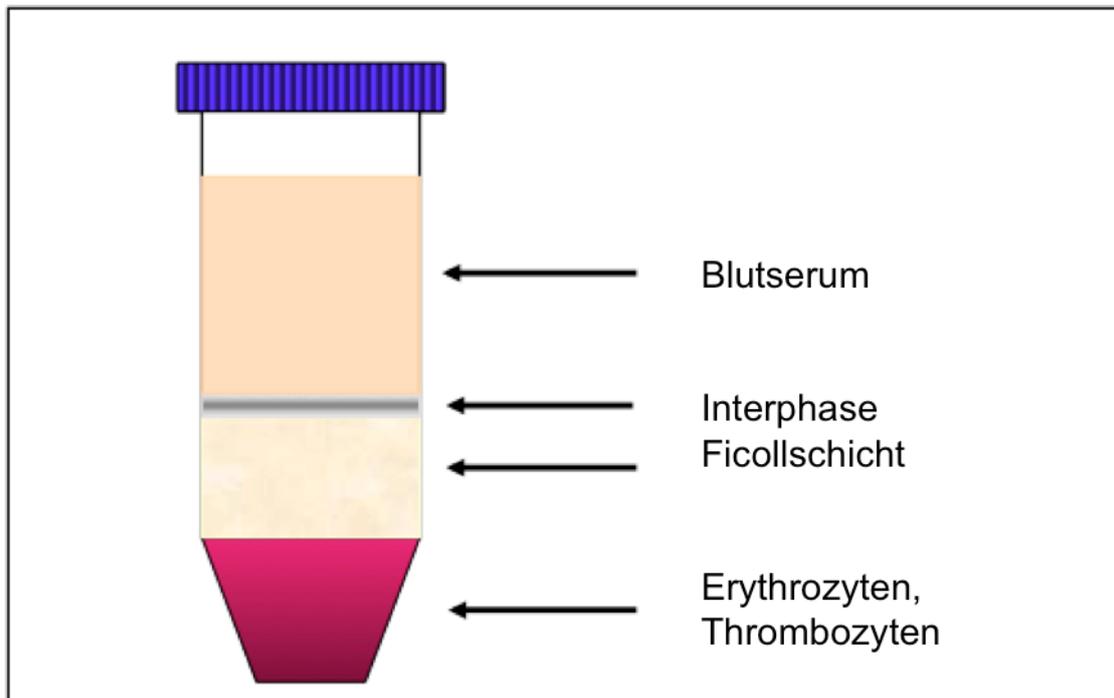


Abb. 2.1: Dichtegradientenzentrifugation von peripher entnommenem, venösen Blut in Ficoll

## 2.4. CNTF-RT-PCR

Zunächst wurden periphere mononukleäre Zellen wieder, wie bereits unter 2.1.2. beschrieben, von gesunden Probanden aus Venenblut gewonnen. Anschließend wurde die mRNA (messenger RNA) mit Hilfe der NucleoSpin® RNA II-Kits (Macherey-Nagel, U.S.A.) aus den MNZ extrahiert. Die Extraktion erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Hiernach wurde die Amplifikation der mRNA mittels PCR durchgeführt. Dabei wurde das Access RT-PCR-Kit (Promega, Madison, WI, U.S.A.) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Einröhrchen-System sowohl für die reverse Transkription als auch für die Amplifikation mittels PCR. Als Primer dienten die handelsüblichen

CNTF- und beta-Aktin Primerpaare (Promega Cat. No G5770 and G5740, entsprechend). Obwohl diese eigentlich hergestellt wurden, um die entsprechende Sequenz in Ratten-mRNA zu finden, binden sie auch die Zielsequenz beim Menschen, da diese in diesem Bereich vollkommen identisch mit der Sequenz der Ratten ist: der CNTF 5`Primer bindet an die Basenpaare 145 bis 169, der CNTF 3`Primer bindet an den komplementären Strang, der Basenpaare 313 bis 289. Jeweils 1µg mRNA wurde untersucht und die Primer wurden in einer Konzentration von 50 pmol verwendet. Die Denaturierung der RNA wurde nach 2 Minuten bei 94°C herbeigeführt. Das anschließend verwendete System greift auf die Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase (AMV RT) des AMV für die Erststrang-DNA-Synthese zurück und für die Zweitstrang-Synthese der cDNA und der DNA-Amplifikation verwendet es die thermostabile Tfl-DNA-Polymerase des *Thermus flavus*. Ein Master-Mix bestehend aus AMV/Tfl (Reaktionspuffer, dNTP-Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphat)(10mM von jeder dNTP), MgSO<sub>4</sub> (25mM), AMV Rev Transkriptase (5u/µl) und Tfl-DNA-Polymerase wurde laut dem Herstellerprotokoll zur denaturierten RNA/Primer Vorlage hinzugegeben. Nach 45 Minuten bei 48°C war die reverse Transkription abgeschlossen. Anschließend wurde die AMV-RT für 2 Minuten bei 94°C inaktiviert. Zur Synthese des Zweitstranges und zur PCR Amplifikation wurden 40 Durchläufe benötigt, nach folgendem Schema: 94°C für die Dauer von 30 Sekunden, 65°C für die Dauer von 1 Minute, 68°C für die Dauer von 1 Minute und beendet durch einen Durchlauf bei 68° C für eine Dauer von 7 Minuten. Gestoppt wurde die gesamte Reaktion im Kühlschrank bei 4°C und die Reaktionsprodukte wurden auf einem 3%igen Agarosegel analysiert.

## **2.5. Fixierung und Antikörperinkubation der MNZ**

Nachdem  $2 \times 10^6$  Zellen für jede Probe in eine Vertiefung der 96-Well Cell Culture Cluster (COSTAR® 3799) pipettiert und zentrifugiert (MULTIFUGE 3 S-R, Heraeus) (Raumtemperatur, 1 Minute, 1500rpm, Beschleunigung 9, Bremse 9) worden waren, fand der erste Färbeschritt statt. Der erste Färbeschritt bestand aus der Oberflächenantikörperfärbung mit 15 - 20 µl (Tab.2.1) anti-human Cluster of differentiation (CD; Oberflächenmarker) 3-, CD 14- und CD 19-Fluorescein isothiocyanate (FITC). Um den Anteil der T-Helferzellen zu bestimmen, wurde CD 3 verwendet. Der Antikörper gegen CD 14 erfasste den Anteil der Monozyten und CD 19 den Anteil der B-Lymphozyten. Nun wurde die 96-Well-Platte® bei Raumtemperatur für 30 Minuten abgedeckt, da die CD-FITC-Antikörper lichtempfindlich sind. Um die Erkennung der Oberflächenantigene zu gewährleisten, musste die Oberflächenfärbung vor Fixierung und Permeabilisierung durchgeführt werden.

Als nächstes wurden die Proben dreimal gewaschen. Beim Waschvorgang wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (MULTIFUGE 3 S-R, Heraeus) (Raumtemperatur, 1 Minute, 1500rpm, Beschleunigung 9, Bremse 9), der Überstand abgeschüttelt und anschließend die Zellen wieder in PBS resuspendiert. Nach dem dritten Waschen wurden die Zellen in 2%igem PFA (SIGMA; P-6148, Steinheim, Germany) /PBS für eine halbe Stunde lichtgeschützt auf Eis fixiert.

Nach der Fixation wurden die Zellen wieder einmal in PBS gewaschen. Danach wurden sie 30 Minuten in 90%igem Methanol (Carl ROTH, Karlsruhe, Germany) lichtgeschützt auf Eis permeabilisiert, so dass die Antikörper gegen intrazelluläre Proteine in die Zelle gelangen konnten. Während der Permeabilisation wurden die Antikörperverdünnungen für die intrazelluläre Färbung vorbereitet (Tab.2.1). Die Verdünnung erfolgte mit 4% fötalem Kälberserum (FCS; fetal calf serum) (PAN<sup>TM</sup>, BIOTECH GmbH) in PBS. FCS diente zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen. Nach dem dreimaligen Waschen der permeabilisierten Proben folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern für 30 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern, welche in 4% FCS an die primären Antikörper binden und durch ihre Fluoreszenz-Markierung das Färbesignal erzeugen.

An die Färbung mit den Sekundärantikörpern schlossen sich zum letzten Mal drei Waschgänge in PBS an. Hiernach wurden die Zellen nach dem letzten Zentrifugieren in FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) aufgenommen und konnten nun im Durchflusszytometer (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS - Gerät (FACS-Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)) untersucht werden, wie unter 2.7 beschrieben.

| Antikörpername  | Verdünnung                                 | Firma, Stadt /Land  |
|---|--|---|
| <b>CD 3</b> FITC-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody  | 10-20µl/2x10 <sup>6</sup><br>Zellen        | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA   |
| <b>CD 14</b> FITC-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody | 10-20µl/2x10 <sup>6</sup><br>Zellen        | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA   |
| <b>CD 19</b> FITC-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody | 10-20µl/2x10 <sup>6</sup><br>Zellen        | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA   |
| <b>Rabbit polyclonal anti-PAG</b>                                 | 1/250                                      | Von Vaclav Horejsi, (Insitute of Molecular Genetics, Academy of Science of the Czech Republik, Prague) zur Verfügung gestellt.                        |
| Rabbit anti-Brain Derived Neurotrophic Factor polyclonal antibody | 1/100<br>10µg/mL                           | Chemicon International (jetzt Millipore), Temecula, California, USA   |
| Rabbit anti-human Ciliary Neurotrophic Factor                     | 1/50<br>0,5µg/mL                           | Chemicon International, Temecula, California, USA   |
| Rabbit polyclonal to <b>TNF α</b> ab6671                          | 1/50<br>1mg/ml                             | Abcam, Cambridge, UK  |
| AK gegen induzierbare <b>NO-Synthetase</b>                        | 1/200                                      | Biomol (SA-200) (jetzt ENZO-Life Sciences)  |
| MHC I   | 1/1<br>Hybrid-Überstand                    | Klon-W6/32 von Dr. Jon Lindquist (Institut of Immunology, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Germany) zur Verfügung gestellt.                   |
| MHC II  | 1/50<br>aufgereinigter<br>Hybrid-Überstand | Klon-L 243 +NaN <sub>3</sub> von Dr. Jon Lindquist (Institut of Immunology, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Germany) zur Verfügung gestellt. |
| Alexa Fluor®546 goat anti-rabbit IgG (H+L) highly cross absorbed  | 1/200<br>2mg/mL                            | Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA  |
| Alexa Fluor®546 goat anti-mouse IgG (H+L) highly cross absorbed   | 1/200<br>2mg/mL                            | Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA  |

Tab.2.1: Antikörper , die zur Färbung der mononukleären Blutzellen benutzt wurden.

## **2.6. FACS-Analysen**

Die Durchflusszytometrie wurde am FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mittels Cell-Quest-Pro Software durchgeführt. Messungen wurden anhand der Bereiche der lebenden Zellen kalkuliert (Gate1). Nacheinander erfolgte die Setzung der Messbereiche: Zunächst für die Signalintensität anhand des sekundären Antikörpers alleine (Gate 2 für Sekundärantikörper Anti Rabbit und Gate 3 für Sekundärantikörper Anti Mouse). Für die Proben, bei denen eine Zweifachfärbung mit Sekundär- und Oberflächenantikörper (CD 3, CD 14, CD 19) vorgenommen wurde, wurde anhand der doppelt gefärbten Probe Sekundärantikörper Anti Rabbit plus CD 3-FITC-Oberflächenantikörper ein letztes Gate 4 gesetzt. Um die sekundär gefärbten Zellen zu messen, wurde die Fluoreszenz des Alexa-546-Antikörpers gemessen. Das Hintergrundrauschen in doppelt gefärbten Proben mit Sekundärantikörper und CD 14- und CD19-FITC war relativ hoch, daher wurden auch die Abweichungen der Lokalisation des Maximums (peak channel shift) angegeben.

## **2.7. Immunzytochemie**

Das 12-Felder-Gläschen (Marienfeld, SUPERIOR, Laboratory Glassware) wurde zweimal in doppelt destilliertem Wasser gespült, so dass sich der blaue Farbstoff, der dazu dient, die adhäsive Wirkung des Felder-Gläschens zu schützen, herunterlöste. Danach wurde das Glasblättchen einmal in PBS (GIBCO™, DULBECCO`S, w/o NaHCO<sub>3</sub>, Cat.No.:21300-058, Paisley, Scotland, UK) gewaschen. Da nur  $1,5 \times 10^5$  /20µl Zellen pro Feld gebraucht wurden, aber ein Volumen von 20µl auf jedes Feld aufgetragen werden musste, wurde die Zellsuspension mit PBS auf 20µl Volumen aufgefüllt und anschließend auf die Felder pipettiert. Die Zellen wurden ebenso wie unter 2.1.2. beschrieben von gesunden Probanden gewonnen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei vier Grad Celsius in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS, wurden die Zellen für eine Stunde in 20µl CD-Oberflächenantikörper inkubiert und anschließend wurden die Gläschen drei Mal je fünf Minuten in PBS gewaschen. Im folgenden Arbeitsschritt wurden die Zellen mit 1%igem PFA (SIGMA; P-6148, Steinheim, Germany) in PBS 20 Minuten fixiert, gefolgt von einmaligem Waschen für fünf Minuten in PBS. An dieser Stelle war es möglich, die Proben für ca. 24 Stunden in PBS bei 4° C zu belassen.

Hierauf folgte die fünf minütige Permeabilisation mit Triton x 100 (Packard 6008084, United technologies PACKARD, S.A. Zürich, Schweiz) mit anschließenden dreimaligen Waschen in PBS für jeweils fünf Minuten.

Hiernach wurde mit einprozentigem bovines Serumalbumin (BSA) (AURION BSA-CTM, Aurion, Wageningen, Holland) für die Dauer von 15 Minuten geblockt. Nach 15 Minuten wurde das BSA vorsichtig mit einem Saugsystem abgezogen. Nun wurde Primärantikörper in BSA in den gleichen Verdünnungen wie bei der FACS-Färbung auf die Felder pipettiert, dort bei Raumtemperatur für eine Stunde belassen und anschließend wieder dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen.

Nun wurden die Zellen wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper in einprozentigem BSA inkubiert und wieder dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen.

Nach Abschluss der Färbeprozesse wurde zunächst Einbettmedium (Einbettmedium: 2,45ml glycerin for fluorescent microscopy (Merck 1.04095), 2,45ml Vectashield, 10mg Dabco (=1,4 diazabicyclo-octano, Sigma D-2522) in 100µl PBS (pH 8,9)) um die Felder herum aufgetragen, anschließend ein Deckglas aufgebracht und dieses mit Nagellack luftdicht abgeschlossen.

Als letztes wurde das Deckglas beschriftet und bei vier Grad Celcius gelagert.

## **2.8. Statistische Methoden**

Um die Varianzen zu vergleichen, wurde der F-Test verwendet. Datenpaare wurden mit Hilfe von T-Tests analysiert (ungepaart, zweiseitig). Außerdem wurde die Welch`s Korrektur für die ungleichen Varianzen angewandt. Als Mindestlevel für die statistische Signifikanz in einem zweiseitigen Test, wurde 5% gewählt. Wo notwendig, zum Beispiel beim Vergleich von Patienten gegenüber Probandendaten, wurde die Bonferroni-Korrektur für mehrfaches Testen angewandt. Zum Vergleich der Expressionen von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$  und iNOS wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Dieser wurde auch angewandt, als der MSSS mit in die Berechnungen einfluss.

Alle statistischen Tests wurden mit der GraphPadPrism®5 Software berechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientenrekrutierung

Über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren wurden 16 Erwachsene mit RRMS im akuten Schub und 15 gesunde Probanden im Alter und Geschlecht passend zu den Patienten untersucht. Dabei handelte es sich um acht Frauen und acht Männer (Tab.3.1). Das Altersmittel betrug 33,8 (21-47) Jahre, die durchschnittliche Erkrankungszeit 9,4 Jahre (4-17) (Standardabweichung (SD) 1,17). Die durchschnittliche Zeit nach Schubbeginn betrug bei der ersten Blutabnahme 10,03 Tage (SD 2,4).

Fünf der Patienten waren zum Untersuchungstermin ohne Therapie, einer von ihnen hatte früher eine Behandlung mit Copaxone- und Mitoxantron erfahren. Sieben Patienten wurden zum Untersuchungstermin mit Interferon- $\beta$ 1a (Rebif®), einer mit Interferon- $\beta$ 1a (Avonex®) und zwei mit Interferon- $\beta$  1b (Betaferon®) behandelt.

