

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Interferon- β moduliert die Expression von Toll-like Rezeptoren in mononukleären
Blutzellen und induziert Toll-like Rezeptor 7 in plasmazytoiden dendritischen Zellen von
Patienten mit Multipler Sklerose**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jakob Moritz Johannes Bauer

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Multiple Sklerose	9
1.1.1 Ätiologie.....	9
1.1.2 Pathogenese.....	11
1.1.3 Klinischer Verlauf.....	12
1.2 Interferon- β -Therapie.....	12
1.3 Toll-like Rezeptoren.....	15
2 Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Studiendesign	21
3.2 Untersuchungsmaterial und Spender.....	21
3.3 Materialien	22
3.3.1 Geräte	23
3.3.2 Sonstige Materialien und Verbrauchsmaterialien.....	23
3.3.3 Chemikalien/Reagenzien.....	24
3.3.4 Enzyme, rekombinante Proteine, TLR-Liganden.....	24
3.3.5 Plasmide	25
3.3.6 Antikörper	25
3.3.7 Kommerzielle Kits	26
3.3.8 Medien und Puffer.....	27
3.3.9 Software	27
3.4 Methoden.....	27
3.4.1 Zellbiologische Methoden.....	27
3.4.1.1 Blutabnahme und Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	27
3.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl	28
3.4.1.3 Einfrieren von Zellen	28
3.4.1.4 Auftauen von Zellen	29
3.4.1.5 Stimulation der PBMC.....	29
3.4.1.6 Zellernte	30
3.4.1.7 Transfektion von HEK293-Zellen mit TLR-Plasmiden.....	30
3.4.2 Molekularbiologische Methoden.....	31
3.4.2.1 Quantitative Real Time PCR (qPCR)	31
3.4.2.1.1 RNA-Isolation	31
3.4.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	31
3.4.2.1.3 cDNA-Synthese	31
3.4.2.1.4 qPCR.....	32
3.4.2.1.5 Auswertung.....	33
3.4.2.1.6 Statistik	34
3.4.2.2 Aufbereitung von Plasmiden.....	34
3.4.3 Immunologische Methoden.....	35
3.4.3.1 Durchflusszytometrie.....	35
3.4.3.1.1 Färbung der PBMC.....	35
3.4.3.1.2 Zellphänotypisierung.....	36

3.4.3.1.3	Auswertung.....	37
3.4.3.2	Zytokinmessung mittels Flowcytomix-Assay.....	37
3.4.3.3	Zytokinmessung mittels ELISA.....	38
4	Ergebnisse	39
4.1	IFN- β reguliert die Expression von TLR- und MyD88-mRNA in humanen PBMC <i>in vitro</i>	39
4.1.1	Der Effekt von IFN- β auf die Expression von TLR- und MyD88-mRNA in PBMC ist zeit- und dosisabhängig	41
4.2	IFN- β reguliert die Expression von TLR- und MyD88-Protein in Subpopulationen humaner PBMC <i>in vitro</i>	44
4.2.1	TLR3	44
4.2.2	IFN- β induziert die Expression von TLR7-Protein in pDC <i>in vitro</i>	46
4.2.3	IFN- β induziert die Expression von TLR9-Protein in pDC <i>in vitro</i>	48
4.2.4	IFN- β induziert die Expression von MyD88-Protein in pDC <i>in vitro</i>	50
4.3	IFN- β induziert die Expression von TLR7- und MyD88-Protein in pDC in MS-Patienten <i>in vivo</i>	52
4.4	Der Einfluss von IFN- β auf die relative Zellzahl verschiedener PBMC- Subpopulationen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
4.5	IFN- β erhöht die TLR7-abhängige Produktion von IFN- α , TNF- α und weiteren Zytokinen in PBMC	56
4.5.1	Die Induktion der TLR7-abhängigen Produktion von IFN- α und TNF- α durch IFN- β ist dosis- und zeitabhängig	59
4.5.1	Die Induktion der TLR9-abhängigen Produktion von IFN- α und TNF- α durch IFN- β ist dosis- und zeitabhängig	61
4.5.2	IFN- β erhöht die TLR7- und TLR9-abhängige Produktion von IFN- α in pDC.....	64
5	Diskussion	67
5.1	Diskussion der Hauptergebnisse im Kontext der Literatur	67
5.2	Schlussfolgerungen	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
	Eidesstattliche Versicherung	87
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	87
	Lebenslauf.....	88
	Publikationen und Kongressbeiträge	89
	Danksagung.....	90
	Supplement	91

Zusammenfassung

Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems und die wahrscheinlichste Ursache nichttraumatischer Behinderung im jungen Erwachsenenalter¹. Bezüglich der Ätiologie werden eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren und Infektionen, v.a. viraler Genese, diskutiert. Die Pathogenese beruht auf Autoimmungeschehen unter Beteiligung autoreaktiver T-Zellen und Autoantikörpern. In Mausmodellen der MS nehmen Toll-like Rezeptoren (TLR) eine regulatorische Rolle bei der Entstehung und im Verlauf der Krankheit ein.² Als Bestandteil des nicht-adaptiven Immunsystems erkennen TLR hoch konservierte molekulare Strukturen von Pathogenen wie Viren und Bakterien. Das 1993 als erstes spezifisches MS-Therapeutikum zugelassene Interferon- β (IFN- β) ist bis heute das am meisten verschriebene³. Es interferiert mit der Virusreplikation, reguliert zahlreiche Gene und moduliert das Immunsystem. Über welchen genauen Mechanismus IFN- β bei Patienten mit MS therapeutisch wirkt, wurde bisher nicht abschließend geklärt.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Medikaments IFN- β auf die beim Menschen bekannten TLR1-10 sowie ihr Adapterprotein MyD88 untersucht.

Methodik

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gesunder Spender sowie von Patienten in einem frühen Stadium der MS oder mit klinisch isoliertem Syndrom (KIS) wurden isoliert. PBMC gesunder Spender wurden mit IFN- β stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte PBMC. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde die relative TLR-mRNA-Expression bestimmt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die TLR-Proteinexpression verschiedener PBMC-Subpopulationen untersucht. Ebenso wurde die Expression von TLR7- und MyD88-Protein in PBMC-Subpopulationen mit IFN- β therapierter MS/KIS-Patienten durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten Patienten, die Glatirameracetat oder keine Therapie erhielten. Die funktionelle Bedeutung der TLR-Regulationen wurde durch Stimulation mit den jeweiligen TLR-Liganden und anschließender Zytokinmessung mittels ELISA, Flowcytomix-Multiplexing-Assay und Durchflusszytometrie untersucht.

Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass IFN- β die Expression von TLR3-, TLR7- und MyD88-mRNA in PBMC *in vitro* verstärkt und die Expression von TLR6- und TLR9-mRNA verringert. Diese Regulationen waren zeit- und dosisabhängig. Auch auf Proteinebene wurde eine Hochregulation von TLR7 und MyD88 durch IFN- β *in vitro* nachgewiesen, und zwar in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC).

Diese Wirkung von IFN- β auf die Expression von TLR7 und MyD88 zeigte sich auch *in vivo*: TLR7- und MyD88-Protein waren in pDC IFN- β -behandelter MS/KIS-Patienten gegenüber unbehandelten oder mit Glatirameracetat behandelten Patienten stärker exprimiert.

Die Hochregulation von TLR7 in pDC ist von funktioneller Bedeutung. So führte die Vorbehandlung von PBMC mit IFN- β zu einer stark gesteigerten IFN- α -Produktion durch pDC nach Stimulation mit dem TLR7-spezifischen Liganden Loxoribine. Demnach könnte zumindest ein Teil der Wirkung von IFN- β bei Patienten mit MS darauf beruhen, dass die gesteigerte, durch TLR7 vermittelte antivirale Immunität MS-Schübe, die im Rahmen viraler Infekte vermehrt auftreten,⁴ verringert.

Abstract

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is one of the most common chronic diseases of the central nervous system and the major cause of non-traumatic disability in young adults¹. With regard to etiology a genetic predisposition, environmental factors and (mainly viral) infections are being discussed. The pathogenesis is based on autoimmune processes involving auto-reactive T-Cells and antibodies. In MS mouse models toll-like receptors (TLR) play a regulatory role in the development and course of the disease.² As part of the non-adaptive immune system TLR sense highly conserved molecular structures of viruses and bacteria. Interferon- β (IFN- β) was approved in 1993 as the first specific MS therapeutic and remains the most commonly prescribed one³. It interferes with viral replication, regulates numerous genes and modulates the immune system. By which exact mechanism IFN- β is effective in MS patients has not been completely elucidated.

In this study the effect of IFN- β on human TLR1-10 and the adapter protein MyD88 was investigated.

Methods

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were stimulated with IFN- β or were left untreated, and TLR mRNA and protein expression were determined by quantitative real time PCR and flow cytometry of different PBMC subpopulations, respectively. Likewise, expression of TLR7 and MyD88 protein was determined by flow cytometry of PBMC subsets from differently treated MS patients. The functional relevance of the TLR regulations was investigated by stimulation with TLR ligands and subsequent cytokine measurements by ELISA, Flowcytomix multiplexing and flow cytometry.

Results

This study showed that IFN- β upregulates the expression of TLR3, TLR7, and MyD88 mRNA in PBMC and downregulates the expression of TLR6 and TLR9 mRNA *in vitro*. These regulations were time and dose dependent. Upregulation of TLR7 and MyD88 by IFN- β *in vitro* were also detected on protein level and were assigned to plasmacytoid dendritic cells (pDC).

This effect of IFN- β on TLR7 and MyD88 expression was also shown *in vivo*: TLR7 and MyD88 protein were expressed stronger in pDC of MS/CIS patients treated with IFN- β compared to untreated or patients treated with glatiramer acetate.

Upregulation of TLR7 in pDC is of functional relevance since pre-stimulation of PBMC with IFN- β lead to a strongly increased IFN- α response by pDC upon stimulation with the TLR7-specific ligand loxoribine. pDC sense viruses via TLR7 and initiate antiviral immune responses. The enhanced TLR7 mediated antiviral immunity may contribute to the therapeutic effect of IFN- β in MS patients by preventing MS relapses that are known to occur more often during viral infections⁴.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
CD	Oberflächenmolekül
cDNA	komplementäre DNA
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligonukleotide (TLR9-spezifischer Ligand)
C _t	PCR-Zyklus, ab welchem die Amplifikation exponentiell erfolgt
DAMP	Gefahr-assoziierte molekulare Muster
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (ein Maß für das Volumen von Zellen in der Durchflusszytometrie)
g	Gramm
GA	Glatirameracetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HD	gesunde Spender
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	Referenzgen (in der qPCR)
HLA	humane Leukozyten-Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-Rezeptor
IFN- α	Interferon- α
IFN- β	Interferon- β
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma-induziertes-Protein-10
IRF-3/-7	Interferon-regulierender-Faktor-3 und -7
ISRE	Interferon-sensitive-Antwort-Elemente
JAK1	Januskinase 1
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
l	Liter
Lox	Loxoribine (TLR7-spezifischer Ligand)
LPS	Lipopolysaccharide (TLR4-spezifischer Ligand)
μ	Mikro
μ M	Mikromol
M	Molar/Mol
m	Milli
MBP	Myelin-basisches-Protein

mDC	myeloide dendritische Zellen
mdDC	von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen
MFI	arithmetische mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minute(n)
MIP-1 α	Inflammatorisches Makrophagen-Protein-1 α
M-MLV-RT	reverse Transkriptase des murinen Moloney-Leukämie-Virus
mRNA	Boten-RNA
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
Mx1	Myxovirus-Resistenz-Gen-1
MyD88	primäres Antwortprotein der myeloiden Differenzierung (88)
NF- κ B	Nukleärer-Faktor- κ B
nm	Nanometer
NTC	Leerkontrolle (in der qPCR)
OD	Optische Dichte
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
pg/ml	Picogramm/Milliliter
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidil-Säure (TLR3-spezifischer Ligand)
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI Medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RRMS	schubförmig verlaufende MS
RT	Raumtemperatur
-RT	Leerkontrolle in der reversen Transkription
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht (ein Maß für die Granularität von Zellen in der Durchflusszytometrie)
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT	Signal-Transduktoren und Aktivatoren der Transkription (bestimmte Transkriptionsfaktoren)
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor(en)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRIF	TIR-Domänen-beinhaltenender Interferon- β -induzierender Adapter
Tyk2	Tyrosinkinase 2
U	Unit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
GOI	Zielgen (in der qPCR)
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte, entzündliche, demyelinisierende chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die in ihrem Verlauf auch zur Schädigung von Axonen und zum Untergang von Neuronen führt⁵. Ihre Folgen sind u.a. Sensibilitätsstörungen und motorische Funktionsausfälle. In Europa und den USA ist sie die häufigste Ursache nichttraumatischer Behinderung im jungen Erwachsenenalter. Ihre Inzidenz liegt weltweit unterschiedlich bei 4-8 Neudiagnosen auf 100.000 Einwohner im Jahr und ist bei 30-jährigen am höchsten. Frauen sind insgesamt etwa dreimal so häufig betroffen wie Männer. Die Ätiologie ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt.¹

1.1.1 Ätiologie

Mehrere Faktoren werden als ursächlich für die MS diskutiert. Unter anderem gibt es Hinweise auf eine genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse und virale Infektionen. So ist die MS-Inzidenz geographisch sehr verschieden mit hohen Fallzahlen in gemäßigten Klimazonen in Europa, Russland, den USA und Südaustralien und mit geringen Fallzahlen in Ländern nahe dem Äquator.⁶ Aber auch innerhalb Europas und der USA gibt es einen deutlichen Nord-Süd Gradienten. Dieser Zusammenhang wurde bereits sehr früh, gegen Mitte des letzten Jahrhunderts als Hinweis auf die Ätiologie der MS diskutiert.⁷ Unter anderem scheinen Sonnenlicht und die hiervon abhängige intrakutane Produktion von Vitamin-D protektiv zu wirken. So konnten sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen mit MS niedrige Vitaminspiegel nachgewiesen werden.^{8,9} In einer großen prospektiven Studie, die ca. 200.000 Frauen über einen Gesamtzeitraum von über 20 Jahren beobachtete, sank die MS-Inzidenz mit zunehmender Vitamin-D-Aufnahme.¹⁰ Ob die Gabe von Vitamin-D bei MS-Patienten als Ko-Medikation effektiv ist, wird aktuell in mehreren klinischen, kontrollierten Studien untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01490502, NCT01198132, NCT01285401). Zwei bereits abgeschlossene Studien kamen vorerst aber zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Studie mit wöchentlicher Gabe von 20.000 IU Vitamin-D über ein Jahr ergab sich eine signifikante Besserung gemessen an MRT-Parametern und nicht statistisch signifikante Verbesserungen klinischer Endpunkte.¹¹ In einer anderen Studie mit derselben Medikation über zwei Jahre fanden sich hingegen keinerlei Besserungen von MS-Symptomen.¹² Beide Studien waren jedoch zu klein, um Unterschiede hinsichtlich klinischer Endpunkte verlässlich zu erfassen.

Auch eine infektiöse Genese der MS wird schon sehr lange diskutiert. Schon Pierre Marie vermutete 1884 eine infektiöse Ursache der Erkrankung, 16 Jahre nachdem sein Lehrer Jean-Martin Charcot die Krankheit erstmals klinisch und pathologisch detailliert beschrieben hatte.¹³ Seitdem wurden immer neue Erreger, insbesondere Viren, mit der Krankheit in Verbindung gebracht, konnten aber in Folgeuntersuchungen nicht einheitlich bestätigt werden. Die konsistentesten Ergebnisse liegen zurzeit für das Epstein-Barr Virus vor.¹⁴ Ebenfalls deutlich ist ein zeitlicher Zusammenhang zwischen viralen Infekten und MS-Exazerbationen.^{15,16}

Für eine genetische Prädisposition gibt es mehrere Anhaltspunkte. So tritt die MS familiär gehäuft auf, wobei nur biologisch verwandte, nicht aber z.B. adoptierte Kinder ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen.¹⁷ Einige ethnische Gruppen, wie z.B. die nordamerikanischen Indianer, zeigen ein deutlich niedrigeres Risiko als es für die Region typisch ist.¹⁸ Die Konkordanz ist bei eineiigen Zwillingen mit 31 % deutlich höher als 5 % bei zweieiigen Zwillingen.¹⁹ Eine Assoziation von genetischen Markern und MS wurde erstmals vor fast 40 Jahren für Allele der humanen Leukozyten-Antigene (HLA) gezeigt.²⁰⁻²² Mittels genomweiter Assoziationsstudien konnten inzwischen viele weitere Marker gefunden werden. Die größte Studie dieser Art, mit annähernd 10.000 MS-Patienten und 20.000 gesunden Kontrollindividuen, fand 52 MS-assoziierte Genloci, von denen 29 erstmals identifiziert werden konnten und die alle eine geringe Odds-Ratio zwischen 1,1 und 1,3 aufwiesen. Lediglich einige HLA-Haplotypen wiesen eine höhere Odds-Ratio auf, insbesondere DRB1*15:01 (Serotyp HLA-DR2) mit einer Odds-Ratio von 3,08. Damit ist dieser Haplotyp der am stärksten MS-assoziierte Genlocus. Seine Träger haben eine 3,08-fach höhere Chance oder Odds, an MS zu erkranken als die Nichtträger. Er findet sich in 28-33 % der kaukasischen MS-Patienten und in 9-15 % der Kontrollgruppe. Im Übrigen konnte etwa ein Drittel der Assoziationen Genen des Immunsystems, insbesondere Genen, die in die T-Helfer-Zell Differenzierung involviert sind, zugeordnet werden.²³

Unter anderem die vergleichsweise niedrigen Konkordanzraten und die bescheidenen Odds-Ratios weisen darauf hin, dass weitere, äußere Faktoren bei der Entstehung der MS mitwirken. Genetische und Umweltfaktoren können sich auch gegenseitig beeinflussen. So wird von einer Regulation vieler assoziierter Gene, einschließlich HLA DRB1*15:01, durch Vitamin D ausgegangen.^{24,25} Umgekehrt spielt das MS-assoziierte Cytochrom-P450-Enzym CYP27B1 (1 α -Hydroxylase) eine entscheidende Rolle beim Vitamin-D-Metabolismus: es hydroxyliert das Vorläufermolekül zum biologisch aktiven Vitamin D, dem Calcitriol, in der Niere.²⁶

Somit muss heute von einer multifaktoriellen Ätiologie ausgegangen werden. Bei gegebener genetischer Prädisposition können bestimmte äußere Faktoren zur Erkrankung führen.

1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der MS wird als Autoimmunprozess beschrieben. Angenommen wird, dass autoreaktive T-Zellen peripher aktiviert werden und anschließend die Blut-Hirn-Schranke durchwandern. Im ZNS erkennen diese T-Zellen Proteine der Myelinscheiden, wie das Myelinbasierte-Protein (MBP), als Autoantigene. Dadurch wird eine inflammatorische Immunreaktion im ZNS ausgelöst. In deren Verlauf werden auch B-Zellen und Makrophagen aktiviert sowie zahlreiche proinflammatorische Zytokine freigesetzt.²⁷ In den so entstehenden Entzündungsherden wurden auch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) nachgewiesen.²⁸ Die Annahme einer autoimmunen Genese wird durch ein Tiermodell der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), gestützt, die z.B. durch Injektion von MBP in Mäuse induziert wird. Die Entzündungsreaktion schädigt die Myelinscheiden, die die Axone umgeben und elektrisch isolieren. Auch die Oligodendrozyten, die das Myelin bilden, gehen zugrunde. Die betroffenen Fasern verlieren in der Folge ihre Isolierung und leiten Signale schlechter fort. In gewissem Maß ist eine Remyelinisierung möglich, die sich aber im Laufe der Krankheit erschöpft. Umliegende Astrozyten proliferieren und ersetzen schließlich die geschädigten Markscheiden, nicht aber deren Funktion, als gliöse Narben. Deren morphologisches Korrelat sind die MS-Plaques in Hirnschnitten und Magnetresonanzaufnahmen. Entgegen der langjährigen Annahme einer Erkrankung ausschließlich der weißen Materie degenerieren auch Axone, und Neurone sterben ab.^{5,29} Dies geschieht bereits im frühen Krankheitsverlauf und ist mit den entzündlichen Prozessen eng assoziiert.³⁰ Axonale Schädigung findet sich aber nicht nur in den MS-Läsionen, sondern auch in der gesund erscheinenden weißen Materie³¹ und im Cortex²⁹. Außer einer Schädigung durch Immunzellen oder -mediatoren werden als mögliche Mechanismen unter anderem ein erhöhter Energiebedarf der Axone bei Entzündung, eine Verschiebung des Elektronengleichgewichts an der Mitochondrienmembran und oxydativer Stress diskutiert.³²

Die gestörte zentrale Signalverarbeitung kann zu sehr verschiedenen Symptomen führen, wie z.B. Empfindungsstörungen, Lähmungen, Koordinationstörungen, Visusminderung und Harninkontinenz. Während im frühen Krankheitsgeschehen meist die entzündliche Demyelinisierung im Vordergrund steht, die zu vorübergehenden Defiziten führt, nimmt die Neurodegeneration mit Verlauf und Schwere der Krankheit zu und verursacht bleibende Behinderungen.^{33,34} Entscheidend ist hierbei scheinbar nicht eine Zunahme des Axon- und Neuronuntergangs, sondern das Erschöpfen der ZNS-Plastizität, die im frühen Krankheitsverlauf Funktionsverluste kompensiert.^{35,36}

Die Therapie der MS beinhaltet mehrere medikamentöse Ansätze. Die sogenannten

Basistherapeutika wirken modulierend auf das Immunsystem. Sie sollen die zugrundeliegende pathologische Immunreaktion hemmen und so die Langzeitprognose der Patienten verbessern. Auf eines dieser Medikamente, IFN- β , soll im Folgenden näher eingegangen werden. Akute Exazerbationen, die sogenannten MS-Schübe, werden mit Methylprednisolonpulstherapie behandelt, die zur schnellen Suppression der Entzündungsreaktion führen soll. Die zahlreichen neurologischen Symptome, die im Krankheitsverlauf auftreten können, werden durch unterschiedliche Pharmaka symptomatisch behandelt, die ihre Wirkung vor allem an den zentralen Synapsen entfalten.³⁷ So kann zum Beispiel die Spastik mit Baclofen behandelt werden, das GABA-B-Rezeptoren im Rückenmark stimuliert.¹

1.1.3 Klinischer Verlauf

Klinisch wird die MS in mehrere Verlaufsformen unterteilt: In über 80 % der Fälle beginnt sie mit einem schubförmigen Verlauf (*relapsing remitting multiple sclerosis*, RRMS). Dabei treten Ausfälle in auch mehrere Tage anhaltenden Schüben auf, die von einer vollständigen Remission über Monate bis wenige Jahre unterbrochen sind. Bei 50 % der so Erkrankten findet innerhalb von 10 Jahren ein Übergang in eine sekundär progrediente Form statt, bei der Remissionen unvollständig sind und der Behinderungsgrad zunimmt. 10 % aller Patienten erkranken primär progredient. Bei ihnen sind keine sicheren Schübe abgrenzbar.^{1,38}

Die erste Krankheitsmanifestation einer MS ist häufig das klinisch-isolierte Syndrom (KIS). Dabei handelt es sich um typische Frühsymptome einer demyelinisierenden Erkrankung. Die Diagnose MS kann zu diesem Zeitpunkt nicht immer sicher gestellt werden. Seit der zweiten Überarbeitung der McDonald Kriterien ist eine Diagnose jedoch bereits zu diesem frühen Zeitpunkt möglich, wenn ein MRT neben den zur Klinik passenden Läsionen auch mindestens eine asymptomatische, floride, kontrastmittelaufnehmende Läsion zeigt.³⁹ Hierdurch wird das geforderte Kriterium der zeitlichen Dissemination des Krankheitsprozesses erfüllt. Das Kriterium der räumlichen Dissemination ist erfüllt, wenn die Läsionen in mindesten zwei von vier verschiedenen Hirnregionen liegen.

1.2 Interferon- β -Therapie

Interferone wurden erstmals 1957 als antivirale Substanzen beschrieben, die mit der Replikation von Viren interferieren.⁴⁰ Heute weiß man, dass es sich um eine Gruppe von aus Zellen sezernierten Proteinen handelt, die im Menschen als immunmodulatorische Zytokine wirken. Sie werden in die Typ-I-Interferone Interferon- α (IFN- α), Interferon- β (IFN- β) und Interferon- ω

(IFN- ω) sowie das Typ-II-Interferon Interferon- γ (IFN- γ) unterteilt.

IFN- γ wird von Th1-Helferzellen im Rahmen der Immunantwort auf Bakterien produziert und wirkt dort u.a. auf Makrophagen, welche die Bakterien phagozytieren. IFN- β , IFN- ω und IFN- α , die wiederum in Unterformen unterteilt werden können, werden von virusinfizierten Zellen produziert. Der größte Anteil an produzierten Interferonen wird jedoch von IFN- α gebildet, das von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) im Rahmen der angeborenen Immunantwort auf Viren sezerniert wird.⁴¹

Unter der Annahme einer viral bedingten Genese der MS begann man in den 70er Jahren, MS-Patienten in klinischen Studien mit Interferonen zu behandeln. IFN- α wies viele Nebenwirkungen auf, und IFN- γ führte in einigen Fällen zu gehäuften und schweren MS-Schüben.⁴² IFN- β schien die Anzahl an Schüben hingegen zu senken, und große Zulassungsstudien wurden initiiert.

Rekombinantes IFN- β wurde 1993 unter dem Handelsnamen Betaferon[®] als erstes Medikament zugelassen, das spezifisch den Krankheitsverlauf bei RRMS beeinflusst.⁴³ Es reduziert die Zahl der Krankheitsschübe um etwa ein Drittel, vermindert die Zahl und das Neuauftreten im MRT erkennbarer Läsionen um etwa zwei Drittel⁴⁴ und verlangsamt das Fortschreiten der Behinderung⁴⁵, wobei letzteres nicht in allen Studien sicher bestätigt werden konnte. In einer aktuellen retrospektiven Studie konnte kein positiver Effekt der IFN- β -Therapie auf die Zeit bis zum Erreichen eines bestimmten Behinderungsgrades nachgewiesen werden.⁴⁶ Eine andere Arbeit hingegen beschrieb kürzlich, dass die IFN- β -behandelten Patienten der oben zitierten Zulassungsstudie von 1993 bis heute ein besseres Überleben zeigen als die Patienten der damaligen Placebo-Gruppe.⁴⁷ Als Schubprophylaxe bei KIS senkt IFN- β das Risiko eines zweiten Schubes, vermindert das Neuauftreten von Läsionen im MRT und reduziert die Zahl der Konversionen zur klinisch gesicherten MS um bis zu 50 %.⁴⁸ Bei sekundär progressiver Verlaufsform reduziert es zwar die Frequenz der aufgesetzten Schübe, beeinflusst aber wahrscheinlich nur im frühen Verlauf den Grad der Behinderung.⁴⁹ Eine Wirkung bei primär-progressiver MS wurde bisher nicht hinreichend nachgewiesen.^{50,51}

Der Wirkmechanismus des rekombinanten IFN- β ist unklar. Wie die endogenen Typ-I-Interferone bindet es an den Interferonrezeptor (*interferon (alpha, beta and omega) receptor*; IFNAR), der auf fast allen Zelloberflächen exprimiert ist. Dieser besteht aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, an die intrazellulär u.a. je eine Tyrosinkinase 2 (Tyk2) bzw. Januskinase 1 (JAK1) gekoppelt ist. Die Ligandierung von Interferon an IFNAR führt über eine intrazelluläre Kaskade von Phosphorylierungen zur Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, den STAT-Proteinen (*signal inducer and activator of transcription*,

STAT), die mit weiteren Proteinen Komplexe bilden und in den Zellkern translozieren. Dort binden sie an spezifische DNA-Abschnitte, die Interferon-sensitiven-Antwort-Elemente (*Interferon Sensitive Response Elements*, ISRE), die sich in der Promotorregion zahlreicher Interferon-regulierter Gene befinden. Dies führt zur Herunter- und Hochregulation von über 1000 Genen.⁴⁴ Der therapeutische Wirkmechanismus des rekombinanten IFN- β bei MS beruht dabei wahrscheinlich auf mehreren immunmodulatorischen Effekten. Wie die endogenen Typ-I-Interferone wirkt es als antivirales Zytokin.⁵² Es ändert über dendritische Zellen (DC) das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen⁵³ und hemmt über Interleukinmodulation in DC und B-Zellen die Differenzierung von Th17-Zellen⁵⁴. Außerdem wurde nachgewiesen, dass es die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (*major histocompatibility complex II*, MHCII) auf Monozyten und Mikroglia vermindert und die Antigenpräsentation beeinflusst⁵⁵ sowie T-Zell-Proliferation, -Expansion und -Differenzierung vermindert und zur Apoptose von T-Zellen führt^{56,57}. Weiterhin hindert es Immunzellen am Passieren der Blut-Hirn-Schranke.^{57,58}

Da es sich um ein Protein handelt, muss IFN- β parenteral verabreicht werden. Nach IFN- β -1b, Betaferon[®], das zu 250 μ g subkutan jeden zweiten Tag injiziert wird, wurden IFN- β -1a, Avonex[®], das einmal pro Woche zu 30 μ g intramuskulär injiziert wird, und Rebif[®] zugelassen, das dreimal pro Woche zu 22 oder 44 μ g subkutan injiziert wird.¹

Bis heute ist es in seinen unterschiedlichen Darreichungsformen das weltweit am häufigsten verschriebene MS-Basistherapeutikum.³ Ein Vorteil gegenüber den neueren, teilweise wirksameren Medikamenten wie Fingolimod, Mitoxantron, Natalizumab und weiteren therapeutischen Antikörpern liegt in seinen geringeren Nebenwirkungen und der bekannten langfristigen Verträglichkeit. Aus diesem Grund werden die oben genannten neuen Medikamente vorrangig in der Eskalationstherapie und bei primär schweren Krankheitsverläufen angewandt.¹

Der größte Nachteil der IFN- β -Therapie ist, dass nur ungefähr jeder zweite Patient darauf anspricht. So bekommen nach 6 Monaten Therapie ca. 50 % der Patienten weiterhin neue Läsionen, die auf T2-gewichteten Magnetresonanzbildern nachweisbar sind, und können als therapieresistent eingestuft werden.⁴⁸ Therapieerfolg und Therapieversagen sind jedoch nicht einheitlich definiert und MRT-Befund und Klinik korrelieren nicht zwangsläufig, weshalb verschiedene Angaben zur Ansprechrate in der Literatur zu finden sind. Bisher gibt es weder eine Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen, noch die Möglichkeit, es z.B. anhand eines Biomarkers vorherzusagen.^{59,60} Dies wäre aber angesichts der neuen Therapieoptionen wichtig, um einen fundierten Wechsel des Medikaments zu erleichtern.

Bekannt ist, dass unter IFN- β -Therapie nach 9-24 Monaten neutralisierende Antikörper gebildet werden können und diese die biologische Aktivität und den therapeutischen Nutzen

vermindern.⁶¹ Zweimalig hochtitrig gemessene neutralisierende Antikörper bei fortschreitender klinischer Verschlechterung des Patienten sind zumindest ein gesichertes Kriterium für einen Therapiewechsel.¹

1.3 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören inzwischen zu den am besten charakterisierten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Aber auch Zellen der adaptiven Immunantwort und viele weitere Körperzellen exprimieren TLR. Sie sind evolutionär hoch konserviert. Das Protein Toll, nach dem sie aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit benannt wurden, war 1985 in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt worden⁶² und spielt dort eine entscheidende Rolle sowohl bei der Embryogenese als auch bei der Immunantwort.

Als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems von Säugetieren erkennen TLR als Liganden spezifische Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP), die ebenfalls hoch konserviert sind und von vielen unterschiedlichen Krankheitserregern exprimiert werden.⁶³ Neben den TLR wurden zahlreiche weitere Muster-erkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) entdeckt, wie zum Beispiel Scavenger-Rezeptoren auf Phagozyten oder das lösliche Mannose-bindende Lektin.

