Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie (INIM)

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Reinhard Hohlfeld

Die Therapie der Multiplen Sklerose mit IFN-β induziert den B-Zellüberlebensfaktor BAFF: Implikationen für Wirkungsmechanismen und Biomonitoring

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Hans Faber

aus

Freiburg i. Br.

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Edgar Meinl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Brocker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Nerl Priv. Doz. Dr. Monika Bradl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Markus Krumbholz
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	17.07.2008

für Elisabeth und Martin

1 Einleitung 4

1.1 Multiple Sklerose 4

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie 4
1.1.2 Klinik, Verlaufsformen und Prognose 5
1.1.3 Diagnostik 6
1.1.4 Immunpathogenese 6
1.1.5 Therapie 9

1.2 Das System der Interferone und seine therapeutische Anwendung bei MS 9

1.2.1 Einteilung und Physiologie der Interferone 9
1.2.2 Immunmodulation mit IFN-β bei MS 10
1.2.3 Neutralisierende Antikörper und Biomonitoring 11

1.3 BAFF – ein wichtiger Überlebensfaktor für B-Zellen 13

1.3.1 Struktur, Expressionsmuster und Rezeptoren 13
1.3.2 Biologische Funktionen 15
1.3.3 Assoziation mit Erkrankungen des Menschen 16

1.4 Zielsetzungen 17

2 Patienten, Material und Methoden 18

2.1 Patienten und gesunde Kontrollen 18

2.2 Methoden 19

2.2.1 Zellkultur und Separation von Immunzellen 19
2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen 21
2.2.3 RNA-Isolierung 23
2.2.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA 25
2.2.5 Quantitative TaqMan-PCR 26
2.2.6 BAFF-ELISA 31
2.2.7 Bestimmung neutralisierender Antikörper (NAB) 33

2.3 Statistische Analyse 33

3 Ergebnisse 34

3.1 In vitro Analyse der Regulation von BAFF und seiner Rezeptoren durch IFN-β und IFN-γ 34

3.1.1 IFN-β ist ein stärkerer Induktor von BAFF als IFN-γ in neutrophilen Granulozyten, PBMC, Monozyten und Fibroblasten 34
3.1.2 Die BAFF-Rezeptoren werden nicht durch IFN-β und IFN-γ reguliert 36

3.2 Etablierung einer quantitativen PCR für BAFF und MxA als ex vivo Testsystem 38

3.2.1 Die PCR verläuft mit hoher Effizienz 38
3.2.2 Die PCR liefert reproduzierbare Messergebnisse 40
3.2.3 Vollblutproben müssen nicht sofort weiterverarbeitet werden 42

3.3 Kinetik der BAFF- und MxA-Induktion nach IFN-Gabe 44

3.3.1 In vitro erreichen die BAFF-Transkripte nach 13 Stunden ein Maximum 44
3.3.2 Ex vivo verlaufen die Induktion von BAFF und MxA zeitlich parallel 46

3.4 Ex vivo Analyse der Regulation von BAFF und MxA in MS-Patienten mit und ohne Interferonbehandlung und in gesunden Kontrollen 49

3.4.1 Die Behandlung mit IFN-β induziert BAFF in MS-Patienten auf Transkript- und Proteinebene 49
3.4.2 Hohe Titer neutralisierender Antikörper heben die Induktion von BAFF und MxA auf 53
3.4.3 Die PCR liefert auch ohne vorherige Separation von Immunzellsubtypen eine hohe Sensitivität für ein Biomonitoring 53
3.4.4 Zwischen der Induktion von BAFF und dem Biomarker MxA besteht eine starke Korrelation 54

4 Diskussion 57

4.1 BAFF-Induktion durch IFN-β und IFN-γ in Immunzellen und Nicht-Immunzellen 57

4.1.1 Identifizierung BAFF produzierender Zellen 57
4.1.2 Keine Regulation der BAFF-Rezeptoren durch IFN-β 59

4.2 IFN-β induziert BAFF in MS-Patienten 60

4.2.1 Erhöhte BAFF-Transkripte unter Therapie mit IFN-β 60
4.2.2 Erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen unter Therapie mit IFN-β 62
4.2.3 Implikationen für Wirkungen und Nebenwirkungen der IFN-Therapie 63

4.3 Biomonitoring der Interferontherapie mit der quantitativen PCR für BAFF und MxA 66

4.3.1 Praktisch-klinische Anwendung der quantitativen PCR als ex vivo Testsystem 66
4.3.2 BAFF als zusätzlicher Biomarker der Interferontherapie 69

5 Zusammenfassung 71

6 Abkürzungen 73

7 Literatur 74

8 Danksagung 86

9 Lebenslauf 87

10 Publikationen 88

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Jacqueline du Pré galt lange Zeit als eines der hoffnungsvollsten Talente auf dem Cello. Als sie 1967 auch noch den Pianisten und Dirigenten Daniel Barenboim heiratete, schien der Weg frei zu sein für eine außergewöhnliche Karriere als Musikerin. Doch es kam anders: Anfang der siebziger Jahre erkrankte Jacqueline du Pré an Multipler Sklerose und verstarb nach einer langen Leidensgeschichte bereits im Alter von 42 Jahren. Zwar führt die Krankheit meist nicht zum Tode, doch dieses Beispiel zeigt, wie sie das Leben unzähliger Menschen ganz unvorbereitet verändern kann. Weit mehr als 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung bleiben enormen Forschungsanstrengungen zum Trotz auch heute noch viele zentrale Fragen ungelöst, insbesondere die nach der Ursache.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Multiple Sklerose (MS, Enzephalomyelitis disseminata) ist eine entzündliche Entmarkungskrankheit des zentralen Nervensystems (ZNS) und stellt die häufigste Ursache neurologischer Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar. Allein in Deutschland geht man von ca. 120.000 Betroffenen aus, weltweit sind es etwa 2,5 Millionen (Compston und Coles, 2002). Erkrankungsbeginn ist üblicherweise die dritte bis vierte Lebensdekade, bei Kindern tritt die MS nur äußerst selten auf. Eine klare Bevorzugung von Frauen gegenüber Männern besteht bezüglich des schubförmigen (~1,6:1), nicht jedoch des progredienten Verlaufstyps. Häufig ist die MS in Nordeuropa, Südaustralien und Nordamerika, in Japan und Afrika wird die Diagnose kaum gestellt. Siedeln Personen aus einem Hochrisikogebiet nach Vollendung der Pubertät in ein Land mit seltenem Auftreten von MS, so nehmen sie das hohe Risiko aus ihrer Heimat mit. Umgekehrt gilt für Einwanderer die niedrige Erkrankungswahrscheinlichkeit des Ziellandes, wenn sie eine Region mit häufigem Vorkommen von MS bereits vor der Pubertät verlassen (Poser, 1994). Nach gegenwärtiger Vorstellung wird die MS über ein

Zusammenwirken von Umwelteinflüssen und Genen ausgelöst. Die Liste verdächtiger Erreger als Umweltfaktoren wächst ständig, kritischen Überprüfungen konnten diese Berichte jedoch zumeist nicht standhalten (Giovannoni et al., 2006; Meinl, 1999). Eine Beziehung besteht indes zwischen dem Auftreten von Schüben und vorausgegangenen Infekten (Sibley et al., 1985). Für die Rolle genetischer Faktoren im Sinne eines polygenen Vererbungsmusters sprechen Familienanalysen. So beträgt die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge 31 Prozent gegenüber 5 Prozent bei zweieiigen Zwillingen (Noseworthy et al., 2000). Eine soeben veröffentlichte genomweite Studie identifizierte mit dem Interleukin-2-Rezeptor (IL2RA) und dem Interleukin-7-Rezeptor (IL7RA) zwei Kandidatengene und bestätigte die schon vorbekannte Assoziation der MS mit HLA-DR2 (The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2007).

1.1.2 Klinik, Verlaufsformen und Prognose

Die Symptome und Zeichen von MS spiegeln die funktionelle Anatomie einer infolge von pathologischen Entmarkungsprozessen gestörten Impulsleitung wieder. „Schübe“ neurologischer Funktionsstörungen treten subakut innerhalb von Stunden bis Tagen auf, erreichen dann ein Plateau und bilden sich binnen weniger Tage oder Wochen entweder spontan oder unter Einsatz von Kortikosteroiden meist, jedoch nicht immer vollständig zurück. Je nach Lokalisation der Läsion können beispielsweise vorkommen: Visusverlust bei Befall des N. opticus; Hemi-, Para- oder Tetraparese mit oder ohne Blasen-/ Mastdarmstörung bei Rückenmarksbeteiligung; Doppelbilder oder Schwindel bei Hirnstammläsionen; Ataxie bei zerebellärer Affektion. Nicht alle Läsionen werden jedoch klinisch manifest, andererseits kommen häufig unspezifische Symptome wie die charakteristische Fatigue dazu.

Etwa 85 Prozent der Patienten präsentieren sich initial mit der schubförmigen Verlaufsform der MS („relapsing-remitting MS“, RR-MS), gekennzeichnet durch klinische Schübe mit anschließender Besserung. Meist erfahren diese Patienten nach einigen Jahren bei abnehmender Schubfrequenz eine kontinuierliche neurologische Verschlechterung, die den Übergang in die sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform („secondary-progressive MS“, SP-MS) bildet. Bei etwa 15 Prozent der

Betroffenen zeigt die Erkrankung von Beginn an den fortschreitenden Verlauf und wird dann primär chronisch-progrediente MS („primary-progressive MS“, PP-MS) genannt (Keegan und Noseworthy, 2002). Die individuelle Prognose ist kaum vorherzusagen: Während etwa ein Viertel der MS-Kranken kaum in den Alltagsaktivitäten eingeschränkt wird, erleiden umgekehrt bis zu 15 Prozent innerhalb kürzester Zeit einen Zustand schwerster Beeinträchtigung (Compston und Coles, 2002).

1.1.3 Diagnostik

Die MS ist eine Ausschlussdiagnose, es gibt keinen isolierten Befund, der für diese Erkrankung spezifisch ist. Die auf Poser zurückgehenden Kriterien (Poser et al., 1983) wurden in letzter Zeit wesentlich überarbeitet (McDonald et al., 2001), 2005 erfolgte eine weitere Anpassung dieser neuen McDonald-Kriterien (Polman et al., 2005b). Zur Diagnosestellung wird der Nachweis räumlich und zeitlich getrennter ZNS-Läsionen gefordert basierend auf klinischen und paraklinischen Befunden wie der Kernspintomographie (MRT), Elektrophysiologie und Liquordiagnostik („Dissemination in Raum und Zeit“). Charakteristische Befunde in der Analyse der Zerebrospinalflüssigkeit sind eine leichte Pleozytose, das Auftreten von Plasmazellen und erhöhten Immunglobulinen sowie die so genannten oligoklonalen Banden (OKB). Letztere sind bei über 90 Prozent der Patienten vorhanden und werden noch mal im Zusammenhang der Immunpathogenese im folgenden Abschnitt erwähnt.

1.1.4 Immunpathogenese

Die Integrität der Einheit aus Myelinscheide und Axon stellt die Voraussetzung für die regelrechte Erregungsleitung dar. Das kennzeichnende pathologische Merkmal der MS ist der Entmarkungsherd (Plaque). An seiner Entstehung ist eine Vielzahl entzündlicher, möglicherweise aber auch neurodegenerativer Prozesse beteiligt (Hemmer et al., 2002). Selbst gesunde Individuen verfügen über autoreaktive, myelinspezifische T-Zellen, die aber entweder erst gar nicht aktiviert oder von regulatorischen T-Zellen unter Kontrolle

gehalten werden (Burns et al., 1983). Zur Erklärung des Zusammenbruchs der Immunregulation bei Autoimmunerkrankungen wird häufig molekulare Mimikry angeführt. Diese Hypothese geht davon aus, dass ein gemeinsam mit dem entsprechenden MHC-Komplex (eine Komponente des erblichen Risikos) präsentiertes Peptid (der Umweltfaktor) immunologisch nicht von einem Selbstantigen unterschieden werden kann. In der Folge entwickelt sich aus einer adäquaten Antwort auf den Erreger zusätzlich eine unangemessene Entzündungsreaktion gegen Komponenten aus der Einheit von Oligodendrozyt und Myelin. Das Versagen von Regulationsmechanismen führt zu Proliferation, Aktivierung und Eintritt autoreaktiver T-Zellen in die Zirkulation. Diese exprimieren nun verstärkt Adhäsionsmoleküle, induzieren Veränderungen an Endothelzellen und erreichen so nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke das ZNS. Dort angekommen treffen die T-Zellen wieder auf ihr Antigen und aktivieren Mikrogliazellen. Diese wiederum präsentieren den T-Zellen erneut das Antigen und eine Kaskade inflammatorischer Prozesse wird in Gang gesetzt. Die Folgen sind eine weitere Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, die Entwicklung eines entzündlichen Infiltrates und schließlich die Schädigung von Glia und Axonen (Trapp et al., 1998). Gleichzeitig leitet die Entzündung aber auch den Vorgang der endogenen Remyelinisierung ein. Langfristig jedoch führen die Astrozyten eine Vernarbung – daher der Name Multiple Sklerose – herbei, welche diese Reparaturprozesse letztendlich begrenzt und den Übergang in bleibende Defekte markiert.

Über mehrere Jahrzehnte hat die zellvermittelte Immunität die Studien zur MS-Pathogenese beherrscht (Sospedra und Martin, 2005). Diese etwas einseitige Fokussierung auf die T-Zellen ist wesentlich in der Entdeckung von aktivierten T-Zellen in MS-Läsionen und Analogien zu dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) begründet. So kann in Transferexperimenten mit $CD4^+$-myelinspezifischen T-Zellen die EAE auf ein gesundes Tier übertragen werden. In jedem Fall scheinen T-Zellen entscheidend beteiligt zu sein an der Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke und damit an der Auslösung des Autoimmunprozesses. An dem Vorgang der Demyelinisierung selbst ist jedoch noch eine Reihe von Mechanismen beteiligt, die weit über die Rolle der T-Zellen hinausgeht. Neben den Bestandteilen der angeborenen Immunabwehr hat in jüngerer Zeit vor allem das System der B-Zellen und Antikörper als

wichtiger Effektor in der Immunpathogenese der MS große Aufmerksamkeit erlangt (Archelos et al., 2000; Cross et al., 2001; Duddy und Bar-Or, 2006; Meinl et al., 2006). Einer der bedeutendsten und ersten Hinweise auf eine Rolle von B-Zellen und Antikörpern in der Pathologie von MS ergab sich bereits im Jahre 1948, als Elvin Kabat die wegweisende Beobachtung von erhöhten Immunglobulinen im Liquor MS-Kranker machte (Kabat et al., 1948). Mindestens zwei Quellen dieser Antikörper im Liquor lassen sich unterscheiden: Zum einen können B-Zellen und Immunglobuline über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke in das ZNS gelangen. Wie jedoch der häufige Befund über Jahre stabiler oligoklonaler Banden bei MS-Patienten zeigt, wird ein wesentlicher Teil der Immunglobuline intrathekal produziert (Walsh und Tourtellotte, 1986). Oligoklonal bedeutet dabei, dass nur eine begrenzte Zahl von B-Zellklonen zur Erhöhung der Liquorantikörper beiträgt. Zusätzlich hat Esiri 1977 auch in den MS-Läsionen Zellen identifizieren können, die Immunglobuline produzieren (Esiri, 1977). In den letzten Jahren ließen Sequenzanalysen der antigenbindenden Regionen von Antikörpern eine hohe Zahl klonal expandierter B-Zellen in Liquor (Qin et al., 1998) und Hirnläsionen (Baranzini et al., 1999) von MS-Patienten erkennen. In diesen Studien wiesen Bestandteile des variablen Teils der schweren Ketten ausgedehnte somatische Mutationen auf, ein Muster hinweisend auf eine antigeninduzierte Selektion von B-Zellen. Bis heute sind allerdings die Spezifitäten der Antikörper noch weitgehend unbekannt, jedenfalls ist nur ein Teil davon gegen Myelinstrukturen gerichtet. Zu weiteren Antigenen gehören Virusbestandteile, Zellkerne, Endothelzellen, Fettsäuren, Ganglioside und selbst axonale Strukturen (Archelos et al., 2000). Unter der Annahme einer pathogenetischen Rolle von Autoantikörpern bei MS hat sich die Suche nach Autoantigenen stark auf Myelinproteine und andere Komponenten des ZNS konzentriert. Ein mit großem Interesse verfolgtes Kandidatenautoantigen ist dabei das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), welches auf der Oberfläche der Myelinscheide lokalisiert und damit Antikörpern in besonderem Maße zugänglich ist. So gelang es Genain und Mitarbeitern, MOG-Antikörper in MS-Läsionen in enger Assoziation zu zerfallenen Myelinstrukturen zu identifizieren (Genain et al., 1999). Allerdings werden Antikörper gegen MOG gelegentlich auch in gesunden Kontrollen gefunden (Lindert et al., 1999). In einem tierexperimentellen Ansatz führte das Vorhandensein von Antikörpern gegen MOG

jedoch erst nach Initiierung einer entzündlichen Läsion durch T-Zellen zu einer Demyelinisierung (Litzenburger et al., 1998).

1.1.5 Therapie

Eine Heilung der MS ist nach wie vor nicht möglich. Die gegenwärtigen Therapien umfassen drei Einsatzgebiete: Im akuten Schub werden häufig Kortikosteroide verabreicht, bei fehlendem Ansprechen kann die Plasmapherese versucht werden (Keegan et al., 2005). Zur Schubprophylaxe stehen eine Reihe immunmodulatorischer Substanzen zur Verfügung (Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) und Rieckmann, 2006). Eine führende Rolle nehmen dabei seit einigen Jahren insbesondere die Interferone ein, denen der zentrale Teil dieser Arbeit gewidmet ist und die daher separat im nächsten Kapitel vorgestellt werden. Seit einigen Jahren zugelassen ist das Peptidgemisch Glatirameracetat (Copaxone®). Als vielversprechende Hoffnungsträger gelten ferner die noch relativ jungen Substanzen Natalizumab (Tysabri®) und FTY720 (Fingolimod) (De Jager und Hafler, 2007). Schließlich existiert noch eine Vielzahl symptomatischer Maßnahmen, mit denen sich unabhängig vom Krankheitsverlauf gezielt einzelne Beschwerden wie Spastik und Blasenstörungen lindern lassen.

1.2 Das System der Interferone und seine therapeutische Anwendung bei MS

1.2.1 Einteilung und Physiologie der Interferone

Vor genau 50 Jahren entdeckten Isaac und Lindenmann einen Faktor, der aus virusinfiziertem Gewebe freigesetzt benachbarte Zellen vor dem Befall mit dem Virus schützt und nannten ihn Interferon (IFN) (Isaacs und Lindenmann, 1957). Neben der antiviralen besitzen Interferone antiproliferative, antineoplastische und immunmodulatorische Eigenschaften, die zu zahlreichen therapeutischen Anwendungen

geführt haben (Weinstock-Guttman et al., 1995). Prominenteste Vertreter der Typ-I-Interferone sind IFN-α und IFN-β. Nahezu alle Zellen sind zu ihrer Produktion befähigt, die häufig zitierte Zuordnung von IFN-α zu Leukozyten und IFN-β zu Fibroblasten ist daher zu eng gefasst. Doppelstrang-RNA aus dem viralen Replikationszyklus stellt einen wichtigen, wenngleich nicht den einzigen Stimulus der Interferonsynthese dar. Beide Interferone binden an den IFN-α/β-Rezeptor (IFNAR), an welchen sich der bei Zytokinen weit verbreitete JAK-STAT-Signalweg anschließt. Nach Konformationsänderung des Rezeptors erfolgt eine Aktivierung der Tyrosinkinasen TYK2 und JAK1, welche eine Phosphorylierung zweier Transkriptionsfaktoren aus der STAT (signal transducers and activators of transcription)-Familie herbeiführen. Die phosporylierten Heterodimere STAT1/STAT2 gelangen nun in den Zellkern und bilden zusammen mit IRF9 (IFN-regulatory factor 9, auch p48) den heterotrimeren Komplex ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3). Dieser erkennt bestimmte DNA-Sequenzen (IFN-stimulated response elements, ISRE) im Promotorbereich Hunderter IFN-stimulierter Gene (ISG) und bewirkt deren Transkription (Karpusas et al., 1998). IFN-γ wird hauptsächlich von T-Zellen und NK-Zellen gebildet und auch als Typ-II-Interferon oder Immun-IFN bezeichnet. Es benutzt einen eigenen Rezeptor und Signalweg und ist wichtiger Bestandteil der TH1-Antwort. Die medizinische Bedeutung einer Reihe weiterer erst kürzlich entdeckter Interferone wie IFN-λ ist noch weitgehend ungeklärt (Theofilopoulos et al., 2005).

1.2.2 Immunmodulation mit IFN-β bei MS

Bei MS sind sowohl Typ-I-IFN als auch Typ-II-IFN auf ihren therapeutischen Nutzen hin überprüft worden. Während die Gabe von IFN-γ zu schweren Exazerbationen führte (Panitch et al., 1987), konnten aufgrund überzeugender Ergebnisse aus randomisierten, klinisch-kontrollierten Studien drei Präparate von IFN-β für den Einsatz bei schubförmiger MS zugelassen werden (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993; PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, 1998; Jacobs et al., 1996; Paty und Li, 1993). Dabei

handelt es sich um die beiden subkutan applizierten Formulierungen Betaferon® (IFN-β1b, Schering; 8 Mio. I.U. jeden 2. Tag) und Rebif® (IFN-β1a, Serono; dreimal wöchentlich 22 oder 44µg) sowie um das intramuskulär verabreichte Avonex® (IFN-β1a, Biogen Idec; 6 Mio. I.U. einmal wöchentlich). Die Behandlung mit IFN-β reduziert die Zahl der Schübe und im kurzfristigen Verlauf auch das Fortschreiten der Behinderung. Im MRT kommt es zu einer deutlichen Abnahme von Aktivitätsmarkern. Bezüglich positiver Effekte der IFN-Therapie bei SP-MS und auf den langfristigen Krankheitsverlauf insgesamt liegen hingegen derzeit noch keine eindeutigen Daten vor (Ann und Rudick, 2006). Unvollständig verstanden bleiben bis heute die eigentlichen Wirkungsmechanismen (Weinstock-Guttman et al., 1995; Yong et al., 1998; Yong, 2002; Zhang et al., 2002). In jedem Fall ist von einem Zusammenwirken mehrerer ISG auszugehen. So vermindert IFN-β die Proliferation von T-Zellen und die Produktion von TNF-α, verschiebt das Zytokinmuster in Richtung TH2 mit erhöhter Sekretion von IL-10 und hemmt die Passage von Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke über seine Effekte auf Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Proteasen. Häufig wird die Interferontherapie erschwert durch das Auftreten von klinischen Autoimmunphänomenen und der Bildung von Autoantikörpern (Bitsch et al., 2004; Lange-Asschenfeldt et al., 2004).

