



Aus dem Institut für klinische Neuroimmunologie des Klinikums Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. R. Hohlfeld

**GENOTYP-PHÄNOTYP-UNTERSUCHUNGEN VON  
FAMILIÄRES MITTELMEERFIEBER-MUTATIONEN BEI  
PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**THERESA WACKER**

aus  
**NÖRDLINGEN**

2012

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Tania Kümpfel

Mitberichterstatter: PD Dr. Roger Kalla  
PD Dr. Stefan Kastenbauer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter Prof. Dr. med. Peter Lohse

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Multiple Sklerose . . . . .	1
1.1.1	Epidemiologie . . . . .	1
1.1.2	Klinisches Bild . . . . .	2
1.1.3	Diagnose . . . . .	2
1.1.4	Ätiologie . . . . .	5
1.1.5	Pathogenese . . . . .	6
1.1.6	Verlauf und Prognose . . . . .	7
1.1.7	Therapie . . . . .	8
1.2	Familiäres Mittelmeerfieber . . . . .	10
1.2.1	Epidemiologie . . . . .	10
1.2.2	Klinisches Bild . . . . .	10
1.2.3	Diagnose . . . . .	11
1.2.4	Genetik . . . . .	11
1.2.5	Pathogenese . . . . .	12
1.2.6	Verlauf und Prognose . . . . .	13
1.2.7	Therapie . . . . .	13
1.3	„Interleukin-1-converting enzyme“(ICE)-Fieber . . . . .	14
1.3.1	Klinisches Bild . . . . .	14
1.3.2	Pathophysiologie . . . . .	14
1.3.3	ICE-Fieber und Multiple Sklerose . . . . .	15
1.4	Multiple Sklerose und Familiäres Mittelmeerfieber . . . . .	16
1.5	Ziel und Fragestellung dieser Arbeit . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Erhebung der klinischen Parameter . . . . .	19
2.2	Labormethoden . . . . .	19
2.2.1	DNA-Isolierung mittels des „QIAamp DNA Blood Mini“-Kits der Firma QIAGEN . . . . .	20
2.2.2	Amplifikation/ Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	21
2.2.3	Gelelektrophorese . . . . .	24
2.2.4	Sequenzierung . . . . .	26
2.2.5	Hybridisierung mit spezifischen Gensonden unter Verwendung zweier „Custom TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assays“ der Fir- ma Applied Biosystems . . . . .	28
2.3	Statistik . . . . .	29

<b>3 Patienten und Kontrollen</b>	<b>31</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1 Mutationen und Charakteristika der Gruppe 1 . . . . .	33
4.1.1 Basischarakteristika der MS-Patienten . . . . .	33
4.1.2 Anzahl der MS-Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen .	35
4.1.3 Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit einer Muta- tion im MEFV-Gen . . . . .	35
4.1.4 Einfluss der Mutation im MEFV-Gen auf die MS . . . . .	42
4.1.5 Basischarakteristika der Patienten ohne MS . . . . .	46
4.1.6 Anzahl der Patienten ohne MS mit einer Mutation im MEFV- Gen . . . . .	46
4.1.7 Klinische Charakteristika der Patienten ohne MS mit einer MEFV-Mutation . . . . .	47
4.1.8 Mutationen im CASP1-Gen . . . . .	48
4.2 Häufigkeit der E148Q- und K695R-Mutationen in Gruppe 2 und 3 . .	50
<b>5 Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1 Gruppe 1 . . . . .	53
5.1.1 Vergleich der Patienten mit und ohne FMF-Symptome . . . .	53
5.1.2 MS-Patienten mit und ohne Mutation im MEFV-Gen . . . .	54
5.1.3 Bedeutung der Mutationen im CASP1-Gen . . . . .	58
5.2 Bedeutung der Mutationen im MEFV-Gen in Gruppe 2 und 3 . . . .	58
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Danksagung</b>	<b>xvii</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose<sup>1</sup>

Die Multiple Sklerose (MS) ist neben der Epilepsie die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter. Sie ist eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Ursache nicht bekannt ist. Es wird eine multifaktorielle Genese angenommen, wobei sowohl umweltbedingte als auch genetische Faktoren eine Rolle spielen.

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz beträgt weltweit zwischen 1 und 300 Erkrankungen pro 100000 Einwohner. In Nordeuropa und Nordamerika liegt sie zwischen 60 und 100 pro 100000 Einwohner [39]. In Deutschland beträgt die jährliche Inzidenz 4-8 neu diagnostizierte Fälle pro 100000 Einwohner. Frauen sind 1,5-2 mal häufiger betroffen als Männer. Es ist auffällig, dass die Prävalenz mit zunehmendem Breitengrad, also zu den Polen hin, ansteigt und zum Äquator hin abnimmt [24] und auch, dass Kaukasier eine deutlich höhere Prävalenz haben als z. B. Asiaten, die in ähnlichen Breitengraden leben. Insgesamt scheinen Personen mit afrikanischer und insbesondere asiatischer Abstammung auch in Regionen mit hoher MS-Prävalenz weitgehend resistent gegen MS zu sein.

Die Krankheit manifestiert sich meist im frühen Erwachsenenalter (Median 28 Jahre) [39], wobei sowohl sehr frühe Manifestationen im Kindesalter als auch Spätmanifestationen im hohen Erwachsenenalter bekannt sind.

---

<sup>1</sup>Als Grundlage dieses Kapitels diente das Buch *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen* von H. Wiendl, A. Melms und R. Hohlfeld [65]

### 1.1.2 Klinisches Bild

Die Symptome der MS sind sehr vielfältig, da grundsätzlich alle Strukturen des ZNS betroffen sein können. Typische Zeichen sind Sensibilitätsstörungen, Muskelschwäche, Koordinationsstörungen, kognitive und psychiatrische Störungen, Müdigkeit (Fatigue), Schmerzen sowie Störungen oder Ausfall der Blasenkontrolle. Auch eine Verschlechterung der Sehkraft ist häufig zu beobachten, da eine der Prädilektionsstellen für die Entzündung der Nervus opticus ist.

Bei der Mehrzahl der Patienten (bis zu 90 %) beginnt die MS mit einem schubförmig remittierenden Verlauf (RR-MS), bei dem sich Phasen der klinischen Verschlechterung, Remission und Stabilität abwechseln. Nach einer Krankheitsdauer von 10-15 Jahren geht bei 30-40 % der Patienten die RR-MS in eine sekundär progrediente MS (SP-MS) über [64], bei der sich die neurologischen Defizite kontinuierlich verschlechtern, und die mit oder ohne zusätzliche Schübe ablaufen kann. Nach 20 Jahren beträgt die Häufigkeit dieser eher ungünstigen Verlaufsform sogar bis zu 90 % [59]. In 10-20 % der Fälle beginnt die Erkrankung bereits mit einer stetigen Verschlechterung der neurologischen Symptome (primär progrediente MS, PP-MS) [55].

Bei einem Schub entwickeln sich die neurologischen Symptome über mehrere Tage, erreichen ein Plateau und bilden sich anschließend über Tage bis Wochen wieder zurück [46]. Als Schub werden Symptome und Ausfälle dann bezeichnet, wenn sie subjektiv berichtet oder durch objektive Untersuchungen verifiziert werden können und länger als 24 Stunden dauern. Die Symptome sind dabei nicht durch Fieber oder Infekte erklärbar. Das Kriterium für das Vorliegen von zwei separaten Schüben ist ein Zeitintervall von 30 Tagen zwischen dem jeweiligen Beginn der beiden Schübe. Die Erstsymptome äußern sich unterschiedlich bei Patienten mit frühem und spätem Krankheitsbeginn. Bei jüngeren Patienten beginnt die MS meist monosymptomatisch mit einer Optikusneuritis (36 %) oder Parästhesien (33 %). Paresen allein oder kombiniert mit Sensibilitätsstörungen finden sich eher bei älteren Patienten als Erstmanifestation (50 %).

### 1.1.3 Diagnose

Für die Diagnosestellung der MS sind nach den Diagnosekriterien von McDonald et al. [35], beziehungsweise nach deren Überarbeitung durch Polman et al. [43], sowohl klinische als auch paraklinische Merkmale von Bedeutung. Zu den paraklinischen Untersuchungen gehören die Kernspintomographie (MRT), die visuellen evozierten

Potenziale und die Liquor-Untersuchung. Nach Polman gilt eine MS bereits als gesichert, wenn bei einem ersten klinischen Krankheitsschub in mindestens einem Funktionssystem, beziehungsweise bei Untersuchung der visuell evozierten Potenziale, Auffälligkeiten vorliegen und sich zusätzlich zwei oder mehr charakteristische Läsionen in der initialen MRT finden. Die Lokalisation dieser Herde sollte in mindestens zwei der folgenden vier Regionen des zentralen Nervensystems liegen: periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder im Rückenmark. Das darüber hinaus erforderliche Kriterium der zeitlichen Dissemination ist dann erfüllt, wenn entweder eine nicht symptomatische, kontrastmittelaufnehmende Läsion zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung vorliegt oder wenn eine neue kontrastmittelaufnehmende Läsion im Vergleich zu einer im Krankheitsverlauf angefertigten Voruntersuchung auftritt [38]. Nach diesen Kriterien wird zwischen MS, möglicher MS (das heißt, es besteht das Risiko, eine MS zu entwickeln, aber die Diagnosekriterien sind noch nicht erfüllt, bzw. die nötigen Befunde wurden noch nicht ausreichend erhoben) und Nicht-MS unterschieden.

### **Kernspintomographie**

In frühen Krankheitsstadien sind die MS-typischen Befunde Läsionen im Marklager, bevorzugt periventrikulär und im Balken. In der T<sub>1</sub>-Wichtung erscheinen diese dunkel, in der T<sub>2</sub>-Wichtung als signalintense, helle Läsionen. Diese Läsionen korrelieren gut mit den makroskopisch sichtbaren pathologischen Plaques [40]. Die Kernspintomographie sollte auch immer mit Kontrastmittel (Gadolinium) durchgeführt werden.

Gadolinium-aufnehmende Läsionen findet man bei neuen, aktiven Herden in der Frühphase als Ausdruck einer Störung der Blut-Hirn-Schranke. Auch ringförmige Kontrastmittelanreicherungen sowie perifokale Verdrängungszeichen können bei akuten Läsionen auftreten. Generell ist die Feststellung neu aufgetretener, aktiver Läsionen ein sensibler Indikator für die Krankheitsaktivität. Allerdings gibt es nicht immer eine gute Korrelation zwischen MRT-Befund und klinischer Symptomatik. Die ergänzende Durchführung einer spinalen MRT ist ebenfalls wichtig, da dadurch Rückenmarksläsionen identifiziert werden können.

Kriterien für pathologische, MS-assoziierte MRT-Veränderungen betreffen die Parameter räumliche und zeitliche Dissemination. Nach Barkhof et al. [6] spricht es für eine MS, wenn drei der folgenden vier Bedingungen erfüllt sind:

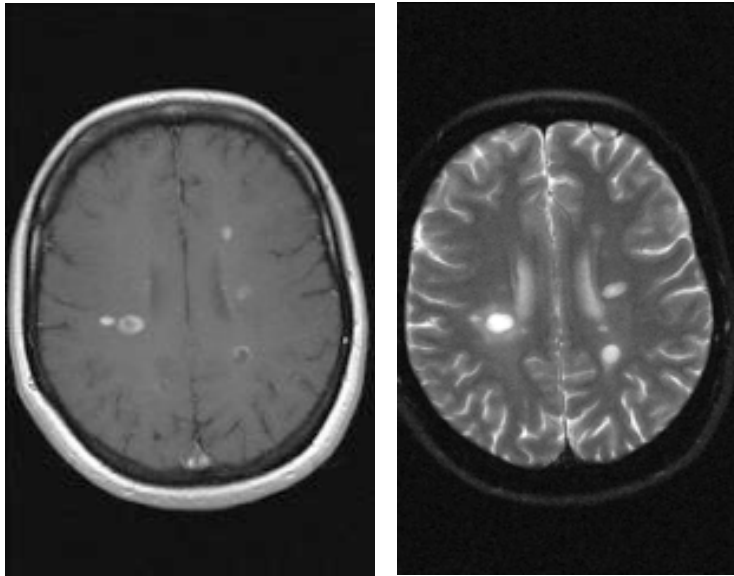


Abb. 1.1: MRT-Aufnahme eines MS-Patienten in axialer Schnittebene. *Links:* MS-typische periventrikuläre Läsionen in T<sub>1</sub>-Wichtung mit Kontrastmittelaufnahme. *Rechts:* T<sub>2</sub>-Wichtung.

- eine kontrastmittelaufnehmende oder neun T<sub>2</sub>w-hyperintense Läsionen,
- mindestens eine infratentorielle Läsion,
- mindestens eine subkortikale Läsion,
- mindestens drei periventrikuläre Läsionen.

Bei Vorliegen einer Rückenmarksläsion kann diese eine Hirnläsion als Bedingung ersetzen. Das MRT alleine genügt jedoch nicht zur Diagnosestellung einer MS, da Läsionen der weißen Substanz auch bei anderen Erkrankungen vorkommen [15], differentialdiagnostisch zum Beispiel auch bei einer Neuroborreliose oder einer Vaskulitis des ZNS. Auch bei etwa 4 % der Normalbevölkerung findet man periventrikuläre Läsionen, die nicht von MS-verursachten Veränderungen zu unterscheiden sind [67].

### Evozierte Potenziale

Die elektrophysiologische Untersuchung im Rahmen der Routinediagnostik dient vor allem der Objektivierung klinisch stummer Läsionen. Im akuten Stadium zeigen sich bei den evozierten Potenzialen Amplitudenminderung und Verzögerung, im weiteren Verlauf vor allem Latenzverzögerungen. Die höchste Bedeutung als prädiktiver Wert



für die Entwicklung einer gesicherten MS sowie die höchste Spezifität und Sensitivität haben die visuellen und die somatosensorischen evozierten Potenziale (VEP und SEP) in der MS-Zusatzdiagnostik. Die Häufigkeit eines pathologischen VEP bei MS-Patienten variiert zwischen 42 und 100 % je nach Zeitpunkt der Messung nach Krankheitsbeginn. Pathologische SEP zeigen sich bei bis zu 80 % der Patienten.

### **Liquor-Untersuchung**

Die Liquor-typischen MS-Befunde umfassen eine mäßige Pleozytose (vor allem Lymphozyten und Monozyten,  $< 50$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) und oligoklonale Banden (OKB) in der isoelektrischen Fokussierung, die nicht im Serum zu finden sind. Diese entstehen durch eine autochthone Immunglobulin-G(IgG)-Produktion im Zentralen Nervensystem. Etwa 95 % der Patienten mit klinisch gesicherter MS haben positive OKB [36]. Jedoch lassen sich auch bei anderen, insbesondere bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel der Neuroborreliose oder der Neurosarkoidose, positive OKB nachweisen. Darüberhinaus finden sich auch bei etwa 4 % der Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen positive OKB [14].

### **1.1.4 Ätiologie**

Für die Entstehung der MS wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Zum einen spielt eine genetische Disposition eine Rolle, worauf eine familiäre Häufung hindeutet. Allerdings geht man von einer großen genetischen Heterogenität der MS aus. Das bedeutet, dass mehrere Gene beteiligt sind, ebenso wie epigenetische Regulationsmechanismen, unvollständige Penetranz und variable Expressivität.

Zum anderen werden Virusinfektionen vor allem mit dem Epstein-Barr-Virus [20, 3] und dem Humanen-Herpes-Virus-6 [54] in der Kindheit als möglicher Auslöser diskutiert. Diese Erreger können möglicherweise eine Kreuzreaktivität zwischen Virusantigenen und Proteinen der Myelinscheide hervorrufen, wodurch das Immunsystem in der Folge das körpereigene Myelin angreift. Neueren Erkenntnissen zufolge spielt möglicherweise auch ein Vitamin-D-Mangel bei der Entstehung der MS eine Rolle. Unklar ist dagegen bisher, welche Rolle sozioökonomische Faktoren, Hygienebedingungen, Ernährung und andere Umweltfaktoren bei den Prävalenzunterschieden der MS haben.

### 1.1.5 Pathogenese

Pathogenetisch spielen bei der MS vor allem autoimmune Mechanismen mit Beteiligung aktivierter, autoreaktiver T-Zellen eine zentrale Rolle. Histopathologisch ist das Hauptcharakteristikum der MS der entmarkte Plaque. Diese demyelinisierten Herde finden sich bevorzugt im Bereich der Kleinhirnstiele, der Nervi optici, in der periventrikulären weißen Substanz und im Rückenmark, seltener in den Hirnstammkernen oder der Großhirnrinde. Innerhalb der Plaques kommt es zur Zerstörung des Myelins und/oder der Oligodendrozyten und zum Untergang von Axonen. In der Folge bildet sich Narbengewebe aus [26]. Ein entzündliches Infiltrat aus Lymphozyten und Makrophagen begleitet die Plaquebildung. Neuere histopathologische Erkenntnisse zeigen eine ausgesprochene Heterogenität in den Mustern der Entmarkung bei der MS [32, 27]. Diese Heterogenität zeigt sich vor allem zwischen den Plaques unterschiedlicher Patienten. Die Plaques des gleichen Patienten sind dagegen sehr ähnlich. Die Entzündungsreaktion ist bei allen von Makrophagen und T-Lymphozyten geprägt, jedoch können vier Muster der Myelindestruktion definiert werden:

1. eine Makrophagen-assoziierte Entmarkung;
2. eine Makrophagen-assoziierte Entmarkung mit Nachweis von Immunglobulinen und aktivierten Komplementkomponenten (Antikörper-medierte Entmarkung);
3. eine Entmarkung mit distaler Oligodendrogliopathie und Oligodendrozyten-Apoptose;
4. eine primäre Oligodendrozytendegeneration in der periplaque-weißen Substanz.

In frühen und akuten Krankheitsstadien weisen die Plaques ein hohes Remyelinisierungspotenzial auf, das bei chronischen MS-Plaques deutlich abnimmt [10]. Im späteren Krankheitsverlauf kommt es zunehmend auch zu neurodegenerativen Prozessen. So sind die frühen Symptome der MS vermutlich Ausdruck der Demyelinisierung, während die Remission dem Rückgang des entzündlichen Ödems sowie einer partiellen Remyelinisierung zugeschrieben wird [63]. Die Progression der neurologischen Symptomatik im weiteren Verlauf ist bedingt durch die zunehmende Schädigung der Axone, Gliose-Narben und den Verbrauch von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch wiederholte Schübe.