Für den Menschen sind 10 unterschiedliche TLR beschrieben (TLR1-10), für die Maus 13 (TLR1-13), wobei TLR10 dort wahrscheinlich nicht funktionell ist. TLR lassen sich aufgrund ihrer Lokalisation in zwei Gruppen unterteilen: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen vor allem mikrobielle Membranbestandteile. So bindet TLR2 zum Beispiel Lipoteichonsäure, ein Bestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien, und TLR5 erkennt das Flagellin begeißelter Bakterien. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 befinden sich ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen, Lysosomen, Endolysosomen und dem endoplasmatischen Retikulum und erkennen virale und mikrobielle Nukleinsäuren. Vor allem TLR3, TLR7 und TLR9 sind für die antivirale Immunantwort essentiell.⁶⁴ TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), TLR7 einzelsträngige RNA (ssRNA) und TLR9 bindet DNA. Synthetische Liganden für TLR7 sind Imidazoquinoline (Imiquimod und R848) und Loxoribine (7-allyl-7,8-dihydro-8-oxoguanosine), deren Struktur jener von Nukleinsäuren ähnelt.⁶⁵ Die ssRNA40 des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ist als „natürlicher“ Ligand von TLR7 bekannt.⁶⁶

Die Struktur von Toll und TLR zeichnet sich durch einen membrandurchspannenden Teil, eine Leucin-reiche Ektodomäne zur Bindung der Liganden und eine zytosolische Toll/Interleukin-1-

Rezeptor-Domäne (TIR) für die Signaltransduktion aus.

Für die Ligation bilden die TLR Homo- und Heterodimere. Dabei interagieren die beiden TIR der TLR und binden wiederum an TIR zytosolischer Adapterproteine wie das primäre Antwortprotein der myeloiden Differenzierung (88) (*Myeloid Differentiation Primary Response Proteine 88*, MyD88)⁶⁷ und den TIR-Domänen-beinhaltenen Interferon- β -induzierenden Adapter (*TIR-Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon- β* , TRIF)⁶⁸. Dabei wird MyD88 von allen TLR außer TLR3 rekrutiert, welcher ausschließlich an TRIF bindet. TLR4 kann beide Adapterproteine binden. In Abhängigkeit vom Adapterprotein und dem Zelltyp werden verschiedene komplexe Signalkaskaden im Zytosol induziert. Gemeinsame Endpunkte sind die Aktivierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren Nukleärer-Faktor- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, NF- κ B) sowie Interferonregulierender-Faktor-3 und -7 (*interferon regulatory factor 3 and 7*, IRF-3 und IRF-7) vom Zytosol in den Zellkern. Die Aktivierung von NF- κ B führt zur Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6. Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 führt zur Produktion von Typ-I-Interferonen (s. Abbildung 1). Während die meisten Zellen Typ-I-Interferone produzieren können, wenn sie von Viren infiziert sind und diese durch zytosolische Rezeptoren erkannt werden, stammt der größte Anteil des messbaren Typ-I-Interferons aus pDC. In pDC führt die Ligation des jeweiligen Liganden an TLR7 und TLR9 zur Produktion großer Mengen IFN- α und zur Zellreifung.⁶⁹ Da diese Rezeptoren nicht im Zytosol, sondern in Endosomen lokalisiert sind, werden Viren durch pDC nicht erst erkannt, wenn die Zelle selbst infiziert ist, sondern bereits dann, wenn Viren von außerhalb der Zelle aufgenommen werden.⁷⁰

TLR sind damit an der ersten Abwehr von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem beteiligt, die innerhalb von Minuten erfolgen kann. Die Zytokin- und Interferonproduktion führt zu einer Entzündungsreaktion und im Verlauf gegebenenfalls zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Dieses reagiert mit einer Verzögerung von wenigen Tagen nach Eintritt des Pathogens in den Körper durch Ausbildung einer antigenspezifischen Immunität und eines immunologischen Gedächtnisses.

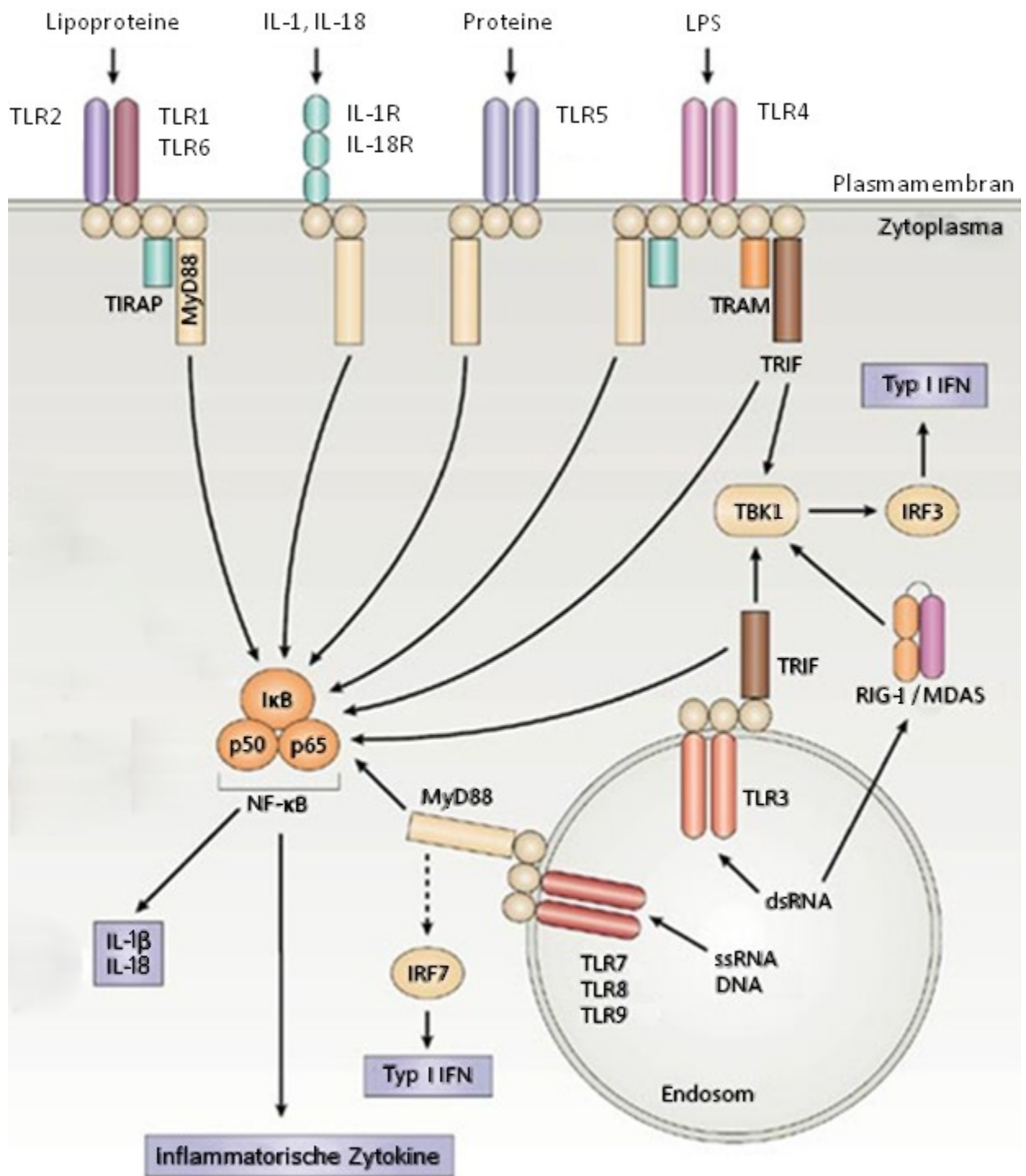


Abbildung 1

Lokalisation und Funktion von Toll-like Rezeptoren

Adaptiert und übersetzt mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd: (Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. NAT REV IMMUNOL 2007; 7: 179-190), copyright (2007).

Neben dieser wichtigen protektiven Rolle der TLR bei der Krankheitsabwehr wurde nachgewiesen, dass TLR auch wirtseigene, sogenannte endogene Liganden binden, die bei Gewebeschäden und Zelltod freigesetzt werden.⁷¹ Die intrazellulären TLR sind für endogene Liganden eigentlich unzugänglich. Im Rahmen einer Abwehrreaktion kann es aber unter anderem B-Zell-Rezeptor- und Fc-gamma-Rezeptor-vermittelt zur Internalisierung endogener Nukleinsäuren kommen.⁷² Diese Liganden werden als Gefahr-assoziierte molekulare Muster bezeichnet (DAMP, *danger associated molecular patterns*). Während die dadurch eingeleitete Entzündungsreaktion bei peripheren Verletzungen durchaus sinnvoll sein kann, führt sie im ZNS teilweise zu schweren Schäden⁷³. So zeigte unsere Arbeitsgruppe kürzlich, dass die im ZNS vorkommende und bei Zellschädigung freigesetzte MicroRNA let-7 ein Ligand für TLR7 in Neuronen darstellt und auf diesem Weg zu Neurodegeneration führt. Außerdem enthielten Liquores von Alzheimer Patienten mehr let-7 als Kontrollproben.⁷⁴ In einem Alzheimer-Modell wurde gezeigt, dass die Neurodegeneration TLR4-abhängig ist.⁷⁵ Auch bei mehreren Autoimmunerkrankungen bzw. deren Tiermodellen wurde eine Beteiligung von TLR beschrieben.^{72,76} So konnte für TLR4 und TLR9 eine regulatorische Funktion bei der EAE nachgewiesen werden und MyD88 ist notwendig für die Induktion von EAE in Mäusen.² Im Menschen wurde eine erhöhte Expression von TLR3 und TLR4 durch Mikroglia und Astrozyten in aktiven MS-Läsionen gefunden.⁷⁷

2 Zielsetzung

MS ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS und kann bereits im jungen Erwachsenenalter zu bleibender Behinderung führen. Als ursächlich muss ein multifaktorielles Geschehen angenommen werden. Bei bestehender genetischer Prädisposition können Umweltfaktoren wie Vitamin D-Mangel bei niedriger Sonnenexposition und bestimmte, vor allem virale Infektionen eine pathologische Autoimmunreaktion hervorrufen. Diese ist gegen Bestandteile der zentralnervösen Myelinscheiden und die sie produzierenden Oligodendrozyten gerichtet und führt zu multifokalen Demyelinisierungsherden. Außerdem wurde gezeigt, dass bei bestehender MS virale Infekte zeitlich mit MS-Schüben assoziiert sind.^{15,16}

Eine kausale Therapie, die zur Heilung führt, gibt es nicht. Das antivirale Zytokin IFN- β wurde 1993 unter der Annahme einer viralen Genese der MS als erstes MS-Basistherapeutikum zugelassen und ist bis heute das am häufigsten verordnete Medikament mit dieser Indikation. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht geklärt. Das Medikament wirkt wie die endogenen Typ I IFN über den IFNAR auf die Expression von über 1000 Genen.⁴⁴ Es sind zahlreiche Modulationen des Immunsystems als mögliche Wirkmechanismen bei MS beschrieben worden.

Ein großes Problem der IFN- β Therapie ist der hohe Anteil an Therapieversagern von bis zu 50 %.⁴⁸ Hinzu kommt, dass die Entscheidung hinsichtlich eines Therapieversagens nicht klar definiert ist und die anzuwendenden Kriterien umstritten sind. Trotz intensiver Forschungsbemühen ist es in den letzten 20 Jahren nicht gelungen, einen prädiktiven Biomarker zu etablieren, der das Ansprechen auf die Therapie vorhersehbar machen würde.^{59,60}

TLR sind als Bestandteil des angeborenen Immunsystems an der Erkennung und Abwehr von pathogenen Bakterien und Viren beteiligt. Neben Pathogen-assoziierten Liganden werden jedoch auch endogene Liganden von TLR erkannt. Die jeweilige Interaktion kann einerseits zur Entzündung bei Gewebeschäden führen und damit die Organisation und schließlich Restitution einleiten.⁷⁸ Andererseits kann es im ZNS zu schweren Schäden kommen.^{73,74} Vereinzelt endogenen Liganden wurde eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen zugesprochen.⁶⁴ Unter anderem auch bei EAE, einem Mausmodell der MS.⁷⁹

Es wurde hier die Hypothese aufgestellt, dass IFN- β das angeborene Immunsystem moduliert und hierüber gegebenenfalls seine antivirale Wirkung und seine Wirkung bei MS entfaltet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte experimentell untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß rekombinantes IFN- β -1b (Betaferon[®]) die Expression von TLR und ihrem Adaptermolekül MyD88 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) beeinflusst.

Dies erfolgte zunächst auf mRNA-Ebene in einem Screeningansatz für alle bekannten humanen TLR1-10 und MyD88 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) nach Stimulation von PBMC gesunder Spender mit IFN- β *in vitro*.

Änderungen der Expression auf mRNA-Ebene wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie auf der Proteinebene nachvollzogen und den jeweiligen PBMC-Subpopulationen zugeordnet.

Schließlich sollte geprüft werden, ob die Regulation von TLR und MyD88 durch IFN- β *in vitro* auch in IFN- β -behandelten MS-/KIS-Patienten *in vivo* nachvollzogen werden kann. Hierzu wurden PBMC verschieden therapierter MS-/KIS-Patienten isoliert und durchflusszytometrisch die TLR- bzw. MyD88-Proteinexpression gemessen.

Mögliche funktionelle Konsequenzen der jeweiligen Regulation wurden durch Quantifizierung von Zytokinen mit Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) oder Flowcytomix-Multiplexing in Überständen mit IFN- β und TLR-Liganden stimulierter PBMC ermittelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zytokinproduktion PBMC-Subpopulationen zugeordnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum besseren Verständnis der Wirkung von IFN- β bei MS bei. Weiterhin liefern sie Hinweise zur Rolle des angeborenen Immunsystems bei dieser Krankheit. Nicht zuletzt sind durch ein Medikament spezifisch regulierte Gene und Proteine potenzielle Kandidaten für prädiktive Biomarker, z.B. für das Therapieansprechen.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine experimentelle Studie unter Verwendung humaner Blutzellen. Die Blutspende erfolgte freiwillig. Einschlusskriterium für die gesunden Kontrollen war ein Alter zwischen 18 und 55 Jahren; Ausschlusskriterien waren bestehende Infekte und Einnahme immunmodulatorischer Medikamente.

Außerdem wurden Blutzellen von Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (KIS) bzw. MS untersucht, die in die Studie „Klinisch isoliertes Syndrom und neu diagnostizierte Multiple Sklerose: Diagnostische, prognostische und Therapie-Response Marker“ des NeuroCure Clinical Research Centers eingeschlossen worden waren. Einschlusskriterien waren ein Alter von mindestens 18 Jahren, Diagnose eines KIS innerhalb der letzten 6 Monate (entsprechend der McDonald-Kriterien 2005⁸⁰), radiologisch isoliertes Syndrom, frühe schubförmige MS (Erstsymptome und Diagnosestellung innerhalb der letzten zwei Jahre bzw. bei verzögerter Diagnosestellung Erstsymptome maximal innerhalb der letzten drei Jahre) und Verdacht bzw. Diagnose einer primär chronisch progredienten MS (innerhalb der letzten 6 Monate). Ausschlusskriterien waren Augenerkrankungen, z.B. Glaukom, fortgeschrittener Diabetes mellitus, sekundär chronisch progrediente MS, Schwangerschaft, Bettlägerigkeit, fehlende Kommunikationsfähigkeit, Alkohol- oder Drogenabusus.

Alle Versuche mit Patientenmaterial wurden verblindet durchgeführt und ausgewertet. Ein Votum der Ethikkommission liegt vor. Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden eingehalten.

Alle Versuche wurden in Laborräumen der Sicherheitsstufe 1 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie durchgeführt.

3.2 Untersuchungsmaterial und Spender

Von achtundzwanzig freiwilligen gesunden Spendern (*healthy donors*, HD) im Alter zwischen 18 und 55 Jahren wurden jeweils 30 ml peripheres venöses Blut abgenommen und hieraus PBMC isoliert. Die verwendeten Zellen von HD1 wurden aus einem Blutfilter isoliert, der von der Blutbank/Blutspende der Charité erhalten wurde.

Die Blutentnahmen bei MS- bzw. KIS-Patienten und die folgende PBMC-Isolation wurden durch Ärzte und Mitarbeiter der Klinik für Neurologie der Charité Berlin durchgeführt. Für die

vorliegende Arbeit wurden 5×10^6 gefrorene PBMC pro Patient und Versuch verwendet.

Tabelle 1

Demographische Details der gesunden Blutspender

Anzahl Spender	Methode	Alter in Jahren, Median (Bereich)	weiblich/männlich
6 gesunde Spender	qPCR	25 (22-28)	3/2
15 gesunde Spender	Durchflusszytometrie	22 (20-51)	12/3
3 gesunde Spender	Flowcytomix-Assay	28 (22-53)	1/2
8 gesunde Spender	ELISA	26,5 (23-51)	5/3

Zur Zuordnung der Spender zu den einzelnen Versuchen siehe Tabellen 5-7 im Supplement.

Tabelle 2

Demographische und klinische Details der KIS-/MS-Patienten

Therapie	KIS/MS	weibl./männl.	Alter in Jahren Median (Bereich)	EDSS Median (Bereich)	Interferon- β Präparat
unbehandelt (9)	8/1	6/3	34 (26-55)	1 (0-2.5)	–
Glatirameracetat (7)	3/4	4/3	48 (30-56)	2 (1-4)	–
Interferon- β (7)	5/2	5/2	32 (21-35)	1.5 (0-3)	Interferon- β - 1a i.m. (2) 1a s.k. (3) 1b s.k. (2)

Zahlen sind Anzahl der Patienten, wenn nicht anders angegeben; KIS, klinisch isoliertes Syndrom; MS, neu diagnostizierte Multiple Sklerose; EDSS, Expanded Disability Status Scale; i.m., intramuskulär; s.k., subkutan

3.3 Materialien

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Chemikalien mit analytischem Reinheitsgrad verwendet. Alle Arbeitsschritte mit lebenden Zellen wurden an einer Sterilbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien durchgeführt. Alle verwendeten Materialien werden im Folgenden aufgelistet, wobei, wenn nicht anders angezeigt, die Bezeichnung links steht und in der rechten Spalte der jeweilige Hersteller angegeben wird.

3.3.1 Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System	AB Applied Biosystems, life technologies, Carlsbad, USA
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer BD FACSCanto II	BD, Heidelberg
Heizblock PHMT	Grant-bio, Cambridgeshire, England
Kryo 1°C Einfrier Container	Thermo Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop IX70	Olympus, Hamburg
Opsys MW Mikrotiterplatten-Wäscher	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Photometer BioMate 3	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Research pro Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank ANTARES 48	STERIL S.P.A., Surbo, Italien
Synergy HT Mikrotiterplatten-Leser	Bio-Tek, Vermont, USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

3.3.2 Sonstige Materialien und Verbrauchsmaterialien

BD Vacutainer, LH 170 I.U., REF367526	BD, Heidelberg
BD Vacutainer, Safety Lok Blood Collection Set	BD, Heidelberg
Einmalpipetten (5, 10, 25 ml)	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (96 well)	MicroAmp, AB, life technologies, Carlsbad, USA
Nalgene Kryo-Röhrchen	Nalge Company, Rochester, USA
Nunc MaxiSorp ELISA Platten (96 well)	eBioscience, San Diego, USA
Pipettenspitzen gestopft, RNase/DNase frei, (1, 100, 1000 µl)	Biosphere, Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, nicht gestopft	Sarstedt, Nümbrech
Plate Sealer	MicroAmp, AB, life technologies, Carlsbad, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 und 50 ml	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturplatten (12 well)	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturplatten (96 well)	Falcon/BD, Heidelberg
Zellsiebe (70 µm)	BD Bioscience, Heidelberg

3.3.3 Chemikalien/Reagenzien

AB dNTP Mix, 2,5 mM	AB, life technologies, Carlsbad, USA
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Calciumchlorid-dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroquin-diphosphat	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
DTT, 100 mM	Promega, Madison, USA
Dulbecco's PBS (1 fach, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PAA Laboratories, Pärching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen, life technologies, Carlsbad, USA
Ficoll-Paque PLUS ($\rho = 1,077$ g/ml, endotoxin tested)	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES Natriumsalz	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
M-MLV RT 5x Puffer	Promega, Madison, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 U bzw. 10 mg/ml)	Invitrogen, life technologies, Carlsbad, USA
Peptone aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Random Primers (Hexamers, 100 μ M)	Promega, Madison, USA
Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) mit L-Glutamin	GIBCO, Invitrogen, life technologies, Carlsbad, USA
Trypan-Blau Lösung 0,5 % (w/v)	Biochrom AG, Berlin

3.3.4 Enzyme, rekombinante Proteine, TLR-Liganden

Betaferon® (250 μ g/ml, 8×10^6 IE/ml)	Bayer Schering Pharma AG, Berlin
CpG 2216 Oligodeoxynukleotide (5' - gsgsgggACgATCgTCgsgsgsgsgsg)	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin
Loxoribine 100 mM	InvivoGen, San Diego, USA
LPS	Enzo life sciences, Farmingdale, USA
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Promega, Madison, USA
Poly(I:C)	InvivoGen, San Diego, USA
RNasin RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	Promega, Madison, USA

3.3.5 Plasmide

GFP-Kontrollplasmid peGFP-c1	Clontech, Mountain View, USA
pUNO3-hTLR3	Invivogen, San Diego, USA
pUNO3-hTLR9a	Invivogen, San Diego, USA
pUNO3-mcs	Invivogen, San Diego, USA

3.3.6 Antikörper

Tabelle 3

Antikörper für Durchflusszytometrie

Humanes Antigen/ Name	Fluorochrom	Isotyp	Klon	Firma	Menge/Test
Fcγ Block	purified			Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	10 μ l/(10 ⁷ Zellen)
CD1c	PE	Maus IgG1,k	L161	BioLegend, San Diego, USA	0,25 μ g
CD4	PerCP Cy5.5	Maus IgG1,k	RPA-T4	BD Bioscience, San Jose, USA	2,5 μ l
CD8	Pacific Blue	Maus IgG1,k	RPA-T8	BD	0,05 μ g
CD11c	APC	Maus IgG1,k	3.9	BioLegend	2 μ g
CD14	Pacific Blue	Maus IgG2a,k	M5E5	BD	0,1 μ g
CD19	APC	Maus IgG1,k	H1B19	eBioscience, San Diego, USA	0,0625 μ g
CD123	PerCP Cy5.5	Maus IgG1,k	6H6	eBioscience	0,25 μ g
CD303	APC	Maus IgG1	AC144	Miltenyi	4,5 μ l
HLA-DR	PE	Maus IgG2a,k	G46-6	BD	10 μ l
HLA-DR	FITC	Maus IgG2a,k	G46-6	BD	10 μ l
MyD88	Alexa488	Maus IgG1	4d6	Imgenex, San Diego, USA	0,5 μ g
TLR3	Alexa488	Maus IgG1,k	40C1285.6	Imgenex	0,5 μ g
TLR3	PE	Maus IgG1,k	TLR3.7	eBioscience	0,5 μ g
TLR7	Alexa488	Maus IgG1	66H3	Dendritics, Lyon, France	0,5 μ g

TLR9	Alexa488	Maus IgG1,k	26C593.2	Imgenex	0,5 µg
TLR9	PE	Ratte IgG2a, k	eB72-1665	eBioscience	0,5 µg

Tabelle 4

Isotyp-Antikörper für Durchflusszytometrie

Isotypkontrolle für	Fluorochrom	Isotyp	Firma	Menge/Test
Isotyp CD11c	APC	Maus IgG1	eBioscience	1 µg
Isotyp CD14	Pacific Blue	Maus IgG2a,k	BD	0,1 µg
Isotyp CD123	PerCP Cy5.5	Maus IgG1,k	eBioscience	0,25 µg
Isotyp CD303	APC	Maus IgG1	Miltenyi	4,5 µl
Isotyp HLA-DR	PE	Maus IgG2a,k	BD	20 µl
Isotyp HLA-DR	FITC	Maus IgG2a,k	BD	20 µl
Isotyp TLR 3	PE	Maus IgG1,k	eBioscience	0,5 µg
Isotyp TLR3	Alexa488	Maus IgG1, k	eBioscience	0,5 µg
Isotyp TLR 7				
Isotyp MyD88				
Isotyp TLR3				
Isotyp MyD88	Alexa 488	Maus IgG1, k	Imgenex	0,5 µg
Isotyp TLR9				
Isotyp TLR 9				
Isotyp TLR 9	PE	Ratte IgG2a, k	eBioscience	0,5 µg

3.3.7 Kommerzielle Kits

Basic Kit Human FlowCytomix	eBioscience, San Diego, USA
BD Cytofix/Cytoperm Permeabilisations und Fixationslösung	BD Bioscience, San Jose, USA
ELISA 1x TMB Substratlösung	eBioscience, San Diego, USA
ELISA Human IFN- α Antikörper-Paar	eBioscience, San Diego, USA
ELISA Verdünnungslösung	eBioscience, San Diego, USA
Human IL-23, IL-17A/F, IL-27, IL-1, MIP-1 α , IL-8, IL-6, IFN- α , IP-10, IL-4, IL-1b und TNF- α FlowCytomix sets	eBioscience, San Diego, USA
Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy mini kit	Qiagen, Hilden
RT2 qPCR Primer Assay- SYBR® Human TLR1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/ MyD88/ HPRT1	SABiosciences, Qiagen, Hilden
RT2 SYBR® Green/ Rox™ qPCR Master Mix	SABiosciences, Qiagen, Hilden

3.3.8 Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x PBS, pH 7,4:	2g KCl, 2g KH ₂ PO ₄ , 80g NaCl, 14,4g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, ad 1l H ₂ O
ELISA Stopplösung	1 M Orthophosphorsäure (Carl Roth, Karlsruhe)
ELISA Waschpuffer	PBS mit 0,05% Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe)
HBS 2x	50 mM HEPES Natriumsalz, 280 mM Natriumchlorid, 1,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat
Komplett-RPMI	RPMI 1640, 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
LB-Medium	10 g/l Peptone aus Casein, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid

3.3.9 Software

Die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte computergesteuert mit dem Programm VISIONlite (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Auch die qPCR lief computergesteuert mit der 7500 Fast System Software (AB Applied Biosystems, life technologies, Carlsbad, USA). Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit der BD FACSDiva Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) durchgeführt und in FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) ausgewertet. Die Absorptionsmessungen der ELISA erfolgte computergesteuert mit dem Programm KC4 (Bio-Tek, Winooski, USA). Die Auswertung des Flowcytomix-Assays (ebioscience, San Diego, USA) erfolgte mit der Software FlowCytomix Pro 3.0 des gleichen Herstellers. Die rechnerische, statistische und graphische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism5 (GraphPad Software, San Diego, USA) und Excel (Microsoft, Redmond, USA).

3.4 Methoden

3.4.1 Zellbiologische Methoden

3.4.1.1 Blutabnahme und Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Bei freiwilligen gesunden Spendern wurden jeweils ca. 30 ml peripheres venöses Blut in mit Lithiumheparin beschichteten Röhrchen entnommen und innerhalb von maximal 60 Minuten (min) weiterverarbeitet.

Je 20 ml des zuvor 1:1 mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS)

verdünnten Blutes wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) für 20 min, ohne Bremse, bei Raumtemperatur (RT) mit 10 ml Ficoll-Paque in mehrere Phasen geteilt: Es entstand eine helle, PBMC-reiche Interphase, die durch Ficoll von den schneller wandernden Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen am Boden getrennt war. Über der Interphase verblieb das Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch. Die Zellschicht in der Interphase konnte nun vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und so von den übrigen Blutbestandteilen isoliert werden.

Die so gewonnenen PBMC wurden in 45 ml Komplett-RPMI Medium (RPMI; 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in zwei Zentrifugationsschritten gewaschen, um Ficoll zu entfernen. Der erste Schritt erfolgte bei 1600 rpm und RT für 12 min, der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen in 25 ml Medium resuspendiert und mit einem 70 µm Zellsieb gefiltert, um aggregierte Zellen zu entfernen. Die zweite Zentrifugation erfolgte bei 1200 rpm und RT für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml Medium resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellzahl mit Zählkammer ermittelt und die Zellen in Kultur genommen.

3.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

10 µl der 20 ml Zellsuspension wurden mit 90 µl 0,5%iger Trypanblaulösung (w/v in PBS) verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zahl der lebenden (ungefärbten) Zellen in den 4 großen Außenquadraten ermittelt. Die Zellzahl berechnet sich folgendermaßen: $\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Zellen} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} (10) \times 10^4$. Nach der Ermittlung der Zellzahl wurde die Zellkonzentration auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.4.1.3 Einfrieren von Zellen

Das Einfriergerät „Mr. Frosty“, die Kryoröhrchen und das aus FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) frisch angesetzte Einfriermedium wurden bei 4 °C vorgekühlt. Anschließend wurde auf Eis gearbeitet. Die einzufrierenden PBMC wurden 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend in 10×10^6 Zellen/1 ml Einfriermedium resuspendiert. Dabei wurde das Einfriermedium tropfenweise zu den Zellen gegeben und das Röhrchen kontinuierlich geschwenkt. Anschließend wurde je 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben und dieses in das Einfriergerät einsortiert, das über Nacht in einen -80 °C Gefrierschrank gestellt wurde. Die gefrorenen Zellen wurden danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.4.1.4 Auftauen von Zellen

In Kryoröhrchen und in Flüssigstickstoff gefroren aufbewahrte PBMC wurden so schnell wie möglich im 37 °C warmen Wasserbad kontinuierlich schwenkend aufgetaut. Sobald die Zellsuspension fast vollständig flüssig war, wurde tropfenweise 1 ml bei 37 °C vorgewärmtes Auftaumedium (RPMI mit 10 % FCS) hinzugegeben. Anschließend wurde das gesamte Volumen tropfenweise in 1 ml warmem Auftaumedium in einem 15-ml-Röhrchen resuspendiert. Das Kryoröhrchen wurde gespült und die Zellsuspension auf 10 ml mit warmem Medium aufgefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Durchflusszytometrie-Puffer resuspendiert. Es wurde mit der Bestimmung der Zellzahl und Durchflusszytometrie fortgefahren.

3.4.1.5 Stimulation der PBMC

Für die TLR-Expressionsbestimmung wurden je 2×10^6 PBMC/1 ml Komplet-RPMI Medium pro Well in 12-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden entweder mit 10, 100, 1000 U/ml IFN- β stimuliert oder nicht weiter behandelt (unstimuliert) und im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 6, 24 oder 48 h inkubiert.

Für die Zytokinmessungen mittels Flowcytomix-Assay (eBioscience) wurden je 200 μ l ($0,4 \times 10^6$ Zellen) pro Well in 96-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden entweder mit oder ohne 1000 U/ml IFN- β für 12 h im Inkubator vorstimuliert. Nach Zugabe von 0,1 mM Loxoribine (TLR7-spezifischer Ligand), 1 μ M CPG2216 (Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligonukleotide, TLR9-spezifischer Ligand), 25 μ g/ml Poly(I:C) (Polyinosin-Polycytidil-Säure, TLR3-spezifischer Ligand) oder 100 ng/ml LPS (Lipopolysacharide, TLR4-spezifischer Ligand) wurden die Zellen weitere 6 h inkubiert. Für die intrazelluläre Zytokinmessung mittels Durchflusszytometrie erfolgten die letzten 3 h Stimulation unter Anwesenheit von 5 μ g/ml Brefeldin A.

Für die Zytokinmessungen mittels ELISA wurden die PBMC zusätzlich mit 10, 100 und 10000 U/ml IFN- β vorstimuliert und die Inkubationszeit mit den TLR-Liganden über 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h variiert. Außerdem wurde die Loxoribinedosis über 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM und 1,0 mM sowie die CpG-Dosis über 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1,0 μ M und 10 μ M variiert.

Für die Zytokinmessung mit Zellen von MS-/KIS-Patienten entfiel die Vorstimulation mit IFN- β . Die Zellen wurden nicht eingefroren und wie oben beschrieben 10 h mit 0,1 mM bzw. 1,0 mM Loxoribine bzw. 1 μ M CpG stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und für die spätere Zytokinmessung bei -80 °C eingefroren.

3.4.1.6 Zellernte

Nach der jeweiligen Stimulationszeit wurde die Zellsuspension aus den Wells in 15-ml-Röhrchen überführt, wobei für qPCR-Versuche jeweils 3 Wells (6×10^6 Zellen) und für Durchflusszytometrie-Versuche sämtliche Wells, entsprechend der benötigten Zellzahl, eines Stimulationsansatzes vereint wurden.

Nach Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min wurden 900 µl der Überstände für Zytokinmessungen abgenommen und bei -80 °C aufbewahrt; der Rest wurde verworfen. Anschließend wurden die Wells mit 1 ml PBS bzw. Durchflusszytometrie-Puffer gespült und die Zellen in zwei Zentrifugationsschritten gewaschen. Zunächst wurde mit 1200 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml PBS bzw. Durchflusszytometrie-Puffer resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und der Überstand wiederum verworfen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation oder die durchflusszytometrische Analyse.