1.2.3 Neutralisierende Antikörper und Biomonitoring

Während die meisten unerwünschten Wirkungen wie grippale Beschwerden und Lokalreaktionen an der Einstichstelle langfristig meist keine Änderung der Therapie erfordern, stellt das Auftreten neutralisierender Antikörper (NAB) gegen IFN-β ein großes therapeutisches Problem dar. Die Angaben zur Häufigkeit der NAB variieren je nach Präparat von 2 bis 40 Prozent (Sorensen et al., 2005). NAB vermindern die Bioverfügbarkeit von IFN-β (Bertolotto et al., 2003) und sind mit einem klinischen Wirkungsverlust assoziiert (Kappos et al., 2005; Sorensen et al., 2003). Bis heute sind keine standardisierten Verfahren für ein Biomonitoring verfügbar, zwei unterschiedliche Ansätze lassen sich aber unterscheiden: Zum einen können die Antikörper im Serum

bestimmt werden. Kann die einfache Detektion unspezifischer bindender Antikörper (BAB) für eine erste Screeninguntersuchung wertvoll sein, erfordert der Nachweis der entscheidenden NAB jedoch den Einsatz aufwändiger, keinesfalls einheitlicher Stimulationsversuche in vitro, um die Verminderung der IFN-β-Aktivität zu erfassen. Meist wird ein Assay auf zytopathischen Effekt (CPE) verwendet, das Prinzip der in dieser Arbeit eingesetzten Variante wird in Abschnitt 2.2.7 erläutert. Der Test auf NAB kann folglich lediglich indirekte Hinweise auf eine biologische Wirksamkeit von IFN-β geben. Die Bestimmung von ISG unmittelbar aus dem Blut der Patienten hingegen bietet den großen Vorteil, die Bioaktivität injizierten β-Interferons direkt ex vivo abschätzen zu können, denn die Stimulation des IFNAR stellt einen notwendigen ersten Schritt für die Wirkung von IFN-β dar. Eine Reihe von ISG wie Neopterin, 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) und β_2-Mikroglobulin wurde bereits auf ihre Anwendbarkeit als Marker überprüft. In letzter Zeit jedoch richtet sich die Aufmerksamkeit besonders auf das Myxovirus Resistenzprotein A (MxA). Diese GTPase aus der Superfamilie der Dynamine vermittelt Resistenz gegenüber viralen Infektionen über die Blockade wichtiger Replikationsschritte (Haller und Kochs, 2002). Seine spezifische Induktion durch Typ-I-Interferone (von Wussow et al., 1990) macht MxA zu einem idealen Biomarker für exogen zugeführtes IFN-β. In NAB-positiven Patienten, besonders bei Vorliegen persistierend hoher NAB-Titer, fällt MxA auf basale Werte hinweisend auf eine fehlende Aktivierung des IFNAR (Bertolotto et al., 2003; Deisenhammer et al., 1999; Pachner et al., 2003a). Wurde MxA anfänglich auf Proteinebene bestimmt (Deisenhammer et al., 1999), schlagen einige Autoren aufgrund einer überlegenen Sensitivität nun die Messung der mRNA-Transkripte vor (Bertolotto et al., 2001; Pachner et al., 2003a; Pachner et al., 2003b). Die Anwendung neuer, kommerziell erhältlicher gebrauchsfertiger Blutentnahmeröhrchen mit integriertem RNA-Stabilisator bedeutet dabei zusätzlich eine wesentliche Vereinfachung der praktischen Durchführung. Allerdings erfordert die quantitative PCR in besonderem Maße die Einhaltung eines engen Intervalls der Blutentnahme nach Injektion. Zur Bestimmung eines möglichst günstigen Blutentnahmezeitpunktes wurde daher zunächst in vitro und ex vivo der zeitliche Verlauf der Transkripte von MxA und BAFF nach Gabe von IFN-β untersucht. Da MxA weder an der Pathogenese der MS noch an den

Wirkungsmechanismen der IFN-Therapie beteiligt ist, könnte sich die Suche nach zusätzlichen Biomarkern als hilfreich erweisen.

1.3 BAFF – ein wichtiger Überlebensfaktor für B-Zellen

Das System der B-Zellen bildet den humoralen Arm der erworbenen Immunität. Abhängig von der Struktur des Antigens wird dieses entweder mit oder ohne Hilfe von T-Zellen selektiv über den B-Zellrezeptor (BCR) erkannt. Auf diese Weise aktivierte B-Zellen können in einem streng regulierten Weg zu Plasmazellen ausdifferenzieren, welche zur Sekretion von Antikörpern gegen das auslösende Agens befähigt sind. B-Zellen vermitteln ihre Wirkungen aber nicht nur über Antikörper, sie sind darüber hinaus höchst effektive antigenpräsentierende Zellen (Lanzavecchia, 1985) und übernehmen zudem wichtige regulatorische Aufgaben (Mizoguchi und Bhan, 2006; Serra und Santamaria, 2006). BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family, auch BLyS (Moore et al., 1999), TALL-1 (Shu et al., 1999), THANK (Mukhopadhyay et al., 1999), zTNF-4 (Gross et al., 2000) oder TNFSF-13B genannt) ist ein kürzlich entdecktes neues Mitglied aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (Schneider et al., 1999), welches entscheidend an der Steuerung von Reifung und Überleben im System der B-Zellen beteiligt ist (Mackay und Browning, 2002).

1.3.1 Struktur, Expressionsmuster und Rezeptoren

BAFF kommt als trimeres Molekül in einer membranständigen und einer löslichen Form vor. Exprimiert wird BAFF in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (Nardelli et al., 2001), neutrophilen Granulozyten (Scapini et al., 2003), follikulären dendritischen Zellen sowie einer Reihe von Stromazellen (**Abb. 1**). B-Zellen hingegen produzieren normalerweise kein BAFF, sind aber dazu nach maligner Transformation imstande (Novak et al., 2002). Bezüglich der Fähigkeit von T-Zellen zur BAFF-Synthese liegen widersprüchliche Daten vor, insgesamt sprechen mehr Arbeiten dagegen (Moore et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 1999; Nardelli et al., 2001; Shu et al., 1999) als dafür (Huard

et al., 2004; Schneider et al., 1999). Die Induktoren von BAFF sind bis heute unvollständig bekannt, Zytokine wie IL-10, IFN-γ, IFN-α und G-CSF bewirkten in zahlreichen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten eine Hochregulierung von BAFF (Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001; Scapini et al., 2003).

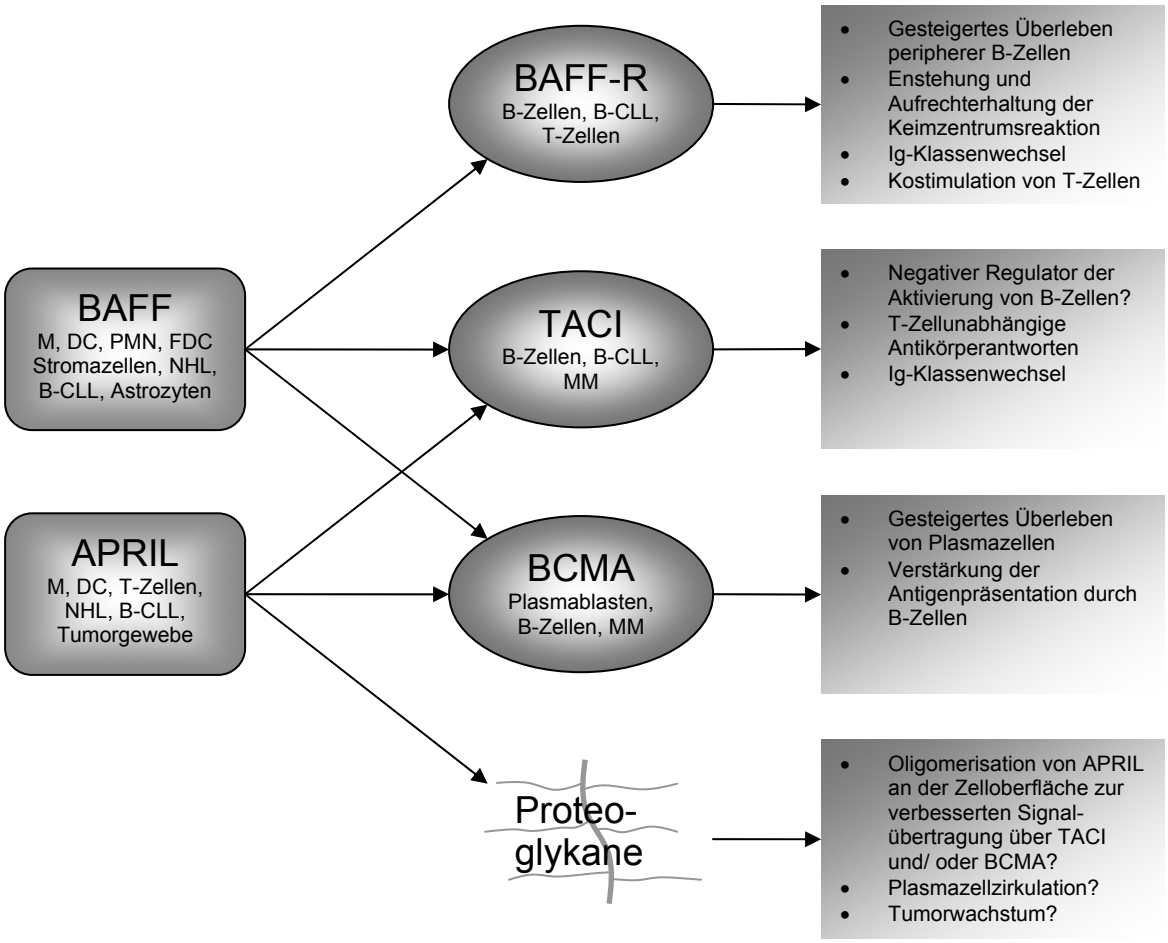


Abbildung 1: Expression und Funktion von Liganden und Rezeptoren im BAFF/ APRIL-System.
Die beiden Liganden BAFF und APRIL (links) binden jeweils an drei verschiedene Rezeptoren (Mitte), welche sowohl überlappende als auch unterschiedliche Funktionen vermitteln (rechts). Zellen, welche die Komponenten des BAFF/ APRIL-Systems exprimieren, sind direkt bei den Liganden und Rezeptoren angegeben. B-CLL: Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie; DC: Dendritische Zellen; FDC: Follikuläre dendritische Zellen; MM: Multiples Myelom; M: Makrophagen; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; PMN: Neutrophile Granulozyten. Modifiziert und ergänzt nach Ng et al., 2005 und Tangye et al., 2006.

Drei Rezeptoren für BAFF sind inzwischen beschrieben, BAFF-R (auch BR3), TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) und BCMA (B cell maturation antigen). Diese werden vorzugsweise, jedoch nicht ausschließlich auf B-Zellen exprimiert (Mackay und Ambrose, 2003). Die wesentlichen Funktionen von BAFF auf B-Zellen werden über BAFF-R vermittelt (Ng et al., 2004). TACI und BCMA binden zusätzlich auch APRIL (a proliferation inducing ligand), einem eng mit BAFF verwandten Mitglied aus der TNF-Familie (Dillon et al., 2006). APRIL wird in löslicher Form freigesetzt und existiert kodiert von einem endogenen Hybridtranskript zusätzlich als membrangebundenes TWEAK-APRIL Fusionsprotein (TWE-PRIL) (Pradet-Balade et al., 2002).

1.3.2 Biologische Funktionen

Nach Verlassen des Knochenmarkes und Eintritt in die Milz durchlaufen unreife B-Zellen auf dem Weg zu naiven, reifen B-Zellen zwei Übergangsstadien, die als T1 (transitional type I) und T2 (transitional type II) bezeichnet werden (Mackay und Browning, 2002). Diese Zwischenstadien gelten als wichtige Kontrollpunkte zur Erhaltung der B-Zelltoleranz. Nur sehr wenige unreife B-Zellen absolvieren erfolgreich diesen Reifungsprozess. BAFF fördert unter Beeinflussung antiapoptotischer Faktoren wie Bcl-2 spezifisch das Überleben der T2 B-Zellen. So finden sich in BAFF-transgenen Mäusen vermehrt B-Zellen, während umgekehrt sowohl BAFF-defiziente Tiere also auch solche mit mutiertem BAFF-R eine erheblich verminderte Anzahl peripherer B-Zellen aufweisen (Batten et al., 2000; Thompson et al., 2000). Demgegenüber lässt der Befund erhöhter B-Zellen in TACI-defizienten Mäusen auf negative regulatorische Funktionen dieses Rezeptors in der Homöostase der B-Zellen schließen (Yan et al., 2001). Sowohl TACI als auch BAFF-R kommt eine Rolle beim Immunglobulinklassenwechsel zu (Castigli et al., 2005). BCMA vermittelt das langfristige Überleben von Plasmazellen im Knochenmark (O'Connor et al., 2004).

1.3.3 Assoziation mit Erkrankungen des Menschen

Neben einigen Malignomen aus der B-Zellreihe (Tangye et al., 2006) ist BAFF am Menschen vor allem im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten untersucht worden: Dabei sind Systemischer Lupus Erythematodes (SLE), Rheumatoide Arthritis (RA), Sjögren-Syndrom (SS) und Wegener-Granulomatose mit leicht erhöhten Serumspiegeln von BAFF assoziiert (Cheema et al., 2001; Groom et al., 2002; Krumbholz et al., 2005a; Zhang et al., 2001), wohingegen organbezogene Autoimmunleiden wie Diabetes Mellitus vom Typ 1 und die Primär Biliäre Zirrhose (PBC) unauffällige BAFF-Spiegel aufweisen (Mackay et al., 2002). Interessanterweise findet sich bei MS-Patienten eine lokal erhöhte Expression von BAFF in den Hirnläsionen (Krumbholz et al., 2005b). Im Einklang zu dem auf das ZNS begrenzten Autoimmunprozess konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Veränderung von BAFF im Serum unbehandelter MS-Kranker gegenüber Kontrollpersonen festgestellt werden. Bei Patienten mit Hepatitis C und HIV ist eine Assoziation von erhöhtem systemischen BAFF mit Autoimmunphänomenen beschrieben (Stohl et al., 2002; Toubi et al., 2006). Der ursächliche Zusammenhang zwischen gesteigerten BAFF-Spiegeln und Autoimmunität konnte im Tiermodell weiter ausgearbeitet werden: Mäuse, die BAFF überexprimieren entwickeln eine B-Zellhyperplasie, erhöhte Ig-Spiegel, Autoantikörper und klinische Autoimmunerkrankungen (Kalled, 2005; Mackay et al., 1999). Autoreaktive B-Zellen sind für ihr Überleben verstärkt auf BAFF angewiesen und können so unter vermehrt verfügbarem BAFF bevorzugt überdauern (Lesley et al., 2004). Bezeichnenderweise sind auch unter therapeutischer Gabe von Typ-I-IFN zahlreiche Autoimmunphänomene beschrieben, eine Auswirkung dieser Therapie auf das BAFF-System ist bislang jedoch noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Demonstration einer direkten Induktion von BAFF in MS-Patienten unter Behandlung mit IFN-β. Dies könnte zu einem besseren Verständnis von Wirkungen, aber auch Nebenwirkungen der Interferontherapie einschließlich der beobachteten Autoimmunphänomene beitragen.

1.4 Zielsetzungen

Der weit verbreiteten und mittlerweile gut etablierten Anwendung von IFN-β in der Behandlung der schubförmigen MS steht ein noch weitgehend unbekannter Wirkungsmechanismus gegenüber. In den vergangenen Jahren sind enorme Fortschritte erzielt worden, die lange unterschätzte Rolle von B-Zellen in der Immunpathogenese der MS besser zu verstehen (Meinl et al., 2006). Somit ist der Gedanke naheliegend, ein Teil der Wirkungen der Interferontherapie könnte auch über eine Modulation des Systems der B-Zellen vermittelt werden. Hier erfolgt erstmals die Beschreibung einer Induktion von BAFF durch IFN-β in Immunzellen. Diese wurde zunächst in vitro näher für verschiedene Zelltypen charakterisiert und konnte dann in der ex vivo Situation an Patienten unter Behandlung mit IFN-β bestätigt werden. Das wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand also zum einen darin, mit der Identifizierung von BAFF als Interferon-stimuliertem Gen (ISG) weitere Einblicke in die vielfältigen Immunmodulationen der IFN-Therapie zu gewinnen. Einen weiteren Fokus dieses Projektes bildete vor dem Hintergrund der bis heute ungelösten Problematik therapieassoziierter, gegen IFN-β gerichteter neutralisierender Antikörper (NAB) die Entwicklung eines effizienten Biomonitorings. Hier wird die Bestimmung der beiden Gene BAFF und MxA mit der quantitativen PCR aus Vollblut unter Einsatz eines speziellen RNA-Stabilisierungssystems als ein vielversprechendes, da sehr sensitives und in den klinisch-praktischen Alltag leicht zu integrierendes Verfahren vorgeschlagen.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und gesunde Kontrollen

Für die vorliegende Untersuchung wurden nach schriftlich dokumentierter Aufklärung und Einwilligung aus der Neuroimmunologischen Ambulanz des Klinikums Großhadern sowie aus der Marianne-Strauss-Klinik Kempfenhausen insgesamt 33 Patienten mit nach den Kriterien von Poser und McDonald gesicherter MS eingeschlossen (McDonald et al., 2001; Poser et al., 1983). Davon erhielten 21 mit schubförmigem Verlaufstyp eine Behandlung mit IFN-β, darunter 12 mit Rebif® 44, drei mit Rebif® 22, einer mit Rebif® 11, vier mit Betaferon® sowie einer mit Avonex®. Weitere 12 MS-Patienten, davon 9 mit schubförmigem und drei mit sekundär chronisch-progredientem Verlaufstyp, waren ohne immunmodulatorische Behandlung. Unter den mit IFN-β behandelten Patienten nahmen einige begleitend NSAID (Paracetamol, Ibuprofen) zur symptomatischen Behandlung unerwünschter Begleiterscheinungen ein. Einer der mit IFN-β behandelten Patienten bekam einen Kortisonpuls i. v. eine Woche vor Blutentnahme. Ansonsten erfolgte keine weitere immunmodulatorische oder immunsuppressive Behandlung in den vorangegangenen vier Wochen. Aus der Abteilung Neuroimmunologie des MPI für Neurobiologie wurden 12 gesunde Kontrollpersonen rekrutiert (**Tabelle 1**). Pro Spender wurden neben einem Serumröhrchen jeweils 20 ml EDTA-Blut und/ oder 2,5 ml Vollblut mit Hilfe des PAXgene™-Systems (s. Kapitel 2.2.3) entnommen. Die Studie wurde durch die Ethikkomission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Tabelle 1: Charakteristika klinischer Probanden

	n	**w:m**	**Alter**	**EDSS**	**Erkrankungsdauer**
IFN-β	21	13:8	42 (33,8-49,3)	3,5 (2,4-4,1)	12 (7,3-16)
Unbehandelt	12	8:4	33,5 (30,5-50)	3,5 (2,3-3,8)	10 (2-19,5)
Gesund	12	4:8	30 (26-32)		

MS-Patienten mit (IFN-β) und ohne IFN-Behandlung (Unbehandelt) sowie gesunde Kontrollen (Gesund). Median von Alter und Erkrankungsdauer in Jahren. EDSS = Expanded Disability Status Scale nach Kurtzke (Kurtzke, 1983). In Klammern 25. und 75. Perzentile.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Separation von Immunzellen

Materialien

Kulturmedium: RPMI 1640 + L-Glutamin, Gibco/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe, versetzt mit 10 % Fetales Kälberserum, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, hitzeinaktiviert bei 57 °C für 30 Minuten.

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) frei von $CaCl_2$ und $MgCl_2$, Gibco/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Pancoll human, Dichte = 1,077 g/ ml, PAN Biotech, Aidenbach

MACS® CD 14 MicroBeads

MACS® MS Separation Columns

MACS® Cell Separator

alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Spülpuffer für MACS® Zelltrennung: PBS (Gibco/ Invitrogen) mit Zusatz von 2 mM EDTA und 5 % fetales Kälberserum

Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin mit EDTA $4Na^+$) 1x, Gibco/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Interferon beta-1b (IFN-β), 1000 U/ ml, Betaferon®, Schering, Berlin

Interferon gamma (IFN-γ), 500 U/ ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Dichtezentrifugation mit Pancoll zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus EDTA Blut

Im Rahmen der Patientenstudie wurden pro Patient 20 ml frisch gewonnenes EDTA-Blut eingesetzt, für die Untersuchungen in vitro je nach Bedarf auch größere Mengen. In sterilen, konischen 50 ml Röhrchen wurden jeweils 10 ml EDTA-Blut mit PBS auf 35 ml verdünnt, das Gemisch auf je 15 ml Pancoll überschichtet und für 40 Minuten bei 400 g und 20 °C ohne Bremse abzentrifugiert. Die Lymphozyten und Monozyten (PBMC)

sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/ Thrombozyten) und Pancoll an, das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Die PBMC-haltige Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und mit PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mit der Zählkammer nach Neubauer bestimmt, tote Zellen über eine Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen.