Ziel der Arbeit war es, aufzuzeigen, in wie weit die trophischen Faktoren, BDNF und CNTF, durch die immunmodulatorische Therapie beeinflusst werden. Außerdem sollte gezeigt werden, wie sich die proinflammatorischen Faktoren TNF $\alpha$  und iNOS im akuten Schub beziehungsweise unter immunmodulatorischer Therapie verhalten. Es galt herauszufinden, ob immunmodulatorische Substanzen proinflammatorische Botenstoffe im akuten Schub rechtzeitig vermindern können ohne dabei die Sekretion trophischer Faktoren zu reduzieren.

| Patient    | Alter (Jahre) | Geschlecht | Basistherapie   | Erkrankungsdauer in Jahren | Tage bis Schubtherapie | MSSS |
|------------|---------------|------------|---|----------------------------|------------------------|------|
| 1*         | 43            | M          | Rebif 44µg  | 17                         | 8                      | 3,0  |
| 2*         | 23            | M          | Keine   | 14                         | 4                      | 0,5  |
| 3          | 28            | M          | Keine   | 14                         | 5                      | 4,3  |
| 4          | 24            | M          | Avonex®   | 5                          | 4                      | 0,3  |
| 5          | 29            | W          | Rebif 44µg  | 4                          | 31                     | 4,3  |
| 6**        | 46            | W          | Keine   | 12                         | 14                     | 6,9  |
| 7          | 21            | M          | Rebif 44µg  | 4                          | 14                     | 4,3  |
| 8          | 46            | M          | Rebif 44µg  | 8                          | 4                      | 6,1  |
| 9          | 25            | M          | Rebif 44µg  | 5                          | 7                      | 1,3  |
| 10         | 31            | W          | Rebif 44µg  | 10                         | 15,5                   | 1,5  |
| 11*        | 36            | W          | Betaferon   | 12                         | 2                      | 6,0  |
| 12*        | 26            | M          | Betaferon   | 4                          | 4                      | 6,2  |
| 13*        | 47            | W          | Rebif 44µg  | 14                         | 7                      | 5,2  |
| 14         | 31            | W          | Rebif 44µg  | 8                          | 4                      | 4,6  |
| 15         | 44            | W          | Keine   | 15                         | 7                      | 5,1  |
| 16         | 41            | W          | Keine   | 4                          | 30                     | 1,5  |
| Mittelwert | 33,8          | 8 W; 8M    | 8x Rebif 44µg<br>1x Avonex®<br>2x Betaferon<br>5x Keine | 9,4                        | 10,03                  | 3,8  |

**Tab.3.1: Charakteristika der rekrutierten Patienten**

\* Patienten, die additional Kortison erhielten zur Basisschubtherapie von 1g/Tag für die Dauer von 3 Tage

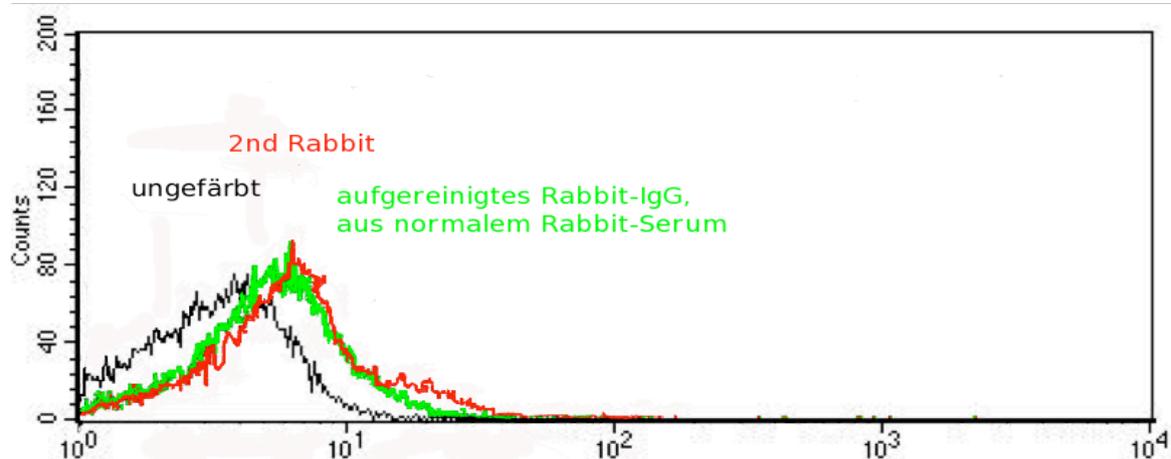
\*\* Patientin Nr.6 befand sich in der sekundär chronisch progredienten Form der MS

### 3.2. Etablierung der FACS-Färbungen

Zur Analyse der zu untersuchenden Faktoren wurde die FACS-Analyse ausgewählt, da es mit dieser Methode möglich ist die Zellen qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Für die Färbungen an fixierten und permeabilisierten Zellen wurden hochspezifische Antikörper verwendet. Diese Antikörper wiesen sowohl eine gut dokumentierte Immunreaktivität in der Immunhistochemie als auch keine Kreuzreaktivität mit verwandten Proteinen auf. Um die passende Antikörperkonzentration zu bestimmen, wurde auf die Herstellerangaben für die Immunhistochemie zurückgegriffen und diese in Test-Versuchen optimiert. Somit konnte die deutlichste Verschiebung der Fluoreszenzintensität in der FACS-Messung erzielt werden. Zunächst wurden die Antikörperverdünnungen an MNZ gesunder Probanden optimiert. Als Negativkontrollen diente zum

Einen eine Färbung mit der aufgereinigten Immunglobulin G-Fraktion aus normalem Kaninchenserum zur Kontrolle der Spezifität der Primärantikörper, zum Anderen die jeweiligen Sekundärantikörper als Kontrolle für deren unspezifische Bindung an die Zellen. Als Positivkontrolle diente die Färbung gegen PAG, ein ubiquitär exprimiertes intrazelluläres Transmembranadapterprotein.

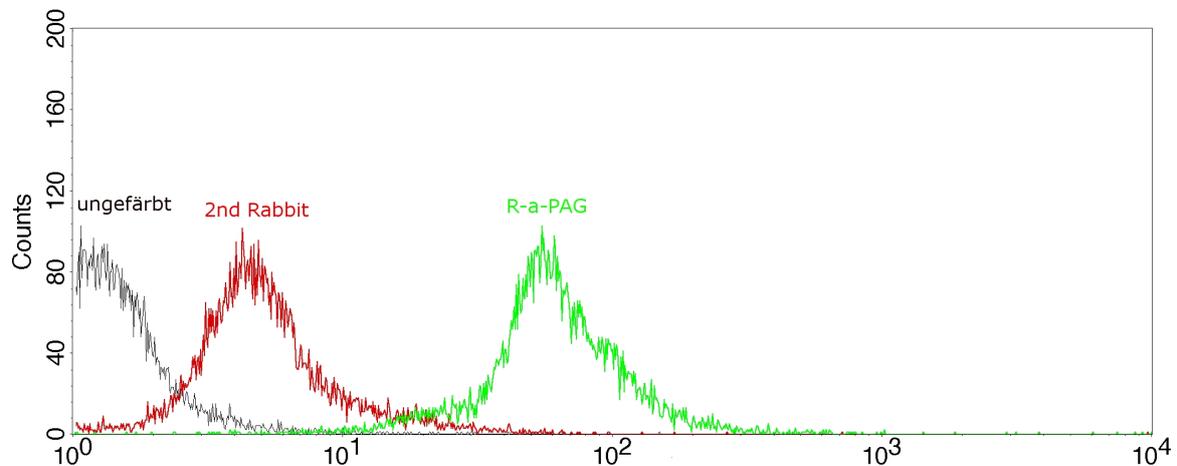
Abb. 3.1. zeigt das Signal für ungefärbte Zellen und die Hintergrund-Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper. Die Inkubation mit dem aufgereinigten Kaninchen-Immunglobulin aus normalem Kaninchenserum und nachfolgender Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper zeigt keine weitere Erhöhung der Fluoreszenzintensität.



**Abb. 3.1: Spezifitätskontrolle für den Primärantikörper**

MNZ von freiwilligen Versuchspersonen wurden entweder mit dem Sekundärantikörper Anti-Rabbit (Alexa Fluor®546 Ziegen IgG) oder mit aufgereinigtem Rabbit-IgG aus normalem Kaninchenserum mit einer Konzentration von 0.4 µg/ml gefärbt. Anschließend folgte die Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem Antikaninchen-Zweitantikörper mittels 4% FCS zur initialen Blockung und während der Inkubation mit dem Antiserum. Die FACS-Profile überschneiden sich.

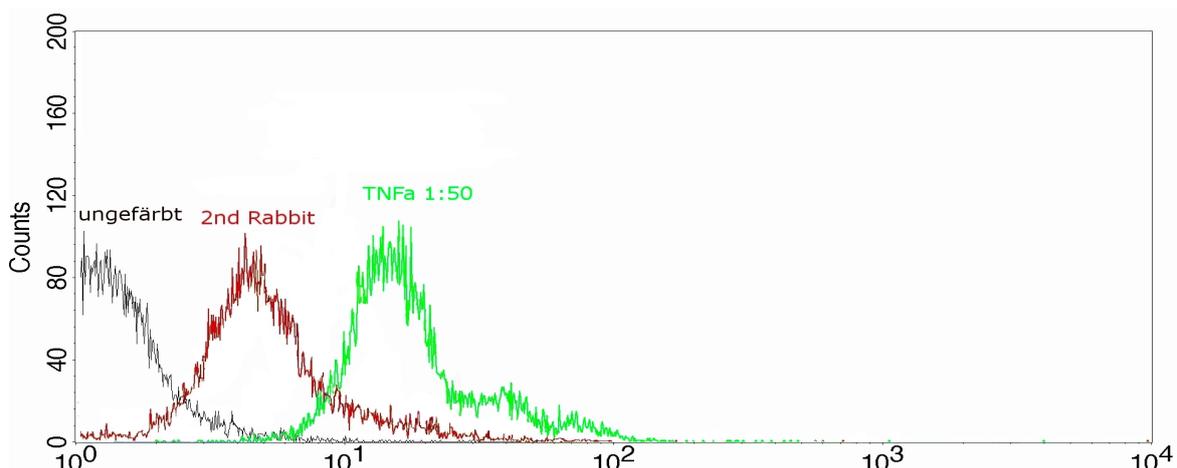
Abb.3.2 zeigt die Hintergrund-Fluoreszenzintensität von mit Sekundärantikörper inkubierten Zellen sowie die deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität der gegen PAG gefärbten Positiv-Kontrolle.



**Abb. 3.2: Kontroll-FACS-Profil**

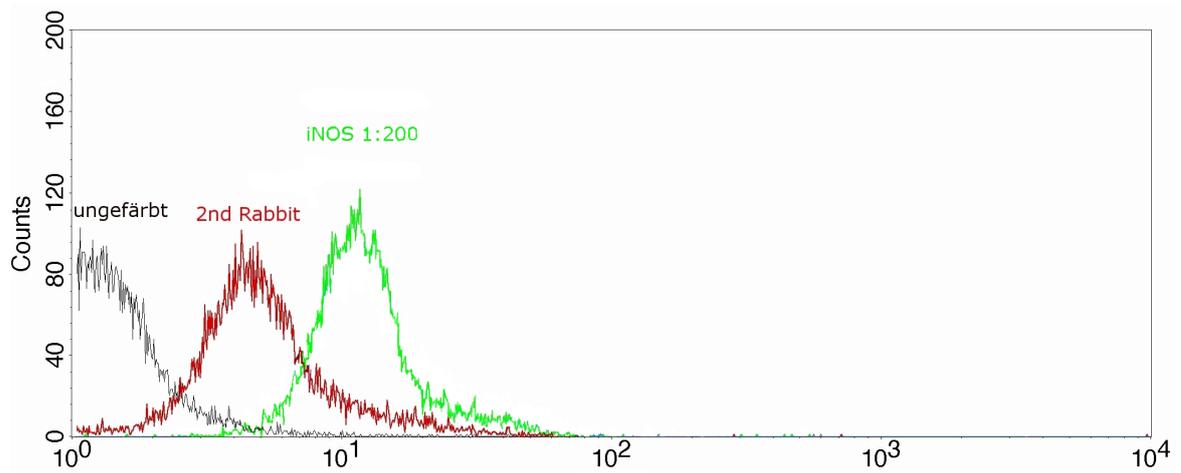
FACS-Profil von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundärantikörper allein inkubiert (Anti-Rabbit-Alexa 546) sowie mit der Positivkontrolle Rabbit-anti-PAG.

Ausgehend von den für fluoreszenzmikroskopische Visualisierung empfohlenen Konzentrationen testeten wir verschiedene Verdünnungen für  $\text{TNF}\alpha$ , iNOS, BDNF und CNTF und wählten die Konzentration mit der besten detektierbaren Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Abb.3.3-3.7). Anti-MHCI wurde als Hybridom-Kulturüberstand unverdünnt verwendet (Abb. 3.8).



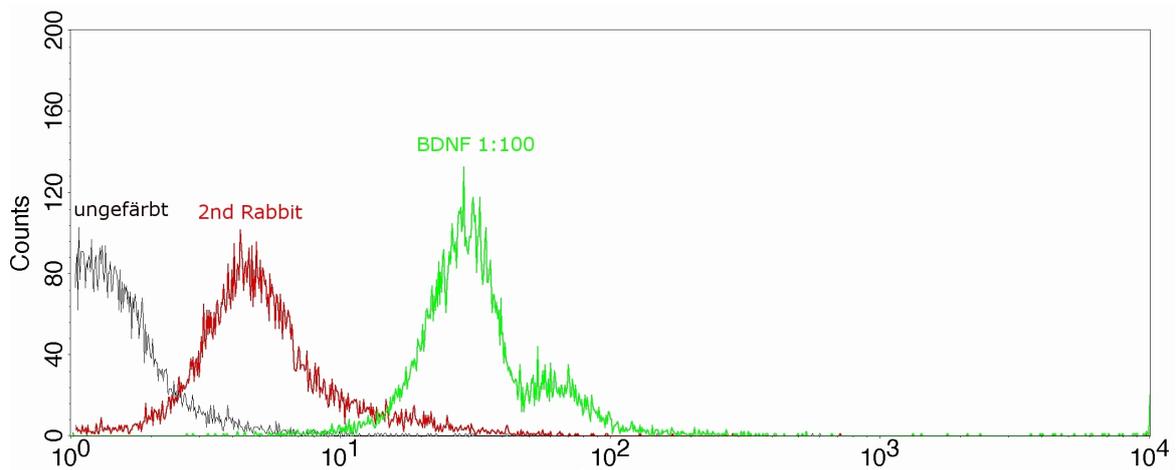
**Abb. 3.3: Optimierung der  $\text{TNF}\alpha$ -Färbung**

FACS-Profil von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundärantikörper inkubiert (hier Anti-Kaninchen-Alexa 546= 2nd Rabbit) sowie mit der angegebenen Konzentration von Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antiserum gefärbt.



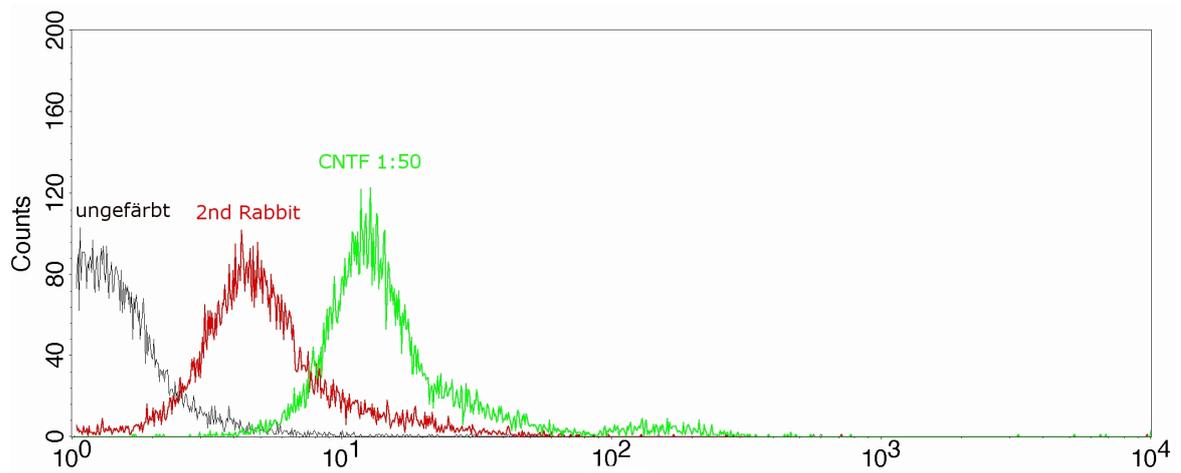
**Abb. 3.4: Optimierung der iNOS-Färbung**

FACS-Profile von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundärantikörper inkubiert (hier Anti-Kaninchen-Alexa 546= 2nd Rabbit) sowie mit der angegebenen Konzentration von Anti-iNOS-Antiserum gefärbt.



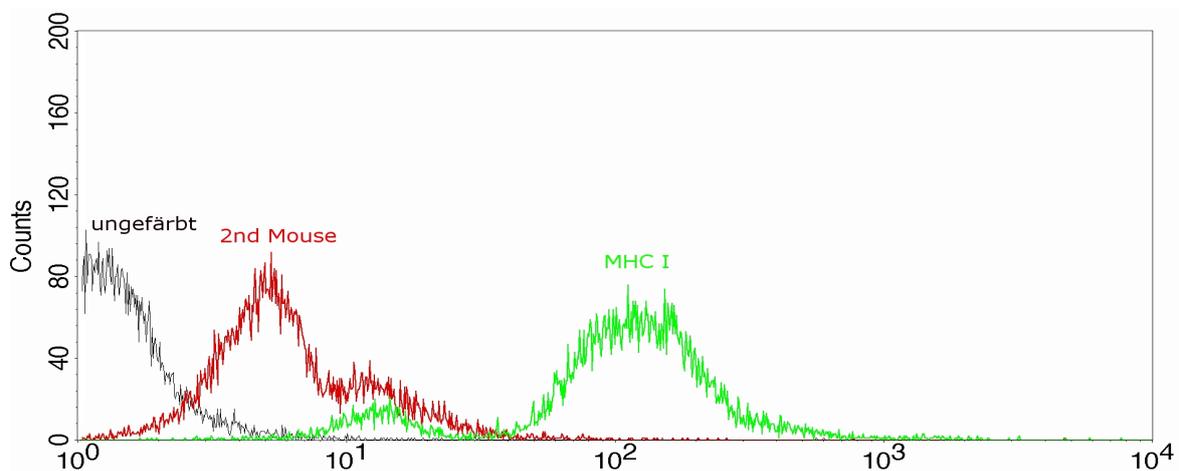
**Abb. 3.5: FACS-Profile für eine BDNF-Färbung**

FACS-Profile von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundärantikörper inkubiert (hier Anti-Rabbit-Alexa 546) sowie mit der angegebenen Konzentration von Anti-BDNF-Antiserum gefärbt.



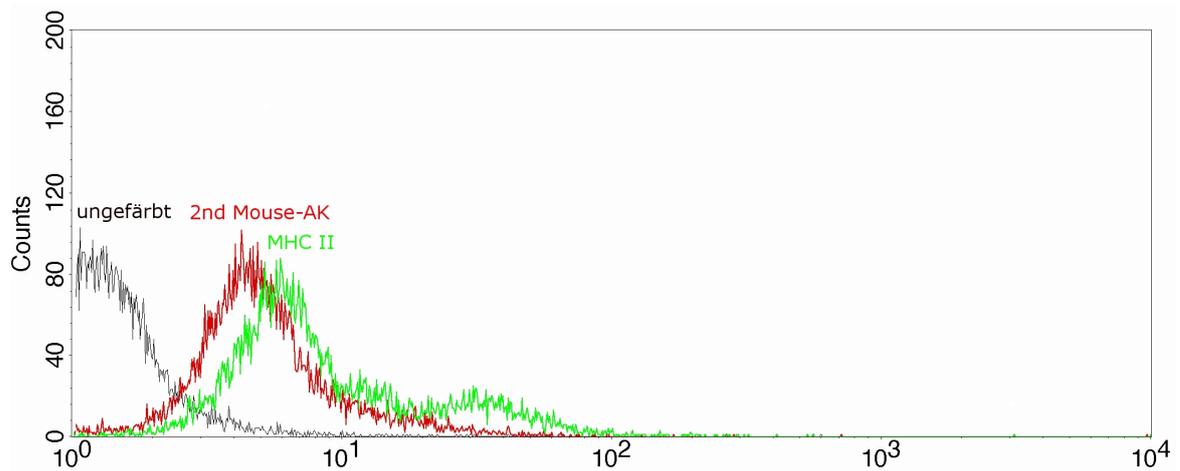
**Abb. 3.6: FACS-Profil für eine CNTF-Färbung**

FACS –Profile von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundäntikörper inkubiert (hier Anti-Rabbit-Alexa 546) sowie mit der angegebenen Konzentration von Anti-CNTF-Antiserum gefärbt.



**Abb. 3.7: FACS-Profil der MHC I-Färbung**

FACS –Profile von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundäntikörper inkubiert (hier Anti-Maus-Alexa 546= 2nd Mouse) sowie mit Hybridom-Überstand des Klons W32/6.