3.4.1.7 Transfektion von HEK293-Zellen mit TLR-Plasmiden

Zur Validierung der TLR3- und TLR9-Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden HEK293-Zellen mit TLR3-, TLR9-, einem Leer- und einem GFP-Kontrollvektor transfiziert, mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometer gemessen. HEK293 ist eine Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die mit Genomanteilen des humanen Adenovirus 5 transformiert wurden. Zur Plasmidisolierung aus Bakterien siehe Abschnitt 3.4.2.2, Aufbereitung von Plasmiden.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Calcium-Phosphat vermittelte Transfektion⁸¹ in HEK293-Zellen eingebracht. Hierzu wurden am Vortag je $0,5 \times 10^6$ HEK293-Zellen in Zellkulturplatten mit sechs 35 mm Vertiefungen gegeben, so dass sie am Tag der Transfektion am Boden adhärent und zu 70-80 % konfluent waren. Drei Stunden vor Transfektion wurde das Medium (DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin-Streptomycin + L-Glutamin) gewechselt. Je 5 µg Plasmid-DNA und 12,3 µl 2-M-CaCl₂-Lösung wurden mit sterilem doppelt destilliertem Wasser auf 100 µl Lösung ergänzt und tropfenweise zu 100 µl 2x HEPES gepufferter Salzlösung gegeben, während diese mittels Vortexmischer geschüttelt wurde. Die Lösung wurde für 20-40 min bei RT inkubiert.

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden je 2 µl Chloroquine⁸² zu den HEK293-Zellen gegeben. Die DNA/HBS/CaCl₂ Lösung wurde erneut gemischt und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nachdem die Zellkulturen durch Schwenken der Kulturplatte gemischt waren, wurden sie 24 h im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

48 h nach Transfektion wurden die transfizierten HEK293-Zellen geerntet, für die durchflusszytometrische Messung auf die jeweiligen 5-ml-Rundbodenröhrchen verteilt und in einem Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm, 4 °C für 5 min mit Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Fixierung und Permeabilisierung, der Fcγ-Rezeptorblock, die intrazelluläre Färbung mit TLR3- bzw. TLR9- Antikörper sowie den jeweiligen Isotypen und die Messung wie unter 3.4.3.1 beschrieben durchgeführt.

3.4.2 Molekularbiologische Methoden

3.4.2.1 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

3.4.2.1.1 RNA-Isolation

Nach Abnahme der aufzubewahrenden Überstände (s. 3.4.1.6) wurde die verbliebene Zellsuspension frisch isolierter HD PBMC kurz herunterzentrifugiert und der restliche Überstand sorgfältig mit einer Pipette abgenommen. Das Zellpellet wurde vollständig resuspendiert. Die Isolation von RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers mit folgenden Modifikationen. Die Zellen wurden nach der Zellyse mit Hilfe von „QIAshredder“-Säulen des gleichen Herstellers homogenisiert und genomische DNA durch einen DNase-Verdau auf der Säule eliminiert (27,27 Kunitz Units DNase-I pro Säule, RNase-Free DNase Set, Qiagen). Die Elution erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser. Die so gewonnene RNA wurde entweder direkt weiter verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Durch die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Spektrophotometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm wurde sowohl die RNA-Konzentration als auch deren Reinheit bestimmt. Je 1 µl der RNA-Proben wurde verwendet, um fotometrisch die Absorption durch RNA bei 260 nm und durch Proteine bei 280 nm zu bestimmen. Bildet man den Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} , sollte dieser für eine reine RNA-Präparation bei dem Wert 2,0 liegen. Mit dem Programm VISIONlite wurden die Messwerte registriert und die RNA-Konzentration auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet.

3.4.2.1.3 cDNA-Synthese

Um eine konstante Ausgangsmenge RNA in der cDNA-Synthese (*complementary DNA*, komplementäre DNA) sicherzustellen, wurden für jeden Ansatz 1 µg der aus den Zellen

isolierten RNA verwendet und auf 15 µl mit RNase-freiem Wasser ergänzt oder in einer Vakuumentrifuge eingedampft. Die folgenden Konzentrationsangaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl pro Ansatz in der PCR.

Nach Zugabe von je 1,5 µl Random-Hexamer-Oligonukleotiden (6 µM) wurden die Ansätze für 5 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 8,5 µl eines zuvor hergestellten Mastermixes mit folgenden Bestandteilen gegeben:

- 5 µl 5x MMLV-Puffer,
- 1,5 µl dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate; 2,5 mM),
- 0,5 µl DTT (Dithiothreitol; 0,1 M),
- 0,5 µl RNasin (RNase Inhibitor; 20 U),
- 1 µl reverse Transkriptase des murinen Moloney-Leukämie-Virus (M-MLV RT) (200 U).

Während 60 minütiger Inkubation im Heizblock bei 37 °C erfolgte die cDNA-Synthese durch die M-MLV RT.

Als Kontrolle wurde in je einem Transkriptionsansatz die reverse Transkriptase durch RNase-freies Wasser ersetzt (-RT). Da in dieser Probe keine Transkription von RNA in cDNA stattfindet, ist eine Amplifikation in der nachfolgenden PCR ein Maß für die Verunreinigung der RNA-Proben mit genomischer DNA. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.2.1.4 qPCR

Die quantitative Real Time PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, aber erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäuren. Zu diesem Zweck wird im PCR-Ansatz das Fluorochrom SYBR-Green verwendet, das mit DNA interkaliert und dessen dabei ansteigende Fluoreszenz als Maß für die amplifizierte DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus gemessen wird. Diese fortlaufende Fluoreszenzmessung erlaubt die Bestimmung des PCR-Zyklus, ab welchem die Amplifikation bi-exponentiell erfolgt. Dieser Schwellenwert (*threshold cycle*, C_t) ist von der Ausgangsmenge an cDNA des Ziel-Gens abhängig und erlaubt einen Vergleich der Expression verschiedener Gene oder eine Aussage darüber, ob verschiedene Behandlungen einen Einfluß auf die Expression eines Genes haben. So ermöglicht der Vergleich von C_t -Werten der Zielgene mit jenem des Referenzgens, das unter den experimentellen Bedingungen nicht reguliert wird, eine relative Quantifizierung. In mehreren Vorversuchen wurden die Referenzgene β -Actin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1 (HPRT) auf eine etwaige Expressionsänderung unter den experimentellen Bedingungen (Stimulation mit IFN- β) untersucht. Auf Grundlage der

Ergebnisse der qPCR wurde HPRT als Referenzgen für die folgenden Versuche eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Für die qPCR wurde das computergesteuerte 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) verwendet, das mit 96-Well-Platten arbeitet, und die zugehörige Software. Jeder PCR-Ansatz wurde als Doppelbestimmung durchgeführt und der C_t -Wert in der Auswertung gemittelt.

Zuerst wurde je 1 μ l der cDNA-Probe bzw. 1 μ l H₂O für die Leerkontrolle (*no template control*, NTC) in ein Well gegeben. Anschließend wurden je 24 μ l des zuvor pipettierten Mastermixes hinzugegeben, der folgende Komponenten enthielt:

- 12,5 μ l 2x RT² qPCR SYBR Green Mastermix
- 10,5 μ l ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser)
- 1 μ l Primer

Anschließend wurde die Platte mit einem Plate-Sealer versiegelt und kurz abzentrifugiert.

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
2. Denaturierung	95 °C	15 sek
3. Elongation	60 °C	1 min
4. Zyklen (2. bis 4.)	40x	
5. Dissoziation	95 °C	15 sek
	60 °C	1 min
	95 °C	15 sek

3.4.2.1.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der 7500 Fast System Software. Durch Kontrolle der Dissoziationskurven wurde sichergestellt, dass nur die für die Primer spezifischen DNA-Abschnitte amplifiziert wurden. Dies zeigte sich in nur einem Maximum bei einer bestimmten Temperatur, die durch die Länge des Genprodukts und dessen Basenzusammensetzung bestimmt ist.

Der Zyklus, ab welchem die Amplifikation exponentiell erfolgte, wurde durch die Software bestimmt („autoanalyze“) und als C_t -Wert für jeden Ansatz ausgegeben. Die C_t -Werte wurden anschließend in Excel exportiert, der Mittelwert der Duplikate berechnet und die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode angewandt. Duplikate, deren C_t -Werte um 1 oder mehr abwichen, wurden aus der Wertung genommen.

Bei der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wird zunächst der ΔC_t -Wert gebildet, indem vom C_t -Wert des Zielgens

(*Gene of interest*, GOI) der Ct-Wert des Referenzgenz (*house keeping gene*, HKG) abgezogen wird. Dies geschieht sowohl für die Kontrollansätze (unstimuliert) als auch für die mit IFN- β stimulierten Ansätze.

$$\Delta C_{t(\text{Kontrolle})} = C_{t(\text{GOI unstimuliert})} - C_{t(\text{HKG unstimuliert})}$$

$$\Delta C_{t(\text{experimental})} = C_{t(\text{GOI stimuliert})} - C_{t(\text{HKG stimuliert})}$$

Anschließend wird der ΔC_t -Wert der unstimulierten Kontrolle jeweils von den ΔC_t -Werten der experimentellen Ansätze subtrahiert. Das Ergebnis ist jeweils der $\Delta\Delta C_t$ -Wert:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{experimental})} - \Delta C_{t(\text{Kontrolle})}$$

Weil die Amplifikation zum Zeitpunkt des C_t bi-exponentiell erfolgt, entspricht $2^{-\Delta\Delta C_t}$ der n-fachen Expression des Zielgens unter den experimentellen Bedingungen gegenüber den Kontrollbedingungen. So lässt sich auswerten, wie sich die Expression der Zielgene TLR1-10, MyD88 und Mx1 nach den jeweiligen Stimulationen mit IFN- β geändert hat.

Die graphische Darstellung der relativen Expressionsänderungen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte) erfolgte mit der Software GraphPad Prism5.

3.4.2.1.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Programm GraphPad Prism5. Statistische Signifikanz wurde ab p -Werten $< 0,05$ angenommen.

Unterschiede der TLR-mRNA-Expression zwischen unstimulierten und 6 h mit 1000 U IFN- β stimulierten PBMC wurden mittels gepaarten t -Tests auf Signifikanz hin getestet.

Mittels Varianzanalyse „One Way ANOVA“ wurde untersucht, ob es signifikante Unterschiede in der Expression der Zielgene ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte) zwischen den Gruppen „unstimuliert“, „10 U IFN- β “, „100 U IFN- β “ und „1000 U IFN- β “ jeweils nach gleicher Stimulationszeit bzw. zwischen den Gruppen „6 h“, „24 h“ und „48 h“ bei jeweils gleicher IFN- β -Dosis gibt. Mit dem Tukey-Kramer Post-Test wurde anschließend festgestellt, zwischen welchen Gruppenpaaren die signifikanten Unterschiede bestanden und welches Signifikanzniveau diese erreichten.

3.4.2.2 Aufbereitung von Plasmiden

Der Leervektor pUNO-mcs und die Vektoren pUNO3-hTLR3 und pUNO3-hTLR9a wurden in lyophilisierten transformierten GT116 Escherichia coli Bakterien von der Firma InvivoGen bezogen. Das Anwachsen von Einzelkulturen und die Selektion erfolgten nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Fast-Media®.

Das peGFP-c1 Kontrollplasmid zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde von Clontech bezogen. Für die Flüssigkulturen wurde LB-Medium verwendet. Im Übrigen wurde wie mit den

anderen Plasmiden verfahren.

Das Ansetzen der Vorkulturen und der Übernachtskulturen sowie die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgten mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 30 µl sterilem Wasser während 20 bis 30 min bei 50 °C im 3D-Schüttler gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.3 Immunologische Methoden

3.4.3.1 Durchflusszytometrie

3.4.3.1.1 Färbung der PBMC

Die nach Inkubation geernteten bzw. aufgetauten PBMC wurden mit 10 ml Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen, wie oben beschrieben gezählt, bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Fcγ-Rezeptoren blockiert, indem die Zellen bei 4 °C für 10 min mit 10 µl Fcγ-Rezeptorblock-Reagenz und 90 µl Durchflusszytometrie-Puffer pro 10×10^6 Zellen inkubiert wurden. Das Blockieren ist notwendig, um unspezifisches Binden der konstanten Domänen der Färbeantikörper durch die Fcγ-Rezeptoren zu verhindern. Die auf 10^6 Zellen/ml verdünnten Zellen wurden für die verschiedenen Färbungen und die entsprechenden 5 ml Rundbodenröhrchen aufgeteilt: je 1 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen für Zellfärbungen und 0,5 bis $0,75 \times 10^6$ Zellen für die Einzelfärbungen, für welche stimulierte und unstimulierte Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt verwendet wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min wurde der Überstand verworfen, die Öffnung der Rundbodenröhrchen auf Zellstoff trocken getupft und das Zellpellet durch Schütteln im Vortexmischer resuspendiert. Alle weiteren Zentrifugationen erfolgten ebenso. Es folgte die Oberflächenfärbung der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern (s. Tabelle 3, S. 25) zur Differenzierung der PBMC-Subpopulationen in einem Färbevolumen von je 50 µl während 20 min bei 4 °C, ein anschließender Waschschrift mit je 1 ml Durchflusszytometrie-Puffer und ein Zentrifugationsschritt. Dann wurden die Zellen mit je 200 µl BD Cytotfix/Cytoperm während 20 min bei 4 °C permeabilisiert und fixiert und anschließend zweimal mit je 1 ml BD Perm/Wash gewaschen und zentrifugiert. Nach einem intrazellulären Fcγ-Rezeptorblock mit 1 µl Reagenz pro Zellfärbung bzw. 0,5 µl pro Einzelfärbung während 10 min Inkubation bei 4 °C erfolgte die intrazelluläre Färbung mit den entsprechenden Antikörpern (s. Tabelle 3, S. 25) zur Expressionsmessung der TLR, von MyD88 bzw. zur

Messung der intrazellulären Zytokine Interferon-alpha (IFN- α) und IL-27 in einem Färbevolumen von je 50 μ l während 20 min bei 4 °C. Die Zellen wurden erneut mit je 1 ml Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 200 μ l Durchflusszytometrie-Puffer resuspendiert. Es wurde mit der durchflusszytometrischen Messung mit einem BD FACSCanto II und BD FACSDiva Software fortgefahren. Dabei wurden pro Zellfärbung 5×10^5 lebende Zellen (von gesunden Spendern) und 3 bis 5×10^5 (von Patienten) gesammelt.

3.4.3.1.2 Zellphänotypisierung

Zellpopulationen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmoleküle (*cluster of differentiation*, CD) differenzieren. Um plasmazytoide dendritische Zellen (pDC; CD14⁻ CD123⁺ CD303⁺) und Monozyten (CD14⁺) zu differenzieren, wurden PBMC mit Antikörpern gegen diese CD gefärbt (s. Tabelle 3, S. 25). Entsprechend wurde zur Messung von CD4-T-Zellen (CD19⁻ CD4⁺), CD-8-T-Zellen (CD19⁻ CD8⁺) und B-Zellen (CD19⁺) vorgegangen. Eine dritte Färbung wurde für die myeloiden dendritischen Zellen (mDC; CD14⁻ CD1c⁺ CD11c^{high} CD123^{low}) verwendet.

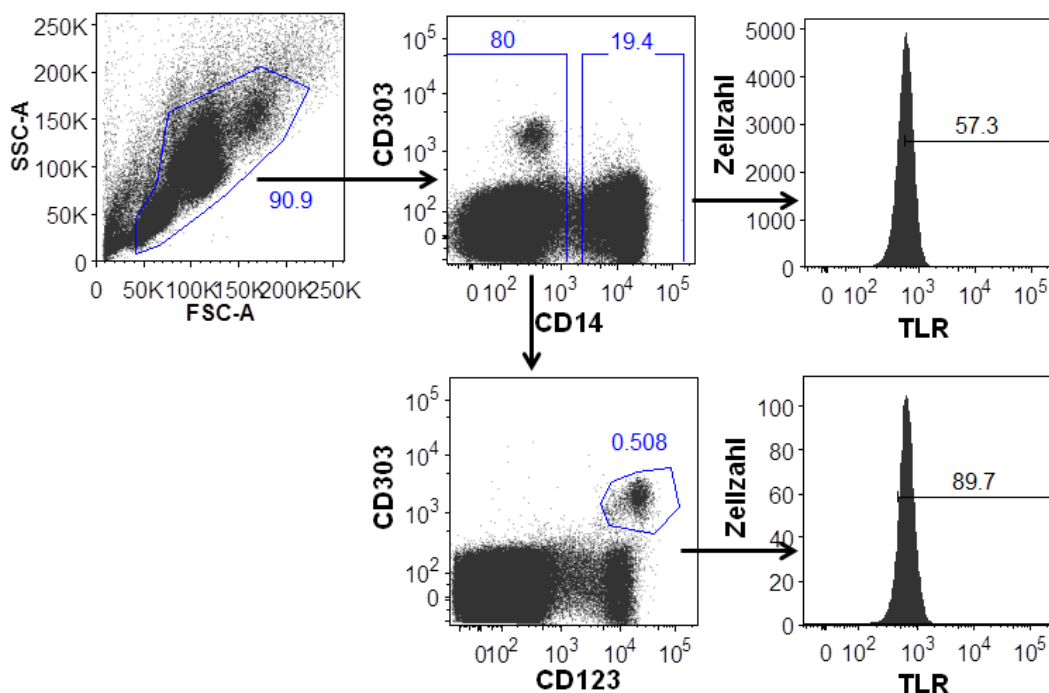


Abbildung 2

Gatingstrategie für die durchflusszytometrische Messung der TLR-Expression in pDC und Monozyten

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen mit 1000 U/ml IFN- β oder unbehandelt für 24h inkubiert, geerntet, mit entsprechenden Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle und die intrazellulären TLR gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Exemplarisch ist hier die Gatingstrategie für pDC und Monozyten dargestellt. Zuerst wurden aufgrund ihres Verhaltens im Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC), ein Maß für das Volumen der Zellen, und im Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC), ein Maß für die Granularität, intakte Zellen ausgewählt. Anschließend wurden CD14 positive Zellen als Monozyten ausgewählt und ihre TLR Expression als Fluoreszenzintensität des jeweiligen Antikörpers gemessen. Ebenso wurde für pDC verfahren, die als CD14 negative und CD123 und CD303 doppelt-positive Zellen ausgewählt wurden.

3.4.3.1.3 Auswertung

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo. Als Maß für die TLR- bzw. MyD88-Expression wurde die arithmetische mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) des Farbstoffes Alexa488 berechnet, der an den jeweiligen Antikörper gekoppelt war. Die MFI der Isotypkontrolle wurde jeweils abgezogen. Auch der jeweilige prozentuale Anteil der Subpopulationen an allen lebenden Zellen wurde in FlowJo ermittelt. Das Ergebnis der intrazellulären Zytokinmessung wurde als relativer Anteil der für das Zytokin positiv gefärbten Zellen quantifiziert. Die Ergebnisse wurden exportiert und in GraphPad Prism5 statistisch ausgewertet. Genauere Angaben zum verwendeten Test, der jeweiligen Fallzahl n , dem verwendeten Signifikanzniveau α oder der Größe der p -Werte werden in den jeweiligen Abbildungstexten angegeben.

Signifikanz wurde ab p -Wert $< 0,05$ angenommen. Für durchflusszytometrische Messungen mit PBMC gesunder Spender wurde der gepaarte t -Test verwendet. Für Messungen der relativen Zellzahlen der verschiedenen PBMC-Subpopulationen wurde im Fall der *in vitro* durchgeführten Versuche der zweiseitige, gepaarte t -Test verwendet; im Fall der Versuche mit Patienten der ungepaarte t -Test. Für die Bestätigung der *in vitro* gesehenen Änderung des relativen Anteils der pDC wurde für die Messung mit Patientenzellen der einseitige t -Test verwendet. Messungen der TLR7- und MyD88-Proteinexpression in PBMC unbehandelter und IFN- β - oder Glatirameracetat-behandelter Patienten wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test analysiert, da die Werte nicht gepaart waren und der Shapiro-Wilk-Normalitätstest ergab, dass die Werte in den Gruppen nicht normalverteilt waren. Die Testung auf Normal- bzw. Gaußverteilung ist bei kleinen Fallzahlen ($n < 12$) zwar unsicher, aber nicht-parametrische Tests haben eine geringere Power, die Entscheidung für Signifikanz erfolgt konservativer und ein Fehler der 1. Art wird gegenüber der Verwendung eines parametrischen Tests bei nicht normalverteilten Werten unwahrscheinlicher.

3.4.3.2 Zytokinmessung mittels Flowcytomix-Assay

In bei -80 °C gelagerten Zellkulturüberständen der mit und ohne IFN- β bzw. TLR-Liganden stimulierten PBMC (s. 3.4.1.5) wurde nach Angaben des Herstellers mittels Flowcytomix-Assay (ebioscience, San Diego, USA), einer durchflusszytometrischen Multianalytmessung, die Konzentration von IFN- α , IL-10, IL-23, IL-27, IL-1 β , IL-17A/F, IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α , IP-10 und IL-4 bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem BD FACSCanto II, die Auswertung mit der Software FlowCytomix Pro 3.0 und die graphische Darstellung und statistische Auswertung mit GraphPad Prism5.

Statistische Signifikanz wurde ab p -Werten $< 0,05$ angenommen. Der Effekt des TLR-Liganden in IFN- β stimulierten Zellen (Zytokinmenge nach IFN- β - und TLR-Stimulation abzüglich Zytokinmenge nach Stimulation mit IFN- β ohne TLR Stimulation) wurde mit demjenigen in unstimulierten Zellen verglichen (Zytokinmenge nach Stimulation ohne IFN- β , aber mit TLR-Ligand abzüglich Zytokinmenge nach Stimulation ohne IFN- β und ohne TLR-Ligand) und der Unterschied mit gepaartem t -Test auf Signifikanz geprüft. Dieses Vorgehen erfolgte nach Rücksprache mit einem Statistiker, Herrn Lenz, im Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité.

3.4.3.3 Zytokinmessung mittels ELISA

In bei -80 °C gelagerten Zellkulturüberständen der mit und ohne IFN- β bzw. TLR-Liganden stimulierten PBMC (s. 3.4.1.5) wurde nach Angaben des Herstellers mittels Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA; eBioscience) die Konzentration von IFN- α und TNF- α bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 IFN- β reguliert die Expression von TLR- und MyD88-mRNA in humanen PBMC *in vitro*

Um den genregulatorischen Effekt von IFN- β auf die verschiedenen TLR1-10 sowie MyD88 *in vitro* zu erfassen, wurde zunächst deren mRNA-Expression in PBMC in einem Screeningansatz mittels qPCR untersucht.

Aus dem peripheren Blut von sechs verschiedenen gesunden Spendern wurden unabhängig voneinander PBMC isoliert, mit 0, 10, 100 oder 1000 U/ml IFN- β inkubiert und nach 6, 24 oder 48 h die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA wurde mittels qPCR die Expression von TLR1-10, MyD88 und Mx1 untersucht und gegen das Referenzgen HPRT normalisiert. HPRT hatte sich in Vorversuchen als das unter den Versuchsbedingungen am stabilsten exprimierte Referenzgen erwiesen (Daten nicht gezeigt). Mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde die Expression relativ quantifiziert. Hierfür wurde die Expression in unstimulierten Zellen gleich 1 gesetzt und die Expression in den stimulierten Zellen als deren Vielfaches ausgedrückt. Von einer biologischen Relevanz kann ab einer Verdopplung bzw. Halbierung der Expression ausgegangen werden⁸³. Die Expressionsunterschiede zwischen unstimulierten und 6 h mit 1000 U/ml IFN- β stimulierten PBMC wurden mit gepaartem *t*-Test und jene zwischen den verschiedenen Stimulationszeiten bzw. verschiedenen IFN- β -Dosen mit einer einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Kramer-Posttest auf statistische Signifikanz hin untersucht. Für jede Kombination von Stimulationszeit und IFN- β Dosis wurden Zellen von mindestens drei Spendern (n = 3) in unabhängigen qPCR-Läufen untersucht.

Nach 6 h Inkubation mit 1000 U/ml IFN- β zeigte sich eine signifikante Hochregulation von TLR3 (4,7-fach), TLR7 (7,4-fach) und MyD88 (2,1-fach) sowie eine signifikante Herunterregulation von TLR6 (0,41-fach) und TLR9 (0,35-fach) verglichen mit der ohne IFN- β inkubierten Kontrollprobe. Die Expression von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR8 zeigte keine signifikante Regulation. Die Herunterregulation von TLR10 (0,54-fach) erreichte keine statistische Signifikanz. TLR5 konnte grundsätzlich nicht detektiert werden. Mx1 ist ein bekanntes, von IFN- β induziertes Gen und diente als Positivkontrolle für die biologische Aktivität des verwendeten IFN- β . Es wurde wie erwartet durch die Stimulation mit IFN- β stark hochreguliert (66,2-fach) (s. Abbildung 3).

Diese Ergebnisse zeigten, dass IFN- β das TLR-System auf mRNA-Ebene differentiell reguliert.

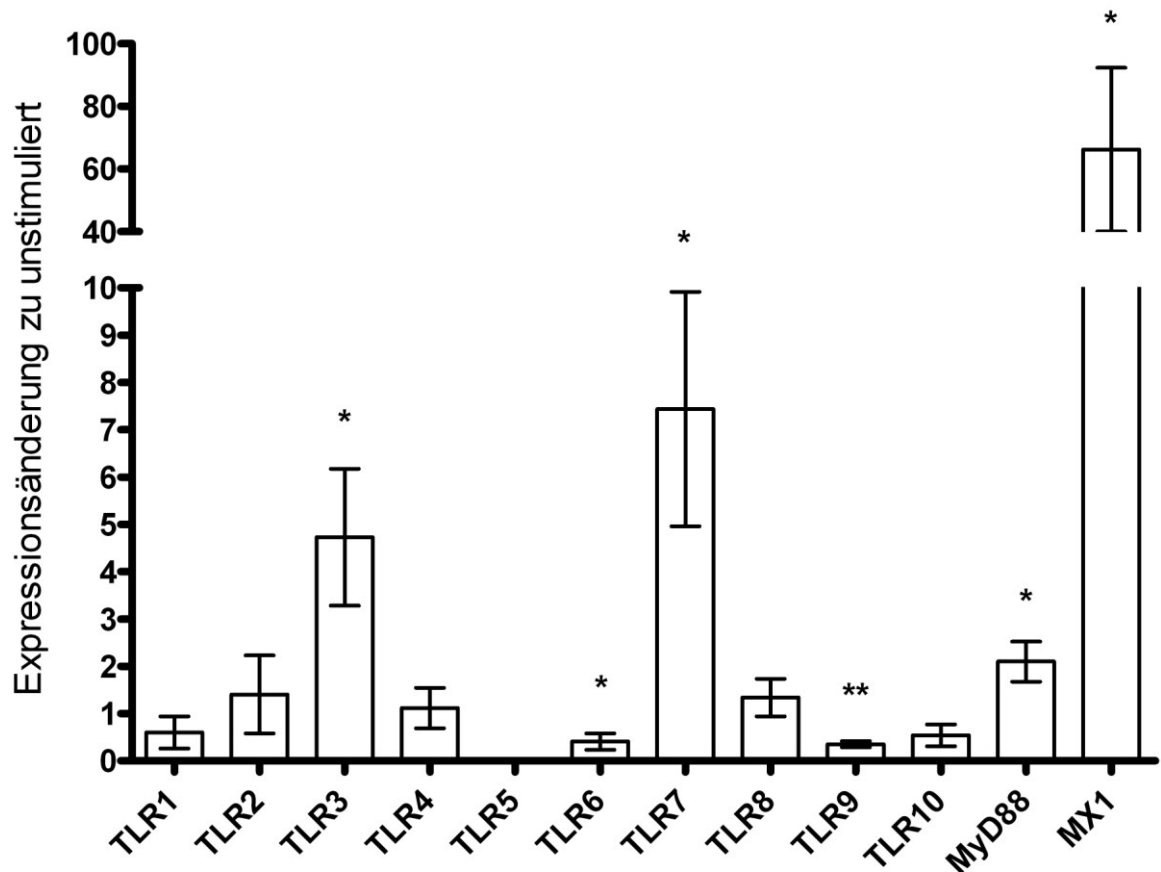


Abbildung 3

IFN- β reguliert die TLR- und MyD88-Expression in humanen PBMC auf mRNA-Ebene *in vitro*.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN- β oder unbehandelt für 6 h im Brutschrank inkubiert und je 3 Wells für die Isolation der RNA vereint. cDNA wurde synthetisiert und qPCR mit Primern für TLR1-10, MyD88, Mx1 und HPRT durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expression der Zielgene in PBMC nach 6 h Stimulation mit 1000 U/ml IFN- β gegenüber unstimulierten Zellen (gepoolte Daten aus mehreren qPCR-Läufen mit je $n = 3$ gesunden Spendern; Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD); gepaarter *t*-Test; Unterschiede zu unstimuliert: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

4.1.1 Der Effekt von IFN- β auf die Expression von TLR- und MyD88-mRNA in PBMC ist zeit- und dosisabhängig

Um die gemessenen regulatorischen Effekte von IFN- β auf das TLR-System hinsichtlich Spezifität und Dynamik zu charakterisieren, wurde für die signifikant regulierten Gene TLR3, TLR6, TLR7, TLR9, MyD88 und Mx1 sowie für TLR10 eine Dosis- und eine Zeitkurve erstellt. Hierfür wurden die PBMC für 6 oder 24 h mit 10, 100 oder 1000 U/ml IFN- β stimuliert bzw. mit 1000 U/ml IFN- β für 6, 24 oder 48 h stimuliert.

Es zeigte sich, dass sowohl Hoch- als auch Herunterregulation mit zunehmender Dosis stärker ausgeprägt waren. Die Expression der hochregulierten Gene TLR3, TLR7, MyD88 und Mx1 war nach Stimulation mit 1000 U/ml IFN- β (für 24 h) am höchsten (s. Abbildung 4A), während die Expression der herunterregulierten Gene TLR6, TLR9 und TLR10 nach Stimulation mit 1000 U/ml IFN- β (für 6 h) am niedrigsten war (s. Abbildung 4B). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich für TLR3 und MyD88 ein verzögerter Effekt mit der am stärksten ausgeprägten Expression erst nach 24 h (5,2-fach bzw. 3,6-fach), die auch nach 48 h noch hoch war (4,3-fach bzw. 3,3-fach). Die Regulation der übrigen Gene erreichte bereits nach 6 h ein Maximum und nahm mit der Zeit wieder ab. Von den herunterregulierten Genen war nur TLR9 auch noch nach 48 h gegenüber der unstimulierten Kondition statistisch signifikant erniedrigt (0,77-fach) (s. Abbildung 5).

Zusammenfassend wurde für alle in PBMC getesteten, signifikant regulierten Gene TLR3, TLR6, TLR7, TLR9, MyD88 und Mx1 sowie für TLR10 eine Dosis- und Zeitabhängigkeit des Effekts von IFN- β nachgewiesen.

