

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

DISSERTATION

# **Responsemarker der Interferontherapie bei Multipler Sklerose**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Wengert  
aus Freiburg im Breisgau

Gutachter: 1. Prov.-Doz. Dr. med. K.-P. Wandinger  
2. Prof. Dr. P. Berlit  
3. Priv.-Doz. Dr. med. K. Angstwurm

Datum der Promotion: 21.11.2008

## **ABSTRACT**

Hintergrund: Interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ) war die erste zugelassene Substanz für die Behandlung der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose (RR-MS). Die therapeutisch relevanten Wirkmechanismen dieses hochgradig pleiotropen Zytokins sind trotz intensiver Forschung noch nicht genau definiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Genexpression bestimmter Kandidatengene mit dem klinischen Therapieerfolg zu korrelieren.

Methoden: Aufbauend auf Literatur-Recherchen wurde eine Auswahl mehrerer Gene (TRAIL, CD95, CD95L, Bcl-2, Bag-1, Bcl-X<sub>L</sub>, FLIP, Caspase-3) getroffen. Deren Genexpression wurde dann mittels Real-time PCR in einer longitudinalen Untersuchung in PBMC von RR-MS Patienten, die an einer therapeutischen Studie mit IFN $\beta$  1a teilnahmen, bestimmt. Aufgrund klinischer Parameter wurden die Patienten in sog. Responder und Nonresponder eingeteilt, um den klinischen Therapieerfolg mit der Genexpression der ausgewählten Kandidatengene zu korrelieren. Relevante Ergebnisse wurden an einer zweiten unabhängigen Patientenkohorte überprüft.

Ergebnisse: Therapieresponder unterschieden sich von Nonrespondern durch eine frühe und anhaltende Hochregulation von TRAIL (MANOVA  $p < 0,0001$ ). Auch auf Proteinebene zeichneten sich die Therapieresponder durch signifikant höhere Werte für sTRAIL gegenüber den Nonrespondern aus (MANOVA  $p < 0,001$ ). Bei einem Cut-off von 584,1 pg/ml konnte der Therapieerfolg anhand der sTRAIL Werte vor Therapie mit einer Spezifität von 90,5% und einer Sensitivität von 71,4% vorhergesagt werden. Eine Korrelation des therapeutischen Ansprechens mit der Transkriptionsrate der weiteren untersuchten apoptoserelevanten Gene konnte nicht nachgewiesen werden.

Interpretation: Mit TRAIL konnte ein Kandidatengen gefunden werden, dessen Expressionsniveau mit dem klinischen Behandlungserfolg korreliert. Mit TRAIL gelang außerdem die Identifizierung des ersten prognostischen Markers einer IFN- $\beta$  Therapie bei MS.

## **ABSTRACT**

Background: A substantial number of multiple sclerosis (MS) patients fail to respond to interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), widely used as immunomodulatory therapy in this disease. Here, the functional relevance of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), recently shown to be upregulated upon incubation with IFN- $\beta$ , for clinical treatment response, was examined.

Methods: Gene expression was quantified longitudinally by realtime-PCR in peripheral immune cells of 82 MS patients. In a first cohort of 62 patients, 20 were classified as 'first year responders' due to the lack of relapses during IFN- $\beta$  1a therapy and 19 as 'first year non-responders'. A second cohort, also characterized by MRI, consisted of 11 patients on IFN- $\beta$  1a and 9 non-treated patients. Soluble TRAIL protein levels were determined by ELISA in serum samples of 49 patients prior to therapy (29 responders, 20 non-responders), as well as longitudinally during therapy.

Findings: In both patient cohorts, drug-responders could be discriminated from non-responders by early and sustained TRAIL gene induction (MANOVA,  $p < 0.0001$ , each). Elevated levels of soluble TRAIL protein in patients' sera prior to the start of therapy allowed prediction of the treatment response in the first year (ROC analysis with area under the curve 0.879 [0.785-0.974]).

## INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT .....	3
ABSTRACT .....	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1. EINLEITUNG UND EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG.....	8
1.1. Multiple Sklerose.....	10
1.1.1. Epidemiologie.....	10
1.1.2. Symptome .....	10
1.1.3. Zusatzuntersuchungen und Diagnosestellung .....	11
1.1.4. Verlaufsformen.....	12
1.1.5. Pathologie .....	13
1.1.6. Immunpathogenese .....	13
1.1.7. Therapie.....	18
1.2. Die Rolle der Apoptose in der Pathogenese der MS und Charakterisierung der untersuchten Moleküle .....	18
1.3. Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System.....	20
1.3.1. Allgemeines.....	20
1.3.2. Immunregulatorische Eigenschaften von TRAIL .....	21
1.3.3. Die Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS .....	22
1.4. Interferon- $\beta$ .....	23
1.4.1. Biologie der Typ I Interferone .....	23
1.4.2. Therapeutischer Einsatz von Interferon- $\beta$ bei MS .....	24
1.4.3. Wirkmechanismen der Interferon- $\beta$ Therapie.....	27
2. MATERIAL UND METHODEN .....	30
2.1. Auswahl der Patienten .....	30
2.2. Probengewinnung .....	32
2.3. RNA-Isolierung und Reverse Transkription.....	32
2.4. Real-time PCR .....	32
2.5. Stimulationsexperimente .....	36
2.6. ELISA .....	36
2.7. Statistische Auswertung .....	37
3. ERGEBNISSE .....	38
3.1. Kinetik der TRAIL mRNA Expression nach Interferon- $\beta$ Stimulation .....	38
3.2. TRAIL wird ex vivo induziert durch Therapie mit Interferon- $\beta$ .....	39

3.3.	TRAIL als Responsemarker des Therapieerfolgs.....	42
3.4.	Einfluß neutralisierender Antikörper auf die TRAIL Expression.....	44
3.5.	Vergleich der baseline TRAIL-Expression zwischen den 3 Subgruppen.....	45
3.6.	Lösliches TRAIL im Vergleich Responder vs Nonresponder.....	45
3.7.	Bestätigung der Ergebnisse an einer zweiten Patientenkohorte .....	47
3.8.	Differentielle TRAIL-Expression korreliert nicht mit Polymorphismus in der Promoterregion .....	50
3.9.	Lösliches TRAIL als prognostischer Marker des Therapieerfolges.....	50
3.10.	Einfluß der IFN- $\beta$ Therapie auf die Transkription von Apoptosegenen .....	51
4.	DISKUSSION.....	55
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....	63
6.	PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN .....	65
	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
	ANHANG .....	73
	Danksagung .....	74
	Lebenslauf.....	75
	Eidstattliche Erklärung.....	76

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AICD	Activation induced cell death
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BBB	Blood-Brain-Barrier (Blut-Hirn-Schranke)
CD	Cluster of Differentiation
DD	Death Domain
DISC	Death inducing signalling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentell Autoimmune Encephalomyelitis
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EDSS	Expanded Disability Status Scale
HLA	Humane Leukozytenantigene
IFN	Interferon
IFN $\beta$	Interferon- $\beta$
IL	Interleukin
IL-12R $\beta$ 2	Interleukin-12 Rezeptor beta 2 Subunit
MBP	Basisches Myelinprotein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
Nab	Neutralizing Antibodies (gegen Interferon- $\beta$ )
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
RR-MS	schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
RT-PCR	revers transkribierte Polymerasekettenreaktion
SP-MS	sekundär-chronisch verlaufende Multiple Sklerose
TH1	T-Helfer-1; proinflammatorische T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. EINLEITUNG UND EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG

Interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ) ist die erste zugelassene Substanz und inzwischen weltweiter Standard in der Therapie der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose (MS) Erkrankung (Goodin et al, 2002). In physiologischem Kontext werden den Interferonen antivirale, antiproliferative und immunmodulierende Eigenschaften zugeschrieben (Theophilopoulos et al, 2005). Bei der therapeutischen Anwendung steht vor allem der immunmodulatorische Aspekt im Vordergrund. Trotz intensiver Forschung bleibt der genaue molekulare Wirkmechanismus von Interferon- $\beta$  im therapeutischen Einsatz bei der MS jedoch noch weitgehend unklar. Diskutiert werden unter anderem das Verhindern der Transmigration aktivierter autoreaktiver Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke, ein antiproliferativer Effekt auf autoreaktive T-Zellen und ein Zytokinshift von einem proinflammatorischen Th1 assoziierten hin zu einem antiinflammatorischen Th2 assoziierten Zytokinmilieu (Dhib-Jalbout et al, 2002; Hall et al, 1997; Stone et al, 1995; Yong et al, 1998). Die genannten Wirkungen sind jedoch nur eine kleine Auswahl aus den vielfältigen biologischen Wirkungen eines ausgesprochen pleiotropen Zytokins. In Microarray-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß Interferon- $\beta$  z.B. in humanen PBMC weit über 100 Gene reguliert, die in ganz verschiedenen Funktionssystemen eine Rolle spielen (Wandinger et al, 2001). Welche der zahlreichen biologischen Effekte aber tatsächlich therapeutisch relevant sind, bleibt noch weitgehend unklar. Neben der Vielfalt der molekularen Wirkungen stellt die Erklärung der interindividuell verschiedenen Wirksamkeit eine weitere große Herausforderung für die Forschung dar: Es ist bekannt, daß nur ein Teil der Patienten von der Interferontherapie profitieren. Es wurden bisher keine Kandidatengene beschrieben, deren unterschiedliche Regulation im Sinne einer Prädisposition die interindividuellen Unterschiede im klinischen Ansprechen auf die Therapie erklären könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einer longitudinalen Untersuchung die Genexpression bestimmter Kandidatengene aus PBMC Interferon- $\beta$  behandelter MS-Patienten bestimmt. Dann wurden die Patienten anhand klinischer Parameter in sog. Responder und Nonresponder eingeteilt, um in einer Subgruppenanalyse folgende Fragen zu bearbeiten:

Welche der vielfältigen biologischen Effekte korrelieren tatsächlich mit dem klinischen Behandlungserfolg? Welche Gene werden differentiell reguliert zwischen Therapie-Respondern und Therapie-Nonrespondern?

Gibt es eine Prädisposition für die Wirksamkeit? Kann vor begonnener Therapie anhand des Expressionsniveaus bestimmter Kandidatengene das zukünftige Ansprechen auf eine Interferon- $\beta$  Therapie vorausgesagt werden?

## 1.1. Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS), oder auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Der Beginn liegt häufig im jungen Erwachsenenalter. Pathologisches Korrelat der Symptome sind vor allem perivaskulär lokalisierte Entzündungsherde in der weißen Substanz. Die Entzündung führt zu Demyelinisierung und axonalem Schaden. Charakteristisch für die MS ist die räumliche und zeitliche Dissemination.

### 1.1.1. Epidemiologie

Multiple Sklerose ist die häufigste in jungem Alter zu relevanter Behinderung führende neurologische Erkrankung. In Deutschland liegt die Prävalenz bei ca. 120.000 oder 0,15% der Bevölkerung. Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr. Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die Multiple Sklerose zeigt ein charakteristisches geographisches Verteilungsmuster. Die Prävalenz der MS schwankt in unterschiedlichen Regionen zwischen 1 aus 100.000 und 100 aus 100.000. Inzidenz und Prävalenz sind in Äquatornähe deutlich geringer als in nördlichen oder südlichen Breiten. Obwohl eine Assoziation mit bestimmten Genen gezeigt werden konnte (vor allem HLA-Antigene wie HLA-DR15 und HLA-DQ6, u.a.), ist die MS keine „Erbkrankheit“ im klassischen Sinne. Die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge beträgt ca. 30%. Geschwister von Betroffenen erkranken durchschnittlich 20mal und Kinder von Betroffenen 12mal häufiger als der Bevölkerungsdurchschnitt.

### 1.1.2. Symptome

Aufgrund der räumlichen Dissemination der Entzündungsherde können bei der MS eine Vielzahl an Symptomen auftreten. Keines dieser Symptome ist spezifisch für die MS. Dennoch gibt es einige Prädilektionsstellen für Entmarkungsherde und damit auch häufiger im Rahmen einer MS auftretende Symptome. Vor allem im frühen Verlauf und bei Erstmanifestation sind folgende Symptome häufig anzutreffen: spastische Paresen, Hirnstamm- oder zerebelläre Symptome, Sensibilitätsstörungen, Optikusneuritis, Störung der Okkulomotorik, u.a.

### 1.1.3. Zusatzuntersuchungen und Diagnosestellung

Es gibt keinen singulären Test, der die Diagnose einer Multiplen Sklerose beweisen könnte. Diagnosesichernd ist der Nachweis der räumlichen und zeitlichen Dissemination der Erkrankung. Dies kann durch den klinischen Verlauf oder durch Zusatzuntersuchungen gezeigt werden. Die Diagnose stützt sich daher, neben der Beurteilung des klinischen Verlaufs, auf typische Befundmuster von MRT-, Liquor-, und elektrophysiologischen Untersuchungen (besonders visuell evozierte Potentiale). In der MRT-Untersuchung stellen sich Entmarkungsherde als T2-hyperintense Läsionen dar. In der Liquoruntersuchung finden sich typischerweise eine geringgradige lymphozytäre Pleozytose sowie die bei über 95% der MS Patienten nachweisbaren oligoklonalen Banden nur im Liquor bzw. intrathekale IgG-Synthese (Kabat et al, 1942; Tourtellotte et al, 1984). Oligoklonale Banden werden als Korrelat (oligo)-klonal expandierter Plasmazellen im Liquorraum gesehen. Die Liquoruntersuchung kann damit die entzündliche Genese der Symptome sichern. Da jeder einzelne klinische und paraklinische Untersuchungsbefund für sich genommen unspezifisch ist, müssen eine große Anzahl entzündlicher, infektiöser, vaskulitischer, granulomatöser, metabolischer und anderer ZNS-Erkrankungen differentialdiagnostisch berücksichtigt werden.

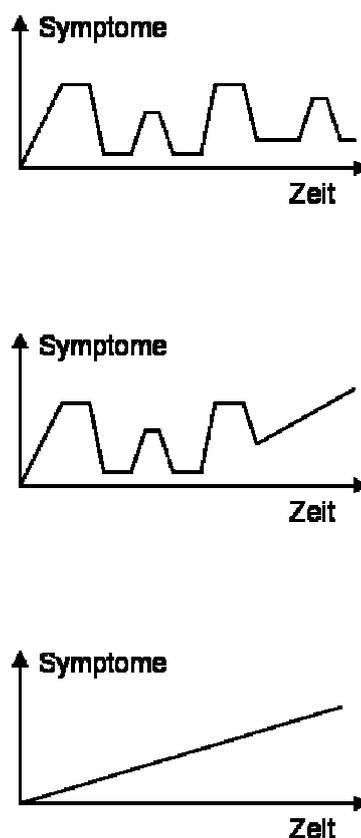
Klinische Präsentation (Schübe)	Klinisch objektivierbare Läsionen	Weitere erforderliche Kriterien
2 oder mehr	2 oder mehr	Keine
2 oder mehr	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Räumliche Dissemination:</u></li> <li>-Positives MRT</li> <li>-oder: positiver Liquor plus <math>\geq 2</math> Läsionen im MRT</li> <li>-oder: weiterer klinischer Schub</li> </ul>
1	2 oder mehr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Zeitliche Dissemination:</u></li> <li>-Positives MRT</li> <li>-oder: zweiter klinischer Schub</li> </ul>
1	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Räumliche Dissemination</u> im MRT oder positiver Liquor plus <math>\geq 2</math> Läsionen im MRT oder weiterer klinischer Schub</li> <li style="text-align: center;">und</li> <li>• <u>Zeitliche Dissemination</u> im MRT oder zweiter klinischer Schub</li> </ul>
Primär chronisch progredienter Verlauf  1 Jahr Krankheitsprogression		<p style="text-align: center;"><u>2 von 3 Kriterien</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• positives zerebrales MRT ( 8 T2-Läsionen oder <math>\geq 4</math> T2-Läsionen + positives VEP)</li> <li>• Positives spinales MRT ( 2 fokale T2-Läsionen)</li> <li>• Positiver Liquor (OKB, bzw IgG-Index)</li> </ul>

Abbildung 1: Diagnosekriterien, revidierte Fassung 2005 (nach Polman et al, 2005)

#### 1.1.4. Verlaufsformen

Der Krankheitsverlauf bei der Multiplen Sklerose ist hoch variabel. Auf dem Boden einer internationalen Erhebung wurden 1996 folgende grundsätzliche Verlaufsformen der MS definiert: schubförmig-remittierender Verlauf, primär chronisch progredienter Verlauf und sekundär chronisch progredienter Verlauf. (Lublin et al, 1996). Es existieren Mischformen, wie etwa sekundär chronisch progredienter Verlauf mit überlagerter Schubaktivität.

Besonders zu Krankheitsbeginn überwiegt die schubförmig-remittierende Verlaufsform. Bei ca. 10% der Patienten verläuft die MS primär chronisch progredient. Nach ca. 10 bis 15 Jahren Erkrankungsdauer gehen ca. 1/3 der initial schubförmigen Verläufe in einen sekundär-chronisch progredienten Verlauf über (Weinshenker et al, 1989); mit zunehmender Erkrankungsdauer nimmt die Häufigkeit weiter zu.



**Abbildung 2: Verschiedene Verlaufsformen der Multiplen Sklerose. Schubförmig-remittierende Verlaufsform (oben), sekundär chronisch progrediente Verlaufsform (Mitte) und primär chronisch progrediente Verlaufsform (unten).**

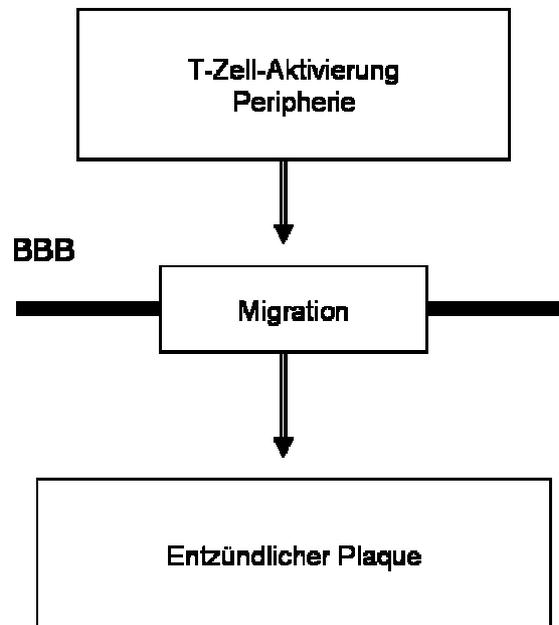
### 1.1.5. Pathologie

Pathologisches Kennzeichen der MS sind Entmarkungsherde, oder auch Plaques genannt, welche sich bevorzugt in der weißen Substanz des ZNS befinden. Die Plaques sind häufig perivenulär gelegen. Histopathologische Charakteristika von MS Läsionen sind Demyelinisierung, Inflammation und Gliose. MS Läsionen sind typischerweise scharf begrenzt. Sie sind neben Demyelinisierung in geringerem Maße auch durch axonalen Schaden gekennzeichnet (Trapp et al, 1998). Besonders in einem frühen Läsionsstadium wird ein ausgeprägtes perivaskuläres entzündliches Infiltrat sichtbar. Das entzündliche Infiltrat setzt sich in erster Linie aus T-Zellen und Makrophagen/Mikroglia zusammen, in geringerem Ausmaß finden sich auch B-Zellen und Plasmazellen. Aktive Läsionen sind durch Myelinabbauprodukte in Makrophagen gekennzeichnet. T-Zellinfiltrate finden sich in akuten und chronischen Läsionen und konnten immunhistochemisch sowohl als CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Helferzellen) als auch als CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) charakterisiert werden. Der relative Anteil verschiedener Effektormechanismen (T-Zellen, Makrophagen, Antikörper, u.a.) ist noch ungeklärt. Eine in den letzten Jahren viel diskutierte Hypothese ist, daß sich anhand der Oligodendrozytenpathologie und Komposition der Entzündungszellen bzw. überwiegendem Immuneffektormechanismus verschiedene Subtypen der MS abgrenzen lassen können (Lucchinetti et al, 2000).