Isolierung von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Pellet der Dichtegradientenzentrifugation durch eine hypotone Lyse der kontaminierenden Erythrozyten isoliert: Nach Suspension und Inkubation für 30 s in 20 ml eiskalter hypotoner 0,2 %iger NaCl Lösung wurde Isotonizität über die Zugabe von 20 ml 1,6 %iger NaCl Lösung wiederhergestellt und dieser Lysezyklus viermal wiederholt. Die durchflusszytometrisch im Forward/ Sideward-Scatter überprüfte Reinheit der Granulozyten erreichte einen Mittelwert von über 97 %.

Isolierung von Monozyten durch magnetische Zellseparation

Monozyten wurden mit dem MACS®-System isoliert. MACS MicroBeads sind paramagnetische Partikel, die an monoklonale Antikörper gekoppelt sind. Für die Trennung von Monozyten werden Antikörper verwendet, die sich gegen das Oberflächenantigen CD14 richten. Werden die magnetisch markierten $CD14^+$ Zellen auf eine Säule (MACS Column) gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet (MACS Separator), so werden sie in der Säule festgehalten, wohingegen die unmarkierten $CD14^-$ Zellen (Lymphozyten) durch Spülpuffer ausgewaschen werden. Wird die Säule anschließend aus dem Magnetfeld entfernt, können die zurückgehaltenen $CD14^+$ Zellen als positiv isolierte Zellfraktion eluiert werden. Die Zelltrennung wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt, durchflusszytometrisch wurden Reinheitsgrade bestimmt mit einem Mittelwert von über 95 % für Monozyten und über 97 % der Lymphozytenfraktion.

Kultur von Humanen Vorhaut-Fibroblasten (HFF)

Humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF, human foreskin fibroblasts) wurden im Rahmen von Zirkumzisionen gewonnen und freundlicherweise von Herrn Dr. Korn und Frau Dr. Schmidt, Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt. Die Fibroblasten wurden in RPMI-Medium in Plastikflaschen, im Rahmen von Stimulationsversuchen mit Zytokinen zusätzlich in Plastikschälchen, bei 37 °C und einer CO_2-Konzentration von 5 % in Kultur genommen. Die Zellen wachsen dabei fest adhärent an Plastikoberflächen unter Ausbildung eines charakteristischen fischzugartigen Wachstumsmusters. Die Ernte der Fibroblasten erfolgte in folgenden Schritten: Abnahme des Mediums, Spülen mit PBS, Zugabe von 5 ml Trypsin je Vertiefung der 6er Kulturschale, Inkubation im Brutschrank für 3-5 Minuten, Lösen der Zellen von der Oberfläche, Zentrifugieren in PBS und erneute Kultur oder direkte RNA-Aufreinigung.

2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen

Geräte und Materialien

FACSCalibur™ Durchflusszytometer einschließlich Software CellQuest™
Antikörper zur Monozytenfärbung: CD14 PE und Isotypkontrolle IgG2b PE
ViaProbe Cell Viability Solution
Pharmingen™ Propidium Iodide Staining Solution
Alle Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) frei von $CaCl_2$ und $MgCl_2$, Gibco/ Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Waschpuffer für Zellfärbung: PBS (Gibco/ Invitrogen) + 1 % FCS + 0,1 % NaN_3

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse, FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dies führt zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, das emittierte Signal verhält sich dabei proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße, bestimmt im Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter), und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw., gemessen im Seitwärtsstreulicht SSC = Side Scatter) der Zellen gewonnen. Propidiumiodid oder alternativ die ViaProbe dienen zur Identifizierung apoptotischer Zellen.

Färbung und Messung der Zellen

Die Färbung von PBMC, Monozyten und der monozytendepletierten Lymphozytenfraktion wurde auf Eis in 96 Well-Mikrotiterplatten mit einer Zellzahl von 100.000 bis 200.000/ Well durchgeführt:

1. Abzentrifugieren der Zellen bei 1.200 U/ min und 4 °C für 5 Minuten, Zugabe von 200 µl Waschpuffer, zweimalige Wiederholung des Waschvorgangs.
2. Zugabe des Antikörpers, jeweils 4 µl auf die in 200 µl suspendierten Zellen und Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C für 30 Minuten.
3. Abzentrifugieren für 5 Minuten bei 1.200 U/ min bei 4 °C, Entfernen des Überstandes und Zugabe von 200 µl Waschpuffer.
4. Abzentrifugieren für 5 Minuten bei 1.200 U/ min bei 4 °C, Entfernung des Überstandes.
5. Zugabe von 10 µl ViaProbe direkt auf das Pellet und Inkubation für 10 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C.

6. Zugabe von 200 µl PBS, Überführen in FACS-Röhrchen.
7. Messung mit Bestimmung des Reinheitsgrades in Prozent aus Gate lebender Zellen im FSC/ SSC (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) sowie für Monozyten zusätzlich aus Gate $CD14^+$ Zellen.

2.2.3 RNA-Isolierung

Geräte und Materialien

RNeasy® Mini Kit (50)
QIAshredder™ (250)
QIAamp® RNA Blood Mini Kit (50)
RNase-Free DNase Set (50)
PAXgene™ Blood RNA Kit (50)
PAXgene™ Blood RNA-Röhrchen
alles Qiagen GmbH, Hilden
14,3 M β-Mercaptoethanol (β-ME)
Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen, Nerbe Plus GmbH, Winsen/ Luhe
Mikrozentrifuge Eppendorf Centrifuge 5417R
Eppendorf Thermomixer Comfort
Beide Eppendorf, Hamburg
Photometer: Pharmacia Biotech GeneQuant II DNA/ RNA Calculator, früher Pharmacia Biotech, jetzt GE Healthcare Life Sciences, München
Tris-Puffer 100mM, pH = 7,5
Ethanol (98%)

Prinzip und Durchführung der RNA-Isolierung mit dem RNeasy® Mini Kit

Mit den RNeasy Kits wurde Gesamt-RNA aus neutrophilen Granulozyten, PBMC, Monozyten, Lymphozyten und HFF-Zellen isoliert. Das RNeasy Verfahren kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften von RNA an eine Silicagel-Membran mit der

Mikrozentrifugationstechnik. Die Zellen werden zunächst in einem stark denaturierenden, Guanidinisothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffer lysiert, durch den auch RNasen inaktiviert werden. Das visköse Lysat wird durch Zentrifugieren in den QIAshredder Spinsäulen homogenisiert, nach Zugabe von Ethanol zur Optimierung der Bindungsbedingungen werden die Probe auf die RNeasy Mini-Säule aufgetragen. Die Gesamt-RNA bindet an die Membran, während die übrigen Substanzen ausgewaschen werden. Schließlich wird die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die einzelnen Schritte wurden nach dem Protokoll für tierische Zellen im RNeasy® Mini Handbuch durchgeführt. Zusätzlich wurde der optionale DNase-Verdau in der RNeasy Mini-Spinsäule mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets fest in das Protokoll integriert.

Photometrische Bestimmung von Konzentration, Ausbeute und Reinheit der Gesamt-RNA

Für die photometrische Messung wurden jeweils 8 µl RNA eingesetzt und 1:10 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (A_{260}) entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml. Hinsichtlich möglicher Kontaminationen, die im UV-Bereich absorbieren (z. B. Proteine), ist das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm (A_{260}/ A_{280}) ein Maß für die Reinheit der RNA. Aufgrund ihrer pH-Abhängigkeit wurden die A_{260}/ A_{280}-Absorptionsverhältnisse in 10 mM Tris-Cl gemessen. Reine RNA hat in diesem Puffer ein A_{260}/ A_{280}-Verhältnis von 1,9-2,1, dieses wurde mit den meisten Proben erreicht.

Reinigung von RNA aus menschlichem Vollblut

Zur Gewinnung von RNA aus Vollblut kamen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz. Das QIAamp® RNA Blood Mini Kit erforderte pro Spender den Einsatz von 1,5 ml EDTA-Blut. Die Aufarbeitung der RNA erfolgte gemäß dem Handbuch des Herstellers. Zunächst werden dabei die Erythrozyten selektiv mit einem hypotonen Puffer lysiert und durch Zentrifugation von den Leukozyten getrennt. Danach erfolgen die Lyse der

Leukozyten und die weitere Aufarbeitung und photometrische Messung der RNA analog dem RNeasy-Prinzip.
Anders als diese Methode arbeitet das PAXgene™ Blood RNA System mit einem speziellen RNA-Stabilisator, welcher es erlaubt, Proben mehrere Tage bei Raumtemperatur lagern zu können, um sie dann zu einem beliebigen Zeitpunkt gleichzeitig verarbeiten zu können. Pro PAXgene™ Blood RNA-Röhrchen werden 2,5 ml Vollblut entnommen. Zunächst werden Nukleinsäuren über einen Zentrifugierschritt abgetrennt. Es schließen sich Waschschritte mit den mitgelieferten Pufferlösungen an sowie ein Proteinverdau mit der beigefügten Proteinase K. Nach Zugabe von Ethanol wird das Lysat schließlich auf eine PAXgene-RNA-Silicasäule geladen und die RNA wie oben beschrieben einschließlich DNase-Verdau gewonnen.

2.2.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Materialien

Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) einschließlich mitgeliefertem Reaktionspuffer, Promega, Madison, USA
Random Hexamer Primer $p(dN)_6$, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR Nukleotid Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Molecular Biology Grade Water, Eppendorf AG, Hamburg
Prime RNase Inhibitor™, 15000 Units, Eppendorf AG, Hamburg

Prinzip und Durchführung

Die Synthese der cDNA erfolgte unverändert nach der Gebrauchsinformation in folgenden Schritten: Nach Zugabe von Random Hexamer Primern Erhitzen der Proben für fünf Minuten bei 70 °C, anschließend Abkühlung und Zugabe der Reversen Transkriptase, des Reaktionspuffers, des RNase Inhibitors, der Trinukleotide und von Wasser und Inkubation bei 40 °C für eine Stunde. Anschließend wurden die Proben

zusätzlich für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt, um die eingesetzten Enzyme zu inaktivieren. Schließlich wurde die cDNA mit Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 5 ng/ µl für die sich anschließende PCR verdünnt.

2.2.5 Quantitative TaqMan-PCR

Geräte und Materialien

GeneAmp® 5700 Sequence Detection System
GeneAmp® 5700 SDS Software, Version 1.3
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate
ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers
Alle Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
qPCR™ Core Kit mit Polymerase
Uracil-DNA Glykosylase (UNG), 1500 IU, 1 IU/ µl
Beide Eurogentec S. A., Seraing, Belgien

Primer und Sonden:

GAPDH:
Vorwärts-Primer (Exon 2): 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
Rückwärts-Primer (Exon 4): 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
Sonde (Exon 4): 5'-FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA-3'
Alle Metabion GmbH, Martinsried

BAFF:
Vorwärts-Primer (Exon 5): 5'-CAA AAT ATG CCT GAA ACA CTA CCC A-3'
Rückwärts-Primer (Exon 6): 5'-ATC TCC ATC CAG TGA TAT TTG TGC-3'
Sonde (Exon 5/6): 5'-FAM-TCC TGC TAT TCA GCT GGC ATT GCA AAA CT-TAMRA-3'
Alle Metabion GmbH, Martinsried

MxA:

Vorwärts-Primer (Exon 19): 5’-GAG GAG ATC TTT CAG CAC CTG ATG-3’

Rückwärts-Primer (Exon 20): 5’-GTA CGT CTG GAG CAT GAA GAA CTG-3’

Beide Thermo Electron GmbH, Ulm

Sonde (Exon 19/20): 5’-FAM-TCA CCA GGA GGC CAG CAA GCG-TAMRA-3’

Biosource Europe, Nivelles, Belgien

BAFF-R:

Vorwärts-Primer (Exon 2): 5’-CTG GTC CTG GTG GGT CTG GT-3’

Rückwärts-Primer (Exon 3): 5’-CCC GGA GAC AGA ATG ATG ACC-3’

Beide Thermo Electron GmbH, Ulm

Sonde (Exon 2/3): 5’-FAM-AGA CAA GGA CGC CCC AGA GCC C-TAMRA-3’

Sigma-Genosys, Steinheim

TACI:

Vorwärts-Primer (Exon 3): 5’-GAA GGT ACC AAG GAT TGG AGC AC-3’

Rückwärts-Primer (Exon 4): 5’-CTG TAG ACC AGG GCC ACC TGA-3’

Beide Thermo Electron GmbH, Ulm

Sonde (Exon 3/4): 5’-FAM-AGG CTC AGA AGC AAG TCC AGC TCT CCC-TAMRA-3’

Sigma-Genosys, Steinheim

BCMA:

Vorwärts-Primer (Exon 2): 5’-TCT TTG GCA GTT TTC GTG CTA ATG-3’

Rückwärts-Primer (Exon 3): 5’-CCA GTC CTG CTC TTT TCC AGG T-3’

Beide Thermo Electron GmbH, Ulm

Sonde (Exon 2/3): 5’-FAM-AAA ACA CAG GAT CAG GTC TCC TGG GCA T-TAMRA-3’

Sigma-Genosys, Steinheim

Prinzip und Durchführung

Die quantitative PCR als Weiterentwicklung der Polymerase-Kettenreaktion erlaubt, eine Aussage zur Ausgangs-DNA-Menge einer Probe zu treffen. Dabei finden Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß statt. Das hier eingesetzte TaqMan-Prinzip stellt dabei eine der Möglichkeiten zur Quantifizierung dar: Zusätzlich zu den äußeren Primern wird eine fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (FAM) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (TAMRA) trägt. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Resonanz Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizenstrang. Trifft die Taq Polymerase nun in der Extensionsphase auf die Sonde, so wird letztere durch die 5'-3'-Exonuklease der DNA Polymerase geschnitten. Die Taq Polymerase kann ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang entfalten. Daher bleiben die nichthybridisierten Sondenmoleküle (DNA-Einzelstränge) unbeschadet. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe – und damit auch der FRET – zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und die gemessene Zunahme der Reporterfluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme. In dieser Arbeit wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung angewandt: Dabei wird die unbekannte Menge einer Zielsequenz bezogen auf das Signal einer endogenen Amplifikationskontrolle zur Normalisierung unterschiedlich eingesetzter RNA-Mengen. Als interne Kontrolle dient ein so genanntes Housekeeping Gen, dessen Regulation sich im idealen Fall nicht ändert, selbst wenn die Zelle den unterschiedlichsten Einflüssen ausgesetzt ist. Näherungsweise erfüllt wird diese Eigenschaft von dem Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Der Vergleich der Expression von Zielsequenz und Housekeeping-Gen erfolgt in der exponentiellen Phase der Reaktion über die Differenz der C_T-Werte beider Gene. Dabei drückt der auch als Threshold Cycle bezeichnete C_T-Wert die Zykluszahl aus, bei der ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Je stärker ein Gen

exprimiert wird und je mehr Ausgangskopien dementsprechend vorliegen, desto eher wird dieser Schwellenwert erreicht und desto kleiner ist folglich der C_T-Wert. Da in der exponentiellen Phase der PCR unter der Annahme einer hundertprozentigen Effizienz der Reaktion eine Verdoppelung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt, lässt sich aus dem ΔC_T-Wert das Verhältnis der Expression des Ziegens zum Housekeeping-Gen ableiten:

$$\text{Zielgen/ Housekeeping-Gen} = 2^{-\Delta C_T}$$

Erreicht beispielsweise das Zielgen den Schwellenwert erst zwei Zyklen nach dem Housekeeping-Gen, beträgt also $\Delta C_T = 2$, so folgt aus obiger Gleichung: $2^{-2} = ¼ = 25$ %. Die Expression der zu untersuchenden Zielsequenz beträgt in diesem Fall also 25 % bezogen auf das Housekeeping-Gen. Design von Primern und Sonden erfolgte unter Einsatz der Software Primer Express. Um eine Störung durch DNA in der RT-PCR zu vermeiden, wurden die Sonden jeweils so entworfen, dass sie eine Intron-Exon-Grenze umfassen. Damit wird die Amplifizierung genomischer DNA verhindert, da in der Synthese der mRNA die Introns über das Splicing entfernt werden. Eine Synthese der entsprechenden Gene aus genomischer DNA konnte weder in einer konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese noch in der TaqMan PCR registriert werden. Die optimalen Primerkonzentrationen wurden über eine Primermatrix ermittelt (**Tabelle 2**):

Tabelle 2: Endkonzentrationen von Primern und TaqMan-Sonde

Primer	**Vorwärtsprimer**	**Rückwärtsprimer**	**TaqMan-Sonde**
BAFF	200 nM	200 nM	100 nM
MxA	600 nM	600 nM	100 nM
GAPDH	100 nM	100 nM	100 nM
BAFF-R	600 nM	600 nM	100 nM
TACI	100 nM	600 nM	100 nM
BCMA	600 nM	600 nM	100 nM

Den einzelnen PCRs lag folgendes Pipettierschema zugrunde (**Tabelle 3**):

Tabelle 3: Pipettierschema einer Reaktion in der quantitativen PCR

Ausgangsmaterial	**Endkonzentration**	**Volumen Einfachansatz**
Mastermix		
10-fach Reaktionspuffer	1-fach	2,5 µl
$MgCl_2$ 25 mM	5 mM	5 µl
dNTP 2,5 mM	200 µM	2 µl
RNase freies Wasser		0,13 µl
Uracil-DNA Glykosylase	0,01 IU/ µl	0,25 µl
Hot GoldStar Enzym	0,025 IU/ µl	0,13 µl
		Summe Mastermix: 10 µl
Primer und Sonde		
RNase freies Wasser		3,75 µl
Primermix	s. Tabelle 2	1,25 µl
		Summe Primermix: 5 µl
Template Zielgen (cDNA)		10 µl
Template GAPDH (cDNA)		5 µl + 5 µl RNase freies Wasser
		Gesamtvolumen PCR: 25 µl

Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Zum Schutz vor Carryover-Kontaminationen wurde der PCR ein Verdau mit Uracil-N-Glykosylase (UNG) vorgeschaltet. Der Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert (**Tabelle 4**):

Tabelle 4: Programmierung des Thermocyclers

Schritt	UNG Inkubation	Hot GoldStar Aktivierung	Denaturierung	Annealing und Extension
Zahl der Zyklen	1	1	40-45	40-45
Zeit pro Zyklus	2 min	10 min	15 sec	1 min
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C

2.2.6 BAFF-ELISA

Geräte und Materialien

ELISA Lesegerät: Dynatech MR 4000, Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf

Nunc 96-Well-Microtiterplatten MaxiSorp™, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Coating Antikörper: anti-hBAFF mAb Klon B4H7.2 (5 µg/ ml)

Detection Antikörper: anti-hBAFF Klon A9C9.1, biotinyliert (1 µg/ ml)

Standard: Rekombinantes, humanes mycBAFF (80 ng/ ml)

Alle Biogen Idec, Cambridge, MA, USA

PBSN Blockpuffer

PBS

1 % proteasefreies BSA

5 % Sucrose (= Saccharose, Rohrzucker)

0,00625 % NaN_3

Coating-Puffer: 50 mM Na_2CO_3, pH 9,6

RDT-Puffer

0,1 % BSA

0,05 % Tween 20

In TBS (Tris-buffered saline: 20 mM Trizma-Base, 150 mM NaCl, pH 7,3)

Streptavidin in Verdünnung 1:200, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Prinzip des Sandwich-ELISA

Beim Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper eingesetzt, die für zwei unterschiedliche Epitope des Antigens spezifisch sind. Dabei bindet der erste spezifische Antikörper (Capture Antikörper) an den Kunststoff der Mikrotiterplatte und hält das Antigen fest. Der zweite biotinylierte Antikörper (Detection Antikörper) dient zum Antigennachweis. Zugabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase sowie des Testsubstrates

Tetramethylbenzidin führt zur Bildung eines bei 690 nm messbaren, blauen Produkts. Mit Schwefelsäure wird die Farbreaktion gestoppt, die OD der entstehenden gelben Flüssigkeit kann anschließend bei 450 und 550 nm bestimmt werden.

Durchführung

1. Beschichten der Mikrotiterplatte mit 100 µl/ Well Coating-Antikörper anti-hBAFF vom Klon B4H7.2 (5 µg/ ml in 50 mM Na_2CO_3 gelöst) bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht
2. Dreimal Waschen mit 0,5 % Tween 20 in PBS, anschließend Blocken mit 300 µl PBSN und Inkubation auf Schüttler bei Raumtemperatur für 2 Stunden
3. Pro Well Zugabe von je 100 µl 1:20 in RDT-Puffer verdünntem Patientenserum und Inkubation über Nacht bei 4 °C auf Schüttler
4. Dreimal Waschen mit 0,5 % Tween 20 in PBS
5. Zugabe von je 100 µl Detection-Antikörper (in RDT auf 1 µg/ ml verdünnter biotinylierter anti-hBAFF vom Klon A9C9.1) und Inkubation für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur auf Schüttler
6. Viermal Waschen mit 0,5 % Tween 20 in PBS
7. Zugabe von je 100 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex 1:200 in RDT-Puffer verdünnt und Inkubation für 30 Minuten
8. Fünfmal Waschen mit 0,5 % Tween 20 in PBS
9. Zugabe von 100 µl unverdünntem TMB und Inkubation bei Raumtemperatur bis Farbreaktion sichtbar wird
10. Bei Umwandlung in blaue Lösung Lesen bei 690 nm zum Erfassen hoher BAFF-Werte
11. Zugabe von je 50 µl 1 M H_2SO_4 und Lesen der Platte bei 450 und 550 nm

Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve aus schrittweise in RDT-Puffer verdünntem rekombinanten, humanen mycBAFF erstellt, die Messungen erfolgten jeweils in Duplikaten.