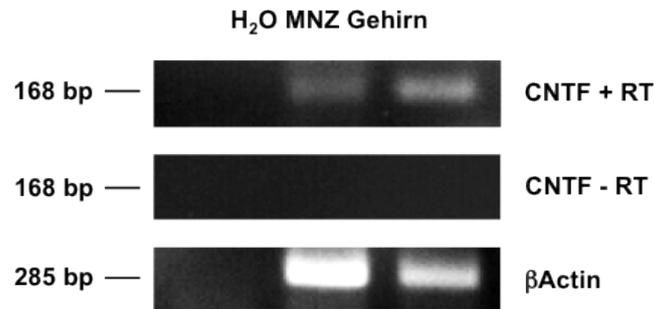
### Abb. 3.8: FACS-Profil der MHC II-Färbung

FACS-Profil von MNZ gesunder Probanden ungefärbt, nur mit Sekundärantikörper inkubiert (hier Anti-Maus-Alexa 546= 2nd Mouse) sowie mit aufgereinigtem Immunglobulin aus Hybridom-Überstand des Klons L224 gefärbt.

Bei Färbung mit dem Antikörper gegen MHC II (Abb.3.8) ist eine diskrete Verschiebung der maximalen Fluoreszenzintensität für die Hauptpopulation sowie eine geringe Zellzahl mit höherer Fluoreszenzintensität zu sehen. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass MHC II nur auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert ist. Aufgrund der geringen Zahl gefärbter Zellen wurde die MHC II-Färbung nicht an allen Patienten durchgeführt.

### 3.3. Expression von CNTF und BDNF in MNZ

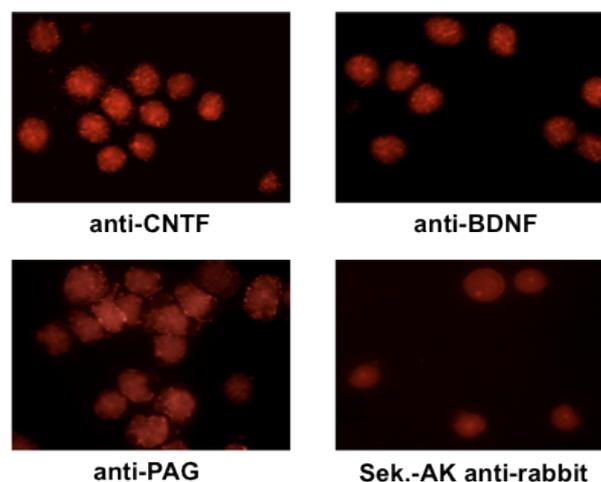
Mit Hilfe der RT-PCR konnte die spezifische Expression von CNTF aus peripheren MNZ im peripheren Venenblut von gesunden Probanden nachgewiesen werden (Abb.3.9). Das erwartete PCR-Produkt der CNTF-spezifischen Primer mit einer Länge von 168 Basenpaaren konnte sowohl aus mRNA von MNZ als auch als Positivkontrolle genutztem humanem Hirngewebe amplifiziert werden. Das 285 Basenpaare lange PCR-Produkt der  $\beta$ -Actin-Primer konnte ebenfalls sowohl aus MNZ als auch aus humanem Hirngewebe amplifiziert werden. Die  $\beta$ -Actin Bande diente als Ladekontrolle für die eingesetzte mRNA-Menge.



**Abb. 3.9: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF in MNZ. RT-PCR.**

Aus humanen peripheren mononukleären Blutzellen wurde mRNA isoliert. Die 168bp-Bande zeigte die CNTF mRNA-Expression sowohl in diesen peripheren Blutzellen als auch in der post mortem menschlichen Gehirnzelllinie, die als Kontrolle diente. Parallel durchgeführte Kontrollreaktionen ohne reverse Transkriptase ergaben keinerlei PCR-Produkte. Somit war die RNA-Präparation frei von Kontamination mit genomischer DNA. RT-PCR für Beta-Actin zeigte die Beladung des Gels.

In der Immunzytochemie konnte durch ein Anti-CNTF-Antiserum ein gepunktetes intrazelluläres Färbemuster gezeigt werden. CNTF besitzt kein Signalpeptid und ist im Zytoplasma lokalisiert. Das Färbemuster von CNTF, welches in (Abb.3.10) gezeigt wird, stimmt mit dem zytoplasmatischen Muster, welches von Dutta et al. (2007) in humanem Gehirn gezeigt wurde, überein. Die BDNF-Färbung mittels Antiserum, welches in der FACS-Analyse verwendet wurde, zeigt ebenfalls ein gepunktetes Färbemuster. Dies entspricht dem von Kerschensteiner et al. (1999) und Stadelmann et al. (2002) beschriebenen Färbemuster. Die Färbung gegen den zytoplasmatischen Teil des transmembranen Adapterproteins PAG diente als Positivkontrolle für die gelungene Permeabilisation (Abb.3.10).



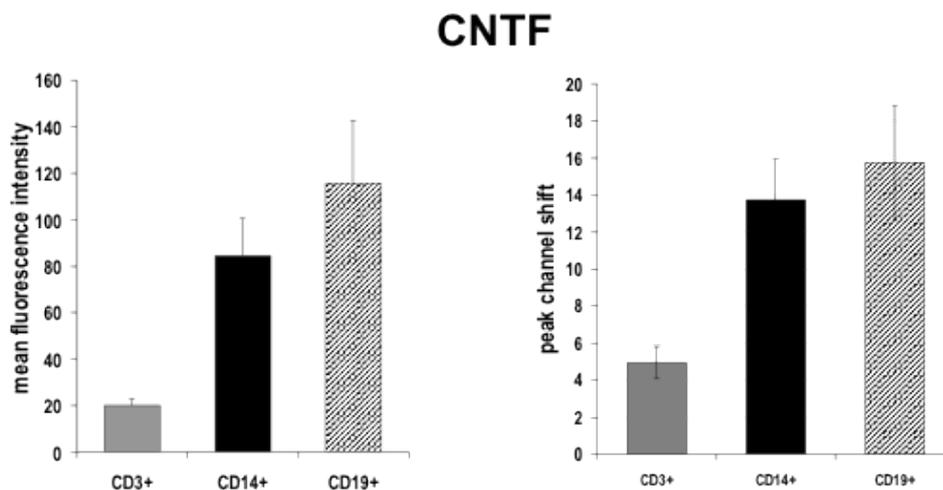
**Abb. 3.10: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF in MNZ. Immunzytochemie.**

Immunzytochemie von fixierten und permeabilisierten peripheren mononukleären Blutzellen, welche ein gepunktetes intrazelluläres Färbemuster für CNTF zeigt, ähnlich dem Färbemuster von BDNF. Die deutliche Färbung des zytoplasmatischen Teils von PAG (Phosphoprotein assoziiert mit glykophospholipid-angereicherten Mikrodomänen) zeigt die erfolgreiche Permeabilisation. Als Negativkontrolle diente die alleinige Färbung des Sekundärantikörpers.

Als Nächstes wurde ein Protokoll zur immunzytochemischen Färbung und FACS-Analyse von peripheren mononukleären Zellen unter der Verwendung des gleichen CNTF-Antiserum, das auch in der Immunzytochemie gezeigt wurde, etabliert. Als Immunogen für dieses Kaninchenimmenserum diente rekombinantes humanes CNTF. Vom Hersteller wurde beschrieben, dass dieses Serum auch die CNTF-Aktivität in der Zellkultur hemmt und damit das CNTF-Protein in seiner nativen Konformation erkennen kann. Wie bereits in Abb. 3.6 gezeigt, wurde eine deutliche Verschiebung der maximalen Fluoreszenzintensität nach Färbung von MNZ mit Anti-CNTF-Antiserum hervorgerufen.

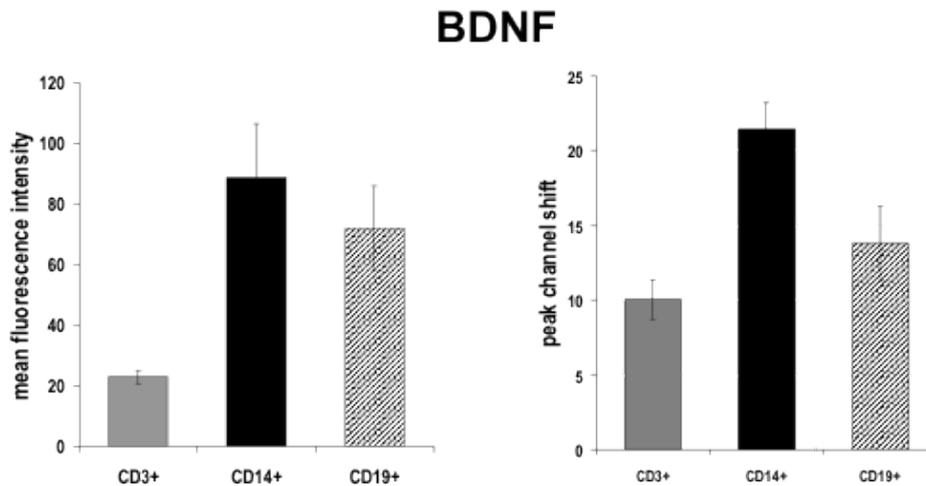
Abb.3.11 zeigt eine Doppelfärbung mit Hilfe populationspezifischer Marker: CD3 für T-Zellen, CD14 für Monozyten und CD19 für B-Zellen und somit die gemessene Expression in allen drei Zelltypen. Die Proben mit CD14- und CD19-Färbung wiesen ein hohes Hintergrundrauschen auf, was möglicherweise auf die Oberflächenexpression von Fc-Rezeptoren zurückzuführen ist. Aufgrund dieses Rauschens waren die Mittelwerte dieser Proben weniger verlässlich als die Proben mit der CD3-Oberflächenfärbung.

Beim Vergleich der Abb.3.11 und Abb.3.12 wurden die BDNF- und CNTF-positiven Zellen einander gegenübergestellt. Es wurde deutlich, dass die CNTF- ebenso wie die BDNF-Expression in T-Zellen gesunder Probanden gering, aber dennoch deutlich messbar ist. In den Doppelfärbungen mit Anti-CD19 und –CD14 konnten erhöhte CNTF-Werte in B-Zellen und Monozyten dokumentiert werden. Dagegen konnten die höchsten BDNF-Expressionen in Monozyten und mittlere Werte in B-Zellen gefunden werden.



**Abb. 3.11: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF. Doppelfärbung CNTF.**

Doppelfärbung mit Anti-CNTF-Antiserum und Antikörpern gegen CD3, CD 14 und CD 19, um die jeweilige Expression in allen drei MNZ Subpopulationen in unterschiedlichen Niveaus zu zeigen. Es werden die mittlere Fluoreszenzintensität und die Verschiebung der maximalen Fluoreszenzintensität (peak channel shift) gezeigt.



**Abb. 3. 12: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF. Doppelfärbung BDNF.**

Doppelfärbung mit anti-CNTF-Antiserum und Antikörpern gegen CD3, CD14 und CD19, um die jeweilige Expression in allen drei MNZ Subpopulationen in unterschiedlichen Niveaus zu verdeutlichen. Es werden die mittlere Fluoreszenzintensität und die Verschiebung der maximalen Fluoreszenzintensität (peak channel shift) gezeigt.

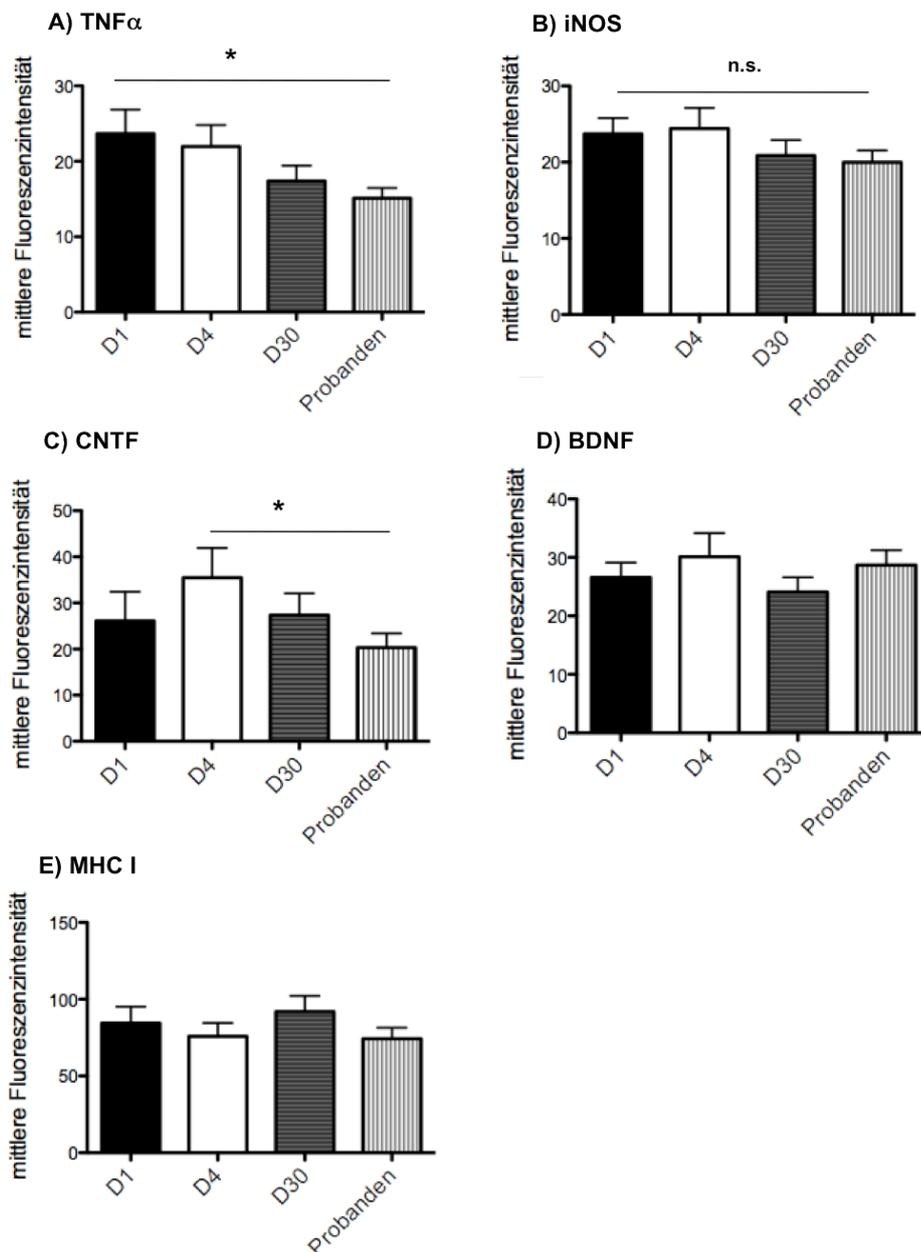
### 3.4. CNTF-, BDNF-, TNF $\alpha$ - und iNOS-Expression bei Patienten mit Multipler Sklerose

Um die Expression von CNTF, BDNF, TNF $\alpha$  und iNOS zu messen, wurde eine intrazelluläre Färbemethode mit Antikörpern gegen TNF $\alpha$ , iNOS, BDNF und CNTF etabliert, wie unter 3.2. beschrieben. Zur Quantifizierung wurde die FACS-Analyse genutzt. Somit konnte die intrazelluläre Konzentration der getesteten Proteine in frisch isolierten, peripheren mononukleären Zellen *ex vivo* gemessen werden, ohne durch Kultivierungsartefakte beeinflusst zu werden. Mit Hilfe dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die Expression von TNF $\alpha$  in MS-Patienten im akuten Schub im Vergleich zu gesunden Probanden (Abb.3.13 A) um 52% gesteigert ist. Diese Wertsteigerung war signifikant ( $p=0,0497$ ). Überraschender Weise blieben die TNF $\alpha$ -Werte auch nach dreitägiger Kortisontherapie hoch (+34% im Vergleich zu gesunden Probanden), am Tag 30 waren die TNF $\alpha$ -Expressionswerte nur noch 12% höher. Ein ähnlicher Trend lies sich auch beim Vergleich der iNOS-Werte von MS-Patienten mit Werten von Gesunden zeigen. Jedoch waren die Veränderungen mit 17% höheren Werten am Tag 1 im Vergleich zu den Gesunden (Abb.3.13 B), deutlich geringer als bei TNF $\alpha$ . Unmittelbar nach der Steroidtherapie lies sich bei iNOS, ebenso wie bei TNF $\alpha$ , keine Reduktion der intrazellulären Proteinkonzentration am Tag 4 messen. CNTF zeigte am Tag 1 eine hohe Varianz im Vergleich zu den Probanden und im Mittel keine erhöhten Werte, jedoch war nach der dreitägigen Methylprednisolongabe die intrazelluläre Konzentration um 86% höher als die Werte der Gesunden. Dieser Anstieg war signifikant ( $p=0,0457$ ). Am Tag 30

waren die Konzentrationen von CNTF bei Patienten und Probanden wieder annähernd gleich (Abb.3.13 C).

Für BDNF konnten für keinen der Analysezeitpunkte quantitative Unterschiede zwischen MS-Patienten und Probanden gefunden werden (Abb.3.13 D). Auch für MHCI, welches als potentiell durch Immunmodulation beeinflussbares Genprodukt als Kontrolle diente, waren keine Expressionsunterschiede nachweisbar (Abb.3.13 E).