Es wird angenommen, dass zu Beginn der Erkrankung autoreaktive T-Lymphozyten durch Umwelteinflüsse wie zum Beispiel Infektionen aktiviert werden und die bereits

vorgeschädigte Blut-Hirn-Schranke passieren können, um ins Parenchym einzuwandern. Es ist jedoch gegenwärtig nicht klar, ob die von diesen Zellen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha/\beta$  sowie andere Faktoren wie zum Beispiel Sauerstoff- und Stickstoffradikale allein für die Demyelinisierung verantwortlich sind, oder ob auch eine Zell- und Antikörpervermittelte Lyse eine Rolle spielt. Auch wird durch die ausgeschütteten Zytokine die Expression von Human-Leukocyte-Antigen-I(HLA-I)- und HLA-II-Molekülen auf Endothel- und Gliazellen gesteigert, wodurch mehr (Auto-)Antigene präsentiert werden und die Entzündung weiter zunimmt. Die zusätzliche Aktivierung der humoralen Immunantwort kommt in der Liquordiagnostik durch die OKBs zum Ausdruck.

### 1.1.6 Verlauf und Prognose

Der Verlauf der MS ist individuell sehr verschieden, was eine genaue Prognose nahezu unmöglich macht. Jedoch gibt es klinische Faktoren, die auf einen eher günstigen Verlauf hindeuten wie zum Beispiel das frühe Auftreten der Erstsymptome ( $< 40$  Jahre), Sensibilitätsstörungen als Erstsymptom, eine schubförmige Verlaufsform mit Remission und das weibliche Geschlecht. Für einen eher ungünstigeren Verlauf sprechen hingegen zerebelläre Ausfälle, pyramidalmotorische Störungen, autonome (Blase, Mastdarm, Potenz) und psychoorganische Auffälligkeiten, häufige und schwere Schübe mit schlechter Rückbildungstendenz, später Krankheitsbeginn und ein männliches Geschlecht.

Als statistische Eckpunkte des Krankheitsverlaufs und der Prognose sind zu nennen: Eine mediane Zeit von 10 Jahren von der Erstmanifestation bis zur Konversion in eine sekundär progrediente Verlaufsform und nach durchschnittlich 15 Jahren die Notwendigkeit einer Gehhilfe und nach 24 Jahren eines Rollstuhls [64]. Die schlechteste Prognose haben Patienten mit stetiger Progression der neurologischen Symptome von Beginn an.

Zur Verlaufskontrolle und Einordnung der neurologischen Symptomatik sowie zur Beurteilung des Behinderungsgrades wird der sogenannte EDSS („expanded disability status score“) nach Kurtzke [25] herangezogen. Hierbei werden insgesamt acht Funktionssysteme untersucht. Diese sind Pyramidenbahn (Kraft), Kleinhirn (Koordination), Hirnstamm, Sensibilität, Blase und Mastdarm, Visus und mentale Funktionen. Anschließend wird aus den Ergebnissen eine Leistungsskala ermittelt, die sich von 0 bis 10 erstreckt. Null bedeutet hierbei einen neurologischen Normalbe-

fund. Ein EDSS von 1 bis 3,5 bezeichnet einen gehfähigen Patienten mit nur geringen Einschränkungen in den verschiedenen Funktionssystemen. Ein Wert von 4,0 bis 9,5 ist definiert durch das Ausmaß der Einschränkung des Gehvermögens. Ein EDSS von 10 bedeutet Tod durch MS.

Einen weiteren Wert zur Verlaufskontrolle der MS stellt der sogenannte Progressionsindex dar. Hierbei wird der EDSS in Bezug zur Krankheitsdauer gesetzt. So kann beurteilt werden, ob die Krankheit schnell oder langsam progredient ist, und hohe EDSS-Werte können besser bewertet werden.

### 1.1.7 Therapie

Für die MS gibt es nach wie vor keine kausale Therapie. Das Therapieprinzip besteht aus drei Säulen:

- Schubtherapie,
- verlaufsmodifizierende Therapie und
- symptomatische Therapie.

Im *akuten Schub* wird üblicherweise mit einer Glukokortikosteroid-Stoßtherapie von 1000 mg an drei oder fünf aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Bei fehlendem Ansprechen kann als Eskalation eine Plasmapherese erfolgen.

Die *verlaufsmodifizierende Therapie* der MS (siehe Abb. 1.2 S.9) richtet sich nach den Richtlinien der MSTKG (Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe)[38]. Für die verlaufsmodifizierende Dauer- oder Basistherapie stehen in erster Linie Medikamente zur Immunmodulation wie zum Beispiel Interferon- $\beta$  und Glatirameracetat zur Verfügung. In Ausnahmefällen können auch Immunsuppressiva wie Azathioprin und Immunglobuline eingesetzt werden. Bei fehlendem Ansprechen der Basistherapie erfolgt eine Therapieeskalation mit dem monoklonalen Antikörper Natalizumab oder mit Fingolimod. Außerdem stehen als zweite Wahl Mitoxantron und bei fulminanten Verläufen Cyclophosphamid zur Verfügung.

Die meisten Therapien sind jedoch nur für die schubförmige MS zugelassen, nicht für progrediente Verläufe.

Ziel ist eine Reduktion der Krankheitsaktivität und die Stabilisierung des Krankheitsverlaufs. Folgende Nebenwirkungen können auftreten: Schüttelfrost und grippeähnliche Symptome bei der Interferon-Therapie, eine Suppression des Knochenmarks

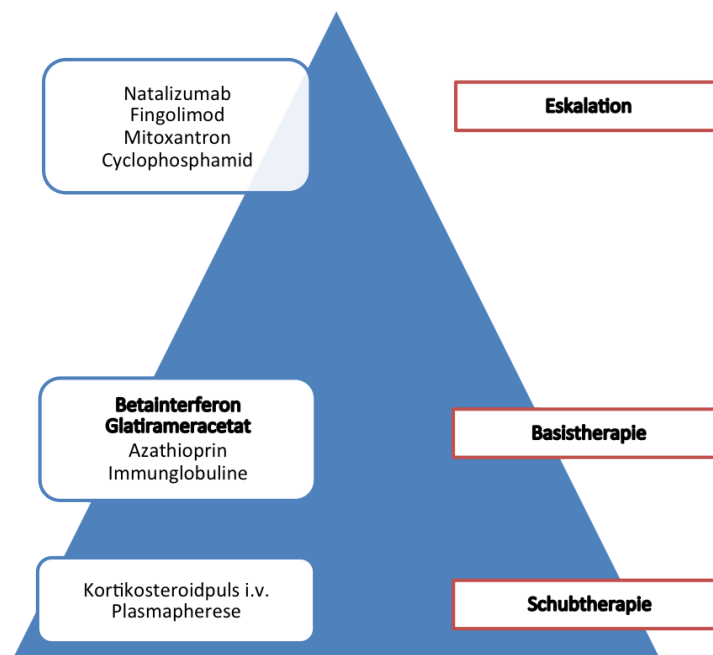


Abb. 1.2: Stufenschema der MS-Therapie nach den Therapieempfehlungen der MSTKG[38]

bei Immunsuppressiva-Gabe, allergische Reaktionen oder die Bildung neutralisierender Antikörper nach Therapie mit synthetischen Polypeptiden, Immunglobulinen oder Interferonen. Bei der Wahl der am besten geeigneten Therapie spielen der individuelle Verlauf der Krankheit, andere Vorerkrankungen des Patienten und auch vorherige Therapien eine Rolle.

Die *symptomatische Therapie* soll die Basistherapie ergänzen. Hierbei spielen zum Beispiel Antidepressiva bei Fatigue, Depressionen oder neuropathischen Schmerzen, eine Schmerzmedikation, Antispastika bei beeinträchtigenden Spastiken und Medikamente zur Symptomlinderung eine Rolle. Häufig sind nicht nur medikamentöse Therapien indiziert, sondern insbesondere auch Physiotherapien zur Verbesserung und Erhaltung der Motorik und der Koordination, aber auch bei Komplikationen wie zum Beispiel einer Inkontinenz oder Spastik. Des Weiteren gibt es komplementäre Therapien, wie zum Beispiel Entspannungstechniken, Phytotherapeutika oder die Akupunktur.

## 1.2 Familiäres Mittelmeerfieber

Das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF) wurde erstmals 1945 als „benigne paroxysmale Peritonitis“ und später als „familiäre paroxysmale Polyserositis“ beschrieben [51]. Es wird sowohl autosomal rezessiv als auch autosomal dominant vererbt und tritt vor allem bei Bewohnern des östlichen Mittelmeerraums auf [8, 51].

### 1.2.1 Epidemiologie

Weltweit sind weit mehr als 10 000 Patienten von einem FMF betroffen, womit es die häufigste autoinflammatorische Erkrankung ist [51]. Charakteristischerweise stammen die Patienten von vier ethnischen Gruppen aus dem Mittelmeerraum ab, den sephardischen Juden, den Türken, den Arabern und den Armeniern [51, 30]. Die Heterozygotenrate kann bei nordafrikanischen Juden bis 1:6, bei Armeniern bis 1:7 betragen [4, 7, 13]. Jedoch sind auch FMF-Fälle bei Amerikanern italienischer, nordeuropäischer oder irischer Abstammung bekannt, was darauf schließen lässt, dass andere Bevölkerungsgruppen ebenfalls betroffen sein können [51].

### 1.2.2 Klinisches Bild

Das Leitsymptom des FMF ist eine rezidivierende, äußerst schmerzhaftes Polyserositis, die gewöhnlich 1-3 Tage dauert und zumeist, aber nicht immer, mit Fieber und einem flüchtigen, unterschiedlich ausgeprägten Exanthem meist der unteren Extremität einhergeht [51]. Die Polyserositis betrifft vor allem Peritoneum, Pleura und Synovia, was zu Bauch- und Brustschmerzen und zu einer nicht-destruktiven Monoarthritis insbesondere der Sprung-, Knie- und Handgelenke führt [51, 30]. Die Dauer des fieberfreien Intervalls ist mit einer Woche bis 3-4 Monaten dagegen sehr variabel. Die Krankheit beginnt typischerweise vor dem 10. Lebensjahr, bei 90 % der Patienten zumindest vor dem 20. Lebensjahr. Nur in etwa 60 % der Fälle findet sich eine positive Familienanamnese.

### 1.2.3 Diagnose

Die Diagnose wird hauptsächlich durch die Anamnese und das klinische Bild unter Anwendung der Tel Hashomer-Kriterien [19] gestellt. Diese Kriterien bestehen aus Major- und Minorkriterien, woraus sich eine definitive oder wahrscheinliche Diagnose ergibt (siehe Tabelle 1.1).

<b>Majorkriterien</b>	<b>Minorkriterien</b>
Rezidivierende Fieberschübe	Rezidivierende Fieberschübe, begleitet von einer Peritonitis, Synovitis oder Pleuritis
Amyloidose vom AA-Typ ohne prädisponierende Erkrankung	Erysipelähnliches Erythem
Gutes Ansprechen auf kontinuierliche Colchicin-Therapie	FMF bei einem erstgradigen Verwandten
<b>Definitive Diagnose</b>	2 Major- oder 1 Major- und 2 Minorkriterien
<b>Wahrscheinliche Diagnose</b>	1 Major- und 1 Minorkriterium

Tab. 1.1: Tel-Hashomer-Kriterien zur Diagnose eines familiären Mittelmeerfiebers (FMF)

Außerdem müssen andere Erkrankungen und Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden [51, 29] wie zum Beispiel das Hyperimmunglobulinämie-D- und periodisches Fieber-Syndrom (HIDS), das Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1-assoziierte periodische Syndrom (TRAPS) , ein akutes rheumatisches Fieber oder andere Autoimmunerkrankungen [17].

Für das FMF gibt es keine spezifischen Laborparameter [16]. Während der Fieberschübe kann man jedoch erhöhte Akute-Phase-Proteine (insbesondere Serum-Amyloid A (SAA) und C-reaktives Protein (CRP) [61]) im Blut messen. Im Urin lässt sich nur bei renaler Amyloidose eine Proteinurie feststellen.

Zur Bestätigung der klinisch gestellten Verdachtsdiagnose FMF erfolgt in der Regel eine molekulargenetische Untersuchung. Durch die Sequenzierung vor allem der Exons 2, 3 und 10 kann man so bei einem klinischem Verdacht die Diagnose sichern.

### 1.2.4 Genetik

Das für die Erkrankung verantwortliche MEFV („Mediterranean fever“)-Gen wurde 1992 erstbeschrieben. Es ist auf der Spitze des kurzen Arms von Chromosom 16

(16p13.3) lokalisiert [51, 34]. Bisher wurden mehr als 150 verschiedene Mutationen beschrieben [58]. Am häufigsten finden sie sich in den Exons 2, 3 und 10, wobei die mit der schwersten Krankheitsausprägung (zum Beispiel M680I, M694V und V726A) von Exon 10 kodiert werden [12, 28, 11, 48, 60]. Eine Mutation mit eher leichter Krankheitsausprägung scheint dagegen die von Exon 2 kodierte E148Q-Substitution zu sein [50, 52, 2]. Klassischerweise wird die Erkrankung autosomal rezessiv vererbt. Jedoch gibt es zunehmend Hinweise und Berichte, dass auch ein heterozygoter Trägerstatus Krankheitssymptome verursachen kann [8].

### 1.2.5 Pathogenese

Das Genprodukt des MEFV-Gens ist das sogenannte Pyrin (früher Marenosttrin genannt), ein Protein, das vorwiegend im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten und Monozyten exprimiert und durch proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  induziert wird [51]. Derzeit wird die genaue Bedeutung des Pyrins in der Apoptose und in der Entzündungsreaktion noch untersucht. Es wird vermutet, dass es in der durch neutrophile Granulozyten vermittelten Entzündung die Rolle eines hemmenden Regulators einnimmt, wobei diese hemmende Wirkung bei einer Veränderung des Proteins infolge eines Aminosäure-Austausches zum Teil oder ganz verloren geht. Jedoch gibt es auch neue Erkenntnisse, nach denen es möglich ist, dass das intakte Pyrin eine entzündungsfördernde Wirkung besitzt, und dass sich diese infolge einer Mutation verstärkt. Dies würde die Erkrankung bei Trägern nur einer Mutation erklären.

Nach der älteren Hypothese konkurriert Pyrin in einem Protein-Komplex, der als NALP3-Inflammasom bezeichnet wird, mit Cryopyrin und Caspase-1 um die Bindung an ASC („apoptosis-associated speck-like protein with a caspase recruitment domain“) und unterdrückt dadurch die Umwandlung von Pro-Interleukin-1 $\beta$  zu Interleukin-1 $\beta$  [34]. Durch Genmutation verändertes Pyrin hat die Fähigkeit der Bindung an ASC verloren, wodurch es wie bei den Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndromen (CAPS) zu einer gesteigerten Bildung dieses proinflammatorischen Zytokins kommt.



### 1.2.6 Verlauf und Prognose

Bei langjährig unbehandeltem Verlauf kann es zu einer Amyloidose mit irreversiblen Nierenschäden kommen. Dies ist die Haupttodesursache der FMF-Patienten [51]. Diese Amyloidose wird durch ein fehlgefaltetes Serum-Amyloid A verursacht, eines der Akute-Phase-Proteine, die besonders bei systemischen Entzündungen vermehrt gebildet werden. Durch Ablagerung dieses Proteins kommt es zu Organschäden vor allem an Nieren, Gastrointestinaltrakt, Nebennieren, Milz und Lunge, seltener dagegen an Leber, Herz und Schilddrüse. Ansonsten haben die Betroffenen eine normale Lebenserwartung. Deshalb ist ein frühzeitiges Erkennen und Behandeln der Patienten (zum Beispiel auch durch Testung der Familienangehörigen von Betroffenen) entscheidend.

### 1.2.7 Therapie

Bereits 1974 wurde in einer Arbeit von Zemer et al. [68] Colchicin als Mittel der Wahl zur Therapie des Familiären Mittelmeerfiebers vorgestellt.

Die tägliche Gabe von Colchicin, das an Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert, ist bei bis zu 96 % der betroffenen Patienten therapeutisch wirksam und ist damit die Therapie der Wahl. Als Alternative gibt es als neue Therapieoption Anakinra, einen Interleukin-1-Antagonisten, der vor allem bei Patienten, die resistent auf eine Colchicinbehandlung sind, gute Wirkung zeigt und die FMF-Schübe unterdrückt [42, 37].

Das Colchicin beeinflusst zum einen die Fieberschübe und zum anderen das Auftreten bzw. das Fortschreiten von Folgeschäden und Komplikationen wie zum Beispiel der Amyloid-assoziierten Nephropathie mit Nierenversagen.

Colchicin-Nebenwirkungen sind eher selten, können aber als Durchfälle, Myopathien, Neuropathien und Leukopenien auftreten, vor allem bei Patienten mit eingeschränkter Leber- oder Nierenfunktion.

### 1.3 „Interleukin-1-converting enzyme“(ICE)-Fieber

Zum sogenannten ICE-Fieber gibt es in der Literatur bislang nur eine zur Publikation eingereichte Arbeit von Frau Prof. Dr. med. Angela Rösen-Wolff und Mitarbeitern mit dem Titel „Hypomorphic germline mutations in CASP-1 do not prevent and may even provoke autoinflammatory disease“ [45], in der diese autoinflammatorische Erkrankung erstmals beschrieben wird.

Darin wird eine mögliche Erklärung abgegeben, wie es durch Mutationen im CASP-1-Gen, das für die Caspase-1 kodiert, die Pro-Interleukin-1 $\beta$  und Pro-Interleukin-18 zu aktivem Interleukin-1 $\beta$  bzw. Interleukin-18 prozessiert, zu systemischen Entzündungen mit Fieberschüben kommen kann. Anhand von fünf positiv getesteten Patienten werden in dieser Arbeit die Symptome der Erkrankung beschrieben.

#### 1.3.1 Klinisches Bild

Systemische Entzündung und rezidivierende Gelenkschmerzen sind die vorherrschenden Symptome. Bei vier Patienten wurden Fieberepisoden, bei drei Patienten Exantheme und bei einzelnen Patienten eine Konjunktivitis, eine aphthöse Stomatitis, abdominelle Schmerzen und eine Diarrhoe bzw. Myalgien und Lymphknotenschwellungen beobachtet. Bei keinem der Patienten wurden Gelenkdestruktionen festgestellt.

#### 1.3.2 Pathophysiologie

Die Caspase-1, auch „interleukin-1-converting enzyme“ (ICE) genannt, ist ein proinflammatorisch wirkendes Protein, das bei den meisten Entzündungsprozessen wie zum Beispiel Infektionen, Autoimmunerkrankungen und autoinflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Zum einen spaltet die Caspase-1 Vorstufen von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18 und Interleukin-33 und bildet so die aktiven Formen dieser Zytokine. Zum anderen führt die Interaktion zwischen den CARDs („caspase recruitment domains“) der Procaspase-1 und des RIP2 („receptor-interacting protein 2“) zur vermehrten Aktivierung von NF- $\kappa$ B („nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells“) und p38-MAPK („mitogen-activated protein kinase“), die wiederum beide zur Entstehung einer Entzündung durch Induktion oder Repression verschiedener Zytokine, Mediatoren und anderer Faktoren, die das Im-

munsystem beeinflussen, beitragen.