### 1.1.6. Immunpathogenese

Die MS wird als multifaktorielle Erkrankung gesehen, bei der neben Autoimmunprozessen eine gewisse genetische Suszeptibilität und auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Martin et al, 1992; Noseworthy et al, 1999). Inwiefern der MS überhaupt ein einheitliches pathogenetisches Muster zugrunde liegt, wird kontrovers diskutiert (Lucchinetti et al, 2000). Überwiegend wird die MS heutzutage als T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung betrachtet. Die kritischen Schritte der Pathogenese sind die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie, der Übertritt aktivierter Zellen über die Blut-Hirn-Schranke, die Reaktivierung der Immunzellen innerhalb des ZNS-Kompartiments und die immunmedierte Schädigung von Myelinscheiden und Axonen (Martin et al 2001). Zur immunmedierten Schädigung der Myelinscheiden tragen neben T-Zellen in großem Maße auch weitere Mechanismen wie Makrophagen,

gegen Myelinscheiden gerichtete Antikörper, sowie lösliche Faktoren (Zytokine) bei. Als Zielantigene der Immunantwort werden verschiedenen Myelin- und Nicht-Myelin-Antigene diskutiert (Wekkerle et al, 1998, u.a.).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der kritischen Schritte der Pathogenese der Multiplen Sklerose. Dazu zählen die Aktivierung autoagressiver T-Zellen in der Peripherie, die Transmigration aktivierter T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke und letztlich die lokale autodestruktive Immunreaktion, die zur Formation eines entzündlichen Plaque führt.**

Als erster kritischer Schritt der Pathogenese wird die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie betrachtet. Die Annahme einer zentralen Rolle  $CD4^+$ -T-Zellen in der MS Pathogenese wird u.a. durch folgende Tatsachen gestützt: Im Tiermodell der MS, der experimentell autoimmunen Enzephalitis (EAE) konnte die Pathogenität autoreaktiver T-Zellen mit Spezifität für das basische Myelinprotein (MBP), Proteolipidprotein (PLP) oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) u.a. gezeigt werden (Hohlfeld 1997). Bei der klassischen EAE wird die Enzephalitis durch autoreaktive  $CD4^+$ -T-Zellen übertragen. Auch findet sich bei MS Patienten im Liquor eine erhöhte Frequenz aktivierter Myelin-reaktiver  $CD4^+$ -T-Zellen (Chou et al, 1992). Ebenso kann die Assoziation der MS mit MHC-Klasse II Haplotypen als Hinweis für die pathogenetische Rolle von  $CD4^+$ -T-Zellen interpretiert werden (Noseworthy et al, 1999). Interessanterweise sind autoreaktive Myelin-spezifische T-Zellen auch bei gesunden

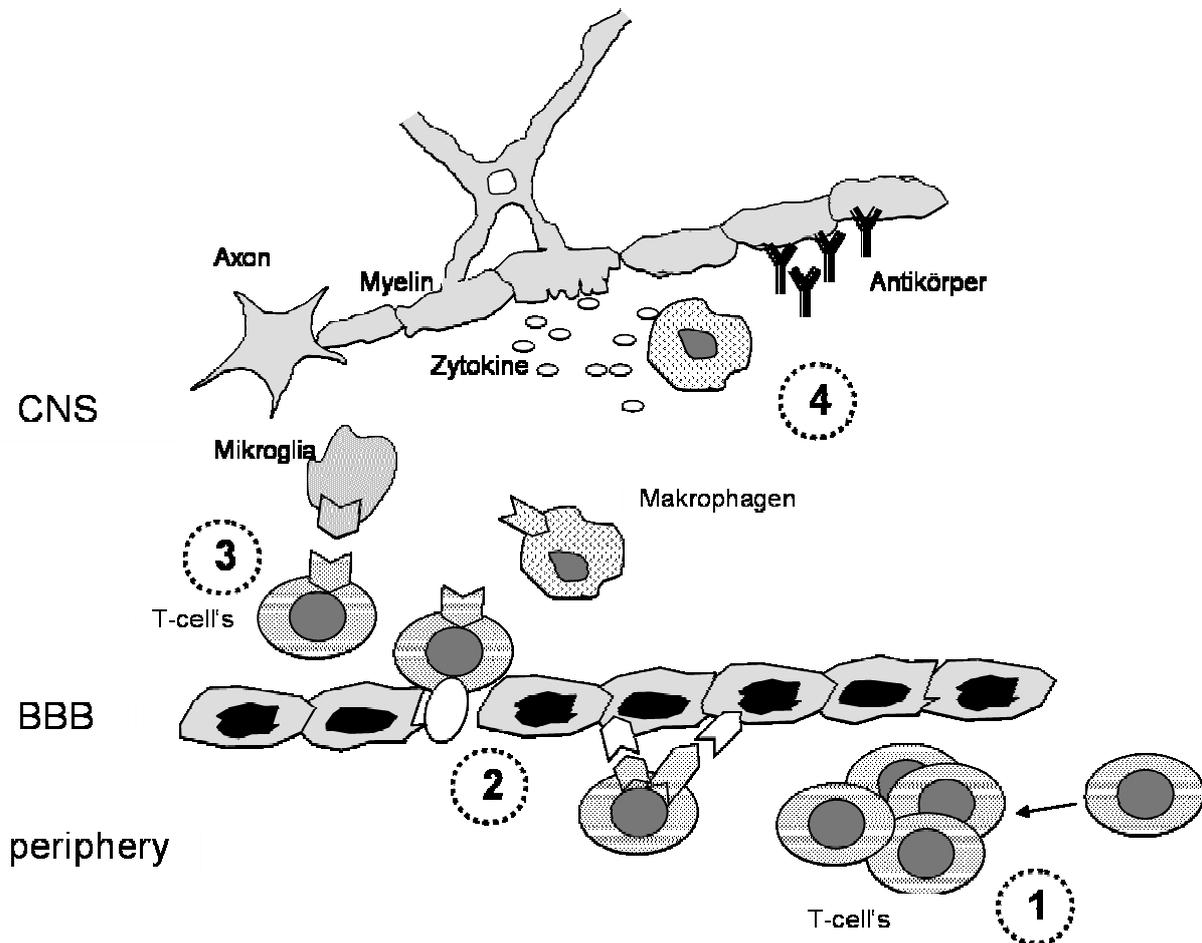
Kontrollpersonen nachweisbar (Martin et al, 1992). Wie sich potentiell autoreaktive von letztlich autodestruktiven T-Zellen unterscheiden, ist unklar. Auch die Bedingungen, die zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen, sind im Detail noch unklar. Diskutiert werden u.a. virale Infektionen (Martin et al 1992, 2001 2005).

Es mehrten sich in den letzten Jahren zunehmend Hinweise auf eine pathogene Rolle CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Beispielsweise konnten expandierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowohl im Liquor von MS Patienten als auch in MS Läsionen festgestellt werden (Babbe et al, 2000; Jacobsen et al, 2002; Skulina et al, 2004). Es ist gezeigt, daß CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für Oligodendrozyten und Neurone zytotoxisch sein können (Jurewicz et al, 1998, Medena et al, 2000).

Als zweiter kritischer Schritt der Pathogenese gilt der Übertritt aktivierter T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke. Aktivierte T-Zellen können unabhängig ihrer Antigen-spezifität die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Wekkerle et al, 1986). Voraussetzung der Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke ist die Aktivierung von T-Zellen und nachfolgende Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Die Inhibition der Leukozytentransmigration über die Blut-Hirn-Schranke bietet einen äußerst effektiven therapeutischen Angriffspunkt, wie er beispielsweise bei dem Wirkstoff Natalizumab verwirklicht wurde. Der eindrucksvolle klinisch-therapeutische Effekt der Hemmung der Leukozytentransmigration belegt nochmals die Bedeutung dieses Schrittes in der Pathogenese der MS.

Die finalen Schritte der Pathogenese sind der Kontakt autoreaktiver T-Zellen mit dem Zielantigen im ZNS und die lokale Reaktivierung, welche eine Schadenskaskade in Gang setzen, an der verschiedene Zellarten und Faktoren beteiligt sind. Beispielsweise sind B-Zellen und Plasmazellen seit langem bekannte Bestandteile von MS Läsionen, für deren Rolle bei der Demyelinisierung zunehmend Hinweise gefunden werden. So konnten zum Beispiel in MS-Läsionen an Oligodendrozyten bzw. an Makrophagen gebundenes IgG, Komplement (Prineas et al, 1981; Compston et al., 1989) und auch terminale Komplementkomplexe (Storch et al., 1998) nachgewiesen werden, was auf die Beteiligung autoreaktiver Antikörper an der Effektorphase der Demyelinisierung hinweist. Daneben spielen in der Immuneffektorphase auch direkte zytotoxische Aktivität von Zellen und auch sezernierte proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$

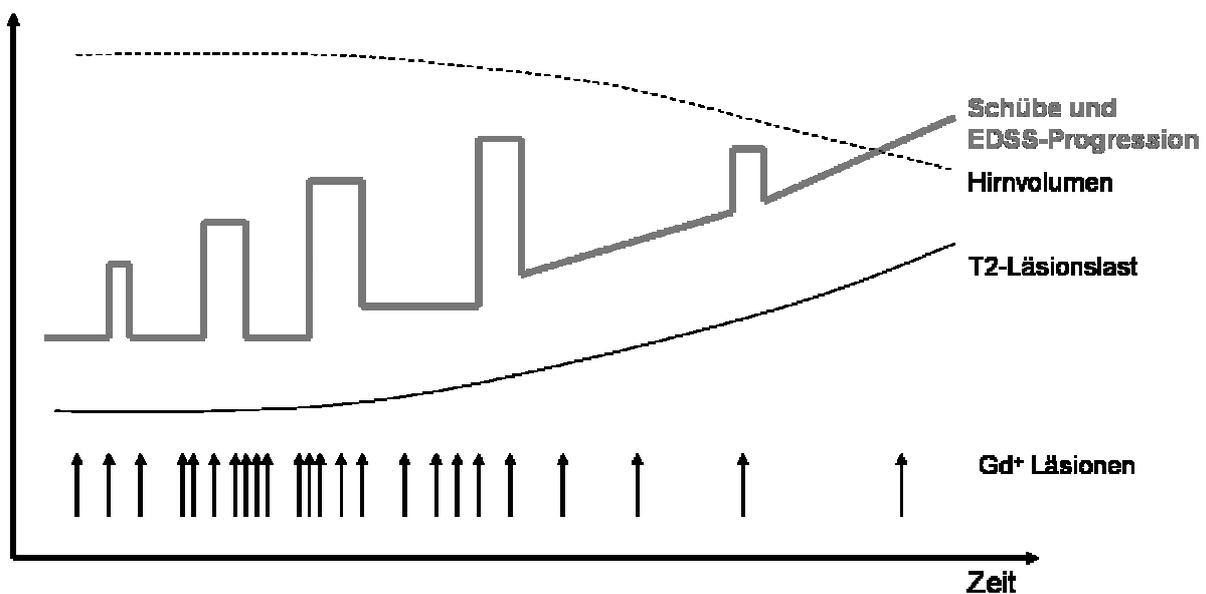
(IFN- $\gamma$ ) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) eine wichtige Rolle (Beck et al. 1988; Selmaj und Raine 1988).



**Abbildung 4: Schlüsselmechanismen der jeweiligen kritischen Schritte der Pathogenese der Multiplen Sklerose. Bisher im Detail ungeklärte Mechanismen führen zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie (1). Konsekutiv kommt es zur Aktivierung, Expression von Adhäsionsmolekülen u.a. und Transmigration aktivierter T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke (2). Innerhalb des ZNS-Kompartiments kommt es zu einer Reaktivierung transmigrierter Zellen durch antigenpräsentierende Mikrogliazellen u.a. (3). In der Effektorphase kommt es zur Zerstörung von Myelinscheiden und Axonen durch verschiedene Mechanismen, bei denen u.a. sezernierte Zytokine und Autoantikörper eine Rolle spielen (4).**

In den letzten Jahren sind aber neben immunvermittelten Vorgängen auch mehr und mehr degenerative Veränderungen bei MS in den Blickpunkt des Interesses gerückt. So

geht man heute weitgehend übereinstimmend von einer Stadienabhängigkeit verschiedener Aspekte der Pathogenese aus (Lassmann et al, 2007). Während in der Frühphase nach Ansicht der meisten Autoren die inflammatorische Aktivität, welche zu fokalen entzündlichen Läsionen führt, im Vordergrund steht, überwiegen mit fortschreitender Erkrankungsdauer und Eintreten einer sekundären chronischen Progression degenerative Veränderungen, die sich beispielsweise in einer globalen Atrophie äußern. Der genaue Stellenwert dieser verschiedenen Aspekte der Pathogenese und zum Teil auch deren Kausalitätsbeziehung werden kontrovers diskutiert (Barnett et al, 2004). Ob es sich beispielsweise in der späten Erkrankungsphase hauptsächlich um degenerative Vorgänge oder aber vielmehr nur um eine andere Art von Entzündungsvorgang, namentlich um eine kompartimentalisierte Inflammation handelt, wird diskutiert (Lassmann et al, 2007).



**Abbildung 5:** In verschiedenen Erkrankungsstadien überwiegen jeweils bestimmte Aspekte der Pathogenese. Im Frühstadium überwiegt die fokale inflammatorische Aktivität. Dies äußert sich klinisch in schubförmiger Krankheitsaktivität (graue Linie). Das bildgebende Korrelat aktiver inflammatorischer Plaques sind kontrastmittelaufnehmende Läsionen (Pfeile). Mit dem Übergang in den sekundär chronisch progredienten Krankheitsverlauf werden Gd<sup>+</sup> Läsionen jedoch seltener (Pfeile). Bildgebend kommt es nun zu einer zunehmenden globalen Atrophie (gestrichelte Linie).

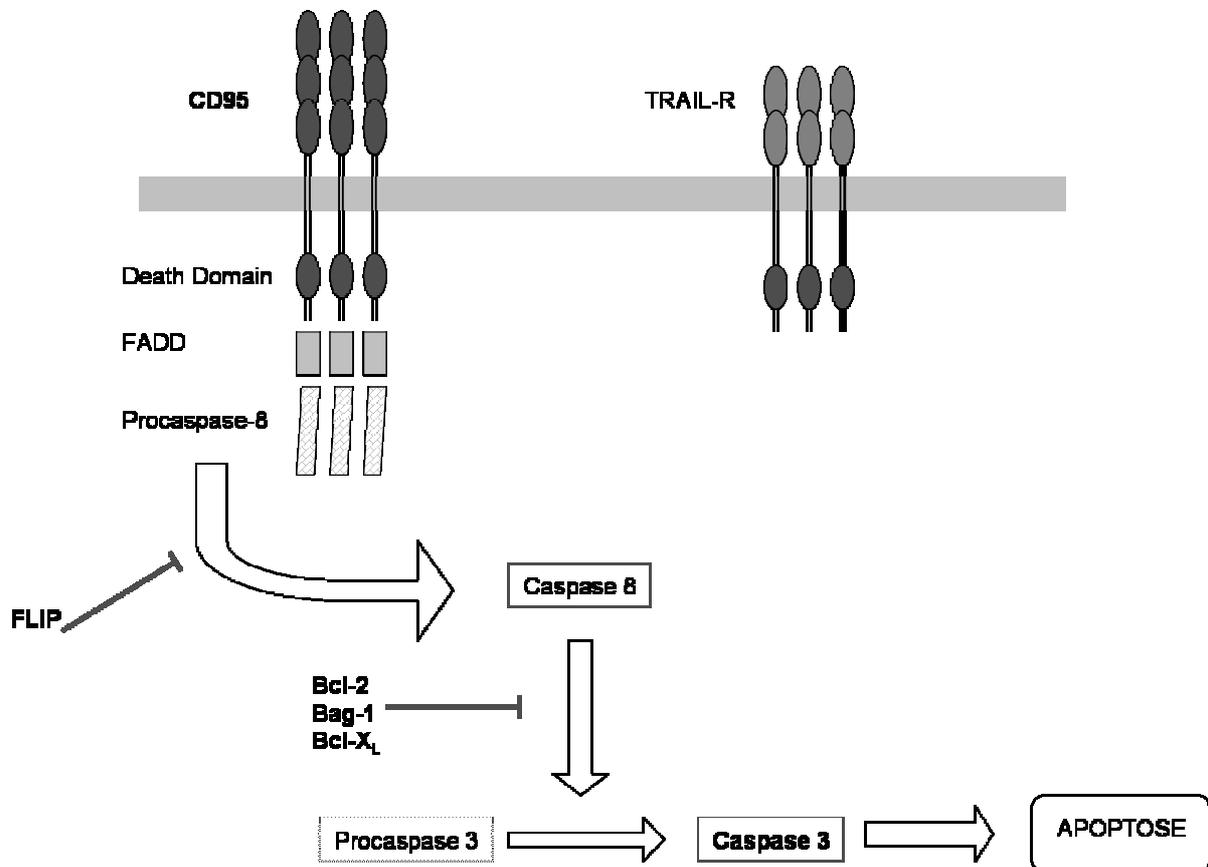
### 1.1.7. Therapie

Hinsichtlich der Therapie der Multiplen Sklerose kann die Therapie des akuten Schubs, die immunmodulatorische oder immunsuppressive Langzeittherapie und die Therapie einzelner Symptome unterschieden werden. Akute Erkrankungsschübe können durch den Einsatz hochdosierter Kortikosteroide abgemildert und abgekürzt werden. Ein Einfluss der Steroidbolustherapie auf den Langzeitverlauf konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Zur den immunmodulatorischen Basistherapeutika zählen die Interferon- $\beta$  Präparate und das synthetische Polypeptidgemisch Glatiramerazetat. Als Optionen der Eskalationstherapie bei therapierefraktären oder auch zur Initialtherapie bei schweren Verläufen stehen die Substanzen Natalizumab und Mitoxantron zur Verfügung. Aufgrund des Nebenwirkungsspektrums ist der Einsatz jedoch sorgfältig abzuwägen. Auf die Interferontherapie wird untenstehend genauer eingegangen werden.

## **1.2. Die Rolle der Apoptose in der Pathogenese der MS und Charakterisierung der untersuchten Moleküle**

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, bezeichnet einen genauestens regulierten aktiven Prozess des Zelltodes. Apoptose dient vor allem der Elimination von im Organismus unerwünschten Zellen. Im Immunsystem spielt die Apoptose eine duale Rolle: Einerseits stellt sie einen wichtigen Effektormechanismus zur Elimination infizierter oder transformierter Zellen dar, andererseits dient die Apoptose einem wichtigen Homöostasemechanismus, nämlich der Regulation und Termination potentiell schädlicher überschießender Immunreaktionen (Aktas et al, 2000). In letzterem Sinne geht man davon aus, daß speziell der sog Activation induced cell death (AICD) eine wichtige Rolle bei der Elimination aktivierter autoreaktiver Zellen spielt (van Parijs et al, 1998). Die beschriebene duale Rolle (Effektormechanismus vs Regulatormechanismus) spiegelt sich auch in der Diskussion um die Relevanz von Apoptosemechanismen in der MS Pathogenese wider: Einerseits wird Apoptose als Effektormechanismus genannt, der beim Untergang von Glia- und Nervenzellen eine wichtige Rolle spielen könnte. Dies ist mittlerweile durch zahlreiche Untersuchungen belegt (Aktas et al, 2000; Markovic-Plese 2001; Zipp et al, 2000; u.a.). Andererseits existieren Hinweise, daß bei

der MS eine defiziente Apoptoseregulation innerhalb des Immunsystems zur Persistenz autoreaktiver (myelinspezifischer) T-Zellen führt, welche für das Entstehen der demyelinisierenden Entzündungsherde verantwortlich gemacht werden (Aktas et al, 2000; Macchi et al 1998, u.a.).

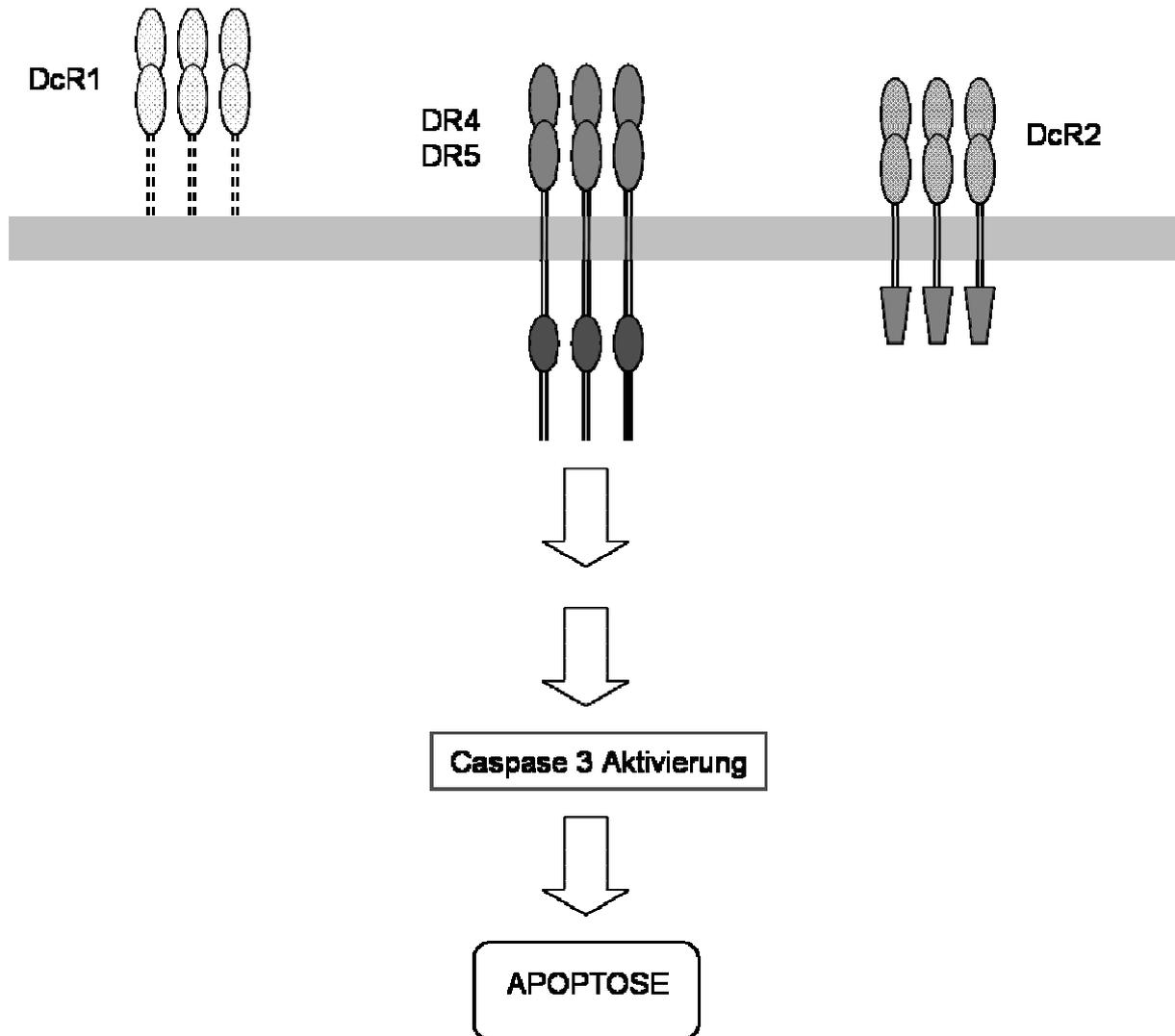


**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rolle der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Moleküle in der Signalkaskade der Apoptose. Die Bindung des Liganden (CD95L oder FasL) an den Rezeptor (CD95) führt initial zu dessen Trimerisierung in der Zellmembran. Die Todesdomäne interagiert u.a. mit dem Adaptermolekül FADD und Procaspase 8, welche wichtige Bestandteile des sog Death inducing signalling complex (DISC) bilden. Dadurch wird die intrazelluläre zu Apoptose führende Signalkaskade in Gang gesetzt. Die DISC-Bildung und damit die Apoptose kann beispielsweise durch FLIP-Moleküle verhindert werden. Während der weiteren Schritte der Signalkaskade können Moleküle wie das mitochondriengebundene Bcl-2, das Bcl-2 assoziierte Molekül Bag-1, oder auch Bcl-X<sub>L</sub> eine inhibierende Rolle spielen. Verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden konvergieren in der Aktivierung der Effektorkaspase Caspase 3, welche über weitere Zwischenschritte letztlich das Apoptoseprogramm in Gang setzt. (Abbildung in Anlehnung an Aktas et al, 2000; Hengartner et al, 2000 und Krammer et al 2000).**

### 1.3. Das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System

#### 1.3.1. Allgemeines

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), auch Apo2 genannt, gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und löst über Interaktion mit einer Reihe von TRAIL-Rezeptoren Apoptose in transformierten und nicht-transformierten Zellen aus (Jo et al, 2000; Nitsch et al, 2000). Die Bindung von TRAIL an die Rezeptoren DR4 und DR5 führt zu Trimerisierung und Apoptoseinduktion (Ashkenazi et al, 2002; Pitti et al, 1996). Die durch die genannten Rezeptoren ausgelöste Signalkaskade besitzt große Ähnlichkeiten mit der von CD95 (FasL) ausgelösten Signalkaskade. Gemeinsame Bestandteile des jeweiligen Death Inducing Signalling Complex (DISC) sind beispielsweise Caspase 8 und FADD (Bodmer et al, 2000). Eine Besonderheit des TRAIL/TRAIL-Rezeptorsystems ist das Vorhandensein so genannter Decoy-Rezeptoren, welche sich durch das Fehlen (DcR1) bzw. Unvollständigkeit (DcR2) einer intrazellulären Death Domain (DD) auszeichnen. TRAIL ist in der Lage, an die beiden Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 zu binden. Die Überexpression von DcR zeigte eine apoptoseschützende Wirkung (Sheridan et al, 1997). Als Zielzellen TRAIL-vermittelter Apoptose wurden zunächst transformierte Zellen bzw. Tumorzellen beschrieben. Im Tiermodell konnte die systemische Verabreichung von TRAIL erfolgreich das Tumorstadium reduzieren (Walczak et al, 1999 und 2000). Mittlerweile ist jedoch beschrieben, daß TRAIL auch in Hepatozyten und humanen Gehirnzellen Apoptose auslösen kann (Jo et al, 2000; Nitsch et al, 2000). Neben der membrangebundenen Form von TRAIL existiert auch eine lösliche Form des TRAIL (sTRAIL). Der Entstehungsmechanismus von sTRAIL ist noch nicht endgültig geklärt. Einerseits ist die Bildung aus zunächst membranständigem TRAIL durch Einwirkung von Proteasen beschrieben worden (Mariani et al, 1998). Als zweiter Produktionsweg ist die Sezernierung in präformierten Mikrovesikeln durch u.a. PBMC und stimulierte Jurkat T-Lymphomzellen beschrieben worden (Martinez-Lorenzo et al, 1999).