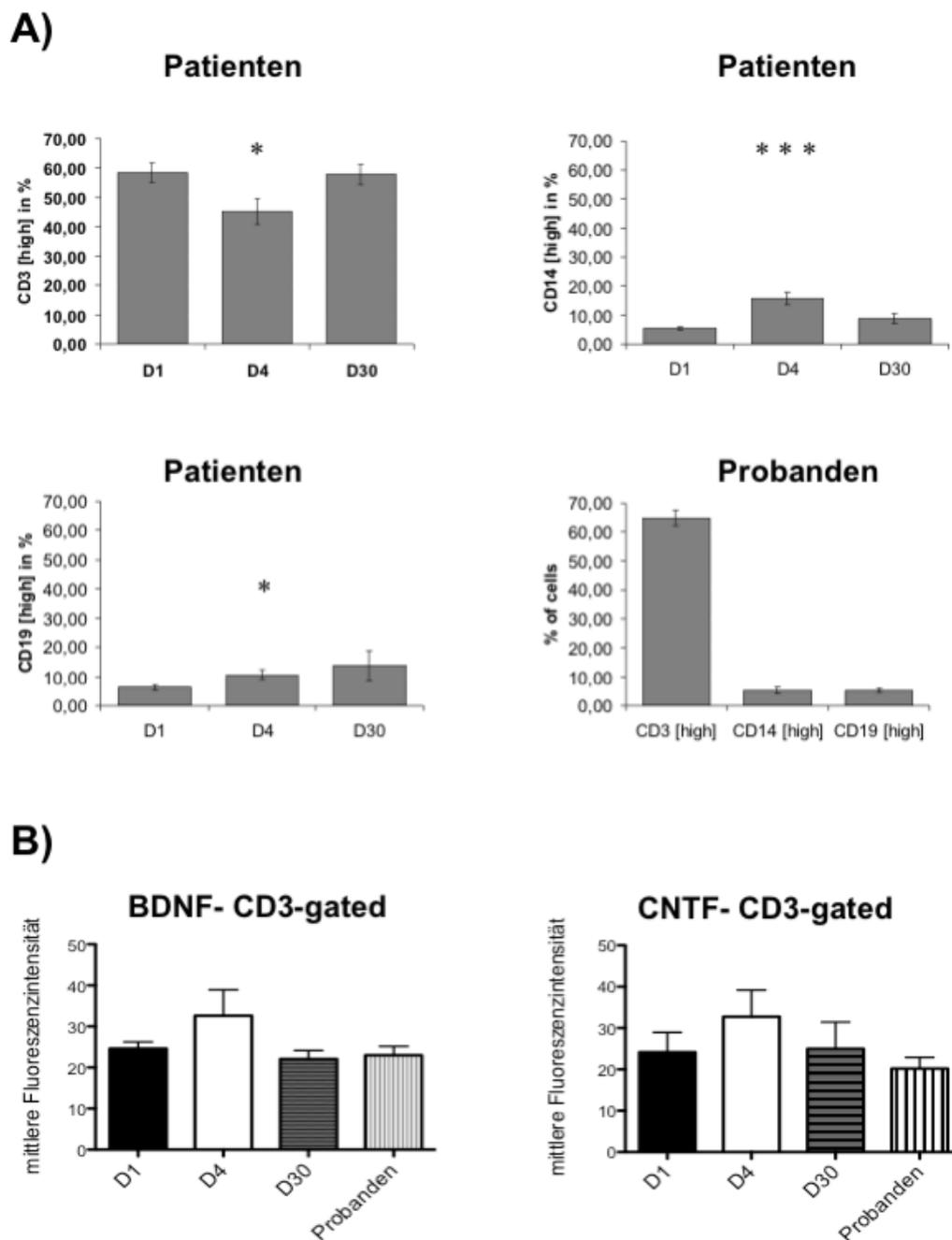
Interessanterweise war zu sehen, dass Patienten- und Probandendaten eine ähnliche Varianz bei iNOS, BDNF und MHC I zeigten, wohingegen Unterschiede in den Varianzen für TNF $\alpha$  und CNTF zwischen Patienten und Gesunden deutlich wurden. Dies könnte darauf hinweisen, dass entweder die MS selbst und/oder die MS-Therapie zu unterschiedlichen Wertniveaus dieser beiden Faktoren führen.



**Abb. 3.13: Expression von TNF $\alpha$ , iNOS, CNTF, BDNF und MHC I bei Patienten mit MS**

MNZ wurden von MS-Patienten isoliert, welche sich im akuten Schub befanden. Das Blut wurde am Tag 1 (D1) unmittelbar vor einer dreitägigen intravenösen Methylprednisolonbehandlung, am Tag 4 (D4) -einen Tag nach der Prednisolontherapie- und am Tag 30 (D30, Basiswert) nach der ersten Blutentnahme abgenommen. Periphere mononukleäre Zellen von gesunden Probanden, die im Alter und Geschlecht zu den Patienten passten, wurden als Kontrollen analysiert. Es wurde eine immunzytochemische Färbung an fixierten und permeabilisierten Zellen vorgenommen. Zur Färbung dienten Antisera gegen **A)** TNF $\alpha$ , **B)** iNOS, **C)** CNTF, **D)** BDNF. Die Charakterisierung des CNTF-Antiserum (bzw. aller Antikörper am Anfang dieses Kapitels) wurde bereits in Abb.3.10 gezeigt. Die Oberflächenfärbung für **E)** MHC I wurde sowohl vor der Fixierung als auch vor der Permeabilisation ausgeführt. Gezeigt werden die mittleren Fluoreszenzintensitäten +/- dem Standardfehler. Der F-Test zeigte ungleiche Varianzen zwischen Patienten und Gesunden bei TNF $\alpha$  und CNTF. Students T-Test (zweiseitig, ungepaart) mit der Welch- Korrektur für ungleiche Varianzen lies bei Patienten im Vergleich zu Probanden einen signifikanten Anstieg sowohl von TNF $\alpha$  am D1 ( $p < 0,05$ ) als auch von CNTF am D4 ( $p < 0,05$ ) erkennen.

Analysen der Leukozytenoberflächenmarker CD3, CD19 und CD14 für T-, B-Zellen und Monozyten zeigten, dass die Therapie mit Kortikosteroiden einen Einfluss auf die Verteilung der Leukozytensubpopulationen hatte, welche mit der MNZ-Präparation isoliert wurden. Die CD3-positiven T-Zellen waren von 59 auf 45% reduziert, während CD14-positive Makrophagen von 5,4 auf 15,6% anstiegen und sich die CD 19-positiven B-Zellen von 6,3 auf 10,6% erhöhten. Es lies sich kein Unterschied zwischen den Werten an Tag 1 von Patienten und den Messungen von gesunden Probanden feststellen. Das lässt darauf schließen, dass der akute Schub selbst zu keiner Veränderung der Leukozytensubpopulationen führte. Doppelfärbungen mit populationsspezifischen Oberflächenmarkern und Anti-BDNF und Anti-CNTF zeigten, dass die Veränderungen, die in Abb. 3.13 für alle MNZ gezeigt wurden, sich auch in den CD3-positiven Zellen zeigen. Allerdings war die erhöhte Expression an Tag 4 nicht signifikant, evtl. aufgrund der relativ geringen Patientenzahlen. Ein ähnlicher Aufwärtstrend wie für CNTF wurde für BDNF in den CD 3-positiven T-Zellen gezeigt, wenn auch noch weniger deutlich als die Werterhöhung bei CNTF. Daher waren diese Werte für BDNF ebenfalls nicht signifikant (Abb. 3.14 A und B). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Expressionsdaten der gesamten MNZ vor allem die Expression in CD3-positiven T-Zellen repräsentieren.



**Abb. 3.14: Glukokortikoidbehandlungseffekt auf Leukozytensubpopulationen**

**A)** MNZ und Kontrollen wurden einer Doppelfärbung mit Anti-BDNF oder Anti-CNTF und jeweils Anti-CD3, -CD14, -CD19 unterzogen. Anschließend wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten der FACS-Analysen gegeneinander aufgetragen, wobei die Wachstumsfaktoren auf der Y-Achse und Oberflächenmarkern auf der X-Achse ihren Platz fanden. Die Daten wurden mit Hilfe einer Quadranten-Analyse untersucht. Im oberen und unteren rechten Quadranten befindliche Zellen wurden zusammengezählt als CD3/CD4/CD 19 [high] deutlich positive Zellen. Gezeigt werden alle Mittelwerte von allen Patienten/ Kontrollen +/- SEM (Standardfehler). Der Students T-Test zeigte eine deutliche Abnahme der CD 3 [high] exprimierenden Zellen am D4 im Vergleich zu D1 ( $p=0,02$ ); eine deutliche Zunahme sowohl von CD14 [high] exprimierenden Zellen am D4 im Vergleich zu D1 ( $p=0,0003$ ) als auch von CD 19 [high] exprimierenden Zellen am D4 verglichen mit D1 ( $p=0,03$ ). Es wurde kein deutlicher Unterschied zwischen Patienten am D1 und gesunden Kontrollen unter Berücksichtigung der Leukozytensubpopulationen gefunden. **B)** Gezeigt werden hier die mittleren Fluoreszenzintensitäten von FACS-Analysen aus Färbungen mit Anti-CNTF und Anti-BDNF der CD3-positiven Zellen. Die Mittelwerte von CD14- und CD19-positiven Zellen konnten, aufgrund zu hohen Hintergrundrauschens des Sekundäntikörpers und vermutlich auch aufgrund der Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen und Makrophagen, nicht evaluiert werden.

### 3.5. Der Einfluss der Interferon $\beta$ -Therapie

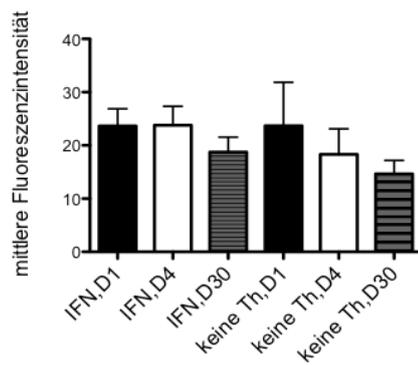
Um die Begleiteffekte der Immunmodulation durch hochdosierte INF- $\beta$ -Therapie sowohl während des akuten Schubes als auch für die Grundwerte zu bestimmen, wurde das Patientenkollektiv stratifiziert. Dabei wurde unterschieden zwischen jenen Patienten, die hochdosiert IFN $\beta$  (entweder Interferon- $\beta$  1a (Rebif®) 44  $\mu$ g 3x/Woche oder Interferon- $\beta$  1b (Betaferon®) 8 MIU jeden zweiten Tag) (n=10) und Patienten die zum Untersuchungszeitpunkt keine immunmodulatorische Therapie erhielten. Der Patient, dem Interferon- $\beta$  1a (Avonex®) als immunmodulatorische Therapie zum Untersuchungszeitpunkt zuteil wurde, wurde in die Interferon-Stratifizierung nicht aufgenommen.

Bei Patienten ohne immunmodulatorische Therapie zeigte sich für die TNF $\alpha$ -Konzentrationen leicht reduzierte Werte an D4 nach Methylprednisolon-Therapie und an D30, bei den IFN $\beta$ -behandelten Patienten an D30, statistisch waren diese Abwärtstrends aber in den beiden Patientengruppen nicht signifikant, was möglicherweise auf die relativ kleine Anzahl an untersuchten Patienten zurückzuführen ist (Abb.3.15 A).

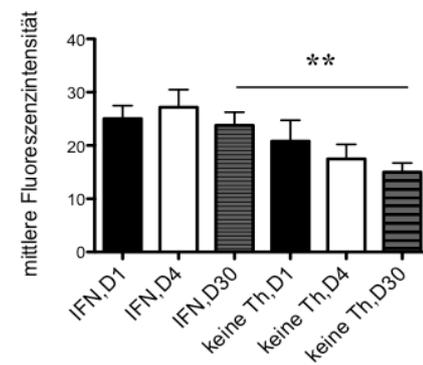
Für iNOS zeigten sich an Tag 4 ebenfalls etwas reduzierte Werte in Patienten ohne immunmodulatorische Therapie im Vergleich mit INF- $\beta$ -behandelten Patienten. Am Tag 30 war diese Reduktion signifikant (p=0,004) hoch (Abb.3.15 B).

Für CNTF wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen gemessen, möglicherweise aufgrund der geringen Patientenzahl (Abb.3.14 C). Die erhöhten Werte für CNTF an Tag 4 nach Methylprednisolon wurden jedoch nur in den Patienten ohne immunmodulatorische Therapie deutlich. Das lässt darauf schließen, dass dieser Glukokortikoideffekt durch die IFN- $\beta$ -Therapie maskiert wurde. Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass Patienten ohne immunmodulatorische Therapie am Tag 30 geringere BDNF-Werte aufwiesen als die Patienten mit IFN- $\beta$ -Therapie (p=0,002). Am Tag 1 und Tag 4 waren die Werte von Patienten ohne immunmodulatorische Therapie den Werten der Patienten mit Therapie gleich (Abb.3.15 D). Das könnte darauf hinweisen, dass IFN- $\beta$ -behandelte Patienten eine erhöhte BDNF-Expression zwischen akuten Schüben zeigen. Jedoch ist keine zusätzlich erhöhte Ausschüttung von BDNF während eines akuten Schubes zu verzeichnen.

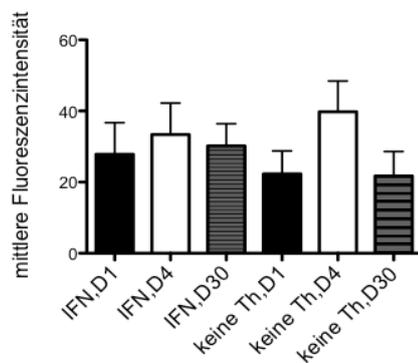
Die MHC I-Expression war bei Patienten mit INF- $\beta$ -Therapie höher als bei Patienten ohne diese Therapie. Dies entsprach unseren Erwartungen und diente infolgedessen als Bestätigung der korrekten Stratifizierung (Abb.3.15 E).

A) TNF $\alpha$ 

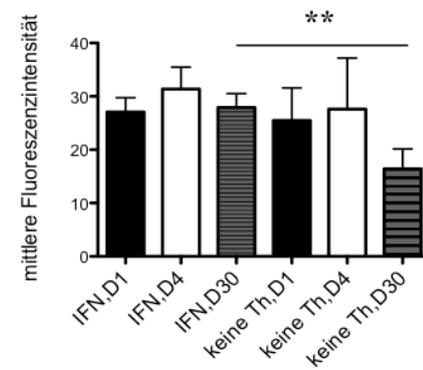
## B) iNOS



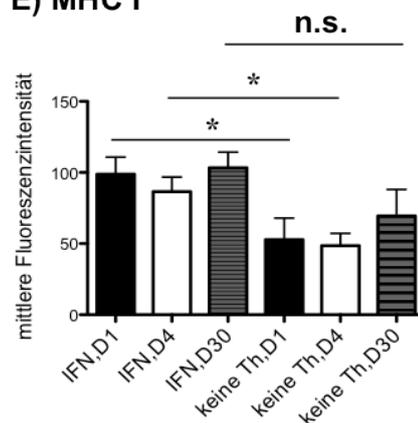
## C) CNTF



## D) BDNF



## E) MHC I



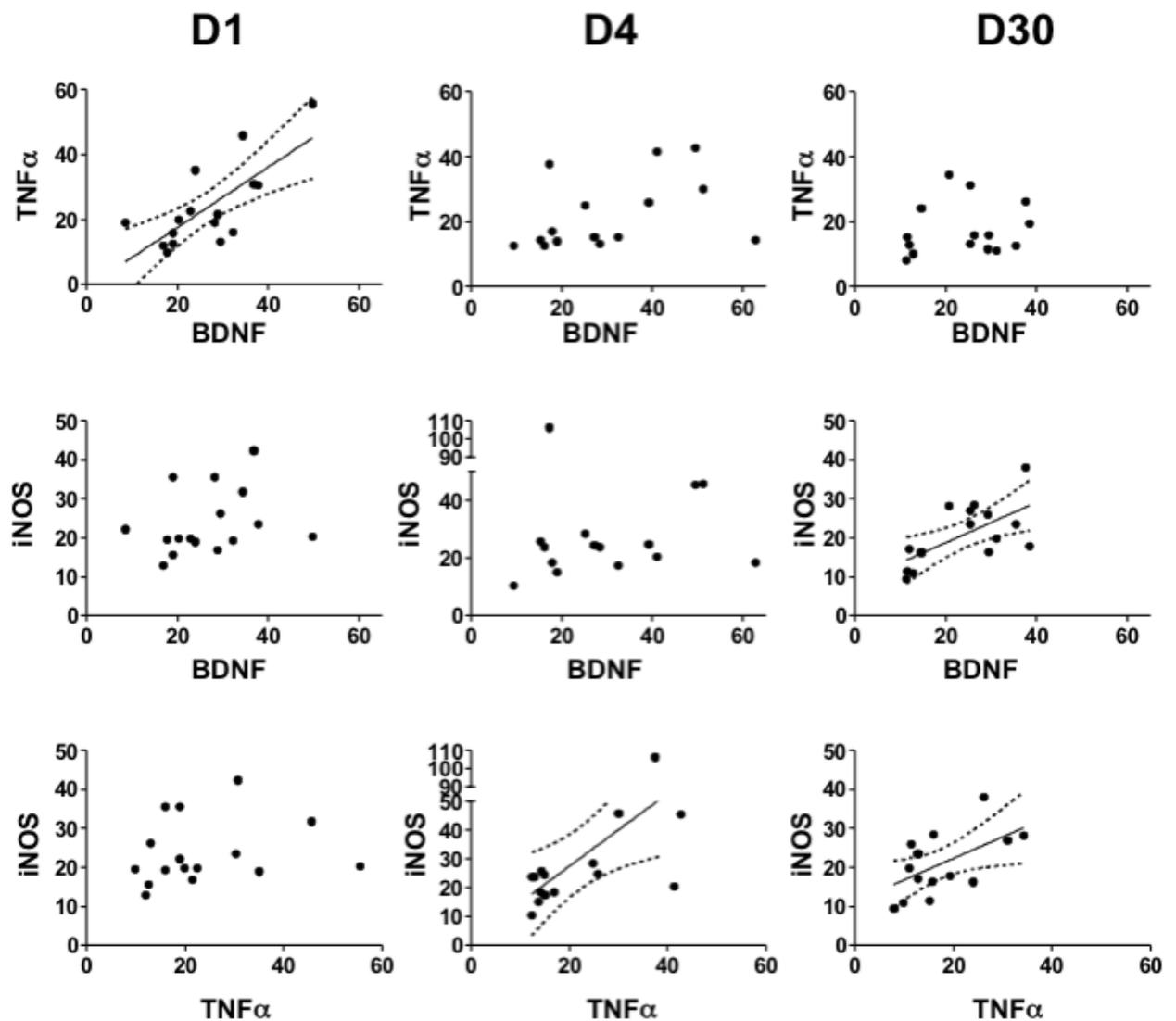
**Abb. 3.15: Effekte der hoch-dosierten IFN- $\beta$ -Therapie bei MS-Patienten innerhalb der Expressionsniveaus von TNF $\alpha$ , iNOS, CNTF, BDNF und MHC I**

Die Patienten wurden anhand ihrer Therapie in zwei Gruppen aufgeteilt: entweder erhielten sie keine immunmodulatorische Therapie oder sie erhielten hoch-dosiert IFN- $\beta$ . Dabei wurden die Expressionen, die bereits in Abb.3.12 gezeigt wurden, erneut einzeln im Hinblick auf die Therapie analysiert. Gezeigt werden die Ergebnisse für die Antikörper **A)** TNF $\alpha$ , **B)** iNOS, **C)** CNTF, **D)** BDNF und **E)** MHC I. Zur statistischen Analyse wurde der Student's T-Test (zweiseitig, ungepaart) mit Welch's Korrektur für ungleiche Varianzen herangezogen.