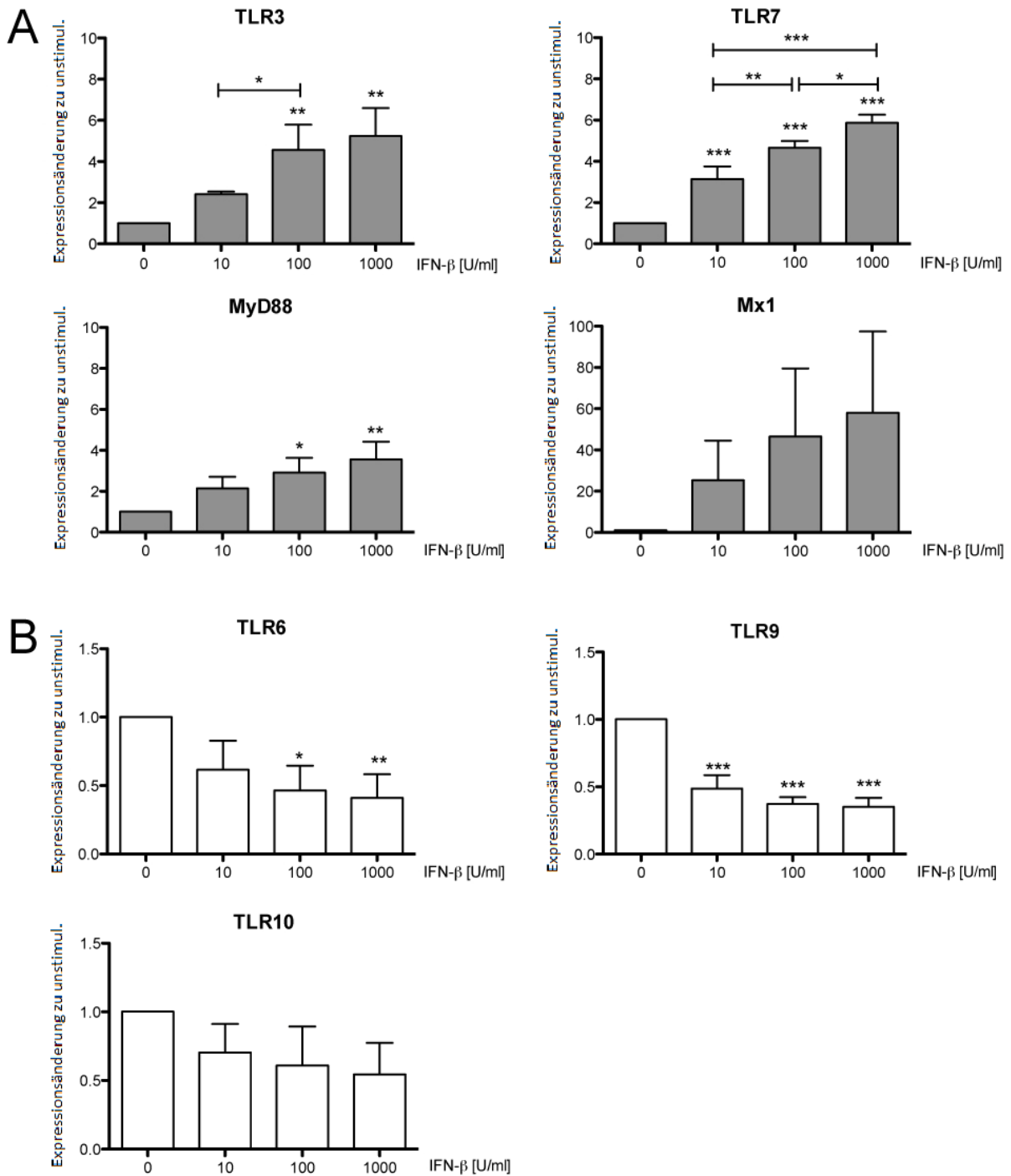


Abbildung 4

Der Effekt von IFN-β auf die Expression von TLR- und MyD88-mRNA in PBMC ist dosisabhängig.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je mit 10, 100 oder 1000 U/ml IFN-β für 6 oder 24 h inkubiert, cDNA synthetisiert und qPCR für die angegebenen Gene und HPRT durchgeführt. Als Vergleichskontrolle dienen unbehandelte PBMC (0 U/ml IFN-β). In (A) dargestellt ist die relative Expression der hochregulierten Zielgene in PBMC nach 24 h Stimulation mit 10, 100 und 1000 U/ml IFN-β gegenüber unstimulierten Zellen. In (B) dargestellt ist die relative Expression der herunterregulierten Zielgene in PBMC nach 6h Stimulation mit 10, 100 oder 1000 U/ml IFN-β gegenüber unstimulierten Zellen. (n = 3; MW+SD; einfaktorier ANOVA mit Tukey-Kramer-Posttest; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

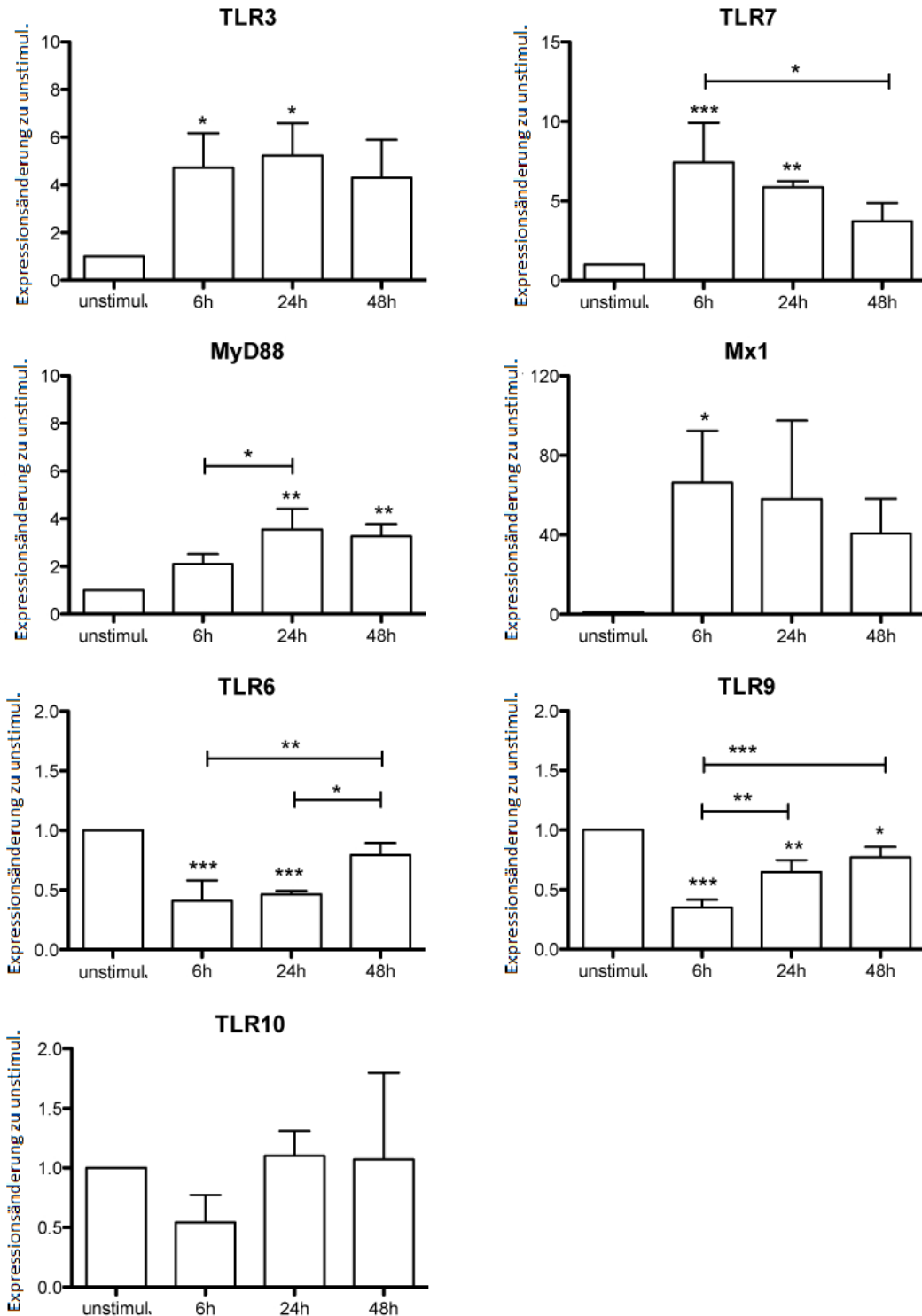


Abbildung 5

Der Effekt von IFN- β auf die Expression von TLR- und MyD88-mRNA in PBMC ist zeitabhängig.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN- β für 6, 24 oder 48 h im Brutschrank inkubiert, je 3 Wells für RNA-Isolation vereint, cDNA synthetisiert und qPCR für die angegebenen Gene und HPRT durchgeführt. Als Vergleichskontrolle dienten unbehandelte PBMC. Dargestellt ist die relative Expression der Zielgene in PBMC nach 6, 24 und 48 h Stimulation mit 1000 U/ml IFN- β gegenüber unstimulierten (unstimul.) Zellen. (n = 3; MW+SD; einfaktorierter ANOVA mit Tukey-Kramer-Posttest; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

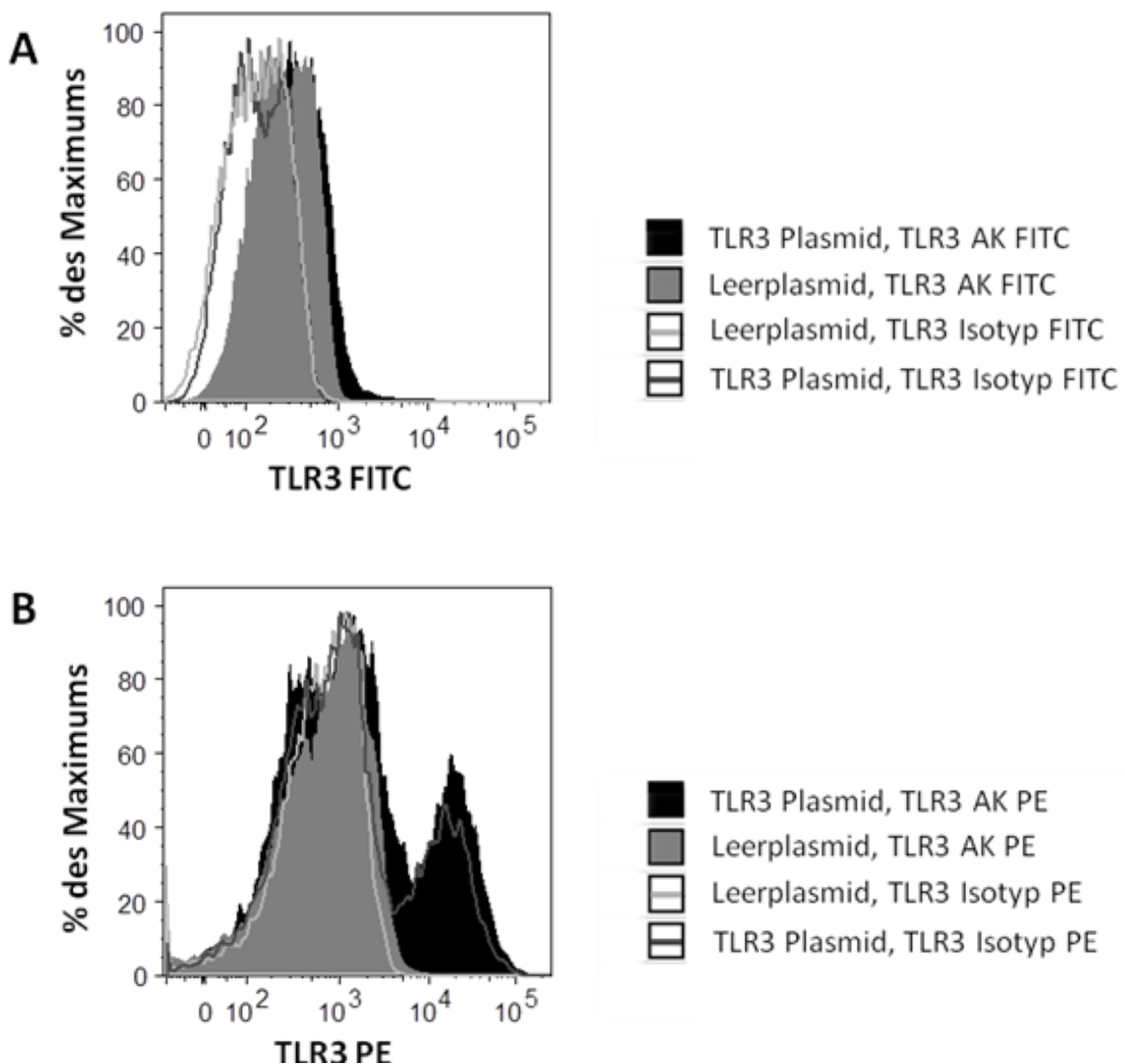
4.2 IFN- β reguliert die Expression von TLR- und MyD88-Protein in Subpopulationen humaner PBMC *in vitro*

Nachdem im Screeningansatz TLR3, TLR6, TLR7, TLR9 und MyD88 als durch IFN- β spezifisch regulierte Kandidaten auf der mRNA-Ebene identifiziert worden waren, stellte sich die Frage, in welchen Subpopulationen der PBMC diese Regulationen stattfanden und ob sie sich auch auf der Proteinebene darstellten. Daher wurden die am stärksten regulierten Gene, nämlich TLR3, TLR7, MyD88 und TLR9, mittels Durchflusszytometrie weiter untersucht. Hierzu wurden PBMC gesunder Spender wie zuvor isoliert und mit oder ohne 1000 U/ml IFN- β inkubiert. Die Zelloberfläche wurde mit Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmoleküle einzelner PBMC-Subpopulationen und intrazellulär mit Antikörpern gegen den jeweiligen TLR bzw. MyD88 sowie mit dem entsprechenden Isotypantikörper gefärbt. Die drei ausgewählten TLR sind bekanntermaßen intrazellulär lokalisiert, und MyD88 ist als Adapterprotein Teil ihrer intrazellulären Signalkaskade. Die verschiedenen Oberflächenfärbungen erlaubten die Detektion von Monozyten, plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), T-Zellen und B-Zellen sowie myeloiden dendritischen Zellen (mDC). Die Ergebnisse werden im Folgenden für jeden TLR und MyD88 separat dargestellt.

4.2.1 TLR3

Die Expression von TLR3-Protein wurde mittels zwei verschiedener Antikörper gemessen, und zwar einem FITC-gekoppelten und einem PE-gekoppelten. Der PE-Antikörper und die zugehörige Isotypkontrolle ergaben in sämtlichen PBMC-Subpopulationen jeweils ähnlich starke Signale, was auf eine Unspezifität des Antikörpers, eine Bindung des Isotypen an TLR3 oder eine zu schwache TLR3-Expression hinweisen kann. Der FITC-gekoppelte Antikörper detektierte TLR3 in pDC. Da pDC laut Literatur keinen TLR3 exprimieren⁸⁴, erschien es notwendig die Spezifität der beiden Antikörper zu verifizieren. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit einem TLR3-Plasmid und einem Kontrollplasmid transfiziert. Außerdem wurde mittels GFP-Plasmid (*green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein) die Transfektionseffizienz kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen intrazellulär mit den beiden gegen TLR3 gerichteten Antikörpern und den zugehörigen Isotypen gefärbt. In der Durchflusszytometrie ergab die Färbung mit dem FITC-gekoppelte Antikörper keinen Unterschied zwischen den TLR3- und den kontrolltransfizierten Zellen (s. Abbildung 6A). Demnach band dieser Antikörper nicht an TLR3. Der PE-gekoppelte Antikörper zeigte zwar in den TLR3-transfizierten Zellen ein deutlich stärkeres Signal, doch war das Signal des Isotypen wieder ebenso stark (s. Abbildung

6B). Dies ließ darauf schließen, dass der Isotyp an TLR3 bindet. Der PE-gekoppelte TLR3-Antikörper band TLR3 spezifisch, womit die Färbung zwar verlässlich war, jedoch mangels Isotypkontrolle nicht quantitativ ausgewertet werden konnte. In der Folge wurden alle PBMC-Subpopulationen nach 24 h Inkubation mit 1000 U/ml IFN- β oder unbehandelt mit dem PE-TLR3-Antikörper gefärbt. Da sich qualitativ keine IFN- β -induzierte Expressionsänderung von TLR3 zeigte (s. Abbildung 6C), wurde auf eine Quantifizierung z.B. durch Verwendung weiterer Antikörper oder Isotypkontrollen verzichtet. Die zuvor auf mRNA-Ebene gemessene Hochregulation von TLR3 konnte demnach auf Proteinebene nicht festgestellt werden.



(Abbildung 6, s. nächste Seite)

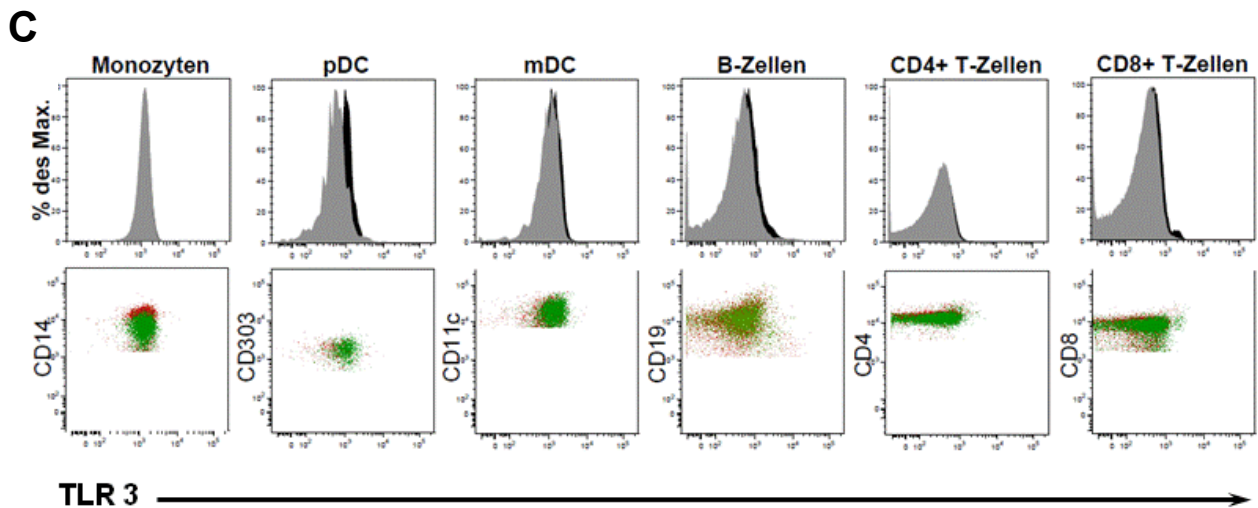


Abbildung 6

Überprüfung der Spezifität zweier Antikörper gegen TLR3 an TLR3-transfizierten HEK293-Zellen und Färbungen mit PE-gekoppeltem Antikörper gegen TLR3 in PBMC-Subpopulationen

(A/B) HEK293-Zellen wurden entweder mit TLR3-Plasmid oder mit einem Leerplasmid als Kontrolle transfiziert, mit TLR3-Antikörpern (AK) oder den entsprechenden Isotypantikörpern als Spezifitätskontrolle intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse einer repräsentativen Messung von insgesamt $n = 4$ Messungen. (A) FITC-gekoppelte TLR3- und Isotypantikörper, (B) PE-gekoppelte TLR3- und Isotypantikörper. (C) Färbungen mit PE-gekoppeltem TLR3-Antikörper ohne Isotypkontrollen zur qualitativen Auswertung. Exemplarische Histogramme und Dotplots eines repräsentativen Spenders für jede PBMC-Subpopulation zeigen die TLR3-Expression in stimulierten (schwarz bzw. grün) vs. unstimulierten (dunkelgrau bzw. rot) Zellen. Die TLR3-Expression ist in den Dotplots jeweils gegen zelltypspezifische Oberflächenmoleküle aufgetragen: CD14 für Monozyten, CD303 für plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), CD11c für myeloide dendritische Zellen (mDC), CD19 für B-Zellen, CD4 bzw. CD8 für jeweilige T-Zellen.

4.2.2 IFN- β induziert die Expression von TLR7-Protein in pDC *in vitro*

TLR7-Protein wurde in allen unstimulierten PBMC-Subpopulationen angefärbt. In Monozyten, pDC und mDC fand sich eine starke Expression, während B-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen TLR7 nur schwach exprimierten. Nach Stimulation mit IFN- β zeigte sich in pDC eine gegenüber unstimulierten Zellen signifikant stärkere Expression von TLR7. In den übrigen PBMC-Subpopulationen gab es keine signifikanten Änderungen der Expression (s. Abbildung 7). Die auf mRNA-Ebene gezeigte Hochregulation von TLR7 wurde damit auf Proteinebene nachvollzogen und war hauptsächlich den pDC zuzuordnen.

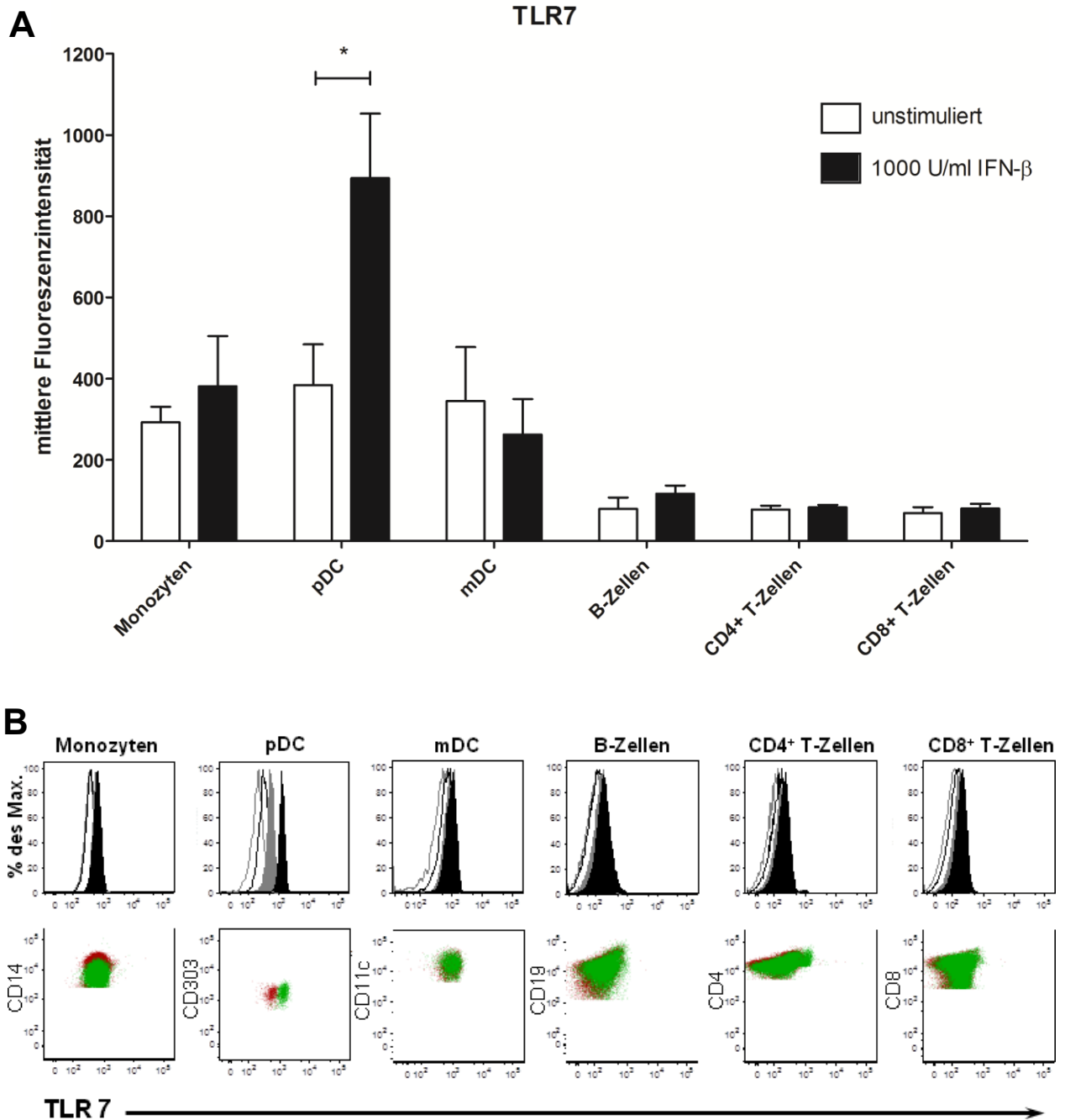


Abbildung 7

IFN-β induziert die Expression von TLR7-Protein in pDC *in vitro*.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN-β für 24 h inkubiert, gerettet, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Als Vergleichskontrolle dienten ohne IFN-β inkubierte PBMC (s. Material und Methoden). (A) Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde bestimmt, die MFI der Isotypkontrolle abgezogen und hier als MW \pm SD von n = 3 Spendern dargestellt. Expressionsunterschiede zwischen unstimulierten und mit 1000 U/ml IFN-β stimulierten Zellen: gepaarter *t*-Test; *: $p < 0,05$. (B) Exemplarische Histogramme und Dotplots eines repräsentativen Spenders für jede PBMC-Subpopulation zeigen die TLR7-Expression in stimulierten (schwarz bzw. grün) vs. unstimulierten (dunkelgrau bzw. rot) Zellen und die Isotypkontrollen (schwarze und dunkelgraue Linien). Die TLR7-Expression ist in den Dotplots jeweils gegen zelltypspezifische Oberflächenmoleküle aufgetragen: CD14 für Monozyten, CD303 für plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), CD11c für myeloide dendritische Zellen (mDC), CD19 für B-Zellen, CD4 bzw. CD8 für jeweilige T-Zellen.

4.2.3 IFN- β induziert die Expression von TLR9-Protein in pDC *in vitro*

TLR9 Protein wurde in allen unstimulierten PBMC-Subpopulationen angefärbt. In Monozyten, pDC und mDC fand sich eine starke Expression, während B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen TLR9 nur schwach exprimierten. Das Expressionsmuster von TLR9 Protein in den Subpopulationen entsprach damit weitgehend jenem von TLR7, doch war das TLR9 Expressionsniveau durchgehend höher (s. Abbildung 8).

Wegen der zuvor beobachteten frühen Herunterregulation von TLR9-mRNA durch IFN- β wurde eine kürzere Stimulationszeit der PBMC (16 h) für die Untersuchung der TLR9-Proteinexpression gewählt.

Eine signifikante Herunterregulation von TLR9-Protein durch IFN- β als Folge der zuvor gemessenen Regulation auf mRNA-Ebene zeigte sich nicht, allerdings ein entsprechender Trend in mDC, B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen. Dagegen ergab sich eine kleine, aber signifikante Steigerung der Expression von TLR9 durch IFN- β in pDC (s. Abbildung 8).

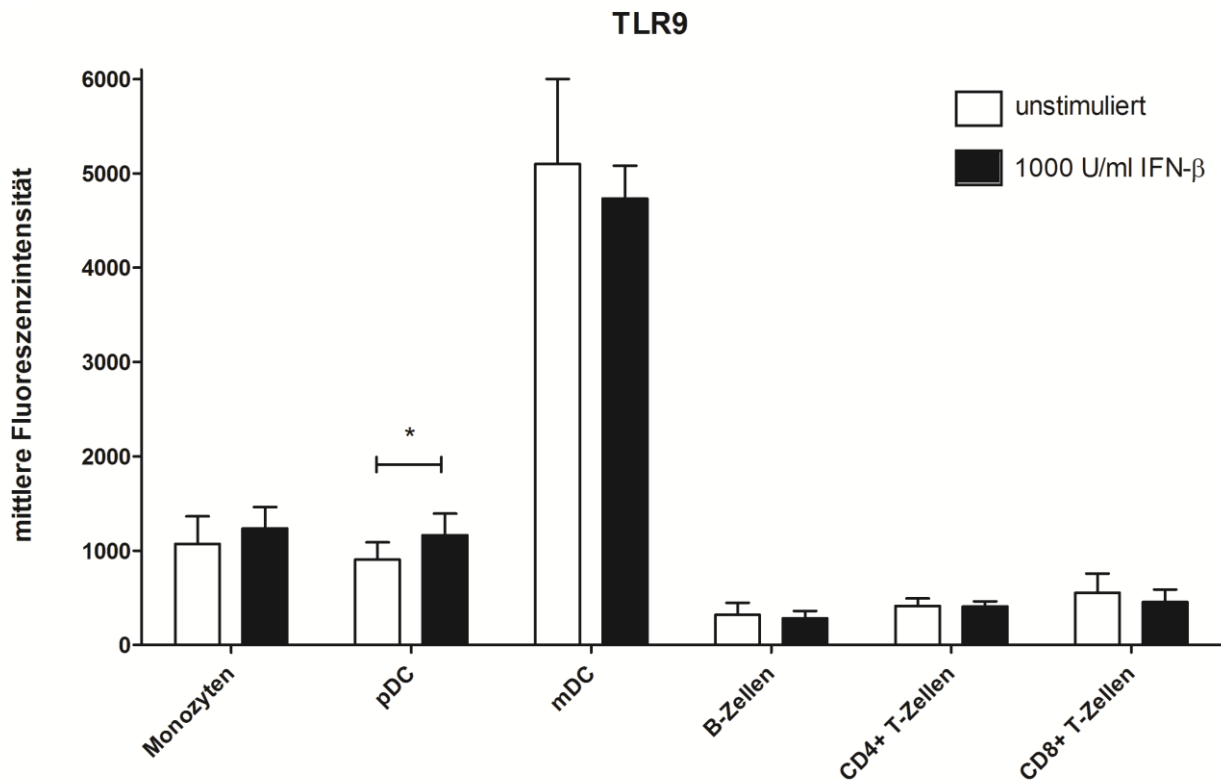
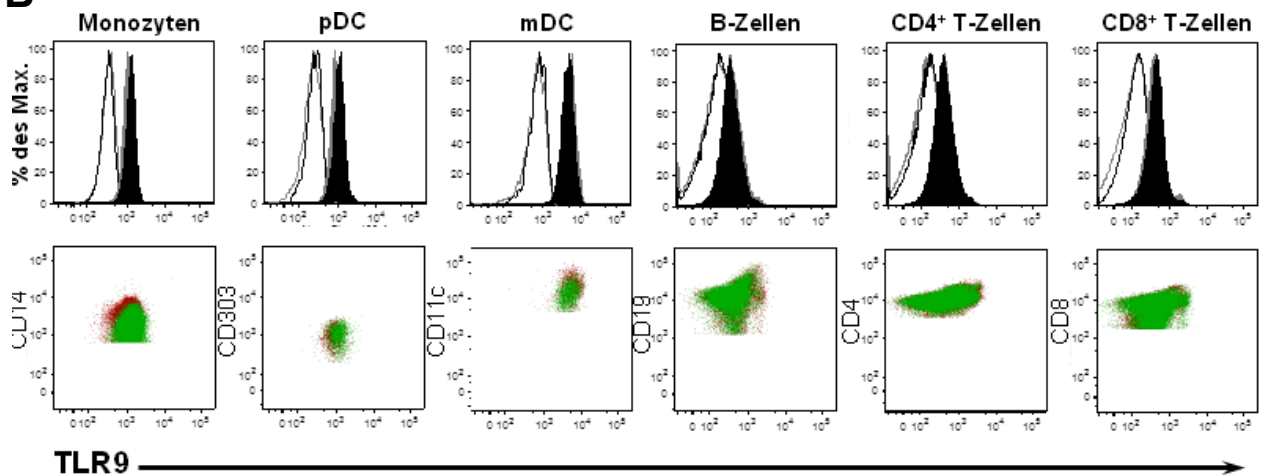
A**B**

Abbildung 8

IFN-β induziert die Expression von TLR9-Protein in pDC *in vitro*.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN-β oder unbehandelt für 16 h inkubiert, gerntet, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Als Vergleichskontrolle dienen ohne IFN-β inkubierte PBMC. (A) Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde bestimmt, die MFI der Isotypkontrolle subtrahiert und hier als MW \pm SD von n = 3 Spendern dargestellt. Expressionsunterschiede zwischen unstimuliert und mit 1000 U/ml IFN-β stimulierten Zellen: gepaarter *t*-Test; *: $p < 0,05$. (B) Exemplarische Histogramme und Dotplots eines repräsentativen Spenders für jede Subpopulation der PBMC zeigen die Expression von TLR9 in stimulierten (schwarz bzw. grün) vs. unstimulierten (dunkelgrau bzw. rot) Zellen und die Isotypkontrollen (schwarze und dunkelgraue Linien). Die TLR9-Expression ist in den Dotplots jeweils gegen zelltypspezifische Oberflächenmoleküle aufgetragen: CD14 für Monozyten, CD303 für plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), CD11c für myeloide dendritische Zellen (mDC), CD19 für B-Zellen, CD4 bzw. CD8 für jeweilige T-Zellen.

In mDC war das Fluoreszenzsignal für TLR9 besonders stark. Da in früheren Arbeiten beschrieben worden war, dass diese Zellen kein TLR9 exprimieren^{85,86}, wurde die Spezifität des TLR9-Antikörpers an mit TLR9-Plasmid transfizierten HEK293-Zellen überprüft. Der Antikörper zeigte eine deutlich stärkere Färbung in TLR9-transfizierten gegenüber mit Leerplasmid transfizierten HEK293-Zellen. Der Antikörper bindet also spezifisch an TLR9 (s. Abbildung 9).