**Abbildung 7: Überblick über das TRAIL/TRAIl-Rezeptorsystem. Nur die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 besitzen eine vollständige intrazelluläre Todesdomäne und können daher die letztlich zu Apoptose führende intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen. Eine Besonderheit des TRAIL/TRAIl-Rezeptorsystems ist die Existenz zweier so genannter Decoy-Rezeptoren, welche kompetitiv TRAIL binden können. DcR1 besitzt keine intrazytoplasmatische Domäne. DcR2 verfügt lediglich über eine trunke intrazytoplasmatische Death Domain. Die Bindung von TRAIL an DcR1 oder DcR2 führt also nicht zu einer intrazellulären Signalkaskade und induziert keine Apoptose.**

### 1.3.2. Immunregulatorische Eigenschaften von TRAIL

Neben den apoptoseinduzierenden Eigenschaften werden TRAIL aber auch immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Humane T-Zellen erwiesen sich als resistent gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose (Wendling et al, 2000). Daten aus

Tiermodellen legten zunächst nahe, daß TRAIL regulatorisch auf den Zellzyklus wirkt und die Transition G1 → S-Phase unterbindet (Song et al, 2000). In weiteren Untersuchungen konnte zusätzlich ein inhibierender Effekt von TRAIL auf die Aktivierung fremdantigen-spezifischer und autoreaktiver T-Zellen festgestellt werden (Lünemann et al, 2002). Die Kenntnis dieser immunoregulatorischen Effekte von TRAIL ist wichtig zum Verständnis der möglichen Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS.

### 1.3.3. Die Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS

Daten aus der Experimentell Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der MS, weisen auf eine regulatorische Rolle von TRAIL in der Pathogenese von MS. Die Neutralisation von TRAIL führte zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs der EAE (Hilliard et al, 2001). Dasselbe zeigte sich bei TRAIL knockout Mäusen (Lamhamedi-Cherradi et al, 2003). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wird eine regulatorische Rolle von TRAIL diskutiert. Beispielsweise konnte im Tiermodell der Rheumatoiden Arthritis durch Blockade von TRAIL ebenfalls eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsverlaufes erreicht werden (Song et al, 2000). Mittlerweile gibt es weitere Hinweise für eine Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS, die sich auf Untersuchungen mit humanen Zellen stützen. So konnte gezeigt werden, daß die TRAIL Expression in PBMC von MS-Patienten in Remission erhöht war, ein weiterer wichtiger Hinweis auf eine regulatorische Rolle des TRAIL-Moleküls in der MS-Pathogenese (Huang et al, 2000).

Ein zweiter Aspekt der Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS ist vermutlich die schädigende Wirkung innerhalb des ZNS im Rahmen der Immuneffektorphase. So konnte gezeigt werden, daß humane Oligodendrozyten und auch Neurone sowohl apoptoseinduzierende (DR4, DR5) als auch apoptoseinhibierende (DcR1, DcR2) TRAIL-Rezeptoren exprimieren und diese Zellen damit grundsätzlich als Zielzellen TRAIL-vermittelter Apoptose vulnerabel sind. In Experimenten an humanen Hirnschnitten konnte gezeigt werden, daß TRAIL tatsächlich Apoptose in Neuronen, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen auslösen kann (Nitsch et al, 2000).

Zusammenfassend ergibt sich damit das Bild einer dualen Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS je nach Körperkompartiment: Eine regulatorische Rolle auf Immunzellen in der Peripherie und eine zweite Rolle im Rahmen der Immuneffektorphase innerhalb des ZNS.

## **1.4. Interferon- $\beta$**

### **1.4.1. Biologie der Typ I Interferone**

Die Erstbeschreibung der Interferone als antivirale Substanzen gelang 1957 Isaac und Lindemann. Die „Interferenz“ mit der Virusreplikation führte zur Namensgebung dieser Substanzgruppe. Interferone sind Zytokine, die früh im Rahmen einer antiviralen Immunantwort von verschiedenen Zellen sezerniert werden. Durch parakrine Wirkung entfalten sie ihre antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekte. Mittlerweile sind über 20 Interferone bekannt. Sie werden eingeteilt in zwei große Gruppen, so genannte Typ I Interferone (Interferon- $\alpha$ , - $\beta$ ) und Typ II Interferone (Interferon- $\gamma$ ). Während die Familie Interferon- $\alpha$  beispielsweise über 20 Mitglieder umfasst, ist beim Menschen nur ein Interferon- $\beta$  bekannt. Das Gen für Interferon- $\beta$  ist auf Chromosom 9 lokalisiert. Die Typ-I Interferone wirken über einen gemeinsamen Rezeptor. Die intrazelluläre Signalkaskade wird hauptsächlich über den so genannten JAK-STAT-Pathway vermittelt und führt letztlich zur Transkription zahlreicher Gene. In Microarray-Experimenten konnten weit über 100 verschiedene Interferon-induzierbare Gene beschrieben werden. Interferon- $\beta$  wird hauptsächlich von Fibroblasten und epithelialen Zellen produziert. Erst in den letzten Jahren rückte auch eine Subform Interferon- $\beta$  produzierender dendritischer Zellen, so genannte plasmatische dendritische Zellen (pDC) in den Mittelpunkt des Interesses (Siegal et al, 1999).

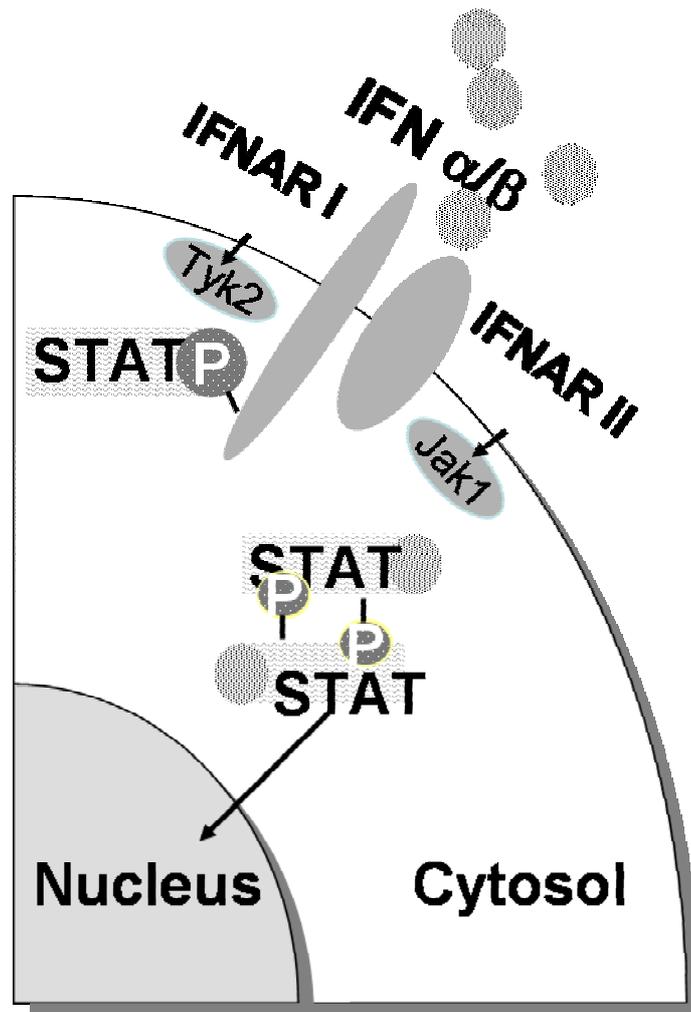


Abbildung 8: Intrazelluläre Signaltransduktion durch Interferon-β. Die Bindung von Interferon-β führt zur Aggregation von IFNAR-1 und IFNAR-2. Anschließend kommt es zu einer Aktivierung von JAK's (Januskinasen), welche durch Phosphorylierung des Rezeptors die Anlagerung von STAT-Proteinen (Signal Transducer and Activator of Transcription) ermöglicht. Es folgt die Phosphorylierung der STAT-Proteine, deren Dimerisierung und anschließende Translokation in den Nucleus, wo die Transkription zahlreicher ISG's (interferon stimulated genes) erfolgt. (in Anlehnung an Stark et al, 1998).

#### 1.4.2. Therapeutischer Einsatz von Interferon-β bei MS

Die frühesten kontrollierten Studien zum therapeutischen Einsatz von Interferon-β wurden 1978 und 1979 begonnen und berichteten ebenso wie nachfolgende kleinere Studien eine Verminderung der Schubrate bei intrathekal verabreichtem natürlichem Interferon-β (Jacobs et al, 1994). Erst die Technik zur Herstellung rekombinanten Interferon-β ebnete Anfang der 90er Jahre den Weg zu einem Einsatz in größerem

Umfang. Schließlich wurde 1993 Interferon- $\beta$  1b als erstes Medikament zur Therapie der MS in den USA zugelassen. Mittlerweile ist die Wirksamkeit subkutan oder intramuskulär verabreichten Interferon- $\beta$  in mehreren Studien mit Klasse I Evidenz belegt worden. Die Therapie mit Interferon- $\beta$  führt zu einer Reduktion der Schubfrequenz und außerdem zu einer Reduktion der Läsionslast in der MRT-Bildgebung (Reviews in Chofflon et al, 2000 und Fillipini et al, 2003). Rekombinantes Interferon- $\beta$  ist mittlerweile fester Bestandteil der Basistherapeutika zur Therapie der schubförmig-remittierenden MS (MSTKG 2005).

In den drei großen Zulassungsstudien wurde die Schubratenreduktion durch die Interferon- $\beta$  Therapie im Vergleich zu Placebo übereinstimmend mit ca 29 - 33% angegeben (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993; Jacobs et al 1996; The PRISMS study group 1998). Damit ist neben der Wirksamkeit auch eines der Probleme der klinischen Anwendung der Interferon- $\beta$  Präparate in der klinischen Praxis beschrieben, nämlich die nur teilweise Wirksamkeit. Interferon- $\beta$  wirkt nicht bei jedem Patienten in der wünschenswerten Weise. Dies sei in einer Abbildung illustriert, welche die Anzahl schubfreier Patienten über 2 Jahre bezogen auf je 100 Patienten darstellt (Abbildung 9). Die Daten beruhen auf einer Metaanalyse der drei großen Zulassungsstudien (Heesen et al, 2004). Mit „Schubfreiheit über zwei Jahre“ ist ein vergleichsweise „strenges“ Kriterium gewählt, das jedoch der gewünschten Wirkung im klinischen Alltag am ehesten entspricht. Anzumerken ist, daß das für die Abbildung gewählte Kriterium nicht dem primären Endpunkt der Studien entspricht. Die Abbildung soll jedoch das Problem illustrieren, welches Ausgangspunkt der vorliegenden Studie war: Interferon- $\beta$  zeigt eine gute klinische Wirksamkeit - dies aber nur in einem Teil der Patienten. Idealerweise würde man nur diejenigen Patienten mit Interferon- $\beta$  behandeln und damit beispielsweise auch Interferon- $\beta$  assoziierten Nebenwirkungen aussetzen, die tatsächlich von der Therapie profitieren. Wünschenswert wäre ein klinischer oder paraklinischer Marker, der mit dem Ansprechen auf die Therapie korreliert, bzw dies prognostiziert, um so jedem Patienten eine optimale Therapie zukommen lassen zu können.

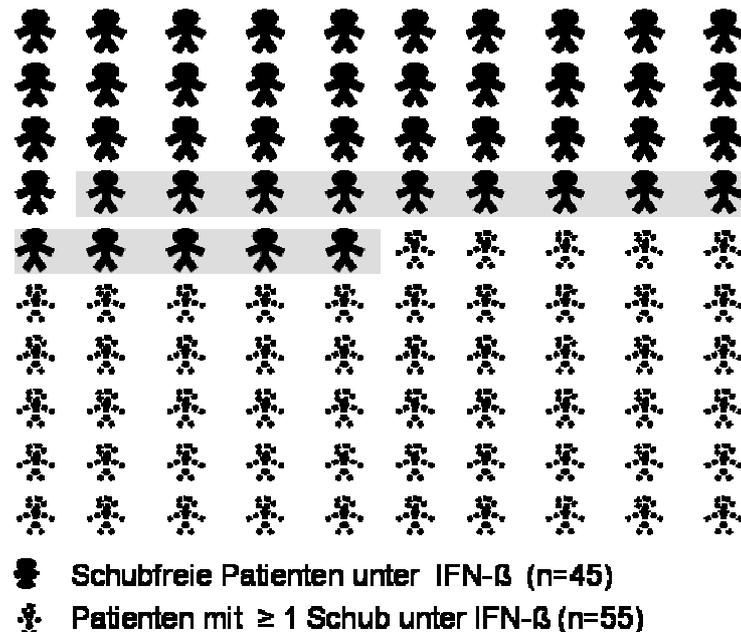
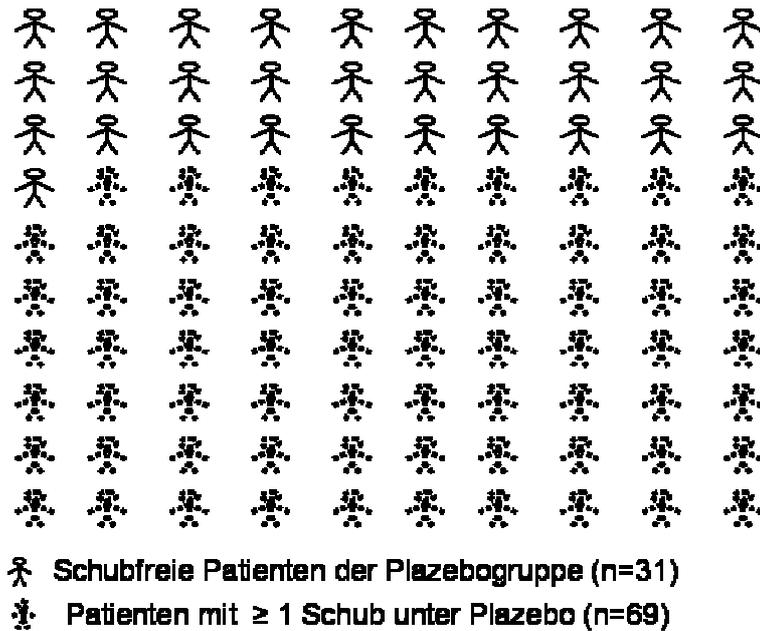


Abbildung 9: Dargestellt ist die Anzahl schubfreier Patienten bezogen auf je 100 Patienten über 2 Jahre jeweils der Placebogruppe (obere Abbildung) und der Gruppe der mit IFN- $\beta$  behandelten Patienten (untere Abbildung). Während in der Placebogruppe 31 Patienten schubfrei waren, betrug die Anzahl schubfreier Patienten in der Interferon- $\beta$  behandelten Gruppe 45. Die Differenz, also die vermutliche Anzahl der Patienten, die *durch* die Interferontherapie in einem Zeitraum von 2 Jahren keinen Schub erlitten, beträgt  $45 - 31 = 14$  (aus 100 behandelten Patienten). Die  $n=14$  Patienten, die von einer Therapie mit IFN- $\beta$  profitieren, sind in der unteren Abbildung mit einem grauen Balken unterlegt (in Anlehnung an Heesen et al, 2004).

### 1.4.3. Wirkmechanismen der Interferon- $\beta$ Therapie

Während die klinische Wirksamkeit von Interferon- $\beta$  bei der Therapie der MS klar gezeigt wurde, sind die zellulären und molekularen Mechanismen noch weitgehend unklar (Dhib-Jalbout et al, 2002; Yong et al, 1998). Es sind zahlreiche vereinzelte biologische Effekte beschrieben worden, deren Plausibilität vor dem Hintergrund des aktuellen Verständnisses der Pathogenese zwar gegeben, deren tatsächliche therapeutische Relevanz in vivo aber noch weitgehend unklar ist. Nach aktuellem Kenntnisstand greift Interferon- $\beta$  auf mehreren Ebenen in die Pathogenese der MS ein.

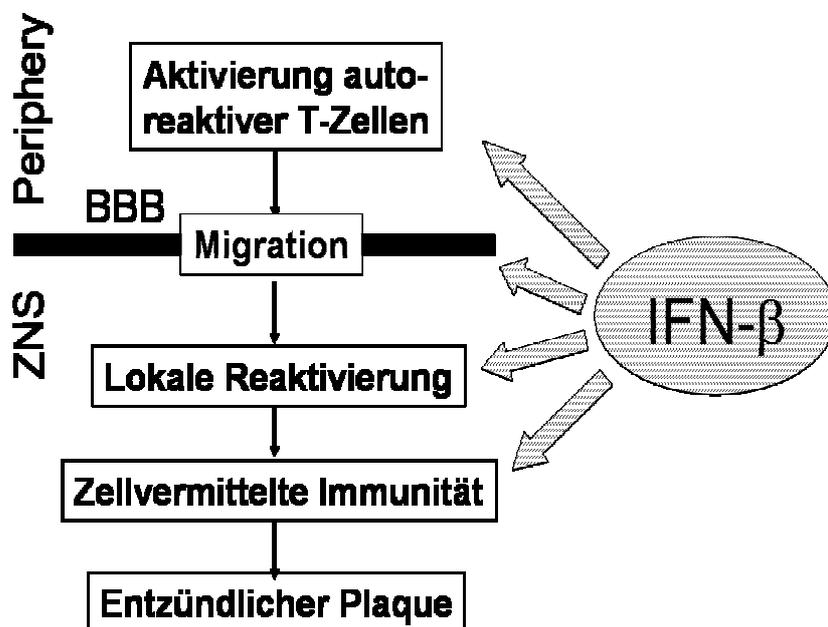


Abbildung 10: Interferon- $\beta$  greift auf verschiedenen Ebenen in die Pathogenese der Multiplen Sklerose ein.

So greift Interferon- $\beta$  beispielsweise in die Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen ein, indem durch Herunterregulation des MHC II Komplexes die Antigenpräsentation vermindert und durch Herunterregulation des Interleukin-2 Rezeptors die Proliferation von T-Zellen inhibiert wird (Hall et al, 1997, Pette et al, 1997). Außerdem wird über einen inhibierenden Einfluss auf das proinflammatorische Zytokin Interleukin 12 die Differenzierung der T-Helferzellen zu so genannten Th1 Zellen unterbunden (Wang et al, 2000). Die Transmigration aktivierter T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke wird beeinflusst durch Wirkung von Interferon- $\beta$  auf verschiedene

Adhäsionsmoleküle, Chemokine, und Matrixmetalloproteinasen, beispielsweise MMP-2 und MMP-9 (Bever et al, 1999; Martin et al 2005; Uhm et al, 1999). Schließlich wird durch Inhibition der Interferon- $\gamma$  induzierten MHC II Expression antigenpräsentierender Zellen vermutlich die Reaktivierung transmigrierter T-Zellen innerhalb des ZNS erschwert (Hall et al, 1997). Einschränkend muß angemerkt werden, daß die Liquorgängigkeit von IFN $\beta$  und damit auch die lokale Wirkung innerhalb des ZNS umstritten ist. Durch Beeinflussung zahlreicher Zytokine, beispielsweise einen inhibierenden Einfluss auf Interleukin-12, Interferon- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  und gleichzeitig einen induzierenden Einfluss auf Interleukin-10 wird ein antiinflammatorisches Milieu geschaffen, was die schädliche Immunantwort begrenzt (Karp et al, 2001, Wang et al, 2000). Mit den Fortschritten auf den Gebieten der Proteomics und Genomics werden mehr und mehr Details der Wirkweise von Interferon- $\beta$  bekannt, welche im Licht der gegenwärtigen Vorstellungen zur Pathogenese der MS zum Teil immer noch Überraschungen bieten, beispielsweise die Induktion zahlreicher proinflammatorischer Gene (Wandinger 2001). Das tatsächliche Ausmaß der beobachteten Effekte in vivo und die tatsächliche Relevanz auf die therapeutische Wirksamkeit bleibt jedoch weitgehend unklar.