2.2.7 Bestimmung neutralisierender Antikörper (NAB)

Die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper erfolgte durch BioMonitor (Kopenhagen, Dänemark) nach dem „Cytopathic Effect Assay“ (CPE). Dieser Test misst die Fähigkeit neutralisierender Antikörper, den protektiven Effekt von IFN-β aufzuheben, wenn kultivierte humane A549 Zellen vom Subklon MC-5 einem zytopathischen, IFN-β empfindlichen Virus (Encephalomyocarditis Virus) ausgesetzt sind. Die Ergebnisse werden als neutralisierende Kapazität (NC) angegeben, die dem Prozentsatz von hinzugefügtem IFN-β entspricht, der von dem Prüfserum neutralisiert wird. Alle Proben wurden zuvor auf endogene Zytotoxizität und intrinsische antivirale Aktivität getestet. Dabei gelten eine neutralisierende Kapazität (NC) von unter 20 % als negativ, 20 - 79 % als niedrig positiv, und schließlich 80 % und darüber als hoch positiv. Die Firma BioMonitor war geblindet bezüglich klinischer Daten der Patienten sowie Ergebnissen aus dieser Arbeit.

2.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SigmaStat® 3.0. Da innerhalb der mit IFN-β behandelten MS-Patienten sowohl biologische Responder als auch Non-Responder anzutreffen waren, war in dieser Gruppe von keiner Normalverteilung auszugehen. Entsprechend kamen in dieser Arbeit ausschließlich nicht-parametrische Tests zum Einsatz. Vergleiche der Induktion und Expression von BAFF und MxA zwischen den IFN-behandelten Patienten und der Gruppe aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen erfolgten mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney. Dabei wurden unbehandelte MS-Patienten und gesunde Kontrollen jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst. Der Zusammenhang einer Induktion von BAFF und MxA wurde über den Korrelationskoeffizienten nach Spearman analysiert.

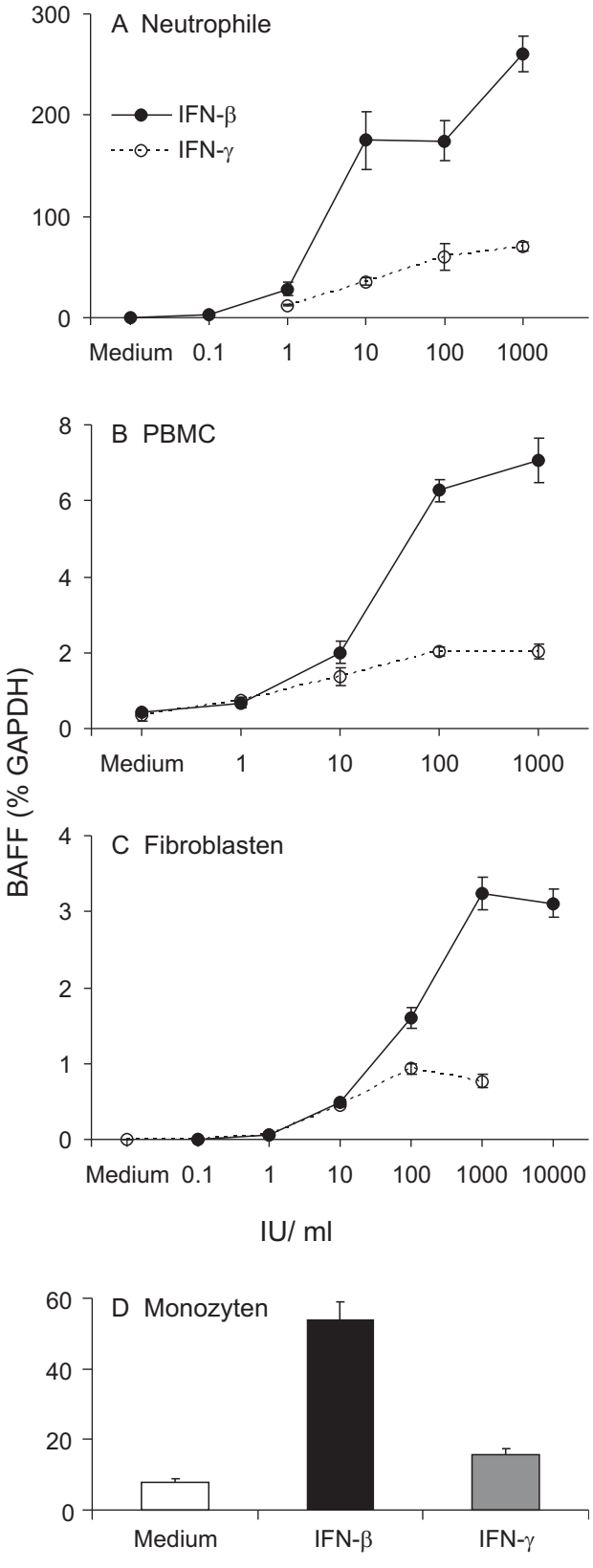
3 Ergebnisse

3.1 In vitro Analyse der Regulation von BAFF und seiner Rezeptoren durch IFN-β und IFN-γ

3.1.1 IFN-β ist ein stärkerer Induktor von BAFF als IFN-γ in neutrophilen Granulozyten, PBMC, Monozyten und Fibroblasten

Der therapeutische Einsatz von IFN-β bei MS-Patienten eröffnet die Möglichkeit, die Physiologie der Typ-I-Interferone in vivo am Menschen zu studieren. Zunächst galt es jedoch, eine mögliche Induktion von BAFF in Immunzellen und Nicht-Immunzellen vorab in vitro nachzuweisen und diese in Beziehung zu setzen mit dem bekannten Stimulus IFN-γ. Dazu wurden in der Zellkultur neutrophile Granulozyten, PBMC und Fibroblasten (HFF) für je 12 Stunden mit den beiden Interferonen in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert und am Folgetag die RNA extrahiert. Pro Versuch wurde jeweils eine Mediumkontrolle ohne Stimulation mitgeführt. Dabei bewirkte IFN-β in allen drei Versuchen eine deutlich stärkere Induktion von BAFF als IFN-γ (**Abb. 2a-c**). Ein Sättigungseffekt der BAFF-Induktion wurde für IFN-γ durchgehend bei 100 U/ ml ermittelt, wohingegen die maximale Stimulierbarkeit von BAFF durch IFN-β in neutrophilen Granulozyten etwas eher, in PBMC ebenfalls bei 100 U/ ml und in HFF bei 1000 U/ ml erreicht wurde. Auffällig war das empfindliche Ansprechen der neutrophilen Granulozyten. So betrug die maximale Expression von BAFF unter IFN-β mehr als das 100-fache gegenüber der Mediumkontrolle, in PBMC hingegen fand sich auf der Ebene der mRNA nur ein 18-facher Unterschied in der Transkription. Eine über 100-fache Differenz auf der Transkriptionsebene von BAFF konnte für IFN-β auch in den

Abbildung 2: IFN-β ist ein stärkerer Induktor von BAFF als IFN-γ in neutrophilen Granulozyten (A), PBMC (B), Fibroblasten (C) und Monozyten (D).
Neutrophile Granulozyten, PBMC und Fibroblasten wurden über Nacht mit aufsteigenden Konzentrationen von IFN-β und IFN-γ inkubiert **(A-C)**, Monozyten mit der aus **(B)** ermittelten Sättigungskonzentration von IFN-β und IFN-γ (100 IU/ ml) **(D)**. Die BAFF-Expression wurde mit der TaqMan-PCR bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der technischen Replikate


A Neutrophile
IFN-β
IFN-γ
300
200
100
0
Medium
0.1
1
10
100
1000
B PBMC
8
6
4
2
0
Medium
1
10
100
1000
BAFF (% GAPDH)
C Fibroblasten
4
3
2
1
0
Medium
0.1
1
10
100
1000
10000
IU/ ml
D Monozyten
60
40
20
0
Medium
IFN-β
IFN-γ

Fibroblasten beobachtet werden, allerdings lag die basale BAFF-Expression für diesen Zelltyp in einem kaum messbaren Bereich (0,0015 % GAPDH). Als Vorbereitung auf die ex vivo Untersuchungen an behandelten MS-Patienten war im Rahmen dieses Versuches auch die Frage zu klären, welche Mindestkonzentrationen an IFN vorliegen müssen, um eine Hochregulierung von BAFF in unserer Messanordnung erfassen zu können. Bereits Konzentrationen von unter 1 IU/ ml IFN reichten in den drei genannten Zellpopulationen aus, um deutliche Effekte auf die Regulation von BAFF zu registrieren. Ausgehend von dieser Dosis-Wirkungsbeziehung wurden in einem weiteren Experiment aus einem Buffy Coat isolierte Monozyten über Nacht mit der für PBMC ermittelten Sättigungskonzentration von je 100 IU/ ml IFN-β und IFN-γ stimuliert. Auch hier führte IFN-β wieder zu einer deutlich stärkeren BAFF-Induktion als IFN-γ (**Abb. 2d**).

3.1.2 Die BAFF-Rezeptoren werden nicht durch IFN-β und IFN-γ reguliert

Der Nachweis einer Hochregulierung von BAFF unter Einfluss von Interferonen warf nun die Frage auf, ob diese auch zu einer Änderung der Expression der drei BAFF-Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA führen. Neutrophile Granulozyten und PBMC eines gesunden Spenders wurden in der Zellkultur über 16 Stunden mit IFN-β und IFN-γ in einer Konzentration von je 1000 IU/ ml stimuliert und dann die RNA gewonnen. Während sich in diesem Versuch wieder das bekannte Bild einer stärkeren Induktion von BAFF durch IFN-β als durch IFN-γ demonstrieren ließ (**Abb. 3a+b**), offenbarte sich weder für neutrophile Granulozyten noch für PBMC ein eindeutiges Bild einer Regulation der Rezeptoren von BAFF nach Gabe der beiden Interferone (**Abb. 3c-h**). Während in den PBMC für alle drei Rezeptoren eine deutliche Expression sichtbar war mit BAFF-R > TACI > BCMA, fand sich in den neutrophilen Granulozyten für BAFF-R (bis 4 % GAPDH) und TACI (bis 2 % GAPDH) eine schwache, für BCMA (bis 0,01 % GAPDH) eine kaum nachweisbare Gentranskription. Keine Expression dieser Rezeptoren konnte in Fibroblasten gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Aus Vollblut-RNA gesunder Kontrollen sowie MS-Patienten mit und ohne IFN-Behandlung konnten die

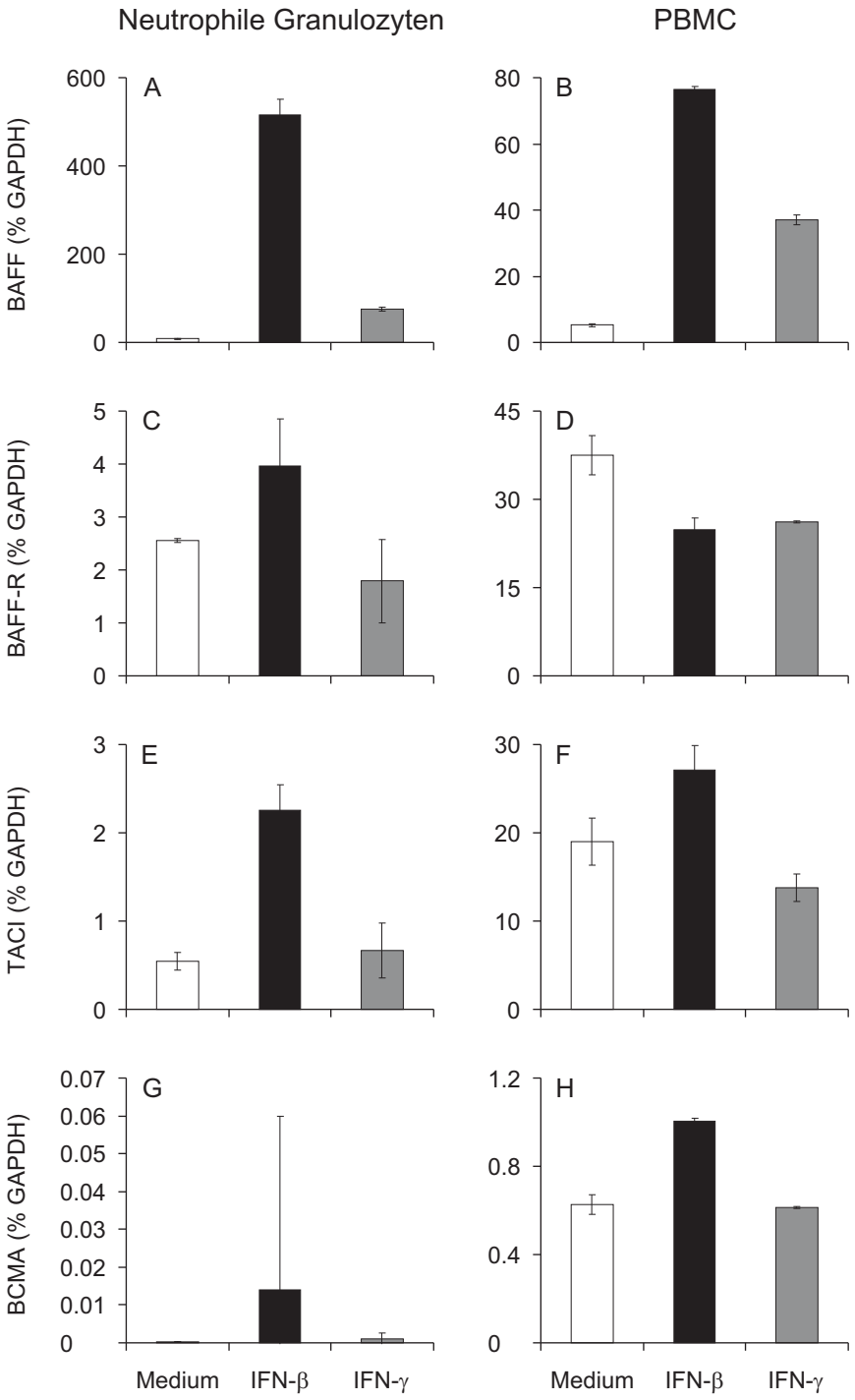


Abbildung 3: BAFF-Rezeptoren werden nicht durch IFN-β und IFN-γ reguliert. Neutrophile Granulozyten und PBMC eines gesunden Spenders wurden über 16 Stunden stimuliert mit je 1000 IU/ ml IFN-β und IFN-γ, die Expression von BAFF **(A+B)** sowie der drei BAFF-Rezeptoren **(C-H)** in der TaqMan-PCR bestimmt. Während IFN-β wieder zu einer stärkeren BAFF-Induktion führte als IFN-γ **(A+B)**, ließ sich keine klare Regulation der drei BAFF-Rezeptoren durch die beiden Interferone erkennen **(C-H)**. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der technischen Replikate.

Transkripte der BAFF-Rezeptoren zwar ebenfalls registriert werden, waren jedoch unabhängig von Erkrankung und IFN-Behandlung (Daten nicht gezeigt).

3.2 Etablierung einer quantitativen PCR für BAFF und MxA als ex vivo Testsystem

Vor Beginn der ex vivo Analyse der Transkription von BAFF und MxA in MS-Patienten und gesunden Kontrollen galt es zunächst, einen Assay zu entwickeln, der die Kriterien Effizienz und Stabilität bei gleichzeitig einfacher Probengewinnung und –verarbeitung erfüllt.

3.2.1 Die PCR verläuft mit hoher Effizienz

Zu Beginn dieser Arbeit lag eine etablierte quantitative PCR für BAFF bereits vor. Ergänzend und analog dazu wurde nun die quantitative PCR für den Biomarker MxA entwickelt mit dem Ziel, in MS-Patienten ein biologisches Ansprechen auf die Therapie mit IFN-β definieren zu können. Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer hundertprozentigen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Sie kann daher mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$(1) \qquad Y = X\,(1 + E)^n$$

Dabei ist Y die Menge an hergestelltem Amplifikat, X die Startkopienzahl zu Beginn der PCR, E die Effizienz der Reaktion und n die Anzahl der PCR Zyklen. Da eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung besteht zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an RNA und dem C_T, kann durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den C_T eine Standardkurve hergestellt werden. Die Funktion dieser Kurve ergibt sich durch Logarithmieren von Gleichung (1). Aus der Steigung s der Geraden leitet sich durch weiteres Umformen die Formel zur Berechnung der Effizienz her:

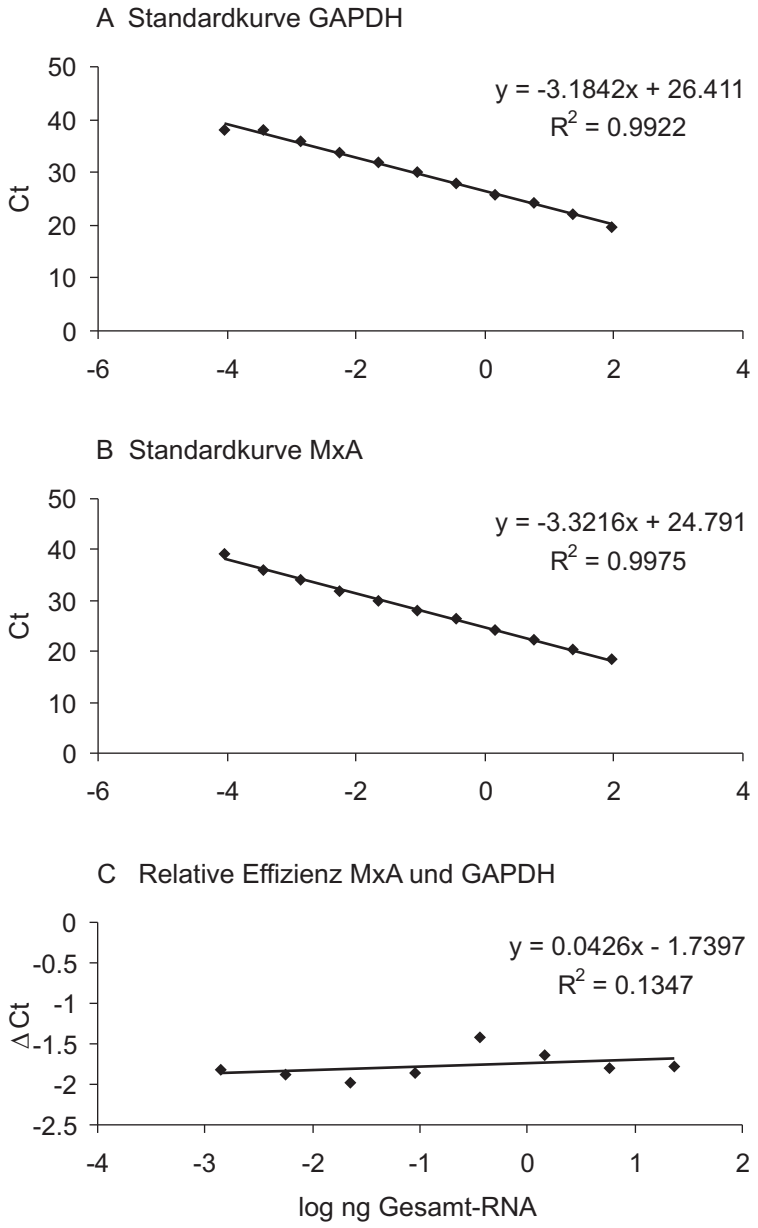


Abbildung 4: Die quantitative MxA-PCR läuft effizient.

Aus cDNA von HFF-Zellen, welche zuvor über Nacht mit 2000 IU/ ml IFN-β stimuliert wurden, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Standardkurven für GAPDH **(A)** und MxA **(B)** ergeben sich aus dem Auftragen des Logarithmus der Menge eingesetzter cDNA gegen den in der TaqMan-PCR erreichten Ct-Wert. Aus der Steigung der Geradengleichungen kann eine nahezu hundertprozentige Effizienz der PCR-Reaktion ermittelt werden. Die Differenz der Ct-Werte und damit die relative Effizienz zwischen den beiden PCR-Reaktionen von MxA und GAPDH ist für einen Ct-Wertebereich von 20 bis 34 unabhängig von der eingesetzten cDNA-Menge **(C)**.

$$(2) \qquad E = 10^{(-1/s)} - 1$$

Nach diesem Prinzip wurden nun parallel eine Standardkurve sowohl für MxA als auch GAPDH erstellt. Als Ausgangsmaterial diente jeweils cDNA aus HFF-Zellen, die über Nacht mit 2000 IU/ ml IFN-β stimuliert worden waren. Ausgehend von einer Startkonzentration von 9,32 ng/ µl bezogen auf die in der Reversen Transkription eingesetzte RNA-Menge wurde die cDNA in zehn aufeinander folgenden Schritten jeweils 1:4 verdünnt. **Abb. 4a+b** stellen die gegen den Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge aufgetragenen C_T-Werte einschließlich der dazugehörigen Geradengleichungen dar. Aus Gleichung (2) ergibt sich sowohl für MxA als auch für GAPDH eine annähernd hundertprozentige Effizienz der PCR. Als nächstes wurde über den Vergleich des ΔC_T bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrizen die relative Effizienz von der Zielsequenz MxA und der Referenz GAPDH bestimmt (**Abb. 4c**). Sind die Effizienzen für beide Amplikons ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden 0. Nach dem Handbuch von Applied Biosystems wird dabei ein absoluter Wert der Steigung des Graphen von unter 0,1 gefordert. Diese Bedingung wird erfüllt, wenn aus der Verdünnungsreihe alle Werte mit Ausnahme der sehr hohen Startkonzentration und der letzten beiden sehr starken Verdünnungen berücksichtigt werden. Diesem Konzentrationsbereich, in dem also eine sichere relative Effizienz von MxA und GAPDH erreicht wird, stehen C_T-Werte für MxA zwischen 20 und 34 gegenüber.