Bei den durch Mutation veränderten Formen der Caspase-1 ist die Enzymaktivität vermindert, d. h. es werden weniger Interleukine aus ihren Vorstufen gebildet. Dagegen ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und p38-MAPK durch die Procaspase-1 bei diesen Patienten gesteigert, was möglicherweise zu den Fieberschüben und Entzündungssymptomen führen kann.

#### 1.3.3 ICE-Fieber und Multiple Sklerose

Bisher gibt es noch keine Daten zur Prävalenz von CASP-1-Mutationen bei Multiple Sklerose-Patienten. Ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen ist jedoch durchaus denkbar. Durch Mutationen im CASP1-Gen könnte es zu einer verstärkten Aktivierung der NF- $\kappa$ B- und p38-MAPK-vermittelten Signaltransduktionswege kommen, was wiederum die Entzündungsaktivität der MS negativ beeinflussen könnte. Durch das klinische Bild, das Ähnlichkeit mit dem des FMF und des TRAPS hat, ist ein vermehrtes Auftreten dieser neu beschriebenen hereditären autoinflammatorischen Erkrankung bei MS-Patienten durchaus denkbar, insbesondere, weil eine Häufung der zu einem milden TRAPS führenden TNFRSF1A-R92Q-Mutation bei MS-Patienten bereits nachgewiesen wurde [23].

## 1.4 Multiple Sklerose und Familiäres Mittelmeerfieber

Zu dem möglichen Zusammenhang zwischen MS und FMF gibt es in der Literatur bisher fünf ausführliche Arbeiten. Drei davon stammen aus der Türkei, zwei aus Israel. In diesen Arbeiten wurden zum einen MS-Patienten auf Mutationen im MEFV-Gen untersucht und der Verlauf der MS bei Trägern solcher Mutationen genauer betrachtet. Zum anderen wurden Kohorten von FMF-Patienten hinsichtlich neurologischer Symptome untersucht, um eine Koexistenz von FMF und MS zu entdecken.

Die erste türkische Arbeit wurde 1996 in Ankara von M. A. Topçuoğlu und R. Karabudak [57] veröffentlicht. Diese berichtet über drei Patienten mit bekanntem FMF, die sich nach einem Zeitintervall von 4, 11 bzw. 12 Jahren nach Diagnosestellung des FMF mit neurologischen Symptomen in der Universitätsklinik in Ankara vorstellten. Bei den Patienten 1 und 3 konnte entsprechend den Kriterien nach Poser eine klinisch sichere MS nachgewiesen werden, bei Patient 2 hingegen nur eine laborgestützte MS. Die Autoren konnten nicht ausschließen, dass es sich dabei um eine zufällige Koinzidenz der beiden Krankheiten handelte.

Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zu MRT-Veränderungen bei Patienten mit FMF, aber ohne eine MS oder neurologische Symptome, so daß auch eine ZNS-Manifestation des FMF denkbar wäre. In der Literatur findet man nur einzelne Berichte über FMF-Patienten mit Komplikationen, wie zum Beispiel die Beschreibung eines zerebralen Pseudotumors [18], der Entzündung des Sehnervs [31], von ZNS-Komplikationen durch eine Vaskulitis vom Polyarteriitis nodosa-Typ [21] oder durch eine Hyperkoagulabilität bei renaler Amyloidose [56], von Kopfschmerzen, unspezifischen Veränderungen des Elektroenzephalogramms während einer Fieberepisode [31], wiederholten aseptischen Meningitiden [5, 47] und einer Amyloid-verursachten Ophthalmoplegie [22].

In der zweiten türkischen Arbeit von 2005 von Gulsen Akman-Demir et al. [1] und in der israelischen Arbeit von Shinar et al. [49] wurden jeweils retrospektiv große MS-Kohorten auf Mutationen im MEFV-Gen untersucht. In der türkischen Arbeit fanden sich unter den 2800 Patienten mit entzündlicher oder demyelinisierender ZNS-Erkrankung 12 Patienten mit Mutationen. Neun der positiv Getesteten hatten eine gesicherte MS. Damit war die FMF-Prävalenz in der Kohorte der 2268 MS-Patienten viermal höher als in der türkischen Normalbevölkerung. Umgekehrt

wurden in einer FMF-Kohorte von 2000 Patienten neun MS-Fälle gefunden, was wiederum einer zehnmal höheren MS-Prävalenz als in der türkischen Normalbevölkerung entspricht. In der israelischen Arbeit dagegen fand sich keine Häufung von Mutationen im MEFV-Gen in der Kohorte der MS-Patienten gegenüber der Normalbevölkerung. Wurde das Kollektiv jedoch noch einmal in Non-Ashkenazi- und Ashkenazi-Juden unterteilt, so hatten in der Gruppe der Non-Ashkenazi-Juden Patienten mit MEFV-Mutationen einen signifikant schwereren Verlauf der RR-MS als Patienten ohne Mutation. EDSS-Werte von 3,0 und 6,0 wurden von den Mutationsträgern deutlich schneller erreicht. Die rascheste Progredienz war bei Trägern der M694V-Mutation zu beobachten. Bei den Ashkenazi-Juden konnte dagegen kein signifikanter Unterschied im Verlauf zwischen positiv und negativ getesteten Patienten festgestellt werden.

Die Autoren der türkischen Arbeit betrachten eine zufällige Koinzidenz der beiden Erkrankungen aufgrund ihrer Ergebnisse als unwahrscheinlich, sie halten es vielmehr für möglich, dass FMF-Patienten eine höhere Inzidenz demyelinisierender oder entzündlicher ZNS-Erkrankungen haben.

Die israelischen Autoren dagegen gehen nicht davon aus, dass eine Mutation im MEFV-Gen Einfluss auf die Entwicklung einer MS hat. Jedoch scheint die Schubrate und die Progression der MS beeinflusst zu werden.

In den beiden neuesten Arbeiten von Yahalom et al. [66] und Unal et al. [62] wurde wiederum zum einen eine israelische FMF-Kohorte auf MS-Patienten durchsucht, zum anderen ein türkisches MS-Kollektiv mit einem gesunden Kontrollkollektiv bezüglich der Prävalenz von MEFV-Mutationen verglichen.

Bei den FMF-Patienten aus Israel wurde eine zweimal höhere Prävalenz der MS festgestellt, als es in der Normalbevölkerung der Fall ist. Außerdem schien die MS bei Patienten mit der homozygoten M694V-Mutation schwerer zu verlaufen als bei anderen Mutationen. In der türkischen Arbeit wurden signifikant mehr Mutationsträger in dem Kollektiv der MS-Patienten gefunden als im Kontrollkollektiv. Auch wurde bei Patienten mit Mutationen wiederum schneller ein EDSS von 3,0 erreicht und die Schubrate schien ebenfalls höher zu sein als bei Patienten ohne Mutation. Die Autoren beider Arbeiten kommen zu dem Schluss, dass Mutationen im MEFV-Gen die Entwicklung einer MS begünstigen können und dass auch der Verlauf der MS möglicherweise negativ beeinflusst werden kann.

## 1.5 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit

In einer Arbeit von 2007 [23] wurde bei MS-Patienten eine Häufung von TRAPS, einer angeborenen autoinflammatorischen Erkrankung, festgestellt. Drei dieser damals untersuchten MS-Patienten waren zusätzlich heterozygote Träger einer Mutation im MEFV-Gen. Sowohl diese Feststellung als auch die türkischen und israelischen Arbeiten, in denen sich eine Häufung von Familiärem Mittelmeerfieber bei MS-Patienten zeigte, warfen die Frage auf, ob es auch bei kaukasischen MS-Patienten eine erhöhte Prävalenz des FMF gibt und wie hoch die Prävalenz der zugrundeliegenden MEFV-Mutationen in der deutschen Allgemeinbevölkerung ist. Daher wurden in dieser Arbeit 180 neurologische Patienten, die entweder die Diagnose Multiple Sklerose haben oder bei denen zumindest der Verdacht auf diese Erkrankung besteht (Gruppe 1), auf Mutationen im MEFV-Gen getestet. Außerdem untersuchten wir ein weiteres, unselektiertes Patientenkollektiv mit 260 MS-Patienten (Gruppe 2) auf die beiden Mutationen im MEFV-Gen, die am häufigsten in Gruppe 1 aufgetreten waren. Das Kontrollkollektiv (Gruppe 3) wurde aus 400 deutschstämmigen Personen gebildet. (Die ausführliche Beschreibung der Gruppen erfolgt in Kapitel 3).

Das ICE-Fieber, eine bisher noch weitgehend unbekannte autoinflammatorische Erkrankung, wurde in unsere Untersuchung mit eingeschlossen, da auch ein Zusammenhang zwischen MS und ICE-Fieber denkbar ist. Darüber hinaus wollten wir feststellen, ob diese Erkrankung überhaupt in Deutschland mit relevanter Häufigkeit zu finden ist.

## 2 Methoden

### 2.1 Erhebung der klinischen Parameter

Die klinischen Untersuchungen und die Rekrutierung von Patienten erfolgte am Institut für klinische Neuroimmunologie am Klinikum Großhadern.

Zur klinischen Verlaufsbeurteilung der Multiple Sklerose-Patienten wurde standardmäßig der EDSS erhoben. Hierzu erfolgte eine ausführliche klinische Untersuchung aller zu beurteilenden Funktionssysteme. Um die EDSS-Werte objektiver beurteilen zu können, wurde außerdem der Progressionsindex (PI) ermittelt. Dabei wird der Quotient aus dem EDSS-Wert und der Dauer der Erkrankung in Jahren gebildet. So kann bestimmt werden, ob die MS schnell oder langsam voranschreitet. Zur Einordnung der Patienten aus Gruppe 1 wurden standardisierte Fragebögen erstellt, die systematisch die typischen Symptome des Familiären Mittelmeerfiebers abfragten.

### 2.2 Labormethoden

Die Laboruntersuchungen erfolgten am Institut für klinische Chemie am Klinikum Großhadern unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Peter Lohse.

Mittels DNA-Sequenzierung wurden die Exons 2, 3 und 10 des MEFV-Gens und die Exons 6, 7, 8 und 9 des CASP1-Gens der Patienten aus Gruppe 1 auf Mutationen untersucht. Außerdem wurde in Gruppe 2 und 3 mit Hilfe einer Sondenhybridisierung speziell nach den Pyrin-Mutationen E148Q und K695R gesucht.

### 2.2.1 DNA-Isolierung mittels des „QIAamp DNA Blood Mini“-Kits der Firma QIAGEN

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach Vorschrift der Firma (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, zweite Ausgabe, November 2007[44]). Die beiden mitgelieferten Waschpuffer wurden gemäß der Anleitung mit 100 %igem Äthanol verdünnt (Waschpuffer 1 mit 125 ml, Waschpuffer 2 mit 160 ml). Die lyophilisierte Protease wurde mit dem dazugehörigen Solvent (5,5 ml) aufgelöst. Es wurden entsprechend der Anzahl an Proben 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorbereitet. Jeweils 20 µl Protease wurden auf dem Boden des Reaktionsgefäßes vorgelegt und anschließend 200 µl der gemischten Blutprobe darauf pipettiert. Dann wurden jeweils 200 µl AL-Puffer (Lyse) zupipettiert, das Reaktionsgefäß fest verschlossen und sofort 15 Sekunden im Intervall gevortext, bis die Lösung glasig und dunkel erschien. Anschließend kam das Reaktionsgefäß für 10 Minuten in einen auf 56 °C eingestellten Heizblock. Innerhalb dieser Inkubationszeit wurden zentrifugierbare Chromatographie-Säulen mit den Nummern der Proben beschriftet. Nach der Inkubationszeit wurden die am Deckel hängenden Kondensationstropfen durch kurzes Zentrifugieren entfernt und 200 µl 100 %iger Äthanol zu jeder Probe gegeben. Die Proben wurden sofort 15 Sekunden im Intervall gevortext und kurz zentrifugiert. Das gesamte Volumen wurde auf die Chromatographie-Säulen überführt. Die Säulen wurden dann in die Zentrifuge gestellt und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Dabei band die DNA an die Silica-Membran (Ionenaustauschprinzip der Chromatographie). Die Säulen wurden zum Waschen der Membran in neue Sammelgefäße gestellt, der Unterstand samt Gefäß dagegen verworfen. Zum Waschen wurden jeweils 500 µl Waschpuffer 1 auf die Säule pipettiert und anschließend erneut eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurden Verunreinigungen sowie Blut- und Lyse-Pufferreste von der Membran entfernt. Ein weiterer Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer 2 folgte. Nun wurde drei Minuten bei 14000 rpm (maximale Geschwindigkeit) zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen in vorbereitete, beschriftete 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 200 µl Elutionspuffer versetzt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von einer Minute bei 8000 rpm löste sich die DNA von der Säule und wurde im Reaktionsgefäß aufgefangen. Die DNA konnte nun für die PCR verwendet werden.



### 2.2.2 Amplifikation/ Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird ein bestimmter Abschnitt eines Gens in mehreren Zyklen kopiert und exponentiell vervielfältigt. Diese Amplifikation dient dazu, ausreichend Material für genetische Analysen zu gewinnen.

#### Amplifikationsansatz

Die HotStarTaq-DNA-Polymerase wurde von der Firma QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland) bezogen. Im Kit waren das Enzym, ein 10 x-Reaktionspuffer,  $\text{MgCl}_2$  (25 mM) und Q-Solution enthalten. Das  $\text{MgCl}_2$  wurde im Reaktionspuffer mit einer Endkonzentration von 1,5 mM verwendet. Das Enzym hatte eine Konzentration von 5 U/ $\mu\text{l}$ . Pro 25  $\mu\text{l}$ -PCR-Ansatz wurden 0,625 U eingesetzt. Q-Solution ist ein Zusatz, der die Amplifikation von schwierigen DNA-Sequenzen (zum Beispiel Guanin-Cytosin(GC)-reichen Regionen) ermöglicht und nach Bedarf eingesetzt wurde.

Bei der *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase, dem Enzym, das die DNA-Bausteine zusammenfügt, handelte es sich um eine HotStart-Taq, d. h. das Enzym musste erst durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C aktiviert werden.

Ein Standard 25 $\mu\text{l}$ -PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

<u>ohne Zusatz:</u>	<u>mit Zusatz:</u>
2,50 $\mu\text{l}$ DNA (50-200 ng)	2,50 $\mu\text{l}$ DNA (50-200 ng)
2,50 $\mu\text{l}$ 10x-Reaktionspuffer	2,50 $\mu\text{l}$ 10x-Reaktionspuffer
2,50 $\mu\text{l}$ dNTPs (1,25 mM)	2,50 $\mu\text{l}$ dNTPs (1,25 mM)
	5,00 $\mu\text{l}$ Q-Solution
0,50 $\mu\text{l}$ Primer vorwärts (20 $\mu\text{M}$ )	0,50 $\mu\text{l}$ Primer vorwärts (20 $\mu\text{M}$ )
0,50 $\mu\text{l}$ Primer rückwärts (20 $\mu\text{M}$ )	0,50 $\mu\text{l}$ Primer rückwärts (20 $\mu\text{M}$ )
0,13 $\mu\text{l}$ Taq (0,625 U)	0,13 $\mu\text{l}$ Taq (0,625 U)
16,40 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$	11,40 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$
<hr/> 25,00 $\mu\text{l}$ Gesamtvolumen	<hr/> 25,00 $\mu\text{l}$ Gesamtvolumen

## Benötigte Reagenzien

### Nukleotide (dNTPs)

Die dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) sind ein Gemisch aus den vier Bausteinen Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Das Gemisch wurde aus gebrauchsfertigen Einzellösungen (100 mM) der Firma Invitrogen hergestellt. Gearbeitet wurde mit einer 1,25 mM-Gebrauchslösung, die aliquotiert bei -20 °C gelagert wurde. Die Endkonzentration in der PCR betrug 0,125 mM.

### Primer

Die verwendeten Primer waren mit wenigen Ausnahmen alle entsprechend der Referenz-Gensequenzen (OMIM-Datenbank) unter der Beachtung der Regeln zum Design geeigneter Oligonukleotide selbst ausgewählt worden.

Die Primer wurden als Auftragssynthese von der Firma ThermoElectron Corporation (Ulm, Deutschland) hergestellt, HPLC-gereinigt und lyophilisiert geliefert. Das Lyophilisat wurde bis zur Herstellung der Gebrauchslösung bei -20 °C gelagert.

Die Stammlösung wurde mit 1x TE-Lösung auf eine Konzentration von 200 µM eingestellt. Zum Gebrauch wurde die Stammlösung 1:10 mit H<sub>2</sub>O auf 20 µM verdünnt. Die Endkonzentration in der PCR betrug 0,4 µM.

Sowohl die Stammlösungen als auch die Gebrauchslösungen wurden aliquotiert bei -20 °C gelagert.

### Spezielle Zusätze

Verwendete Zusätze waren Dimethylsulfoxid (DMSO) und die Q-Solution. Die Q-Solution wurde von der Firma QIAGEN zusammen mit der Taq-Polymerase geliefert und enthält sowohl DMSO als auch Betain, ein Oxidationsprodukt des Cholin.

Die Zusätze wurden bei der Amplifikation GC-reicher Regionen (Erniedrigung der Schmelztemperatur) und zur Minimierung der Synthese unspezifischer PCR-Produkte verwendet. Die DNA ließ sich durch diese Zusätze häufig besser amplifizieren.

### **PCR-Programm**

Eine PCR besteht in der Regel aus dreißig bis vierzig sich wiederholenden Temperatur-Zyklen mit jeweils drei Schritten.

Die Erwärmung auf 95 °C spaltet die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge auf. Dies ermöglicht den Primern im zweiten Schritt die Anlagerung an den jeweils komplementären DNA-Abschnitt. Die verwendete Temperatur ist von der Struktur (GC-Gehalt) und der Länge der jeweiligen Primer abhängig. Im dritten Schritt bei 72 °C arbeitet die Polymerase optimal. Ausgehend vom Startpunkt (Primer) werden komplementär zum Einzelstrang die Nukleotide eingebaut. Dieser Zyklus wird dann 30 bis 45 mal wiederholt, um ausreichend PCR-Produkt zu erhalten.

Ein Standard-Programm sieht wie folgt aus:

---

Initiale Denaturierung	95 °C	15 Minuten
1. Schritt	95 °C	20 Sekunden
2. Schritt	spezifische Anlagerungstemperatur der Primer	20 Sekunden
3. Schritt	72 °C	20 Sekunden
Diese drei Schritte eines Zyklus werden in der Regel 35 bis 40 mal wiederholt.		
Abschließende Elongation:	72 °C	5 Minuten

### 2.2.3 Gelelektrophorese

Die Gel-Elektrophorese ermöglicht das Auftrennen der PCR-Produkte im elektrischen Feld anhand ihrer Größe, da Nukleinsäuren negativ geladen sind. Durch das Anlegen von Strom in einem Puffersystem bewegen sich die aufgetragenen Proben vom Minus- zum Pluspol durch das feste Gel und trennen sich entsprechend ihrer Größe auf. Größere Produkte wandern dabei langsamer als kleine.