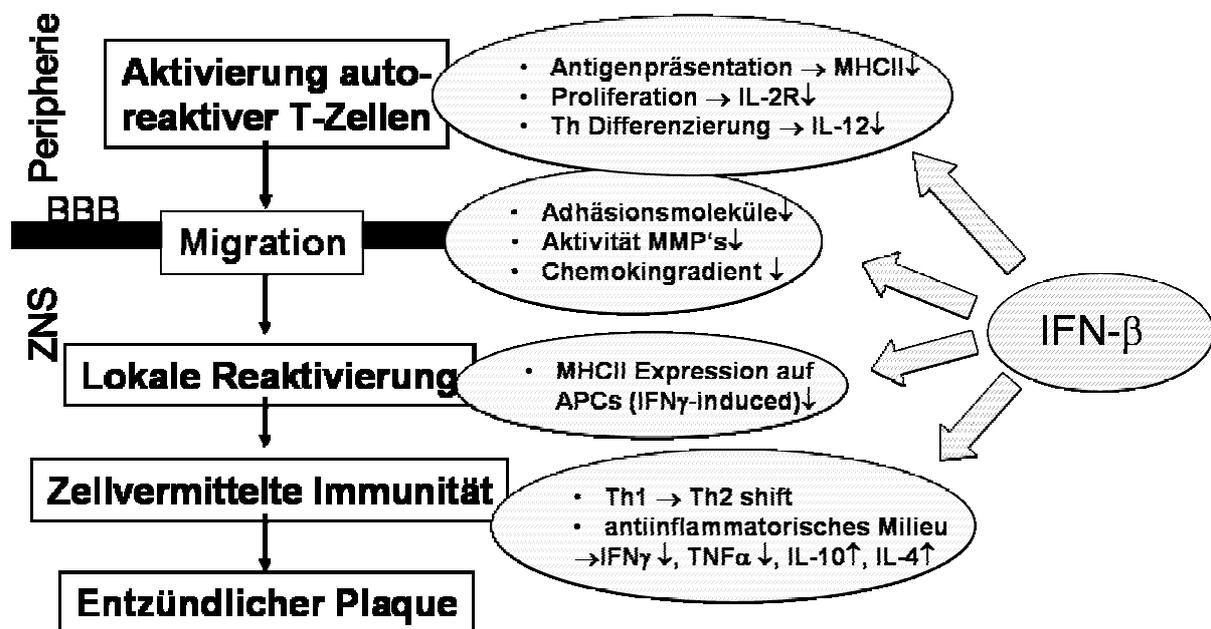


Abbildung 11: Wirkmechanismen von Interferon- $\beta$ . Hier dargestellt die Beeinflussung der Hauptschritte der Pathogenese. Interferon- $\beta$  greift auf verschiedenen Ebene sowohl in die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie, als auch in die Transmigration

**aktivierter T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke, als auch in die lokale Reaktivierung und terminale Immuneffektorkaskade ein.**

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Auswahl der Patienten

Die untersuchten Patienten entstammen, sofern nicht anders angegeben, aus dem Patientenkollektiv der sog. MASTER-Studie („MS antibody status and therapy evaluation with Rebif“). Einschlusskriterien waren: Patienten mit klinisch gesicherter oder laborgestützter Multipler Sklerose (Diagnosekriterien nach Poser et al, 1984), Alter von 18 – 55 Jahren, schubförmig-remittierende Verlaufsform der MS über mehr als 2 Jahre, mindestens 2 ärztlich dokumentierte Schübe in den letzten 2 Jahren vor Studienbeginn, kein schubförmiges Ereignis in den letzten 4 Wochen vor Studienbeginn, EDSS (Kurtzke et al, 1983) 0-5.5 und keine immunmodulatorische Therapie in den vorhergegangenen 6 Monaten. MRT-Befunde der Patienten wurden nicht systematisch dokumentiert und waren auch nicht Bestandteil der Studienuntersuchungen. Im Rahmen der Studie erfolgte die Therapie mit IFN $\beta$  1-a (Rebif, Serono, Unterschleissheim), in einer Dosierung von 44 $\mu$ g einmal pro Woche, subkutan verabreicht. Während der Studienzeit wurden die Patienten regelmäßig hinsichtlich des Auftretens von Krankheits-Schüben und Verschlechterung des EDSS-Status untersucht. Blutentnahmen erfolgten zu vier festgelegten Zeitpunkten während des Studienzeitraumes: Bevor (Woche 0), sowie 4, 26 und 52 Wochen nach Beginn der Interferon- $\beta$  Therapie. Klinische Untersuchung und Blutentnahme erfolgten jeweils 3 Tage nach Interferoninjektion. Für die Subgruppe der Patienten die im Studienverlauf neutralisierende Antikörper gegen Interferon- $\beta$  entwickelten (siehe unten) lagen zusätzlich zu den o.g. Zeitpunkten Daten und Material für den Zeitpunkt von 78 Wochen nach Behandlungsbeginn vor.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine Auswahl aus der Gesamtstudienpopulation getroffen, um nur Patienten einzuschließen, von denen PBMC über den vollständigen longitudinalen Verlauf vorhanden waren (n=62). Ausgeschlossen wurden weiterhin Patienten, welche zu einem Zeitpunkt der Probenentnahme eine Cortisontherapie erhielten. Für eine Subgruppenanalyse wurden die Patienten je nach klinischem Ansprechen auf die Therapie in sog. Responder und sog Nonresponder eingeteilt. Die Einteilung beruhte auf folgenden Kriterien: Als Responder (n=20) wurden Patienten definiert, die unter Behandlung keinen Schub erlitten und bei denen keine Verschlechterung des EDSS auftrat. Als Nonresponder

(n=19) wurden Patienten bezeichnet, die unter der Behandlung Schübe erlitten und/oder eine EDSS-Progression aufwiesen. Als eine dritte Subgruppe wurden Patienten definiert, bei denen neutralisierende Antikörper (Nab) gegen Interferon- $\beta$  nachgewiesen wurden (n=23). Neutralisierende Antikörper wurden bestimmt in einem MxA induction assay (Kracke et al, 2000). In der Subgruppe der Nab-positiven Patienten konnten nach den o.g. Kriterien n=17 als Responder und n=6 als Nonresponder definiert werden. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Eine zweite Patientenkohorte bestand aus 20 Patienten mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose welche sich in regelmäßiger Behandlung in der neuroimmunologischen Sprechstunde Universitätsmedizin Charite Berlin befanden. Bei 11 der Patienten wurde eine Interferontherapie begonnen (Interferon- $\beta$  1a 22 $\mu$ g 3x pro Woche). Blutentnahmen und klinische Untersuchung (EDSS) erfolgten vor Behandlungsbeginn sowie 1, 2, 3, 4, 6 und 9 Monate nach Therapiebeginn. Bei 9 unbehandelten Patienten sowie bei 4 gesunden Kontrollpersonen wurde Blut zu parallelen Zeitpunkten entnommen. Zusätzlich wurden bei allen der 20 Patienten MRT-Untersuchungen vor Studienbeginn sowie nach 9 Monaten durchgeführt. Die MRT-Untersuchungen beinhalteten T2 gewichtete Aufnahmen sowie T1-gewichtete Aufnahmen mit und ohne Kontrastmittelgabe. Für die Subgruppenanalyse der mit Interferon- $\beta$  behandelten Patienten erfolgte die Einteilung in Responder und Nonresponder sowohl nach klinischen als auch nach bildgebenden Aspekten. Folgende Kriterien definierten Therapie-Responder (n=5): kein Schub während des Beobachtungszeitraumes, keine EDSS-Progression, keine Zunahme der Läsionslast in T1- und T2-gewichteten Sequenzen, keine Kontrastmittel aufnehmenden Läsionen. Als Nonresponder definiert (n=6) wurden Patienten mit Auftreten von schubförmigem Ereignis unter Therapie und/oder MRT-Progression hinsichtlich Zunahme der Läsionslast und/oder Nachweis von Kontrastmittel aufnehmenden Läsionen. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Darüber hinaus erfolgten Blutentnahmen für begleitende in vitro Stimulationsexperimente von weiteren gesunden Kontrollpersonen.

## **2.2. Probengewinnung**

Blutentnahmen erfolgten in EDTA-Röhrchen (0,002 mol/l EDTA). PBMC wurden isoliert mittels Dichtegradientenzentrifugation (Lymphoprep, Lycomed Pharma, Norwegen) und in Gefriermedium (RPMI-1640 mit 20% FCS; Gibco, Karlsruhe, und 10% DMSO; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in flüssigem Stickstoff bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

## **2.3. RNA-Isolierung und Reverse Transkription**

Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit dem „RNeasy-Kit“ (Qiagen, Santa Clara, USA). Zur Gewinnung von cDNA wurden Taqman Reverse Transcription Kits (Perkin Elmer, Foster City, CA) benutzt und gemäß den Herstellerempfehlungen eingesetzt.

## **2.4. Real-time PCR**

Die Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels Real-time PCR. Von zentraler Bedeutung für diese Technik sind die hydrolytische Aktivität der Taq-Polymerase und eine zweifach fluoreszenzmarkierte Sonde, die zwischen forward und reverse primer an das Amplikon bindet. Im intakten Zustand wird das Fluoreszenzsignal des „Reporters“ am 3' Ende durch das Signal des „Quenchers“ am 5' Ende aufgrund der räumlichen Nähe unterdrückt. Im Falle der Amplifikation wird der Reporter-Farbstoff durch die Taq-Polymerase über eine hydrolytische Degradation der Sonde freigesetzt. Die durch Ablösen des Reporterfarbstoffes erzeugte Fluoreszenzemission wird während des gesamten Reaktionsablaufes aufgezeichnet. Es besteht ein lineares Verhältnis zwischen der Menge des Amplikons und der Stärke des Reporter-Fluoreszenzsignals. Die Ausgangsmenge an cDNA (RNA) korreliert dabei mit der Zeit (gemessen in Reaktionszyklen) bei der die Fluoreszenzemission einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Diese Technik erlaubt eine objektive, präzise, sensitive und reliable Quantifizierung des PCR-Produktes. Durch den Einsatz einer DNS-Sonde zusätzlich zu den Primern wird gegenüber der konventionellen PCR zudem eine höhere Spezifität erreicht. Die Real-time PCR Technik bietet damit optimale Voraussetzungen für eine quantitative Untersuchung der Genexpression.

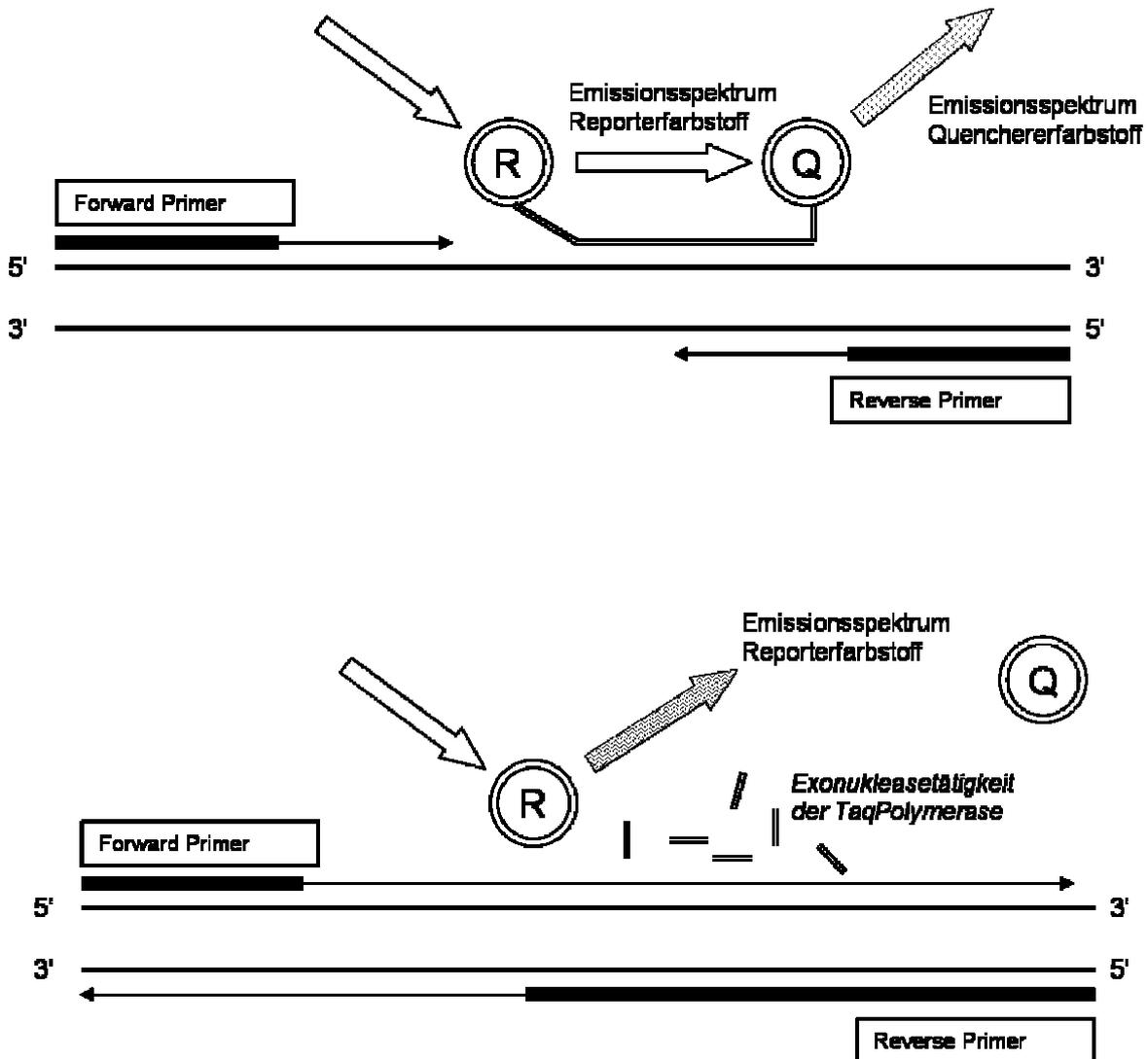


Abbildung 12: Prinzip der Taqman-PCR. Besonderheit der Taqman-PCR ist der Einsatz einer 2-fach Fluoreszenzmarkierten Sonde. Jeder der Farbstoffe Reporter (R) und Quencher (Q) besitzt ein verschiedenes Emissionsspektrum. Das Emissionsspektrum des Reporterfarbstoffes entspricht dem Absorptionsspektrum des Quencherfarbstoffes. Ist die Sonde intakt, wird daher die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes von der des Quencherfarbstoffes absorbiert. Zweites wichtiges Prinzip der Real-Time PCR ist die Ausnutzung der Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Durch die Exonukleasetätigkeit der Taq-Polymerase kommt es zur Degradation der Sonde und Freisetzung des Reporterfarbstoffes, bzw Trennung von Reporter und Quencher. Infolgedessen kann jetzt direkt das Emissionsspektrum der Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes aufgezeichnet werden. Das Fluoreszenzsignal des Reporters ist damit direkt proportional zur Menge des Amplifikats. Außerdem erlaubt diese Technik den „real-time“ Nachweis der Amplifikatsmenge noch während der laufenden Reaktion.

Für die Real time PCR benutzt wurde das ABI Prism 7700 Detection System (Perkin Elmer) sowie an Chemikalien das Taqman Gold reverse transcriptase PCR-Kit. Die Messungen erfolgten jeweils als Duplikate in einem Volumen von 50µl pro well. Akzeptiert wurde maximaler Unterschied der Duplikate von 0,5 C<sub>t</sub>. Als so genanntes housekeeping gene wurde 18S rRNA bzw HPRT verwendet. Für die Amplifikation von CD95 wurde ein kommerziell erhältliches panel benutzt (Perkin Elmer). Oligonukleotidkonzentrationen für die weiteren panels betragen 200 nmol/l für je forward und reverse primer sowie 100 nmol/l für die fluoreszenzmarkierte Sonde. Verwendete Nukleotidsequenzen für Primer und Sonden sind untenstehend gelistet. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse bezogen auf ein housekeeping gene (18S bzw. HPRT) erfolgte anhand der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

**Table 1:** Sequenzen der verwendeten primer und probes

<b>Name</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Probe</b>
HPRT	5'- AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G - 3'	5'- GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G-3'	(FAM)5'- TTT CAC CAG CAA GCT TGC GAC CTT GA -3'(TAMRA)
MxA	5'- CAG CAC CTG ATG GCC TAT CAC- 3'	5'- GAG CAT GAA GAA CTG GAT GAT CAA- 3'	(FAM)5'- AGC AAG CGC ATC TCC AGC CAC ATC -3'(TAMRA)
FLIP	5'- CAT CCA CAG AAT AGA CCT GAA GAC AA -3'	5'- GCT TGG AGA ACA TTC CTG TAA CTT G - 3'	(FAM)5'- CTG CTC CTT GAA CAG ACT GCT TGT ACT TCT GGA T- 3'(TAMRA)
Bcl - X <sub>L</sub>	5'- TGC ATT GTT CCC ATA GAG TTC CA- 3'	5'- CCT GAA TGA CCA CCT AGA GCC TT- 3'	(FAM)5'- AAA GTA TCC CAG CCG CCG TTC TCC TG -3'(TAMRA)
Bcl - 2	5'- CAT GCT GGG GCC GTA CAG- 3'	5'- GAA CCG GCA CCT GCA CAC- 3'	(FAM)5'- CAC AAA GGC ATC CCA GCC TCC GTT - 3'(TAMRA)
Bag - 1	5'- AGT CTG TGG AGA AGA TAG CTG ACC A 3'	5'- GAG AGC TTC AGC TTG CAA ATC C - 3'	(FAM)5'- CTT ACT GGA ATC CAG CAG GGT TTT CTG CC - 3'(TAMRA)
TRAIL	5'- CAG AGG AAG AAG CAA CAC ATT GTC T- 3'	5'- TGA TGA TTC CCA GGA GTT TAT TTT G - 3'	(FAM)5'- ACT CCA AGA ATG AAA AGG CTC TGG GCC -3'(TAMRA)
Caspase- 3	5'- CCA GTG GAG GCC GAC TTC T - 3'	5'- GGA GCC ATC CTT TGA ATT TCG - 3'	(FAM)5'- TAT GCA TAC TCC ACA GCA CCT GGT TAT TAT TCT TG- 3'(TAMRA)
Fas-L	5'- ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG G - 3'	5'- ATG GGC CAC TTT CCT CAG CT - 3'	(FAM)5'- AAG CAA ATA GGC CAC CCC AGT CCA CC - 3'(TAMRA)
18s	5'- CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA - 3'	5'- GCT GGA ATT ACC GCG GCT - 3'	(VIC)5'- TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C - 3'(TAMRA)

## 2.5. Stimulationsexperimente

Frisch aufgetaute PBMC wurden resuspendiert in Isocove's modified Dulbecco's medium (Gibco, Grand Islands, NY, USA) unter Zusatz von 2 mmol/l L-Glutamin, 50g/l Gentamicin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Whittaker, Bioproducts, Gaithersburg, MD, USA) sowie 5% Humanserum. Anschließend erfolgte die Inkubation in 48 well plates in einer Menge von  $10^6$  Zellen pro well in einem Volumen von 1ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Für Stimulationszwecke wurden bei den entsprechenden Experimenten 1mg/l Phytohämagglutinin (Sigma-Aldrich, Steinheim), bzw. rekombinantes humanes Interleukin 2 (Proleukin, Eureka, Frankfurt) bzw. rekombinantes humanes Interferon- $\beta$  1a in einer Konzentration von 10 bzw. 100 IU/ml (Rebif®, Serono, Unterschleißheim) zugegeben.

## 2.6. ELISA

Bei kommerziell erhältlichen ELISA's werden Mikrotiterplatten verwendet, welche bereits mit einem monoklonalen Antikörper gegen das zu untersuchende Antigen beschichtet sind. Die zu untersuchenden Proben reagieren mit diesem Antikörper. Nach Zugabe von mit Meerrettichperoxidase-markierten polyklonalen Antikörpern bildet sich in einer anschließenden Inkubation ein Sandwich-Komplex aus dem ersten Antikörper, der zu untersuchenden Substanz (Antigen) in der Probe und dem enzymmarkierten zweiten Antikörper. Überschüssiger enzymmarkierter Antikörper wird durch Waschen entfernt. Durch Zugabe einer chromogenen Lösung mit Tetramethylbenzidin geschieht die Bildung eines farbigen Endproduktes. Die Absorption kann nun gemessen werden, wobei die Farbintensität proportional der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe ist.

Durch das Mitführen von Standardproben bekannter Konzentration wurde eine Referenzgerade erstellt, mit der die Konzentration der Proben berechnet werden konnte. Der Leerwert, die Standardproben und die Proben wurden jeweils als Doppelwert gemessen.

Zur quantitativen Erfassung des löslichen TRAIL (sTRAIL) wurde ein Sandwich-ELISA gemäß Protokoll des Herstellers verwendet (Trinova Biochem, Gießen).