3.2.2 Die PCR liefert reproduzierbare Messergebnisse

Die quantitative PCR kann als Analysemethode der ex vivo Gentranskription nur sinnvoll eingesetzt werden, wenn sie in unabhängigen Versuchen zu wiederholbaren Messergebnissen führt, denn die Zahl der zu untersuchenden Proben erforderte den Einsatz zahlreicher Mikrotiterplatten. Um den damit einhergehenden zufällligen Fehler kontrollieren zu können, wurde in jeder PCR-Reaktion eine Standardkontrolle mitgeführt. Als Material für diese Kontrolle diente die in Abschnitt 3.2.1 erwähnte cDNA aus den mit IFN-β stimulierten Fibroblasten. Diese wurde zu diesem Zweck auf eine einheitliche Konzentration von 0,5 ng/ µl verdünnt, um eine ausreichende Menge an Aliquots für

künftige Versuche zur Verfügung zu haben. In **Abb. 5a + b** sind die Analyseergebnisse der Transkripte von BAFF und MxA für jede einzelne Mikrotiterplatte dargestellt. Der Variationskoeffizient beträgt für BAFF 12,4 %, für MxA 14,8 %. In absteigender und aufsteigender Tendenz finden sich sowohl für BAFF als auch MxA maximal vier aufeinander folgende Werte. Für BAFF lassen sich bis zu vier, für MxA bis zu fünf aufeinander folgende Messpunkte über oder unter dem Mittelwert identifizieren. Somit zeigt sich im Verlauf kein Trend zu höheren oder niedrigeren Werten.

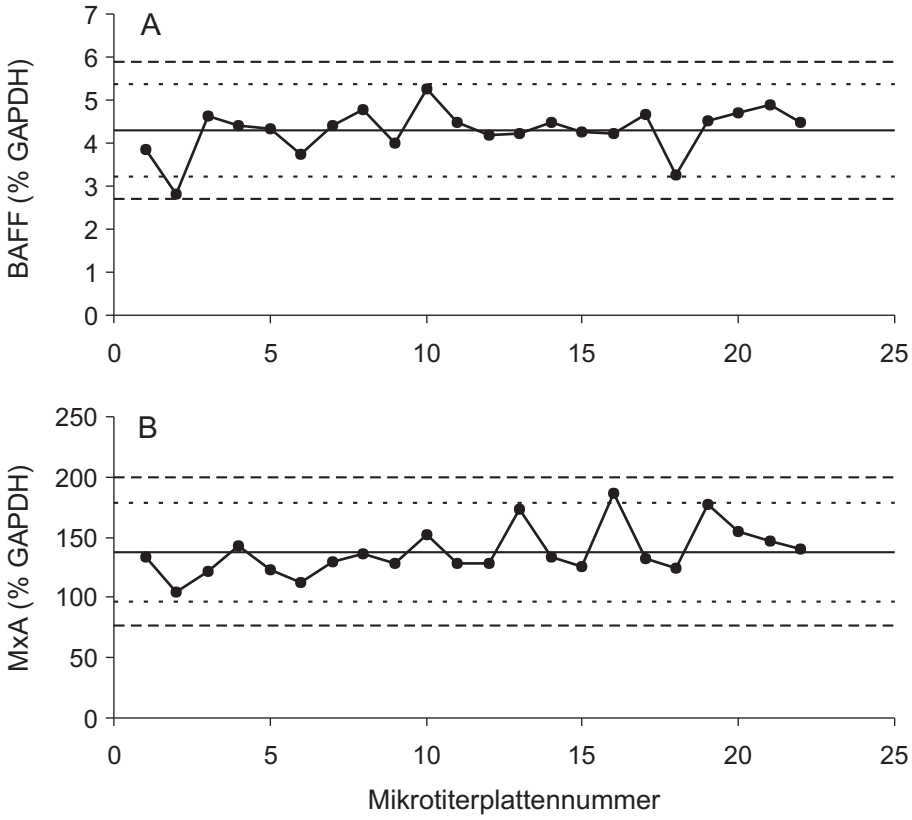


Abbildung 5: Die quantitative PCR für BAFF (A) und MxA (B) liefert wiederholbare Ergebnisse.

Pro Mikrotiterplatte wurde jeweils cDNA aus HFF-Zellen (stimuliert mit 2000 IU/ ml IFN-β) als Standardkontrolle mitgeführt. Jeder Punkt der Abbildung entspricht einer Mikrotiterplatte. Die durchgezogenen Linien zeigen die Mittelwerte, die inneren gestrichelten +/- 2 Standardabweichungen, die äußeren gestrichelten Linien +/- 3 Standardabweichungen.

3.2.3 Vollblutproben müssen nicht sofort weiterverarbeitet werden

Nach der erfolgreichen Etablierung der MxA-PCR bestand nun die Aufgabe darin, die Durchführung dieses Tests für eine Anwendung im klinischen Alltag zu optimieren. Diesbezüglich ist es insbesondere wertvoll, wenn Proben nicht sofort weiterverarbeitet werden müssen, sondern zunächst eingefroren oder sogar eine bestimmte Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden können. So wurde in der folgenden Untersuchung überprüft, ob das PAXgene™ Blood RNA-System mit integriertem RNA-Stabilisator das Gentranskriptionsprofil von MxA und BAFF zu stabilisieren vermag. Als Blutspenderin stellte sich eine mit Betaferon behandelte MS-Patientin zur Verfügung, deren biologisches Ansprechen auf die Immunmodulation bereits zuvor in einer MxA-PCR bestätigt worden war. Zeitgleich wurden 12 Stunden nach der letzten Darreichung von Betaferon ein EDTA-Röhrchen sowie fünf PAXgene™ Blood RNA-Röhrchen entnommen. Am Tag der Blutentnahme wurde aus dem EDTA-Blut mit dem QIAamp® RNA Blood Mini Kit (ohne RNA-Stabilisator) sowie aus einem der fünf PAXgene™-Röhrchen Vollblut-RNA hergestellt. Drei weitere PAXgene™-Röhrchen wurden bei Raumtemeratur gelagert und an den Tagen 1, 3 und 6 nach der Blutentnahme RNA extrahiert. Das fünfte PAXgene™-Röhrchen wurde schließlich bei -80 °C eingefroren und nach einigen Tagen daraus ebenfalls RNA gewonnen. Dabei ließen sich für MxA keine relevanten Unterschiede zwischen der RNA-Präparation aus EDTA-Blut, den unterschiedlich lang bei Raumtemperatur gelagerten sowie dem eingefrorenen PAXgene™-Röhrchen erkennen (**Abb. 6a**). Was das mRNA Transkriptionsprofil von BAFF betrifft, so führten die Messungen von RNA aus dem QIAamp®-System sowie aus der eingefrorenen PAXgene™-Probe zu sehr ähnlichen Ergebnissen, wohingegen die bei Raumtemperatur gelagerten PAXgene™-Röhrchen etwas niedrigere Messwerte für die BAFF-Expression aufwiesen (**Abb. 6b**). Ein direkter Vergleich zwischen dem PAXgene™ Blood RNA Kit und dem QIAamp® RNA Blood Mini Kit als den beiden Verfahren mit und ohne RNA-Stabilisator zur Gewinnung von Vollblut-RNA wurde nun an vier weiteren Spendern vorgenommen. Darunter befanden sich ein mit Rebif 44 behandelter MS-Patient sowie drei gesunde Kontrollen. Dabei lieferte das PAXgene™ Blood RNA-Kit gegenüber dem QIAamp® RNA-System für MxA leicht höhere, für

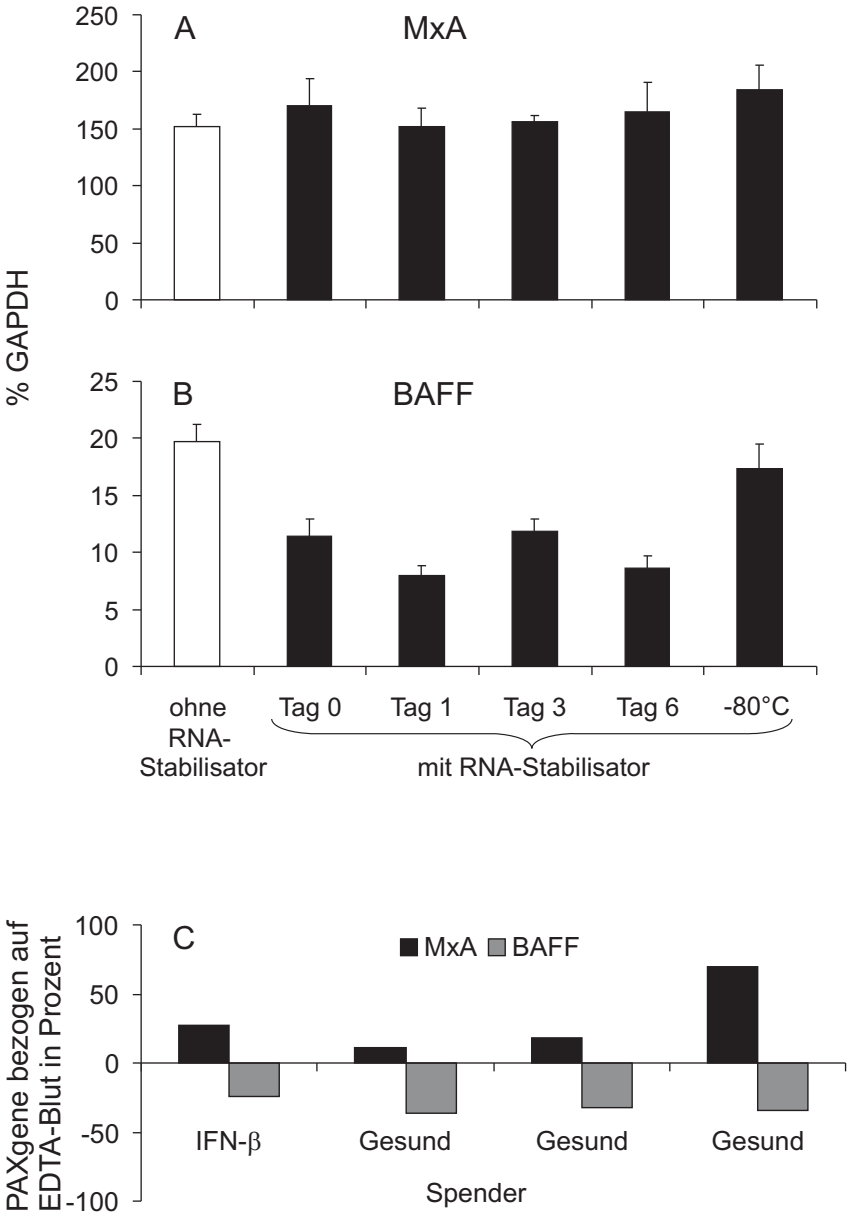


Abbildung 6: Stabilisierung der RNA-Transkripte bei Raumtemperatur und bei -80 °C mit dem PAXgene™-System.

Aus Vollblut einer auf IFN-β eingestellten MS-Patientin wurde RNA ohne (QIAamp® RNA Blood Mini Kit, weiße Säulen links) und mit RNA-Stabilisator (PAXgene™-System, schwarze Säulen) gewonnen und die Transkripte MxA **(A)** und BAFF **(B)** mit der TaqMan-PCR bestimmt. Proben mit RNA-Stabilisator wurden bis zu 6 Tage bei Raumtemperatur gelagert (Mitte) oder bei -80 °C eingefroren (rechts). In **(C)** wurde anhand vier weiterer Spender das PAXgene™-System mit EDTA-Blut (QIAamp® RNA Blood Mini Kit) verglichen, darunter ein Patient unter Behandlung mit IFN-β (links) sowie drei gesunde Kontrollen (rechts). Die Messwerte aus dem PAXgene™-System wurden dabei prozentual auf die Werte aus EDTA-Blut (QIAamp® RNA Blood Mini Kit) bezogen. Alle fünf Spender einbezogen werden insgesamt im PAXgene™-System mit RNA Stabilisator gegenüber dem QIAamp® RNA Blood Mini Kit ohne Stabilisator für MxA leicht höhere, für BAFF leicht niedrigere Messwerte erreicht.

BAFF leicht niedrigere Werte (**Abb. 6c**). An einem größeren Kollektiv konnte jedoch mit dem t-Test getrennt nach den drei Gruppen MS-Patienten mit IFN-Behandlung, MS-Patienten ohne Immunmodulation und gesunden Spendern weder für MxA noch BAFF ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Präparationsmethoden für Vollblut-RNA aufgedeckt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Kinetik der BAFF- und MxA-Induktion nach IFN-Gabe

Um vor der Untersuchung der biologischen Effekte einer Behandlung mit IFN-β an einer größeren Zahl von Patienten das Blut zu einem möglichst günstigen Zeitpunkt abnehmen zu können, war es notwendig, Informationen über den Zeitverlauf der BAFF-Induktion zu gewinnen. Diese Kinetikversuche wurden zunächst in vitro, dann ex vivo anhand von drei Patienten durchgeführt.

3.3.1 In vitro erreichen die BAFF-Transkripte nach 13 Stunden ein Maximum

Neutrophile Granulozyten und PBMC eines gesunden Spenders wurden mit je 100 IU/ ml IFN-β und IFN-γ stimuliert und im Intervall von mehreren Stunden geerntet. Darüber hinaus wurde bei einem Teil der Zellen das Medium eine Stunde nach Stimulation gewechselt, um die hinzu gegebenen Stimuli auszuwaschen. In **Abb. 7a+b** ist das durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Auf diese Art sollte dieses in vitro Modell noch näher an die Situation in vivo angepasst werden, denn aus dem Körper des Patienten wird das Medikament nach erfolgter Gabe nach und nach wieder entfernt. Dabei standen die beiden Versuchsvarianten mit und ohne Austausch des Mediums für die Extreme einer sehr raschen und einer fehlenden Elimination des Medikamentes aus der Zirkulation. Schließlich wurde zum Zeitpunkt Null und in der Folge für jeden Messpunkt eine Kontrolle ohne Stimulation mitgeführt. Sowohl in den neutrophilen Granulozyten als auch in den PBMC erfolgte unter Einfluss der beiden Interferone zunächst ein steiler Anstieg der Expression von BAFF mit Beginn bereits nach weniger als drei und einem

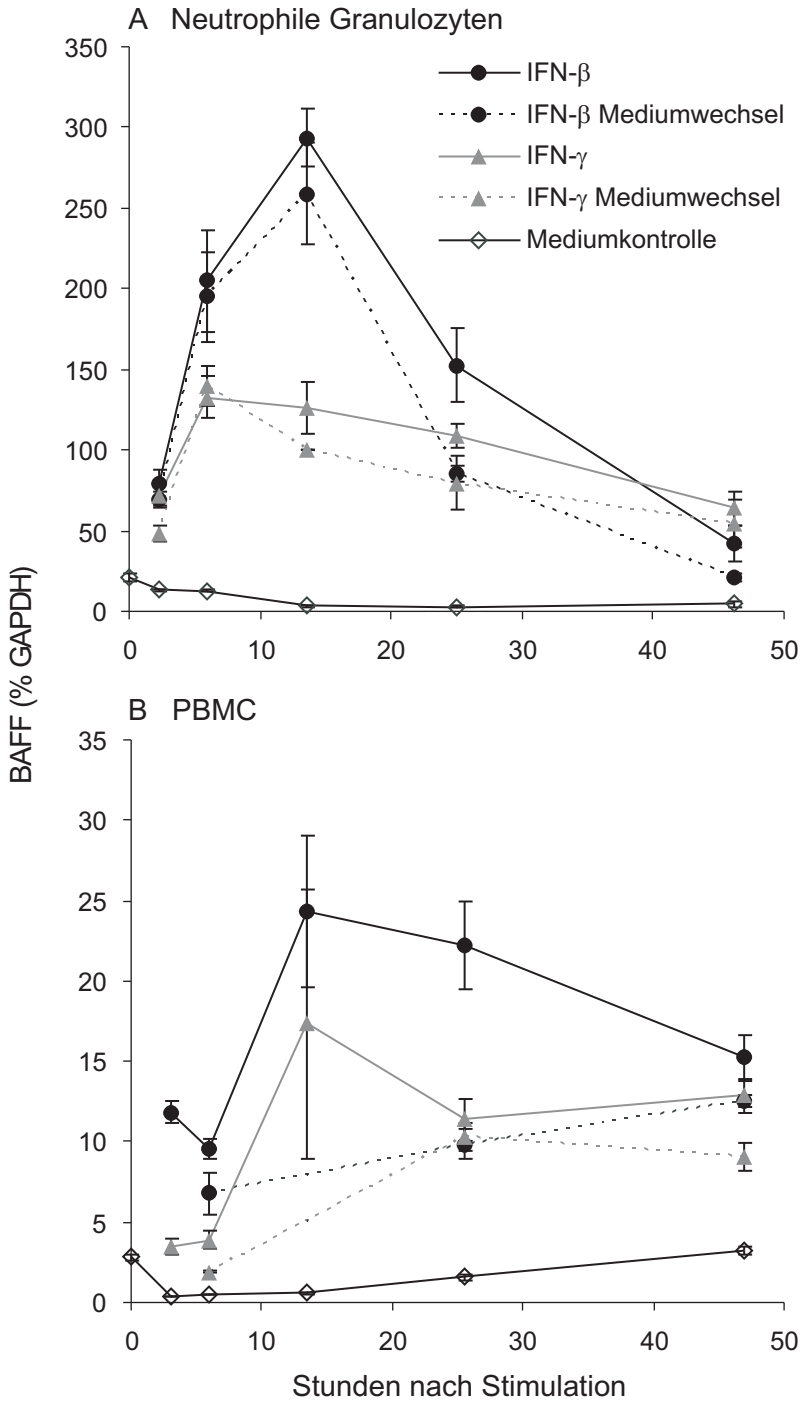


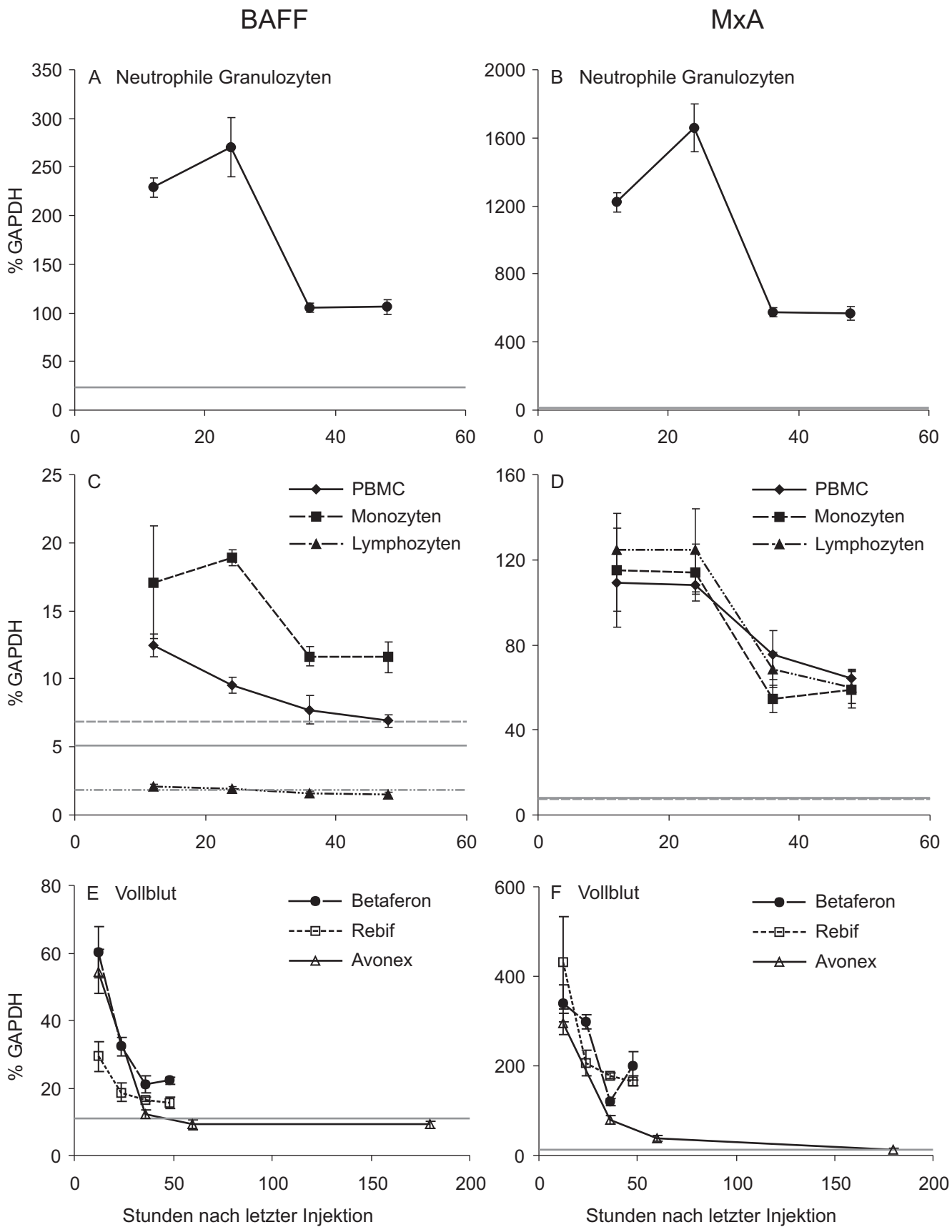
Abbildung 7: Maximum der BAFF-Transkripte 13 h nach Stimulation *in vitro*. Neutrophile Granulozyten **(A)** und PBMC **(B)** eines gesunden Spenders wurden mit je 100 IU/ ml IFN-β und IFN-γ stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, die Transkripte in der TaqMan-PCR gemessen. Zusätzlich wurde z. T. das Medium 1 h nach Stimulation gewechselt zur Eliminierung des Induktors (gestrichelte Linien). Sowohl in neutrophilen Granulozyten **(A)** als auch PBMC **(B)** wurden die höchsten BAFF-Transkripte nach 13 h erreicht und waren nach 48 h noch deutlich gegenüber der Mediumkontrolle erhöht. IFN-β war auch hier wieder ein stärkerer BAFF-Induktor als IFN-γ. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der technischen Replikate.