### 3.6. Korrelation von TNF $\alpha$ - und BDNF-Werten während des akuten Schubes

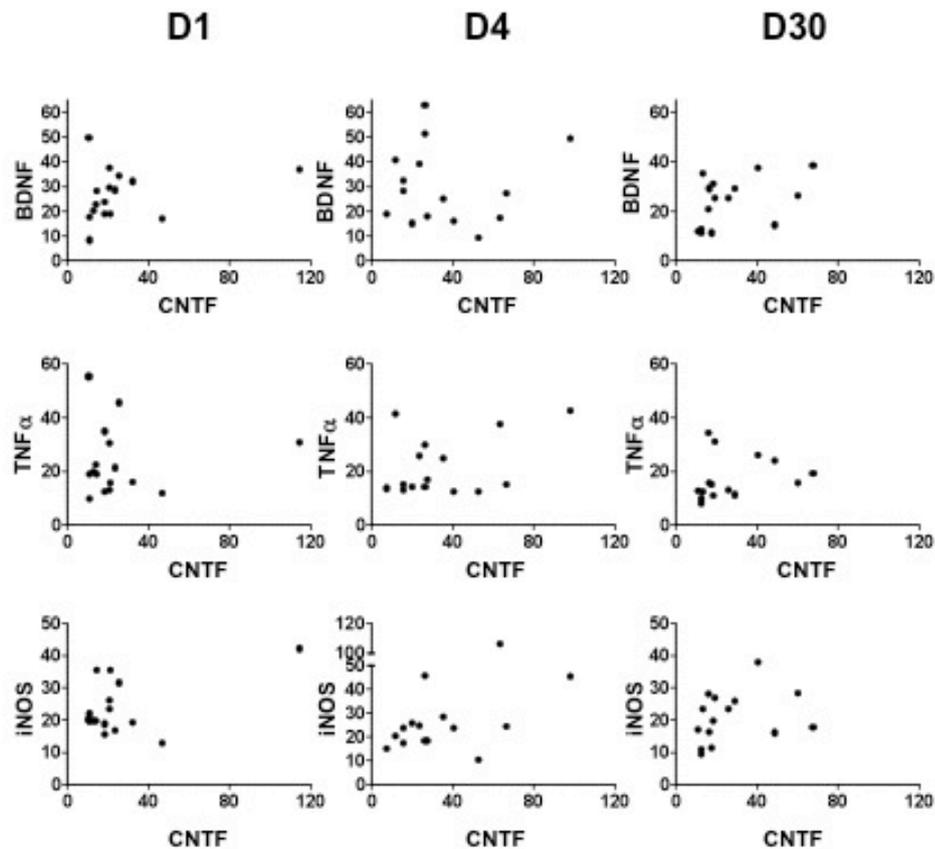
Wir spekulierten, dass TNF $\alpha$  eine Rolle bei der vermehrten Expression von BDNF spielt. Daher stellten wir die einzelnen TNF $\alpha$ -Werte in Abhängigkeit der jeweiligen BDNF-Werte dar und fanden eine signifikant positive Korrelation am Tag 1 (Pearson  $r=0,73$ ,  $p=0,001$ ) (Abb.3.16). Die lineare Regressionsanalyse wurde mit  $R^2=0,54$  angewendet. Für Tag 4 nach Kortisontherapie und Tag 30 wurde keine Korrelation gefunden. Um zu testen, ob es Hinweise dafür gibt, dass BDNF an der Regulation von iNOS beteiligt ist, wurden die individuellen BDNF-Werte in Abhängigkeit von den jeweiligen iNOS-Werten aufgezeichnet (Abb.3.16). Hier wurde eine schwache Korrelation für Tag 30 (Pearson  $r=0,64$ ,  $p=0,01$ ) deutlich. Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur für mehrfache Tests (18 Vergleiche in Abb.3.16 und Abb.3.17) wurde jedoch deutlich, dass diese Korrelation nicht signifikant war.

Als die TNF $\alpha$ - und iNOS-Expressionen in Abhängigkeit voneinander dargestellt (Abb.3.16) wurden, zeigten sich schwache Korrelationen für Tag 4 (Pearson  $r=0,6$ ,  $p=0,02$ ) und Tag 30 (Pearson  $r=0,56$ ,  $p=0,03$ ). Nach Korrektur für mehrfaches Testen waren die Korrelationen wiederum nicht signifikant.



**Abb. 3.16: Korrelation der individuellen Expression von BDNF und TNF $\alpha$  im akuten Schub**

Es wurden die Expressionsniveaus (mittlere Fluoreszenzintensität) von BDNF eines jeden Patienten denen von TNF $\alpha$  und iNOS gegenübergestellt. Untersucht wurden die Werte an den Entnahmetagen D1, D4 und D30. Außerdem wurden die iNOS-Expressionen auch denen von TNF $\alpha$  gegenübergestellt. Während eines akuten Schubes (D1) korrelierten die BDNF-Werte mit den TNF $\alpha$ -Expressionen (Pearson  $r=0,73$ ,  $p=0,001$ ). BDNF- und iNOS-Konzentrationen zeigen eine leichte Korrelation am D30 (Pearson  $r=0,64$ ,  $p=0,01$ ), iNOS und TNF $\alpha$  korrelieren leicht am D4 (Pearson  $r=0,60$ ,  $p=0,02$ ) und am D30 (Pearson  $r=0,56$ ,  $p=0,03$ ). Um die korrelierenden Datensätze darzustellen, wird die lineare Regressionkurve mit der 95% Konfidenzbande gezeigt.

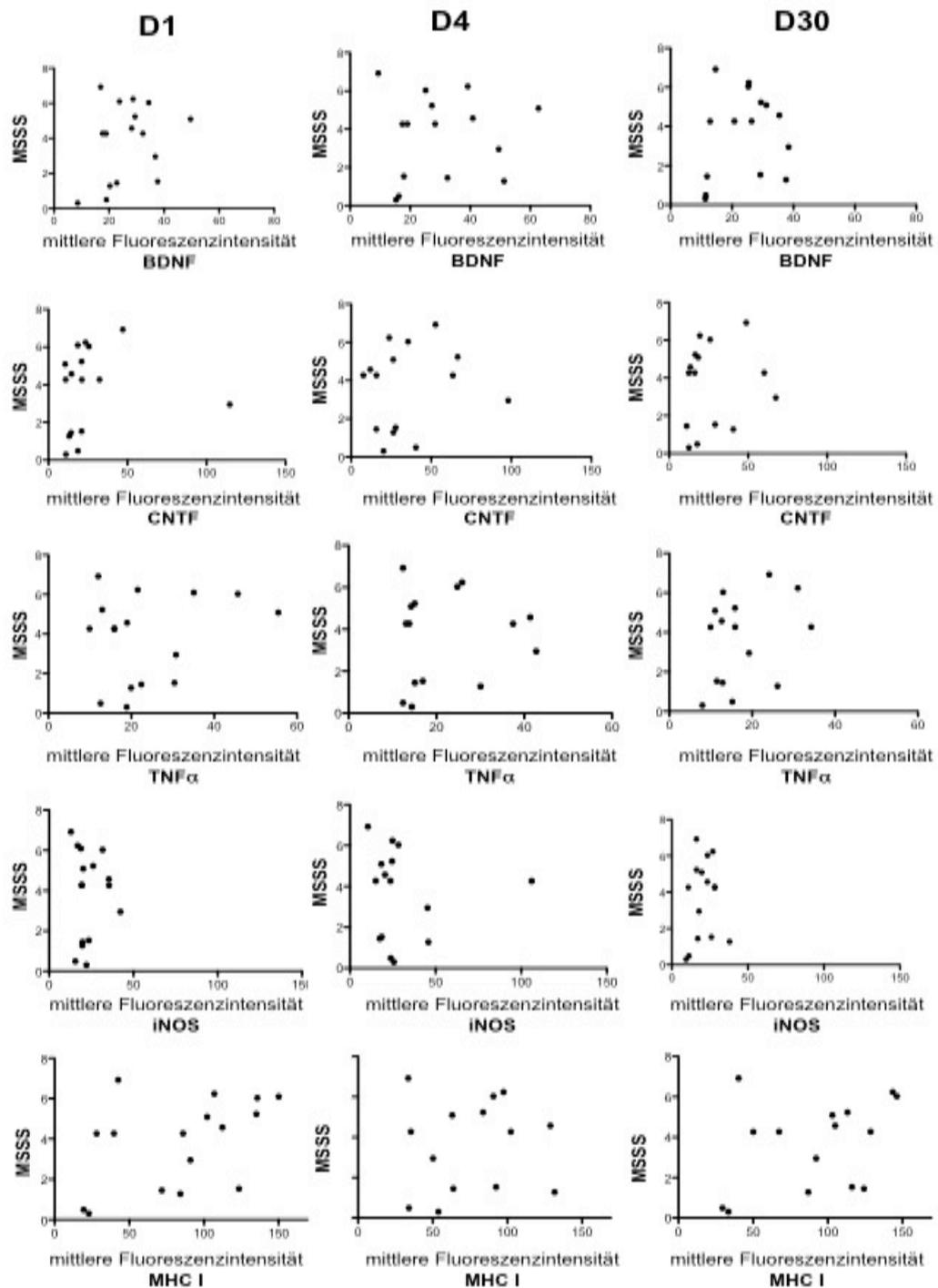


**Abb. 3.17: Keine Korrelation der individuellen Expression von BDNF/CNTF, CNTF/TNF $\alpha$  und CNTF/iNOS**

Es wurden die Expressionsniveaus (mittlere Fluoreszenzintensität) von CNTF eines jeden Patienten denen von BDNF, TNF $\alpha$  und iNOS gegenübergestellt. Untersucht wurden die Werte an den Entnahmetagen D1, D4 und D30. Es wurde keine Korrelation gefunden.

### 3.7. Individuelle Werte für TNF $\alpha$ -, iNOS-, CNTF- und BDNF-Werte korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung

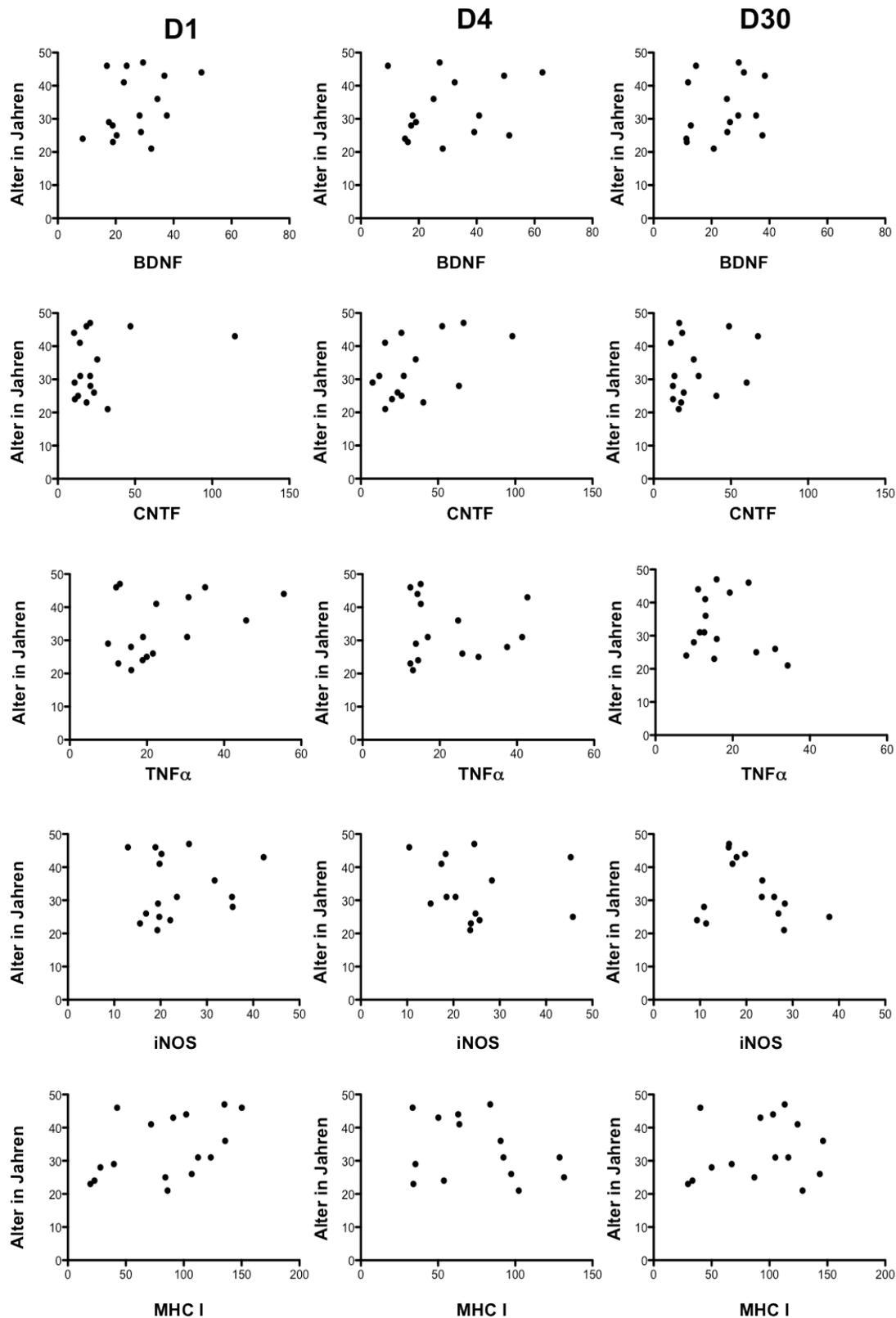
Des Weiteren wurde die Frage gestellt, ob es eine positive Korrelation zwischen der Expression der proinflammatorischen, potentiell zytotoxischen Faktoren TNF $\alpha$  und iNOS mit dem Schweregrad der MS oder eine negative Korrelation mit der Expression von Neurotrophinen aus peripheren Immunzellen gibt. Für beide Korrelationen wurde der Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) jedes Patienten in Abhängigkeit seines individuellen Expressionslevels von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I zu den drei Messzeitpunkten (Tag1, Tag 4, Tag 30) dargestellt. Es konnten keine Korrelationen gefunden werden (Abb.3.18).



**Abb. 3.18: Individuelle Wertniveaus von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I zeigen keine Korrelation mit dem MSSS**

Es wurden die Expressionsniveaus (mittlere Fluoreszenzintensität) von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I am D1, D4 und D30 eines jeden Patienten den MSSS-Werten gegenübergestellt. Es konnte bei keinem der Patienten eine Korrelation gefunden werden.

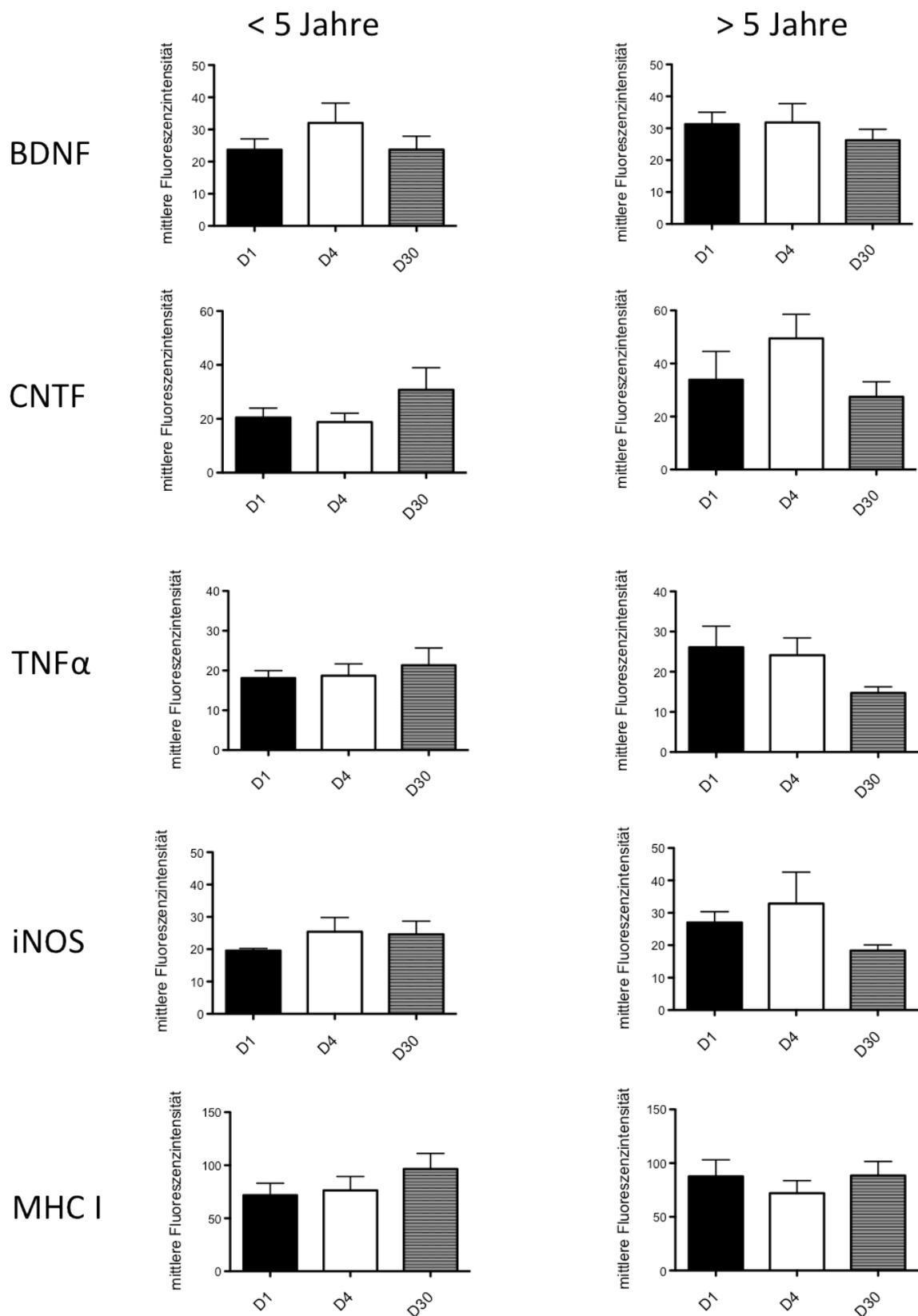
Zusätzlich konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen der Expression proinflammatorischer und neurotrophischer Mediatoren und dem Alter der Patienten festgestellt werden (Abb.3.19).