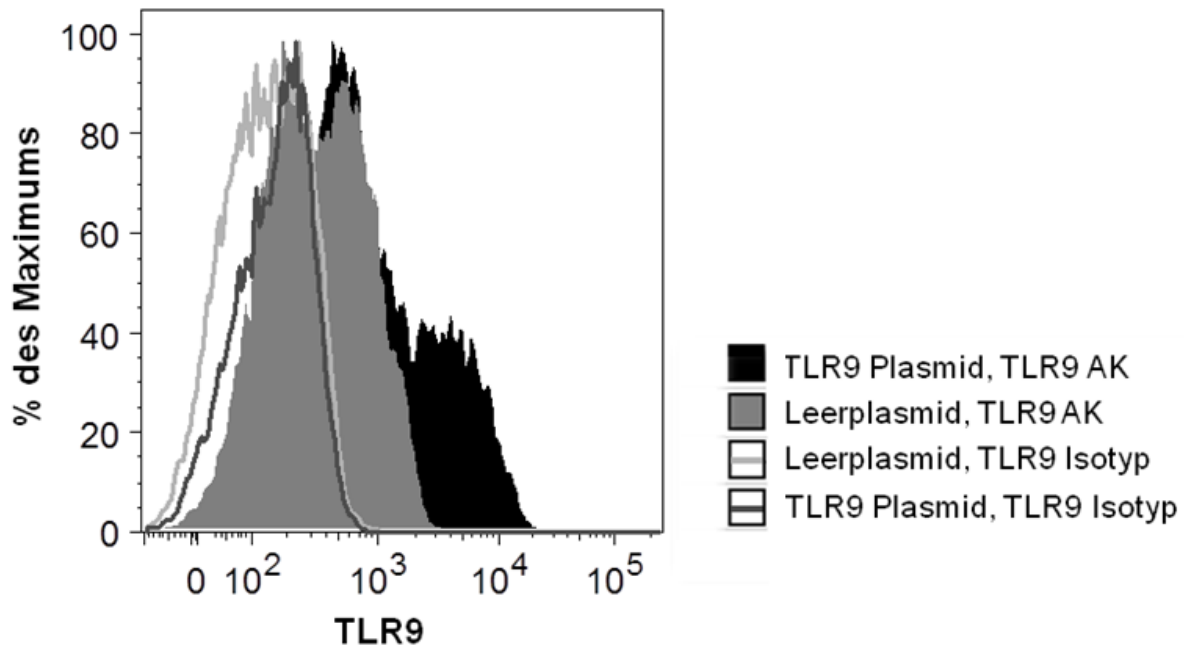


Abbildung 9

Antikörper gegen TLR9 färbt spezifisch TLR9 in transfizierten HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen wurden entweder mit TLR9-Plasmid oder mit einem Leerplasmid als Kontrolle transfiziert, mit TLR9-Antikörper (AK) oder dem entsprechenden Isotypantikörper als Spezifitätskontrolle intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse einer repräsentativen Messung von insgesamt n = 4 Messungen.

4.2.4 IFN-β induziert die Expression von MyD88-Protein in pDC *in vitro*

MyD88-Protein war insbesondere in unstimulierten Monozyten, pDC und mDC stark und in B- und T-Zellen schwach exprimiert. Nach Stimulation mit 1000 U/ml IFN-β stellte sich in pDC eine deutliche und statistisch signifikante Hochregulation von MyD88-Protein dar (s. Abbildung 10).

Die in den qPCR-Messungen beobachtete Hochregulation der MyD88-mRNA in PBMC durch IFN-β setzte sich demnach in einer gesteigerten Expression von MyD88-Protein in pDC fort.

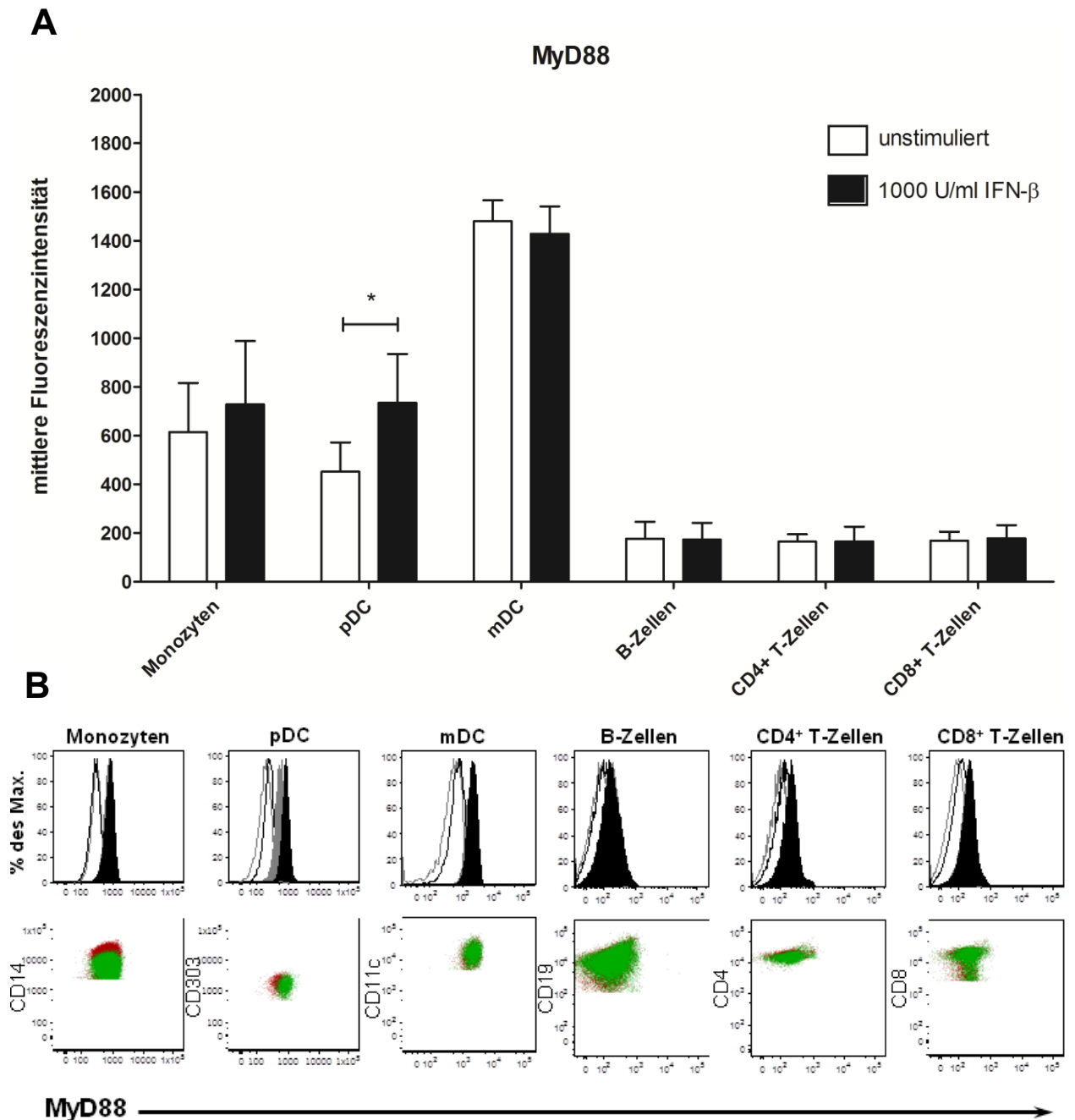


Abbildung 10

IFN-β induziert die Expression von MyD88-Protein in pDC *in vitro*.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN-β für 24 h inkubiert, geerntet, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Als Vergleichskontrolle dienen ohne IFN-β inkubierte PBMC. (A) Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde bestimmt, die MFI der Isotypkontrolle subtrahiert und hier als MW ± SD von n = 3 Spendern dargestellt. Expressionsunterschiede zwischen unstimulierten und mit 1000 U/ml IFN-β stimulierten Zellen: gepaarter *t*-Test; *: $p < 0,05$. (B) Exemplarische Histogramme und Dotplots eines repräsentativen Spenders für jede PBMC-Subpopulation zeigen die MyD88-Expression in stimulierten (schwarz bzw. grün) vs. unstimulierten (dunkelgrau bzw. rot) Zellen und die Isotypkontrollen (schwarze und dunkelgraue Linien). Die MyD88-Expression ist in den Dotplots jeweils gegen zelltypspezifische Oberflächenmoleküle aufgetragen: CD14 für Monozyten, CD303 für plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), CD11c für myeloide dendritische Zellen (mDC), CD19 für B-Zellen, CD4 bzw. CD8 für jeweilige T-Zellen.

4.3 IFN- β induziert die Expression von TLR7- und MyD88-Protein in pDC in MS-Patienten *in vivo*

Nachdem IFN- β die Expression von TLR7- und MyD88-Protein in pDC gesunder Spender *in vitro* signifikant hochreguliert hatte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch *in vivo* bei Patienten unter IFN- β -Therapie auftritt. Um dies zu untersuchen, wurden PBMC von Patienten mit RRMS (Erstdiagnose vor weniger als 2 Jahren) oder KIS, die entweder unbehandelt waren (n = 9) oder mit IFN- β (n = 7) oder Glatirameracetat (n = 7) therapiert wurden, isoliert. Die durchflusszytometrische Messung der TLR7- und MyD88-Proteinexpression in pDC und Monozyten erfolgte analog den Vorversuchen (s. Material und Methoden Abschnitt 3.4.3.1). Die Zelloberfläche wurde mit Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmoleküle von pDC und Monozyten und intrazellulär mit Antikörpern gegen TLR7 bzw. MyD88 und mit dem entsprechenden Isotypantikörper gefärbt. Die Durchführung und Auswertung dieser Versuche erfolgte verblindet.

Für TLR7-Protein ergab sich eine signifikant stärkere Expression in pDC der mit IFN- β behandelten Gruppe gegenüber pDC der unbehandelten Patienten (p = 0,0389; Mann-Whitney-U-Test). In pDC der mit GA behandelten Patienten zeigte sich hingegen keine Expressionsänderung gegenüber unbehandelten Patienten.

Auch MyD88 war in pDC von IFN- β -behandelten Patienten stärker exprimiert als in pDC unbehandelter oder GA-behandelter Patienten. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (IFN- β gegen unbehandelt: p = 0,1121; Mann-Whitney-U-Test). In Monozyten ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von TLR7 oder MyD88 zwischen den Gruppen (s. Abbildung 11). Demnach induziert IFN- β die Expression von TLR7- und MyD88-Protein in pDC nicht nur *in vitro*, sondern auch in pDC von MS-Patienten *in vivo*.

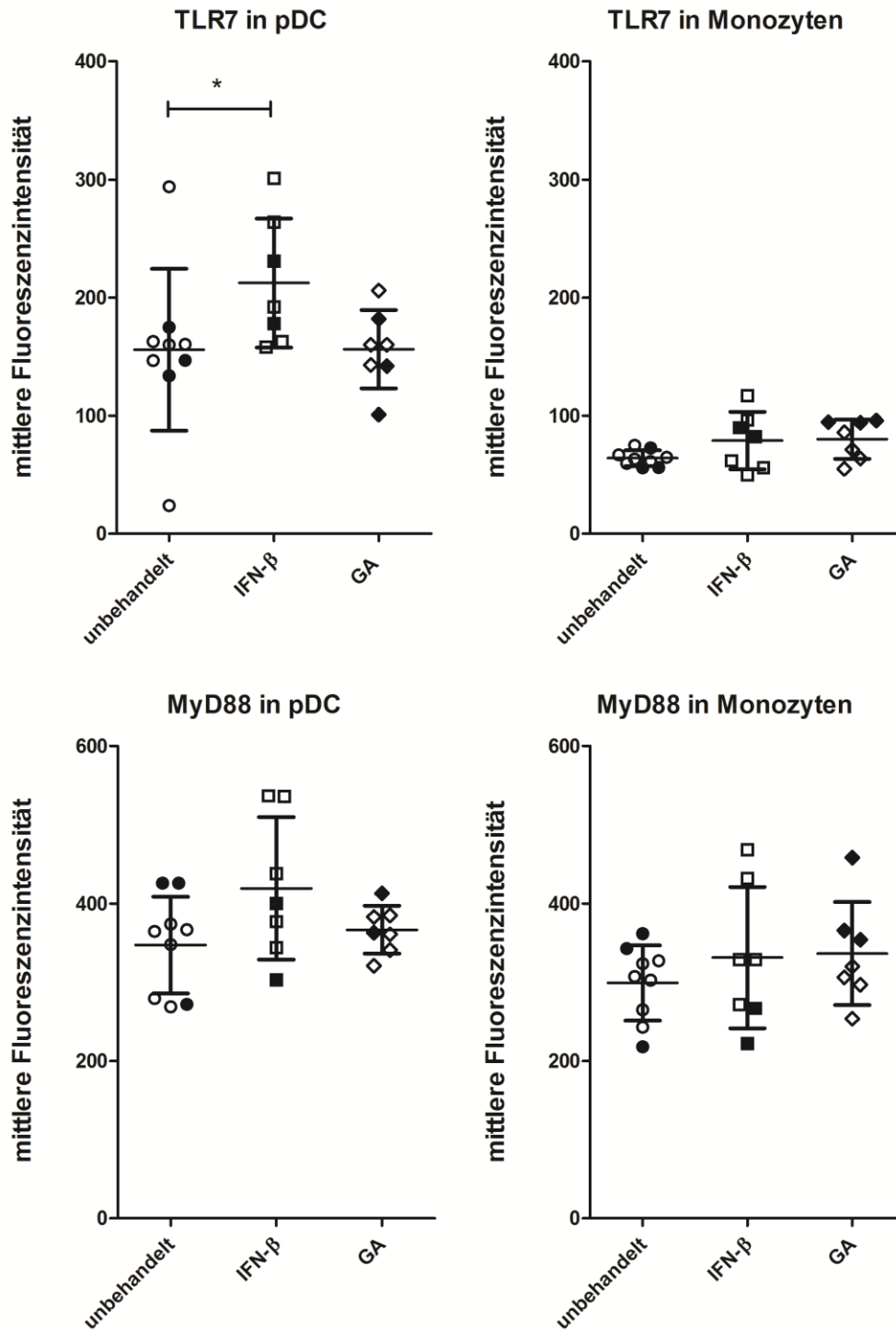


Abbildung 11

IFN-β induziert die Expression von TLR7- und MyD88-Protein in pDC in MS-/KIS-Patienten *in vivo*.

TLR7- und MyD88-Proteinexpression wurde durchflusszytometrisch in pDC und Monozyten von IFN-β-behandelten (n = 7) und Glatirameracetat(GA)-behandelten (n = 7) sowie unbehandelten Patienten (n = 9) mit früher RRMS oder KIS bestimmt. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des TLR7- bzw. MyD88-Antikörpers, abzüglich der MFI der Isotypkontrolle. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten, gefüllte Symbole männliche, ungefüllte weibliche. Unterschiede zwischen den Gruppen „unbehandelt“ und „IFN-β-behandelt“: Mann-Whitney-U-Test; *: $p < 0,05$.

4.4 Der Einfluss von IFN- β auf die relative Zellzahl verschiedener PBMC-Subpopulationen *in vitro* und *in vivo*

PBMC gesunder Spender wurden wie zuvor beschrieben isoliert, mit 1000 U/ml IFN- β für 16 oder 24 h inkubiert, die Zelloberfläche mit Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmoleküle einzelner PBMC-Subpopulationen gefärbt und deren relativer Anteil an allen lebenden Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Als Vergleichskontrolle dienten parallel ohne IFN- β inkubierte PBMC. Die verschiedenen Oberflächenfärbungen gegen CD-Moleküle erlaubten die Detektion von Monozyten, plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), myeloiden dendritischen Zellen (mDC), T-Zellen und B-Zellen.

Ein deutlicher und statistisch signifikanter Effekt konnte für pDC nachgewiesen werden. Ihr relativer Anteil an allen lebenden Zellen stieg im Mittel von 0,34 % in unstimulierten Zellen auf 0,49 % in den IFN- β -stimulierten Zellen an ($p = 0,0035$). Ebenfalls ein deutlicher Anstieg zeigte sich als Trend für mDC (0,51 % vs. 0,65 %), jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen ($p = 0,1553$). Der relative Anteil an B-Zellen war nach Stimulation mit IFN- β geringfügig, aber statistisch signifikant erhöht (7,88 % vs. 8,29 %, $p = 0,0301$). Der Anteil CD4⁺ T-Zellen war in IFN- β -stimulierten PBMC geringfügig, aber signifikant vermindert (42,38 % vs. 41,01 %, $p = 0,0241$) (s. Abbildung 12).

Um zu untersuchen, ob ähnliche Effekte auch unter Therapie mit IFN- β *in vivo* auftreten, wurden PBMC von IFN- β -behandelten ($n = 7$), Glatirameracetat(GA)-behandelten ($n = 7$) sowie unbehandelten ($n = 9$) MS-/KIS-Patienten isoliert und der relative Anteil von pDC und Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt.

Die relative Zellzahl der pDC in der Gruppe unter Therapie mit IFN- β war im Durchschnitt deutlich höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe (0,64 % vs. 0,43 % „unbehandelt“). Dieser Unterschied war jedoch, wenn auch knapp, nicht signifikant: Der ungepaarte *t*-Test, der einseitig durchgeführt wurde da eine höhere Zellzahl in der „IFN- β -Gruppe“ nach den Experimenten *in vitro* erwartet wurde, ergab $p = 0,0714$. Der Anteil von pDC war in der „Glatirameracetat-Gruppe“ mit 0,40 % vergleichbar mit jenem in der unbehandelten Kontrollgruppe (s. Abbildung 13). Auch die mittlere relative Zellzahl der Monozyten war in der mit IFN- β behandelten Gruppe höher als in den anderen beiden Gruppen (27,89 % vs. 20,27 % „unbehandelt“ vs. 21,56 % „Glatirameracetat“), wobei dieser Unterschied vor allem auf zwei sehr hohen Messwerten in der „IFN- β -Gruppe“ beruhte (s. Abbildung 13); er erreichte keine statistische Signifikanz ($p = 0,1468$; ungepaarter, zweiseitiger *t*-Test).

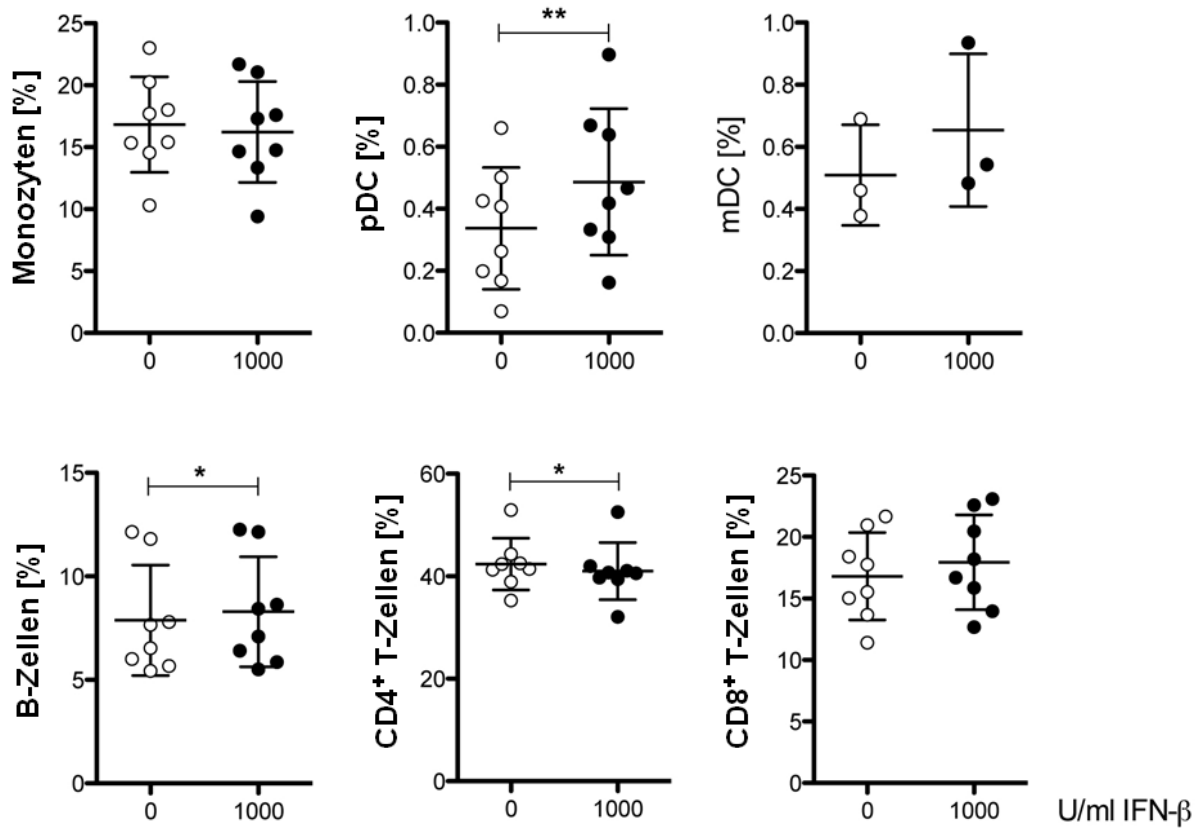


Abbildung 12

IFN-β erhöht die relative Zellzahl von pDC *in vitro*.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert und 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 0 oder 1000 U/ml IFN-β für 16 oder 24 h inkubiert. Die Subpopulationen wurden mit Antikörpern gegen die entsprechenden CD-Moleküle angefärbt und durchflusszytometrisch gemessen: Monozyten (CD14+), plasmazytoide dendritische Zellen (pDC; CD14- CD123+ CD303+), myeloide dendritische Zellen (mDC; CD14- CD1c+ CD11c^{high} CD123^{low}), B-Zellen (CD19+), CD4+ T-Zellen (CD19- CD4+) und CD8+ T-Zellen (CD19- CD8+). Dargestellt ist der relative Anteil der jeweiligen Zellpopulation an allen lebenden Zellen in Prozent. Unterschiede zwischen unbehandelt und 1000 U/ml IFN-β: gepaarter *t*-Test; *:p < 0,05, **:p < 0,01.

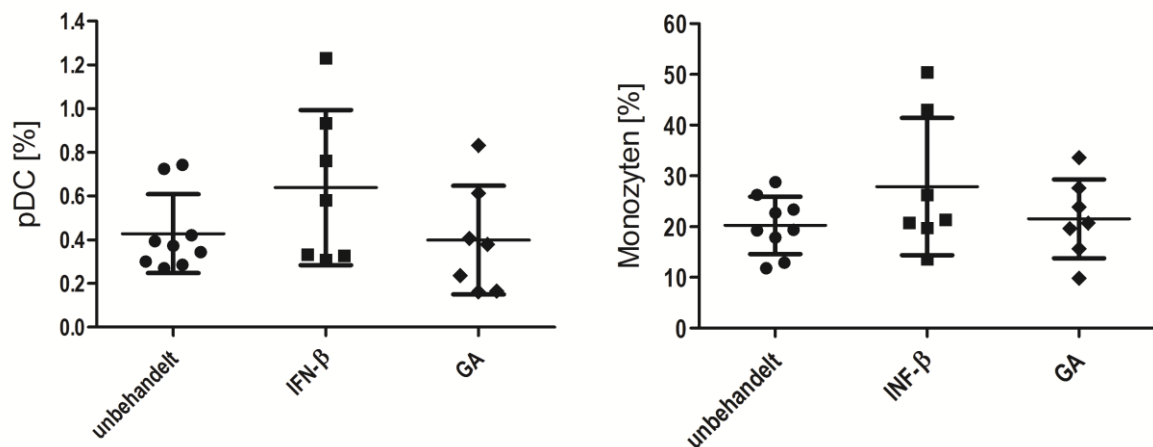


Abbildung 13

Der Einfluss von IFN-β auf die relative Zellzahl von pDC und Monozyten in MS-/KIS-Patienten *in vivo*

(Zu Abbildung 13)

Der relative Anteil plasmazytoider dendritischer Zellen (pDC) und Monozyten wurde durchflusszytometrisch in PBMC von IFN- β -behandelten (n = 7), Glatirameracetat(GA)-behandelten (n = 7) sowie unbehandelten Patienten (n = 9) mit früher RRMS oder KIS bestimmt. Dargestellt ist der relative Anteil der jeweiligen Zellpopulation an allen lebenden PBMC in Prozent. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen „unbehandelt“ und „IFN- β “: ungepaarter *t*-Test; einseitig für pDC ($p = 0,0714$), da höherer pDC-Anteil in „IFN- β -Gruppe“ nach *in vitro* Vorexperimenten erwartet; zweiseitig für Monozyten ($p = 0,1468$).

4.5 IFN- β erhöht die TLR7-abhängige Produktion von IFN- α , TNF- α und weiteren Zytokinen in PBMC

Nachdem eine Regulation der Expression von TLR und MyD88 durch IFN- β sowohl *in vitro* in Zellen gesunder Spender als auch *in vivo* in Zellen von MS Patienten erwiesen war, stellte sich die Frage nach der funktionellen Relevanz. Die Ligation an TLR führt u. a. zur Sekretion von Zytokinen, deren Messung Rückschlüsse auf die Funktionalität der regulierten TLR zulässt. Daher wurde die Zytokinantwort mit IFN- β vorstimulierter sowie unstimulierter PBMC nach TLR-Aktivierung durch verschiedene spezifische TLR-Liganden untersucht. Hierzu wurden PBMC gesunder Spender wie zuvor isoliert und für 12 h mit oder ohne 1000 U/ml IFN- β und anschließend für weitere 6 h mit dem TLR7-Liganden Loxoribine (Lox), dem TLR9-Liganden unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligonukleotide (CpG), dem TLR3-Liganden Polyinosin-Polycytidil-Säure (Poly(I:C)), dem TLR4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS) oder ohne TLR-Ligand inkubiert. Um den Einfluss von IFN- β auf die TLR-abhängige Zytokinantwort zu untersuchen, erfolgte die Messung von 12 Zytokinen in den Zellkulturüberständen der wie oben beschrieben mit IFN- β und TLR-Liganden stimulierten PBMC gesunder Spender (n = 3) mittels Flowcytomix-Assay für IL-23, IL-17A/F, IL-27, IL-1, MIP-1 α , IL-8, IL-6, IFN- α , IP-10, IL-4, IL-1b und TNF- α . Diese Methode erlaubte den quantitativen Nachweis von bis zu 20 Proteinen in kleinen Probenvolumina mit Antikörpern, die an fluoreszierende Beads gekoppelt waren, welche wiederum durchflusszytometrisch gemessen wurden.

Um die Frage zu beantworten, ob die Regulation der Expression eines TLR durch IFN- β einen Effekt auf die Zytokinantwort auf Stimulation des jeweiligen TLR hat, wurden die Ergebnisse folgendermaßen ausgewertet: Der Effekt des TLR-Liganden in IFN- β -stimulierten Zellen (absolute Zytokinmenge nach IFN- β - und TLR-Stimulation abzüglich Zytokinmenge nach Stimulation mit IFN- β ohne TLR-Stimulation) wurde mit demjenigen in unstimulierten Zellen verglichen (Zytokinmenge nach Stimulation ohne IFN- β aber mit TLR-Ligand abzüglich Zytokinmenge nach Stimulation ohne IFN- β und ohne TLR-Ligand) und der Unterschied mit gepaartem *t*-Test auf Signifikanz geprüft.

Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration von IFN- α nach Stimulation IFN- β -

vorstimulierter PBMC mit Loxoribine (2408,97 pg/ml \pm 605,69 pg/ml) gegenüber unstimulierten (48,19 pg/ml \pm 26,27 pg/ml) und nur mit Loxoribine (66,09 pg/ml \pm 31,09 pg/ml) bzw. nur mit IFN- β stimulierter PBMC (49,91 pg/ml \pm 43,33 pg/ml). Die Stimulation mit Loxoribine induzierte demnach in nicht vorstimulierten PBMC eine deutlich niedrigere IFN- α -Sekretion (mittlere Differenz: 66,09 pg/ml - 48,19 pg/ml = 17,9 pg/ml; \pm 51,13 pg/ml Standardabweichung) als in mit IFN- β vorstimulierten Zellen (2408,97 pg/ml - 49,91 pg/ml = 2359,06 pg/ml; \pm 644,14 pg/ml). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0239$). Ein ähnliches Muster zeigte sich auch für TNF- α und MIP-1 α , wenn auch weniger deutlich. Die Doppelstimulation mit IFN- β und Loxoribine führte jeweils zur stärksten Zytokinproduktion (s. Abbildung 14). Die Unterschiede der wie oben beschrieben berechneten Differenzen erreichten jedoch knapp keine statistische Signifikanz (TNF α : $p = 0,0604$; MIP-1 α : $p = 0,1058$).

Auch LPS induzierte in IFN- β -vorstimulierten PBMC eine deutlich höhere IFN- α - und TNF- α -Produktion als in unstimulierten Zellen. Die berechneten Differenzen waren für TNF- α statistisch signifikant ($p = 0,0310$), für IFN- α knapp nicht ($p = 0,0956$). Auch die LPS-abhängige IL-6-Produktion war nach IFN- β -Vorstimulation deutlich erhöht ($p = 0,1546$). Die LPS-induzierte IL-10-Produktion war nach IFN- β -Stimulation hingegen vermindert ($p = 0,0416$). Außerdem verringerte LPS die IFN- β induzierte Produktion von IP-10 ($p = 0,0237$).

CpG induzierte ebenfalls eine stärkere IFN- α -Produktion in den mit IFN- β vorstimulierten als in unstimulierten Zellen ($p = 0,1606$). Auch die CPG-abhängige IP-10-Produktion war nach IFN- β -Vorstimulation deutlich erhöht ($p = 0,0237$).

Auch die Stimulation mit pI:C führte zu einer höheren IP-10-Produktion in IFN- β -vorstimulierten Zellen gegenüber unstimulierten Zellen ($p = 0,0025$).

Als Nebenbeobachtung zeigte sich weiterhin eine TLR-unabhängige Induktion von MIP-1 α , IP-10 und IL-6 sowie eine Suppression von IL-8 durch IFN- β .

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Hochregulation von TLR7 durch IFN- β von funktioneller Bedeutung ist: Die Zytokinantwort bei Stimulation des TLR7 mit seinem Liganden Loxoribine war nach Vorstimulation mit IFN- β verstärkt. Auch die Zytokinantwort auf andere TLR-Liganden zeigte sich durch IFN- β moduliert.

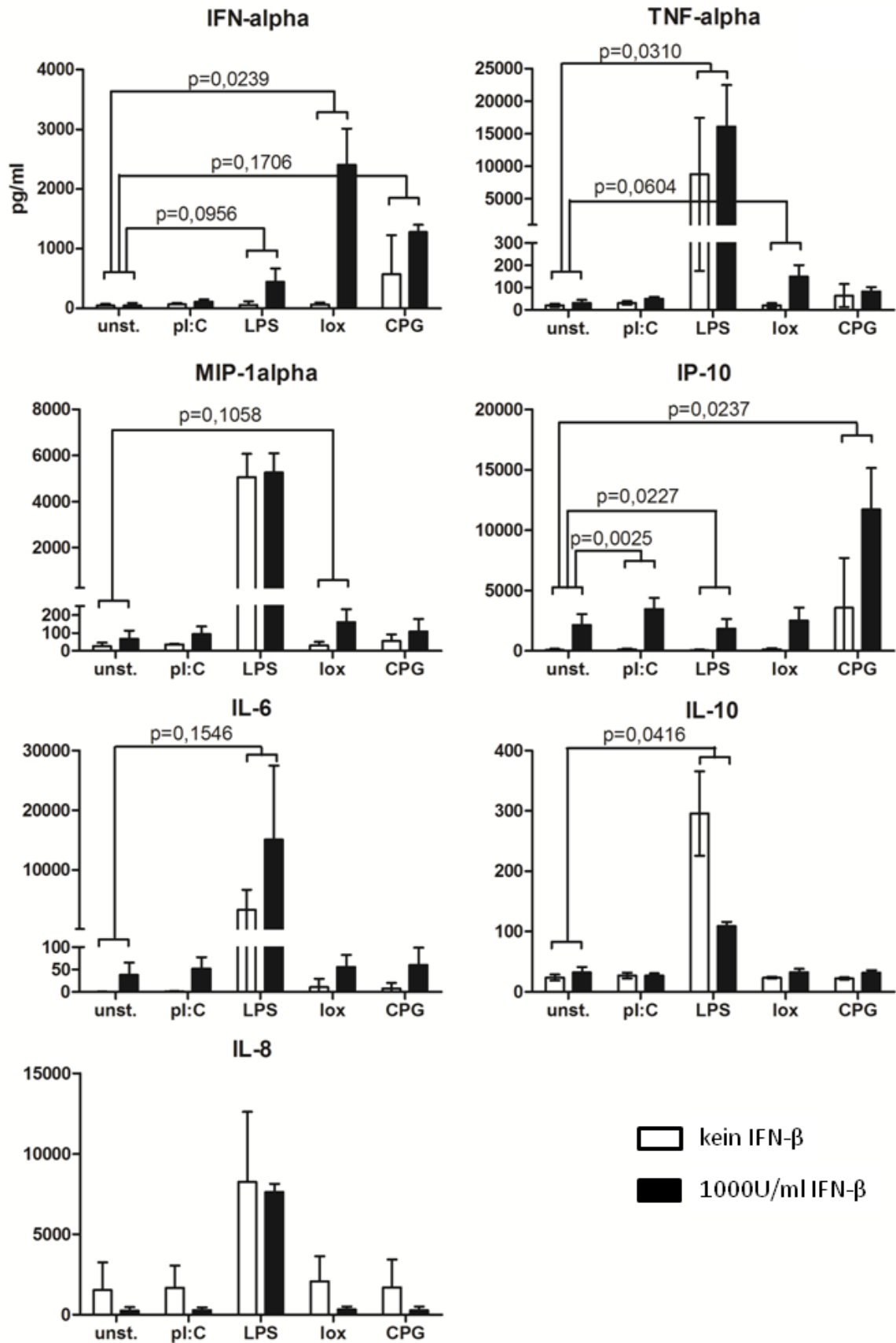


Abbildung 14

IFN-β erhöht die TLR7-abhängige Produktion von IFN-α, TNF-α und MIP-1α, die TLR9-abhängige Produktion von IFN-α sowie IP-10 und supprimiert die LPS-abhängige IL-10-Produktion in PBMC.