Zu einem Gel-Elektrophorese-System gehören:

1. eine Elektrophorese-Kammer,
2. ein Laufpuffer (hier: 1x TBE-Puffer) und
3. ein Spannungsgerät

#### Anfertigung von Agarose-Gelen zur Auftrennung von PCR-Produkten

Die aus Algen gewonnene Agarose wurde als Pulver geliefert. Entsprechend des Gehalts wurde die gewünschte Menge abgewogen und in ein Mikrowellen-geeignetes Gefäß mit Verschuß gegeben und mit dem bei der Elektrophorese verwendeten Laufpuffer versetzt. Die Suspension wurde gut geschüttelt und solange in der Mikrowelle unter Beobachtung erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte.

Die gelöste Agarose wurde anschließend auf einen Plexiglas-Träger gegossen und Kämme zur Taschenbildung eingesteckt. Nach dem Aushärten der Gels und dem Übersichten mit Laufpuffer wurden die Kämme vorsichtig herausgezogen. Dadurch erhielt man die Taschen, in die die Proben geladen wurden.

### Laden der Proben

Da die Proben unter Puffer in die Taschen geladen werden, müssen sie beschwert werden.

Das Beschweren erfolgte durch einen sogenannten Ladepuffer, der aus Ficoll und zwei Farbstoffen (Bromphenolblau und Xylencyanol) besteht. Diese Farbstoffe laufen unterschiedlich schnell vom Minus- zum Pluspol, so dass man die Laufstrecke der PCR-Produkte nachverfolgen kann.

Zum Laden der Proben wurden 10 µl PCR-Produkt mit 1,5 µl Ladepuffer versetzt.

### Größenmarker (hier: „Gene Ruler™ 1 kb ladder“)

Um die Größe der PCR-Produkte zu überprüfen, ist es erforderlich, dass man einen Größenstandard auf dem Gel mitlaufen lässt. Der Größenstandard bestand aus DNA-Fragmenten definierter Größe (Konzentration 50 ng / 6 µl). Er wurde konzentriert von der Firma Fermentas geliefert und musste verdünnt werden. Dazu wurden 100 µl Standard mit 100 µl Ladepuffer (von der Firma mitgeliefert) und 400 µl destilliertem H<sub>2</sub>O versetzt und gemischt.

### Gel-Färbung

Mit Ethidiumbromid-Lösung können die aufgetrennten PCR-Produkte gefärbt und damit sichtbar gemacht werden, da sich Ethidiumbromid in den DNA-Doppelstrang einlagert und unter UV-Beleuchtung bei 302 nm rot fluoresziert.

Zum Färben wurden die Gele in eine dafür gekennzeichnete Färbeschale gelegt und mit verdünnter Ethidiumbromid-Lösung übergossen. Nach 4 bis 5 Minuten wurde die Ethidiumbromid-Lösung in das Aufbewahrungsgefäß zurückgegossen und die Gele mit destilliertem Wasser gespült. Dieses Wasser wurde in ein Abfallgefäß gegossen. Anschließend wurden die Gele in die Elektrophoresekammer zurückgelegt. Nach ca. 5 minütigem Anlegen der Spannung zum Entfärben des Geles konnte dieses fotografiert werden.

Die Fotoanlage besteht aus einer geschlossenen Kammer mit einem UV-Licht-Tisch. Oben auf der Kammer ist die Kamera angebracht.

## 2.2.4 Sequenzierung

### Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mittels des ExoSAP-IT-Kits der Firma United States Biochemical Corp. (USB) aufgereinigt. Dabei zerstört eine Exonuklease die in der PCR im Überschuß zugegebenen Primer durch Verdau der Einzelstrang-DNA. Der verwendete Puffer und die überschüssigen dNTPs stören dagegen in der nachfolgenden Sequenzreaktion nicht.

5 µl PCR-Produkt wurden in einem Sequenz-Reaktionsgefäß (200 µl, dünnwandig) vorgelegt. Mit einer weißen, gestopften Pipettenspitze (20 µl) wurden 2 µl ExoSAP-IT-Reagenz dazu pipettiert und der Ansatz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenige Luftblasen entstehen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einen Thermocycler (PE 2400) gestellt und erst 15 Minuten bei 37 °C (Enzym aktiv) und dann weitere 15 Minuten bei 80 °C (Inaktivierung des Enzyms) inkubiert. Anschließend konnten die PCR-Produkte sequenziert werden.

### Sequenzreaktionsansatz

Die Sequenzreaktion wurde mit dem BigDyeTerminator v3.1-Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Der Ansatz erfolgte in einem 200 µl-Reaktionsgefäß und bestand aus folgenden Reagenzien:

3,0 µl aufgereinigtes Fragment

1,5 µl Reaktionspuffer

1,5 µl BigDye-Reagenz

3,0 µl destilliertes H<sub>2</sub>O

---

9,0 µl Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler (PE 9600 oder PE 9700) gestellt und folgendes Programm gestartet:

Initiale Denaturierung	96 °C	1 Minute
1. Schritt	96 °C	10 Sekunden
2. Schritt	50 °C	5 Sekunden
3. Schritt	60 °C	1 Minute

Diese drei Schritte (entsprechend einem Zyklus) wurden 25x wiederholt.

### **Aufreinigung des Sequenzansatzes**

Um die Probe auf den DNA-Sequencer laden zu können, musste diese nach der Sequenzreaktion aufgereinigt werden.

Dazu wurde die Sequenzreaktion mit 10 µl 125 µM EDTA-Lösung versetzt und das gesamte Volumen in ein beschriftetes, mit 55 µl 100 %igem Äthanol und 2 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) vorbereitetes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde gut gemischt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß mit der Deckelverbindung nach außen in eine Zentrifuge gestellt. Bei maximaler Umdrehungszahl wurde jetzt mindestens 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Anschließend wurden 250 µl 70 %iger Äthanol dazupipettiert und erneut gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde in die Zentrifuge gestellt und mindestens fünf Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, ein weiteres Mal 250 µl 70 %iger Äthanol dazupipettiert und erneut gemischt. Wieder wurde das Reaktionsgefäß in die Zentrifuge (Deckelverbindung nach außen) gestellt und mindestens fünf Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgekippt und das nicht sichtbare Pellet an der Luft oder auf dem Heizblock getrocknet.

### **Laden der Sequenzreaktion und Starten des Laufes**

Die umgefällten, getrockneten Sequenzproben wurden mit 30 µl HiDi-Formamid versetzt, gut gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gelöst. Anhand einer vorbereiteten Plattenbelegungsvorlage wurden jeweils 15 µl Probe luftblasenfrei in die Vertiefungen einer „MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate“ pipettiert.

Die Platte wurde mit einer gummiartigen „96-well Plate Septa“-Matte abgedeckt und in die Platten-Halterung des Sequenzers gestellt.

Nun wurde das Programm für die Sequenzierung am Computer aufgerufen, die erforderlichen Daten eingegeben und der Lauf gestartet.

Die einzelnen Sequenzen konnten nach abgeschlossenem Lauf ausgedruckt werden.

### 2.2.5 Hybridisierung mit spezifischen Gensonden unter Verwendung zweier „Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays“ der Firma Applied Biosystems

Mit diesem Verfahren können einzelne spezifische Mutationen bzw. Polymorphismen durch Anlagerung fluoreszenzmarkierter Gensonden an die DNA detektiert werden. Die Isolierung und Aufreinigung der DNA erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben. Dann wurde, je nach Anzahl der Proben, ein Master-Mix vorbereitet, bestehend aus 5 µl 2x „TaqMan® Universal PCR Master Mix“, 2,5 µl destilliertem Wasser und 0,5 µl 20x „working stock“ pro Probe. In jedem 200 µl-Reaktionsgefäß wurden 8 µl dieses Master-Mix vorgelegt und 2 µl DNA mit einer Endkonzentration von 1–20 ng dazupipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden fest geschlossen und die Platte kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde die PCR mit Hilfe des „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ (SDS) gestartet. Das Programm besteht aus folgenden Schritten:

1. Schritt (Enzymaktivierung)	75 °C	10 Minuten
2. Schritt (Denaturierung)	92 °C	15 Sekunden
3. Schritt (Anlagerung der Primer und DNA-Synthese)	60 °C	90 Sekunden

Schritt 2 und 3 werden 40x wiederholt.

Nach Beendigung des Laufes wurde mit Hilfe der SDS-Software eine Endpunkt-Auslesung der Platte durchgeführt. Dabei werden die während der PCR entstehenden Fluoreszenz-Signale gemessen, die anzeigen, welche Allele (mutiert und/oder normal) jede Patientenprobe aufweist.

Anhand der Positiv- und Negativkontrollen, die als Referenzwert auf jeder Platte mitliefen, konnten die Patienten damit entweder als homozygoter oder heterozygoter Träger für die getestete Mutation oder als Wildtyp (zwei normale Allele) identifiziert werden. Schwer zuzuordnende Patientenproben wurden mittels einer Sequenzreaktion nachkontrolliert. Ebenso wurden alle positiven Ergebnisse durch eine Sequenzanalyse bestätigt.



## 2.3 Statistik

Für die Beschreibung der Kollektive und deren klinische Charakteristika wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median angewendet. Diese Werte wurden für Alter, EDSS-Wert und Progressionsindex sowie für Alter bei Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer der MS-Patienten berechnet. Zum Vergleich des Patientenkollektivs aus der Marianne-Strauss-Klinik (Gruppe 2) mit den Kontrollen (Gruppe 3) bezüglich der Häufigkeit der Pyrin-Mutationen E148Q und K695R wurde der „Exakte Test“ nach Fisher herangezogen. Damit wurde der p-Wert ausgerechnet, der die statistische Signifikanz eines Ergebnisses angibt. So sollte festgestellt werden, ob es in einem der Kollektive signifikant mehr Mutationen gibt als in dem anderen. Ist der p-Wert also kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau (hier 0,05), so ist der Unterschied der Ergebnisse signifikant, ist der p-Wert dagegen größer als 0,05, so ist das Ergebnis statistisch nicht signifikant und damit nicht aussagekräftig.

Um in Gruppe 1 statistisch signifikante Unterschiede der klinischen Charakteristika zwischen MS-Patienten mit und ohne Mutation im MEFV-Gen festzustellen, wurde der t-Test angewandt. Dabei wurden die Mittelwerte von Alter bei Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer, EDSS und Progressionsindex miteinander verglichen. Es wurden auch hier p-Werte errechnet, die als statistisch signifikant gelten, wenn sie kleiner als das Signifikanzniveau (hier wiederum 0,05) sind.



## 3 Patienten und Kontrollen

Insgesamt wurden zwei Patientenkohorten (Gruppe 1 und Gruppe 2) und ein Kontrollkollektiv (Gruppe 3) auf Mutationen untersucht.

### **Gruppe 1:**

Die DNA von 180 Patienten, die sich mit neurologischen Symptomen und dem Verdacht auf eine MS in der neuroimmunologischen Ambulanz des Klinikums Großhadern der Universität München vorgestellt hatten, wurde mittels DNA-Sequenzanalyse auf Mutationen in den Exons 2, 3 und 10 des MEFV-Gens sowie auf Alterationen in den Exons 6, 7, 8 und 9 des CASP1-Gens untersucht.

Diese 180 Patienten konnten noch einmal unterteilt werden. 98 Patienten gaben mindestens zwei typische Symptome für das Familiäre Mittelmeerfieber an, wie zum Beispiel rezidivierende Fieberschübe über mehrere Tage oder auch subfebrile Temperaturen, Bauchschmerzen, rezidivierende Gelenkschmerzen, Gelenkschwellungen, Myalgien, Kopfschmerzen, Migräne, Augenentzündungen oder häufige unklare Infekte. 82 Patienten hatten dagegen keine derartigen Symptome.

Die klinischen Basischarakteristika sind in Tabelle 3.1 (S. 32) dargestellt.

### **Gruppe 2:**

Im weiteren Verlauf wurde ein zweites, unselektiertes Patientenkollektiv untersucht. Diese 260 MS-Patienten stammten aus der Marianne-Strauss-Klinik, einer auf Multiple Sklerose spezialisierten Neurologischen Klinik in Berg (Oberbayern). Mittels Sondenhybridisierung wurde deren DNA auf die beiden in Gruppe 1 am häufigsten aufgetretenen Pyrin-Mutationen E148Q und K695R hin untersucht.

### **Gruppe 3:**

Als Kontrollkollektiv wurde die DNA von 400 deutschstämmigen Personen ebenfalls mittels Sondenhybridisierung auf die Mutationen E148Q und K695R untersucht.

Die klinischen Basischarakteristika der Gruppe 2 und 3 sind in Tabelle 3.2 (S. 32) zusammengefasst.

	Alle Patienten	Patienten mit FMF-Symptomen	Patienten ohne FMF-Symptome
<b>Anzahl n</b>	180	98	82
<b>Geschlecht m/w</b>	34/146	17/81	17/65
<b>Alter</b>			
Altersspanne	16 - 76 Jahre	17 - 76 Jahre	16 - 66 Jahre
Mittelwert	40,63	42,7	38,15
Standardabweichung	$\pm 11,98$	$\pm 12,39$	$\pm 11,03$
Median	41	43	37
<b>Herkunft</b>			
Deutschland/ Nicht-Deutschland	143/37	76/22	67/15

Tab. 3.1: Klinische Basischarakteristika des untersuchten Patientenkollektivs (Gruppe 1)

	Unselektierte MS-Patienten (Gruppe 2)	Kontrollen (Gruppe 3)
<b>Anzahl n</b>	260	400
<b>Geschlecht m/w</b>	104/156	200/200
<b>Alter</b>		
Altersspanne	21 - 79 Jahre	2 - 91 Jahre
Mittelwert	48,18	43,82
Standardabweichung	$\pm 10,66$	$\pm 22,42$
Median	48	44,5
<b>Herkunft</b>		
Deutschland/ Nicht-Deutschland	237/23	400/0

Tab. 3.2: Klinische Basischarakteristika der unselektierten MS-Patienten und Kontrollen (Gruppe 2 und 3)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mutationen und Charakteristika der Gruppe 1

Nach ausführlicher differentialdiagnostischer Einordnung konnte bei 160 Patienten aus Gruppe 1 die Diagnose MS oder der hochgradige Verdacht auf MS gestellt werden. 20 Patienten erfüllten die Diagnosekriterien einer MS nach McDonald nicht.

#### 4.1.1 Basischarakteristika der MS-Patienten

Die Basischarakteristika der 160 MS-Patienten aus Gruppe 1 sind in Tabelle 4.1 (S. 34) zusammengefasst. Dabei wird noch einmal zwischen Patienten mit FMF-Symptomen und Patienten ohne diese Symptome unterschieden.

Man erkennt leichte Unterschiede bezüglich des EDSS-Mittelwerts und der durchschnittlichen Krankheitsdauer. Jedoch ist keiner dieser Unterschiede statistisch signifikant. Progressionsindices und die Verteilung der Verlaufsformen sind in beiden Kollektiven vergleichbar und lassen keine größeren Unterschiede erkennen.

	Patienten mit FMF-Symptomen	Patienten ohne FMF-Symptome
<b>Anzahl n</b>	84	76
<b>Alter</b>		
Altersspanne	16 - 76 Jahre	17- 64 Jahre
Mittelwert	42,86	37,2
Standardabweichung	$\pm 12,16$	$\pm 10,77$
Median	42,5	36
<b>Verlaufsform</b>		
RR-MS	68 (81 %)	65 (85,5 %)
RSP-MS	11 (13 %)	9 (12 %)
PP-MS	5 (6 %)	2(2,5 %)
<b>Krankheitsdauer</b>		
Zeitspanne	0 - 31 Jahre	0 - 30 Jahre
Mittelwert	7,34 Jahre	8,27 Jahre
Standardabweichung	$\pm 7,38$ Jahre	$\pm 7,19$ Jahre
Median	4 Jahre	6 Jahre
<b>EDSS</b>		
Spanne	0 - 8	0 - 8
Mittelwert	2,95	4,25
Standardabweichung	$\pm 2,07$	$\pm 1,77$
Median	3	3
<b>Progressionsindex</b>		
Spanne	0,0 - 5,0	0,0 - 5,5
Mittelwert	0,7	0,6
Standardabweichung	$\pm 0,8$	$\pm 0,8$
Median	0,5	0,3

Tab. 4.1: Basischarakteristika der MS-Patienten aus Gruppe 1

### 4.1.2 Anzahl der MS-Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen

Unter den MS-Patienten fanden sich 16 heterozygote Träger einer Mutation im MEFV-Gen (siehe Tabelle 4.2). Von diesen 16 Patienten gaben 13 FMF-typische Symptome an. Bei der Kurzbeschreibung der Mutationen bezeichnet die Zahl die Position der ausgetauschten Aminosäure im jeweiligen Protein, hier also dem Pypin. Der Buchstabe vor der Zahl steht für die ursprüngliche Aminosäure, der Buchstabe nach der Zahl für die neue Aminosäure. Beispiel: Bei der Mutation K695R wird die 695. Aminosäure des Pypins, Lysin (= K) durch Arginin (= R) ersetzt.

Mutation	E148Q (Exon 2)	E230K (Exon 2)	A289V (Exon 2)	R329H (Exon 3)	P369S, R408Q (Exon 3)	K695R (Exon 10)	V726A (Exon 10)
Anzahl	4	1	1	1	3	4	2

Tab. 4.2: Anzahl der einzelnen Pypin-Mutationen bei den 16 positiv getesteten MS-Patienten der Gruppe 1

### 4.1.3 Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen

Die klinischen Charakteristika der 16 MS-Patienten aus Gruppe 1, bei denen heterozygote Mutationen im MEFV-Gen nachgewiesen wurden, sind in Tabelle 4.3 (S. 39-41) aufgelistet.

Zur besseren Veranschaulichung der klinischen Symptomatik und des Verlaufs der Erkrankung werden nachfolgend vier Patienten aus dieser Tabelle näher beschrieben:

Patientin 4 ist eine 25 jährige Patientin, die seit ihrem 19. Lebensjahr an einer MS leidet. Die Diagnose wurde aufgrund typischer periventrikulärer, demyelinisierender Herde im MRT, pathologischer elektrophysiologischer Untersuchungen und einer typischen Klinik mit Hypästhesien in den Beinen sowie einer Gangunsicherheit und einem Taubheitsgefühl in den Händen gestellt. Auffällig sind bei ihr Episoden mit Symptomen wie Bauchschmerzen, Diarrhoen, Kopfschmerzen und Migräneattacken sowie immer wieder leicht erhöhten Entzündungswerten, für die bislang keine Ur-

sache gefunden werden konnte. Diese Symptome bestehen seit etwa 11 Jahren. Die molekulargenetische Analyse ergab, daß sie heterozygote Trägerin der von Exon 3 des MEFV-Gens kodierten Doppelmutation P369S plus R408Q ist.