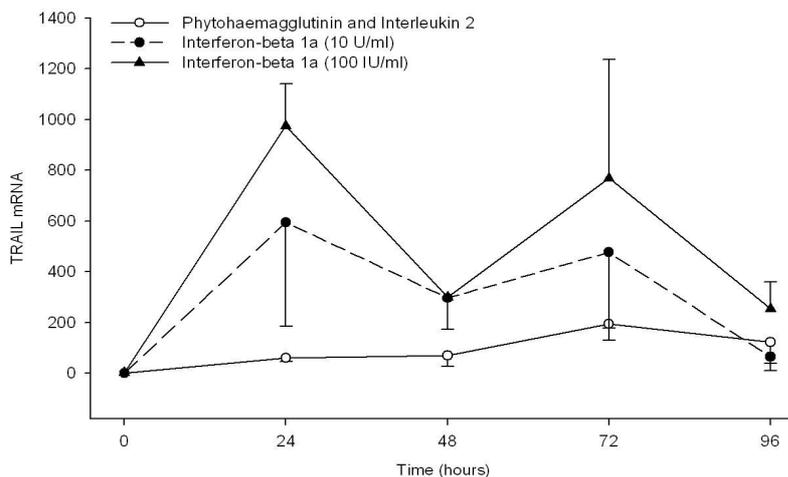
## 2.7. Statistische Auswertung

Die Darstellung der Daten, insbesondere der longitudinalen Verläufe, erfolgte als Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Ein Teil der Daten (insbesondere Gruppenvergleiche) ist als sog „boxplot“ dargestellt, mit Angabe von Median, sowie der 25. und 57. Perzentile. Die über die „boxes“ hinausragenden Linien bezeichnen die 10. und 90. Perzentile. Eine Kalkulation der erforderlichen Fallzahl wurde nicht durchgeführt. Limitiert wurde die Anzahl der Proben durch die Anzahl der vorhandenen PBMC kompletter longitudinaler Verläufe. Die statistische Auswertung hinsichtlich Signifikanzprüfung wurde je nach Fragestellung zunächst mit dem Mann-Whitney Rangsummen-Test oder dem Wilcoxon Test durchgeführt. Der Mann-Whitney Rangsummen-Test ist ein nichtparametrischer statistischer Test und beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein zwischen zwei unabhängigen Gruppen beobachteter Unterschied auf Zufall beruht. Eine Normalverteilung in den Gruppen ist dabei nicht erforderlich. Der Mann-Whitney Rangsummen-Test wurde bevorzugt verwendet, um Gruppenunterschiede (baseline bzw. zu einzelnen Zeitpunkten) zu beschreiben. Der Wilcoxon Test ist ebenfalls ein nicht-parametrischer statistischer Test und beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein innerhalb einer Gruppe beobachteter Unterschied auf Zufall beruht. Eine Normalverteilung ist dabei ebenfalls nicht erforderlich. Der Wilcoxon-Test wurde bevorzugt verwendet, um Unterschiede zwischen baseline und einzelnen Zeitpunkten nach Therapiebeginn zu beschreiben. Weiterhin wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt, um Unterschiede zwischen mehr als 2 Gruppen zu detektieren. In Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Biometrie erfolgte außerdem eine Auswertung anhand einer nicht-parametrischen multivariaten zweifaktoriellen Varianzanalyse unter Berücksichtigung der Meßwiederholung (Behandlung und Wiederholungen als Faktoren) (Brunner 2002). Daher konnten alle Zeitpunkte auf einer entsprechenden Responsekurve gleichzeitig miteinander verglichen werden. Prädiktive diskriminative Faktoren wurden anhand einer ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics) ermittelt. Die ROC-Kurve beschreibt den Zusammenhang von Sensitivität und Spezifität beispielsweise eines diagnostischen Tests. Die einzelnen Punkte der Kurve beschreiben entsprechend dem jeweiligen Cutoff die Relation der beiden Validitätsmaße. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 11.0.1 und SAS Version 8.2.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Kinetik der TRAIL mRNA Expression nach Interferon- $\beta$ Stimulation

Zeitpunkt der Blutentnahme bei dem Haupt-Patientenkollektiv der für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden Proben war jeweils 3 Tage nach erfolgter Interferon- $\beta$ -Injektion. Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde zunächst der Fragestellung nachgegangen, inwiefern dieser Zeitpunkt post injectionem geeignet ist, um die maximale IFN $\beta$ -induzierte Änderung der Transkriptionsrate von TRAIL zu erfassen. Zu diesem Zweck wurde eine in vitro Kinetik unter Verwendung humaner PBMC zweier gesunder Kontrollpatienten durchgeführt. PBMC wurden inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Interferon- $\beta$  1a (10 IU/ml und 100 IU/ml) sowie mit PHA und Interleukin-2. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden erfolgte die Bestimmung von TRAIL mRNA via Taqman PCR. Es zeigte sich eine dosisabhängige, rasche und 2-gipflige Kurve (Maximum bei 24 Stunden, zweiter Gipfel bei 72 Stunden) der Induktion von TRAIL mRNA nach Stimulation mit Interferon- $\beta$  (Abbildung 13). Stimulation mit PHA und Interleukin-2 resultierte in einer vergleichsweise deutlich abgeschwächten und verzögerten Kinetik der TRAIL Induktion. – Die Ergebnisse zeigen, daß der Zeitpunkt der Blutentnahme der zur Verfügung stehenden Proben dem Zeitfenster der TRAIL-Induktion auf Genexpressionsebene nach Interferon- $\beta$  Stimulation entspricht.



**Abbildung 13: Kinetik der Induktion der TRAIL Genexpression durch Stimulation mit Interferon- $\beta$  in vitro. Inkubation mit Interferon- $\beta$  führt zu einer raschen und dosisabhängigen Induktion der Expression von TRAIL. Die Kinetik zeigt einen zweigipfligen Verlauf mit Maximum nach 24 Stunden und zweitem Gipfel nach 72 Stunden. Stimulation mit PHA und Interleukin-2 führt im Vergleich zur Interferon- $\beta$  Stimulation zu einer erniedrigten und verlangsamten Kinetik der TRAIL-Induktion.**

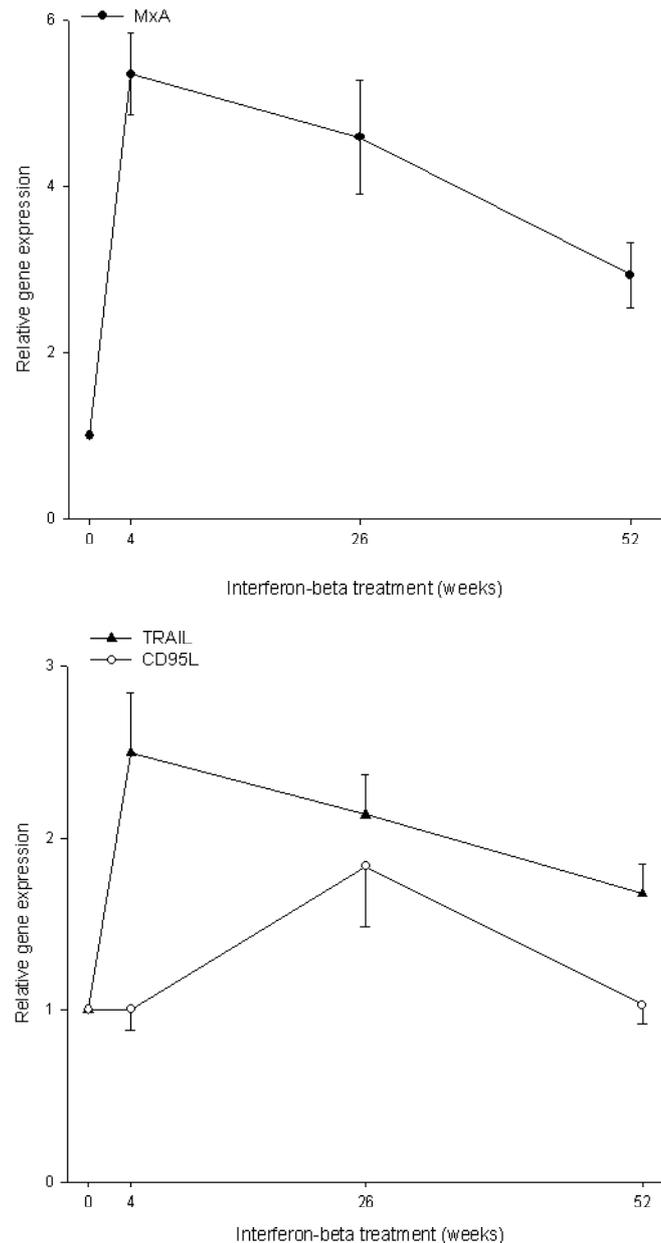
### 3.2. TRAIL wird ex vivo induziert durch Therapie mit Interferon- $\beta$

Im ersten Teil der vorgelegten Arbeit wurde die Expression von TRAIL ex vivo in PBMC von IFN $\beta$  behandelten RR-MS Patienten untersucht. Es ist bekannt, daß die TRAIL Genexpression durch Verabreichung von Interferon- $\beta$  induziert wird (Wandinger et al 2001). Ob es sich dabei um einen nur transienten oder anhaltenden Effekt handelt und ob dies überhaupt eine therapeutische Relevanz hat, ist jedoch unklar. Die erste Frage lautete, ob es in vivo zu einer langanhaltenden Induktion von TRAIL kommt. Untersucht wurden 62 Patienten mit klinisch gesicherter MS, die an o.g. Therapiestudie mit IFN $\beta$  1a teilgenommen hatten. Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 zusammengefasst. PBMC dieser Patienten wurden vor Beginn der Therapie sowie 1, 6 und 12 Monate nach Therapiebeginn mittels Taqman auf die TRAIL mRNA Expression untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß TRAIL bereits früh und anhaltend über den gesamten Beobachtungszeitraum hochreguliert wird ( $p < 0,0001$ , MANOVA) (Abbildung 14). Um zu verifizieren, daß die verabreichte Interferon- $\beta$  Dosierung einen biologischen Effekt hatte, und die Qualität der Proben nach verschiedenen Bearbeitungsschritten wie Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  etc nicht gelitten hatte, erfolgte außerdem die Bestimmung von mRNA für MxA, ein Protein das als biologischer Responsemarker für Typ I Interferone charakterisiert ist (von Wussow et al, 1990). Die Daten zeigen ebenfalls eine frühe und über den Beobachtungszeitraum weitgehend anhaltende Induktion von MxA durch eine Interferon- $\beta$  Therapie (Abbildung 14). Um die Spezifität des beobachteten Effektes für TRAIL genauer zu charakterisieren, erfolgte die Bestimmung von mRNA für CD95Ligand (FasL), ein Molekül was ebenso wie TRAIL zur TNF-Rezeptoren-Familie gehört, welche untereinander eine weitgehende Aminosäuresequenz-Homologie aufweisen. Die Daten zeigen für CD95L eine zwar statistisch signifikante, aber nicht eindeutig auch biologisch relevante Induktion der Genexpression ( $p = 0,0243$ , MANOVA) (Abbildung 14). (Als biologisch relevant wurden größer 2-fache Unterschiede der Genexpression gewertet). Die hier gewonnenen Ergebnisse einer selektiven Hochregulation von TRAIL und fehlendem Effekt auf CD95L entsprechen publizierten Ergebnissen von in vitro Experimenten mit IFN $\beta$  Stimulation von PBMC (Wandinger et al, 2001).

Tabelle 2: Klinische Charakterisierung der Patienten (Interferon- $\beta$  1a 44 $\mu$ g 1x pro Woche)

	Mittleres Alter (Jahre)	Sex w/m	Ekrankungsdauer (Monate)	EDSS baseline	EDSS Woche 52/78	Schubrate 2 Jahre vor Studienbeginn	Schübe während Beobachtungszeit	NAB Titer (INU/ml) Woche 52	NAB Titer (INU/ml) Woche 78
Subgruppe	n (%)		Mittelwert (range)	Median (range)	Median (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)
Gesamt	62 (100)	45/17	68.9 (1-307)	2.3 (0.0-5.5)	2.3 (0.0-6.5)	2.9 (2-10)	0.8 (0-4)	286.8 (0-2001)	376.6 (0-2001)
Responder	20 (32)	12/8	51.52 (7-150)	2.2 (1.0-3.5)	1.8 (1.0-3.5)	2.6 (2-6)	0	0	0
Non-Responder	19 (31)	15/4	61.2 (1-216)	2.6 (1.0-5.5)	3.0 (1.0-6.5)	2.9 (2-5)	1.9 (1-3)	0	0
Neutralizing antibodies (Nab)	23 (37)	18/5	80.4 (4-307)	2.3 (0.0-4.0)	2.1 (1.0-5.0)	3.0 (2-10)	0.6 (0-4)	773.1 (100-2001)	1111.1 (230-2001)

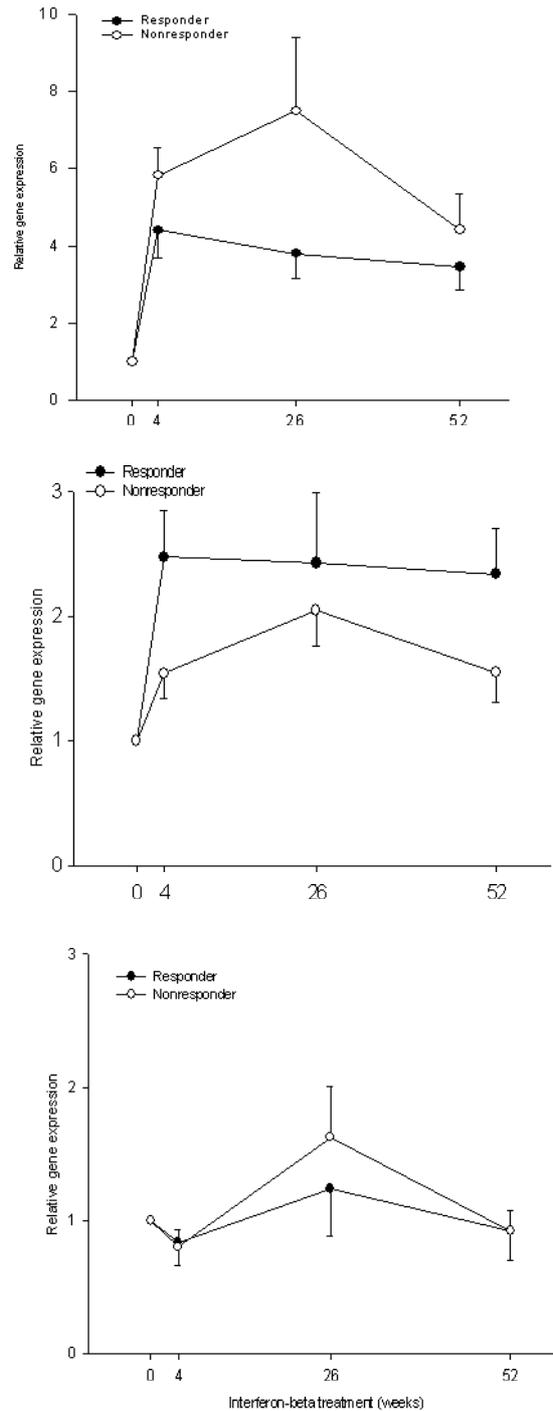
INU: Interferon Neutralizing Units



**Abbildung 14: Regulation der Genexpression von MxA, TRAIL und CD95L unter Interferon- $\beta$  1a Therapie. Interferon- $\beta$  führt zu einer frühen und anhaltenden Induktion von MxA, einem biologischen Responsemarker für Typ I Interferone (obere Abbildung). Interferon- $\beta$  Therapie führt zu einer frühen und anhaltenden Hochregulation von TRAIL (untere Abbildung). Die Hochregulation von CD95L nach Beginn der Interferon- $\beta$  Therapie zeigt zwar statistische Signifikanz, bei Änderung der Genexpression  $< 2$ -fach ist dies jedoch nicht sicher von biologischer Relevanz. (Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler)**

### **3.3. TRAIL als Responsemarker des Therapieerfolgs**

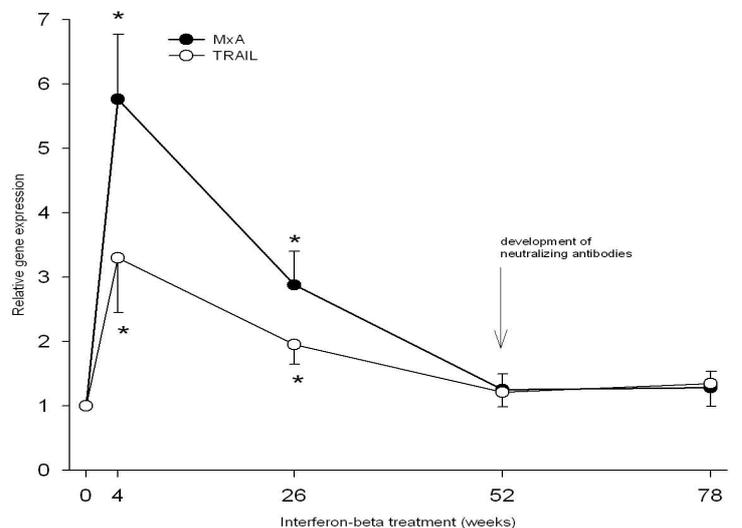
Die nächste Frage war, ob sich Individuen mit gutem Ansprechen auf die Therapie (Responder) von Individuen mit mangelndem Ansprechen (Nonresponder) hinsichtlich ihres TRAIL Expressionsniveaus unterschieden. Therapieresponder (n=20) unterschieden sich von Nonrespondern (n= 19) durch eine frühe und anhaltende Hochregulation von TRAIL (Abbildung 15 Mitte, MANOVA  $p < 0,0001$ ). Die Tatsache einer signifikanten Hochregulation von MxA in beiden Gruppen spricht für eine vergleichbare allgemeine biologische Wirksamkeit von Interferon- $\beta$  (Abbildung 14 oben). Bei Non-Respondern zeigte sich sogar eine höhere Genexpression von MxA durch die Interferontherapie (MANOVA  $p=0,0178$ , Abbildung 15 oben). Die Expression von CD95L zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Subgruppen (Abbildung 15 unten, MANOVA  $p= 0,3875$ ). Daher scheint die differentielle Regulation von TRAIL bei Therapierespondern ein Spezifikum eben dieses Gens zu sein. Die Daten zeigen, daß der klinische Therapieerfolg signifikant mit der mRNA Expression von TRAIL korreliert.



**Abbildung 15: Genexpression von TRAIL, MxA und CD95L in Respondern und Nonrespondern einer Interferon- $\beta$  Therapie. MxA wird sowohl in Respondern als auch in Nonrespondern signifikant hochreguliert (obere Abbildung). TRAIL zeigt selektiv in Respondern eine signifikante und biologisch relevante (> 2-fach) Hochregulation über den gesamten Beobachtungszeitraum (mittlere Abbildung). CD95L zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Subgruppen (untere Abbildung). (Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler)**

### 3.4. Einfluß neutralisierender Antikörper auf die TRAIL Expression

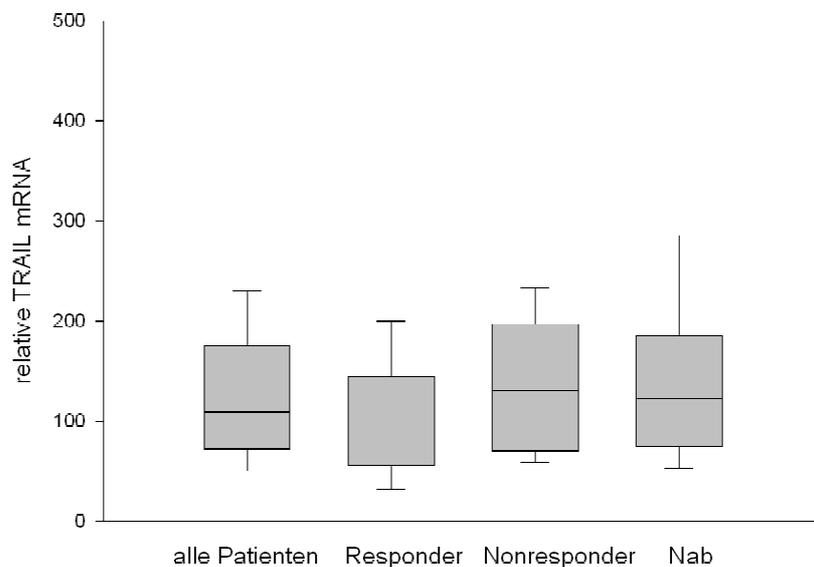
Die Behandlung mit Interferon- $\beta$  kann zur Entwicklung neutralisierender Antikörper (Nab) führen. Dies kann zu einer Abschwächung der klinischen Wirksamkeit führen. Die nächste Frage lautete, inwieweit sich neutralisierende Antikörper auf die TRAIL mRNA Expression auswirken. Es wurden 23 Patienten identifiziert, die während des Studienzeitraumes neutralisierende Antikörper entwickelten. Die Antikörpertiter wurden nach 78 Wochen kontrolliert (Tabelle 2). Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression sowohl von MxA als auch auf TRAIL. Die initiale Induktion von MxA wurde durch die Entwicklung neutralisierender Antikörper wieder inhibiert (Abbildung 16, systematic time effect analysed by MANOVA for 1 group  $p < 0,0001$ ; Wilcoxon Test zeigte für Wochen 4 und 26  $p < 0,0001$ , für Wochen 52 und 78  $p = 0,563$  bzw.  $p = 0,741$ ). Parallel zu der Änderung der MxA-Expression zeigte auch die Expression von TRAIL einen deutlichen inhibierenden Einfluss neutralisierender Antikörper (Abbildung 16, MANOVA  $p < 0,0001$ ; Wilcoxon Test zeigte für Wochen 4 und 26  $p < 0,0001$ , für Wochen 52 und 78  $p = 0,855$  bzw.  $p = 0,543$ ). Die mRNA Expression von CD95L wurde durch die neutralisierenden Antikörper nicht beeinflusst (Daten nicht mit abgebildet).