(Zu Abbildung 14)

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN- β für 12 h und anschließend für weitere 6 h mit den TLR-Liganden Loxoribine (lox, TLR7), CpG (TLR9), LPS (TLR4) oder Poly(I:C) (TLR3) inkubiert. Als Vergleichskontrollen dienten PBMC, die ohne IFN- β bzw. ohne TLR-Ligand („unst.“) inkubiert wurden. Dargestellt ist die Konzentration des jeweiligen Zytokins in pg/ml gemessen mittels Flowcytomix-Assay im Zellkulturüberstand als MW \pm SD für n = 3. *p*-Werte sind angegeben für statistisch signifikante ($p < 0,05$) und annähernd signifikante Differenzen des Effekts des Liganden in unstimulierten vs. Effekt des Liganden in mit IFN- β vorstimulierten Zellen.

4.5.1 Die Induktion der TLR7-abhängigen Produktion von IFN- α und TNF- α durch IFN- β ist dosis- und zeitabhängig

Nachdem nachgewiesen worden war, dass IFN- β die TLR7-abhängige Produktion von u.a. IFN- α und TNF- α erhöht, sollte dieser Effekt durch eine Zeit- und Dosisreihe weiter charakterisiert werden. Wie zuvor wurden PBMC gesunder Spender (n = 4) mit oder ohne IFN- β über 12 h und anschließend mit dem TLR7-spezifischen Liganden Loxoribine inkubiert. In drei verschiedenen Ansätzen wurde nun entweder die Stimulationszeit mit Loxoribine von 3 bis 72h, die Stimulationsdosis von IFN- β von 0 bis 10000 U/ml oder die Stimulationsdosis von Loxoribine von 0 bis 1,0 mM variiert. Anschließend wurden IFN- α und TNF- α in den Überständen mittels ELISA quantitativ gemessen.

Die TLR7- und IFN- β -induzierte Produktion von IFN- α war von der Stimulationszeit mit Loxoribine und IFN- β abhängig (s. Abbildung 15). Die durch die kombinierte Stimulation erhöhte Produktion betrug nach 3 h durchschnittlich 503,8 pg/ml, nahm über 6, 12 und 24 h auf das annähernd Siebenfache (3478,8 pg/ml) weiter zu und blieb über 48 und 72 h hinweg weitgehend erhalten.

Die durch die Doppelstimulation induzierte Menge IFN- α war außerdem abhängig von der IFN- β - und der Loxoribinedosis. Die IFN- α Konzentration betrug nach Stimulation mit 0,1mM Loxoribine und 10 U/ml IFN- β bereits 175,3 pg/ml, stieg bei Verwendung von 100 U/ml IFN- β auf 527,8 pg/ml an und erreichte ein Maximum von 1066,1 pg/ml IFN- α nach Stimulation mit 1000 U/ml IFN- β . Die Höchstdosis von 10.000 U/ml IFN- β führte zu keiner weiteren Steigerung der IFN- α -Produktion. Die niedrigen Dosen Loxoribine zeigten nach Vorstimulation mit 1000 U/ml IFN- β keinen Effekt. Erst die auch zuvor für die Flowcytomix-Experimente verwendete Dosis von 0,1mM Loxoribine erzielte den erwarteten Effekt der durch IFN- β gesteigerten IFN- α -Antwort auf Loxoribine (1066,1 pg/ml IFN- α), der bei Verwendung von 1,0mM Loxoribine noch deutlich stärker ausfiel (2531,7 pg/ml).

Auch für die TLR7- und IFN- β -abhängige TNF- α -Sekretion zeigte sich eine Abhängigkeit von der Stimulationszeit mit Loxoribine bzw. mit IFN- β (s.o.). Ein Anstieg der Zytokinmenge fand sich bereits nach 3 h, erreichte nach 6 h sein Maximum und fiel dann ab, bis TNF- α nach 48 h

nicht mehr messbar war. Nach 48 und 72 h Stimulationszeit zeigte sich hingegen eine zunehmende Produktion von TNF- α durch die unstimulierten und nur mit Loxoribine stimulierten Zellen, nicht jedoch durch Zellen, die mit IFN- β stimuliert waren. Die Standardabweichung der TNF- α -Konzentration war in diesen späten Messungen jedoch sehr groß. Es wurde bereits beschrieben, dass unstimulierte PBMC in Kultur TNF- α produzieren.⁸⁷⁻⁸⁹ Der zeitliche Verlauf war in diesen Arbeiten jedoch unterschiedlich und die Standardabweichungen ebenfalls sehr hoch, weshalb von einem unspezifischen Effekt ausgegangen werden kann. Es ist auch bekannt, dass IFN- β die durch verschiedene Stimuli induzierte Produktion von TNF- α inhibiert.^{90,91}

Die TNF- α -Menge war in diesem Versuch auch abhängig von der IFN- β -Dosis. Sowohl mit als auch ohne Ko-Stimulation mit 0,1mM Loxoribine führte jede IFN- β -Dosiszunahme zu einer leichten Steigerung der TNF- α -Produktion. Die Zytokinmenge war auch von der Loxoribinedosis abhängig, wobei wiederum die beiden höheren Dosen 0,1mM und 1,0mM zusammen mit 1000 U/ml IFN- β nötig waren und sich zwischen diesen eine Verzwanzigfachung der TNF- α -Menge zeigte (37,0 und 749,4 pg/ml).

Insgesamt ist also die Induktion der TLR7-abhängigen IFN- α - und TNF- α -Produktion durch IFN- β sowohl von der Stimulationszeit als auch von der IFN- β - und Loxoribinedosis abhängig.

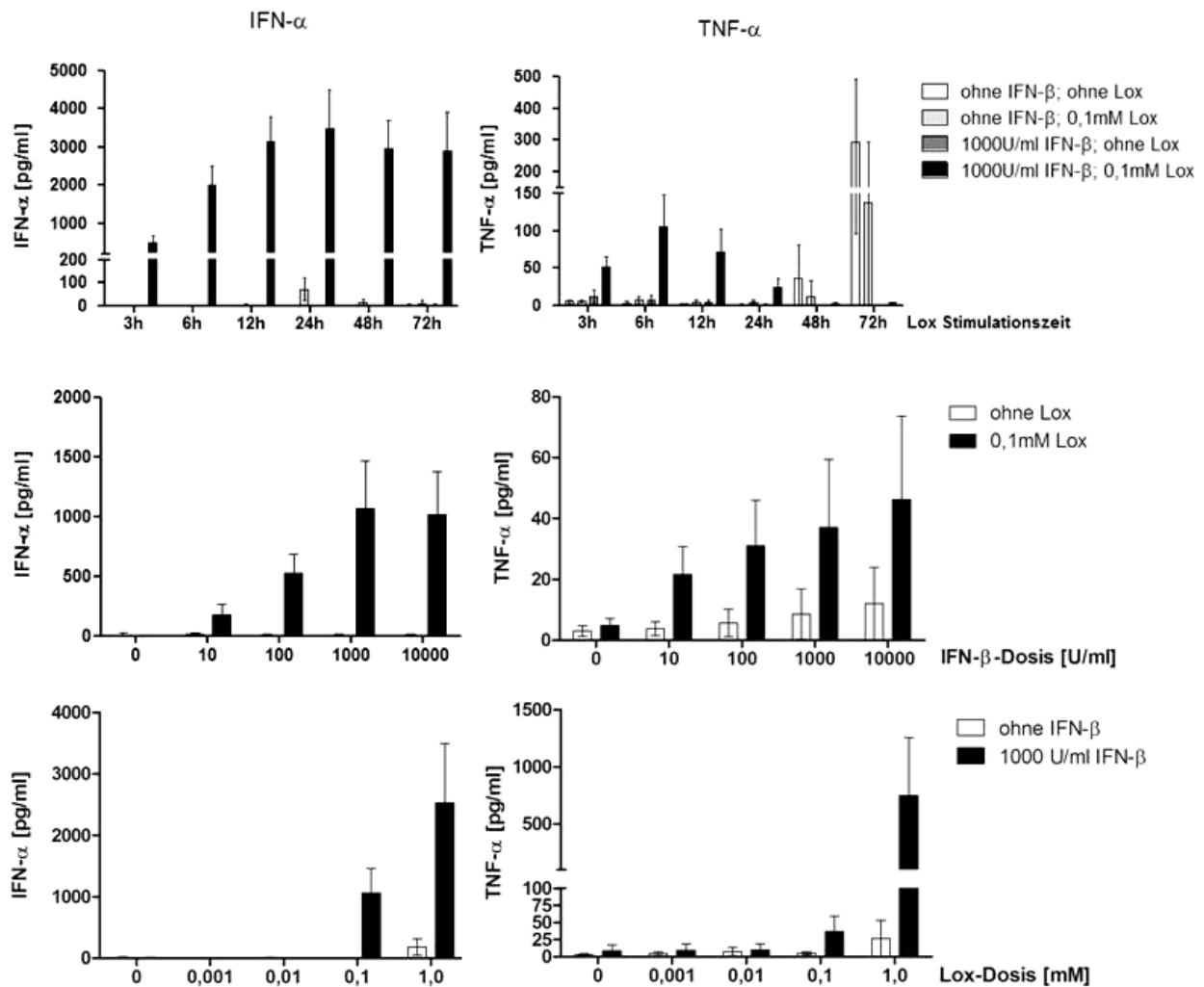


Abbildung 15

Die Induktion der TLR7-abhängigen IFN- α - und TNF α -Produktion durch IFN- β ist dosis- und zeitabhängig.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen mit 0, 10, 100, 1000 oder 10000 U/ml IFN- β für 12 h und anschließend für weitere 12 h (wenn nicht anders angegeben) mit oder ohne den TLR7-spezifischen Liganden Loxoribine (Lox) inkubiert. Dargestellt ist die Konzentration des jeweiligen Zytokins in pg/ml gemessen mittels ELISA im Zellkulturüberstand als MW \pm SD für n = 4 Spender.

4.5.1 Die Induktion der TLR9-abhängigen Produktion von IFN- α und TNF- α durch IFN- β ist dosis- und zeitabhängig

Nachdem die Messungen mittels Flowcytomix-Assay ergeben hatten, dass IFN- β die CpG- bzw. TLR9-abhängige Produktion von IFN- α und TNF- α in PBMC steigert (statistisch nicht signifikant), wurde auch dieser Effekt hinsichtlich einer Zeit- und Dosisabhängigkeit untersucht. Wie zuvor beschrieben wurden PBMC gesunder Spender (n = 4) mit oder ohne IFN- β über 12 h und anschließend mit oder ohne den TLR9-spezifischen Liganden CpG inkubiert. In drei

verschiedenen Ansätzen wurde nun entweder die Stimulationszeit mit CpG von 3 bis 72h, die Stimulationsdosis von IFN- β von 0 bis 10000 U/ml oder die Stimulationsdosis von CpG von 0 bis 10 μ M variiert. Anschließend wurden IFN- α und TNF- α quantitativ mittels ELISA in den Überständen gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Produktion von IFN- α nach Stimulation mit der auch im Flowcytomix-Assay verwendeten Konzentration von CpG von 1,0 μ M. Die IFN- α -Menge war nach der im Flowcytomix-Assay verwendeten Stimulationszeit mit CpG von 6 h hier erstmals messbar und noch relativ gering (249,5 pg/ml \pm 132,2 pg/ml), stieg über 12 und 24 h stark an (1960,0 pg/ml \pm 664,2 pg/ml) und blieb dann über 48 und 72 h relativ konstant. Die nächst niedrigere CpG-Dosis von 0,1 μ M bewirkte über 12 h eine deutlich geringere Produktion von IFN- α (118,1 pg/ml \pm 111,3 pg/ml vs. 521,9 pg/ml \pm 375,9 pg/ml), die nächst höhere Dosis von 10 μ M keine stärkere Produktion dieses Zytokins (397,2 pg/ml \pm 209,6 pg/ml).

Die Vorstimulation mit IFN- β führte zu einer deutlichen Zunahme der durch CpG induzierten IFN- α Produktion. Dieser Unterschied war nach 12 h Stimulation mit CpG am deutlichsten (2293,6 pg/ml \pm 1021,4 pg/ml vs. 1292,8 pg/ml \pm 501,0 pg/ml) und blieb über 24, 48, und 72 h bestehen. Interessanterweise war dieser Unterschied desto größer, je niedriger die zur Vorstimulation verwendete IFN- β -Dosis war. Mit steigender CpG-Dosis nahm der Unterschied durch die Vorstimulation mit IFN- β hingegen zu (s. Abbildung 16).

Bezüglich der CpG-abhängigen Produktion von TNF- α zeigte sich nach 12 h Vorstimulation mit 0 oder 1000 U/ml IFN- β und anschließender Stimulation mit 1,0 μ M CpG über 6 h wie zuvor im Flowcytomix-Assay kein eindeutiger, durch die Vorstimulation bedingter Unterschied. Die CpG-induzierte Produktion von TNF- α erreichte sowohl in den mit IFN- β vorstimulierten Zellen als auch in den nicht vorstimulierten ein Maximum nach 12 h (42,7 pg/ml \pm 22,2 pg/ml bzw. 51,2 pg/ml \pm 19,0 pg/ml) und fiel dann über 24 und 48 h ab. Interessanterweise fiel die Produktion von TNF- α nach Vorstimulation mit IFN- β nach 24 h Stimulationszeit mit CpG deutlich geringer aus als in nicht mit IFN- β vorstimulierten Zellen nach der gleichen Stimulationszeit mit CpG (14,0 pg/ml \pm 8,9 pg/ml vs. 34,9 pg/ml \pm 16,8 pg/ml). Wiederum zeigte sich eine Produktion von TNF- α durch unstimulierte Zellen nach 48 h und 72 h. Dieses Ergebnis wurde bereits im vorigen Abschnitt vor dem Hintergrund anderer Arbeiten diskutiert. Allerdings fand sich in der Literatur keine Erklärung für das Ausbleiben der Produktion von TNF- α in den mit CpG stimulierten Zellen gegenüber unstimulierten oder mit Loxoribine stimulierten Zellen. Es ist jedoch denkbar, dass CpG selbst im Gegensatz zu Loxoribine zu einer starken Produktion von IFN- α führt und dieses, ebenso wie IFN- β , die Produktion von TNF- α durch PBMC hemmt⁹⁰ (s. Abbildung 15 und Abbildung 16). Wie zuvor für IFN- α zeigte sich auch für TNF- α eine Induktion der CpG-abhängigen Produktion bei Verwendung der niedrigsten

IFN- β -Dosis von 10 U/ml für die Vorstimulation ($54,4 \text{ pg/ml} \pm 25,1 \text{ pg/ml}$ vs. $24,6 \text{ pg/ml} \pm 13,3 \text{ pg/ml}$). Wiederum nahm dieser Effekt bei Verwendung der höheren Dosen von IFN- β ab. Die CpG-induzierte Produktion von TNF- α stieg unabhängig von der Vorstimulation mit zunehmender CpG-Dosis an (s. Abbildung 16).

Insgesamt ist also der Einfluss von IFN- β auf die TLR9-abhängige IFN- α - und TNF- α -Produktion sowohl von der Stimulationsdauer als auch von der IFN- β - und Loxoribinedosis abhängig.

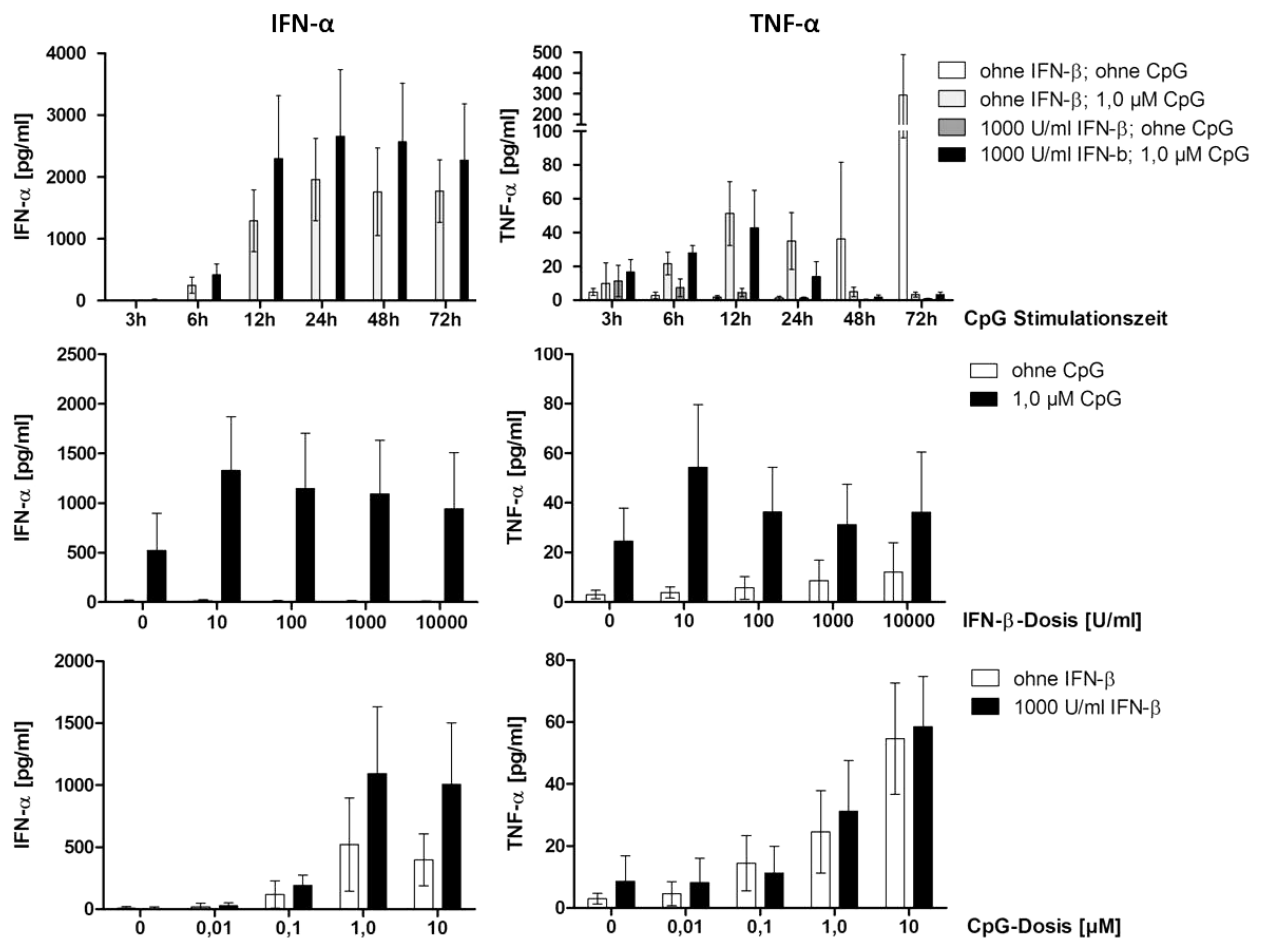


Abbildung 16

Die Induktion der TLR9-abhängigen IFN- α - und TNF α -Produktion durch IFN- β ist dosis- und zeitabhängig.

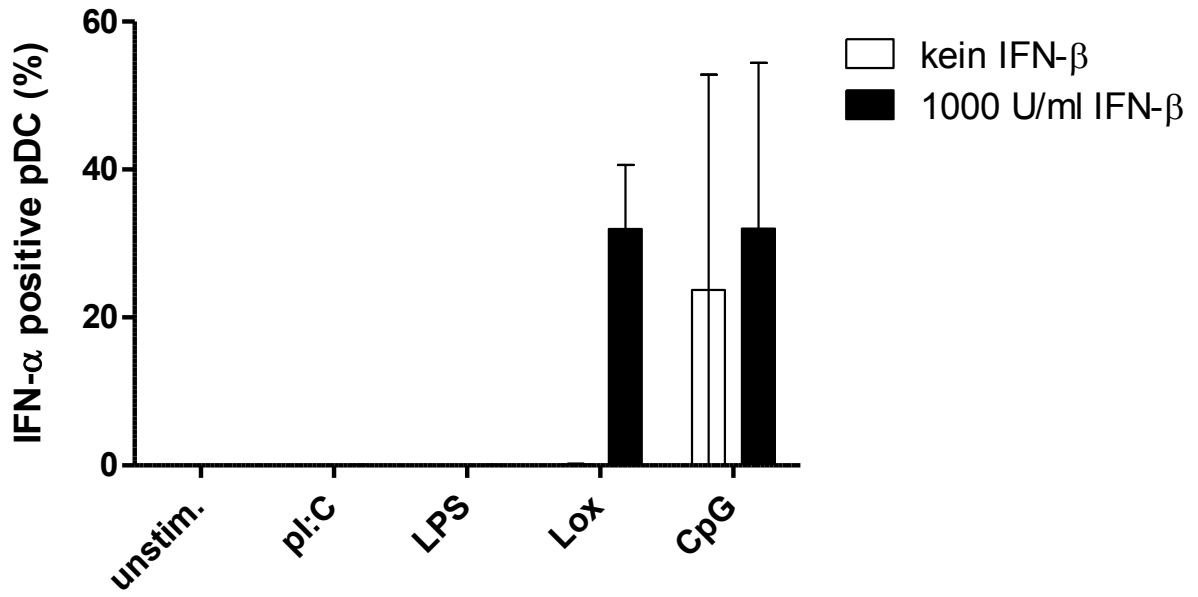
PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen mit 0, 10, 100, 1000 oder 10000 U/ml IFN- β für 12 h und anschließend für weitere 12 h (wenn nicht anders angegeben) mit oder ohne den TLR9-spezifischen Liganden Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Dargestellt ist die Konzentration des jeweiligen Zytokins in pg/ml gemessen mittels ELISA im Zellkulturüberstand als MW \pm SD für n = 4 Spender.

4.5.2 IFN- β erhöht die TLR7- und TLR9-abhängige Produktion von IFN- α in pDC

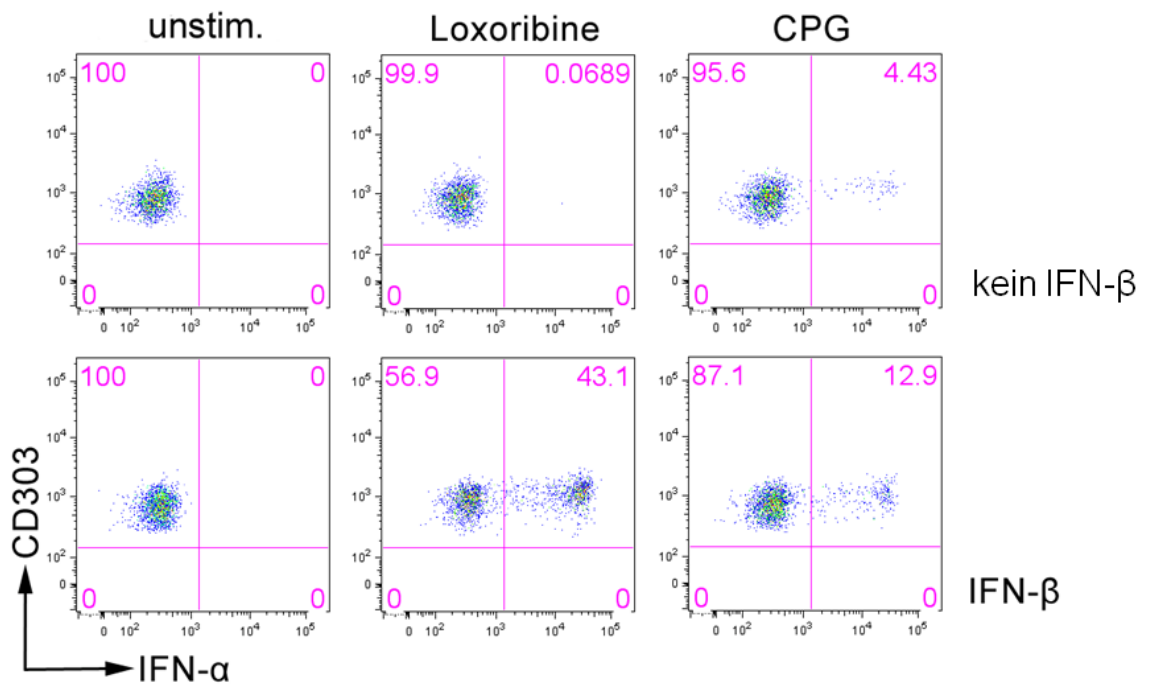
Nachdem die Messungen mittels Flowcytomix-Assay und ELISA gezeigt hatten, dass die Vorstimulation mit IFN- β insbesondere zu einer verstärkten Sekretion von IFN- α nach Stimulation von TLR7 oder TLR9 führte, stellte sich die Frage, ob die selbe Zellpopulation für die Produktion von IFN- α verantwortlich war, in der zuvor eine Hochregulation dieser TLR gezeigt worden war. Da die durchflusszytometrischen Messungen eine Hochregulation von TLR7 und TLR9 in pDC nachgewiesen hatten und beschrieben wurde, dass pDC große Mengen IFN- α produzieren können, wurde nun deren IFN- α -Produktion untersucht. Hierzu wurden PBMC gesunder Spender ($n = 4$) wie zuvor beschrieben isoliert und für 12 h mit oder ohne 1000 U/ml IFN- β und anschließend für weitere 6 h mit 0,1mM des TLR7-Liganden Loxoribine (Lox), 1,0 μ M des TLR9-Liganden CpG, 25 μ g/ml des TLR3-Ligand Poly(I:C), 100ng/ml des TLR4-Ligand LPS oder ohne TLR-Ligand inkubiert. Für die letzten 3 h der Inkubation wurde Brefeldin A hinzugegeben, um die Sekretion des gebildeten IFN- α zu verhindern, damit es intrazellulär messbar bliebe. Anschließend wurde die Zelloberfläche mit Antikörpern gegen charakteristische Oberflächenmoleküle von pDC (CD14- CD123+ CD303+) und Monozyten (CD14+) und intrazellulär mit einem Antikörper gegen IFN- α gefärbt.

Hierbei ergab sich eine stark erhöhte Produktion von IFN- α in pDC nach Vorstimulation mit IFN- β und anschließender Stimulation von TLR7 mit Loxoribine (31,98 % \pm 8,65 % IFN- α -positive Zellen) gegenüber der Einzelstimulation mit Loxoribine (0,11 % \pm 0,13 %) oder IFN- β sowie unstimulierten pDC (jeweils 0,00 % IFN- α positive Zellen; s. Abbildung 17). Außerdem zeigte sich eine IFN- α -Produktion nach Stimulation von TLR9 mit CpG, die bei drei von vier Spendern höher war, wenn die pDC zuvor mit IFN- β vorstimuliert worden waren (32,00 % \pm 22,40 % IFN- α positive Zellen gegenüber 23,74 % \pm 29,10 %). Die Produktion von IFN- α war jeweils ausschließlich in pDC und in keinen anderen Zellen messbar (s. Abbildung 17C). Die Stimulation mit IFN- β , dem TLR4-spezifischen Liganden LPS bzw. dem TLR3-spezifischen Liganden Poly(I:C) führte weder einzeln noch in Kombination zu einer Produktion von IFN- α . Somit konnte anhand der Produktion von IFN- α eine funktionelle Bedeutung der zuvor beobachteten Hochregulation von TLR7 und TLR9 durch IFN- β in pDC nachgewiesen werden.

A



B



(Abbildung 17, s. nächste Seite)

C

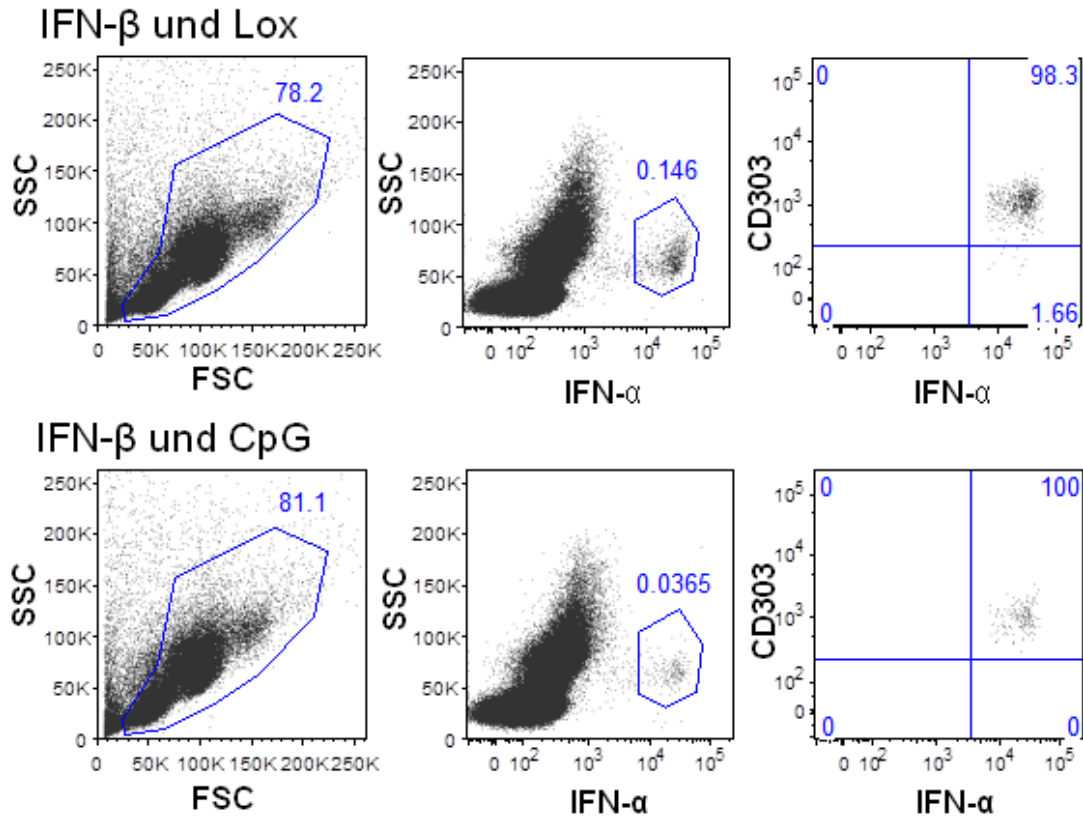


Abbildung 17

IFN- β erhöht die Produktion von IFN- α nach Stimulation von TLR7 und TLR9 in pDC.

PBMC gesunder Spender wurden isoliert, 2×10^6 /ml Zellen je Well mit 1000 U/ml IFN- β oder unbehandelt (kein IFN- β) für 12 h und anschließend für weitere 6 h mit oder ohne (unstim.) die TLR-Liganden Loxoribine (lox, TLR7), CpG (TLR9), LPS (TLR4) oder Poly(I:C) (TLR3) inkubiert, geerntet, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist der relative Anteil IFN- α positiver pDC an allen pDC. (A) Mittelwert \pm Standardabweichung von $n = 4$ gesunden Spendern, Ansätze mit und ohne Vorbehandlung mit IFN- β jeweils nebeneinander. (B) Durchflusszytometrie-Plots eines repräsentativen Spenders und (C) Gatingstrategie, die zeigt, dass alle lebenden Zellen, die IFN- α produzieren, CD303 positiv sind und daher als pDC identifiziert wurden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Hauptergebnisse im Kontext der Literatur

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass rekombinantes IFN- β -1b, der Wirkstoff des MS-Therapeutikums Betaferon[®], das angeborene Immunsystem moduliert, indem es die Expression verschiedener TLR und des TLR-Adapterproteins MyD88 differentiell reguliert. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse im Kontext der relevanten Literatur diskutiert.