**Abb. 3.19: Keine Korrelation der Expression von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I mit dem Alter der Patienten**

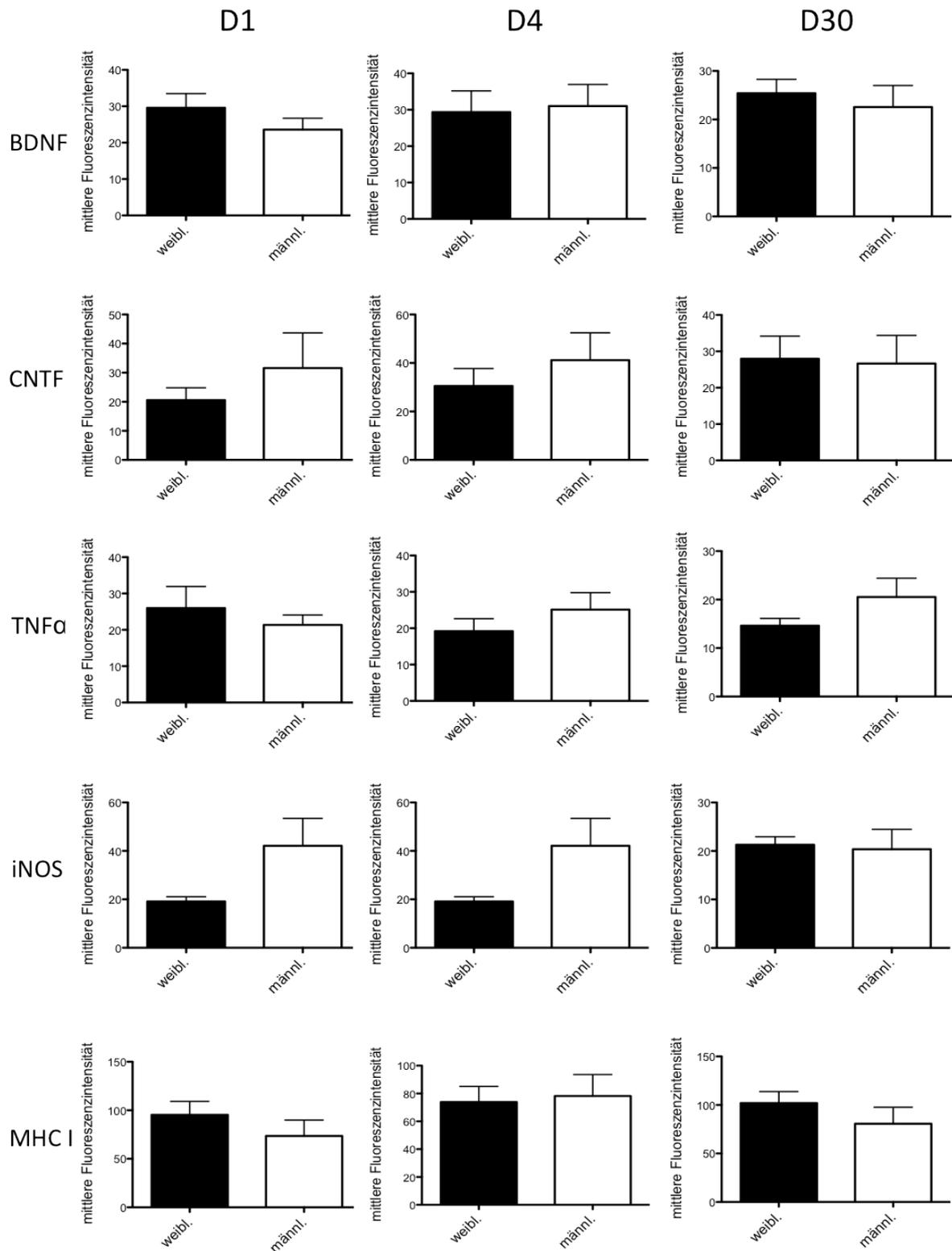
Es wurden die Expressionsniveaus (mittlere Fluoreszenzintensität) von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I dem Alter der Patienten gegenübergestellt. Untersucht wurden die Werte an den Entnahmetagen D1, D4 und D30. Es wurden keine Korrelationen gefunden.

Bezüglich der Krankheitsdauer  $\leq / > 5$  Jahre (Abb.3.20) zeigte sich für CNTF ein Trend zu höherer Expression an D1 und D4 für Patienten mit längerer Krankheitsdauer, der nicht signifikant war. Jedoch sind in dieser Gruppe die Patienten ohne immunmodulatorische Therapie überrepräsentiert (4/10 gegenüber 1/6 in der Gruppe mit kürzerer Krankheitsdauer). Der Effekt könnte also indirekt sein, da diese Patienten zumindest an D4 auch einen Trend zu höherer CNTF-Expression zeigten. Bei Analyse nach dem Geschlecht (Abb.3.21) zeigte sich interessanterweise ein Trend zu erhöhter iNOS-Expression an D1 und D4 bei den männlichen Patienten, der aber, vermutlich aufgrund der niedrigen Patientenzahlen, nicht signifikant war.



**Abb. 3.20: Vergleich von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I anhand der Krankheitsdauer.**

Gezeigt werden FACS-Analysen, wie bereits in Abb.3.12. Es werden BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I von Patienten mit einer Krankheitsdauer von über fünf Jahren denen mit einer Krankheitsdauer von unter fünf Jahren gegenübergestellt. Bei einer Krankheitsdauer von über fünf Jahren zeigte sich bei CNTF ein Trend zu höheren Werten an D4.



**Abb. 3.21: Vergleich von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I an den Tagen D1, D4 und D30, stratifiziert nach Geschlecht.**

Gezeigt werden FACS-Analysen, wie bereits in Abb.3.12 gezeigt. Es werden BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I von Patienten nach dem Geschlecht stratifiziert an den Tagen D1, D4 und D30 gegenübergestellt.

## 4. Diskussion

Die derzeit zugelassenen immunmodulatorischen Behandlungen gegen MS zielen darauf ab, die klinisch und radiologisch feststellbare Aktivität zu reduzieren. Dabei sollt die Therapie präventiv Neurone und Oligodendrozyten schützen. Die Entdeckung der Expression von Wachstumsfaktoren in humanen Leukozyten (Kerschensteiner et al. 1999, Besser & Wank 1999) inspirierte Studien zum reparativen Potential der Entzündung. In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass der Transport exogener (Maier et al. 2004, Kuhlmann et al. 2006) und endogener Neurotrophine durch Immunzellen (Hammarberg et al. 2000) zum Ort der Entzündung die Reparatur von entzündlich bedingten Schädigungen fördert. Erfolgreiche MS-Therapien werden proinflammatorische und zytotoxische Mediatoren effektiv supprimieren müssen, während die reparativen Prozesse erhalten oder sogar gefördert werden.

Um diesen Fragen näher auf den Grund zu gehen, wurde in dieser Arbeit die Balance proinflammatorischer und neuroprotektiver Mediatoren in mononukleären Zellen von MS-Patienten im akuten Schub näher untersucht. Es wurden Veränderungen der Proteinexpression direkt nach intravenöser Methylprednisolontherapie mit Basiswerten verglichen. Zusätzlich wurden Patienten, die mit INF- $\beta$  behandelt wurden, mit Patienten ohne immunmodulatorische Therapie verglichen. Um Zellkulturartefakte zu vermeiden und um ein möglichst realitätsgetreues Bild einer *in vivo*-Stimulation von Leukozyten zu erreichen, wählten wir die durchflusszytometrische Analyse von direkt *ex vivo* isolierten, intrazellulär gefärbten MNZ. So war es uns möglich, quantitativ hochwertige Ergebnisse auf Einzelzellniveau zu erzielen.

### 4.1. CNTF-Expression in humanen Leukozyten und Erhöhung der CNTF-Expression während eines akuten Schubes nach Glukokortikoid-Therapie

In unseren Versuchen zeigten wir mit Hilfe der RT-PCR, der Immunzytochemie und der Durchflusszytometrie, dass CNTF in humanen Leukozyten exprimiert wird. So bewiesen wir die Expression in Gesunden und konnten im Vergleich dazu erhöhte CNTF-Expressionen von MS-Patienten am Tag 4 nach Kortisontherapie im akuten Schub nachweisen. CNTF ist ein potentes Neurotrophin, welches das Überleben von Neuronen nach Axotomie unterstützt (Sendtner et al 1990, Clatterbuck et al. 1993). Es wurde bereits in experimentellen Modellen primär degenerativer Erkrankungen beschrieben (Mitsumoto et al. 1994, Sendtner et al. 1992, Anderson et al. 1996). In

einem ZNS-Autoimmunitäts-Modell, der MOG (35-55) - induzierten EAE, zeigten CNTF-knockout-Mäuse frühere Symptome und eine progrediente Behinderung (Linker et al. 2002). Die Injektion von rekombinantem CNTF führte zu einer verbesserten Remyelinisierung durch eine Zunahme von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in MOG-induzierter EAE (Kuhlmann et al. 2006). In einem Rattenmodell der Optikusneuritis konnte rekombinantes CNTF die Degeneration von Retinaganglienzellen verhindern (Maier et al. 2004). Im Menschen wird die Verteilung des CNTF dadurch behindert, dass es nur schwer die BHS passieren kann. Das könnte überwunden werden, indem CNTF intrathekal appliziert würde, was aber zu starken Nebenwirkungen des hoch dosierten exogenen CNTF führen kann (Kuhlmann et al. 2006). Daher scheint es ein wesentlich eleganterer Weg zu sein, die natürliche Expressionsmenge des CNTF in aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen, welche in das entzündete ZNS einwandern, zu erhöhen. Es gelang uns nachzuweisen, dass CNTF von T-Zellen, Monozyten und B-Zellen exprimiert wird. In den letzteren Populationen scheint die Expression höher zu sein. Somit ist die Expression von CNTF der Expression von BDNF in Leukozyten sehr ähnlich. Die höchste BDNF-Konzentration konnte in Monozyten nachgewiesen werden, die Konzentration in T- und B-Lymphozyten war etwas geringer. Eine Unterscheidung der T-Zellen in CD4+ und CD8+ fand in dieser Versuchsreihe nicht statt. Kerschensteiner et al. (1999) untersuchten aufgereinigte Subpopulationen nach längerer Kultur und fanden die höchste Expression in CD4+ T-Zellen. Wir fanden dagegen die höchste BDNF-Ausschüttung in Monozyten zusätzlich zu einer deutlichen Expression von BDNF in T-Zellen, was mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Stadelmann et al. 2002, Schulte-Herbrüggen et al. 2005) übereinstimmte.

Während die CNTF-Expression von MS-Patienten untersucht wurde, fiel eine erhöhte Varianz der CNTF-Werte zum Zeitpunkt des akuten Schubes auf. Dies lässt die Spekulation zu, dass die Entzündung in manchen Patienten einen Effekt auf die CNTF-Konzentration hat. Nachdem die Patienten drei Tage lang intravenös mit Methylprednisolon therapiert worden waren, zeigte sich eine signifikant erhöhte CNTF-Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden. Zunächst fragten wir uns daher, ob sich die Steroidtherapie auf die relative Veränderung bestimmter Leukozyten-Subpopulationen auswirkt. Während T-Zellen nach der dreitägigen Methylprednisolon-Therapie deutlich von 58,5% auf 45,3 % abnahmen, stieg die Zahl der Monozyten von 5,4% auf 15,6% und die der B-Zellen von 6,3% auf 10,6% aller Zellen an. Die verringerte Zahl der T-Zellen ist vermutlich auf Apoptose zurückzuführen (Leussink et al. 2001). Dagegen scheint die erhöhte Prozentzahl an Monozyten und B-Zellen ein relativer Effekt der Erniedrigung der T-Zellen zu sein. Im Vordergrund steht somit der Abfall der prozentualen Anteile der T-Lymphozyten. Zusätzlich könnte die geminderte Transmigration zum ZNS als Folge der Steroidtherapie die eben beschriebenen Effekte unterstützen. In den drei Subpopulationen war die relative Zellverteilung am Tag 1 der Patienten gleich der Verteilung der gesunden Probanden, damit ist eine tatsächliche Differenz der Expressionswerte ursächlich für die erhöhte Varianz unter den MS-Patienten. Die

Auswirkungen des Methylprednisolon könnten teilweise durch die erhöhte Anzahl an Monozyten in MNZ hervorgerufen werden. Als wir uns auf die Färbung von CD3<sup>+</sup>-Zellen beschränkten, konnten wir aber einen ähnlichen, wenn auch weniger deutlichen Trend hin zu erhöhten CNTF-Werten nach Methylprednisolon-Therapie feststellen. Sowohl die höhere Expression des Neutrophins in T-Zellen als auch eine Zunahme der hoch-CNTF-exprimierenden Makrophagen, könnte vielversprechende neuro- und oligodendrozyten-schützende Effekte nach therapeutischer Intervention mit Glukokortikoiden erzielen.

Interessanterweise wurde bei dem Vergleich von Patienten mit INF- $\beta$ -Therapie gegenüber Patienten ohne immunmodulatorische Therapie nur bei den Patienten ohne Therapie der Effekt der Kortikosteroide gesehen. Das lässt darauf schließen, dass INF- $\beta$  separate Effekte auf die CNTF-Expression hat und mit Glukokortikoid-Effekten interferiert. Diese Interaktionen sollten weiter erforscht werden, um das neuroprotektive Potential von INF- $\beta$  zu fördern.

Zeitgleich mit dieser Arbeit publizierten Jones et al. (2010) die Expression von CNTF, platelet-derived growth factor (PDGF) und Basic fibroblast growth factor (FGF2) zusammen mit BDNF in humanen Leukozyten. Sie zeigten, dass Patienten, die mit dem Lymphozyten-depletierenden monoklonalen Antikörper Alemtuzumab behandelt wurden, in der Phase der Lymphozytenrekonstitution deutlich mehr Neurotrophine sezernierten. Dieser Effekt wurde durch *in vitro* Stimulation mit Myelin-Basischem Protein (MBP) für CNTF, PDGF und BDNF verstärkt. Jones et al. (2010) zeigten weiterhin, dass die Sekretionsprodukte von MBP-stimulierten MNZ der Alemtuzumab-behandelten Patienten trophische Effekte für Neurone *in vitro* hatten und das Überleben und die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen unterstützten. Sie analysierten die Sekretion von kultivierten MNZ und konnten kein CNTF-Protein in MS-Patienten vor Alemtuzumab-Behandlung detektieren, obwohl sie CNTF mRNA sowohl in diesen Patienten als auch in gesunden Probanden nachwies. Unsere Studie komplementiert diese Ergebnisse, indem wir mittels einer hoch-sensitiven FACS-Analyse CNTF Protein-Expression in direkt *ex vivo* isolierten MNZ von MS-Patienten und gesunden Probanden zeigen. Interessanterweise zeigt sowohl unsere als auch die Studie von Jones et al. (2010) eine Steigerung der CNTF-Menge nach immunmodulatorischer Behandlung. Wie oben beschrieben, bewirken Glukokortikoide eine mäßige Depletion der Lymphozyten durch Apoptose. Man könnte daher spekulieren, dass die erhöhte CNTF-Expression eine ähnliche homöostatische Regulation wie in den Alemtuzumab-behandelten Patienten darstellt.

## 4.2. BDNF-Erhöhung in INF- $\beta$ -behandelten Patienten

Von den Neurotrophinen, die in humanen mononukleären Zellen exprimiert werden, wurde BDNF bisher bei MS-Erkrankten am Besten charakterisiert. Zur BDNF-Expression in MS-Patienten während der Remission gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen ist das wahrscheinlich auf den Einschluss von MS-Patienten mit subklinischer Krankheitsaktivität oder unterschiedlicher immunmodulatorischer Therapie zum anderen auf teilweise unterschiedliches biologisches Analysematerial zurückzuführen. Es wurde bereits gezeigt (Lalivé et al. 2008), dass BDNF-Werte im Serum nicht mit Werten aus Extraktionen von frisch isolierten MNZ korrelieren. Durchflusszytometrie-Analysen des BDNF wurden von Ziemssen et al. (2002) etabliert. Zum Nachweis des BDNF wurden T-Zell-Klone mit PMA+Ionomycin-stimuliert und mit dem intrazellulären Transportinhibitor Monensin A behandelt. In der vorliegenden Arbeit wurde die BDNF-Expression in peripheren mononukleären Zellen *ex vivo* ohne zusätzliche Stimulation untersucht. Die BDNF-Expression in gesunden Kontrollpersonen und Patienten ist in unserer Studie gut messbar, aber wir fanden keinen Unterschied zwischen der BDNF-Konzentration von Patienten in einem akuten Schub, nach hoch dosierter intravenöser Kortikosteroid-Therapie oder im schubfreien Intervall gefunden. Allerdings ist ein Unterschied messbar, wenn die Patienten nach Therapie stratifiziert werden. Patienten, welche hoch dosiert INF- $\beta$  erhielten, zeigten an allen drei Messzeitpunkten höhere BDNF-Werte im Vergleich zu Patienten, die keine immunmodulatorische Therapie erhielten. Patienten ohne immunmodulatorische Therapie zeigen vergleichbare Werte im akuten Schub und direkt nach Glukokortikoidtherapie, aber signifikant niedrigere Basiswerte. Vergleicht man nun diese Basiswerte nach 30 Tagen mit den Werten von gesunden Probanden, dann fällt auf, dass MS-Patienten ohne Therapie niedrigere Werte am Tag 30 aufweisen. Tatsächlich wurde dies auch von anderen Forschungsgruppen kürzlich nachgewiesen (Azoulay et al. 2005, Azoulay et al. 2008, Lalivé et al. 2008, Comini et al. 2009) und scheint auf einen Defekt in der CD40-abhängigen Stimulation zurückzuführen zu sein. INF- $\beta$  stellt sowohl die CD 40-Expression in MS-Patienten, als auch die CD40-abhängige BDNF-Expression wieder her (Azoulay et al. 2009). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren und denen von Lalivé et al. (2008) überein. Es wurden vergleichbare BDNF-Werte bei mit INF- $\beta$ -behandelten Patienten und gesunden Kontrollen gezeigt (Lalivé et al. 2008). Erhöhte BDNF-Werte wurden in MNZ von Patienten im akuten Schub in homogenen Gruppen von entweder unbehandelten Patienten (Sarchielli et al. 2002, Caggiula et al. 2005, Comini et al. 2009) oder immunmodulatorisch therapierten Patienten nachgewiesen. Die Behandlung erfolgte entweder mit INF- $\beta$ , Glatirameracetat oder intravenösen Immunglobulingaben (Sarchielli et al. 2007). Wir sahen lediglich einen Trend hin zu erhöhten BDNF-Werten bei Patienten ohne immunmodulatorische Therapie. Im Gegensatz zu Sarchielli et al. (2007) konnte dieser Effekt hier bei IFN- $\beta$ -therapierten Patienten nicht. Ob ein zusätzlicher Anstieg der BDNF-

Expression im akuten Schub auch bei Patienten, die mit INF- $\beta$  behandelt wurden, möglich ist, sollte an Hand einer *ex vivo*-Studie von MNZ mit einer höheren Anzahl von Patienten untersucht werden. Es ist wichtig an dieser Stelle zu erwähnen, dass Kortikosteroide die BDNF-Werte bei INF- $\beta$ -behandelten Patienten oder Patienten ohne immunmodulatorische Therapie nicht beeinflusst haben. Dies stimmt mit den Arbeiten von (Sarchielli et al. 2002) überein. All diese Ergebnisse verdeutlichen die unterschiedlichen Regulationswege, die die Expression der beiden Neurotrophine CNTF und BDNF beeinflussen. Im Einklang mit dieser Hypothese fanden (van Winsen et al. 2005) wir keine Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von CNTF und BDNF in den einzelnen Patienten.