Die MS dieser Patientin verläuft schubförmig, allerdings mit inkompletten Remissionen, wodurch mittlerweile ein EDSS von 4,0 besteht. Hauptprobleme sind hierbei eine ausgeprägte Blasenschwäche, Gefühlsstörungen sowie eine Gangunsicherheit und Schwäche in den Beinen. In den MRT-Untersuchungen zeigte sich eine ausgeprägte spinale Beteiligung.

Therapeutisch wurde zunächst eine Basistherapie mit Interferon- $\beta$  und anschließend mit Glatirameracetat versucht, die jedoch beide keine Krankheitsstabilisierung brachten. Die weiteren Erkrankungsschübe wurden mit Glucokortikoiden behandelt, remittierten aber nur unvollständig. Unter der dann folgenden Mitoxantron-Therapie kam es zwar zu einer Rückbildung der ausgeprägten Defizite und zu einem Sistieren der schweren Schübe, jedoch musste die Behandlung nach drei Zyklen aufgrund der Nebenwirkungen abgebrochen werden. Vor vier Jahren erfolgte dann die Umstellung auf Natalizumab. Zuletzt wurde die 36. Infusion verabreicht. Hierunter stabilisierte sich die MS.

Patientin 8 entwickelte mit 53 Jahren subakut eine sensomotorische Hemiparese links. In der Kernspintomografie zeigte sich eine große, singuläre, partiell kontrastmittelaufnehmende, balkenassoziierte Marklagerläsion rechts, die ca. 2 x 2 x 4 cm maß (siehe Abb. 4.1 S. 36).

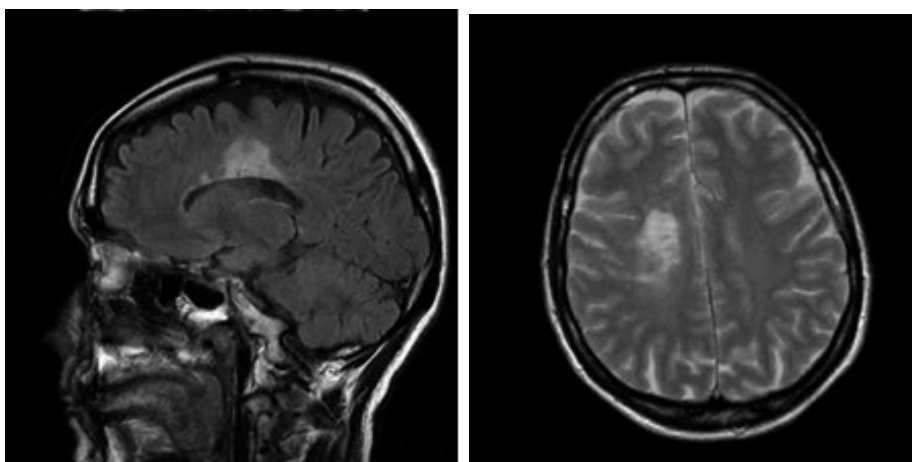


Abb. 4.1: *Links*: FLAIR-Sequenz sagittal; *Rechts*: T<sub>2</sub>-Sequenz transversal mit der großen hyperintensiven Läsion rechts balkennah



Außerdem fanden sich im Liquor oligoklonale Banden. Laborchemisch fielen weiterhin ein erhöhter ANA-Titer (antinukleäre Antikörper), positive SSB-Antikörper (Sjögren-Syndrom-B-Antikörper) und ein wiederholt erhöhtes CRP (C-reaktives Protein) auf. In der Vorgeschichte bestanden rezidivierende Episoden mit Myalgien und Arthralgien, erhöhte Entzündungswerte unklarer Ätiologie und eine einmalige Episode eines unklaren meningitischen Syndroms mit Fieber sowie Kopf- und Nackenschmerzen. In der Familie ist ein Kawasaki-Syndrom (nekrotisierende Vaskulitis) der Tochter bekannt. Da differentialdiagnostisch zunächst der Verdacht auf eine Vaskulitis, eine akute disseminierte Enzephalomyelitis oder MS-Erstmanifestation bestand, wurde initial eine Kortikosteroid-Stoßtherapie eingeleitet, die zu einer kompletten Remission der Beschwerden führte. Nach einem beschwerdefreien Intervall von drei Jahren kam es erneut zu einer sensomotorischen Hemiparese links mit Gangstörung, die nach Kortikosteroidgabe nur inkomplett remittierte. Im MRT zeigte sich eine erneute Diffusionsstörung im Bereich der alten Läsion ohne weitere Herde. Eine zerebrale Angiografie zeigte keine vaskulitischen Veränderungen in diesem Bereich. Nach weiteren eineinhalb Jahren trat eine leichte Dysarthrie auf. Durch den Nachweis neuer Läsionen im MRT im Bereich des Hirnstamms und des linken Marklagers konnte nach McDonald die Diagnose MS gestellt werden.

Aufgrund der Vorgeschichte mit Episoden unklarer rheumatologischer Beschwerden wurde eine molekulargenetische Testung vorgenommen und die von Exon 3 des MEFV-Gens kodierte Mutation R329H in heterozygoter Form entdeckt, die wahrscheinlich (Mit-)Ursache dieser Symptome ist.

Der 57 Jahre alte Patient 9 stammt aus Großbritannien. Er stellte sich mit unklarem, zunehmendem Taubheitsgefühl in Händen und Füßen, einem Schwächegefühl und Schmerzen seit zwei Jahren mit der Bitte um eine Zweitmeinung vor. Er berichtete außerdem von Fieberepisoden, Myalgien, Arthralgien und Hautrötungen seit mehreren Jahren. Eine ausführliche Labordiagnostik auf virale und rheumatologische Erkrankungen war unauffällig, ebenso wie die Untersuchung auf Malaria, die aufgrund seiner Auslandsanamnese durchgeführt wurde. Als Differentialdiagnosen wurden eine atypische MS oder eine unspezifische rheumatische Erkrankung mit ZNS-Beteiligung diskutiert.

In der MRT-Untersuchung fanden sich mehrere kleine, hyperintense Läsionen im zervikalen und thorakalen Rückenmark sowie eine hyperintense Läsion in der Medulla oblongata, jedoch alle ohne Kontrastmittelaufnahme. In der Liquoruntersuchung wurde eine leichte Pleozytose sowie positive OKB festgestellt. Die visuellen

und somatosensorischen evozierten Potenziale waren verlängert. Rheumatologische Erkrankungen wurden mittels ausgiebiger Labordiagnostik weitgehend ausgeschlossen. Bei der molekulargenetischen Untersuchung fand sich die heterozygote Pyrin-Mutation K695R.

Somit wurde letztendlich nach McDonald die Diagnose primär progrediente MS gestellt mit der Zweitdiagnose Familiäres Mittelmeerfieber. Eine Therapie mit hochdosierten Kortikosteroidpulsen und Colchicin wurde eingeleitet.

Patientin 12 ist eine 22-jährige, italienisch-stämmige Patientin, bei der sich bereits im Alter von 9 Jahren eine schubförmige MS manifestierte. Im Rahmen unserer Arbeit wurde auch sie molekulargenetisch auf Mutationen im MEFV-Gen untersucht und wurde als heterozygote Trägerin der E148Q-Mutation identifiziert. Sie zeigte jedoch keinerlei FMF-typische Beschwerden.

Interessant war jedoch die genauere Betrachtung ihrer Familienanamnese. Bei ihrer Mutter besteht eine sehr frühe Form einer kardiovaskulären Erkrankung mit Herzinfarkt und Schlaganfall schon in jungen Jahren. Einer der beiden Brüder der Patientin leidet ebenfalls an einer MS. Bei der molekulargenetischen Untersuchung der ganzen Familie auf Mutationen im MEFV-Gen fanden sich bei der Mutter und bei dem von der MS betroffenen Bruder ebenfalls die Mutation E148Q in heterozygoter Ausprägung. In Abbildung 4.2 wird dieser Erbgang veranschaulicht.

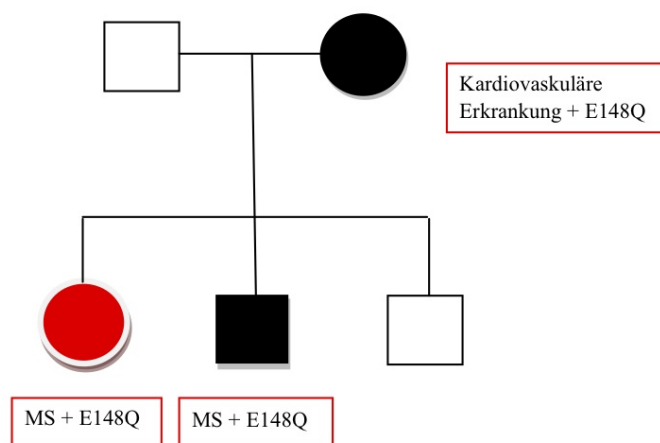


Abb. 4.2: Im dargestellten Erbgang stellt der rote Kreis Patientin 12 dar. Die ebenfalls betroffenen Familienmitglieder sind schwarz markiert.

Patient	Geschlecht	Herkunft	Alter	Alter bei Krankheitsbeginn	Mutation
1	w	Deutschland	40	31	E148Q
2	w	Deutschland	41	37	A289V
3	m	Griechenland	36	27	V726A
4	w	Deutschland	25	19	P369S, R408Q
5	w	Deutschland	54	42	K695R
6	m	Deutschland	38	22	E148Q
7	w	Deutschland	40	37	E148Q
8	w	Deutschland	56	49	R329H
9	m	Großbritannien	57	53	K695R
10	w	Italien	17	14	E230K
11	w	Deutschland	30	17	K695R
12	w	Italien	22	9	E148Q
13	m	Ägypten	23	19	K695R
14	m	Deutschland	48	45	P369S, R408Q
15	w	Deutschland	37	23	P369S, R408Q
16	w	Türkei	25	23	V726A

Tab. 4.3: Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen Teil 1

Patient	Diagnose	EDSS	PI	Erstsymptome	FMF-Symptome	Befunde
1	RR-MS	3	0,4	Parästhesien und Taubheit der Extremitäten	Gelenkschmerzen, Myalgien, Fieber, Fatigue, Beginn nach Interferon-Therapie-Beginn	MRT und Liquor typisch
2	RR-MS, Diabetes mellitus	3	0,8	Beidseitiges Verschwommensehen, Übelkeit, Nackenschmerzen	Gelenkschmerzen, Myalgien, Fieberschübe, psoriatische Hautveränderungen	MRT und Liquor typisch
3	RR-MS	3,5	0,5	Gefühlsstörungen der rechten Gesichtshälfte, beider Unterschenkel und der rechten Hand	Gelenkschmerzen, Urtikaria Lymphknotenschwellungen	MRT typisch
4	RR-MS, inkomplett remittierend	4,5	0,8	Hypästhesien der Extremitäten beidseits, Schleiersehen, Geschmacksveränderung, spastische Paraparese beider Beine	Diarrhoen, Migräne mit starken Kopfschmerzen	MRT und Liquor typisch
5	PP-MS	4,5	0,3	Zunehmende Hemiparese rechts, Dysarthrie, Merkfähigkeitsstörungen	Gelenkschmerzen, Myalgien, häufige Infekte, Fatigue	MRT und Liquor typisch
6	SP-MS	6,5	0,7	nicht bekannt	Häufig fieberhafte Atemwegsinfekte, Fatigue, Stimmungsschwankungen	MRT und Liquor typisch
7	RR-MS	0	0,0	Kribbelparästhesie und Hypästhesie der Beine (rechts mehr als links), der rechten Gesichtshälfte und des rechten Arms	Myalgien, häufige Infekte, Bronchitiden, Fatigue	MRT und Liquor typisch
8	RR-MS	3	0,8	sensomotorische Hemiparese links	Rheumatische Beschwerden, Fieberschübe, Depression	MRT und Liquor typisch

Tab. 4.3: Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen Teil 2

Patient	Diagnose	EDSS	PI	Erstsymptome	FMF-Symptome	Befunde
9	PP-MS			Taubheitsgefühl in Händen und Füßen, Schwächegefühl	Gelenkschmerzen, vereinzelt mit Schwellung, Hautrötungen	MRT und Liquor typisch
10	RR-MS	1,5	0,8	Kribbelparästhesien und Brennen im rechten Bein, Hörminderung	Häufige Infekte, Fieberepisode	MRT typisch
11	RR-MS	2	0,2	Sensibilitätsstörung im rechten Arm	Subfebrile Temperaturen, Bauchschmerzen	MRT und Liquor typisch
12	RR-MS, inkomplett remittierend	4,5	0,4	nicht bekannt	keine	MRT typisch
13	RR-MS			nicht bekannt	Subfebrile Temperaturen	multiple Myelonläsionen
14	RR-MS, M. Bechterew	1,5	0,8	Facialisparese, Sehstörung	keine	MRT und Liquor typisch
15	RR-MS	2	0,2	Neuritis nervi optici	keine	MRT typisch
16	RR-MS	0	0,0	Übelkeit, Erbrechen, Schwankschwindel, ischialgieforme und brennende Schmerzen, dann Hypästhesie im rechten Unterschenkel	Fieberschübe, häufige Infekte	MRT und Liquor typisch

Tab. 4.3: Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen Teil 3

Von den 16 Patienten aus Tabelle 4.3, die alle Träger einer Mutation sind und die Diagnose MS haben, sind zehn deutscher Abstammung. Ein Patient kommt aus Großbritannien. Die anderen fünf Patienten stammen aus Ländern, in denen das Familiäre Mittelmeerfieber häufiger zu finden ist, nämlich aus der Türkei, Griechenland, Italien und Ägypten.

#### **4.1.4 Einfluss der Mutation im MEFV-Gen auf die MS**

Für uns stellte sich nun die Frage, ob die Mutation/en im MEFV-Gen Einfluss auf den Verlauf der MS hat/haben. Dazu wurden in Tabelle 4.4 (S. 43) die 16 Patienten mit Mutation den 144 Patienten, die zwar eine MS, aber keine MEFV-Mutation hatten, gegenübergestellt. Es wurden das Alter bei Erkrankung und die Anzahl der Fälle von kindlicher bzw. juveniler MS in den beiden Gruppen verglichen, um zu sehen, ob eine MEFV-Mutation den Ausbruch der MS beschleunigt. Außerdem wurden EDSS und Progressionsindex betrachtet, um schwerere MS-Verläufe in einer der Gruppen zu erkennen. Und auch die Verlaufsformen der Gruppen wurden miteinander verglichen.

	MS-Patienten mit Mutation im MEFV-Gen	MS-Patienten ohne Mutation im MEFV-Gen
<b>Anzahl n</b>	16	144
<b>Alter bei Krankheits- beginn</b>		
Mittelwert	29,19 Jahre	30,61 Jahre
Standardabweichung	± 13,23 Jahre	± 11,39 Jahre
Median	25 Jahre	29 Jahre
<b>Kindliche/juvenile MS</b> (Beginn ≤ 16 Jahre)	2 (12,5 %)	11 (7,6 %)
<b>Krankheitsdauer</b>		
Mittelwert	6,19 Jahre	8,21 Jahre
Standardabweichung	± 4,59 Jahre	± 7,58 Jahre
Median	5 Jahre	6 Jahre
<b>EDSS</b>		
Mittelwert	2,82	3
Standardabweichung	± 1,83	± 1,99
Median	3	3
<b>Progressionsindex</b>		
Mittelwert	0,43	0,66
Standardabweichung	± 0,3	± 0,85
Median	0,44	0,38
<b>Verlaufsform</b>		
RR-MS	13 (81,25 %)	119 (82,5 %)
PP-MS	2 (12,5 %)	5 (3,5 %)
SP-MS	1 (6,25 %)	20 (14 %)

Tab. 4.4: Vergleich der MS bei Mutationsträgern und Patienten ohne Mutation

Mithilfe des t-Tests wurden die Mittelwerte von Alter bei Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer, EDSS und Progressionsindex in den beiden Gruppen miteinander verglichen. Außerdem wurden die Anzahl der kindlichen bzw. juvenilen MS und die Anteile der Verlaufsformen mittels des Exakten Tests nach Fisher auf Signifikanz getestet. Dabei ergaben sich folgende p-Werte (Tabelle 4.5):

	p-Wert	Signifikanz
<b>Alter bei Krankheitsbeginn</b>	0,6432	nicht signifikant
<b>Kindliche/juvenile MS</b>	0,6218	nicht signifikant
<b>Krankheitsdauer</b>	0,2985	nicht signifikant
<b>EDSS</b>	0,7300	nicht signifikant
<b>Progressionsindex</b>	0,9999	nicht signifikant
<b>Verlaufsform</b>		
RR-MS	1,0000	nicht signifikant
PP-MS	0,1464	nicht signifikant
SP-MS	0,6970	nicht signifikant

Tab. 4.5: P-Werte zur Bestimmung der Signifikanz beim Vergleich der MS-Patienten mit und ohne Mutation

Zur Veranschaulichung wurden die p-Werte in Abbildung 4.3 in Bezug zum Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  gesetzt.

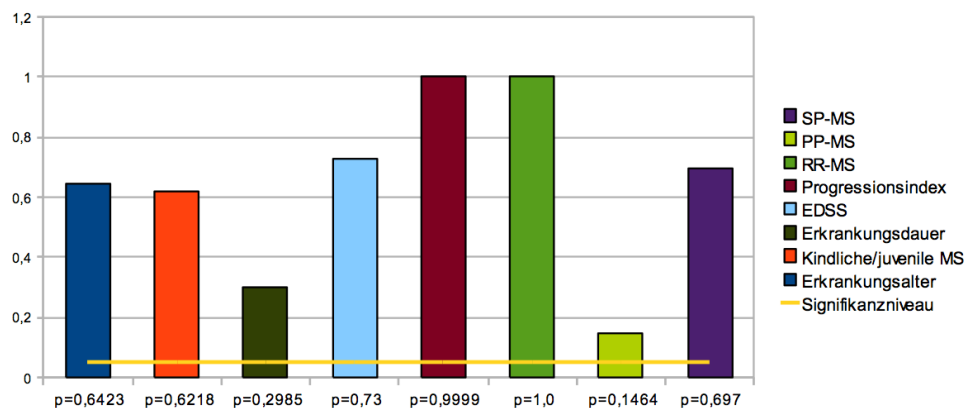


Abb. 4.3: P-Werte des Vergleichs von MS-Patienten mit und ohne Mutation



In Tabelle 4.5 und Abbildung 4.3 wird deutlich, dass sich der MS-Verlauf zwischen Patienten mit und ohne Mutation im MEFV-Gen in keinem der klinischen Parameter statistisch signifikant unterscheidet.