Als erstes galt es, die Frage zu beantworten, ob IFN- β das TLR-System auf mRNA-Ebene reguliert. Hierzu wurde in einem Screeningansatz die mRNA-Expression von TLR1-10 und MyD88 mittels qPCR gemessen. Dabei zeigte sich eine Hochregulation von TLR3-, TLR7- und MyD88- sowie eine Herunterregulation von TLR9- und TLR6- und von TLR10-mRNA durch Stimulation mit IFN- β in PBMC gesunder Spender *in vitro*, wobei das Ergebnis für TLR10 knapp nicht statistisch signifikant war. Für diese Regulationen durch Stimulation mit IFN- β wurden sowohl eine Dosis-, als auch eine Zeitabhängigkeit nachgewiesen. TLR1-, TLR2-, TLR4- und TLR8-mRNA wurden durch Stimulation mit IFN- β nicht reguliert. TLR5-mRNA wurde in PBMC nicht detektiert.

Es gab keine früheren Arbeiten zur Regulation aller beim Menschen bekannten TLR1-10 durch IFN- β in PBMC, mit denen die hier vorgestellten Ergebnisse hätten verglichen werden können. Eine Reanalyse von Microarray-Daten der Arbeitsgruppe um Zettl, mit der die Ergebnisse dieser Arbeit in Kooperation veröffentlicht wurden,⁹² bestätigte jedoch die hier vorliegenden Ergebnisse zur TLR-Regulation durch IFN- β auf mRNA-Ebene auch in MS-Patienten *in vivo*. Die Gruppe untersuchte die Expression von ca. 17.000 Genen in PBMC von MS-Patienten (n=25) vor und einen Monat nach Therapiebeginn mit IFN- β -1b mittels Affymetrix-Microarrays. Die Details zu Methoden und Patienten sind andernorts veröffentlicht.⁹³ TLR3-, TLR7- und MyD88-mRNA waren sowohl in der hier vorliegenden Arbeit in der qPCR als auch im Microarray signifikant hochreguliert. Zettls Gruppe fand TLR9- und TLR10-mRNA in Antwort auf die IFN- β -Therapie ebenfalls herunterreguliert, wobei die Expressionsänderung von TLR10-mRNA in der hier vorliegenden Arbeit nicht statistisch signifikant war. TLR6-mRNA wurde in der vorliegenden Arbeit durch Stimulation mit IFN- β herunterreguliert. Die Microarray-Daten zeigten hingegen keine Regulation von TLR6-mRNA durch die Therapie mit IFN- β . Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich durch die kleine Fallzahl von n = 3 in der hier vorliegenden Arbeit bedingt. Die Daten der Gruppe um Zettl zeigen bei etwa der Hälfte der Patienten eine Hochregulation von TLR6-mRNA und bei der anderen Hälfte eine Herunterregulation. Für

TLR1-, TLR2-, TLR4-, TLR5- und TLR8-mRNA wurde auch in den Microarray-Daten keine Regulation durch IFN- β nachgewiesen. Insgesamt bestätigen Zettls Daten die hier vorliegenden Ergebnisse der TLR-Regulation durch IFN- β auf mRNA-Ebene (s. Abbildung 18, Seite 93).

Miettinen *et al.* zeigten mittels Northern-Blot, dass IFN- α die mRNA von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR7 in Makrophagen induziert und TLR5-mRNA herunterreguliert.⁹⁴ Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit ist nicht möglich, da hier RNA aus PBMC und nicht aus reifen Makrophagen untersucht wurde. TLR5-mRNA war in der hier vorliegenden Arbeit in PBMC nicht messbar. Da TLR5-mRNA in PBMC mittels qPCR zuvor nachgewiesen wurde,⁸⁴ und die Messung unabhängig von der den Versuch durchführenden Person bei sämtlichen unabhängigen Versuchsdurchgängen hier kein spezifisches Signal ergab, während alle parallel verwendeten Primer für die anderen TLR des gleichen Herstellers spezifische Amplifikationen ermöglichten, kann entweder von einem Versagen des TLR5-Primers, im Sinne einer ausbleibenden Anlagerung, oder einer TLR5-mRNA-Expression unterhalb der Nachweisgrenze des Assays ausgegangen werden. Da die Microarray-Daten jedoch keine Regulation der TLR5-mRNA durch Therapie mit IFN- β gezeigt hatten, wurde auf weitere qPCR-Messungen mit anderen TLR5-Primern verzichtet.

Nachdem nachgewiesen worden war, dass IFN- β die TLR- und MyD88-Expression auf der mRNA-Ebene differentiell reguliert, sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Regulationen auch zu Änderungen der Expression von TLR- und MyD88-Protein führen. Hierzu folgten Untersuchungen der am stärksten regulierten TLR und MyD88 auf Proteinebene. In der durchflusszytometrischen Messung verschiedener PBMC-Subpopulationen gesunder Spender fand sich auch eine Hochregulation von TLR7- und MyD88- sowie marginal von TLR9-Protein nach Stimulation mit IFN- β *in vitro*. Diese Regulationen wurden jeweils in pDC nachgewiesen. In den Subpopulationen B-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen, Monozyten und mDC zeigte sich keine Regulation dieser Proteine. Für TLR3-Protein wurde in keiner dieser Zellpopulationen eine Regulation gesehen. Die zuvor nachgewiesene Hochregulation von TLR7- und MyD88-mRNA durch IFN- β führte demnach auch zu einer stärkeren Expression des jeweiligen Proteins.

In früheren Studien wurde eine Induktion der TLR7-Expression durch endogene Typ-I-Interferone (IFN- α und IFN- β) sowie IFN- β -1a, den Wirkstoff der MS-Medikamente Avonex[®] (Biogen-Idec) und Rebif[®] (Merck-Serono), nachgewiesen.^{65,95,96} Da bisher keine eindeutigen Unterschiede in der klinischen Wirksamkeit der verschiedenen β -Interferone beschrieben wurden und in der Literatur einheitliche Wirkmechanismen angenommen werden⁹⁷, ist der Befund der vorliegenden Arbeit, dass auch IFN- β -1b, der Wirkstoff von Betaferon[®] (Bayer), TLR7 hochreguliert, plausibel. Andererseits wurden auch Unterschiede zwischen den verschiedenen

Präparaten nachgewiesen: So führte in einer Studie mit 22 MS-Patienten die Therapie mit IFN- β -1b zu einer geringeren Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ durch isolierte PBMC, während IFN- β -1a eine stärkere Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 bewirkte.⁹⁸ Die Verwendung verschiedener IFN- β -Präparate in den Arbeiten sollte demnach auch bei der Interpretation und dem Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Zwei frühere Arbeiten wiesen die Regulation von TLR7 neben der mRNA-Ebene auch auf Proteinebene nach, wobei sie jeweils anderen Zellen zugeschrieben wurden, nämlich B-Zellen einerseits⁶⁵ und aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen (*monocyte derived dendritic cells*, mdDC) andererseits⁹⁵. Die Hochregulation von TLR7 durch IFN- β in B-Zellen war in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachvollziehbar, was an unterschiedlichen Stimulationszeiten und Bedingungen liegen könnte. mdDC, die von Zhang *et al.* verwendet wurden, sind *in vitro* unter Zugabe Kolonie-stimulierender-Faktoren und proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten ausdifferenzierte Zellen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden hingegen nur *in vivo* vorkommende Zellpopulationen untersucht, wie z.B. pDC. Die Arbeit von Zhang *et al.* zeigte auch eine Hochregulation von MyD88 in mdDC durch IFN- β -1a.

Beide Arbeitsgruppen zeigten durch weitere Versuche Konsequenzen der TLR7-Hochregulation auf: Bekeredjian-Ding *et al.* beschrieben unter Verwendung von pDC, den Hauptproduzenten von körpereigenem Typ-I-IFN, einen physiologischen Prozess, bei dem aktivierte pDC über die Sekretion von Typ-I-IFN TLR7 in B-Zellen induzieren und diese für die virale Abwehr sensibilisieren. Die Stimulation mit einem TLR7-spezifischen Liganden führte in der Folge zur polyklonalen Expansion dieser B-Zellen und zur Differenzierung zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen.⁶⁵ Zhang *et al.* wiesen nach, dass die Induktion von TLR7 in mdDC durch IFN- β -1a zur verminderten Freisetzung Th17-polarisierender Zytokine durch diese Zellen führt.⁹⁵ Th17-Zellen wird bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zugesprochen.⁹⁹ Sie sind die zellulären Hauptakteure des MS-Mausmodells experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE): Sie wandern in das ZNS ein und schütten dort die inflammatorischen Zytokine IL-17, IL-6 und TNF- α aus.¹⁰⁰ Auch bei MS-Patienten wird eine Beteiligung von Th17-Zellen an der Pathophysiologie der MS diskutiert.¹⁰¹ So wurden diese Zellen in aktiven, nicht aber in inaktiven MS-Läsionen nachgewiesen¹⁰², und die Expansion dieser Zellpopulation konnte in einer klinischen Studie mit der Krankheitsaktivität korreliert werden¹⁰³. Zhang *et al.* interpretierten die Regulation von TLR7 als Teil eines möglichen Wirkmechanismus von IFN- β bei MS.¹⁰⁴ Auch in der genannten klinischen Studie und einer weiteren *ex vivo* Arbeit mit MS-Patientenmaterial wurde gezeigt, dass IFN- β die Differenzierung

von Th17-Zellen inhibiert.^{103,105}

In der hier vorliegenden Arbeit ergaben sich keine direkten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der IFN- β -abhängigen TLR-Regulation und einer Supprimierung von Th17-Zellen. So waren die Ergebnisse der Zytokinmessungen von IL-17, IL-23 und IL-27 wegen zu großer Standardabweichungen und interindividuell teilweise gegenläufiger Regulationen durch IFN- β nicht eindeutig (Daten nicht gezeigt). IL-17 wird von Th17-Zellen produziert, IL-23 induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu Th17-Zellen¹⁰⁰ und IL-27 inhibiert die Differenzierung zu Th17-Zellen¹⁰⁶. Da die Messung der Zytokine in der hier vorliegenden Arbeit lediglich zu einem Zeitpunkt (18 h) nach Stimulation erfolgte und die Fallzahl mit $n = 3$ klein war, ist eine Regulation dieser Zytokine durch IFN- β jedoch nicht generell auszuschließen. Zhang *et al.* haben Expressionsunterschiede dieser Zytokine nach 24 h Stimulation mit IFN- β -1b gezeigt und, wie weiter oben diskutiert, als Bestandteil des Wirkmechanismus von IFN- β bei Patienten mit MS interpretiert.⁹⁵ Auch Sweeney *et al.* haben gezeigt, dass die Stimulation mit IFN- β über 24 h die Produktion von IL-23 durch mit dem TLR2-spezifischen Liganden Zymosan aktivierte dendritische Zellen (DC) hemmt und die Produktion von IL-10 steigert. Erst durch Verwendung dieser Überstände für die Stimulation von T-Zellen für fünf weitere Tage war eine Reduktion der IL-17-Produktion durch IFN- β nachweisbar. Ebenfalls nach 24 h *in vitro* Stimulation von DC mit IFN- β wurde eine gesteigerte Produktion von IL-27 gemessen. Sweeney *et al.* wiesen desweiteren nach, dass IFN- β die Expression von IL-27-mRNA in PBMC erfolgreich mit IFN- β therapierter MS-Patienten signifikant stärker induziert als in PBMC von IFN- β -Therapieversagern.¹⁰⁷

Eine weitere Arbeit, die die Hochregulation von TLR7 durch IFN- β als möglichen Wirkmechanismus bei MS beschreibt, erschien kurz vor Publikation der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit. Dort wurde gezeigt, dass die Reifung von B-Zellen und Produktion von Antikörpern nach Stimulation von TLR7 in unbehandelten MS-Patienten gegenüber gesunden Spendern vermindert ist, aber durch Therapie mit IFN- β -1b bereits nach einem Monat annähernd wieder hergestellt wird. Damit Einhergehend war TLR7-mRNA in PBMC und insbesondere auch in isolierten Monozyten unbehandelter MS-Patienten schwächer exprimiert als in Zellen gesunder Spender. Nach einem Monat Therapie mit IFN- β -1b war die Expression von TLR7-mRNA wieder mindestens so stark wie in Zellen gesunder Spender. Die Expression von TLR7-Protein wurde nicht gemessen. Die Wirkung von IFN- β auf die TLR7-vermittelte B-Zellaktivität war in weiteren Experimenten von Monozyten abhängig.⁶⁷ In der hier vorliegenden Arbeit war keine durch IFN- β vermittelte Hochregulation von TLR7-Protein in Monozyten messbar, weder *in vitro* noch *in vivo*. Auf mRNA-Ebene wurden keine PBMC-Subpopulationen untersucht. Zu

etwaigen Expressionsunterschieden von TLR7 in MS-Patienten in Relation zu gesunden Kontrollen konnte hier keine Aussage getroffen werden, da die Versuchsbedingungen nicht identisch waren. Die isolierten Zellen der MS-/KIS-Patienten wurden bei -80 °C aufgehoben, während die Zellen gesunder Spender direkt nach der Blutentnahme isoliert und verwendet wurden.

Während in der vorliegenden Arbeit auf der mRNA-Ebene eine deutliche Herunterregulation von TLR9 durch IFN- β in PBMC gesunder Spender messbar war, zeigte sich auf Proteinebene eine geringe, aber statistisch signifikante Hochregulation von TLR9 in pDC. Wie bereits im Ergebnisteil erörtert, war die Spezifität des Antikörpers gegen TLR9-Protein jedoch nicht abschließend gesichert. Der verwendete und vom Hersteller validierte TLR9-Antikörper ergab ein sehr starkes Signal in mDC, die nach u.a. Jarrossay *et al.* und Krug *et al.* kein TLR9 exprimieren^{85,86}. Bei vertiefter Recherche fanden sich lediglich zwei Arbeiten, die eine Expression von TLR9 in humanen mDC diskutieren. Hoene *et al.* zeigten, dass *in vitro* zu mdDC differenzierte humane Monozyten, ein weit verbreitetes Modell für mDC, funktionellen TLR9 exprimieren.¹⁰⁸ Hellman *et al.* beschrieben, dass humane mDC durch den TLR9-spezifischen Liganden CpG aktiviert werden. Da die verwendeten mDC jedoch in Ko-Kultur mit pDC stimuliert wurden, ist ein indirekter, durch pDC vermittelter Effekt des CpG auf die mDC nicht auszuschließen.¹⁰⁹ Interessanterweise exprimieren murine mDC TLR9.¹¹⁰ Um die Spezifität des in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten TLR9-Antikörpers zu überprüfen, wurde er an transfizierten HEK293-Zellen getestet. Der Antikörper zeigte eine deutlich stärkere Färbung in TLR9-transfizierten gegenüber mit Leerplasmid transfizierten HEK293-Zellen, was auf eine spezifische Bindung an TLR9 hinweist (s. Abbildung 9, Seite 50). Es ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen, dass der Antikörper in mDC (und letztlich auch in den anderen Subpopulationen) ein weiteres Antigen bindet und ein nicht-TLR9-spezifisches Signal liefert.

Die gemessenen Hochregulation von TLR9-Protein in pDC wird durch das Ergebnis gestützt, dass die TLR9-vermittelte Ausschüttung des Zytokins IP-10 (Interferon-gamma-induziertes-Protein-10) durch IFN- β -vorstimulierte PBMC gegenüber nicht vorstimulierten Zellen deutlich erhöht war. IP-10 wird unter anderem durch aktivierte pDC gebildet.¹¹¹ Die Hochregulation von TLR9-Protein in pDC wird auch durch die erhöhte TLR9-abhängige Produktion von IFN- α nach Vorstimulation mit IFN- β sowohl in PBMC als auch in pDC bestätigt. Hirotani *et al.* beschrieben, dass die Sekretion von IFN- α aus pDC in MS-Patienten nach Aktivierung von TLR9 im Vergleich zu gesunden Spendern herabgesetzt ist. Dies ging mit einer Veränderung der Zytokinantwort von PBMC einher. Unter anderem folgte eine erhöhte Produktion von IL-17, hinweisend auf eine Expansion von Th17-Zellen. Dieser Unterschied zwischen Gesunden und

MS-Patienten wurde durch Vorbehandlung der PBMC mit IFN- α und IFN- β *in vitro* aufgehoben.¹¹² Auch Meyers *et al.* zeigten, dass eine TLR9/CpG-abhängige Produktion von IFN- α die IL-17-Produktion inhibiert¹¹³ und auch für die Aktivierung von TLR7 wurde eine Inhibition von Th17-Zellen über IFN- α und IL-10 beschrieben¹¹⁴. Auch diese Ergebnisse sprechen für einen Wirkmechanismus von IFN- β über die Regulation von TLR und eine folgende Inhibierung von Th17-Zellen, und die hier vorliegenden Daten einer durch IFN- β erhöhten TLR7- bzw. TLR9-abhängigen IFN- α -Produktion stützen diese Hypothese.

Nachdem nachgewiesen worden war, dass IFN- β TLR7-, TLR9- und MyD88-Protein in pDC *in vitro* hochreguliert, sollte die Frage beantwortet werden, ob solche Regulationen auch unter Therapie mit IFN- β *in vivo* auftreten. Hierzu erfolgten durchflusszytometrische Messungen von PBMC verschieden therapiert MS-Patienten. Dabei wurde eine Hochregulation von TLR7- und MyD88-Protein in pDC auch *in vivo* bei MS-/KIS-Patienten unter IFN- β -Therapie im Vergleich mit unbehandelten MS-/KIS-Patienten nachgewiesen. Bei mit Glatirameracetat therapierten MS-/KIS-Patienten zeigte sich hingegen keine veränderte Expression von TLR7 oder MyD88.

In allen oben zitierten Arbeiten, die eine TLR7-Hochregulation durch IFN- β gezeigt haben, wurden entweder Zellen von MS-Patienten *ex vivo* oder Zellen gesunder Spender *in vitro* mit IFN- β stimuliert sowie teilweise *in vitro* ausdifferenzierte mdDC verwendet.^{65,95,96} In der hier vorliegenden Arbeit wurde damit erstmalig die Hochregulation von TLR7-Protein auch *in vivo* in MS-/KIS-Patienten unter IFN- β -Therapie gezeigt und diese Regulation den physiologisch im Blut vorkommenden pDC zugeschrieben.

Ein wichtiger methodischer Unterschied der vorliegenden Arbeit verglichen mit anderen Arbeiten, die eine Hochregulation von TLR7 durch IFN- β gezeigt haben, war die Verwendung von PBMC als Mischkultur statt aufgetrennter Zellpopulationen. Die Verwendung von Mischkulturen bot den Vorteil, dass interzelluläre Wechselwirkungen erhalten blieben. Dies war von besonderer Bedeutung, da das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der IFN- β Wirkung *in vivo* war. Andererseits hätten aufgetrennte Zellpopulationen eine genauere Quantifizierung des Proteins ermöglicht, als es durch Detektion einer so kleinen Subpopulation wie pDC mittels Durchflusszytometrie möglich war.

Schließlich sollte in dieser Arbeit die Frage nach funktionellen Konsequenzen der Regulation des TLR-Systems durch IFN- β beantwortet werden. Hierzu wurde die Wirkung von IFN- β auf die TLR-abhängige Zytokinproduktion in PBMC mittels ELISA und Flowcytomix-Assay und in pDC mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Produktion einzelner Zytokine fand sich für alle in diesen Experimenten untersuchten TLR, 3, 4, 7 und 9, durch IFN- β moduliert. Wie zuvor auf mRNA-Ebene, war die Wirkung von IFN- β auf das TLR-System also auch hier eindeutig

festzustellen und gleichzeitig differenziert, da die Sekretion einiger Zytokine induziert und die anderer gehemmt wurde. Zum Beispiel wurde die TLR4- bzw. LPS-abhängige Sekretion von IL6 durch Vorstimulation mit IFN- β gesteigert, während gleichzeitig die TLR4-abhängige Produktion von IL10 vermindert wurde. Dies und die Tatsache, dass TLR4-mRNA nicht durch IFN- β reguliert war, weisen darauf hin, dass IFN- β nicht nur die TLR-Expression reguliert, sondern die Funktion der TLR über verschiedene Mechanismen moduliert. Diese Modulationen könnten zum Beispiel Bestandteile der TLR-induzierten Signalkaskade betreffen. So wurde hier eine Regulation der Expression des TLR-Adaptermoleküls MyD88 durch IFN- β sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt. Die Induktion von MyD88 könnte auch teilweise für die durch IFN- β gesteigerte Sekretion von IFN- α nach Stimulation von TLR4, TLR7 und TLR9 verantwortlich sein, da alle drei Rezeptoren dieses Adaptermolekül in ihrer Signalkaskade rekrutieren. TLR3 rekrutiert hingegen TRIF und nicht MyD88, und IFN- β induzierte keine verstärkte TLR3-abhängige Sekretion von IFN- α . Da die TLR7-abhängige Produktion auch von anderen Zytokinen, nämlich TNF- α sowie MIP-1 α , und von IFN- α besonders stark durch IFN- β induziert wurde, kann dies über den Effekt der MyD88-Hochregulation hinaus auch als Folge der durch IFN- β vermittelten Hochregulation von TLR7 gewertet werden. Die Vorstimulation der Zellen mit IFN- β führte zu einer verstärkten IFN- α -, TNF- α - sowie MIP-1 α -Antwort auf TLR7-Aktivierung durch den Liganden Loxoribine. Die Ausschüttung von IFN- α und TNF- α ist ein beschriebener Endpunkt der TLR7-induzierten Signalkaskade. Diese führt über zwei Wege einerseits zur Aktivierung von NF- κ B und zur Transkription inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel TNF- α , und andererseits zur Aktivierung von IRF-7 und zur Produktion von Typ-I-Interferonen, IFN- α und IFN- β (s. Abbildung 1, Seite 17).⁶⁹ Mittels Durchflusszytometrie wurden wiederum pDC, in denen zuvor die Hochregulation von TLR7-Protein durch IFN- β nachgewiesen worden war, als die IFN- α -produzierenden Zellen identifiziert. pDC stellen nur eine sehr kleine Zellpopulation im Blut dar, sind jedoch die Hauptproduzenten der körpereigenen Typ-I-Interferone α und β , unter anderem als Antwort auf eine Ligation an TLR7 und TLR9. Sie sind damit die primären zellulären Akteure der angeborenen antiviralen Immunabwehr und stellen als antigenpräsentierende Zellen eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem her. Sie werden im Knochenmark gebildet und ins Blut abgegeben, von wo sie in lymphatisches Gewebe einwandern. Außerdem werden sie in Bereiche lokaler Entzündung rekrutiert und dort aktiviert.⁴¹ Auch im Liquor unbehandelter MS-Patienten im Schub und in MS-Läsionen wurden erhöhte Zellzahlen von pDC nachgewiesen.^{28,115} Ein natürlicher Ligand von TLR7 ist einzelsträngige RNA von Viren,¹¹⁶ und die auf die Ligation folgende Ausschüttung von IFN- α und TNF- α ist Teil der angeborenen antiviralen Immunabwehr. So wurde beschrieben, dass die Vorbehandlung von

Lungenepithelzellen mit IFN- α oder TNF- α zur Hochregulation von TLR3, MyD88, TRIF, IRF7 und Retinoinsäure-induzierbarem-Protein-I (*retinoic acid-inducible gene/protein I*, RIG-I) führt, die an der Erkennung der RNA von Viren und der folgenden Signalkaskade beteiligt sind. Es folgt eine verstärkte Produktion antiviraler Zytokine nach Infektion dieser Epithelzellen mit Influenza-A-Virus.¹¹⁷ In einer anderen Arbeit verlängerte intraperitoneal injiziertes TNF- α das Überleben von Mäusen nach Infektion mit Herpes-simplex-Virus vom Typ 1.¹¹⁸ Typ-I-Interferone, IFN- α und - β , wirken regulatorisch auf die Expression vieler hundert Gene, deren Effekt in der Summe vereinfacht als antiviraler Status beschrieben wird. Indessen ist die genaue antivirale Funktion nur weniger dieser Gene bekannt.¹¹⁹ Als erstmals Interferone zur Behandlung der MS verwendet wurden, beruhte die Rationale auf der Annahme einer viralen Genese der Krankheit.⁴³ Als alleinige Ursache gilt dies heute zwar als unwahrscheinlich, aber viele Daten sprechen weiterhin für einen engen Zusammenhang der Erkrankung mit viralen Infektionen, und die aktuelle Annahme einer multifaktoriellen Ätiologie schließt virale Infekte ein. Es wurde beschrieben, dass MS-Schübe vermehrt in zeitlicher Nähe zu viralen Infektionen auftreten, zum Beispiel mit Influenza-A-Viren.^{4,15,16} Da TLR7 die einzelsträngige RNA von Influenza-A-Viren erkennt,¹¹⁶ erlauben die hier vorliegenden Ergebnisse die Hypothese, dass die Hochregulation von TLR7 und seinem Adaptermolekül MyD88 in pDC durch IFN- β und die in der Folge verstärkte IFN- α -Produktion durch diese Zellen als ein Wirkmechanismus des Medikaments zur Reduzierung der Schubrate bei MS beiträgt.

Diese Hypothese einer durch IFN- β gestärkten antiviralen Immunität wird durch einen weiteren Befund der vorliegenden Arbeit gestützt: Die Stimulation von PBMC mit IFN- β *in vitro* induzierte eine Zunahme des relativen Anteils von pDC an diesen Zellen. Auch in PBMC mit IFN- β behandelte MS-/KIS-Patienten war die relative Zellzahl der pDC im Durchschnitt erhöht verglichen mit PBMC unbehandelte oder mit Glatirameracetat behandelte Patienten (0,64 % „IFN- β “ vs. 0,43 % „unbehandelt“, $p = 0,0714$). Es wurde beschrieben, dass pDC im Blut von Patienten mit schwerer chronisch progressiver MS verringert sind im Vergleich mit Patienten mit schubförmiger MS und gesunden Kontrollen. Auch MS-Patienten, die einen bestimmten hinsichtlich MS protektiven Gen-Polymorphismus nicht haben, zeigten eine niedrigere pDC-Zahl.¹²⁰ In anderen Arbeiten wurden keine Änderungen der Zellzahl der pDC durch die Therapie mit IFN- β nachgewiesen, aber Änderungen des Phänotyps und der Funktion der pDC, was als Teil des Wirkmechanismus von IFN- β diskutiert wurde.¹²¹

Ein weiterer interessanter Aspekt der hier gezeigten durch IFN- β veränderten Zytokinantwort ist die Rolle von TNF- α bei MS. TNF- α wirkt proinflammatorisch, wurde in aktiven MS-Läsionen und in MS-Liquores gemessen und verschlechterte nach intraperitonealer Applikation den

Krankheitsverlauf von EAE in Ratten. Aus diesem Wissen heraus wurden in den 90er Jahren Anti-TNF- α -Therapeutika gegen MS entwickelt. In der klinischen Erprobung zeigte sich jedoch vielmehr eine Verschlechterung unter dem Medikament mit früheren und schwereren Schüben der behandelten MS-Patienten gegenüber Placebo.¹²² Unter den heute bei Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis oder Psoriasis zugelassenen Anti-TNF- α -Therapeutika können als seltene Nebenwirkung Demyelinisierungen im ZNS auftreten. Es ist ein Fall einer MS-Erkrankung nach Therapiebeginn mit dem Anti-TNF- α -Therapeutikum Etanercept beschrieben worden.¹²³ Diese Medikamente sind deshalb bei MS kontraindiziert. Kürzlich wurde ein MS-assoziiertes Polymorphismus im TNF- α -Rezeptorgen TNFRSF1A beschrieben, der zur Expression einer neuen, löslichen Form des Rezeptors führt, der wiederum TNF- α bindet und dessen Wirkung inhibiert. Dieser Polymorphismus und seine Assoziation mit MS sprechen für einen möglichen protektiven Effekt von TNF- α bei MS.¹²⁴ Dieser könnte auf den antiapoptischen und neuroprotektiven Eigenschaften von TNF- α beruhen.^{125,126} Besonders interessant ist hierbei auch der folgende Gegensatz: TNF- α -Blocker sind bei Rheumatoider Arthritis therapeutisch wirksam, aber schaden bei MS. Und umgekehrt ist IFN- β , das in dieser Arbeit insbesondere die TLR7-abhängige Produktion von TNF- α in PBMC erhöhte, nur bei MS wirksam, nicht aber bei Rheumatoider Arthritis.¹²⁵ In einer kleinen klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass unbehandelte MS-Patienten niedrigere TNF- α -Serumspiegel haben als gesunde Kontrollen und sich der Spiegel unter IFN- β Therapie wieder erhöht.¹²⁷ Das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit, dass IFN- β eine Hochregulation von TLR7 mit nachfolgend gesteigerter TNF- α Produktion induziert, könnte hierbei einen möglichen Mechanismus darstellen.

MIP-1 α (engl.: *macrophage inflammatory protein 1 α* ; bzw. CCL3), dessen TLR7-abhängige Sekretion in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls nach Vorstimulation mit IFN- β verstärkt war, ist ein proinflammatorisches Zytokin, das essentiell für Chemotaxis und Wundheilung ist. Es wurde beschrieben, dass es das Th1/2-Zell-Verhältnis in Richtung Th1-Zellen verschiebt und damit EAE begünstigt.¹²⁸ Dieser Zusammenhang erscheint weniger eindeutig, seitdem gezeigt wurde, dass nicht Th1-, sondern Th17-Zellen für die Induktion von EAE in Mäusen essentiell sind.¹⁰⁰ Außerdem scheint MIP-1 α eine wichtige antivirale Funktion zum Beispiel bei der Unterdrückung der Replikation des HI-Virus durch CD8-T-Zellen innezuhaben¹²⁹ und ist essentiell für die gegen Influenza-Viren gerichtete Entzündungsreaktion in Mäusen¹³⁰.

Um die Hypothese, dass IFN- β seine Wirkung bei MS u.a. durch Stärkung der TLR7-vermittelten antiviralen Immunität entfaltet, zu untermauern, wären weitere Versuche sinnvoll. In einem *in vitro* Modell viraler Infektionen von PBMC in Zellkulturen könnte untersucht werden, ob IFN- β die antivirale Immunantwort TLR7-vermittelt stärkt, das Überleben der Zellen

beeinflusst und z.B. den Virus-Titer im Überstand verringert. Um desweiteren zu untersuchen, ob diese gestärkte Immunität einen protektiven Effekt gegenüber MS bewirkt, könnte eventuell das Theiler-Virus-Mausmodell der MS verwendet werden. In diesem Modell führt die Infektion bestimmter Mauslinien mit dem Theiler-Enzephalomyelitis-Virus zu einem MS-ähnlichen Krankheitsbild. Es wurde gezeigt, dass das Virus durch TLR3 und TLR7 erkannt wird.¹³¹ Die Rolle von IFN- β in diesem Modell ist jedoch nicht ganz eindeutig. Einerseits zeigen Mäuse, denen der IFN- α/β -Rezeptor fehlt, einen drastisch verschlechterten Krankheitsverlauf,¹³² andererseits verbessert die Behandlung mit murinem IFN- β zwar kurzfristig die Remyelinisierung, verstärkt aber bei längerer Gabe die Demyelinisierung¹³³. Die Aussagekraft solcher Versuche ist generell begrenzt, da die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen und den verschiedenen Mausmodellen häufig nicht auf die humane MS übertragbar sind. Durch den Autor dieser Arbeit wurden bereits Versuche begonnen, die eine gesteigerte Produktion von IFN- α und TNF- α als Folge der Hochregulation von TLR7 durch IFN- β auch in MS-Patienten unter IFN- β -Therapie *in vivo* nachweisen sollen. Hierzu werden wiederum PBMC unbehandelter und mit IFN- β behandelter MS-Patienten isoliert, in Zellkultur mit dem TLR-7-Liganden Loxoribine stimuliert und anschließend Zytokinmessungen mittels ELISA oder Multiplexing in den Überständen durchgeführt.