**Abbildung 16: Einfluss neutralisierender Antikörper gegen Interferon- $\beta$  auf die Genexpression von MxA und TRAIL.** Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises neutralisierender Antikörper. Die \* markieren mit dem Wilcoxon Test gerechnete signifikante Änderung ( $p < 0,0001$ ) der Genexpression gegenüber Baseline. Die initiale mRNA Induktion von MxA und TRAIL wird mit dem Auftreten neutralisierender Antikörper wieder inhibiert. (Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler)

### 3.5. Vergleich der baseline TRAIL-Expression zwischen den 3 Subgruppen

Die nächste Frage lautete, ob die differentielle Genregulation zwischen Respondern und Nonrespondern durch Interferon- $\beta$  Therapie eine differentielle Genexpression bereits vor Therapiebeginn widerspiegelt. In Abbildung 17 sind die baseline Werte der Genexpression für TRAIL für Responder, Nonresponder und die Subgruppe Nab-positiver Patienten aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der baseline Genexpression zwischen den Subgruppen.

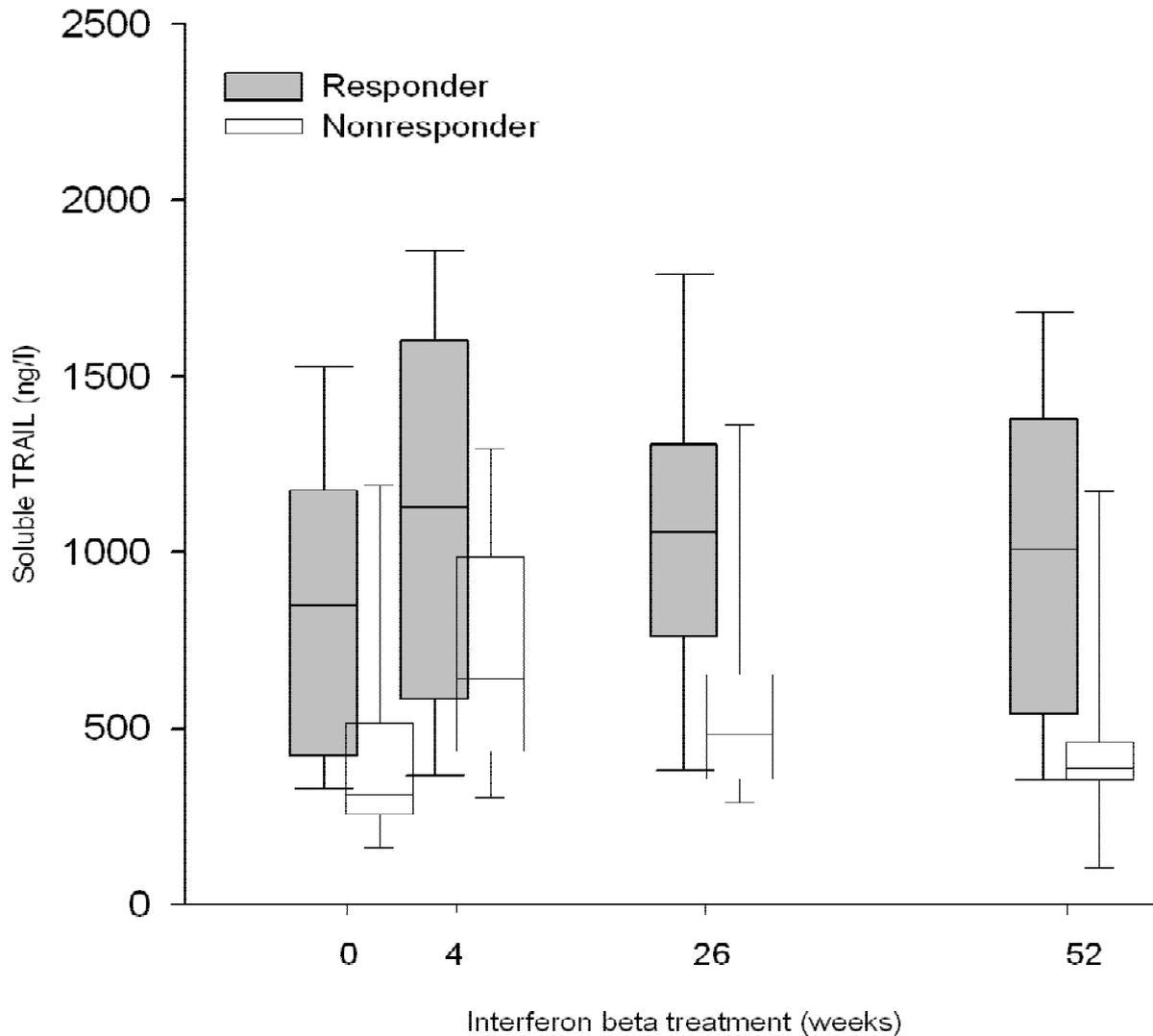


**Abbildung 17: Basale Genexpression von TRAIL in den Patientensubgruppen. Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der TRAIL Transkriptionsrate in den Subgruppen. (Daten dargestellt als boxplots, mit Angabe von Median, sowie 25. und 75. Perzentile. Die Linien die über die Kästchen hinausragen bezeichnen 10. und 90. Perzentile.)**

### 3.6. Lösliches TRAIL im Vergleich Responder vs Nonresponder

Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse wurde als nächstes TRAIL auf Proteinebene bestimmt. Dazu wurde eine ELISA Messung des löslichen TRAIL (sTRAIL) im Serum der in Tabelle 2 charakterisierten Patienten durchgeführt. Serumproben waren lediglich von n=23 der bisher untersuchten Nab-negativen Patienten vorhanden. Die Ergebnisse einer differentiellen mRNA Induktion zwischen Respondern und Nonrespondern konnten bestätigt werden. Auch auf Proteinebene zeichneten sich Therapieresponder durch signifikant höhere Werte für TRAIL gegenüber den Nonrespondern aus

(Abbildung 18, MANOVA  $p < 0,0011$ ). Darüber hinaus zeigen die Daten, daß sich Responder von Non-respondern bereits vor Therapie durch höhere Werte für lösliches TRAIL im Serum unterschieden (Man-Whitney U test  $p = 0,004$ ).



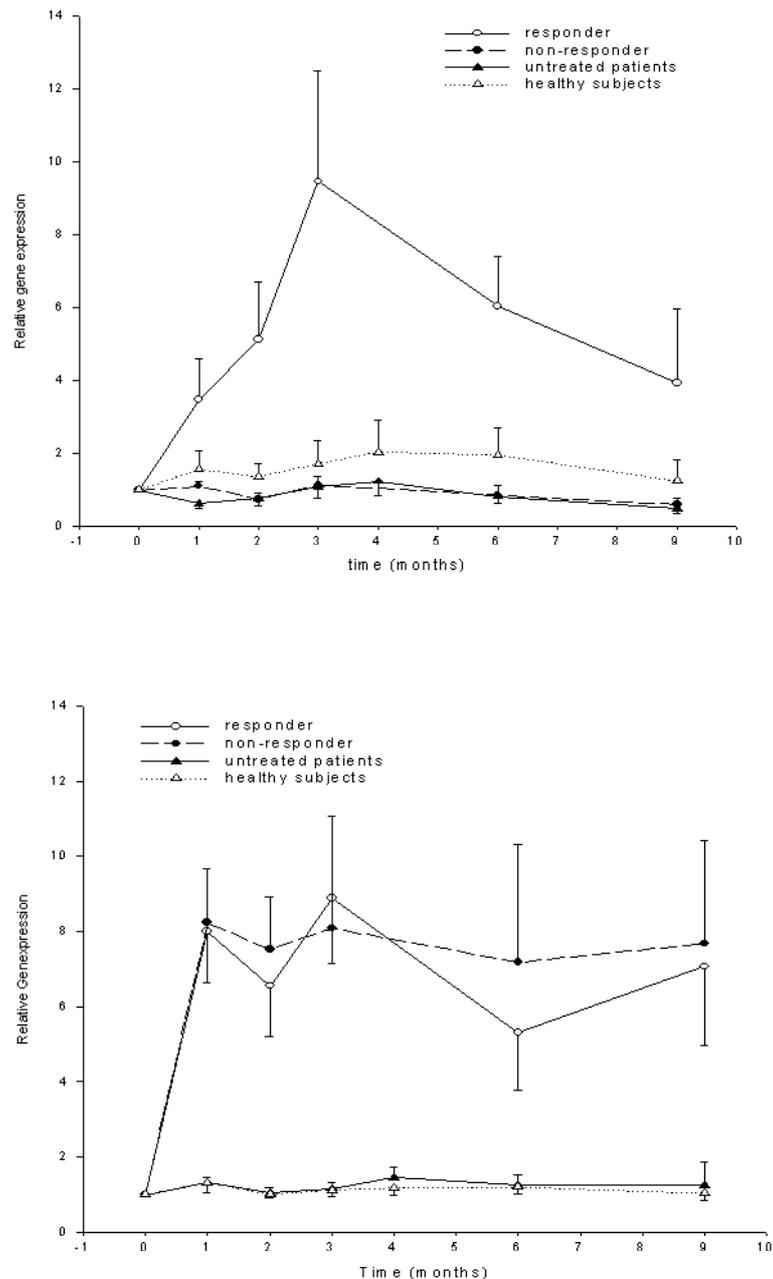
**Abbildung 18: Konzentration löslichen TRAIL's (sTRAIL) im Vergleich Responder vs Nonresponder während Therapie mit Interferon- $\beta$ . Responder zeigen im Behandlungsverlauf signifikant unterschiedliche Konzentrationen von sTRAIL im Vergleich zu Nonrespondern. Responder zeichnen sich im Vergleich zu Nonrespondern außerdem durch signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von sTRAIL bereits vor Therapiebeginn aus. (Daten dargestellt als boxplots, mit Angabe von Median, sowie 25. und 75. Perzentile. Die Linien die über die Kästchen hinausragen bezeichnen 10. und 90. Perzentile.)**

### 3.7. Bestätigung der Ergebnisse an einer zweiten Patientenkohorte

In einer zweiten, unabhängigen Patientenkohorte (Gesamtzahl n=20, mit IFN $\beta$  1a behandelte Patienten n=11), die in Bezug auf den Therapieerfolg zusätzlich kernspintomographisch untersucht wurden, sollte als nächster Schritt die bisherigen Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden. Die Patientencharakteristika und Aufteilung in Subgruppen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Blutentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten Monat 0, 1, 2, 3, 4, 6 und 9. Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte Patienten (n=9) und gesunde Kontrollpersonen (n=4), bei denen Blutentnahmen zu parallelen Zeitpunkten erfolgten. Die Therapie erfolgte mit Interferon- $\beta$  1a 22 $\mu$ g 3x wöchentlich. Zum Vergleich: bei der ersten Patientenkohorte erfolgte die Therapie mit Interferon- $\beta$  1a 44 $\mu$ g 1x pro Woche. Neben der Frage nach Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte so auch eine mögliche (von den in vitro Daten implizierte – siehe Abbildung 13) Dosisabhängigkeit der TRAIL-Regulation untersucht werden. Das Resultat bestätigte das Ergebnis einer differentiellen TRAIL Genexpression unter Therapie in Respondern und Nonrespondern (Abbildung 19, MANOVA,  $p < 0,0001$ ). In dieser zweiten, in der Standarddosierung behandelten Patientenkohorte erreichten Responder eine fast 5-fach erhöhte Induktion von TRAIL im Vergleich zu der ersten Patientenkohorte. Dies weist auf eine Dosisabhängigkeit der Induktion von TRAIL durch Interferon- $\beta$  auch bei therapeutischer in vivo Applikation hin. MxA als biologischer Responsemarker zeigte eine signifikante Hochregulation der Genexpression nach Therapiebeginn sowohl in Respondern (MANOVA  $p = 0,0064$ ) als auch in Nonrespondern (MANOVA  $p = 0,0006$ ; Abbildung 19). Sowohl in unbehandelten MS Patienten als auch in unbehandelten Kontrollpersonen konnten über einen Zeitraum von 9 Monaten keine relevanten Schwankungen der TRAIL Expression beobachtet werden.

Tabelle 3: Patientencharakteristika Klinik und MRT (Interferon-β-1a 22 µg 3x pro Woche und unbehandelte Patienten)

	n (%)	mittleres Alter (Jahre)	Sex	Erkrankungsdauer (Monate)	EDSS Woche 0	EDSS Monat 9	Schubrate 2 Jahre vor Therapie	Schübe während Studie	T2 Läsionslast Woche 0/ Monat 9	T1 Läsionslast Woche 0/ Monat 9	Neue Gd+ Läsionen während Studie
Subgruppe		(range)	W/ M	Mittelwert (range)	Median (range)	Median (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)	Mittelwert (range)
Gesamt	20 (100)	33.3 (18-47)	17/ 3	34.5 (1-196)	1.5 (0.0-4.0)	1.4 (0-4)	1.45 (1-3)	0.45 (0-2)	19.7 / 20.9 (2-83) / (5-63)	6.7 / 8.4 (0-24) / (1-23)	1.8 (0-9)
Responder	5 (25)	34.2 (27-40)	2/ 3	43 (3-123)	1.6 (1.0-2.0)	1.2 (1.0-2.0)	1.4 (1-3)	0.2 (0-1)	30.6 / 25.0 (5-83) / (5-63)	8.6 / 8.0 (2-20) / (2-18)	0 (0-0)
Non-Responder	6 (30)	32.7 (18-47)	6/ 0	62 (9-196)	2.0 (0.0-4.0)	2.0 (1.0-4.0)	1.83 (1-3)	0.83 (0-2)	23.7 / 28.0 (4-45) / (17-45)	9.7 / 12.5 (4-21) / (7-23)	4.0 (1-7)
Untreated	9 (45)	33.2 (21-46)	9/ 0	11 (1-34)	1.1 (0.0-3.0)	1.1 (0.0-2.0)	1.22 (1-3)	0.33 (0-2)	10 / 13 (2-28) / (5-34)	4.8 / 5.5 (0-24) / (1-21)	0.5 (0-2)



**Abbildung 19: mRNA Expression von TRAIL und MxA in Respondern und Nonrespondern in einer zweiten unabhängigen Patientenkohorte nach Therapiebeginn mit Interferon- $\beta$  1a vs unbehandelte Patienten und gesunde Kontrollpersonen. Die Daten zeigen eine selektive Induktion von TRAIL in Respondern im Vergleich zu Nonrespondern (obere Abbildung) bei vergleichbarer Induktion des Responsemarkers MxA in beiden Subgruppen (untere Abbildung). In PBMC unbehandelter Patienten und gesunder Kontrollpersonen konnten keine signifikanten Änderungen der Genexpression von MxA und TRAIL über den gesamten Beobachtungszeitraum festgestellt werden. (Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler)**

### **3.8. Differentielle TRAIL-Expression korreliert nicht mit Polymorphismus in der Promoterregion**

Die bisherigen Daten konnten eine differentielle Regulation des TRAIL Moleküls zwischen Respondern und Nonrespondern der Interferontherapie belegen. Die bisherigen Daten boten jedoch keinen Anhaltspunkt für eine mechanistische Erklärung dieses Phänomens. In unserem Labor wurde ein single nucleotide Polymorphismus in der TRAIL Promoterregion beschrieben (Weber et al, 2004). Die nächste Frage lautete nun, ob das Vorhandensein des beschriebenen Polymorphismus eine mechanistische Erklärung böte für die unterschiedliche Regulation von TRAIL. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen Genotyp und TRAIL Expressionsniveau bzw. Therapieresponse gefunden werden (Daten nicht abgebildet).

### **3.9. Lösliches TRAIL als prognostischer Marker des Therapieerfolges**

Da auch in der zweiten Patientenkohorte Responder bereits vor Therapie höhere sTRAIL Proteinwerte als Nonresponder aufwiesen, wurde eine ROC-Analyse zur Überprüfung des prädiktiven Wertes von sTRAIL für den Therapieerfolg durchgeführt. Die Analyse stützte sich auf zur Verfügung stehende Seren von insgesamt 49 Patienten (29 Responder und 20 Nonresponder). Bei einem Cut-off von 584,1 pg/ml konnte der Therapieerfolg anhand der Baselinewerte von sTRAIL mit einer Spezifität von 90,5% und einer Sensitivität von 71,4% vorhergesagt werden (area under the curve: 0,879; 95% Konfidenzintervall 0,785 – 0,974) (Abbildung 20). Eine zweite Analyse nur Nabnegativer Patienten (Responder n= 16, Nonresponder n=17) zeigte vergleichbare Ergebnisse. Dies bedeutet, daß die spätere Entwicklung neutralisierender Antikörper keinen Einfluss auf die Wertigkeit von sTRAIL als prädiktivem Marker des Therapieerfolges hat (Daten nicht mit abgebildet). Diese Ergebnisse weisen TRAIL als ersten prognostisch bedeutsamen Marker der Interferon- $\beta$  Therapie bei MS Patienten aus.

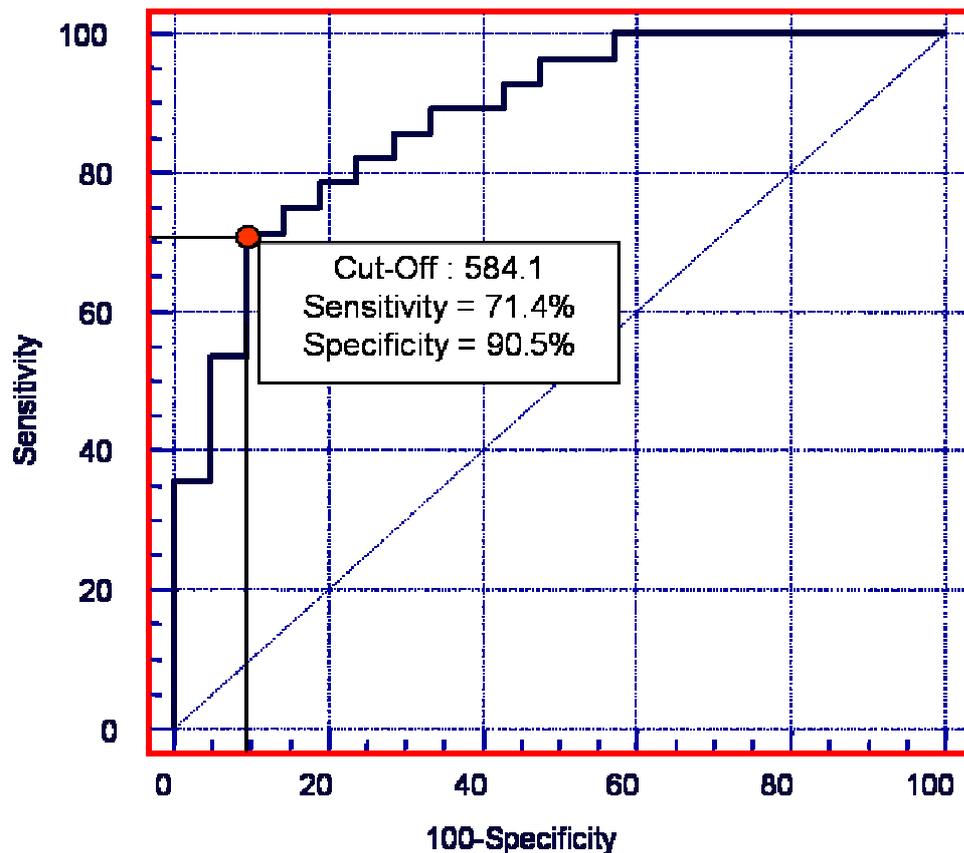
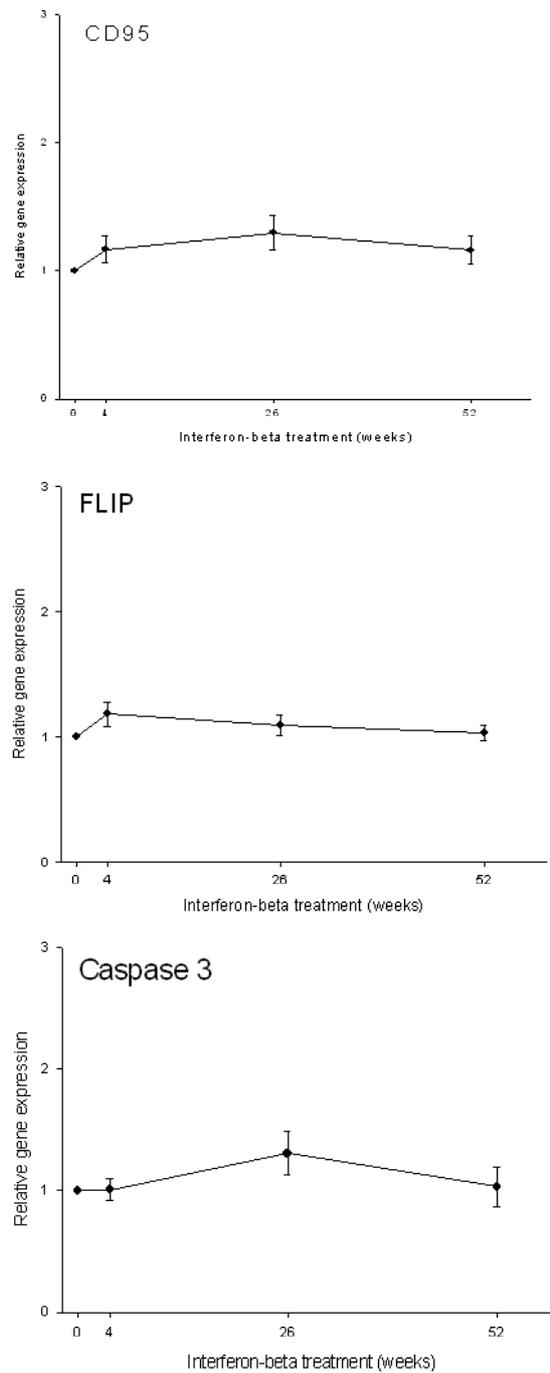


Abbildung 20: Prädiktiver Wert der Serumkonzentration von sTRAIL für die Therapieresponse für Interferon- $\beta$  1a im ersten Therapiejahr. Ermittlung des Cut-offs mit maximaler Sensitivität und Spezifität anhand der ROC-Analyse. Darstellung der Ergebnisse aller zur Verfügung stehenden Seren (Responder vs Nonresponder).