Maximum nach 13 Stunden, um schließlich langsam auf Werte abzufallen, die nach 48 Stunden aber immer noch deutlich über denen der unstimulierten Kontrollen lagen (**Abb. 7a+b**). Für die gewaschenen Zellen ergab sich ein fast deckungsgleicher Verlauf, allerdings lagen hier die Werte für die Expression von BAFF geringfügig unter denen jener Zellen, die über den gesamten Versuchzeitraum dem Stimulus ausgesetzt waren. Für die PBMC genügte die Zellzahl nicht, um jedem Zeitpunkt eine gewaschene Zellpopulation gegenüberzustellen. Auch in diesem Versuch konnte zu allen Zeitpunkten unter IFN-β eine deutlich stärker ausgeprägte BAFF-Induktion als unter IFN-γ festgestellt werden.

3.3.2 Ex vivo verlaufen die Induktion von BAFF und MxA zeitlich parallel

Ex vivo wurde nun der Zeitverlauf einer möglichen Induktion von BAFF anhand von drei Patienten untersucht, von denen je einer auf Betaferon (IFN-β1b; 8 IU jeden 2. Tag s. c.), Rebif (IFN-β1a; dreimal wöchentlich 22 µg s. c.) und Avonex (IFN-β1a, 6 Mio. IU einmal wöchentlich i. m.) eingestellt war. Verteilt über das Intervall von zwei Injektionen wurden von den Probanden Blutproben zu vier aufeinander folgenden Zeitpunkten gewonnen: Für Betaferon und Rebif jeweils 12, 24, 36 und 48 Stunden, für Avonex 12, 36, 60 und 180 Stunden nach der letzten Injektion. Aus dem Blut der mit Betaferon behandelten Patientin wurde zu jedem der vier Zeitpunkte RNA aus neutrophilen Granulozyten, PBMC, Monozyten, Lymphozyten und Vollblut aufgereinigt. Bei den beiden Patienten, die auf Rebif bzw. Avonex eingestellt waren, beschränkte sich die Untersuchung auf Vollblut-RNA. Zusätzlich zu BAFF wurde in diesen Versuchsreihen auch die Expression des Biomarkers MxA bestimmt. In sämtlichen Versuchen fiel das parallele zeitliche Verlaufsmuster der Induktion von BAFF und MxA auf (**Abb. 8a-f**). In

Abbildung 8: Zeitlich paralleler Verlauf der BAFF- und MxA-Induktion *ex vivo*.
An insgesamt 3 MS-Patienten, davon je einer unter Behandlung mit Betaferon **(A-F)**, Rebif 22 **(E+F)** und Avonex **(E+F)**, wurde die Kinetik einer möglichen BAFF- und MxA-Induktion ex vivo zwischen zwei Gaben von IFN-β untersucht. Während in allen drei Spendern die Transkripte aus Vollblut-RNA bestimmt wurden **(E+F)**, wurden von der mit Betaferon behandelten Spenderin zusätzlich einzelne Immuzellsubtypen analysiert **(A-D)**. Die Mediane aus gesunden Kontrollen und unbehandelten MS-Patienten sind jeweils als graue waagrechte Linien eingezeichnet. Die Messung der Transkripte erfolgte in der TaqMan-PCR, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der technischen Replikate.

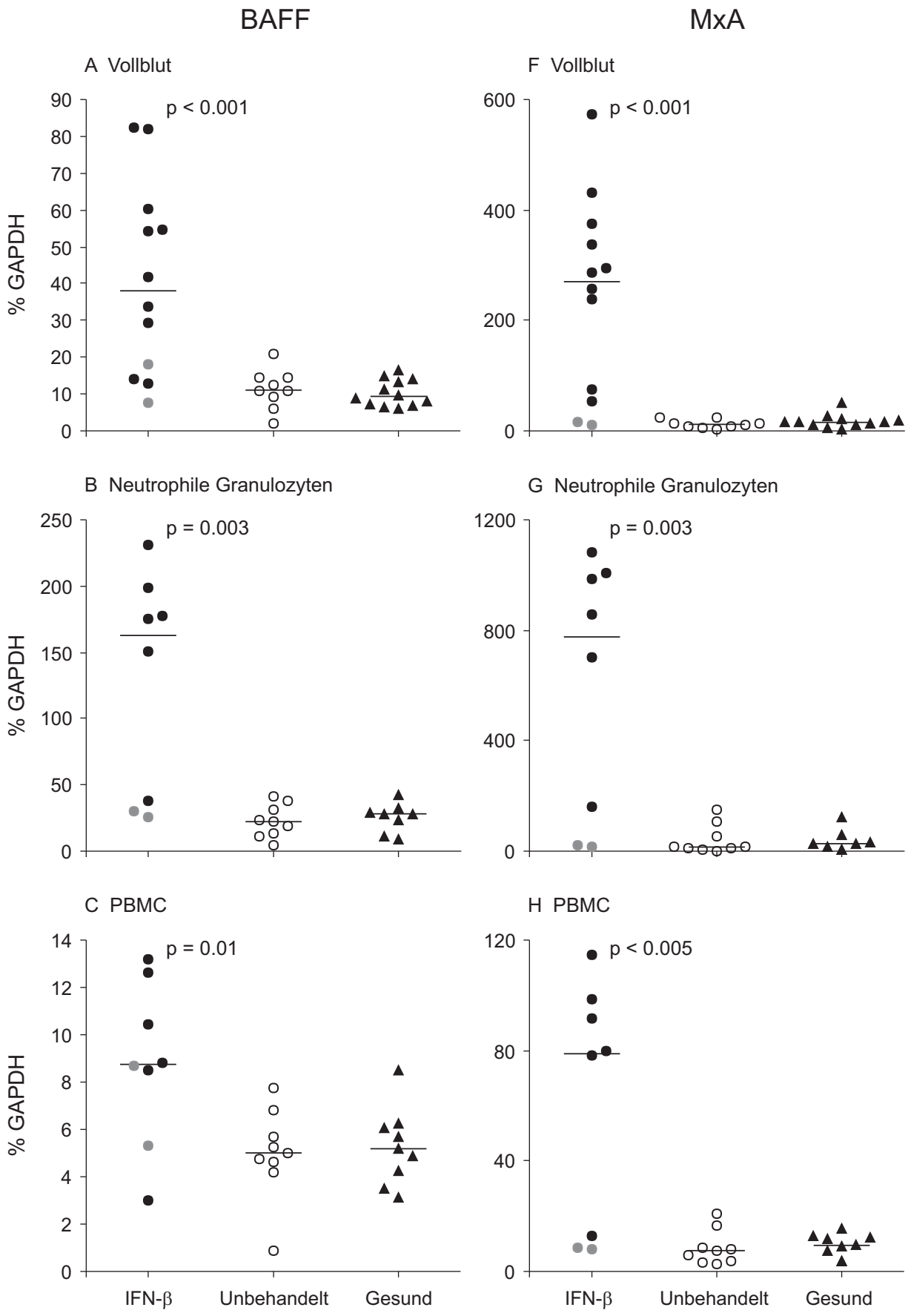

BAFF
MxA
A Neutrophile Granulozyten
B Neutrophile Granulozyten
C
D
PBMC
Monozyten
Lymphozyten
E Vollblut
F Vollblut
Betaferon
Rebif
Avonex
% GAPDH
Stunden nach letzter Injektion

den nicht als klassische BAFF-Produzenten geltenden Lymphozyten der Patientin, die mit Betaferon behandelt wurde, war erwartungsgemäß keine Induktion von BAFF zu erkennen (**Abb. 8c**). Für die übrigen Zellpopulationen dieser Patientin stellte sich das folgende Bild dar: In den neutrophilen Granulozyten wurden die höchsten Werte der Induktion von BAFF und MxA nach 24 Stunden gesehen, wobei diese nur geringfügig über dem Wert 12 Stunden nach Injektion lagen. In den Monozyten wurden nach 12 und 24 Stunden für beide Gene jeweils ähnlich hohe Werte erreicht, für die PBMC galt das auch für MxA. Was die Induktion von BAFF in den PBMC betrifft, so zeigte sich dort ein Maximum nach 12 Stunden gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall. Ein ähnliches Verlaufsmuster ergab sich auch im Vollblut aller drei Spender: Sowohl für BAFF und MxA ließen sich die höchsten Expressionsniveaus bereits nach 12 Stunden beobachten. Dabei stimmen auch die Prozentwerte der BAFF Expression bezogen auf GAPDH zwischen den drei Präparaten gut überein, lediglich für Rebif lagen die maximalen Werte für BAFF etwa 50 Prozent unter denen, die für Betaferon und Avonex ermittelt wurden. Allerdings erhielt der genannte Patient Rebif 22 und nicht die maximale Dosierung Rebif 44. Für Betaferon und Rebif lagen in allen untersuchten Proben die Expressionswerte für BAFF und MxA nach 48 Stunden noch deutlich über den Werten unbehandelter MS-Patienten und gesunder Kontrollen. Die Mediane aus letzteren sind in den Abbildungen als gestrichelte Linien gekennzeichnet. Nach der Gabe von Avonex hingegen wurden nach 60 Stunden sowohl für BAFF als auch MxA wieder Werte erreicht, die denen des Kontrollkollektivs entsprachen.

3.4 Ex vivo Analyse der Regulation von BAFF und MxA in MS-Patienten mit und ohne Interferonbehandlung und in gesunden Kontrollen

3.4.1 Die Behandlung mit IFN-β induziert BAFF in MS-Patienten auf Transkript- und Proteinebene

Im ersten Teil der ex vivo Analyse stand die Frage im Vordergrund, ob sich die in vitro gefundene Induktion von BAFF durch IFN-β auch an einem größeren Kollektiv von MS-Patienten nachweisen lässt, die mit IFN-β behandelt werden. Dazu wurden MS-Patienten, welche eine Behandlung mit IFN-β erhielten, mit unbehandelten MS-Patienten sowie gesunden Kontrollen bezüglich der Expression von BAFF und MxA miteinander verglichen. In allen drei Gruppen erfolgte die Isolierung von RNA aus Vollblut sowie für die meisten Spender zusätzlich auch aus den folgenden gereinigten Immunzellen: Neutrophile Granulozyten, PBMC, Monozyten und Lymphozyten. Im Hinblick auf die Befunde aus den Kinetikversuchen wurde das Blut der behandelten Patienten jeweils innerhalb eines Intervalls von 12-24 Stunden nach der letzten Injektion abgenommen. Zunächst wurde jedoch überprüft, ob die Erkrankung MS selbst die Transkripte von BAFF und MxA beeinflusst. Für beide Gene konnten weder in Vollblut noch in den gereinigten Immunzellen statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen ermittelt werden. Daraufhin wurden diese beiden Spendergruppen für die folgende Analyse zusammengefasst und den mit IFN-β behandelten MS-Patienten gegenübergestellt. Dabei gelang der Nachweis einer deutlich erhöhten Transkription sowohl von BAFF als auch MxA in der Gruppe der mit IFN-β behandelten MS-Patienten gegenüber unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen (**Abb. 9a-j**). Dieser Unterschied erreichte für beide Gene sowohl für Vollblut also auch die gereinigten Immunzellen statistische Signifikanz. Lediglich innerhalb der Lymphozyten, die nicht zu den anerkannten BAFF-Produzenten gehören, wiesen behandelte Patienten erwartungsgemäß keine gegenüber unbehandelten MS-Patienten und Kontrollpersonen erhöhte Induktion von BAFF auf (**Abb. 9e**).


BAFF
MxA
A Vollblut
F Vollblut
p < 0.001
p < 0.001
% GAPDH
B Neutrophile Granulozyten
G Neutrophile Granulozyten
p = 0.003
p = 0.003
C PBMC
H PBMC
p = 0.01
p < 0.005
IFN-β
Unbehandelt
Gesund

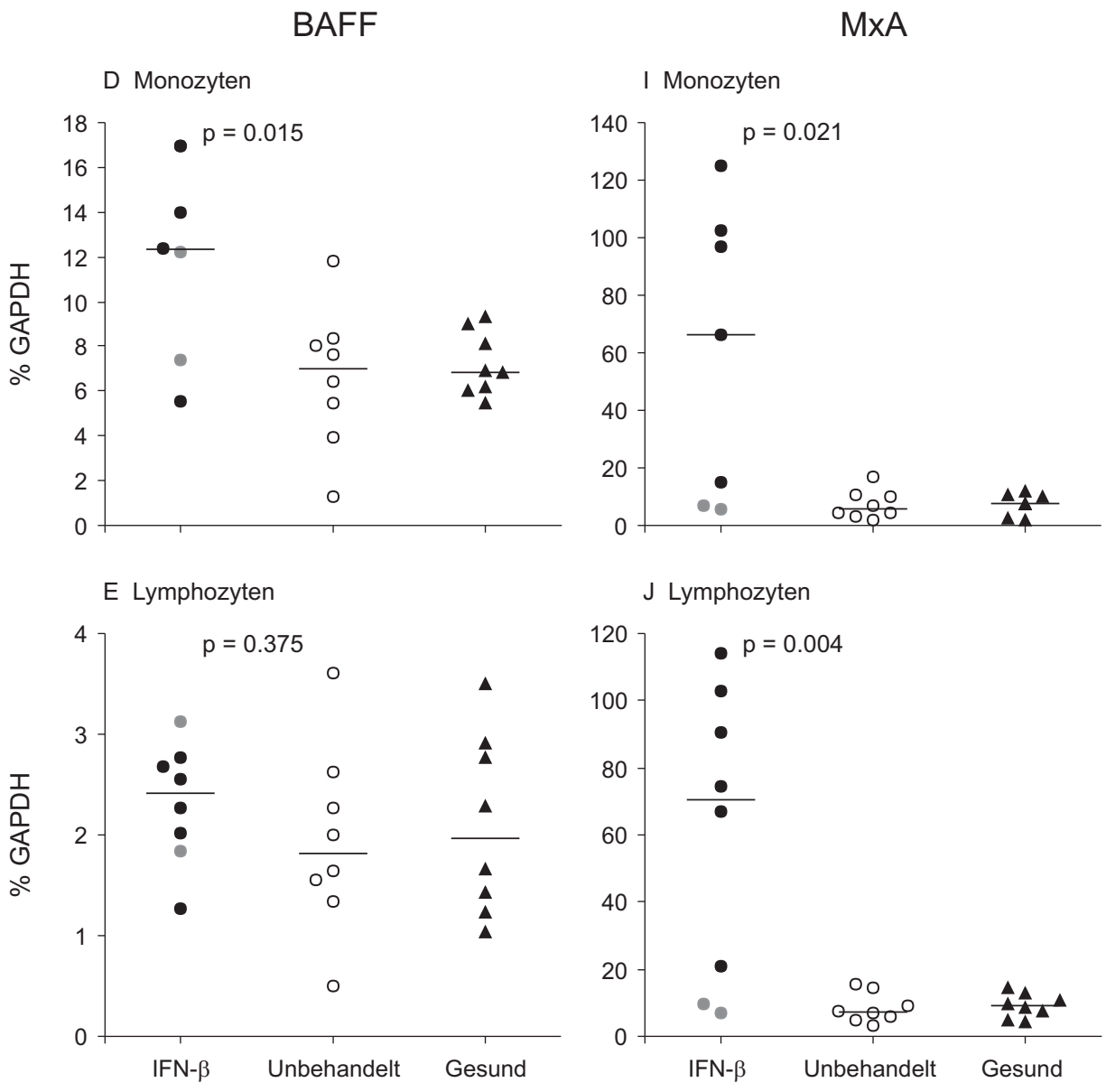


Abbildung 9: Erhöhte BAFF- und MxA-Transkripte unter Therapie mit IFN-β.
MS-Patienten unter Behandlung mit IFN-β mit Blutentnahme 12-24 h nach der letzten Injektion wurden mit der TaqMan-PCR bezüglich der BAFF- und MxA-Transkripte verglichen mit unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen. Zwischen unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich beider Transkripte. Dagegen fanden sich in MS-Patienten unter Behandlung mit IFN-β statistisch signifikant erhöhte BAFF- und MxA-Transkripte gegenüber dem Kollektiv aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen (Rangsummentest nach Mann-Whitney, p-Werte s. Abb.). Erwartungsgemäß fand sich in den Lymphozyten jedoch keine BAFF-Induktion **(E)**. Zwei Patienten mit hohen Titern neutralisierender Antikörper (grau gefüllte Punkte) wiesen BAFF- und MxA-Transkripte im Bereich unbehandelter MS-Patienten und gesunder Kontrollen auf. IFN-β: MS-Patienten unter Behandlung mit IFN-β; Unbehandelt: Unbehandelte MS-Patienten; Gesund: Gesunde Kontrollen. Waagrechte Linien: Mediane.

Nach dem Befund einer erhöhten Expression von BAFF auf Ebene der mRNA in behandelten MS-Patienten wurde nun untersucht, ob diese auch auf Proteinebene zu finden ist. Zur Erhöhung der Probenzahl wurde hierbei auf zahlreiche weitere Serumproben aus dem Klinikum Großhadern zurückgegriffen, welche im Rahmen einer gemeinsamen Publikation mit Frau Dr. Hoffmann und Herrn Dr. Krumbholz gesammelt wurden (Hoffmann et al., 2007). **Abb. 10** zeigt innerhalb der biologischen Responder auf IFN-β eine um den Faktor 1,5 erhöhte BAFF-Serumkonzentration gegenüber dem Kollektiv aus biologischen Nonrespondern, unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen. Im Einklang mit den Befunden auf Transkriptebene fand sich auch in den BAFF-Serumkonzentrationen kein Unterschied zwischen unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.

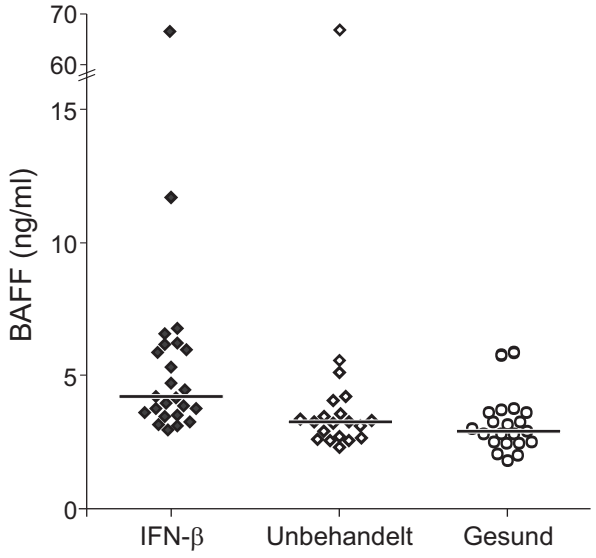


Abbildung 10: Erhöhte BAFF-Serumspiegel in biologischen Respondern auf IFN-β.
Aus einem Kollektiv von Spendern der vorliegenden Arbeit sowie weiterer, für eine gemeinsame Publikation mit Frau Dr. Hoffmann und Herrn Dr. Krumbholz gesammelten Proben (Hoffmann et al., 2007) wurden im ELISA die BAFF-Konzentrationen im Serum bestimmt. Während kein Unterschied in den Serumspiegeln zwischen unbehandelten MS-Patienten (Unbehandelt) und gesunden Kontrollpersonen (Gesund) gefunden werden konnte, zeigte sich in biologischen Respondern auf IFN-β (IFN-β) gegenüber dem Kollektiv aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen statistisch-signifikant erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen ($p < 0{,}001$; Rangsummentest nach Mann-Whitney). Waagrechte Linien: Mediane.

3.4.2 Hohe Titer neutralisierender Antikörper heben die Induktion von BAFF und MxA auf

Innerhalb der Gruppe der behandelten MS-Patienten wiesen einige wenige sehr niedrige Transkripte sowohl für BAFF als auch MxA auf, die sich im Bereich unbehandelter MS-Patienten und gesunder Kontrollen bewegten (**Abb. 9**). Die sich anschließende Bestimmung neutralisierender Antikörper im Serum identifizierte unter den mit IFN-β behandelten Spendern zwei mit hoch positivem sowie einen mit niedrigem Antikörperstatus. Von den beiden erstgenannten Patienten erhielten einer Rebif 44, der andere sowie die Patientin mit niedrigen Antikörpern jeweils Betaferon. Interessanterweise konnten in sämtlichen Messungen der MxA-Transkripte die beiden niedrigsten Werte den zwei Patienten mit hoch positivem Antikörpertiter zugeordnet werden (grau gefüllte Punkte in **Abb. 9**). Auch für BAFF zeigten diese Patienten niedrige Expressionsniveaus, wie sie auch in der Kontrollgruppe erreicht wurden. In den neutrophilen Granulozyten stellten sie sogar wie für MxA die beiden niedrigsten Werte dar, die unter allen behandelten Patienten gemessenen wurden. Die Patientin mit niedrigem Antikörperstatus hingegen wies sowohl für BAFF und MxA eine hohe Expression auf, wie sie auch bei anderen biologischen Respondern gefunden wurde.

3.4.3 Die PCR liefert auch ohne vorherige Separation von Immunzellsubtypen eine hohe Sensitivität für ein Biomonitoring

Für ein effektives Biomonitoring sollte das eingesetzte Testsystem möglichst große Differenzen zwischen Ziel- und Kontrollgruppe aufdecken. Dabei spielt neben der Frage des geeigneten Biomarkers insbesondere auch das verwendete Ausgangsmaterial eine entscheidende Rolle. Für die Umsetzung der quantitativen PCR in die Klinik galt es nun konkret zu klären, ob über die aufwändige Aufreinigung von Immunzellen eine Steigerung der Sensititvität gegenüber der Verwendung von Vollblut-RNA erreicht werden kann. Dazu wurden aus den Medianen der BAFF- und MxA-Transkripte (waagrechte Linien in **Abb. 9**) jeweils die Quotienten gebildet aus den beiden Gruppen MS-Patienten mit IFN-Behandlung und dem Kollektiv bestehend aus MS-Patienten ohne

IFN-Behandlung und gesunden Kontrollen. Betrachtet man zunächst BAFF, so fällt auf, dass mit neutrophilen Granulozyten (Quotient von 6,8) und Vollblut (Quotient von 3,5) eine besonders deutliche Unterscheidung zwischen den beiden Kollektiven gelingt. Die Trennung von Monozyten erfolgte in der Vermutung, ohne die Lymphozyten deutlichere Unterschiede in der BAFF-Expression erkennen zu können als innerhalb der PBMC. Diese Separierung der Monozyten vermochte den Quotienten der Mediane zwischen den beiden Vergleichskollektiven gegenüber den PBMC jedoch nur von 1,7 auf 1,8 zu steigern. Allerdings ging aufgrund eines Pipettierfehlers die Monozyten-RNA eines behandelten Spenders verloren, der in den übrigen Zellpopulationen eine deutliche BAFF-Induktion zeigte. Für MxA ergab sich das folgende Bild: Für die neutrophilen Granulozyten lag der Median der MxA-Transkripte der behandelten MS-Patienten 50-fach über dem gemeinsamen Median aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen. Im Vollblut konnte diesbezüglich ein über 20-facher Unterschied festgestellt werden, PBMC, Monozyten und Lymphozyten waren mit Quotienten knapp unter 10 etwas weniger sensitiv. Somit deckten wie für BAFF auch für MxA die neutrophilen Granulozyten und Vollblut die größten Unterschiede auf. Im direkten Vergleich scheint aufgrund der jeweils höheren Quotienten der Biomarker MxA eine insgesamt höhere Sensitivität zu liefern als BAFF.