Der Einfluss des etablierten MS-Medikaments IFN- β auf das TLR-System und insbesondere auf TLR7 ist auch deshalb relevant, weil sich hieraus neue Therapieansätze ergeben könnten. So gibt es zum Beispiel Arbeiten, die die Wirksamkeit einer Therapie mit einem TLR7-spezifischen Liganden bei EAE, dem Mausmodell der MS, gezeigt haben.^{134,135} Dabei wird jedoch von einer Desensibilisierung durch repetitive Stimulation mit nachfolgend geringerer Antwort beziehungsweise geringerer Aktivierung von dendritischen Zellen ausgegangen. Hier wären Experimente mit einer Ko-Medikation mit IFN- β interessant, das in dieser Arbeit eine verstärkte TLR7-Antwort induzierte.

Neben ihrer wichtigen Rolle in der Erkennung von Pathogenen wurde in neueren Arbeiten gezeigt, dass TLR auch körpereigene Strukturen erkennen, und es wird angenommen, dass dies Ursache von Autoimmunerkrankungen sein kann.¹³⁶ Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TLR7 die endogene microRNA let-7 erkennt und dies in Neuronen zu Zelltod führt.⁷⁴ Bisher konnte ein solcher Mechanismus bei MS nicht nachgewiesen werden. Aber sollten TLR die Autoimmunität bei MS vermitteln, indem sie endogene Liganden binden, wäre ein Einfluss von IFN- β auf diese Prozesse nach den hier vorliegenden Ergebnissen naheliegend.

Abseits von solchen Überlegungen zur Pathogenese der MS, zu Wirkmechanismen von IFN- β und potentiellen neuen Wirkstoffen ist die Regulation der TLR durch IFN- β auch deshalb

relevant, weil die regulierten TLR mögliche Kandidaten für prädiktive Biomarker für die IFN- β -Therapie darstellen. Die Entdeckung und Etablierung eines Biomarkers, der das Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β verlässlich vorherzusagen vermag, wäre von großem Nutzen. Die Forschungsbemühungen in dieser Richtung sind seit 20 Jahren sehr stark, aber bisher ohne hinreichenden Erfolg.^{59,60} Da nach den MS-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Stand 2008) „der therapeutische Nutzen der immunmodulatorischen Therapie (kann) klinisch im Allgemeinen frühestens nach ca. 12 Monaten abgeschätzt werden“¹³⁷ kann, würde die Verwendung eines Biomarkers im Falle eines notwendigen Therapiewechsels eine große Zeitersparnis bedeuten. Der Gewinn auf Seiten des Patienten liegt auf der Hand: verkürzte Leidensdauer, Verhinderung von möglichen frühen bleibenden Schäden und Schmerzen sowie ein Rückgewinn von Sicherheit.

Bei einer so häufigen und chronischen Krankheit wie der MS muss vor dem Hintergrund eines stark ausgelasteten Gesundheitssystems auch der Kostenfaktor berücksichtigt werden. Die Schubprophylaxe ist mit über 1000 Euro Monatsbehandlungskosten pro Patient ohnehin sehr teuer.⁹⁷ Die Folgekosten einer unwirksamen Therapie dürften durch vermehrte Arztbesuche, Krankenhausaufenthalte und die Eskalationstherapie ein Vielfaches erreichen. Gerade wenn eine frühe wirksame Therapie das Risiko einer späteren schweren Behinderung, die mit Pflegebedürftigkeit und längeren Krankenhausaufenthalten verbunden ist, senkt, dürfte der wirtschaftliche Aspekt nicht zu vernachlässigen sein. Andererseits bietet die Suche nach Biomarkern Einsichten in den Wirkmechanismus von IFN- β bei MS *in vivo*, der weitgehend unbekannt bleibt⁶⁰. Wie oben diskutiert, könnte die Hochregulation von TLR7 ein essentieller Bestandteil des Wirkmechanismus von IFN- β sein,^{95,103-105} was wiederum die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Regulation des Rezeptors mit dem Anklingen der Therapie korreliert und damit als prädiktiver Biomarker dienen könnte. Leider konnte in der vorliegenden Arbeit keine Aussage über die Expressionsänderung von TLR7 bei einzelnen Patienten vor und nach Therapiebeginn getroffen werden, da von zu wenigen Patienten Proben beider Zeitpunkte verfügbar waren. Dies wäre für eine Korrelation der Regulation von TLR7 mit dem Ansprechen auf die Therapie mit IFN- β notwendig. In Zukunft wird dies möglich sein, wenn Patienten, die unbehandelt eingeschlossen wurden, eine Therapie mit IFN- β beginnen und der Beobachtungszeitraum lang genug wird, um Aussagen zum klinischen Verlauf treffen zu können.

5.2 Schlussfolgerungen

Am Anfang dieser Arbeit stand die Frage nach einem Einfluss des MS-Therapeutikums IFN- β auf das angeborene Immunsystem, als dessen Bestandteil hier alle bekannten humanen TLR1-10 untersucht wurden. Mit verschiedenen Methoden wurden differenzierte regulatorische Effekte von IFN- β auf die Expression mehrerer TLR und des TLR-Adapterproteins MyD88 in PBMC sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene *in vitro* nachgewiesen. Durch Zytokinmessungen wurden funktionelle Konsequenzen dieser Regulationen beschrieben.

Es zeigte sich u.a. eine Hochregulation von TLR7- und MyD88-mRNA sowie -Protein durch IFN- β in pDC, die mit einer veränderten Zytokinantwort einherging, nämlich einer gesteigerten TLR7-abhängigen Produktion von IFN- α und TNF- α . Diese Regulationen durch IFN- β spiegelten sich auch in einer erhöhten Expression von TLR7- und MyD88-Protein in pDC mit IFN- β therapierter MS-Patienten gegenüber unbehandelten oder mit Glatirameracetat behandelten Patienten wider. Die Hochregulation von TLR7 in pDC des peripheren Bluts durch IFN- β *in vivo* wurde hier erstmals nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine IFN- β -induzierte Erhöhung der TLR7- und TLR9-abhängigen IFN- α -Produktion durch pDC nachgewiesen. Wie weiter oben ausführlich diskutiert, legen die Ergebnisse mehrerer älterer Arbeiten einen Wirkmechanismus von IFN- β bei MS über TLR7/9-Hochregulation und eine in der Folge veränderte Zytokinproduktion von u.a. IFN- α , IL23 sowie IL27, die autoreaktive Th17-Zellen supprimiert, nahe.^{95,112-114}

TLR7 und die ebenfalls durch IFN- β regulierten TLR3 und TLR9 befinden sich in Membranen intrazellulärer Vesikel, vor allem Endolysosomen, und erkennen virale einzel- (TLR7) und doppelsträngige (TLR3) RNA und virale oder bakterielle DNA (TLR9) im Rahmen der frühen antiviralen Abwehr.⁶⁴ Es ist deshalb naheliegend, dass deren Regulation Teil des komplexen durch IFN- β induzierten antiviralen Programms ist. pDC sind die Hauptproduzenten der körpereigenen Typ-I-Interferone α und β , unter anderem als Antwort auf eine Ligation an TLR7 und TLR9. Sie sind damit die primären zellulären Akteure der angeborenen antiviralen Immunabwehr und stellen als antigenpräsentierende Zellen eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem her.⁴¹ Die relative Zellzahl der pDC wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch Stimulation mit IFN- β *in vitro* signifikant erhöht und war auch in den mit IFN- β -behandelten Patienten mit deutlicher Tendenz höher als in unbehandelten Patienten.

Die ursprüngliche Überlegung hinter der Anwendung des antiviral wirkenden IFN- β in der MS-Therapie beruhte auf der Annahme einer viralen Genese der Krankheit.⁴³ Es wird angenommen, dass zum Beispiel Influenzainfektionen MS-Schübe auslösen können.^{4,15,16} Da TLR7 die einzelsträngige RNA von Influenza-A-Viren erkennt,¹¹⁶ führten die hier vorliegenden Ergebnisse

zur Formulierung der Hypothese, dass die Hochregulation von TLR7 und seinem Adaptermolekül MyD88 in pDC durch IFN- β als ein Wirkmechanismus des Medikaments zur Reduzierung der Schubrate bei MS beiträgt. Auch die hier gezeigte durch IFN- β erhöhte IFN- α - bzw. TNF- α -Produktion in pDC bzw. PBMC nach Ligation an TLR7 spricht für einen stärkenden Effekt von IFN- β auf die angeborene antivirale Immunabwehr.

6 Literaturverzeichnis

1. DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS. 2012. (Accessed 21.10.2012, 2012, at http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/LL_MS_Neu/DGN-KKNMS_MS-LL_20120809_frei_neu4.pdf.)
2. Marta M, Meier UC, Lobell A. Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmun Rev* 2009;8:506-9.
3. Farrell RA, Giovannoni G. Current and future role of interferon beta in the therapy of multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:715-26.
4. Oikonen M, Laaksonen M, Aalto V, et al. Temporal relationship between environmental influenza A and Epstein-Barr viral infections and high multiple sclerosis relapse occurrence. *Mult Scler* 2011;17:672-80.
5. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-85.
6. Kurtzke JF. Geography in multiple sclerosis. *J Neurol* 1977;215:1-26.
7. Kurland LT, Reed D. Geographic and Climatic Aspects of Multiple Sclerosis; a Review of Current Hypotheses. *American journal of public health and the nation's health* 1964;54:588-97.
8. Banwell B, Bar-Or A, Arnold DL, et al. Clinical, environmental, and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination: a prospective national cohort study. *Lancet neurology* 2011;10:436-45.
9. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 2010;133:1869-88.
10. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62:60-5.
11. Soilu-Hanninen M, Aivo J, Lindstrom BM, et al. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon beta-1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:565-71.
12. Kampman MT, Steffensen LH, Mellgren SI, Jorgensen L. Effect of vitamin D3 supplementation on relapses, disease progression, and measures of function in persons with multiple sclerosis: exploratory outcomes from a double-blind randomised controlled trial. *Mult Scler* 2012;18:1144-51.
13. Marie P. Sclérose en plaques et maladies infectieuses: A. Delahaye et E. Lecrosnier; 1884.
14. Santiago O, Gutierrez J, Sorlozano A, de Dios Luna J, Villegas E, Fernandez O. Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2010;29:857-66.
15. Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985;1:1313-5.
16. Rutschmann OT, McCrory DC, Matchar DB. Immunization and MS: a summary of published evidence and recommendations. *Neurology* 2002;59:1837-43.
17. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 1995;377:150-1.
18. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE, Jr. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology* 1979;29:1228-35.
19. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993;33:281-5.
20. Jersild C, Fog T, Hansen GS, Thomsen M, Svejgaard A, Dupont B. Histocompatibility

- determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* 1973;2:1221-5.
21. Bertrams HJ, Kuwert EK. Association of histocompatibility haplotype HLA-A3-B7 with multiple sclerosis. *J Immunol* 1976;117:1906-12.
 22. Compston DA, Batchelor JR, McDonald WI. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *Lancet* 1976;2:1261-5.
 23. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-9.
 24. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, et al. A CHIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome research* 2010;20:1352-60.
 25. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS genetics* 2009;5:e1000369.
 26. Ramagopalan SV, Dyment DA, Cader MZ, et al. Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:881-6.
 27. Mumenthaler M, Mattle H. Demyelinisierende Erkrankungen. In: *Neurologie*. 12. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008:401-23.
 28. Lande R, Gafa V, Serafini B, et al. Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:388-401.
 29. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001;50:389-400.
 30. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002;125:2202-12.
 31. Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;47:391-5.
 32. Aktas O, Kieseier B, Hartung HP. Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2010;33:140-52.
 33. Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 2003;206:165-71.
 34. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 1998;121 (Pt 8):1469-77.
 35. Rocca MA, Mezzapesa DM, Falini A, et al. Evidence for axonal pathology and adaptive cortical reorganization in patients at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *NeuroImage* 2003;18:847-55.
 36. Reddy H, Narayanan S, Arnoutelis R, et al. Evidence for adaptive functional changes in the cerebral cortex with axonal injury from multiple sclerosis. *Brain* 2000;123 (Pt 11):2314-20.
 37. von Eichborn J, Dunkel M, Gohlke BO, et al. SynSysNet: integration of experimental data on synaptic protein-protein interactions with drug-target relations. *Nucleic acids research* 2012.
 38. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 1989;112 (Pt 1):133-46.
 39. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
 40. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-67.

41. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Seminars in immunology* 2005;17:253-61.
42. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987;1:893-5.
43. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993;43:655-61.
44. Rudick RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis. *Experimental cell research* 2011;317:1301-11.
45. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39:285-94.
46. Shirani A, Zhao Y, Karim ME, et al. Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2012;308:247-56.
47. Goodin DS, Reder AT, Ebers GC, et al. Survival in MS: a randomized cohort study 21 years after the start of the pivotal IFNbeta-1b trial. *Neurology* 2012;78:1315-22.
48. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:898-904.
49. Kappos L, Weinshenker B, Pozzilli C, et al. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials. *Neurology* 2004;63:1779-87.
50. Leary SM, Miller DH, Stevenson VL, Brex PA, Chard DT, Thompson AJ. Interferon beta-1a in primary progressive MS: an exploratory, randomized, controlled trial. *Neurology* 2003;60:44-51.
51. Montalban X, Sastre-Garriga J, Tintore M, et al. A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon beta-1b on primary progressive and transitional multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15:1195-205.
52. Noseworthy JH, Wolinsky JS, Lublin FD, et al. Linomide in relapsing and secondary progressive MS: part I: trial design and clinical results. North American Linomide Investigators. *Neurology* 2000;54:1726-33.
53. Jagust WJ, Noseworthy JH. Brain atrophy as a surrogate marker in MS: faster, simpler, better? *Neurology* 2000;54:782-3.
54. Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 1999;46:878-86.
55. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 1998;51:682-9.
56. Sharief MK, Semra YK, Seidi OA, Zoukos Y. Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;120:199-207.
57. Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 2002;59:802-8.
58. Leppert D, Waubant E, Burk MR, Oksenberg JR, Hauser SL. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;40:846-52.
59. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74 Suppl 1:S17-24.
60. Croze E. Differential gene expression and translational approaches to identify biomarkers of interferon beta activity in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:743-9.

61. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2003;362:1184-91.
62. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985;42:779-89.
63. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
64. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
65. Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* 2005;174:4043-50.
66. Alter G, Suscovich TJ, Teigen N, et al. Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J Immunol* 2007;178:7658-66.
67. Giacomini E, Severa M, Rizzo F, et al. IFN-beta therapy modulates B-cell and monocyte crosstalk via TLR7 in multiple sclerosis patients. *European journal of immunology* 2013;43:1963-72.
68. Balashov KE, Aung LL, Vaknin-Dembinsky A, Dhib-Jalbut S, Weiner HL. Interferon-beta inhibits toll-like receptor 9 processing in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;68:899-906.
69. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 2002;218:74-86.
70. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006;25:373-81.
71. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005;115:2223-33.
72. Papadimitraki ED, Bertias GK, Boumpas DT. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun* 2007;29:310-8.
73. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* 2008;28:2320-31.
74. Lehmann SM, Kruger C, Park B, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nature neuroscience* 2012;15:827-35.
75. Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, et al. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Experimental neurology* 2008;213:114-21.
76. Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:506-18.
77. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1013-21.
78. Jiang D, Liang J, Fan J, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature medicine* 2005;11:1173-9.
79. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006;116:456-64.
80. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840-6.
81. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973;52:456-67.
82. Luthman H, Magnusson G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic acids research* 1983;11:1295-308.

83. Julie Logan KJE, Nick A. Saunders. Real-time PCR: Current Technology and Applications: Horizon Scientific Press; 2009.
84. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002;168:4531-7.
85. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 2001;31:3388-93.
86. Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European journal of immunology* 2001;31:3026-37.
87. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1998;5:78-81.
88. Jansky L, Reymanova P, Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2003;52:593-8.
89. De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992;4:239-48.
90. Abu-Khabar KS, Armstrong JA, Ho M. Type I interferons (IFN-alpha and -beta) suppress cytotoxin (tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin) production by mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell. *Journal of leukocyte biology* 1992;52:165-72.
91. Jungo F, Dayer JM, Modoux C, Hyka N, Burger D. IFN-beta inhibits the ability of T lymphocytes to induce TNF-alpha and IL-1beta production in monocytes upon direct cell-cell contact. *Cytokine* 2001;14:272-82.
92. Derkow K, Bauer JM, Hecker M, et al. Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-Like Receptor (TLR) Expression by Interferon-beta Includes Upregulation of TLR7 in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PloS one* 2013;8:e70626.
93. Goertsches RH, Hecker M, Koczan D, et al. Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN-beta-1b treatment in relapsing remitting MS. *Pharmacogenomics* 2010;11:147-61.
94. Miettinen M, Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* 2001;2:349-55.
95. Zhang X, Jin J, Tang Y, Speer D, Sujkowska D, Markovic-Plese S. IFN-beta1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *J Immunol* 2009;182:3928-36.
96. Severa M, Remoli ME, Giacomini E, et al. Sensitization to TLR7 agonist in IFN-beta-preactivated dendritic cells. *J Immunol* 2007;178:6208-16.
97. Hacke W. Multiple Sklerose und andere immunvermittelte Enzephalopathien. In: *Neurologie*. 13 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010:502-17.
98. Segal S, Wraber B, Mesec A, Horvat A, Ihan A. IFN-beta1a and IFN-beta1b have different patterns of influence on cytokines. *Clin Neurol Neurosurg* 2004;106:255-8.
99. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218-22.
100. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-40.
101. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the New Player of Neuroinflammatory Process in Multiple Sclerosis. *Scand J Immunol*.
102. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous

- system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172:146-55.
103. Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 2009;65:499-509.
 104. Zhang X, Markovic-Plese S. Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2010;112:641-5.
 105. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 2009;183:5418-27.
 106. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937-45.
 107. Sweeney CM, Lonergan R, Basdeo SA, et al. IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain, behavior, and immunity* 2011;25:1170-81.
 108. Hoene V, Peiser M, Wanner R. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *Journal of leukocyte biology* 2006;80:1328-36.
 109. Hellman P, Eriksson H. Early activation markers of human peripheral dendritic cells. *Human immunology* 2007;68:324-33.
 110. Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 2003;197:101-9.
 111. Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2002;169:6673-6.
 112. Hirotani M, Niino M, Fukazawa T, et al. Decreased interferon-alpha production in response to CpG DNA dysregulates cytokine responses in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012;143:145-51.
 113. Meyers JA, Mangini AJ, Nagai T, et al. Blockade of TLR9 agonist-induced type I interferons promotes inflammatory cytokine IFN-gamma and IL-17 secretion by activated human PBMC. *Cytokine* 2006;35:235-46.
 114. Vultaggio A, Nencini F, Pratesi S, et al. The TLR7 ligand 9-benzyl-2-butoxy-8-hydroxy adenine inhibits IL-17 response by eliciting IL-10 and IL-10-inducing cytokines. *J Immunol* 2011;186:4707-15.
 115. Longhini AL, von Glehn F, Brandao CO, et al. Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *Journal of neuroinflammation* 2011;8:2.
 116. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5598-603.
 117. Matikainen S, Siren J, Tissari J, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *J Virol* 2006;80:3515-22.
 118. Rossol-Voth R, Rossol S, Schutt KH, Corridori S, de Cian W, Falke D. In vivo protective effect of tumour necrosis factor alpha against experimental infection with herpes simplex virus type 1. *The Journal of general virology* 1991;72 (Pt 1):143-7.
 119. Le Page C, Genin P, Baines MG, Hiscott J. Interferon activation and innate immunity. *Reviews in immunogenetics* 2000;2:374-86.
 120. Hellings N, Thewissen K, Nuyts AH, et al. Circulating dendritic cells of multiple

- sclerosis patients are dysregulated and their frequency is correlated with MS-associated genetic risk factors. In: Accessed via <http://hdl.handle.net/1942/14300> on 06092014; IMMUNOLOGY, 137 (Supplement 1), p 470-470; 2012;p. 470-.
121. Schwab N, Zozulya AL, Kieseier BC, Toyka KV, Wiendl H. An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol* 2010;184:5368-74.
 122. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1999;53:457-65.
 123. Sicotte NL, Voskuhl RR. Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy. *Neurology* 2001;57:1885-8.
 124. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature* 2012;488:508-11.
 125. Steinman L. Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. *J Clin Invest* 2008;118:3557-63.
 126. Turrin NP, Rivest S. Tumor necrosis factor alpha but not interleukin 1 beta mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *J Neurosci* 2006;26:143-51.
 127. Sellner J, Greeve I, Findling O, et al. Effect of interferon-beta and atorvastatin on Th1/Th2 cytokines in multiple sclerosis. *Neurochemistry international* 2008;53:17-21.
 128. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1882-6.
 129. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-5.
 130. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, et al. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995;269:1583-5.
 131. Hause L, Al-Salleeh FM, Petro TM. Expression of IL-27 p28 by Theiler's virus-infected macrophages depends on TLR3 and TLR7 activation of JNK-MAP-kinases. *Antiviral research* 2007;76:159-67.
 132. Fiette L, Aubert C, Muller U, et al. Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors. *J Exp Med* 1995;181:2069-76.
 133. Njenga MK, Coenen MJ, DeCuir N, Yeh HY, Rodriguez M. Short-term treatment with interferon-alpha/beta promotes remyelination, whereas long-term treatment aggravates demyelination in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2000;59:661-70.
 134. Hayashi T, Gray CS, Chan M, et al. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2764-9.
 135. Hayashi T, Yao S, Crain B, et al. Treatment of autoimmune inflammation by a TLR7 ligand regulating the innate immune system. *PloS one* 2012;7:e45860.
 136. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
 137. Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose 2008. Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2008. (Accessed March 17, 2011, at <http://www.dgn.org/pressemitteilungen/ms-antik%C3%B6rper-therapie/437.html>.)

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jakob Moritz Johannes Bauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Interferon- β moduliert die Expression von Toll-like Rezeptoren in mononukleären Blutzellen und induziert Toll-like Rezeptor 7 in plasmazytoiden dendritischen Zellen von Patienten mit Multipler Sklerose* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Jakob Moritz Johannes Bauer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Derkow K*, **Bauer JMJ***, Hecker M, Paap BK, Thamilarasan M, *et al.* (2013) Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-Like Receptor (TLR) Expression by Interferon- β Includes Upregulation of TLR7 in Plasmacytoid Dendritic Cells. PLoS ONE 8(8): e70626. doi:10.1371/journal.pone.0070626. *These authors contributed equally to this work.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Planen, Durchführen und Auswerten der Experimente; Analyse, Interpretation und Darstellung der Ergebnisse.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen und Kongressbeiträge

Derkow K*, **Bauer JMJ***, Hecker M, Paap BK, Thamilarasan M, Koczan D, Schott E, Deuschle K, Bellmann-Strobl J, Paul F, Zettl UK, Ruprecht K, Lehnardt S.

* These authors contributed equally to this work

Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-Like Receptor (TLR) Expression by Interferon- β Includes Upregulation of TLR7 in Plasmacytoid Dendritic Cells

PLoS ONE 8(8) (2013): e70626. doi:10.1371/journal.pone.0070626

von Eichborn J, Dunkel M, Gohlke BO, Preissner SC, Hoffmann MF, **Bauer JM**, Armstrong JD, Schaefer MH, Andrade-Navarro MA, Le Novere N, Croning MD, Grant SG, van Nierop P, Smit AB, Preissner R.

SynSysNet: integration of experimental data on synaptic protein-protein interactions with drug-target relations

Nucleic acids research 2013, Vol.41, Database Issue.

Bauer JMJ, Derkow K, Hecker M, Paap BK, Thamilarasan M, Koczan D, Schott E, Deuschle K, Bellmann-Strobl J, Paul F, Zettl UK, Ruprecht K, Lehnardt S.

Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-like Receptor (TLR) Expression by Interferon-beta includes Upregulation of TLR7 in Plasmacytoid Dendritic Cells

Poster, präsentiert beim Jahrestreffen des European Committee on Treatment and Research in MS (ECTRIMS) in Kopenhagen 2013

Zettl UK, Paap BK, Thiesen HJ, Ruprecht K, Derkow K, **Bauer JMJ**, Lehnardt S, Koczan D, Hecker M.

Toll-like receptors as genes regulated by Interferon-beta and their role in multiple sclerosis therapy

Poster, präsentiert beim Jahrestreffen der American Academy of Neurology in New Orleans 2012

Hecker M, Paap BK, Derkow K, **Bauer JMJ**, Koczan D, Thiesen HJ, Lehnardt S, Ruprecht K, Zettl UK.

Regulation of Toll-like Receptors in Patients with Multiple Sclerosis treated with Interferon-beta

Poster, präsentiert bei der VisionNeurologie Berlin; Posterpreis dritter Platz

2012

Derkow K, **Bauer J**, Ruprecht K, Lehnardt S.

Interferon-beta modulates Toll-like Receptor Expression in human peripheral blood mononuclear cells

Poster, präsentiert beim Toll Meeting in Riva del Garda, Italien

2011

Danksagung

Danken möchte ich Frau Prof. Dr. med. Seija Lehnardt und Herrn PD Dr. med. Klemens Ruprecht für die Überlassung des Themas dieser Promotion und für Ihre Betreuung sowie ihrer gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Katja Derkow für Ihre unermüdliche Hilfe und sehr gute Anleitung und Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich den Menschen danken, die mit ihrer Blutspende diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meiner Verlobten für ihre große Geduld und Unterstützung.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden und den folgenden Menschen bedanken:
Anne, Anne, Carina, Carolin, Christoph, David, Eleonora, Eva-Margarete, Frank, Fred, Johanna, Karen, Katharina, Kathrin, Lia, Manuel, Marie, Nadine, Nora, Philip, Piet, Rickie, Rosa, Sarah, Sophie.

Supplement

Tabelle 5

Gesunde Blutspender und Zuordnung zu qPCR Experimenten

Spender			Dosis-Abhängigkeit											
HD	Geschl.	Alter	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	MyD88	MX1
1	nn	nn		x	x	x		x	x		x	x	x	x
2	m	28			x				x	x	x		x	x
3	f	28	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	m	22	x											
6	f	22	x	x		x		x		x		x		x

Spender			Zeitabhängigkeit 6h											
HD	Geschl.	Alter	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	MyD88	MX1
1	nn	nn		x	x	x		x	x		x	x	x	x
2	m	28			x				x	x	x		x	x
3	f	28	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	m	22	x											
6	f	22	x	x		x		x		x		x		x

Spender			Zeitabhängigkeit 24h											
HD	Geschl.	Alter	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	MyD88	MX1
1	nn	nn	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	f	22			x			x	x		x	x	x	x
6	f	22			x			x	x		x	x	x	x

Spender			Zeitabhängigkeit 48h											
HD	Geschl.	Alter	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	MyD88	MX1
1	nn	nn	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	f	22			x			x	x		x	x	x	x
6	f	22			x			x	x		x	x	x	x

Tabelle 6

Gesunde Blutspender und Zuordnung zu durchflusszytometrischen Experimenten

Spender			pDC/Monozyten				mDC				B-Zellen/T-Zellen			
HD	Geschl.	Alter	TLR3	TLR7	TLR9	MyD88	TLR3	TLR7	TLR9	MyD88	TLR3	TLR7	TLR9	MyD88
4	m	22			x								x	
10	f	49		x	x	x						x	x	x
11	m	51						x	x	x				
12	f	20		x		x						x		x
13	f	21		x		x						x		x
14	f	22	x											
15	f	21	x								x			
16	f	22	x								x			
18	f	22			x								x	
19	f	22												
20	f	21												
22	f	35									x			
24	m	24						x	x	x				
25	f	27						x	x	x				
11	m	53	IFN- α intrazellulär											
19	f	24												
20	f	22												
26	f	34												
11	m	53	Flowcytomix-Zytokinmessung im Überstand											
20	f	22												
27	m	28												

Tabelle 7

Gesunde Spender und Zuordnung zu ELISA Messungen

Spender			IFN- α		TNF- α	
HD	Geschl.	Alter	Zeitreihe	Dosisreihe	Zeitreihe	Dosisreihe
9	f	28	x		x	
10	f	51	x		x	
19	f	24		x		x
20	f	23		x		x
21	m	24	x		x	
22	f	35		x		x
27	m	28	x		x	
28	m	25		x		x

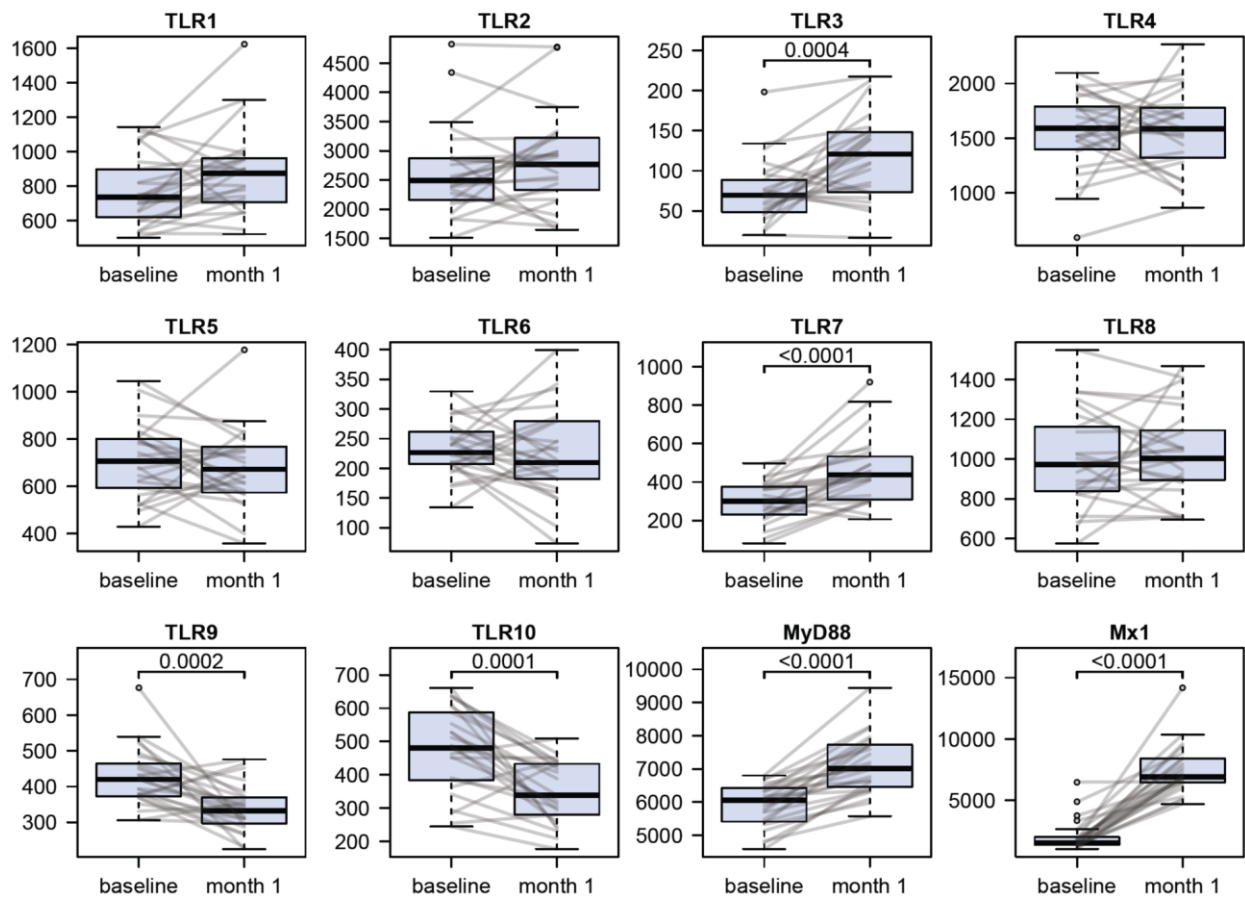


Abbildung 18 (aus eigener Publikation⁹²)

Die Daten der Arbeitsgruppe Zettl *et al.* zeigen eine Hochregulation von TLR3-, TLR7- und MyD88-mRNA sowie eine Herunterregulation von TLR9- und TLR10-mRNA in PBMC von MS-Patienten nach einmonatiger Therapie mit IFN- β .

Dargestellt sind die Expressionslevel von TLR1-10-, MyD88-, und MX1-mRNA in PBMC von Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose ($n = 25$), gemessen mittels Affymetrix Microarray vor und einen Monat nach Therapiebeginn mit Interferon- β -1b. Die Boxplots zeigen Median, oberes und unteres Quartil sowie Ausreißer, und stellen die Verteilung der vorprozessierten Microarray-Daten graphisch dar. Die statistische Signifikanz von Genexpressionsveränderungen durch die Therapie wurde mittels Wilcoxon-signed-Rank-Test ermittelt und p -Werte $< 0,01$ sind angegeben.