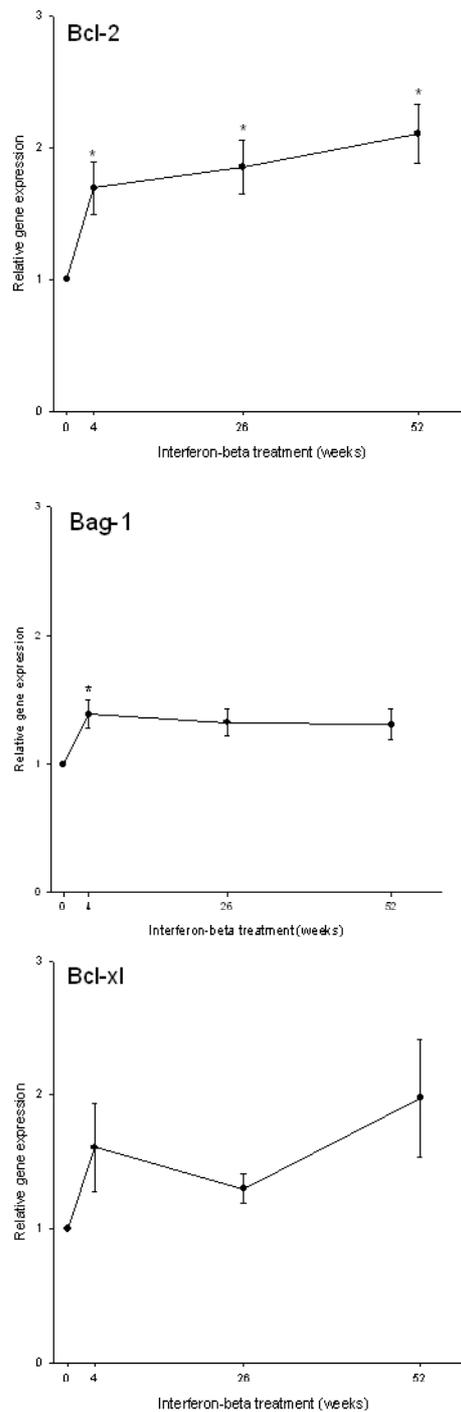
### 3.10. Einfluß der Interferon- $\beta$ Therapie auf die Transkription von Apoptosegenen

Es existieren Hinweise, daß bei der MS eine defiziente Apoptoseregulation innerhalb des Immunsystems zur Persistenz autoreaktiver (myelinspezifischer) T-Zellen führt, welche für das Entstehen der demyelinisierenden Entzündungsherde verantwortlich gemacht werden (Segal et al, 2000; Zipp et al, 1999). Daher stellte sich die Frage, ob der Behandlungseffekt von Interferon- $\beta$  möglicherweise auf beschriebene proapoptotische Eigenschaften dieses Moleküls zurückzuführen sei. Nachdem eine apoptoseinduzierende Wirkung von IFN $\beta$  ex vivo nachgewiesen konnte (Gniadek et al, 2003), sollte nun in der vorliegenden Arbeit mittels Real-time PCR der Frage nachgegangen werden, ob dieser Effekt auf eine direkte Wirkung von Interferon- $\beta$  auf

die Transkription apoptoserelevanter Gene zurückgeführt werden konnte. Zu diesem Zweck wurden in PBMC eines Teils (n=39) des oben (Tabelle 2) beschriebenen Patientenkollektivs via Real-time PCR die Transkription folgender apoptoseregulierender Gene untersucht: CD95, CD95L, FLIP, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, BAG-1, Caspase-3. In genau den hier untersuchten Patienten konnte in einer anderen Arbeit eine apoptoseinduzierende Wirkung der IFN $\beta$  Therapie gezeigt werden (Gniadek et al, 2003). Die Interferon- $\beta$  Therapie führte zu einer signifikanten Induktion des antiapoptotischen Bcl-2 Gens über den gesamten Beobachtungszeitraum von einem Jahr gegenüber baseline (Abbildung 22, p= 0,001 für Wochen 4 und 26, bzw. p= 0,0001 für Woche 52, Wilcoxon). Das Bcl-2 assoziierte Gen Bag-1 wurde nur vorübergehend induziert (Abbildung 22, p= 0,004 für Woche 4, Wilcoxon). In den weiteren untersuchten apoptoseregulierenden Genen konnte keine signifikante Regulation nach Therapiebeginn im Beobachtungszeitraum festgestellt werden (Abbildung 21 und 22). In der Subgruppenanalyse zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Genexpression zwischen Respondern und Non-Respondern.



**Abbildung 21: Einfluss von therapeutisch verabreichtem Interferon- $\beta$  auf die Transkription von Apoptosegenen. Keine relevante Änderung der Genexpression durch Therapie mit Interferon- $\beta$  für CD95 (obere Abbildung), FLIP (Mitte) und Caspase 3 (unten). (Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler)**



**Abbildung 22: Einfluss von therapeutisch verabreichtem Interferon- $\beta$  auf die Transkription von Apoptosegenen. Bcl-2 war signifikant hochreguliert durch Therapie mit Interferon- $\beta$  im Vergleich zu baseline (obere Abbildung). Bag-1 zeigte eine transiente initiale Hochregulation nach Beginn der Interferon- $\beta$  Therapie (Mitte). Die \* markieren jeweils im Wilcoxon Test gerechnete signifikante Änderungen gegenüber baseline. Genexpression von Bcl-X<sub>L</sub> blieb während der Therapie unverändert (unten). (Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler)**

## 4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation funktionell relevanter Gene der Interferon- $\beta$  Therapie. Um die Effizienz gegenwärtiger und zukünftiger Therapiestrategien zu verbessern, ist ein genaueres Verständnis der Wirkweise der aktuell verfügbaren Medikamente notwendig. Besonders wäre die daraus sich ergebende Kenntnis auch im klinischen Alltag anwendbarer Therapieresponsemarker wünschenswert. Ob es sich darum handelt, für den einzelnen Patienten von vorneherein das erfolgsversprechendste Medikament auszuwählen, oder ob es sich darum handelt, die Wirksamkeit einer begonnen Therapie vor dem Hintergrund der unvorhersagbaren Variabilität des natürlichen Erkrankungsverlaufes besser einschätzen zu können - eine genauere Kenntnis der relevanten Wirkmechanismen von Interferon- $\beta$  ist unerlässlich, um dem Ziel, einer für den individuellen Patienten „maßgeschneiderten“ Therapie näher zu kommen. Mit zunehmendem Wissen um die Heterogenität der Pathogenese der Multiplen Sklerose interindividuell und in verschiedenen Krankheitsstadien erlangt die Kenntnis therapeutisch relevanter Wirkmechanismen als Ausgangspunkt einer individualisierten Therapieentscheidung oder auch Entwicklung neuer Medikamente zusätzlich an Bedeutung. Gleichzeitig kann die Identifikation der tatsächlichen Therapierelevanz der vielfältigen biologischer Mechanismen der Interferon- $\beta$  Präparate zu einem besseren Verständnis der Pathogenese beitragen.

Apoptose ist ein streng regulierter Kontrollmechanismus in der Homöostase des Immunsystems. Eine defiziente Apoptoseregulation kann zu Autoimmunphänomenen führen (Pender et al, 1999). Mehrere Untersuchungen belegen, daß in der Pathogenese der Multiplen Sklerose eine defiziente Apoptoseregulation innerhalb des Immunsystems eine Rolle spielt, was zur Persistenz autodestruktiver T-Zellen führt (Comi et al, 2000; Segal et al, 2000; Zipp et al, 1999). Daraus ergab sich die Frage, inwieweit therapeutisch verabreichtes Interferon- $\beta$  durch Apoptoseinduktion zu einer Begrenzung der schädlichen inflammatorischen Reaktion gegen die Myelinscheiden beiträgt. Dieser Wirkmechanismus konnte beispielsweise für die Schubtherapie der MS mit hochdosierten Steroiden gezeigt werden (Leussink et al, 2001). Die Daten zu Apoptoseinduktion durch Interferon- $\beta$  in vitro sind kontrovers und erlauben keine eindeutigen Schlussfolgerungen. Es wurde in vitro sowohl eine Steigerung des AICD (Kaser et al, 1999), ein Fehlen einer direkten Apoptoseinduktion (Zipp et al, 2000), als

auch ein inhibierender Einfluss auf Apoptose von T-Zellen beschrieben (Pilling et al, 1999). Anders ist die Datenlage aus ex vivo Bestimmungen der Apoptoserate nach Interferon- $\beta$  Therapie. Hier konnte in einem großen Patientenkollektiv ein deutlicher apoptoseinduzierender Effekt beschrieben werden (Gniadek et al, 2003). Ein in vivo apoptoseinduzierender Effekt konnte von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden (Weyenbergh et al, 2001). Die Apoptoseinduktion könnte die Beobachtung von Zhang et al erklären, die eine erniedrigte Anzahl MBP-spezifischer T-Zellen unter Therapie mit Interferon- $\beta$  beschrieben (Zhang et al, 2000). Um die Apoptoseinduktion von Interferon- $\beta$  genauer zu verstehen, wurde in der vorliegenden Studie die Genexpression mehrerer Schlüsselmoleküle der Apoptoseregulation untersucht (Lenardo et al, 1999), namentlich CD95, CD95L, FLIP, Bcl-2, Bag-1, Bcl-x<sub>L</sub> und Caspase 3. In dem gleichen Patientenkollektiv wurde in einer anderen Studie die Apoptoserate bestimmt und eine signifikante Apoptoseinduktion durch die Interferon- $\beta$  Therapie gezeigt werden (Gniadek et al 2003). Die Resultate zeigen eine signifikante Hochregulation von Bcl-2 über den gesamten Studienzeitraum. Die Induktion des Gens für das antiapoptotische mitochondrienassoziierte Molekül Bcl-2 kann angesichts der gesteigerten Apoptoserate am ehesten als kompensatorischer Effekt interpretiert werden. Ferner kann bei Änderung der Transkriptionsrate kleiner bzw. grenzwertig Faktor 2 nicht sicher von einer biologischen Relevanz des beobachteten Effektes ausgegangen werden. Das gleiche gilt für die lediglich transiente Hochregulation von Bag-1, ein Molekül das in Interaktion mit Bcl-2 einen protektiven Effekt vor Apoptose besitzt (Sawitzki et al, 2001). Die weiteren untersuchten Gene zeigten keinen Effekt der Interferon- $\beta$  Therapie auf Transkriptionsebene. Zusammengefasst, konnte in der vorliegenden Studie keine relevante Korrelation der Transkriptionsrate apoptoserelevanter Gene mit der gesteigerten Apoptoserate bzw. dem therapeutischen Ansprechen nachgewiesen werden.

Wie kann nun, wenn nicht durch Änderung relevanter apoptoseregulierender Gene der ex vivo gezeigte proapoptotische Effekt von Interferon- $\beta$  erklärt werden? Ein möglicher Induktionsweg könnte über den Cyklin Kinase Inhibitor p21 gehen. Es wurde gezeigt, daß Interferon- $\beta$  in vitro p21 induziert (Sanceau et al, 2000). Sowohl in vitro (Wu et al, 2002) als auch in vivo (Fotedar et al, 1999; Santiago-Raber et al, 2001) ist p21 als proapoptotisches Molekül beschrieben worden. Es ist denkbar, daß Interferon- $\beta$  durch Induktion von p21 eine erhöhte Apoptosesuszeptibilität in Zielzellen bewirkt. Des

Weiteren ist auch ein indirekter Mechanismus über eine Inhibition des u.a. antiapoptotisch wirkenden Moleküls TGF- $\beta$  denkbar (Lünemann et al, 2001; Chen et al, 2001). Diese indirekten Mechanismen der Apoptoseinduktion wären mit der Beobachtung vereinbar, daß Interferon- $\beta$  auf antigenspezifische T-Zellen keine direkte apoptose-induzierende Wirkung hat (Zipp et al, 2000).

In einem weiteren Teil der vorliegenden Studie wurde der Einfluss therapeutisch verabreichten Interferon- $\beta$  auf die Transkriptionsrate von TRAIL untersucht. Durch Korrelation des Genexpressionsniveau ex vivo mit dem klinischen Behandlungserfolg konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß eine frühe und anhaltende Induktion der TRAIL Genexpression während des ersten Behandlungsjahres mit Interferon- $\beta$  ein paraklinischer Marker der Therapieresponse sein kann. Darüber hinaus konnte anhand der Serumkonzentration löslichen TRAIL's bereits vor Therapiebeginn der klinische Erfolg der Behandlung vorausgesagt werden.

Die verwendete Dosis und das Applikationsintervall von Interferon- $\beta$  1a in dem ersten untersuchten Patientenkollektiv (44 $\mu$ g 1x pro Woche) entspricht nicht dem aktuell gängigen bzw zugelassenen Therapieschema für Interferon- $\beta$  1a. Die Daten konnten jedoch an einem zweiten Patientenkollektiv, bei dem die Interferontherapie mit 22 $\mu$ g 3x pro Woche durchgeführt wurde, bestätigt werden. Darüber hinaus kann aus den vorliegenden Daten zur signifikanten und anhaltenden Induktion der Genexpression von MxA als biologischem Responsemarker auch in der Patientenkohorte mit 1x wöchentlichem Applikationsintervall klar auf eine biologische Wirksamkeit der verabreichten Interferondosis geschlossen werden. Auch konnte für die gleiche Dosierung in einer kontrollierten Studie eine deutliche Reduktion Kontrastmittel aufnehmender Läsionen nach Therapiebeginn festgestellt werden (The OWIMS study group, 1999). In einer anderen Studie hingegen konnte sogar für eine geringere Dosierung (22  $\mu$ g Interferon- $\beta$  1a 1x pro Woche) eine klinische Wirksamkeit belegt werden (Comi et al, 2001).

Es gibt in der Literatur keinen Konsens über die Definition eines Therapie-Response bei der Interferon- $\beta$  Behandlung der MS. Die Situation ist bei der MS etwas komplexer als beispielsweise bei der antihypertensiven Therapie, bei der die Messung des Blutdrucks ein direktes Maß des Therapieerfolgs darstellt. Für die MS existiert kein solches Maß.

Verschiedene Kriterien für die Definition einer Therapieresponse könnten gewählt werden: Reduktion der Schubrate, Schubfreiheit über einen definierten Zeitraum, Verhinderung der Behinderungsprogression (abgelesen an einer Progression des EDSS) oder auch Zeitpunkt der Konversion in die sekundär chronisch progrediente Krankheitsphase. Weiterhin können paraklinische Surrogatmarker herangezogen werden zur Definition der Therapieresponse, wie etwa Verminderung der kumulativen Anzahl neu aufgetretener Läsionen in der MRT-Untersuchung, Reduktion neu aufgetretener „aktiver“, d.h. Kontrastmittel aufnehmender Läsionen, u.a.. Aufgrund der relativ kurzen Studiendauer des Patientenkollektivs der vorliegenden Studie kam Konversion in die sekundär chronisch progrediente Krankheitsphase oder auch Verhinderung einer Progression des EDSS als alleiniges Kriterium als Responsedefinition nicht in Frage. Aufgrund der hohen Intra- und Interratervariabilität in der Bestimmung des EDSS ist eine Bestätigung der EDSS Progression in wiederholten Untersuchungen über einen bestimmten Zeitraum nötig. Die Definition der Therapieresponse in der vorliegenden Arbeit erfolgte pragmatisch nach den strengstmöglichen Kriterien auf der Basis der verfügbaren Daten. Wunsch eines Patienten, der eine Therapie beginnt, ist es, schubfrei zu bleiben und keine Behinderungsprogression zu erleben. Diesen Kriterien sollte durch die Responsedefinition in der vorliegenden Studie möglichst nahe gekommen werden. Responder wurden jeweils definiert durch Fehlen jeglicher Anzeichen einer Krankheitsaktivität nach Therapiebeginn in allen verfügbaren Untersuchungen. So wurden in der ersten Patientenkohorte (Tabelle 2) die Therapieresponse wie folgt definiert: Kein Schub *und* keine EDSS-Progression während des Beobachtungszeitraumes von 1 Jahr. MRT-Untersuchungen als Maß der subklinischen Krankheitsaktivität standen für diese Patientenkohorte nicht zur Verfügung. In der zweiten Patientenkohorte (Tabelle 3) wurde die Therapieresponse aufgrund der verfügbaren Daten wie folgt definiert: Kein schubförmiges Ereignis, keine EDSS Verschlechterung, in der MRT-Untersuchung keine Progression der Läsionslast ( in T1 und T2 Wichtung) und keine neu aufgetretenen Kontrastmittel aufnehmenden Läsionen während des Beobachtungszeitraumes von 9 Monaten. Die Auswahl der Responsekriterien erfolgte damit nach den strengstmöglichen Kriterien auf dem Boden der verfügbaren klinischen und paraklinischen Daten. Einschränkend muß angemerkt werden, daß die Beurteilung des Therapieerfolges in der vorliegenden Studie sich nur auf einen begrenzten Beobachtungszeitraum beschränkt (1 Jahr, bzw 9

Monate). Inwieweit eine Extrapolation dieser 1-Jahres-Daten auf den längerfristigen Krankheitsverlauf möglich ist, bleibt unklar. Eine Bestätigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einer längerfristig angelegten prospektiven Studie wäre für die Zukunft wünschenswert.

Welche funktionelle Relevanz hat die beschriebene Induktion von TRAIL? Obwohl ursprünglich aufgrund seiner tumoriziden Eigenschaften charakterisiert, weisen mittlerweile zahlreiche Arbeiten auf eine immunmodulatorische Rolle von TRAIL im Kontext von Autoimmunerkrankungen hin. Bei der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose, konnte beispielsweise gezeigt werden, daß eine Blockade von TRAIL in einer deutlichen Exazerbation der Krankheitsaktivität resultierte (Hilliard et al, 2001 und Song et al, 2000). Bei TRAIL knockout Mäusen konnte dieser Befund bestätigt werden (Lamhamedi-Cherradi et al, 2003). Die Ergebnisse der genannten Arbeiten legen eine immunmodulatorische Wirksamkeit von TRAIL auf Ebene der T-Zell-Proliferation und T-Zell-Effektorfunktionen autoreaktiver T-Zellen nahe. In Experimenten mit humanen Zellen konnte ein inhibierender Effekt von TRAIL auf die Aktivierung und auch Proliferation sowohl autoreaktiver als auch Fremdantigenspezifischer T-Zellen gezeigt werden (Lünemann et al, 2002). Vor diesem Hintergrund ist ein regulatorischer Einfluss von TRAIL bei Multipler Sklerose auf die in der Pathogenese der MS kritischen Schritte der Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen denkbar. Als Beleg hierfür können die Ergebnisse einer Untersuchung interpretiert werden, welche eine erhöhte TRAIL-Genexpression in PBMC von MS Patienten im Stadium der klinischen Remission zeigte (Huang et al, 2000). Dies legt ebenfalls eine kompensatorische Rolle der TRAIL Expression im Sinne einer Begrenzung der Entzündungsreaktion nahe. Das in der vorliegenden Arbeit gefundene Resultat einer frühen und anhaltenden Induktion der TRAIL Expression selektiv in Therapierespondern kann so im Sinne des regulatorischen Einflusses von TRAIL auf die in der Pathogenese der MS kritischen T-Zellen interpretiert werden.

Welche Rolle spielen die pro-apoptotischen Eigenschaften von TRAIL? TRAIL ist initial aufgrund seiner pro-apoptotische Wirkung beschrieben worden (Walczak et al, 1999). Als Mitglied der TNF-Familie ist TRAIL in der Lage via Caspasenaktivierung Apoptose sowohl in transformierten als auch in nicht-transformierten Zellen auszulösen (Wiley et

al. 1995; Walczak et al. 1999; Jo et al. 2000, Nitsch et al. 2000). Unter anderem konnte dies für Hepatozyten und Neurone gezeigt werden konnte (Jo et al, 2000 und Nitsch et al, 2000). Humane antigenspezifische T-Zellen sind diesbezüglich jedoch nicht suszeptibel gegenüber TRAIL (Wendling et al, 2000). Wie ist nun in Kenntnis der proapoptischen Eigenschaften von TRAIL die in der vorliegenden Arbeit nahe gelegte funktionelle Therapierelevanz bei der Interferontherapie zu erklären? Wahrscheinlich ist von einer dualen Rolle von TRAIL in der Pathogenese der MS auszugehen, welche abhängig ist von dem entsprechenden Körperkompartiment: Einerseits eine immunregulatorische „gute“ Rolle in der Peripherie und andererseits eine destruktive Rolle innerhalb des ZNS. Da Interferon- $\beta$  bereits früh im Behandlungsverlauf zu einer Wiederherstellung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke führt, ist der therapierelevante Effekt der Induktion von TRAIL am wahrscheinlichsten im Sinne der immunregulatorischen Eigenschaften in der Peripherie und nicht durch seine destruktiven Eigenschaften auf das ZNS zu erklären.

Ein weiteres interessantes Resultat der vorliegenden Arbeit ist die komplette Inhibition der Interferon- $\beta$  vermittelten Induktion von TRAIL durch die Entwicklung neutralisierende Antikörper (Nab) im Behandlungsverlauf. Parallel zur Inhibition von TRAIL zeigte sich auch ein deutlich inhibitorischer Effekt auf MxA, einem biologischen Responsemarker von Typ I Interferonen. Die Mehrzahl der Nab-positiven Patienten im vorliegenden Patientenkollektiv wurden im Beobachtungszeitraum von einem Jahr als klinische Responder eingestuft. Es ist jedoch bekannt, daß neutralisierende Antikörper sich erst im Behandlungsverlauf entwickeln und erst in einem Beobachtungszeitraum von 18 bis 24 Monaten mit einer verminderten Behandlungseffektivität korrelierten (The IFNB multiple sclerosis study group 1996 und The PRISMS Study group 2001). Die erst zu Ende des Beobachtungszeitraumes des vorliegenden Patientenkollektivs einsetzende Antikörperproduktion der neutralisierenden Antikörper und konsekutive Inhibition der MxA und TRAIL Expression lässt jedoch auch im untersuchten Patientenkollektiv eine nachlassende biologische und klinische Wirksamkeit nach Ende des Beobachtungszeitraumes vermuten.