### 4.3. TNF $\alpha$ -Erhöhung im akuten Schub

In Übereinstimmung mit früheren Studien zeigten unsere durchflusszytometrischen Analysen eine erhöhte TNF $\alpha$ -Expression im akuten Schub von MS Patienten. TNF $\alpha$  ist ein gut etablierter Marker für die Krankheitsaktivität (Rieckmann et al. 1995). In vorhergehende Studien wurde ein Abfall von TNF $\alpha$  im Serum und verringerte mRNA-Mengen nach akuter Schubbehandlung mit intravenösem Methylprednisolon beschrieben (Spuler et al. 1996, Pitzalis et al. 1997, Kahl et al. 2002). Diese Studien zeigten aber nicht, ob der Abfall von TNF $\alpha$  auf die Herunterregulation der Expression in bestimmten Zellen oder vielleicht auf die Reduktion von TNF $\alpha$ -exprimierenden T-Lymphozyten zurückzuführen ist. Unerwarteter Weise zeigte sich in dieser Studie, dass die Methylprednisolon-Therapie keinen wesentlichen Effekt auf die TNF $\alpha$ -Expression hat. Es zeigte sich lediglich ein leichter Trend zu erniedrigten TNF $\alpha$ -Werten nach intravenöser Methylprednisolongabe bei Patienten, die keine immunmodulatorische Basistherapie erhielten. Möglicherweise waren die Effekte bei Patienten ohne immunmodulatorische Therapie aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Patienten nicht signifikant. Alternativ könnte auch eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber Glukokortikoiden bei Patienten mit schubförmiger MS die fehlende TNF $\alpha$ -Reduktion erklären. IFN- $\beta$  kann die Glukokortikoidsensitivität noch weiter herabsetzen (van Winsen et al. 2005). Das unterstützt unsere Daten, die zeigen, dass es nach intravenöser Methylprednisolontherapie bei IFN- $\beta$ -behandelten Patienten zu keinem TNF $\alpha$ -Abfall kommt.

Interessanterweise korrelierten in unserer Studie die TNF $\alpha$ -Mengen individueller Patienten mit den BDNF-Werten zum Zeitpunkt des akuten Schubes. Die Werte nach Steroidtherapie oder nach 30 Tagen korrelierten dagegen nicht. Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden (Schulte-Herbrüggen et al. 2005), dass TNF $\alpha$  die BDNF-Expression induzieren kann. Außerdem wurde bereits eine schwache Korrelation zwischen TNF $\alpha$ - und BDNF-mRNA bei MS-Patienten in der schubförmig-rezidivierenden Krankheitsphase nachgewiesen (Gielen et al. 2003). Eine TNF $\alpha$ -abhängige

Stimulation der BDNF-Expression könnte – zumindest teilweise - im akuten Schub wichtig sein, während unter Glukokortikoidtherapie und nach 30 Tagen beziehungsweise im schubfreien Intervall der MS möglicherweise zusätzliche Faktoren die BDNF-Konzentration beeinflussen.

Es wurden schwache Korrelationen zwischen iNOS-Konzentrationen nach intravenöser Methylprednisolontherapie und während des schubfreien Intervalls gefunden aber keine Korrelationen im akuten Schub. Zusammen mit anderen Zytokinen kann TNF $\alpha$  die iNOS-Expression *in vitro* induzieren. Dagegen ist in menschlichen Zellen möglicherweise nicht TNF $\alpha$ , sondern IL-1 das ausschlaggebende Zytokin bei der iNOS-Expression, besonders im akuten Schub (Liu et al. 1996).

#### 4.4. Leichter Anstieg von iNOS bei IFN- $\beta$ -behandelten Patienten

Die Sekretion von NO durch humane Leukozyten wurde lange kontrovers diskutiert. Letztendlich wurde die NO-Produktion in kultivierten MNZ nach Stimulation mit LPS nachgewiesen (Sarchielli et al. 1997). Soweit es uns bekannt ist, ist die vorliegende Arbeit die erste Studie, welche die Konzentration des iNOS-Proteins direkt *ex vivo* im Menschen analysiert. Da iNOS konstitutionell aktiviert ist und seine Aktivität nicht, wie andere NOS-Isoformen durch Calcium reguliert ist, ist die Proteinmenge direkt proportional zum produzierten NO. Obwohl ein leichter Trend zu einem Anstieg von iNOS beobachtet wurde, konnte keine klare Hochregulation gesehen werden. Möglicherweise gibt es hier einen Zusammenhang zwischen der überwiegenden Expression von iNOS in Monozyten und deren relativ geringem Beitrag zur gesamten Zellzahl. In Untersuchungen von MNZ aus Steroid-behandelten MS Patienten wurde *in vitro* gezeigt, dass die NO-Produktion nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation abnimmt (Sarchielli et al. 1997). Weiter wurde beschrieben, dass Glukokortikoide die iNOS-Protein-Konzentration verringern und gleichzeitig *in vitro* neuroprotektiv wirken (Golde et al. 2003). In unserer Analyse der MNZ, welche direkt *ex vivo* isoliert worden waren, sahen wir keinen Abfall des iNOS-Proteins nach der Behandlung mit Kortikosteroiden (D4). Offensichtlich obliegt die Stimulation der MNZ *in vivo* sehr viel komplexeren Mechanismen, als die Aktivierung der MNZ *in vitro* mittels LPS; ihr kann nicht ausreichend durch Glukokortikoide entgegengewirkt werden. Alternativ sind diese Ergebnisse wiederum auf die herabgesetzte Sensitivität der MS-Patienten gegenüber Glukokortikoiden zurückzuführen.

Als wir allerdings die Ergebnisse nach IFN- $\beta$ -Therapie stratifizierten, fanden wir einen Anstieg der iNOS-Expression im schubfreien Intervall von mit IFN- $\beta$  behandelten MS-Patienten. Die Konsequenzen dieser Hochregulation sind unklar, da NO sowohl zytotoxisch als auch immunmodulatorisch wirken kann (Smith & Lassmann 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass IFN- $\beta$  IFN- $\gamma$  hochregulieren kann (Petereit et al. 2003), (Hamamcioglu & Reder 2007). IFN- $\gamma$  kann

zusammen mit anderen Zytokinen iNOS in humanen Zellen induzieren. Weiter könnte BDNF, welches im schubfreien Intervall bei IFN- $\beta$ -behandelten MS Patienten erhöht ist, direkt oder indirekt an der iNOS-Hochregulation mitwirken (Klöcker et al. 1999). Tatsächlich fanden wir eine leichte Korrelation zwischen BDNF und iNOS im schubfreien Intervall, die allerdings nach Korrektur für multiple Testungen keine Signifikanz erreichte. Unsere Studie zeigt zwei scheinbar gegensätzliche Effekte von IFN- $\beta$ : die Hochregulation von BDNF und iNOS. Hier sollte noch getestet werden, ob BDNF in der Lage ist, Neurone und Oligodendrozyten gegen die Schädigung durch hohe Mengen NO zu schützen und demzufolge als Gegengewicht gegenüber potentiell schädigenden Effekten von IFN- $\beta$  zu dienen.

#### **4.5. IFN- $\beta$ erhöht die MHC I-Sekretion**

Interferone haben sich evolutionär als Mediatoren der antiviralen Abwehr herausgebildet. Virus-Antigene werden durch MHC I Moleküle den CD8+-T-Zellen präsentiert. Die Hochregulation von MHC I durch IFN- $\beta$  ist gut bekannt (Leeuwenberg et al. 1987). Bei MS Patienten in dieser Studie könnte der robuste Effekt der IFN- $\beta$ -Behandlung auf die Oberflächenexpression von MHC I jedoch auf eine wesentlich effektivere Präsentation der Autoantigene gegenüber den CD 8+-T-Zellen hinweisen. CD 8+-T-Zellen korrelieren gut mit axonaler Schädigung in MS-Läsionen (Bitsch et al. 2000). Das Fehlen funktionaler MHC I-Moleküle verstärkte andererseits die Gewebeschädigung in einem EAE-Modell in  $\beta$ 2-Mikroglobulin-defizienten Mäusen (Linker et al. 2005). Therapie mit IFN- $\beta$  kann die T-Zellreaktivität in MS-Patienten reduzieren, obwohl die immunmodulatorischen Wirkungen noch nicht gut verstanden werden (Zafranskaya et al. 2007). Dieser inhibitorische Effekt könnte teilweise durch die Induktion und Verstärkung von regulatorischen T-Zellen zustande kommen (Namdar et al. 2010, Korporal et al. 2008). Es muss noch näher untersucht werden, ob der Effekt der IFN- $\beta$ -Therapie auf die MHC I-Expression direkt für die verbesserte homöostatische Proliferation in regulatorischen T-Zellen verantwortlich ist.

#### **4.6. Expression von proinflammatorischen und neurotrophen Mediatoren während der späteren Phase der schubförmig-rezidivierenden MS**

Während ihres natürlichen Verlaufes verändert sich die MS bei 65% der Patienten von einer schubförmig-rezidivierenden hin zu einer sekundär progressiven Form. Als pathologisches Korrelat wird hierbei die mangelnde Reparatur der geschädigten Axone und des Myelins angesehen. Die Entzündung scheint sich zu einer differenzierteren Immunantwort mit relativ intakter Bluthirnschranke hin zu verändern (Compston & Coles 2008). In Anbetracht der unterschiedlichen Krankheitsdauer der Patienten in unserer Kohorte untersuchten wir, ob die Krankheitsdauer die Expression der proinflammatorischen und neurotrophen Mediatoren beeinflusst. Ein „burn out“ entzündlicher Aktivität oder eine Reduktion des trophischen Potential der Leukozyten wären möglich. Allerdings zeigten Patienten in unserer Kohorte keinen Unterschied zwischen der Expression von TNF $\alpha$ , iNOS, MHC I, CNTF und BDNF in peripheren Leukozyten von Patienten, die weniger als fünf Jahre an MS erkrankt waren und Patienten, die bereits mehr als fünf Jahre an MS litten. Durch die Analyse des natürlichen Verlaufes der MS konnten sowohl Kremenutzky et al. 2006 als auch Confavreux und Vukusic 2006 hervorheben, dass das Erkrankungsalter eine wesentlich wichtigere Rolle spielt, als die Krankheitsdauer, um einen bestimmten Behinderungsgrad zu erreichen. Aus diesem Grund testeten wir, ob sowohl das Erkrankungsalter mit der Expression von Neurotrophen als auch mit proinflammatorischen Faktoren korreliert. Einen solchen Effekt konnten wir nicht nachweisen.

Um herauszufinden, ob proinflammatorische und neurotrophe Immunantworten mit dem Grad der Behinderung korrelieren, stellten wir die Expressionsniveaus von TNF $\alpha$ , iNOS, CNTF und BDNF von individuellen Patienten ihrem MSSS gegenüber. Der MSSS ist, wie bereits in der Einleitung erläutert, eine Messgröße für die Krankheitsschwere (Roxburgh et al. 2005). Hier fanden wir keine Korrelation. Das bedeutet, dass Werte eines einzelnen Schubes keinen Rückschluss auf den Grad der Behinderung zulassen. Ein wesentlich komplexeres Zusammenspiel von zahlreichen Faktoren, wie zum Beispiel intraindividuelle Unterschiede der Expressionsniveaus, Frequenz und Dauer eines Schubes, sowie intrinsische Anfälligkeit gegenüber schädigenden Prozessen sind wahrscheinlich nötig, um den Behinderungsgrad zu definieren. Eventuell könnte die Untersuchung einer einzigen Gadolinium-anreichernden Läsion zusammen mit Markern für die strukturelle Schädigung, wie zum Beispiel MRT und Magnetresonanztomographie (MRS) neben der Expression unserer proinflammatorischen und neurotrophen Mediatoren bessere Informationen über individuelle reparationsvermittelnde Faktoren liefern.

## 4.7. Schlussfolgerungen

Wir zeigten in dieser Studie, dass Leukozyten nicht nur eine Quelle für BDNF sind, sondern auch CNTF exprimieren. CNTF ist ein Wachstumsfaktor, der für das neuronale Überleben und die Oligodendrozytendifferenzierung wichtig ist. Nun muss näher untersucht werden, welche Rolle das von Leukozyten exprimierte CNTF für den Schutz von Zellen im ZNS gegen entzündliche Schädigungen hat. Die CNTF-Expression weist eine wesentlich höhere Varianz bei MS Patienten im akuten Schub auf und die Mittelwerte steigen nach intravenöser Methylprednisolontherapie an. Steroidtherapie könnte also eine neuroprotektive Funktion erfüllen. Wir bestätigen eine erhöhte BDNF-Expression bei Patienten, die mit IFN- $\beta$  im schubfreien Intervall behandelt wurden. Ein Trend zu erhöhten BDNF-Niveaus während eines Schubes ist allerdings nur bei Patienten ohne eine immunmodulatorische Therapie sichtbar. So können wir postulieren, dass die Signalwege, die für eine erhöhte BDNF-Expression im akuten Schub verantwortlich sind, durch IFN- $\beta$  verändert sein könnten. Ein Anstieg von TNF $\alpha$  im akuten Schub, den wir in unserer Arbeit auch demonstrieren konnten, und der sich etwas weniger deutlich bei Patienten mit IFN- $\beta$ -Therapie zeigte, könnte in dem Prozess der Hochregulation von BDNF eine Rolle spielen. Wir fanden eine signifikante Korrelation zwischen TNF $\alpha$  und BDNF in individuellen Patienten während - jedoch nicht nach - eines akuten Schubes. Interessanterweise erhöhte die IFN- $\beta$ -Therapie auch die Expression von iNOS bei MS-Patienten im schubfreien Intervall und könnte sich so auch auf die Reduktion von iNOS durch Glukokortikoide auswirken. Da NO sowohl immunmodulatorisch als auch toxisch gegenüber Neuronen und Oligodendrozyten wirken kann, sollten die Folgen der iNOS-Hochregulation durch IFN- $\beta$  weiter untersucht werden. Weiterhin sollte den Interaktionen von IFN- $\beta$ - und Kortikosteroid-Therapie für die Balance zwischen proinflammatorischen und Reparaturvermittelnden Faktoren mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden um regenerative Prozesse therapeutisch zu unterstützen.

## 5. Zusammenfassung

Multiple Sklerose, eine Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems, stellt die häufigste Ursache primär neurologischer Behinderung bei jungen Erwachsenen dar. Entzündungszellen schädigen Oligodendrozyten und Neurone, aber die therapeutische Suppression der Entzündung hemmt möglicherweise die Reparatur. In dieser Arbeit wurde die Komplexität schädigender versus regenerationsunterstützender Faktoren während des akuten Schubes und deren Beeinflussung durch Immunmodulation näher untersucht. In direkt *ex vivo* isolierten mononukleären Zellen von MS-Patienten im akuten Schub wurden die intrazellulären Expressionsniveaus von proinflammatorischen Mediatoren, dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), sowie der Neurotrophine ciliary neurotrophic factor (CNTF) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mittels FACS-Analyse untersucht. So konnte die Expression des für Oligodendrozyten und Neurone wichtigen Wachstumsfaktors ciliary neurotrophic factor (CNTF) in menschlichen Leukozyten gezeigt werden. Bei MS-Patienten im akuten Schub unterscheiden sich die Werte im Vergleich zu gesunden Probanden, nach Kortikosteroid-Therapie stiegen sie deutlich an. CNTF kann der schädigenden Wirkung von TNF $\alpha$  auf Oligodendrozyten entgegenwirken. Wir bestätigten hier, dass TNF $\alpha$  im akuten Schub erhöht ist. Weiter fanden wir heraus, dass entgegen unseren Erwartungen weder die Expression von TNF $\alpha$  noch von iNOS nach Kortikosteroidgabe reduziert waren. Dies weist möglicherweise auf eine geringere Glukokortikoidsensitivität bei MS-Patienten hin. Zusätzlich zeigten wir erhöhte BDNF-Werte unter immunmodulatorischer Therapie mit IFN- $\beta$ . Daneben erhöht IFN- $\beta$  auch die Expression von iNOS und MHC I. Dies unterstreicht das immunmodulatorische Potential von IFN- $\beta$ . Wir zeigten auch Interaktionen der Glukokortikoid- und der IFN- $\beta$ -Therapie, die näher untersucht werden müssen, um Neuroprotektion und die Remyelinisierung durch immunmodulatorische Therapie zu optimieren.

## Literaturverzeichnis

1. Achiron A, Feldman A, Mandel M, Gurevich M: Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relapse, *Ann N Y Acad Sci.* 1107. 155-67. (2007)
2. Andersen O, Lygner PE, Bergstrom T, Andersson M, Vahlne A: Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J Neurol.* 240. 417-422. (1993)
3. Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand, SJ: Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93. 7346-51. (1996)
4. Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H: Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci.* 10. 3507-15. (1990)
5. Avolio C, Giuliani F, Liuzzi GM, Ruggieri M, Paolicelli D, Riccio P, Livrea P, Trojano M: Adhesion molecules and matrix metalloproteinases in Multiple Sclerosis: effects induced by Interferon-beta. *Brain Res Bull.* 61. 357-64. (2003)
6. Azoulay D, Mausner-Fainberg K, Urshansky N, Fahoum F, Karni, A: Interferon-beta therapy up-regulates BDNF secretion from PBMCs of MS patients through a CD40-dependent mechanism. *J Neuroimmunol.* 211. 114-9. (2009)
7. Azoulay D, Urshansky N, Karni A: Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection, *J Neuroimmunol.* 195. 186-93. (2008)
8. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miller A, Karni, A: Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol.* 167. 215-8. (2005)
9. Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, Koprowski H, Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92. 12041-5. (1995)
10. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC: Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol.* 23. 1221-30. (1992)
11. Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC: Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival, 118. 283-95. (1993)
12. Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin, J: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand.* 78. 318-23. (1988)
13. Besser M, Wank, R: Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol.* 162. 6303-6. (1999)
14. Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M: Efficient central nervous system remyelination requires T cells. *Ann Neurol.* 53. 680-4. (2003)
15. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck, W: Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 123. 1174-83. (2000)

16. Boutros T, Croze E, Yong VW: Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J Neurochem.* 69. 939-46. (1997)
17. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, van FG, van PA, Hintzen RQ: Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain.* 125. 952-60. (2002)
18. Caggiula M, Batocchi AP, Frisullo G, Angelucci F, Patanella AK, Sancricca C, Nociti V, Tonali PA, Mirabella M.: 'Neurotrophic factors and clinical recovery in relapsing-remitting multiple sclerosis', *Scand J Immunol.* 62. 176-82. (2005)
19. Chandran S, Hunt D, Joannides A, Zhao C, Compston A, M RJ: Myelin repair: the role of stem and precursor cells in multiple sclerosis', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363. 171-83. (2008)
20. Chan A, Weilbach FX, Toyka KV, Gold R: Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 139. 152-8. (2005)
21. Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE.: 'Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90. 2222-6. (1993)
22. Comini ER, Rodrigues DH, Donadi EA, Brum DG, Kaimen DR, Teixeira AL: Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse. *Neurosci Lett.* 460. 130-2. (2009)
23. Compston, A: *McAlpine's Multiple Sclerosis.* 4th edn. pp.287-294. Churchill Livingstone Elsevier Philadelphia 2006
24. Compston A & Coles A: Multiple sclerosis, *Lancet.* 372. 1502-17. (2008)
25. Confavreux, C., Compston, A.: The natural history of multiple sclerosis. In: Compston, A: *McAlpine's Multiple Sclerosis.* 4th edn. S.219. Churchill Livingstone Elsevier Philadelphia 2006.
26. Confavreux C, Suissa S, Sadder P, Bourdes V, Vukusic S.: 'Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. *Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group.* *N Engl J Med.* 344. 319-26. (2001)
27. Confavreux C & Vukusic S: Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain.* 129. 595-605. (2006)
28. Correale J & Farez M: Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 61. 97-108. (2007)
29. Curtis R, Adryan KM, Zhu Y, Harkness PJ, Lindsay RM, DiStefano, PS: Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature.* 365. 253-5. (1993)
30. Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J, Syndulko K, Weinshenker BG, Antel JP, Confavreux C, Ellison GW, Lublin F, Miller AE, Rao SM, Reingold S, Thompson A, Willoughby, E: Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain.* 122 . 871-82. (1999)
31. De Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD, der PV: Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 10-20. (1997)