Da bisher alle Mutationen gemeinsam betrachtet wurden, ist es möglich, dass der Einfluss einzelner Mutationen auf die MS unbemerkt bleibt. Daher werden die drei häufigsten Mutationen, also E148Q, K695R und die gekoppelte Mutation P369S plus R408Q und deren Einfluss auf die MS in Tabelle 4.6 noch einmal aufgeführt. Da die Fallzahlen für diese Mutationen sehr niedrig sind, ist es nicht möglich, die Signifikanz dieser Unterschiede zu bestimmen. Es wird jedoch deutlich, dass es durchaus Unterschiede in den MS-Verläufen bei Trägern der verschiedenen Mutationen zu geben scheint.

Besonders in Bezug auf das Alter bei Krankheitsbeginn, die Krankheitsdauer und den Progressionsindex scheint sich die Mutation K695R von den anderen beiden zu unterscheiden.

	Alter bei Krankheitsbeginn	Krankheitsdauer	EDSS	Progressionsindex
<b>E148Q (n=4)</b>				
Mittelwert	19,5	8	4,2	0,6
Standardabweichung	± 14,8	± 2,8	± 0,3	± 0,1
<b>K695R (n=4)</b>				
Mittelwert	34,5	2	3,7	1,6
Standardabweichung	± 20,5	± 1,4	± 3,9	± 0,8
<b>P369S/R408Q (n=3)</b>				
Mittelwert	20,5	7,5	2,5	0,6
Standardabweichung	± 4,9	± 6,3	± 0,7	± 0,6

Tab. 4.6: Klinische Charakteristika der MS bei Patienten mit den drei häufigsten Mutationen

### 4.1.5 Basischarakteristika der Patienten ohne MS

Von den bereits erwähnten 20 Patienten aus Gruppe 1, die die Diagnosekriterien nach McDonald für eine MS nicht erfüllten, gaben 14 FMF-Symptome an. Diese bestanden im Wesentlichen aus Arthralgien, Fatigue, häufigen Infekten und Hautveränderungen. Zudem bestand bei einem Patienten der Verdacht auf einen Morbus Behçet. Ein anderer hatte die Diagnose Systemischer Lupus erythematoses, und bei einem weiteren Patienten bestand der Verdacht auf diese Erkrankung. Bei einer Patientin wurde der Verdacht auf eine Arteriitis temporalis geäußert. Bei zwei weiteren Patientinnen wurde die Diagnose Familiäres Mittelmeerfieber gestellt. Bei weiteren 14 Patienten, die ebenfalls keine MS hatten, konnte bisher dagegen noch keine Ursache der Beschwerden gefunden werden.

### 4.1.6 Anzahl der Patienten ohne MS mit einer Mutation im MEFV-Gen

Bei diesen 20 Patienten wurden 4 heterozygote Mutationen gefunden (siehe Tabelle 4.7).

Mutation	E148Q (Exon 2)	T267L (Exon 2)	M680I (Exon 10)
Anzahl	2	1	1

Tab. 4.7: Anzahl der einzelnen Pysin-Mutationen im MEFV-Gen bei den vier positiv getesteten Patienten ohne MS der Gruppe 1

#### 4.1.7 Klinische Charakteristika der Patienten ohne MS mit einer MEFV-Mutation

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
<b>Geschlecht</b>	w	w	w	w
<b>Herkunft</b>	Kroatien	Griechenland	Bosnien	Deutschland
<b>Alter</b>	63	22	40	23
<b>Alter bei Krankheitsbeginn</b>	39	19	seit Kindheit	seit Kindheit
<b>Mutation</b>	T267L (Exon 2)	M680I (Exon 10)	E148Q (Exon 2)	E148Q (Exon 2)
<b>Diagnose</b>	okuläre Myositis bei FMF; keine MS	unklar	unspezifische Kollagenose und FMF	gastrointestinale Symptome bei FMF
<b>Erst-symptome</b>	Doppelbilder mit retroorbitalen Schmerzen	pulssynchrones Ohrgeräusch		
<b>FMF-Symptome</b>	Bauchschmerzen in der Kindheit, Diarrhoen, Gelenkschmerzen, Hautveränderungen, Fieberschübe, Depression	keine	Fieberschübe, intermittierend Gelenkschmerzen vereinzelt mit Schwellung, episodenhaft Bauchschmerzen und Diarrhoe, Kopfschmerzen	rezidivierende Bauchschmerzen und Obstipation, Fiebergefühl, Hautveränderungen
<b>Befunde</b>	unauffällig	MRT auffällig mit Kleinhirnläsionen	unauffällig	unauffällig

Tab. 4.8: Klinische Charakteristika der Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen, jedoch ohne MS

Von diesen Patienten, die keine MS haben, jedoch eine Mutation im MEFV-Gen aufweisen (Tabelle 4.8), stammen drei aus Ländern, in denen eine höhere Prävalenz des FMF angenommen werden kann. Lediglich eine Patientin ist deutscher Abstammung. Nur eine Patientin gab an, keine FMF-typischen Symptome zu haben.

Auch hier wird zur Veranschaulichung ein Fall beschrieben:

Patientin 4 aus Tabelle 4.8 ist eine 23 jährige Patientin, die angibt, seit ihrer Kind-

heit an ausgeprägten Bauchschmerzen, Müdigkeit und Hautveränderungen zu leiden. Dies führte bereits zu mehrfachen Krankenhausaufenthalten und Untersuchungen mit Magen- und Darmspiegelungen. Dabei konnten allerdings Verdachtsdiagnosen wie zum Beispiel eine entzündliche Darmerkrankung in Form eines M. Crohn nicht erhärtet werden, und die Ursache der Beschwerden blieb letztlich unklar. Zum Ausschluss einer neurologischen Ursache der Beschwerden erfolgte die Vorstellung in der neuroimmunologischen Ambulanz. Die molekulargenetische Untersuchung ergab den Nachweis einer heterozygoten Mutation im MEFV-Gen. Die Diagnose FMF konnte damit gestellt werden. Bislang wurde noch keine Therapie begonnen.

#### **4.1.8 Mutationen im CASP1-Gen**

Die DNA der Patienten aus Gruppe 1 wurde zusätzlich auf Mutationen im CASP1-Gen untersucht. Dazu wurden die Exons 6, 7, 8 und 9 dieses Gens sequenziert. Es fanden sich lediglich drei Mutationen unter den insgesamt 180 Patienten. Zwei Patientinnen gaben Symptome an, die auf das Vorliegen eines autoinflammatorischen Syndroms hinweisen (Tabelle 4.9 S. 49). Keine dieser Patientinnen war gleichzeitig Trägerin einer Mutation im MEFV-Gen.

Die Symptome der Patientinnen 1 und 2 (gehäufte Infekte, Bauchschmerzen, Kopfschmerzen, Hautveränderungen und Lymphknotenschwellungen) ähneln den typischen FMF-Symptomen. Sie entsprechen auch den bislang beschriebenen Symptomen bei ICE-Fieber. Patientin 3 gab keines dieser Symptome an.

#### 4.1. Mutationen und Charakteristika der Gruppe 1

---

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
<b>Geschlecht</b>	w	w	w
<b>Herkunft</b>	Deutschland	Äthiopien	Deutschland
<b>Alter</b>	20	24	28
<b>Mutation</b>	R240Q (Exon 6)	K319R (Exon 7)	N263S (Exon 6)
<b>Diagnose</b>	Zustand nach Meningo- enzephalitis, Migräne	RR-MS	SP-MS
<b>Symptome</b>	gehäufte Infekte, Lymphknoten- schwellungen, Gürtelrose	Bauchschmerzen, Kopfschmerzen, Asthma, Neurodermitis	
<b>Befunde</b>		MRT und Liquor typisch	MRT und Liquor typisch

Tab. 4.9: Klinische Charakteristika der Patienten mit Mutation im CASP1-Gen

## 4.2 Häufigkeit der E148Q- und K695R-Mutationen in Gruppe 2 und 3

Mittels Sondenhybridisierung wurde die DNA des Patientenkollektivs aus der Marianne-Strauss-Klinik (Gruppe 2) und des Kontrollkollektivs (Gruppe 3) auf die Mutationen E148Q und K695R untersucht. Damit sollte die Häufigkeit dieser beiden Mutationen zum einen in der deutschen Allgemeinbevölkerung, zum anderen in einem MS-Patientenkollektiv, das unselektiert zusammengestellt worden war, verglichen werden. Bei 17 Kontrollen (4,25 %) und 10 MS-Patienten (3,8 %) fand sich eine Mutation im MEFV-Gen. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst und in Abbildung 4.4 (S. 51) anteilmäßig veranschaulicht. Alle Mutationen lagen heterozygot vor.

	Gruppe 2	Gruppe 3
<b>Gesamtzahl</b>	260	400
<b>E148Q</b>		
Anzahl n	7	9
m/w	2/5	5/4
<b>K695R</b>		
Anzahl n	3	8
m/w	2/1	5/3

Tab. 4.10: Mutationen im MEFV-Gen bei Kontrollen und unselektierten MS-Patienten

#### 4.2. Häufigkeit der E148Q- und K695R-Mutationen in Gruppe 2 und 3

---

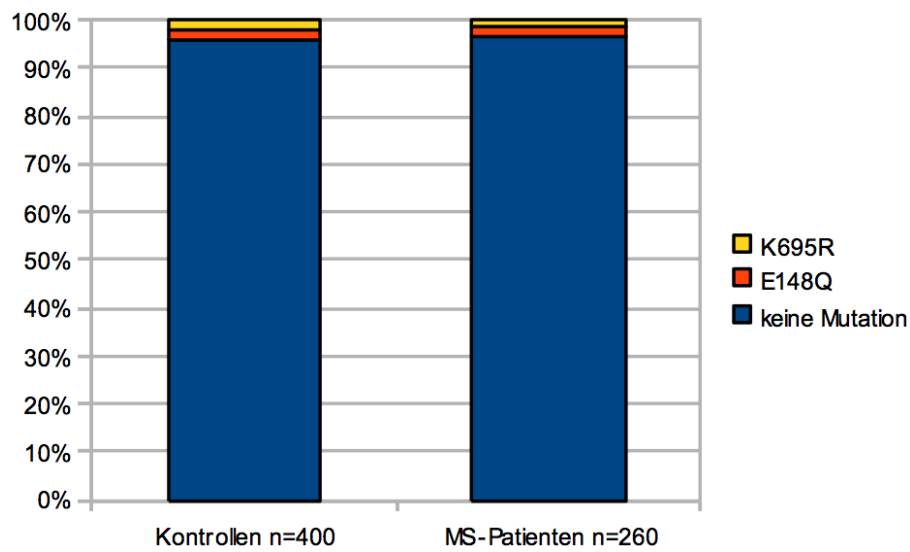


Abb. 4.4: Anteil der Mutationen bei Kontrollen und MS-Patienten

Mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher ergab sich ein p-Wert von 0,8432, der deutlich über dem Signifikanzniveau von 0,05 liegt. Damit war der Unterschied bezüglich der Mutationshäufigkeit in Gruppe 2 und dem Kontrollkollektiv statistisch nicht signifikant.





# 5 Diskussion

## 5.1 Gruppe 1

### 5.1.1 Vergleich der Patienten mit und ohne FMF-Symptome

Die 180 ausgewählten Patienten aus der neuroimmunologischen Ambulanz wurden noch einmal unterteilt in Patienten mit FMF-typischen Symptomen und Patienten ohne derartige Beschwerden. Lediglich 160 dieser Patienten erfüllten die Kriterien nach McDonald für eine MS bzw. hatten den hochgradigen Verdacht auf eine MS. Beim Vergleich dieser MS-Patienten mit und ohne FMF-Symptome konnten keine größeren Unterschiede im Krankheitsverlauf festgestellt werden. In der Patientengruppe, die Symptome angab, fanden sich 16 Mutationen, in der Gruppe ohne Symptome dagegen nur vier. Daraus kann man schließen, dass Patienten mit einer MEFV-Mutation, auch wenn sie nur in heterozygoter Form vorliegt wie in diesen Fällen, häufig Symptome haben. Wir gehen davon aus, dass diese heterozygoten Mutationen die Ursache der Beschwerden dieser Patienten sind, da andere Ursachen und Differentialdiagnosen weitestgehend ausgeschlossen wurden. Jedoch sind dies lediglich sehr milde Verläufe eines FMF, mit nur seltenen, wenn überhaupt vorhandenen Fieberschüben und ohne Amyloidose. Für das Vollbild eines schwer verlaufenden FMF scheinen dagegen Mutationen auf beiden Allelen notwendig zu sein.

Bei den Patienten, die ebenfalls Beschwerden angaben, aber keine Mutation in den Exons 2, 3 und 10 aufwiesen, wurden rheumatologische Ursachen weitgehend ausgeschlossen. Damit bleibt die Frage, ob andere Ursachen, wie zum Beispiel Mutationen in anderen Exons des MEFV-Gens, andere hereditäre autoinflammatorische Syndrome oder noch unbekannte Erkrankungen diese Symptome verursachen. Einen Einfluss auf die MS scheint es jedoch nicht zu geben.

Bei den 160 Patienten, die die gesicherte Diagnose MS haben, fanden sich 16 Patienten mit Mutation. Von diesen gaben 13 FMF-typische Symptome an. Unter den Mutationsträgern waren 10 deutschstämmige Patienten. Die anderen sechs hat-

ten eine andere Herkunft. Bemerkenswert dabei ist, dass fünf dieser Patienten aus Regionen kamen, in denen das familiäre Mittelmeerfieber sehr wahrscheinlich eine höhere Prävalenz hat als in Deutschland. Doch trotz dieser Beschwerden und der türkischen, italienischen, griechischen, kroatischen, ägyptischen und bosnischen Herkunft der Patienten wurde lange nicht an diese autoinflammatorische Erkrankung gedacht. Möglicherweise hätte eine frühzeitigere dahingehende Diagnostik diesen Patienten eine Reihe von Arztbesuchen und Untersuchungen erspart.

### 5.1.2 MS-Patienten mit und ohne Mutation im MEFV-Gen

Bei 16 Patienten der 180 Patienten aus der neuroimmunologischen Ambulanz konnte sowohl die Diagnose Multiple Sklerose nach den Kriterien von McDonald gestellt als auch eine Mutation im MEFV-Gen gefunden werden. Nur drei der positiv getesteten MS-Patienten gaben keine mit einem FMF zu vereinbarenden Symptome an. Dies ist zum einen wieder ein Hinweis, dass auch ein heterozygotes Vorliegen einer MEFV-Mutation Symptome verursachen kann. Zum anderen müsste möglicherweise die DNA der drei Patienten, die zwar Symptome angaben, jedoch in den Exons 2, 3 und 10 keine Mutation aufwiesen, noch auf Alterationen in den übrigen Exons untersucht werden, um ein FMF mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können. Vergleicht man die MS-Patienten mit Mutation mit den MS-Patienten, bei denen keine Mutation im MEFV-Gen gefunden wurde, so kann man Unterschiede in der Krankheitsdauer und im Progressionsindex erkennen, die jedoch statistisch nicht signifikant sind. So dauert die Erkrankung bei Patienten mit Mutation im Mittel 6,19 Jahre und der mittlere Progressionsindex ist 0,43. Bei Patienten ohne Mutation beträgt die Krankheitsdauer im Mittel 8,21 Jahre und der Progressionsindex ist 0,66. Bemerkenswert ist dabei, dass der Progressionsindex, der aus dem Quotienten des „expanded disability status score“ (EDSS) und der Dauer der Erkrankung berechnet wird, trotz der längeren Krankheitsdauer bei den Patienten ohne Mutation höher ist als bei den MEFV-Mutationsträgern. Das lässt einen höheren Behinderungsgrad bei diesen Patienten vermuten, was in Tabelle 4.4 (S. 43) nur ansatzweise zu erkennen ist. Der Unterschied ist auch hier nicht statistisch signifikant.

Beim durchschnittlichen Krankheitsalter scheint es ebenfalls kaum Unterschiede zu geben. Allerdings gibt es unter den Mutationsträgern zwei Fälle von kindlicher bzw. juveniler MS, d. h. die Erkrankung begann mit 16 Jahren oder früher, was einem Anteil von 12,5 % entspricht. In dem MS-Kollektiv ohne MEFV-Mutation fanden sich

dagegen 11 Fälle, was einem Anteil von 7,6 % entspricht. Auch dieser Unterschied ist nicht signifikant, könnte aber auf eine Tendenz hinweisen, dass FMF den Ausbruch einer MS beschleunigt. Das würde einerseits bedeuten, dass auch heterozygote Mutationen Einfluss auf den Allgemeinzustand des Patienten haben können, indem sie zum Beispiel ein erhöhtes Entzündungsniveau bewirken, und dass es sich andererseits nicht um eine rezessive Vererbung handelt, da alle Mutationen in unserem Kollektiv nur heterozygot vorliegen. Dies wird zunehmend auch in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert [9, 34, 33, 42].

Eine solche Tendenz würde allerdings dem Ergebnis der israelischen Arbeit von Y. Shinar et al. widersprechen [49], in der zwar ein möglicher Zusammenhang zwischen FMF und dem Verlauf der MS, nicht aber dem Beginn der MS vermutet wurde. Dass die Schwere des Verlaufs der MS durch das FMF beeinflusst wird, lässt sich bei unseren Patienten nicht mit Sicherheit erkennen. In der Anzahl der verschiedenen Verlaufsformen gibt es jedoch nennenswerte Unterschiede. So haben von den Patienten mit einer MEFV-Mutation zwei Personen (12,5 %) einen primär progredienten Verlauf und nur eine Person (6,25 %) einen sekundär progredienten. In der anderen Gruppe dagegen haben nur fünf Personen, also ca. 3,5 %, eine primär progrediente MS, dafür aber 20 (14 %) einen sekundär progredienten Verlauf. Auch hier ist der Unterschied nicht statistisch signifikant. Außerdem sollte man berücksichtigen, dass die unterschiedliche durchschnittliche Krankheitsdauer in beiden Gruppen für die Verlaufsform eine Rolle spielen kann, da sich das Risiko, eine sekundär progrediente Verlaufsform zu entwickeln, mit der Dauer der Erkrankung erhöht. Da die Patienten ohne Mutation unseren Ergebnissen zufolge eine etwas längere durchschnittliche Krankheitsdauer hatten als die Patienten mit Mutation, könnte dies die höhere Anzahl an sekundär progredienten Krankheitsverläufen zumindest teilweise erklären.

Bei all diesen Ergebnissen kann man lediglich von Tendenzen und Vermutungen sprechen, da keiner der Unterschiede signifikant war. Das liegt einerseits daran, dass das Kollektiv mit 160 MS-Patienten sehr klein ist, und bei nur 16 Mutationsträgern kaum eine beweisende Aussage getroffen werden kann. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die heterozygoten MEFV-Mutationen unserer Patienten keinen Einfluss auf den Verlauf, möglicherweise aber auf die Verlaufsform und den Beginn der MS haben. Es bleibt deshalb weiterhin interessant, ob man in einem größeren Kollektiv mehr Mutationen und vielleicht auch homozygote oder zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger findet, die dann wiederum möglicherweise einen deutlicheren Einfluss auf den MS-Verlauf nehmen und deutlichere Ergebnisse liefern könnten. Die Untersuchung der am häufigsten von Mutationen betroffenen Exons 2, 3 und 10

des MEFV-Gens führte andererseits möglicherweise auch dazu, dass weitere Alterationen, die ebenfalls Symptome verursachen oder die MS beeinflussen können, in Einzelfällen übersehen wurden.