3.4.4 Zwischen der Induktion von BAFF und dem Biomarker MxA besteht eine starke Korrelation

Auffallenderweise traten in **Abb. 9** erhöhte Werte für BAFF nur innerhalb der Gruppe der behandelten Patienten auf. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen einer gesteigerten BAFF-Induktion und einem biologischen Ansprechen auf die Therapie mit IFN-β. Dazu wurden in gereinigten Immunzellen behandelter MS-Patienten parallel die Induktion von BAFF und dem für Typ-I-Interferone spezifischen Biomarker MxA bestimmt und in **Abb. 11** gegeneinander aufgetragen. Bewusst eingeschlossen wurden in diesen Versuch zusätzlich solche

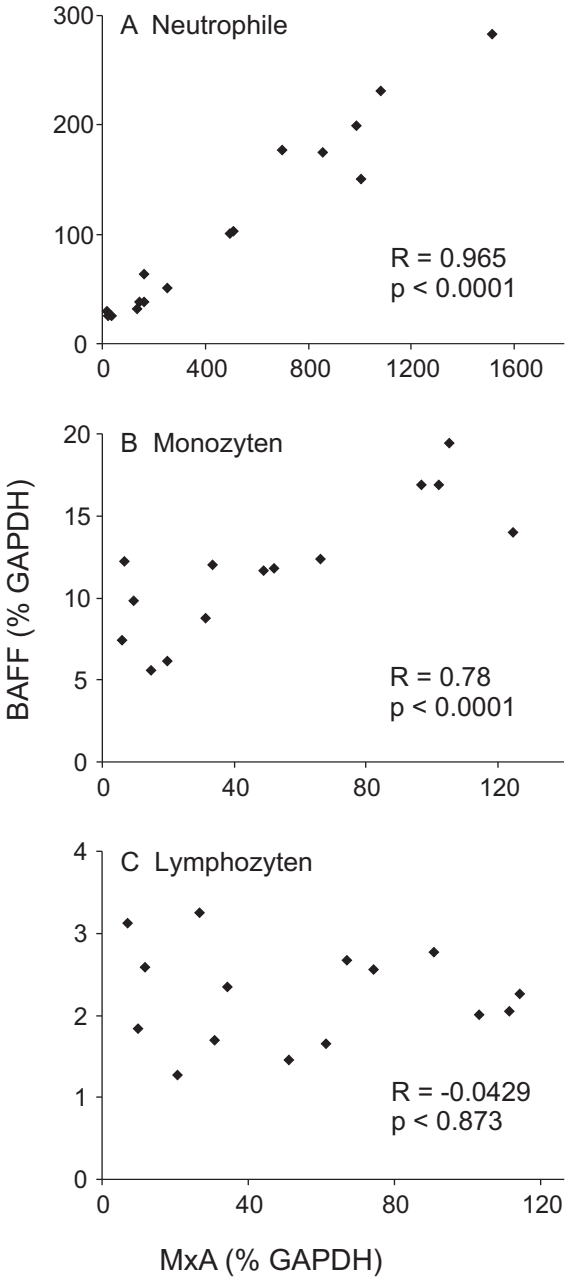


Abbildung 11: Starke Korrelation zwischen der Induktion von BAFF und dem Biomarker MxA in Neutrophilen und Monozyten behandelter MS-Patienten.
Aus neutrophilen Granulozyten **(A)**, Monozyten **(B)** und Lymphozyten **(C)** von MS-Patienten unter Behandlung mit IFN-β wurden im gesamten Intervall zwischen zwei Injektionen mit der TaqMan-PCR die Transkripte von BAFF und MxA bestimmt. Der Biomarker MxA wurde in allen Zelltypen induziert. Die BAFF-Transkripte korrelierten stark und statistisch signifikant mit MxA in zur BAFF-Synthese befähigten Zellen (Neutrophile und Monozyten; **A+B**), nicht jedoch in Lymphozyten **(C)**. Korrelationskoeffizient nach Spearman.

Blutproben, die länger als 24 Stunden nach Gabe des Medikaments abgenommen wurden. Auf diese Art konnte die gesamte Zeitspanne zwischen zwei Injektionen abgedeckt werden. **Abb. 11a+b** zeigen eine sehr starke und statistisch signifikante ($p < 0,001$) Korrelation zwischen der Expression von BAFF und MxA, die in neutrophilen Granulozyten ($r = 0.965$) noch ausgeprägter war als in Monozyten ($r = 0,78$). Beide genannten Zelltypen gelten als klassische Produzenten von BAFF im Gegensatz zu Lymphozyten, in denen erwartungsgemäß auch keine Korrelation gefunden werden konnte ($r = -0,0429$; $p = 0,873$; **Abb. 11c**).

4 Diskussion

Kern dieses Projektes bildete die Untersuchung der biologischen Effekte von IFN-β, einem weit verbreiteten Medikament in der Behandlung der schubförmigen Verlaufsform der MS. Mit dem Ziel, die Wirkungen und Nebenwirkungen dieser Therapie besser zu verstehen, wurde zunächst in vitro, dann ex vivo am Patienten der Einfluss von IFN-β auf die Regulation von BAFF getestet, einem wichtigen Überlebensfaktor für B-Zellen. Vor dem Hintergrund der Problematik therapieassoziierter neutralisierender Antikörper gegen IFN-β sollte schließlich die Eignung der quantitativen PCR für BAFF und MxA als ex vivo Testsystem für ein effektives Biomonitoring beurteilt werden.

4.1 BAFF-Induktion durch IFN-β und IFN-γ in Immunzellen und Nicht-Immunzellen

4.1.1 Identifizierung BAFF produzierender Zellen

In der Zellkultur bewirkte IFN-β in allen untersuchten Zelltypen – Neutrophile Granulozyten, PBMC, Monozyten und Fibroblasten – eine deutlich stärkere Induktion von BAFF als der bekannte Stimulus IFN-γ (Nardelli et al., 2001). Dies ist die erste Beschreibung einer BAFF-Induktion in Immunzellen durch IFN-β. In dendritischen Zellen und Monozyten der Maus wurde bereits eine Hochregulierung von BAFF durch IFN-α beobachtet (Litinskiy et al., 2002). Innerhalb der Immunzellen reagierten die neutrophilen Granulozyten besonders empfindlich auf den Stimulus IFN-β. Die Mehrzahl der Literaturberichte legt eine untergeordnete oder gar fehlende Bedeutung von Lymphozyten als BAFF-Produzenten nahe (Moore et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 1999; Nardelli et al., 2001; Shu et al., 1999). Im Einklang damit ließ sich nach Auftrennung der PBMC in Monozyten und Lymphozyten eine stärkere BAFF-Induktion in Monozyten als in PBMC nach Stimulation sowohl mit IFN-β als auch IFN-γ beobachten. Da eine Wirkung von IFN-β auch außerhalb der Blutzirkulation z. B. am Ort

der Injektion möglich erscheint, wurden die Untersuchungen ausgedehnt auf Nicht-Immunzellen. So konnten Fibroblasten (HFF; human foreskin fibroblasts) in dieser Arbeit als ein weiterer BAFF-Produzent identifiziert werden. War die basale BAFF-Expression in dieser Zelllinie relativ gering, so stieg sie unter Behandlung mit IFN-γ, und wie in den Immunzellen noch stärker durch IFN-β, deutlich an. Analoge Befunde wurden darüber hinaus an kultivierten Astrozyten erhoben. Die Synthese von BAFF durch Fibroblasten und Astrozyten konnte schließlich auch auf Ebene der Proteine bestätigt werden (Krumbholz*, Faber* et al., 2008). Folgende weitere Nicht-Immunzellen, die BAFF produzieren können, sind bis heute bekannt: Nicht näher bezeichnete strahlenresistente Zellen (Gorelik et al., 2003), Speicheldrüsenepithelien (Ittah et al., 2006), fibroblastenähnliche Synovialzellen (Ohata et al., 2005) sowie nasale Epithelzellen (Kato et al., 2006). Sind in diesen genannten Zelltypen bisher keine Effekte von IFN-β erforscht worden, konnte in Kulturen von Atemwegsepithelien eine Induktion von BAFF durch IFN-β nachgewiesen werden (Kato et al., 2006). Die für die Fibroblasten erhobenen Befunde sind insofern im Zusammenhang mit der MS von Interesse, sind doch am Ort der Applikation von IFN-β zahlreiche Bindegewebszellen vorhanden. So ist es nach Mäurer sogar vorstellbar, dass eine lokale Reaktion an der Applikationsstelle mit der Freisetzung von Mediatorsubstanzen für die klinische Wirkung bei der MS verantwortlich ist (Mäurer et al., 2001). Und schließlich sind bei einer Reihe von Patienten schwere, bis zu Nekrosen reichende Lokalreaktionen an der Einstichstelle dokumentiert worden (Elgart et al., 1997). Es darf spekuliert werden, ob eine Freisetzung von BAFF durch Fibroblasten am Ort der Injektion an der Entstehung des in diesen Fällen beobachteten lymphozytären Infiltrates beteiligt sein könnte. Da Biopsiematerial von Hautreaktionen nicht verfügbar war, konnte einer möglichen Rolle von BAFF aus Fibroblasten an der Injektionsstelle nicht weiter nachgegangen werden. Jedoch lagen die für eine BAFF-Induktion in vitro benötigten Konzentrationen von IFN-β (etwa 1 IU/ ml) deutlich unter jenen Konzentrationen, welche in vivo in behandelten MS-Patienten erreicht werden (etwa 5-30 IU/ ml) (Mäurer et al., 2001). Dies legte die Vermutung nahe, vergleichbare Wirkungen auch ex vivo an den leicht zugänglichen Blutzellen behandelter MS-Patienten beobachten zu können. Die mit BAFF verwandten Mitglieder der TNF-

Familie APRIL und TWE-PRIL wiesen in vitro keine Regulation durch IFN-β und IFN-γ auf (Krumbholz*, Faber* et al., 2008).

4.1.2 Keine Regulation der BAFF-Rezeptoren durch IFN-β

Transkripte für BAFF-R, TACI und BCMA konnten in vitro aus PBMC und neutrophilen Granulozyten sowie ex vivo aus Vollblut von MS-Patienten mit und ohne Behandlung mit IFN-β und gesunden Kontrollen detektiert werden. Deren Höhe war jedoch unabhängig von einer Stimulation in vitro oder einer Behandlung in vivo mit IFN-β. Angesichts der niedrigen Expressionswerte der BAFF-Rezeptoren in neutrophilen Granulozyten bezogen auf GAPDH ist es nicht auszuschließen, dass die dort gemessenen Transkripte von verunreinigenden Immunzellen stammen und nicht von den neutrophilen Granulozyten selbst. Durchflusszytometrische Untersuchungen könnten zur Klärung der Frage beitragen, ob neutrophile Granulozyten tatsächlich die BAFF-Rezeptoren exprimieren. Dies könnte einen Schlüssel für ein tieferes Verständnis der Physiologie von BAFF liefern, die damit weit über eine Wirkung auf Lymphozyten hinausreichen würde. Da es in dieser Arbeit aber primär um die biologischen Effekte von IFN-β ging und sich für solche auf die Regulation der BAFF-Rezeptoren keine klaren Hinweise ergaben, wurde dieser Aspekt bislang nicht weiterverfolgt. Keine Expression von BAFF-Rezeptoren hingegen konnte auf Fibroblasten registriert werden (Daten nicht gezeigt). Interessant bleibt aber noch anzumerken, dass analog zu diesem Versuch auch in Tonsillen- und Hirngewebe sowie in MS-Läsionen und ZNS-Lymphomen eine deutlich schwächere Expression von BCMA im Vergleich zu BAFF-R und TACI beschrieben wurde (Krumbholz et al., 2005b).

4.2 IFN-β induziert BAFF in MS-Patienten

4.2.1 Erhöhte BAFF-Transkripte unter Therapie mit IFN-β

In behandelten MS-Patienten gelang im Vergleich zu unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen der Nachweis einer statistisch signifikant erhöhten Transkription von BAFF in neutrophilen Granulozyten, PBMC, Monozyten und Vollblut. Die größten Unterschiede zeigten sich in neutrophilen Granulozyten, ein Befund, der gut zu der auch in der Zellkultur registrierten besonders hohen Empfindlichkeit der BAFF-Induktion in neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit IFN-β passt. Lediglich in Lymphozyten konnte keine Erhöhung der BAFF-Transkription unter Behandlung mit IFN-β nachgewiesen werden. Dies wird verständlich vor dem Hintergrund der gegenwärtigen Literatur, die mehrheitlich die Rolle von Lymphozyten als relevante BAFF-Produzenten in Frage stellt (Moore et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 1999; Nardelli et al., 2001; Shu et al., 1999). Dennoch detektierte die quantitative PCR in dieser Studie auch in geringem Ausmaß BAFF-Transkripte aus den Lymphozyten der Blutspender. Dafür könnte der geringe Restgehalt an Monozyten nach der negativen Selektion der Lymphozyten verantwortlich sein.

Kein Unterschied der BAFF-Transkripte konnte indes zwischen gesunden Kontrollen und MS-Patienten festgestellt werden, die nicht auf IFN-β eingestellt waren. In einer kleinen Studie wird zwar über erhöhte BAFF mRNA Werte in Monozyten von MS-Patienten mit schubförmigem, sekundär- und primär progredientem Verlaufstyp berichtet verglichen mit gesunden Kontrollen (Thangarajh et al., 2004). Allerdings wird in dieser Arbeit nicht zwischen MS-Patienten mit und ohne Interferonbehandlung differenziert, obwohl in jeder Gruppe der drei klinischen Verlaufsformen Patienten enthalten waren, die mit IFN-β behandelt wurden. Für die Hypothese eines ursächlichen Zusammenhangs einer gesteigerten Transkription von BAFF und der Behandlung mit IFN-β, nicht aber der Erkrankung MS per se, sprechen schließlich die folgenden Befunde:

1. Gegenüber gesunden Kontrollen erhöhte Werte der Transkription von BAFF wurden ausschließlich in der Gruppe der mit IFN-β behandelten MS-Patienten registriert (**Abb. 9**).
2. Es konnte eine sehr starke und statistisch signifikante Korrelation zwischen der Transkription von BAFF und des für Typ-I-Interferone spezifischen Biomarkers MxA demonstriert werden. Dieser Zusammenhang war besonders deutlich in neutrophilen Granulozyten und Monozyten als den klassischen Produzenten von BAFF, wohingegen er erwartungsgemäß in den Lymphozyten nicht zu erkennen war (**Abb. 11a-c**).
3. In der Gruppe der behandelten MS-Patienten konnte bei zwei Probanden ein hoch positiver Titer neutralisierender Antikörper gegen IFN-β festgestellt werden. Diese beiden Patienten wiesen ein Niveau der BAFF-Transkription im Bereich gesunder Kontrollen auf (**Abb. 9**).
4. Untersuchungen zur Kinetik der BAFF-Induktion in vitro und ex vivo wiesen ein zeitlich paralleles Verlaufsmuster für BAFF und den Biomarker MxA auf. Diese Versuche legen eine direkte Induktion von BAFF durch IFN-β nahe: Bereits nach weniger als drei Stunden war ein gleichzeitiger Anstieg der Transkription von BAFF und MxA (Daten für MxA in vitro nicht gezeigt) zu beobachten, zu kurz, als dass die Induktion von BAFF sekundär über ein anderes durch IFN-β induziertes Genprodukt bedingt sein könnte.
5. In einem Patienten, der mit Avonex® behandelt war und dessen Blut zu mehreren Zeitpunkten nach einer Injektion untersucht wurde, fielen die initial erhöhten BAFF-Transkripte nach 60 Stunden wieder auf Werte gesunder Kontrollen ab. In Patienten, die auf Rebif® bzw. Betaferon® eingestellt waren, konnte diese Beobachtung aufgrund des engeren Applikationsintervalls nicht gemacht werden.
6. Schließlich konnten die Punkte 1-3 im Sinne einer Fortführung dieses Projektes in einer erweiterten Studie an insgesamt über 100 Probanden und damit einer wesentlich größeren Zahl als in der Arbeit von Thangarajh bestätigt werden (Hoffmann et al., 2007).

4.2.2 Erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen unter Therapie mit IFN-β

Die Induktion von BAFF in biologischen Respondern auf die Therapie mit IFN-β fiel im Serum deutlich schwächer aus als auf Ebene der Transkripte in Blutzellen. Dies könnte erklärt werden durch die Beobachtung, dass ein gesteigertes Angebot von BAFF zu einer verstärkten Bindung an den BAFF-Rezeptor auf B-Zellen und damit einhergehend zu einem erhöhten Verbrauch führt (Carter et al., 2005). In den Fällen systemischer Autoimmunerkrankungen, in denen in Patienten bislang vermehrt BAFF im Serum gefunden wurde, waren die beschriebenen Erhöhungen ebenfalls moderat ausgeprägt mit einem weiten Überlappungsbereich zu gesunden Kontrollen (Cheema et al., 2001; Groom et al., 2002; Krumbholz et al., 2005a; Zhang et al., 2001). Zu berücksichtigen ist ferner das Vorkommen von BAFF aus zwei ganz unterschiedlichen Quellen (Gorelik et al., 2003): Für die Aufrechterhaltung des BAFF-Serumspiegels, in der zitierten Arbeit als konstitutives BAFF bezeichnet, scheinen strahlenresistente Zellen – wahrscheinlich Stromazellen lymphatischer Organe – verantwortlich zu sein. BAFF freigesetzt aus Zellen der myeloischen Reihe hingegen, von den Autoren induziertes BAFF genannt, trägt hingegen nicht nennenswert zu den Serumspiegeln bei, sondern spielt vermutlich lokal an Orten der Entzündung eine Rolle. Inflammatorische Reize sind jedenfalls wesentlich an der Freisetzung von synthetisiertem BAFF aus Immunzellen beteiligt (Nardelli et al., 2001; Scapini et al., 2005). Patienten mit rheumatoider Arthritis wiesen in der Synovialflüssigkeit und damit lokal am Ort des Entzündungsgeschehens deutlich höhere BAFF-Konzentrationen auf als im Serum (Cheema et al., 2001). Zu berücksichtigen ist ferner das Vorkommen von BAFF als lösliche und membranständige Form. Möglicherweise vermittelt auch letztgenannte Variante biologische Funktionen, ohne jedoch freilich zu den Serumkonzentrationen beizutragen. Diesbezüglich könnten durchflusszytometrische Bestimmungen von BAFF auf Immunzellen von MS-Patienten weitere Aufschlüsse geben. Analog wie schon für die BAFF-Transkripte gezeigt fanden sich auch auf Proteinebene vergleichbare BAFF-Serumkonzentration in unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen. Dies ist im Einklang mit früheren Studien zu organbezogenen Autoimmunerkrankungen, in welchen anders als in systemischen

Autoimmunleiden wie SLE keine erhöhten BAFF-Serumkonzentrationen auftraten (Mackay et al., 2002).

4.2.3 Implikationen für Wirkungen und Nebenwirkungen der IFN-Therapie

Vieles spricht für eine Aktivierung des B-Zellkompartiments unter Therapie mit IFN-β: Tierexperimentell konnte eine Verstärkung der humoralen Immunantwort durch Typ-I-Interferone etabliert werden sowohl über direkte Effekte auf B-Zellen als auch indirekt über eine Stimulation von dendritischen Zellen (Banchereau und Pascual, 2006; Le Bon et al., 2001; Le Bon et al., 2006). Die vorliegende Arbeit postuliert über die gefundene Induktion von BAFF in MS-Patienten einen zusätzlichen dritten Weg. Dies wird von den Befunden in vitro unterstützt, in welchen Konzentrationen von IFN-β sogar deutlich unter jenen therapeutisch im Patienten erreichten Spiegeln ausreichten, um eine Induktion von BAFF zu beobachten.

Tabelle 5: Ambivalente Effekte von B-Zellen und Antikörpern auf die ZNS-Entzündung

Zerstörung von ZNS-Gewebe	Erhaltung von ZNS-Gewebe
Demyelinisierung und axonaler Schaden durch ZNS-Autoantikörper (Genain et al., 1999; Mathey et al., 2007)	Möglicherweise fördernde Effekte von einigen ZNS-Autoantikörpern auf Remyelinisierung (Warrington et al., 2000) und axonale Regeneration (Reindl et al., 2003; Schwab, 2004)
Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und Lymphotoxin (Lund et al., 2005)	Von autoreaktiven B-Zellen freigesetztes IL-10 hemmt die EAE (Fillatreau et al., 2002)
B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (Lanzavecchia, 1985; Wucherpfennig et al., 1997)	Neuroprotektion über die Freisetzung neurotropher Faktoren wie BDNF (Kerschensteiner et al., 1999), Neurturin (Vargas-Leal et al., 2005) und NGF (Torcia et al., 1996)

Aufgrund der pleiotropen Effekte der Interferone ist es schwierig, therapeutisch induziertes BAFF in Zusammenhang mit klinischen Effekten der Therapie mit IFN-β zu bringen. Um jedoch einen Eindruck von den zahlreichen denkbaren Angriffspunkten von induziertem BAFF zu vermitteln, fasst **Tabelle 5** die Rolle des B-Zellsystems in der

Neuroinflammation zusammen: Auffällig sind die vollkommen entgegengesetzten Effekte von B-Zellen sowohl auf Protektion einerseits und Zerstörung des ZNS andererseits. Dies erschwert die Interpretation möglicher Konsequenzen einer therapeutischen BAFF-Induktion auf den Krankheitsverlauf der MS zusätzlich.