32. D'Souza SD, Alinauskas KA, Antel JP: Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res.* 289-98. (1996)
33. D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, Goodyer C, Antel, JP: Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci.* 15. 7293-300. (1995)
34. Dutta R, McDonough J, Chang A, Swamy L, Siu A, Kidd GJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD: Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients. *Brain.* 130. 2566-76. (2007)
35. Eltayeb S, Berg A-L, Lassmann H, Wallström E, Nilsson M, Olsson T, Ericsson-Dahlstrand A, Sunnemark, D: Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: insight into mechanisms of MOG-induced EAE. *J Neuroinflammation.* 4. 14. (2007)
36. Foote AK, Blakemore WF: Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination *Brain.* 128. 528-39. (2005)
37. Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F: Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol.* 57. 493-7. (2003)
38. Giess R M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, Rieckmann, P: Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 59. 407-9. (2002)
39. Giovannoni G, Heales SJ, Silver NC, O'Riordan J, Miller RF, Land JM, Clark JB, Thompson EJ, Raised serum nitrate and nitrite levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 145. 77-81. (1997)
40. Givan, AL:, *Flow cytometry: first principles.*pp. 18-27. New York: Wiley-Liss 1993.
41. Gold R, Buttgereit F, Toyka KV: Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol.* 117. 1-8. (2001)
42. Golde S, Chandran S, Brown GC, Compston, A: Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression. *J Neurochem.* 82. 269-82. (2002)
43. Golde S, Coles A, Lindquist JA, Compston, A: Decreased iNOS synthesis mediates dexamethasone-induced protection of neurons from inflammatory injury in vitro. *Eur J Neurosci.* 18. 2527-37. (2003)
44. Goodin DS, Frohman EM, G. JG, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH, den SV: Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology.* 58. 169-78. (2002)
45. Haas J, Hug A, Viehöver, A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporeal M, Fritz B, Storch-Hagenlocher B, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B: Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 35. 3343-52. (2005)

46. Hamamcioglu K, Reder AT: Interferon-beta regulates cytokines and BDNF: greater effect in relapsing than in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 13. 459-70. (2007)
47. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Lind van PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F: Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci.* 20. 5283-91. (2000)
48. Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Leibowitz-Amit R, Pevsner E, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M: Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci.* 20. 6421-30. (2000)
49. Hoffmann V P, Przuntek H, Epplen JT, Hardt C: A null mutation within the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-gene: implications for susceptibility and disease severity in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun.* 3. 53-5. (2002)
50. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE: Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 170. 607-12. (1989)
51. Hohlfeld R, Wekerle, H: Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101. 14599-606. (2004)
52. Johnson AW, Land JM, Thompson EJ, Bolanos JB, Clark JB, Heales, SJ: Evidence for increased nitric oxide production in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 58. 107. (1995)
53. Jones JL, Anderson JM, Phuah C-L, Fox EJ, Selmaj K, Margolin D, Lake SL, Palmer J, Thompson SJ, Wilkins A, Webber DJ, Compston DA, Coles AJ: Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain.* 133. 2232-47. (2010)
54. Kahl KG, Kruse N, Toyka KV, Rieckmann P: Serial analysis of cytokine mRNA profiles in whole blood samples from patients with early multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 200. 53-5. (2002)
55. Kasper LH, Shoemaker J: Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology.* 74. 2-8. (2010)
56. Keegan M, Konig F, McClelland R, Bruck W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF: Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet.* 366. 579-82. (2005).
57. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R: 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. 865-70. (1999)
58. Kimura A, Naka T, Kishimoto T: IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104. 12099-104. (2007)
59. Klöcker N, Kermer P, Gleichmann M, Weller M, Bähr M: Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 19. 8517-27. (1999)

60. Korporal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Moeller S, Fritz B, Suri-Payer E, Wildemann B: Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol.* 65. 1434-9. (2008)
61. Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Rooijen NV, Franklin RJ: Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia.* 35. 204-12. (2001)
62. Kremenchutzky M, Rice GPA, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain.* 129. 584-94. (2006)
63. Kuhlmann T, Remington L, Cognet I, Bourbonniere L, Zehntner S, Guilhot F, Herman A, Guay-Giroux A, Antel JP, Owens T, Gauchat J-FC: Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 169. 584-98. (2006)
64. Kurtzke, JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 33. 1444-52. (1983)
65. Lalive PH, Kantengwa S, Benkhoucha M, Juillard C, Chofflon M: Interferon-beta induces brain-derived neurotrophic factor in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 197. 147-51. (2008)
66. Leeuwenberg JF, Damme JV, Jeunhomme GM, Buurman WA: Interferon beta 1, an intermediate in the tumor necrosis factor alpha-induced increased MHC class I expression and an autocrine regulator of the constitutive MHC class I expression. *J Exp Med.* 166. 1180-5. (1987)
67. Leussink VI, Jung S, Merschorf U, Toyka KV, Gold R: High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol.* 58. 91-7. (2001)
68. Lhermitte F, Marteau R, Gazengel J, Dordain G, Deloche G: The frequency of relapse in multiple sclerosis. A study based on 245 cases. *Z Neurol.* 205. 47-59. (1973)
69. Liguori M, Fera F, Patitucci A, Manna I, Condino F, Valentino P, Talarico P, Cerasa A, Gioia MC, Palma GD, Quattrone A: A longitudinal observation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain Res.* 1256. 123-8. (2009)
70. Linker RA, Mäurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R: CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med.* 8. 620-4. (2002)
71. Linker RA, Rott E, Hofstetter HH, Hanke T, Toyka KV, Gold R: EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *Neurobiol Dis.* 19. 218-28. (2005)
72. Liu J, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC: Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol.* 157. 3569-76. (1996)
73. Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S: CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science.* 259. 689-92. (1993)

74. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi, F: Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 130. 1089-104. (2007)
75. Maier K, Rau CR, Storch MK, Sättler MB, Demmer I, Weissert R, Taheri N, Kuhnert AV, Bähr M, Diem, R: Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from secondary cell death during acute autoimmune optic neuritis in rats. *Brain Pathol*. 14. 378-87. (2004)
76. Massaro AR, Soranzo C, Carnevale A: Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients. *Eur Neurol*. 37. 243-6. (1997)
77. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, den SV, Weinshenker BY, Wolinsky JS: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 50. 121-7. (2001)
78. Menge T, Hemmer B, Nessler S, Wiendl H, Neuhaus O, Hartung HP, Kieseier BC, Stuve O: Acute disseminated encephalomyelitis: an update. *Arch Neurol*. 62. (2005)
79. Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM: Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science*. 265. (1994)
80. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M: Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*. 5. 49-55. (1999)
81. Monteyne P, Sindic CJ: Data on cytokine mRNA expression in CSF and peripheral blood mononuclear cells from MS patients as detected by PCR. *Mult Scler*. 4. 143-6. (1998)
82. Namdar A, Nikbin B, Ghabaee M, Bayati A, Izad M: Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study. *J Neuroimmunol*. 218. 120-4. (2010)
83. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG: Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 343. 938-52. (2000)
84. Olsson T: Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis *Immunol Rev*. 144. 245-68. (1995)
85. Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J: Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science*. 251. 1616-8. (1991)
86. Petereit HF, Lindemann H, Schoppe, S: Effect of immunomodulatory drugs on in vitro production of brain-derived neurotrophic factor. *Mult Scler*. 9. 16-20. (2003)
87. Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG: Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol*. 63. 390-6. (2006)
88. Pitzalis C, Sharrack B, Gray IA, Lee A, Hughes RA: Comparison of the effects of oral versus intravenous methylprednisolone regimens on peripheral blood T lymphocyte adhesion molecule expression, T cell subsets distribution and TNF alpha concentrations in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 74. 62-8. (1997)
89. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Conno PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG,

- Wolinsky JS: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 58. 840-6. (2005)
90. Prat A, Biernacki K, Antel JP: Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1. *J Autoimmun.* 24. 119-24. (2005)
91. Redford EJ, Kapoor R, Smith KJ: Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain.* 120. 2149-57. (1997)
92. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Lürer W, Helwig A, Poser S: Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol.* 37. 82-8. (1995)
93. Rieckmann P, Toyka KV, 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, Schlupe M, Vaney C, Baumhackl U, Berger T, Deisenhammer F, Fazekas F et al.: Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application, *J Neurol.* 251. 1329-39.(2004)
94. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, Page EL, Edan G, McDonnell GV, Hawkins S, Trojano M, Liguori M, Cocco E, Marrosu MG, Tesser F, Leone MA, Weber A et al.: Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology.* 64. 1144-51.(2005)
95. Sarchielli P, Greco L, Stipa A, Floridi A, Gallai V: Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 132. 180-8. (2002)
96. Sarchielli P, Orlacchio A, Vicinanza F, Pelliccioli GP, Tognoloni M, Saccardi C, Gallai V: Cytokine secretion and nitric oxide production by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 80. 76-86. (1997)
97. Sarchielli P, Zaffaroni M, Floridi A, Greco L, Candelieri A, Mattioni A, Tenaglia S, Filippo MD, Calabresi P: Production of brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon-beta 1a, and high doses of immunoglobulins. *Mult Scler.* 13. 313-31. (2007)
98. Schulte-Herbrüggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H, Braun A: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol.* 160. 204-9. (2005)
99. Schwid SR, Goodman AD, Apatoff BR, Coyle PK, Jacobs LD, Krupp LB, Miller AE, Wende KE, Brownschidle CM, State NY: Are quantitative functional measures more sensitive to worsening MS than traditional measures?. *Neurology.* 55. 1901-3. (2000)
100. Scolding N, Franklin R, Stevens S, Heldin CH, Compston A, Newcombe J: Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain.* 121. 2221-8. (1998)
101. Seguin R, Biernacki K, Rotondo RL, Prat A, Antel JP: Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62. 412-9. (2003)
102. Selmaj KW, Raine CS: Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 23. 339-46. (1988)
103. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF: Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest.* 87. 949-54. (1991)

104. Selmaj K, Raine CS, Cross AH: Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol.* 30. 694-700. (1991)
105. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H: Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature.* 345. 440-1. (1990)
106. Sendtner M, Schmalbruch H, Stöckli, KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen, H: Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature.* 358. 502-4. (1992)
107. Setzu A, Lathia JD, Zhao C, Wells K, Rao MS, Ffrench-Constant C, Franklin, RJM: Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells. *Glia.* 54. 297-303. (2006)
108. Sharief MK, Hentges R: Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 325. 467-72. (1991)
109. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ: The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv.* 74. 265-72. (2000)
110. Smith KJ, Kapoor R, Hall SM, Davies M: Electrically active axons degenerate when exposed to nitric oxide. *Ann Neurol.* 49. 470-6. (2001)
111. Smith KJ, Lassmann H: The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 1. 232-41. (2002)
112. Spuler S, Yousry T, Scheller A, Voltz R, Holler E, Hartmann M, Wick M, Hohlfeld R: Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *J Neuroimmunol.* 66. 57-64. (1996)
113. Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noe M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC, Thoenen H, Sendtner M: Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol.* 115. 447-59. (1991)
114. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Bruck W, Hohlfeld R, Lassmann H: BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?. *Brain.* 125. 75-85. (2002)
115. Stangel M, Toyka KV, Gold R: Mechanisms of high-dose intravenous immunoglobulins in demyelinating diseases. *Arch Neurol.* 56. 661-3. (1999)
116. Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T: A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet.* 7. 79-84. (1994)
117. Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, Brochet B, Filippi M, Miller DH, Polman CH, Stevenson VL, McDonald WI: Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol.* 47. 831-5. (2000)
118. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L: Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 172. 146-55. (2008)
119. van Winsen LML, Muris DFR, Polman CH, Dijkstra CD, van den Berg TK, Uitdehaag BMJ: Sensitivity to glucocorticoids is decreased in relapsing remitting multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 90. 734-40. (2005)

120. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 112. 133-46. (1989)
121. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG: The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*. 53. 1107-14. (1999)
122. Wolswijk G: Oligodendrocyte regeneration in the adult rodent CNS and the failure of this process in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*. 117. 233-47. (1998)
123. Yamashita T, Ando Y, Obayashi K, Uchino M, Ando M: Changes in nitrite and nitrate (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>-) levels in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 153. 32-4. (1997)
124. Zafranskaya M, Oschmann P, Engel R, Weishaupt A, van Noort JM, Jomaa H, Eberl M: Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis. *Immunology*. 121. 29-39. (2007)
125. Zajicek JP, Wing M, Scolding NJ, Compston DA: Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain*. 115. 1611-31. (1992)
126. Zamvil SS, Steinman L: Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron*. 38. 685-8. (2003)
127. Ziemssen T, Kümpfel T, Klinkert WEF, Neuhaus O, Hohlfeld R: Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. *Brain*. 125. 2381-91. (2002)

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. M.Sailer, Professor für Restaurative Neurologie und Chefarzt des Neurologischen Rehabilitationszentrums Magdeburg, für die Überlassung des Themas bedanken. Neben der Finanzierung des Projekts und der strukturellen Führung bedanke ich mich auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Es war mir immer eine Freude im Labor zu arbeiten. Viele lange Tage wurden mir versüßt durch die Kollegen, die mir wertvolle Tipps gaben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Hier möchte ich besonders Dr. Jonathan Lindquist für seine Unterstützung und Geduld bei der Erklärung des FACS-Gerätes danken.

Viele Techniken lernte ich von den medizinisch-technischen Assistentinnen. Vielen Dank dafür.

Liebe Sabine, vielen Dank, dass Du mich bei dieser Arbeit betreut hast. Neben dem experimentellen und wissenschaftlichen Arbeiten habe ich von dir auch gelernt, dass es möglich ist Familie und Beruf zu vereinen. Vielen Dank, dass Du mir immer helfend zur Seite gestanden hast.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinen Brüdern. Unzählige Male habt Ihr mich bedingungslos unterstützt und ermutigt. Ich bin so froh, dass Ihr meine Familie seid.

Jochen, was wäre ich ohne Dich? Wer wäre ich ohne Dich? Eins weiß ich sicher, ohne Dich hätte ich das nicht geschafft. Danke.

---

## Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Die Balance pro-inflammatorischer und trophischer Faktoren bei Patienten mit Multipler Sklerose im akuten Schub“**

in der Neurologischen Universitätsklinik der OvGU Magdeburg

mit Unterstützung durch Dr. med. S. Lindquist und Prof. M. Sailer

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 28.10.2011

---

## Curriculum vitae

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Name                          | Sarah Hassinger  |
| Adresse                       | Hermann-Billingstr.12<br>76137 Karlsruhe<br>sarah.hassinger@gmx.li   |
| Geburtsdatum, -ort:           | 12.05.1981, Zweibrücken  |
| Nationalität                  | deutsch  |
| Familienstand                 | verheiratet  |
| 1991-2000                     | Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken  |
| Oktober 2000                  | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  |
| März 2003                     | Ärztliche Vorprüfung (Physikum)  |
| Juli 2004                     | Beginn der Forschungstätigkeit im Rahmen der Promotion, Thema: <u>„Die Balance pro-inflammatorischer und trophischer Faktoren bei Patienten mit Multipler Sklerose im akuten Schub“</u> , Betreuerin: Frau Dr. med. S. Lindquist und Prof. Dr. med. M.Sailer |
| Februar 2006<br>– Januar 2007 | Praktisches Jahr   |
| Mai 2007                      | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
| Juni 2007                     | Approbation als Ärztin   |
| November 2007<br>- Juli 2011  | Assistenzärztin Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs-<br>chirurgie des Ameos Klinikums Halberstadt  |
| Seit August 2011              | Assistenzärztin Orthopädie II des SRH-Klinikums in Karlsbad-<br>Langensteinbach  |

Magdeburg, den 28.10.11

Sarah Hassinger

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1.1: MS-Immunpathologie   | 7  |
| Abb. 1.2: Schema des FACS-Calibur  | 13 |
| Abb. 1.3: Studiendesign  | 14 |
| Abb. 2.1: Dichtegradientenzentrifugation von peripher entnommenem, venösen Blut in Ficoll  | 17 |
| Abb. 3.1: Spezifitätskontrolle für den Primärantikörper  | 25 |
| Abb. 3.2: Kontroll-FACS –Profile   | 26 |
| Abb. 3.3: Optimierung der TNF $\alpha$ -Färbung  | 26 |
| Abb. 3.4: Optimierung der iNOS-Färbung   | 27 |
| Abb. 3.5: FACS-Profile für eine BDNF-Färbung   | 27 |
| Abb. 3.6: FACS-Profile für eine CNTF-Färbung   | 28 |
| Abb. 3.7: FACS-Profile der MHCI-Färbung  | 28 |
| Abb. 3.8: FACS-Profile der MHC II-Färbung  | 29 |
| Abb. 3.9: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF in MNZ. RT-PCR.  | 30 |
| Abb. 3.10: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF in MNZ. Immunzytochemie.  | 30 |
| Abb. 3.11: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF. Doppelfärbung CNTF.  | 31 |
| Abb. 3.12: Vergleiche der Expression von CNTF und BDNF. Doppelfärbung BDNF.  | 32 |
| Abb. 3.13: Expression von TNF $\alpha$ , iNOS, CNTF, BDNF und MHC I bei Patienten mit MS   | 34 |
| Abb. 3.14: Glukokortikoidbehandlungseffekt auf Leukozytensubpopulationen   | 36 |
| Abb. 3.15: Effekte der hoch-dosierten IFN- $\beta$ -Therapie bei MS-Patienten innerhalb der Expressionsniveaus von TNF $\alpha$ , iNOS, CNTF, BDNF und MHC I | 38 |
| Abb. 3.16: Korrelation der individuellen Expression von BDNF und TNF $\alpha$ im akuten Schub  | 40 |
| Abb. 3.17: Keine Korrelation der individuellen Expression von BDNF/CNTF, CNTF/TNF $\alpha$ und CNTF/iNOS   | 41 |
| Abb. 3.18: Individuelle Wertniveaus von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I zeigen keine Korrelation mit dem MSSS                                      | 42 |
| Abb. 3.19: Keine Korrelation der Expression von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I mit dem Alter der Patienten  | 43 |
| Abb. 3.20: Vergleich von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I anhand der Krankheitsdauer.   | 45 |
| Abb. 3.21: Vergleich von BDNF, CNTF, TNF $\alpha$ , iNOS und MHC I an den Tagen D1, D4 und D30, stratifiziert nach Geschlecht.                               | 46 |