Eine weitere interessante Auffälligkeit zeigte sich in der Familie der in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Patientin 12, in der sowohl die Mutter als auch einer der beiden Brüder ebenfalls die Mutation E148Q aufwiesen. Bei dem Bruder konnte, wie auch bei der Patientin selbst, die Diagnose MS gestellt werden. Bei der Mutter ist eine sehr frühe Form einer kardiovaskulären Erkrankung festgestellt worden. Diese Assoziation einer Mutation im MEFV-Gen mit anderen, vor allem entzündlichen Erkrankungen gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung und zur genaueren Betrachtung der Familienanamnese von Patienten mit einer MEFV-Mutation.

In Tabelle 4.6 (S. 45) wurden noch einmal einige klinische Charakteristika der MS-Patienten mit den drei häufigsten Mutationen gesondert betrachtet und miteinander verglichen. Da es sich jeweils nur um vier bzw. drei Patienten handelt, ist es nicht möglich, die statistische Signifikanz der Unterschiede zu bestimmen. Dennoch ist bemerkenswert, dass zum einen der Progressionsindex bei Patienten mit der K695R-Mutation mit einem Wert von 1,6 deutlich höher ist als bei den Patienten mit anderen Mutationen. Wenn das tatsächlich der Fall ist, würde das ein im Vergleich zu den anderen Patienten schnelleres Fortschreiten der Behinderung bedeuten. Zum anderen scheint das Alter bei Krankheitsbeginn für Patienten mit der E148Q-Substitution und den gekoppelten Mutationen P369S und R408Q deutlich niedriger zu sein. Das lässt eine Beschleunigung des MS-Beginns durch diese Mutationen vermuten. Jedoch sind diese Ergebnisse durch die niedrige Fallzahl lediglich Auffälligkeiten, die anhand eines größeren Kollektivs weiter untersucht werden müssen, um tatsächlich eine sichere Aussage treffen zu können.

Zu dem Thema Multiple Sklerose und familiäres Mittelmeerfieber gibt es bisher fünf Arbeiten aus der Türkei und Israel. In Tabelle 5.1 (S. 57) werden diese Arbeiten noch einmal kurz beschrieben und mit dieser Arbeit verglichen, um Unterschiede, aber auch Parallelen in den Ergebnissen aufzuzeigen.

	Topçuoğlu et al. [57] (1997), Türkei	Shinar et al. [49]. (2003), Israel	Akman-Demir et al. [1] (2006), Türkei	Unal et al. [62] (2010), Türkei	Yahalom et al. [66] (2010), Israel	Diese Arbeit
<b>Patienten</b>	3 langjährige FMF-Patienten mit neu aufgetretenen neurologischen Symptomen	144 MS-Patienten (31 irakische Juden, 28 nordafrikanische Juden und 85 Ashkenazi-Juden) wurden auf Mutationen im MEFV-Gen untersucht	2800 Patienten, davon 2268 mit MS, die übrigen mit anderen demyelinisierenden Erkrankungen, wurden retrospektiv auf FMF untersucht. 2000 FMF-Patienten wurden auf MS untersucht	53 MS-Patienten und 66 gesunde Kontrollen wurden auf Mutationen im MEFV-Gen untersucht	12000 FMF-Patienten wurden auf MS durchsucht	Bei 180 neurologischen Patienten, davon 160 mit MS, wurden die Exons 2, 3 und 10 des MEFV-Gens sequenziert; 260 unselektierte MS-Patienten und 400 Kontrollen wurden auf E148Q und K695R untersucht.
<b>Mutationen</b>	nicht bekannt	M694V: 1 irakischer Jude, 6 nordafrikanische Juden, 1 Ashkenazi-Jude V726A: 3 irakische Juden, 1 nordafrikanischer Jude, 5 Ashkenazi-Juden E148Q: 6 irakische Juden, 2 nordafrikanische Juden, 5 Ashkenazi-Juden K695R: 3 Ashkenazi-Juden	M694V: 2 Patienten mit homozygoter Mutation, 1 Patient heterozygot, 2 Patienten ebenfalls heterozygot und zusätzlich V726A bzw. M680I Bei 4 weiteren Patienten wurde lediglich die klinische Diagnose FMF gestellt.	M694V: 1 MS-Patient heterozygot, 9 Patienten heterozygot, davon 2 zusätzlich mit V726A bzw. E148Q. 4 Kontrollen heterozygot. E148Q: 7 Patienten heterozygot, 1 Kontrolle heterozygot. M680I: 1 Patient heterozygot, 2 Kontrollen heterozygot. V726A: 1 Patient heterozygot, 3 Patienten heterozygot.	M694V: 4 Patienten heterozygot, 2 Patienten heterozygot, einer zusätzlich mit V726A. V726A: 1 Patient heterozygot. E148Q: 1 Patient heterozygot. M680I: 1 Patient heterozygot. K695R: 4 Patienten, 3 unselektierte Patienten, 8 Kontrollen V726A: 2 Patienten	E148Q: 6 Patienten, 7 unselektierte MS-Patienten, 9 Kontrollen E230K: 1 Patient T267L: 1 Patient A289V: 1 Patient R329H: 1 Patient P369S/R408Q: 3 Patienten M680I: 1 Patient K695R: 4 Patienten, 3 unselektierte Patienten, 8 Kontrollen V726A: 2 Patienten
<b>Ergebnis</b>	Bei allen drei Patienten wurde die Diagnose MS gestellt	Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der Mutationen bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden. Jedoch erreichten die irakischen und die nordafrikanischen Juden mit Mutation am Schnellsten EDSS-Werte von 3,0 bzw. 6,0, signifikant schneller als Patienten ohne Mutation und auch signifikant schneller als Ashkenazi-Juden mit Mutation.	Bei 12 neurologischen Patienten wurde retrospektiv FMF festgestellt, 9 dieser Patienten hatten geschätzte MS. Das ist eine fast viermal höhere Prävalenz als erwartet in der Türkei. Bei den 2000 FMF-Patienten wurden retrospektiv 9 MS-Fälle gefunden, das ist zehnmal höher als die erwartete Prävalenz in der Türkei.	Unter den MS-Patienten wurden signifikant mehr Mutationen gefunden als in dem Kontrollkollektiv. Patienten mit Mutation erreichten statistisch signifikant schneller einen EDSS von 3,0 im Vergleich zu Patienten ohne Mutation. Sonst ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.	Es fanden sich 12 FMF-Patienten, bei denen zusätzlich die Diagnose MS gestellt werden konnte, 9 gesunder beschrieben. Das FMF scheint früher zu beginnen bei homozygoten Trägern der M694V und schwerer zu verlaufen. Die MS-Patienten mit homozygoter M694V-Mutation haben einen höheren EDSS als die Träger der anderen Mutationen. Die Prävalenz der MS unter FMF-Patienten ist signifikant höher als in der Normalbevölkerung.	Es fanden sich 20 neurologische Patienten mit MEFV-Mutation, davon 16 mit MS. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der MS bei Mutationsträgern im Vergleich mit Patienten ohne Mutation. Von den 260 unselektierten Patienten haben 10 eine Mutation, bei den 400 Kontrollen fanden sich 17 Mutationen. Alle Mutationen liegen heterozygot vor.
<b>Schlussfolgerung</b>	Ein zufälliges Zusammentreffen der beiden Erkrankungen ist möglich, jedoch unwahrscheinlich, da beide eine sehr niedrige Prävalenz in der Türkei haben. Jedoch ist auch eine ZNS-Manifestation des FMF nicht ausgeschlossen.	Die Mutationen scheinen nicht den Ausbruch von MS zu begünstigen oder zu beschleunigen, aber möglicherweise beeinflussen sie den Verlauf der MS in einigen Bevölkerungsgruppen negativ und führen zu einer schnelleren Progression. Das scheint vor allem für das homozygote Vorliegen der M694V-Mutation zu gelten.	Die häufige Kopplung von MS und FMF könnte auf einen ähnlichen genetischen Anfalligkeit oder begünstigende Umweltfaktoren für die beiden Erkrankungen hinweisen. Eine zufällige Koinzidenz ist jedoch ebenfalls möglich.	Möglicherweise ist eine Mutation im MEFV-Gen ein Risikofaktor für die Entwicklung von MS. Außerdem scheinen Mutationen die Progression der MS zu beschleunigen.	FMF-Patienten scheinen prädisponiert zu sein, eine MS zu entwickeln. Homozygotes Vorliegen des M694V-Austausches beeinflusst den Verlauf der MS negativ und ist mit schwereren FMF-Verläufen vergesellschaftet.	Es zeigte sich keine signifikante Häufung von Mutationen im MEFV-Gen bei MS-Patienten. Es ist möglich, dass die Mutationen den Verlauf der MS beeinflussen, jedoch fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 5.1: Vergleich bisheriger Arbeiten zum Thema Multiple Sklerose und FMF mit dieser Arbeit

### 5.1.3 Bedeutung der Mutationen im CASP1-Gen

Mit der Untersuchung der 180 Patienten aus der neuroimmunologischen Ambulanz auf Mutationen im CASP-1-Gen wurde versucht, die Bedeutung dieser noch relativ unbekannten autoinflammatorischen Erkrankung ein wenig zu klären. Mit nur drei heterozygoten Mutationen (1,67 %) scheint sie zunächst keine größere Rolle zu spielen. Jedoch muss beachtet werden, dass diese Analyse sehr selektiv nur neurologische Patienten und in der Mehrzahl MS-Patienten betraf, und dass das Kollektiv außerdem zu klein war, um eine Aussage über die Häufigkeit einer wahrscheinlich eher seltenen Krankheit zu treffen. Dennoch gilt auch für das ICE-Fieber wie für das FMF, dass die unspezifischen Symptome wie Fieberepisoden, Bauchschmerzen, Gelenkschmerzen u. a. zu zahlreichen Untersuchungen und Arztbesuchen führen können. Es wäre also interessant, ein größeres Kollektiv unselektierter Patienten zu testen, um die Häufigkeit dieser Mutationen in Deutschland genauer zu bestimmen.

## 5.2 Bedeutung der Mutationen im MEFV-Gen in Gruppe 2 und 3

In Kapitel 4.2 wurde bereits beschrieben, dass in dem Kontrollkollektiv von 400 gesunden Deutschen 17 heterozygote Mutationsträger gefunden wurden. Das entspricht einem Anteil von 4,25 %. Bei den unselektierten MS-Patienten, die auf dieselben beiden Mutationen getestet wurden, fanden sich 10 heterozygote Mutationsträger unter 260 getesteten Patienten entsprechend einem Anteil von 3,8 %. Dieses Ergebnis lässt zum einen darauf schließen, dass in der deutschen Bevölkerung etwa 4 von 100 Individuen heterozygote Träger einer der beiden getesteten Mutationen sind. Zum anderen scheinen MS-Patienten nicht gehäuft MEFV-Mutationen aufzuweisen. Vor allem in der Arbeit von Gulsen Akman-Demir et al. aus der Türkei [1] wurde ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen vermutet. Neun der zwischen 1986 und 2005 in der Abteilung für Rheumatologie der Universität Istanbul gesehenen 2268 MS-Patienten litten (basierend auf klinischen und nicht auf molekulargenetischen Befunden) an einem familiären Mittelmeerfieber, was einer viermal höheren Prävalenz als in der türkischen Normalbevölkerung entsprach. Setzte man diese neun Patienten in Bezug zu den ungefähr 2000 FMF-Patienten, die bei den zwei Rheumatologischen Kliniken der Universität Istanbul zum Zeitpunkt der Publikation registriert waren, ergab sich eine zehnmal höhere Prävalenz als er-

wartet. In unserer Arbeit konnte dagegen keine Häufung von MEFV-Mutationen bei MS-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung festgestellt werden, was zum einen an den sehr viel kleineren Kollektiven liegen könnte, zum anderen aber auch an der weniger selektiven Auswahl unserer Patienten. Man könnte außerdem in einer weiteren Studie das komplette MEFV-Gen untersuchen, anstatt nur auf zwei spezifische Mutationen zu testen, und damit ein aussagekräftigeres Ergebnis erhalten. Für die Praxis ist vor allem interessant, dass ein Anteil von ungefähr 4 % (4,25 % der 400 Kontrollen und 3,8 % der 260 unselektierten MS-Patienten) der deutschen Bevölkerung Mutationen im MEFV-Gen aufweist, wohingegen in einer Arbeit von D. Tchernichko et al. [53] nur zwei heterozygote Mutationen in einem Kollektiv von 208 europäischen Kaukasiern in Frankreich gefunden wurden. Das entspricht einem Anteil von weniger als 1 %. Alle untersuchten Patienten in dieser Studie hatten zuvor mittels standardisierter Untersuchung die klinische Diagnose FMF erhalten. Die Autoren ziehen daraus den Schluss, dass FMF-ähnliche Syndrome in der westeuropäischen Bevölkerung nicht mit Mutationen im MEFV-Gen erklärt werden können. Demgegenüber stehen andere Arbeiten [9, 33, 41], die zeigen, dass auch Patienten mit heterozygoten Mutationen deutliche Symptome aufweisen können, die durchaus mit einem FMF vereinbar sind. Bisher scheint also die Bedeutung heterozygoter Mutationen im MEFV-Gen und des familiären Mittelmeerfiebers in der europäischen Normalbevölkerung unterschätzt worden zu sein. Deshalb kann die molekulargenetische Untersuchung für Patienten, die aufgrund jahrelanger, für eine autoinflammatorische Erkrankung sprechender Beschwerden zahlreiche Untersuchungen und Arztbesuche über sich ergehen ließen, ohne eine Diagnose zu erhalten, von Bedeutung sein. Mit dem Nachweis einer Mutation, auch wenn sie nur in heterozygoter Form vorliegt, und der anschließenden Behandlung mit Colchicin, kann möglicherweise eine Besserung dieser Symptome erreicht werden.





## 6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose zählt mit einer Prävalenz von 60 bis 100 pro 100000 Einwohner in Deutschland zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters. Das familiäre Mittelmeerfieber, das als häufigste hereditäre autoinflammatorische Erkrankung gilt, spielt dagegen bisher in Deutschland eine eher untergeordnete Rolle und wird allenfalls bei langjährigen Symptomen ohne eindeutige Diagnose in Erwägung gezogen. Bislang gibt es dementsprechend auch noch keine Untersuchung zur Bedeutung des FMF in der Entstehung einer MS in größeren deutschen Kollektiven. Arbeiten aus der Türkei und aus Israel geben jedoch Hinweise darauf, dass diese beiden Erkrankungen möglicherweise in Zusammenhang stehen. Außerdem fanden sich einige MS-Patienten in der Neuroimmunologischen Ambulanz mit zusätzlichen, unklaren Symptomen, die für diese autoinflammatorischen Syndrome typisch sind, wie zum Beispiel Fieberepisoden, häufige Infekte, Bauchschmerzen und Gelenkschmerzen. Für uns stellte sich daher die Frage, ob Mutationen des MEFV-Gens bei MS-Patienten gehäuft vorkommen und ob bei diesen Patienten die MS einen anderen Verlauf nimmt als bei Patienten ohne Mutation. Außerdem interessierte uns die Häufigkeit von MEFV-Mutationen in der deutschen Normalbevölkerung. Ein weiteres, noch weitestgehend unbekanntes periodisches Fiebersyndrom, das ICE-Fieber, wurde ebenfalls in die Untersuchung der MS-Patienten mit einbezogen.

Dazu wurden bei 180 ausgewählten Patienten der neuroimmunologischen Ambulanz Großhadern die Exons 2, 3 und 10 des MEFV-Gens und die Exons 6, 7, 8 und 9 des CASP-1-Gens sequenziert. Bei 400 Kontrollen und weiteren 260 unselektierten MS-Patienten wurde darüberhinaus mittels Sondenhybridisierung nach den beiden Pyrin-Mutationen E148Q und K695R gesucht, die in dem zuvor untersuchten Patientenkollektiv am häufigsten vorkamen.

Das Ergebnis lässt keine statistisch signifikante Häufung von Mutationen bei MS-Patienten erkennen. Im Kontrollkollektiv wurden 17 heterozygote Mutationsträger unter 400 Kontrollen gefunden (4,25 %), während sich unter den 260 unselektierten MS-Patienten 10 heterozygote Mutationsträger fanden (3,8 %). Unter den 180

Patienten aus der neuroimmunologischen Ambulanz waren 20 Patienten mit einer heterozygoten MEFV-Mutation. 16 dieser 20 Patienten gaben Symptome an, die mehr oder weniger typisch für ein familiäres Mittelmeerfieber sind. Wir gehen davon aus, dass die Mutationen, auch wenn sie nur in heterozygoter Form vorliegen, diese Symptome (mit-)verursachen. Von den 20 Mutationsträgern erfüllten 16 auch die Diagnosekriterien einer MS. Diese wurden bezüglich des Krankheitsverlaufs mit den 144 Patienten aus dem selektierten Kollektiv verglichen, die ebenfalls die Diagnose MS hatten, jedoch keine MEFV-Mutation aufwiesen. Unterschiede im Krankheitsverlauf ließen sich nicht mit Sicherheit erkennen, jedoch ist es möglich, dass die MS bei Mutationsträgern tendentiell früher beginnt als bei Patienten ohne Mutation. Bei der Untersuchung auf ICE-Fieber fanden sich lediglich drei heterozygote Mutationen bei 180 untersuchten Patienten. Diese Ergebnisse lassen nur Vermutungen über die Häufigkeit dieser Mutationen und deren Auswirkungen zu, da die Kollektive insgesamt sehr klein sind.

Mit diesen Untersuchungen sollte vor allem herausgefunden werden, ob FMF und ICE-Fieber überhaupt in Deutschland zu finden sind und welche Rolle diese Erkrankungen bei MS-Patienten spielen könnten. Eine weitere Untersuchung an größeren Kollektiven könnte die Tendenzen, die sich in unseren Ergebnissen abzeichnen, möglicherweise bestätigen.