Unklar bleibt die mechanistische Erklärung im Sinne einer Prädisposition der differentiellen Regulation von TRAIL in Respondern und Nonrespondern. Im gleichen Labor der hier vorliegenden Arbeit wurde eine polymorphe Region der TRAIL-

Promoterregion an einer Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors beschrieben (Weber et al, 2004). Eine Assoziation des TRAIL Genotyp zur TRAIL Expression bzw. zur Therapieresponse konnte jedoch nicht gefunden werden.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung von sTRAIL als positivem Prädiktor des Ansprechens auf eine Interferon- $\beta$  Therapie vor Behandlungsbeginn. Bei einem Cutoff von 584,1 ng/l konnte die Therapieresponse mit guter Sensitivität und Spezifität vorausgesagt werden. Bei zwischen Respondern und Nonrespondern vergleichbarer baseline mRNA Expression von TRAIL aber differentieller Serumkonzentration von sTRAIL liegt es nahe, daß sich Responder von Nonrespondern durch eine differentielle post-transkriptionelle Regulation von TRAIL, bzw. differentielle Regulation der Freisetzung löslichen TRAILs unterscheiden. Leider sind die Mechanismen und die Regulation der autokrinen Freisetzung löslichen TRAIL's noch weitgehend unverstanden. Sowohl eine Sezernierung in Mikrovesikeln als auch eine Freisetzung von der Zelloberfläche durch Proteasen ist beschrieben worden (Martinez-Lorenzo et al, 1999 und Mariani et al, 1998). Die mechanistische Erklärung der differentiellen Regulation von sTRAIL bei Respondern und Nonrespondern bleibt bislang unverstanden.

Auch die Quelle der hier in PBMC gemessenen TRAIL mRNA und des hier im Serum gemessenen sTRAIL bleibt unklar. Verschiedene Arbeiten beschreiben, daß T-Zellen in der Lage sind, sTRAIL zu sezernieren (Martinez-Lorenzo et al, 1999 und Song et al, 2000). Ebenso führt in Monozyten eine LPS-Stimulation zu einer erhöhten sTRAIL Expression (Halaas et al, 2000). In ruhenden humanen B-Zellen konnte dahingegen kein TRAIL mRNA Transkript nachgewiesen werden (Zhao et al, 1999). Auch die Stimulation von dendritischen Zellen führt nicht zur Expression von TRAIL (Fanger et al 1999 und Vidalain et al, 2001). Der genaue Zelltyp der für den in der vorliegenden Arbeit in PBMC beobachteten Anstieg der TRAIL Expression letztlich verantwortlich ist, wird in Zukunft genauer zu charakterisieren sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten jeweils in zwei voneinander unabhängigen Patientenkollektiven bestätigt werden. Außerdem konnten die therapieinduzierten Änderungen der TRAIL Expression noch einmal zusätzlich auch von zufälligen Schwankungen im longitudinalen Verlauf von unbehandelten Patienten und

gesunden Kontrollpersonen abgegrenzt werden. Um TRAIL aber tatsächlich als Labormarker der Therapieresponse nach begonnener Therapie und als Prädiktor der Therapieresponse vor Beginn einer Behandlung für die Anwendung im klinischen Alltag etablieren zu können, ist eine erneute kritische Überprüfung der Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv nötig. Außerdem wird es von Interesse sein, genauer zu verstehen, welche Rolle Interferon-induziertes TRAIL in vivo spielt und wie die differentielle Regulation zwischen Respondern und Nonrespondern zu erklären ist.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Interferon- $\beta$  wird seit mehreren Jahren erfolgreich in der Behandlung der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose eingesetzt. Die Wirksamkeit dieser Therapie konnte in mehreren prospektiven randomisierten placebokontrollierten Studien klinisch durch eine signifikante Reduktion der Schubfrequenz sowie paraklinisch durch eine Reduktion der Läsionslast in der Kernspintomographie gezeigt werden. Die genauen Wirkmechanismen hingegen sind noch weitgehend unverstanden. Auf molekularer Ebene betrachtet, steht man einer unübersichtlichen Vielzahl an durch Interferon- $\beta$  vermittelten Effekten gegenüber. An behandlungsrelevanten Mechanismen wurden u.a. das „Verschließen“ der Blut-Hirn-Schranke, ein antiproliferativer Effekt auf autoreaktive T-Zellen, sowie ein Zytokinshift Th1  $\rightarrow$  Th2 assoziierter Zytokine diskutiert (Pette et al, 1997; Wang et al, 2000; Yong et al, 1998, u.a.). Die genannten Punkte sind aber lediglich eine kleine und hochselektive Auswahl aus einer Vielzahl von durch IFN $\beta$  vermittelten Wirkungen (Wandinger et al, 2001). Bislang ist es noch nicht gelungen, einzelne dieser Effekte eindeutig mit dem therapeutischen Ansprechen zu korrelieren. Daneben ist auch die Tatsache, daß nur ein Teil der Patienten tatsächlich von der Behandlung profitiert, also die Heterogenität des therapeutischen Ansprechens ein molekularbiologisch betrachtet bisher unverstandenes Phänomen der Interferontherapie. Bislang konnte noch kein einzelnes Gen bzw. Genprodukt mit dem interindividuell unterschiedlichen Ansprechen auf die Interferontherapie korreliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte in einer longitudinalen Studie eines gut untersuchten Patientenkollektivs die Expression bestimmter Gene mit dem therapeutischen Ansprechen korreliert werden, um aus der Vielfalt der pleiotropen Wirkungen von Interferon- $\beta$  die therapeutisch tatsächlich relevanten Mechanismen herauszufiltern. Außerdem sollten prognostische Marker gefunden werden, die den Therapieerfolg voraussagen ließen. Welche Ziele wurden damit verfolgt? *Erstens* soll ein besseres Verständnis der Wirkweise der Interferone helfen, die pathogenetischen Mechanismen der MS besser zu verstehen, und dadurch gezielt neue Therapieansätze zu entwickeln. *Zweitens* wäre im klinischen Alltag in der oft schwierigen Entscheidungssituation über das Ansprechen auf eine begonnene Interferontherapie angesichts des äußerst heterogenen klinischen Verlaufs ein Labormarker zur genaueren Orientierung hilfreich.

*Drittens* wäre aufgrund der bekannten Tatsache, daß nur ein Teil der Patienten klinisch auf eine Therapie mit Interferon- $\beta$  ansprechen, ein prädiktiver Marker zur Therapie-Entscheidung (sowohl für den einzelnen Patienten, als auch volkswirtschaftlich betrachtet) von großem Nutzen.

Durch Korrelation der ex vivo Genexpression mit dem klinischen Ansprechen auf eine Interferon- $\beta$  Therapie gelang die Charakterisierung folgender therapeutisch relevanter Moleküle: Zum einen konnte gezeigt werden, daß eine frühe und anhaltende Induktion von TRAIL mit der klinisch-therapeutischen Wirksamkeit von Interferon- $\beta$  korreliert. Damit gelang die Beschreibung eines molekularbiologischen Markers des Therapieerfolges bei MS nach begonnener Therapie. Außerdem wurde gezeigt, daß die Bestimmung der Konzentration des löslichen TRAIL vor Beginn einer Therapie die Vorhersage des individuellen Ansprechens auf eine Interferontherapie ermöglicht. Damit konnte gezeigt werden, daß die Bestimmung von sTRAIL im Serum einen prognostischen Wert hat, der eine Voraussage über das Ansprechen auf Therapie vor Behandlungsbeginn erlaubt. Angesichts der mit einer Interferontherapie verbundenen Nebenwirkungen und auch der hohen Kosten könnte ein solcher prognostischer Marker dabei helfen, die vorhandenen Therapien effizienter und selektiver einzusetzen, um so dem einzelnen Patienten eine Therapie mit maximaler Wirksamkeit bei minimalen Nebenwirkungen zukommen zu lassen und gleichzeitig einen bescheidenen Beitrag zur Reduktion der steigenden Kosten unseres Gesundheitssystems im Sinne einer effizienteren Ressourcenverteilung zu leisten.

## 6. PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Gniadek P, Aktas O, Wandinger KP, Bellmann-Strobl J, Wengert O, Weber A, von Wussow P, Obert HJ, Zipp F. Systemic IFN-beta treatment induces apoptosis in peripheral immune cells in MS patients.

*J Neuroimmunol* 2003; 137: 187-96

Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundstrom E, Ehrlich S, Wernecke KD, Volk HD, Zipp F. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis.

*Lancet* 2003; 361: 2036-43

Weber A, Wandinger KP, Mueller W, Aktas O, Wengert O, Grundstrom E, Ehrlich S, Windemuth C, Kuhlmann T, Wienker T, Bruck W, Zipp F. Identification and functional characterization of a highly polymorphic region in the human TRAIL promoter in multiple sclerosis.

*J Neuroimmunol* 2004; 149: 195-201

Wengert O, Waiczies S, Bellmann-Strobl J, Zipp F, Wandinger KP Interferon-beta induces IL-12Receptor beta2 via upregulation of t-bet – Relevance to therapeutic effects in multiple sclerosis.

*Poster: 7<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Venice, September 2004*

## LITERATURVERZEICHNIS

- Ashkenazi A Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 818-21
- Babbe H, Roers A, Waisman A, et al Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192: 393-404
- Barnett MH und Prineas JW. Relapsing and Remitting Multiple Sclerosis: Pathology of the newly forming Lesion. *Ann Neurol* 2004; 55: 458-68
- Beck J, Rondot P, Catinot L, et al. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand* 1988; 78: 318-323
- Bever CT und Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in multiple sclerosis - targets or markers of injury? *Neurology* 1999; 53: 1380-1381
- Brunner, E., Domhof, S., Langer, F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *J. Wiley*, New York 2002
- Chen WC, Jin W, Hongsheng T, et al. Requirement for transforming growth factor beta1 in controlling T cell apoptosis. *J Exp Med* 2001; 194: 439– 454
- Chou YK, Bourdette DN, Offner H, et al. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; 38: 105-114
- Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2002; 359: 1221-1231
- Comi C, Leone M, Bonisconi S et al. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2000; 55: 921–927
- Comi G, Filippi M, Barkhof F et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001; 357: 1576-1582
14. Chawla-Sarkar M, Leaman, DW, Borden EC. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)- $\beta$  compared with IFN- $\alpha$ 2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Canc Res* 2001; 7: 1821-1831
- Chofflon M. Recombinant human interferon beta in relapsing remitting multiple sclerosis: a review of the major clinical trials. *Eur J Neurol* 2000; 7: 369-80
- Deisenhammer F, Reindl M, Harvey J, et al. Bioavailability of interferon  $\beta$  1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. *Neurology* 1999; 52: 1239-1243.
- Dhib-Jalbout S. Mechanisms of action of intererons and glatirameracetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2002; 58: 3-9

- Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley, et al. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 1999; *190*:1155-64.
- Filippini G, Munari L, Incorvaia B, et al. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet* 2003; *361*: 545-52
- Fotadar R, Brickner H, Saadatmandi N, et al. Effect of p21waf1/cip1 transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene* 1999; *18*: 3652–3658.
- Gniadek P, Aktas O, Wandinger KP et al. Systemic IFN- $\beta$  treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. *J Neuroimmunol* 2003; *137*: 187-196
- 6-Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, et al. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 2002; *58*: 169-178.
- Halaas O, Vik R, Ashkenazi A, et al. Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 2000; *51*: 244-50.
- Hall GL, Compston A, Scolding NJ. Beta-interferon and multiple sclerosis. *Trend Neurosci* 1997; *20*: 63-67
- Hengartner MO. The biochemistry of Apoptosis. *Nature* 2000; *407*: 770-76
- Heesen C, Schwickert Y, Kasper J, et al. Immuntherapien der Multiplen Sklerose. 2004. <http://www.ms-netzwerk-hamburg.de>
- 16-Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, et al Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001; *166*: 1314-1319.
- Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 1997; *120*: 865-916
- Huang WX, Huang P, Gomes A, et al. Apoptosis mediators FasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. *Neurology* 2000; *55*: 928-934.
- Jacobs L und Johnson KP. A brief history of the use of interferons as treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1994; *51*: 1245-52
- Jacobs LD, Cookfair DL, for The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). Intramuscular Interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; *39*: 285-94
- Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002; *125*: 538-550
- Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; *6*: 564-567.
- Jurewicz A, Biddison WE und Antel JP. MHC class I restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 1998; *160* 3056-3059

- Kabat EA, Moore DH und Landow H. An electrophoretic study of the protein components in the cerebrospinal fluid and their relationship to serum proteins. *J Clin Invest* 1942; 21: 571-577
- Karp CL, van Boxel-Dezaire A, Byrnes A, et al. Interferon- $\beta$  in multiple sclerosis: altering the balance of interleukin-12 and interleukin-10? *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 361-68
- Kaser A, Deisenhammer F, Berger T et al. Interferon beta-1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients. *Lancet* 1999; 353: 1413–1414
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Type I Interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 1999; 189: 1451-1460.
- Kracke A, von Wussow P, Al-Masri AN, et al. Mx proteins in blood leukocytes for monitoring interferon  $\beta$ -1b therapy in patients with MS. *Neurology* 2000; 54: 193-199.
- Krammer PH. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 97: 1753-59
- Kumar-Sinha C, Varambally S, Sreekumar A, et al. Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 575-585.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis; an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-1452.
- Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, et al. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL (-/-) mice. *Nat Immunol* 2003; 4: 255-260.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathol* 2007; 17: 210-18
- Lenardo MJ, Chan FK, Hornung F et al. Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 221– 253
- Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, et al. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 2001; 58: 91– 97
- Lublin F D und Reingold S C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-11
- Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, et al. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol* 1996; 6: 259-274.
- Lünemann JD, Aktas O, Gniadek P, et al. Downregulation of transforming growth factor-beta 1 in interferon-beta 1a treated MS patients. *Neurology* 2001; 57: 1132–1134
- Lünemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, et al. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *J Immunol* 2002; 168: 4881-4888.
- Macchi B, Matteucci C, Nocentini U, et al. Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *Neuroreport* 1999; 10: 399–402

- Mariani SM, Krammer PH. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 973-982.
- 5-Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, et al.. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1185-1194.
- Markovic-Plese S und McFarland HF. Immunopathogenesis of the multiple sclerosis lesion. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001; **1**: 257-62
- 4-Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992; **10**: 153-187.
- Martin R, Sturzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapie of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat Immunology* 2001; **21**: 785-788
- Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, et al. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 1999; **163**: 1274-1281.
- Medana IM, Gallimore A, Oxenius A, et al. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 3623-33
- Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). Leitlinie Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. Thieme 2005
- Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, et al. Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 2000; **356**: 827-828.
- Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 1999; **399**: 40-47
- Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; **343**: 938– 952
- 2-Pette M, Fujita K, Kitzke B, et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990; **40**: 1770-1776.
- Pette M, Pette DF, Muraro P, et al. Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes. *Neurology* 1997;**49**: 385-92.
- Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J et al. Interferonbeta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 1041–1050
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12687-90
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the „McDonald Criteria“. *Ann Neurol* 2005; **58**: 840-46
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983 **13**: 227-231.

- Sanceau J, Hiscott J, Delattre O, et al. IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene* 2000; 19: 3372– 3383
- Santiago-Raber ML, Lawson BR, Dummer W, et al. Role of cyclin kinase inhibitor p21 in systemic autoimmunity. *J Immunol* 2001;167: 4067– 4074
- Segal BM, Cross AH. Fas(t) track to apoptosis in MS: TNF receptors may suppress or potentiate CNS demyelination. *Neurology* 2000; 55: 906– 907
- Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988; 23: 339-346
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997; 277: 818-21
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the type I Interferon producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-7
45. Song K, Chen Y, Goke R, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 2000; 191: 1095-1104.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, et al. How cells respond to Interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-64
- Steinman L. Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996; 85: 299-302
44. Stone LA, Frank JA, Albert PA, et al. The effect of interferon- $\beta$  on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1995; 37: 611-619.
- The IFNB multiple sclerosis study group. Interferon-beta1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical Results. *Neurology* 1993; 43: 665-61
- The IFNB multiple sclerosis study group and the University of British Columbia MS/MRI analysis group. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon  $\beta$ -1b: experience during the first three years. *Neurology* 1996; 47: 889-894.
- The once weekly interferon for MS study group. Evidence of interferon  $\beta$ -1a dose response in relapsing-remitting MS: the OWIMS study. *Neurology* 1999; 53: 679-686.
- The PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. PRISMS-4: long-term efficacy of interferon- $\beta$ -1a in relapsing MS. *Neurology* 2001; 56: 1628-1636.
- Theophilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, et al. Type I Interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 307-335
- Tourtellotte WW, Walsh MJ, Baumhefner RW, et al. The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. *Ann NY Acad Sci* 1984; 436: 52-67

- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesion of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285.
- Uhm JH, Dooley NP, Stuve O, et al. Migratory behaviour of lymphocytes isolated from multiple sclerosis patients: effects of interferon- $\beta$  1b therapy. *Ann Neurol* 1999; 46: 319-324
- Vidalain PO, Azocar O, Yagita H, et al. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J Immunol* 2001; 167:3765-72
- Van Parijs L und Abbas AK. Homeostasis and Self-Tolerance in the immune System: Turning Lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-48
- von Wussow P, Jakschies D, Hocjkeppel HK, et al. The human intracellular Mx-homologous protein is specifically induced by type I Interferons. *Eur J Immunol.* 1990; 20: 2015-2019.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.*1999; 5:157-163.
- Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000; 256: 58-66
- Wandinger KP, Wessel K, Neustock P, et al. Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1997, 149: 87-93.
- 42-Wandinger KP, Stürzebecher CS, Bielekova B et al. Complex immunomodulatory effects of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 2001; 50: 349-357.
- 40-Wang X, Chen M, Wandinger KP, et al. Interferon  $\beta$ -1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10 dependent mechanism: relevance to interferon  $\beta$ -1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 2000; 165: 548-557.
- Weber A, Wandinger KP, Müller W, et al. Identification and characterization of a highly polymorphic region in the human TRAIL promoter in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004;149:195-201.
- Weinshenker BG und Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 1987; 14: 255-61
- Wekerle H, Linington C, Lassmann H, et al. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neuroscience* 1986; 9: 271-277
- Wekerle H. Immunology of multiple sclerosis. In Compston A, Lassmann H, McDonald WI, Matthews B und Wekerle H. (Hrg.). *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone, London, 1998, pp.379-408.
- Wendling U, Walczak H, Dorr J, et al. Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *Cell Death Differ* 2000; 7: 637-44.
- Weyenbergh JV, Wietzerbin J, Rouillard D, et al. Treatment of multiple sclerosis patients with interferon-beta primes monocyte-derived macrophages for apoptotic cell death. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 745– 748

13. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673-682.
- Wu Q, Kirschmeier P, Hockenberry T, et al. Transcriptional regulation during p21/WAF1/Cip1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 23 143-54
- Yong VW, Chabot S, Stuve O, et al. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 1998; 51: 682-9.
- Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994; 179: 973 – 984
- Zhao S, Asgary Z, Wang Y, et al. Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells. *Br J Haematol* 1999; 106: 827-32.
- Zipp F, Krammer PH, Weller M, et al. Immune (dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95/CD95 ligand system. *Immunol Today* 1999; 20: 550–554
- Zipp F, Beyer M, Gelderblom H, et al. No induction of apoptosis by IFN-beta in human antigen-specific T cells. *Neurology* 2000;54: 485– 487
- Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 163-71

## **ANHANG**

## **Danksagung**

Ich will an dieser Stelle allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich danken. Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit geschah zwischen den Jahren 2000 und 2004 in der AG Klinische Neuroimmunologie in Kooperation mit dem Institut für Neuroimmunologie. Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr Wandinger für die Betreuung der Dissertation und die hilfreiche Begleitung der wissenschaftlichen Arbeit in vielerlei Hinsicht über viele Jahre. Darüber hinaus danke ich Frau Prof Zipp für die weitreichende Unterstützung dieser Arbeit und die ausgezeichneten Forschungsbedingungen. Für die fachliche Anleitung, technische Unterstützung, fruchtbare Diskussionen und kollegiale Zusammenarbeit danke ich außerdem den Mitarbeitern der AG Klinische Neuroimmunologie, später Institut für Neuroimmunologie. Über die Jahre der Arbeit an diesem Projekt haben viele Personen ihren Rat, ihr Wissen und ihre Zeit zur Verfügung gestellt, denen ich mit der folgenden Aufzählung sicher nur teilweise gerecht werden kann. Namentlich erwähnen will ich Frau Susan Pikol, Bibiane Seeger und Antje Claußnitzer für vielfältige technische Unterstützung und Hilfestellungen in allen Laborfragen, insbesondere Überlassung von Kulturmedien etc, Hilfe bei PBMC-Isolierung, Zellkulturexperimenten, Taqman-Experimenten und ELISA-Experimenten u.a.; Frau Sonja Waiczies, und Carmen Infante-Duarte für kritische Diskussionen der Ergebnisse und viele wichtige kleine methodische Hilfestellungen; Herrn Paul Gniadek für eine initiale kleine Einführung in die statistische Auswertung mit SPSS; Herrn Orhan Aktas für konstruktiv-kritische Diskussionen und großzügige Überlassung von z.T. mit Frau Judith Bellmann-Strobl gesammelten und charakterisierter Proben; Frau Alexandra Weber für die Zusammenarbeit in dem Teilprojekt der Korrelation mit dem Polymorphismus der TRAIL Promoterregion; Herrn Prof Volk sowie den Mitarbeitern des Institutes für Immunologie für die Überlassung des Taqmangerätes zur Durchführung der Messungen. Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für den Rückhalt, die Geduld und die freundliche Unterstützung bedanken.

## **Lebenslauf**

- Der Lebenslauf wird in der elektronischen Fassung aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht. -

## **Eidstattliche Erklärung**

„Ich, Oliver Wengert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Responsemarker der Interferontherapie bei Multipler Sklerose“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

*Die Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden als Bestandteile der obenstehend („Publikationen und Präsentationen“) aufgelisteten Titel veröffentlicht.*

Berlin, den 10.5.2008

(O. Wengert)