# Abkürzungsverzeichnis

A .....	Alanin
ASC .....	Apoptosis-associated speck-like protein with a caspase recruitment domain
CAPS .....	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom
CARD .....	Caspase recruitment domain
CASP1 .....	Caspase-1
CRP .....	C-reaktives Protein
dATP .....	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP .....	Desoxycytidintriphosphat
dGTP .....	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
dNTP .....	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP .....	Desoxythymidintriphosphat
E .....	Glutaminsäure
EDSS .....	Expanded disability status score
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
FLAIR .....	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FMF .....	Familiäres Mittelmeerfieber
GC .....	Guanin-Cytosin
H .....	Histidin
HIDS .....	Hyperimmunglobulinämie-D und periodisches Fieber-Syndrom
HLA .....	Human-Leukocyte-Antigen
I .....	Isoleucin
ICE .....	Interleukin-1-converting enzyme
IgG .....	Immunglobulin-G
K .....	Lysin
L .....	Leucin
M .....	Methionin
MAPK .....	Mitogen-activated protein kinase
MEFV .....	Mediterranean fever
MRT .....	Magnetresonanztomographie/Kernspintomographie
MS .....	Multiple Sklerose
MSTKG .....	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
N .....	Asparagin
NF-κB .....	Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
OKB .....	Oligoklonale Banden
P .....	Prolin

PCR .....	Polymerase-Kettenreaktion
PI .....	Progressionsindex
PP-MS .....	Primär progrediente MS
Q .....	Glutamin
R .....	Arginin
RIP2 .....	Receptor-interacting protein 2
RR-MS .....	Schubförmig remittierende MS
S .....	Serin
SAA .....	Serum-Amyloid A
SDS .....	Sequence Detection System
SEP .....	Somatosensorisch evozierte Potenziale
SP-MS .....	Sekundär progrediente MS
T .....	Threonin
TRAPS .....	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1-assoziiertes periodisches Syndrom
u. a. ....	und andere
USB .....	United States Biochemical Corp.
V .....	Valin
VEP .....	Visuell evozierte Potenziale
ZNS .....	Zentrales Nervensystem

# Abbildungsverzeichnis

1.1	MRT-Aufnahmen eines MS-Patienten . . . . .	4
1.2	Stufenschema der MS-Therapie . . . . .	9
4.1	MRT-Aufnahmen von Patientin 8 . . . . .	36
4.2	Erbgang von Patientin 12 . . . . .	38
4.3	P-Werte des Vergleichs von MS-Patienten mit und ohne Mutation . .	44
4.4	Anteil der Mutationen bei Kontrollen und MS-Patienten . . . . .	51



# Tabellenverzeichnis

1.1	Tel-Hashomer-Kriterien zur Diagnose eines FMF . . . . .	11
3.1	Klinische Basischarakteristika des untersuchten Patientenkollektivs (Gruppe 1) . . . . .	32
3.2	Klinische Basischarakteristika der unselektierten MS-Patienten und Kontrollen (Gruppe 2 und 3) . . . . .	32
4.1	Basischarakteristika der MS-Patienten aus Gruppe 1 . . . . .	34
4.2	Anzahl der einzelnen Pyrin-Mutationen bei den 16 positiv getesteten MS-Patienten der Gruppe 1 . . . . .	35
4.3	Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit Mutation im MEFV-Gen Teil 1 . . . . .	39
4.3	Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit Mutation im MEFV-Gen Teil 2 . . . . .	40
4.3	Klinische Charakteristika der MS-Patienten mit Mutation im MEFV-Gen Teil 3 . . . . .	41
4.4	Vergleich der MS bei Mutationsträgern und Patienten ohne Mutation . . .	43
4.5	P-Werte zur Bestimmung der Signifikanz beim Vergleich von MS-Patienten . . . . .	44
4.6	Klinische Charakteristika der MS bei Patienten mit den drei häufigsten Mutationen . . . . .	45
4.7	Anzahl der einzelnen Pyrin-Mutationen im MEFV-Gen bei den vier positiv getesteten Patienten ohne MS der Gruppe 1 . . . . .	46
4.8	Klinische Charakteristika der Patienten mit einer Mutation im MEFV-Gen, jedoch ohne MS . . . . .	47
4.9	Klinische Charakteristika der Patienten mit Mutation im CASP1-Gen . . .	49
4.10	Mutationen im MEFV-Gen bei Kontrollen und unselektierten MS-Patienten	50
5.1	Vergleich bisheriger Arbeiten zum Thema MS und FMF mit dieser Arbeit . . . . .	57





# Literaturverzeichnis

- [1] G. Akman-Demir, A. Gul, E. Gurol, H. Ozdogan, S. Bahar, A. E. Oge, H. Gurvit, G. Saruhan-Direskeneli, H. Yazici, and M. Eraksoy. Inflammatory/ demyelinating central nervous system involvement in Familial Mediterranean Fever (FMF): Coincidence or association? *Journal of Neurology*, 253:928–934, 2006.
- [2] I. Aksentijevich, Y. Torosvan, and J. Samuels. Mutation and haplotype studies of Familial Mediterranean Fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *American Journal of human genetics*, 64:949–962, 1999.
- [3] S. Alotaibi, J. Kennedy, and R. Teller. Epstein-Barr-Virus in pediatric multiple sclerosis. *Journal of the American medical Association*, 291:1875–1879, 2004.
- [4] A. Bakkaloglu. Familial Mediterranean Fever. *Pediatric Nephrology*, 18:853–859, 2003.
- [5] M. H. Barakat, H. T. Mustafa, and R. A. Shakir. Mollaret’s meiningitis: a variant of recurrent hereditary polyserositis both provoked by metaraminol. *Archives of Neurology*, 45:926–927, 1988.
- [6] F. Barkhof, M. Filippi, D. H. Miller, P. Scheltens, A. Campi, and C. H. Polman. Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*, 120:2059–2069, 1997.
- [7] E. Ben-Chatrit and M. Levy. Familial Mediterranean Fever. *Lancet*, 351:659–664, 1998.
- [8] D. R. Booth, J. D. Gillmor, and H. J. Lachmann. The genetic basis of autosomal dominant Familial Mediterranean Fever. *The Quarterly Journal of Medicine*, 93:217–221, 2000.
- [9] M. G. Booty, J. J. Chai, S. L. Masters, V. Remmers, E. F. and Barham, J. M. Le, K. S. Barron, S. M. Holland, D. L. Kastner, and I. Aksentijevich. Familial Mediterranean Fever with a single MEFV mutation. *Arthritis and Rheumatism*, 60:1851–1861, 2009.
- [10] W. Brück, T. Kuhlmann, and C. Stadelmann. Remyelination in multiple sclerosis. *Journal of neurological sciences*, 206:181–185, 2003.

- [11] C. Cazaneuve, T. Sarkisian, and C. Pecheux. MEFV-gene analysis in Armenian patients with Familial Mediterranean Fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype - genetic and therapeutic implications. *American Journal of human genetics*, 65:88–97, 1999.
- [12] M Dewalle, C. Doning, and M. Rozenbaum. Genotype-phenotype correlation in Jewish patients suffering from Familial Mediterranean Fever. *European Journal of human genetics*, 6:95–97, 1998.
- [13] J. P. H. Drenth and J. V. M. Van der Meer. Hereditary periodic fever. *The New England Journal of medicine*, 345:1748–1757, 2001.
- [14] G. Ebers and D. W. Paty. CSF electrophoresis in one thousand patients. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 7:275–280, 1980.
- [15] M. D. Edwards and Bonnin J. M. *White matter disease*. Atlas, S. W., 1991.
- [16] E. Erken. Familial Mediterranean Fever - a review. *Turkish Journal of Rheumatology*, 1:19–22, 1996.
- [17] A. Gähler, K. Jung, and W. Korte. Familiäres Mittelmeerfieber - auch in der Schweiz. *Schweiz Medizin-Forum*, 4:558–561, 2004.
- [18] H. Z. Gökalp, M. K. Başkaya, and V. Aydin. Pseudotumor cerebri and Familial Mediterranean Fever. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 94:261–263, 1992.
- [19] G. Grateau, C. Pecheux, C. Cazaneuve, D. Cattan, M. Dervichian, and M. Goossens. Clinical versus genetic diagnosis of Familial Mediterranean Fever. *Quarterly Journal of medicine*, 93:223–229, 2000.
- [20] S. Haahr, A. M. Plesner, and V. F. Vestergaard. A role of late Epstein-Barr-Virus infection in multiple sclerosis. *Acta neurologica Skandinavica*, 109:270–275, 2004.
- [21] M. Henckes, T. Roskams, S. Vanneste, B. Van Damme, and Y. Vanrantghem. Polyarteritis nodosa type vasculitis in a patient with Familial Mediterranean Fever treated with cyclosporine-A. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 7:292–296, 1994.
- [22] G. Irtman, I. Öztura, N. Berber, and M. Başoğlu. Amyloid ophthalmoplegia associated with familial Mediterranean fever. XXX. National Neurology Congress in Adana, Turkey, 9-14 October 1994.
- [23] T. Kümpfel, L. Hoffmann, H. Rübsamen, W. Pöllmann, W. Feneberg, R. Hohl-feld, and Lohse P. Late-Onset Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Pe-riodic Syndrome in multiple sclerosis patients carrying the TNFRSF1A R92Q mutation. *Arthritis and Rheumatism*, 56:2774–2783, 2007.

- [24] J. F. Kurtzke. Epidmiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology*, 7:61–79, 1980.
- [25] J. F. Kurtzke. Reating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33:1444–1452, 1983.
- [26] H. Lassmann. *Pathology of multiple sclerosis*. Compston, Ebers, Lassmann, 1998.
- [27] H. Lassmann, W. Brück, and C. F. Lucchinetti. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine*, 7:115–121, 2001.
- [28] A. Livneh, P. Langevitz, and Y. Shinar. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of Familial Mediterranean Fever. Amyloid. *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation*, 6:1–6, 1999.
- [29] A. Livneh, P. Langevitz, D. Zemer, N. Zaks, S. Kees, T. Lidar, A. Migdal, S. Padeh, and M. Pras. Criteria for the dianosis of Familial Mediterranean Fever. *Arthritis and Rheumatism*, 40:1879–1885, 1997.
- [30] P. Lohse. Autoinflammatorische (Fieber-) Syndrome - Klinik, Genetik und Therapie. *Aktuelle Rheumatologie*, 32:154–161, 2007.
- [31] A. Lossos, S. Eliashiv, E. Ben-Chatrit, and A. Reches. Optic neuritis associated with Familial Mediterranean Fever. *Journal of clinical neuro-ophthalmology*, 13:141–143, 1993.
- [32] C. F. Lucchinetti, W. Brück, and M. Rodriguez. Distinct patterns of Multiple Sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain pathology*, 6:259–274, 1996.
- [33] D. Marek-Yagel, Y. Berkun, S. Padeh, A. Abu, H. Reznik-Wolf, A. Livneh, M. Pras, and E. Pras. Clinical Disease Among Patients Heterozygous for Familial Mediterranean Fever. *Arthritis and Rheumatism*, 60:1862–1866, 2009.
- [34] S. L. Masters, A. Simon, I. Aksentijevich, and D. L. Kastner. Horror Auto-inflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease. *Annual Review of Immunology*, 27:627–668, 2009.
- [35] I. McDonald, A. Compston, and G. Edan. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 50:121–127, 2001.
- [36] M. A. McLean, R. W. Luxton, and A. Thompson. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 10007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the log IgG-index. *Brain*, 113:1269–1289, 1990.

- [37] U. Meinzer, P. Quartier, J. F. Alexandra, V. Hentgen, F. Retornaz, and I. Koné-Paut. Interleukin-1 targeting drugs in Familial Mediterranean Fever: A case series and a review of literature.
- [38] Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). *Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose*. Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft, 2012.
- [39] J. H. Noseworthy, J. S. Wolinsky, F. D. Lublin, J. N. Whitaker, A. Linder, and P. Gjorstrup. Linomide in relapsing and secondary progressive MS: part I: trial design and clinical results. *Neurology*, 54:1726–1733, 2000.
- [40] I. E. Ormerod, D. H. Miller, W. I. McDonald, E. P. du Boulay, P. Rudge, and B. E. Kendall. The role of NMR imaging in the assessment of multiple sclerosis and isolated neurological lesions. A quantitative study. *Brain*, 110:1579–1616, 1987.
- [41] S. Özen. Changing Concepts in Familial Mediterranean Fever: Is it possible to have an autosomal-recessive disease with only one mutation? *Arthritis and Rheumatism*, 60:1575–1577, 2009.
- [42] S. Özen, Y. Bilginer, N. Aktay Ayaz, and M. Calguneri. Anti-interleukin 1 treatment for patients with Familial Mediterranean Fever resistant to colchicine. *Journal of Rheumatology*, 38:516–518, 2011.
- [43] C. H. Polman, S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O’Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinstenker, and J. S. Wolinsky. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the mcdonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2):292–302, 2011.
- [44] QIAGEN®. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*, second edition, November 2007.
- [45] A. Rösen-Wolff, M. J. Romanowski, I. Aksentijevich, E. F. Remmers, S. Flecks, N. Quoos, J. Grammatte, C. Petzold, H. D. Nguyen, T. Kallinich, G. Ganser, A. Nimtz-Talaska, V. Runde, B. Grimbacher, J. Birmelin, M. Gahr, and J. Roessler. Hypomorphic germline mutations in CASP-1 do not prevent and may even provoke autoinflammatory disease.
- [46] F. A. Schumacher, G. W. Beeve, and R. F. Kibler. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Science*, 122:552–568, 1965.
- [47] A. D. Schwabe and J. B. Monroe. Meningitis in Familial Mediterranean Fever. *The American Journal of medicine*, 85:715–717, 1988.

- [48] Y. Shinar, A. Livneh, and P. Langevitz. Genotype-phenotype assessment of common genotypes among patients with Familial Mediterranean Fever. *The Journal of Rheumatology*, 27:1703–1707, 2000.
- [49] Y. Shinar, A. Livneh, Y. Vill, A. Pinhasov, I. Zeitoun, A. Kogan, and A. Achiron. Common mutations in the Familial Mediterranean Fever gene associated with rapid progression to disability in non-Ashkenazi Jewish multiple sclerosis patients. *Genes and Immunity*, 4:197–203, 2003.
- [50] S. Stojanov and D. L. Kastner. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Current Opinion in Rheumatology*, 17:586–599, 2005.
- [51] S. Stojanov, S. Zellerer, F. Hoffmann, E. D. Renner, A. Kéry, E. Laicini, P. Lohse, and B.H. Belohradskz. Periodische Fiebersyndrome. *Monatsschreiben Kinderheilkunde*, 151:91–106, 2003.
- [52] D. Tchernitchko, M. Legendre, and C. Cazaneuve. The E148Q MEFV allele is not implicated in the development of Familial Mediterranean Fever. *Human mutations*, 22:339–340, 2003.
- [53] D. Tchernitchko, S. Moutereau, M. Legendre, A. Delahaye, C. Cazaneuve, C. Lacombe, G. Grateau, and S. Amselem. MEFV analysis is of particularly weak diagnostic value for recurrent fevers in western Europe Caucasian patients. *Arthritis and Rheumatism*, 52 52:3603–3605, 2005.
- [54] M. V. Tejada-Simon, Y. C. Zang, and J. Hong. Cross reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 53:189–190, 2003.
- [55] A. J. Thompson, C. H. Poman, and D. H. Miller. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 120:1085–1096, 1997.
- [56] R. Topaloğlu, Ü. Saatçi, A. Bakkaloğlu, N. Beşbaş, and V. Başsoy. Evaluation of the hypercoagulable state by measuring protein-C and antithrombin III levels in nephrotic syndrome and in Familial Mediterranean Fever-related amyloidosis. *Turkish Journal of Pediatrics*, 34:15–20, 1992.
- [57] M. A. Topçuoğlu and R. Karabudak. Familial Mediterranean Fever and multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 244:510–514, 1997.
- [58] I. Toubitou, S. Lesage, M. McDermott, L. Cuisset, H. Hoffman, C. Dode, N. Shoham, E. Aganna, J. P. Hufot, C. Wise, H. Waterham, D. Punere, J. Demaille, and C. Sarrauste de Menthier. In-fevers: an evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes. *Human mutations*, 24:194–198, 2004.
- [59] M. Trojano, D. Paolicelli, and A. Bellacosa. The transition from relapsing-remitting MS to irreversible disability: clinical evaluation. *Neurological sciences*, 24:268–270, 2003.

- [60] M. Tunca, S. Akar, F. Onen, H. Ozdogan, O. Kasapcopur, F. Yalcinkaya, E. Tutar, S. Ozen, R. Topaloglu, E. Yilmaz, M. Arici, A. Bakkaloğlu, N. Beşbaş, T. Akpolat, A. Dinc, E. Erken, and Turkish FMF study group. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, 84:1–11, 2005.
- [61] M. Tunca, G. Kirkali, M. Soyturk, S. Akar, M. B. Pepys, and P. Hawkins. Acute phase response and evolution of Familial Mediterranean Fever. *Lancet*, 353:1415, 1999.
- [62] A. Unal, A. Dursun, U. Emre, N.F. Tascilar, and H. Ankarali. Evaluation of common mutations in the Mediterranean fever gene in Multiple Sclerosis patients: Is it a susceptibility gene? *Journal of Neurological Sciences*, 294:38–42, 2010.
- [63] S. G. Waxman. Demyelinating diseases - new pathological insights, new therapeutic targets. *The New England Journal of medicine*, 338:323–234, 1998.
- [64] B. B. Weinshenker, B. Bass, and G. P. Rice. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 1. Clinical course and disability. *Brain*, 112:133–146, 1989.
- [65] H. Wiendl, A. Melms, and R. Hohlfeld. Multiple Sklerose und andere demyelinisierende Erkrankungen. In *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*. Brandt, T. and Dichigans, J. and Diener, H.C., 2003.
- [66] Y.G. Yahalom, S. Kivity, M. Lidar, A. Vaknin-Dembinsky, D. Karussis, S. Fletcher, E. Ben-Chetrit, and Livneh A. Familial Mediterranean Fever (FMF) and multiple sclerosis: an association study in one of the world’s largest FMF cohorts. *European Journal of Neurology*, 18:1146–1150, 2011.
- [67] F. Z. Yetkin, V. M. Haughton, R. A. Papke, M. E. Fischer, and S. M. Rao. Multiple Sclerosis: specificity of MR for diagnosis. *Radiology*, 178:447–451, 1991.
- [68] D. Zemer, M. Revach, M. Pras, B. Modan, S. Schor, E. Sohar, and J. Gafni. A controlled trial of Colchicine in preventing attacks of Familial Mediterranean Fever. *The New England Journal of medicine*, 291:932–934, 1974.

# Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bedanken bei

- Frau PD Dr. med. Tania Kümpfel und bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Lohse für die sehr gute und engagierte Betreuung, für die Hilfe und das stets offene Ohr während der Durchführung der Versuche und bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- den Mitarbeitern der Institute für klinische Neuroimmunologie und klinische Chemie für die Unterstützung, das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.
- meinen Eltern, die mir zum einen das Studium ermöglicht haben und mich zum anderen in jeder Beziehung stets tatkräftig unterstützt haben und mir immer Rückhalt gegeben haben.
- meinen Schwestern, auf die ich immer zählen kann und die mir mit Rechtschreibung und Formulierungen geholfen haben.
- Moritz Hügler, für alle guten Ratschläge, für die Hilfe beim Formatieren und dafür, dass er immer da ist.