Ferner ist zu bedenken, dass trotz ihrer breiten Anwendung nicht alle Patienten in gleicher Weise auf die Therapie mit IFN-β ansprechen. Bis heute ist es schwierig vorherzusagen, ob ein einzelner Patient von der Gabe von IFN-β profitieren wird. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die MS als eine heterogene Erkrankung zu verstehen mit ganz unterschiedlicher Beteiligung auch des humoralen Immunsystems. So konnte die Ablagerung von Antikörpern und Komplement in aktiven Läsionen einer Untergruppe von Patienten (Lucchinetti et al., 2000) in Verbindung gebracht werden mit therapeutischem Ansprechen auf Plasmapherese (Keegan et al., 2005). In einer anderen Arbeit sagte ein hoher Quotient von B-Zellen zu Monozyten im Liquor einen besonders schweren Krankheitsverlauf vorher (Cepok et al., 2001). In Patienten mit Hinweisen für eine pathogenetische Beteiligung der B-Zellen könnte eine Hochregulierung systemischer BAFF-Spiegel die B-Zellaktivität weiter verstärken. Der Gedanke ist naheliegend, solche Patienten könnten weniger von einer Therapie mit IFN-β profitieren als vielmehr von einer Depletion von B-Zellen. Interessanterweise scheint IFN-β in der Behandlung der Neuromyelitis optica (auch Devic-Syndrom), einer entzündlichen ZNS-Erkrankung mit starker Evidenz einer antikörpervermittelten Pathogenese (Lucchinetti et al., 2002; Takahashi et al., 2007), weniger wirksam oder sogar schädlich zu sein (Warabi et al., 2007). Stattdessen führte der monoklonale, gegen das CD20-Antigen auf B-Zellen gerichtete Antikörper Rituximab zu einer erheblichen Stabilisierung einer kleinen Gruppe von Patienten mit Neuromyelitis optica (Cree et al., 2005). Auf der 59. Jahrestagung der American Academy of Neurology im Mai diesen Jahres konnten schließlich erste Erfolge in einer randomisierten Phase-II-Studie auch an Patienten mit schubförmiger MS präsentiert werden (Hauser et al., 2007).

Muss eine mögliche Beteiligung von induziertem BAFF an den komplexen Wirkungsmechanismen der Therapie mit IFN-β naturgemäß weitgehend spekulativ bleiben, erscheint eine Rolle von BAFF an zwei Nebeneffekten der Interferontherapie wesentlich leichter vorstellbar: Erstens die Entstehung von Autoantikörpern gegen

unterschiedlichste körpereigene Antigene, zweitens die Bildung neutralisierender Antikörper gegen das Medikament selbst. Die meisten Autoantikörper, welche unter Behandlung mit IFN-β beschrieben sind, sind gegen die Schilddrüse gerichtet (Bitsch et al., 2004; Lange-Asschenfeldt et al., 2004). Jedoch bleiben diese Befunde nicht gänzlich unwidersprochen, in einer über den relativ kurzen Zeitraum von zwei Jahren durchgeführten Studie konnte keine Verbindung zwischen der Behandlung mit IFN-β und der Induktion von Autoantikörpern hergestellt werden (Polman et al., 2005a). Wesentlich eindeutiger hingegen ist der Zusammenhang zwischen einer Therapie mit dem ebenfalls zu den Typ-I-Interferonen gerechneten IFN-α und dem Auftreten von Autoimmunphänomenen und Autoantikörpern (Banchereau und Pascual, 2006; Borg und Isenberg, 2007). IFN-α wiederum ist auch ein bekannter Induktor von BAFF (Litinskiy et al., 2002). Im Sinne einer Weiterführung der vorliegenden Arbeit konnten inzwischen in Melanompatienten unter Behandlung mit IFN-α ebenfalls dosisabhängig erhöhte Serumkonzentrationen von BAFF gemessen werden (Krumbholz*, Faber* et al., 2008). Interessanterweise übertrafen in diesen Patienten die induzierten BAFF-Erhöhungen deutlich jene, welche in MS-Patienten unter Therapie mit IFN-β gefunden wurden. Die bekannte Assoziation von BAFF und Autoimmunerscheinungen in Mensch und Tier sowie die hier gefundene Induktion von BAFF in vivo könnte die Verbindung herstellen zu den häufigen Autoimmunphänomenen und der Interferontherapie. Dabei könnte die höhere BAFF-Induktion in vivo unter therapeutischer Gabe von IFN-α gegenüber IFN-β eine Erklärung liefern für den stärkeren Zusammenhang von Autoimmunphänomenen unter IFN-α als unter IFN-β.

Bei einer Vielzahl von Patienten treten neutralisierende Antikörper gegen das Medikament IFN-β auf, was mit einem klinischen Wirkungsverlust verbunden sein kann (Kappos et al., 2005). Eine Begünstigung dieses Phänomens über die Induktion von BAFF erscheint gut vorstellbar: Wie eine Studie an Melanompatienten zeigte, ist die Immunogenität von IFN-β jedenfalls nicht einfache Folge struktureller Unterschiede zwischen rekombinanten und natürlichen Interferonen: Neutralisierende Antikörper traten in dieser Untersuchung bei Verwendung von rekombinantem gegenüber natürlichem IFN-β nicht häufiger, sondern paradoxerweise sogar seltener auf (Fierlbeck et al., 1994).

Abzuwarten bleibt angesichts der zahlreichen denkbaren Modulationsmechanismen von B-Zellen auf den Krankheitsverlauf der MS, ob nicht eine gezielte Intervention in den Haushalt von BAFF – sei es durch Verstärkung oder Abschwächung seiner Funktionen – eines Tages neue therapeutische Möglichkeiten bei MS eröffnen könnte. So wird der monoklonale anti-BAFF Antikörper Lymphostat B gegenwärtig bereits in einer Reihe klinischer Studien an Patienten mit rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematodes getestet (Martin und Chan, 2006), der Beginn einer Studie bei MS-Patienten mit dem BAFF/APRIL-Antagonisten Atacicept, einem löslichen TACI-Rezeptor, steht unmittelbar bevor. Eine therapiebegleitend zu einer Interferonbehandlung eingesetzte Blockade von BAFF könnte sich vor dem Hintergrund der Problematik der Autoimmunphänomene und neutralisierenden Antikörper ebenfalls als sinnvoll erweisen.

4.3 Biomonitoring der Interferontherapie mit der quantitativen PCR für BAFF und MxA

Die Bestimmung IFN-stimulierter Gene (ISG) ist nicht nur nützlich für das Studium von Wirkungsmechanismen. Vor dem Hintergrund der Problematik neutralisierender Antikörper gegen IFN-β sollen nun die Eignung und praktische Umsetzbarkeit der PCR für BAFF und MxA für ein Biomonitoring der Interferontherapie im klinischen Alltag besprochen werden.

4.3.1 Praktisch-klinische Anwendung der quantitativen PCR als ex vivo Testsystem

Der Weg zu einer quantitativen PCR für MxA und BAFF mit praktisch-klinischer Anwendbarkeit erfolgte über folgende Schritte: 1. Etablierung einer PCR-Reaktion mit hoher Effizienz und reproduzierbaren Messergebnissen. 2. Testung eines Blutentnahmesystems mit RNA-Stabilisator (PAXgene™-System) zur effizienten Bündelung der Probenverarbeitung. 3. Ermittlung optimaler Blutentnahmezeitpunkte anhand von Untersuchungen zur Kinetik der Induktion von MxA und BAFF. 4. Definition besonders sensitiven Ausgangsmaterials zur Diskriminierung zwischen

biologischen Respondern und Non-Respondern insbesondere mit der Frage, ob eine aufwändige Separation von Immunzellen gegenüber der einfachen Gewinnung von Vollblut-RNA von Vorteil ist.

Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde bereits früher für BAFF (Krumbholz et al., 2005b) und hier nun für MxA und GAPDH bestätigt ebenso wie die Reproduzierbarkeit von Analyseergebnissen über die Mitführung einer Standardkontrolle auf jeder Mikrotiterplatte. So könnten die im Rahmen dieses Projektes erhobenen Messungen an Patienten und gesunden Kontrollen gleichsam als Vorphase eines klinischen Tests betrachtet werden, aus dem sich entsprechende Normbereiche für künftige Anwendungen am Patienten ableiten ließen. Zur Verbesserung der Lagerfähigkeit der Blutproben und damit zur Vereinfachung der Materialgewinnung hat erst kürzlich zwar auch Pachner für die quantitative MxA-PCR den Einsatz des PAXgene™-Systems vorgeschlagen (Pachner et al., 2003a). Die vorliegende Arbeit liefert aber zusätzlich den Vergleich zweier unterschiedlicher Verfahren zur Gewinnung von Vollblut-RNA mit (PAXgene™-System) und ohne RNA-Stabilisator (QIAamp® RNA Blood Mini Kit). Der Einsatz der PAXgene™-Röhrchen erlaubte das Einfrieren der Blutproben bei -80 °C und sogar die Lagerung bei Raumtemperatur über mindestens sechs Tage bei stabilem Gentranskriptionsprofil sowohl von BAFF und MxA. Dies stellt einen wesentlichen logistischen Vorteil gegenüber dem QIAamp®-Kit da, welches die sofortige Verarbeitung von Vollblut erfordert. Allerdings lieferte im direkten Vergleich an fünf unabhängigen Spendern das PAXgene™-System gegenüber der QIAamp®-Methode regelmäßig geringfügig erniedrigte Werte in der BAFF-Transkription. Eine Ursachensuche dieses Befundes scheint jedoch kaum durchführbar, da von Seiten des Herstellers keine Angaben über Inhalt, Zusammensetzung und Wirkprinzip der PAXgene™-Röhrchen verfügbar sind.

In sämtlichen Versuchen zur Kinetik verlief sowohl in vitro als auch ex vivo die Induktion von BAFF und MxA jeweils zeitlich parallel. Im Einklang mit Pachner wurden im Vollblut 12 Stunden nach Injektion die höchsten Werte gemessen (Pachner et al., 2005). Gilli und Mitarbeiter beobachteten in einer quantitativen MxA-PCR aus PBMC ebenfalls ein Maximum nach 12 Stunden (Gilli et al., 2006). Lediglich die Gruppe um Santos beschreibt in monozytendepletierten PBMC für MxA Höchstwerte der

Transkription bereits wenige Stunden nach Verabreichung des Medikaments (Santos et al., 2006). Die Befunde von Pachner im Vollblut sind jedoch weitgehend deckungsgleich mit eigenen Daten aus in vitro Versuchen, in denen zwar bereits nach wenigen Stunden ein deutlicher Anstieg der ISG gesehen wurde, mit einem Maximum jedoch erst etwa 12 Stunden nach Gabe von IFN-β (Pachner et al., 2005). Somit erscheint nach eigenen Versuchen und den überwiegenden Berichten aus der Literatur ein Abstand von 12 Stunden nach der letzten Spritze besonders günstig für die Blutentnahme. Da die Patienten zur Verlagerung unerwünschter Wirkungen in die Schlafphase IFN-β zudem üblicherweise abends spritzen, wären frühere Abnahmezeitpunkte ohnehin nicht zweckmäßig, fielen sie so doch auf Stunden mitten in der Nacht. In der Suche nach besonders geeignetem Ausgangsmaterial für ein Biomonitoring erfolgte eine detaillierte Gegenüberstellung der RNA-Gewinnung aus Vollblut und separierten Immunzellen. Die beste Diskriminierung zwischen der Gruppe der behandelten MS-Patienten und der Gruppe unbehandelter MS-Patienten und gesunder Kontrollen gelang sowohl für BAFF als auch MxA bei Verwendung von RNA aus neutrophilen Granulozyten, gefolgt von Vollblut. Die übrigen Zelltypen deckten für beide Gene deutlich geringere Differenzen zwischen der Behandlungsgruppe und Kontrollen auf. Ist die Verwendung von RNA aus neutrophilen Granulozyten zwar mit der höchsten Sensitivität verbunden, so ist der Einsatz von Vollblut-RNA bei ebenfalls guter Sensitivität mit erheblich weniger Aufwand verbunden, zumal die für Vollblut mögliche RNA-Stabilisierung mit dem PAXgene™-System einen zusätzlichen logistischen Vorteil bietet. Auch Pachner hat in der Anwendung von Vollblut gegenüber der Isolierung von PBMC behandelte Patienten deutlich besser von Kontrollen trennen können (Pachner et al., 2003a). Diese Arbeitsgruppe führte die deutlichere MxA-Induktion im Vollblut auf eine bevorzugte Stabilisierung der MxA-Transkripte durch das PAXgene™-System zurück. Die Daten aus der hier vorgelegten Arbeit legen aber den Schluss nahe, dass für den deutlicheren Anstieg von MxA in Vollblut gegenüber PBMC die zusätzlich enthaltenen Granulozyten verantwortlich sind. Gegen die von Pachner angeführte Hypothese sprechen ferner die nahezu identischen MxA-Werte aus Vollblut mit und ohne RNA-Stabilisator.

4.3.2 BAFF als zusätzlicher Biomarker der Interferontherapie

Obwohl MxA aufgrund der stabilen Antwort auf IFN-β und seiner Spezifität für Typ-I-Interferone als ein geeigneter Marker für ein Biomonitoring der Interferontherapie gilt (Pachner et al., 2003b), ist damit seine Überlegenheit gegenüber weiteren ISG nicht bewiesen. Da die klinischen Wirkungen von IFN-β darüber hinaus vermutlich über eine Vielzahl von ISG vermittelt werden, erscheint es nur folgerichtig, sich auch bei der Bestimmung biologischer Effekte nicht auf ein einzelnes Gen zu verlassen, zumal MxA weder zum klinischen Effekt beiträgt noch an der Pathogenese der MS beteiligt ist. In dem Bemühen, die Zuverlässigkeit von MxA zu überprüfen, haben zahlreiche Arbeitsgruppen dieses mit anderen postulierten Biomarkern verglichen (Gilli et al., 2006; Pachner et al., 2006; Santos et al., 2006; Wandinger et al., 2003). Die sehr deutliche Korrelation von BAFF und MxA in dieser Arbeit unterstützt die Rolle von MxA als einen repräsentativen Biomarker Interferon vermittelter biologischer Effekte. Aber auch BAFF selbst könnte neben seinem möglichen Beitrag zu Wirkungen und Nebenwirkungen der Interferontherapie nach den Daten dieser Arbeit ein zusätzlicher wertvoller Marker für ein Biomonitoring darstellen. Vermochte auch BAFF, insbesondere bei Verwendung von Vollblut und Granulozyten als Probenmaterial, deutlich zwischen der Gruppe mit IFN-β behandelter Patienten und Kontrollpersonen zu unterscheiden, so war diese Fähigkeit insgesamt bei MxA stärker ausgeprägt. Dies deckt sich weitestgehend mit den oben zitierten Publikationen, in denen die dort analysierten Gene TRAIL, XAF-1, STAT1, MxB, β_2-Mikroglobulin, 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) und Viperin (VIP) ebenfalls nicht ganz so sensitiv wie MxA erschienen. Vor einigen Jahren ist in ähnlicher Weise TRAIL als neuer Biomarker vorgeschlagen worden (Wandinger et al., 2003). CD95L, wie TRAIL und BAFF ebenfalls ein Mitglied der TNF-Familie, wurde im Patienten kaum durch IFN-β reguliert (Wandinger et al., 2003). Im Rahmen dieser Dissertation lag bei zwei Patienten ein hochpositiver Titer neutralisierender Antikörper vor. Interessanterweise ergab die Analyse der Transkription sowohl von MxA als auch BAFF Werte im Bereich unbehandelter und gesunder Kontrollen. Mittlerweile konnte die Fähigkeit dieser PCR, Träger hochpositiver neutralisierender Antikörper zuverlässig zu identifizieren, in Erweiterung dieser Daten anhand eines größeren Patientenkollektivs

bestätigt und von uns in Neurology publiziert werden (Hoffmann et al., 2007). Zusammenfassend spricht vieles für eine Eignung der quantitativen PCR mit den beiden Genen BAFF und MxA aus Vollblut zur Feststellung eines biologischen Ansprechens auf die Interferontherapie. Ein zukunftsweisender Ansatz könnte die gleichzeitige Bestimmung mehrerer ISG entweder in der Multiplex-Analyse (Pachner et al., 2006) oder unter Verwendung von Genkarten sein. Letzterer wird im Sinne einer Weiterführung dieses Projektes gegenwärtig in unserem Labor verfolgt nicht zuletzt auch mit dem wesentlichen Ziel, zusätzlich zur Optimierung des Biomonitoring weitere Schlüssel zum nach wie vor unvollständig verstandenen Wirkungsmechanismus von IFN-β zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Einleitung

Die Therapie mit Interferon (IFN)-β reduziert die Schubrate bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS), einer chronisch entzündlichen Erkrankung des ZNS.
Bis heute ist nicht geklärt, über welchen Weg diese Effekte vermittelt werden. B-Zellen sind in diesem Zusammenhang bislang kaum untersucht worden, da ihre Rolle in der Immunpathogenese der MS erst in jüngerer Zeit verstärkte Aufmerksamkeit erlangt hat.
BAFF (B cell activating factor of the TNF family) ist ein kürzlich entdeckter wesentlicher Überlebensfaktor für B-Zellen.
Ein klinisch-praktisches Problem stellt das Auftreten neutralisierender Antikörper gegen das Medikament IFN-β dar, verbunden mit einem klinischen Wirkungsverlust. MxA (Myxovirus Resistenzprotein A) gilt als einer von mehreren möglichen Biomarkern für exogen zugeführtes IFN-β. Mit zwei Zielen wurde in der vorliegenden Arbeit die Genregulation von BAFF und MxA in MS-Patienten unter Behandlung mit IFN-β untersucht: Zum einen zur Quantifizierung der Bioverfügbarkeit von appliziertem IFN-β, zum anderen zur Gewinnung weiterer Einblicke in die Wirkungsmechanismen dieser Therapie.

Ergebnisse

Für die Analyse *ex vivo* am Patienten wurde eine quantitative PCR für BAFF und MxA etabliert. Um die Eignung dieses Testsystems im klinischen Alltag zu erhöhen, wurde eine Methode zur Gewinnung von Vollblut-RNA kombiniert mit einem RNA-Stabilisator (PAXgene™-System) getestet. Damit konnten aus Vollblut-RNA die Transkripte BAFF und MxA reproduzierbar und stabil auch nach mehrtägiger Lagerung der Blutproben bei Raumtemperatur gemessen werden. In Vollblut sowie in separierten Immunzellsubtypen fanden sich in MS-Patienten 12 bis 24 Stunden nach Injektion von IFN-β statistisch

signifikant höhere BAFF- und MxA-Transkripte als in unbehandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen. Dabei gelang mit RNA aus neutrophilen Granulozyten und Vollblut eine bessere Diskrimination als aus Monozyten und PBMC. In Lymphozyten konnte hingegen keine Induktion von BAFF, jedoch ebenfalls eine deutliche Hochregulierung von MxA unter Behandlung mit IFN-β beobachtet werden. In MS-Patienten mit hochpositivem Titer neutralisierender Antikörper war keine verstärkte Induktion von BAFF und MxA nachweisbar. BAFF-Transkription korrelierte in behandelten Patienten deutlich und statistisch signifikant mit dem Biomarker MxA. In biologischen Respondern auf IFN-β zeigten sich erhöhte BAFF-Serumspiegel. Die Stimulation gereinigter Immunzellen *in vitro* bestätigte die besonders deutliche Induktion von BAFF in neutrophilen Granulozyten. Fibroblasten als eine prominente Zellpopulation am Ort der Einstichstelle konnten als weitere Produzenten von BAFF identifiziert werden. IFN-β erwies sich in allen untersuchten Zelltypen stets als ein stärkerer Induktor von BAFF als der klassische Stimulus IFN-γ. Weder IFN-β noch IFN-γ hatten hingegen einen Einfluss auf die Expression der drei BAFF-Rezeptoren.

Diskussion

Zusammenfassend ergibt sich, dass die quantitative PCR für MxA und BAFF aus Vollblut-RNA geeignet ist, die biologische Verfügbarkeit von IFN-β zu beurteilen, was zur Therapieoptimierung beitragen kann. Die gefundene Induktion des B-Zellüberlebensfaktors BAFF durch IFN-β erweitert unsere Kenntnis über mögliche Wirkungsmechanismen und auch Probleme der Interferontherapie.

6 Abkürzungen

APRIL	A proliferation inducing ligand
BAB	Binding antibody
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
BAFF-R	BAFF-Rezeptor
BCMA	B cell maturation antigen
CPE	Cytopathic Effect Assay
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, auch Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Acitvated Cell Sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HFF	Human foreskin fibroblasts
IFN	Interferon
ISG	Interferon stimuliertes Gen
MBP	Myelin basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MxA	Myxovirus Resistenzprotein A
NAB	Neutralisierende Antikörper
PAXgene™	System mit RNA-Stabilisator zur Gewinnung von Vollblut-RNA
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PMN	Polymorphonuclear cells = Neutrophile Granulozyten
PP-MS	Primary-progressive MS = Primär chronisch-progrediente MS
RR-MS	Relapsing-remitting MS = Schubförmige MS
SP-MS	Secondary-progressive MS = Sekundär chronisch-progrediente MS
TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor

7 Literatur

Ann M.R. und Rudick R.A. (2006). Drug Insight: interferon treatment in multiple sclerosis. Nat. Clin. Pract. Neurol. *2*, 34-44.

Archelos J.J., Storch M.K. und Hartung H.P. (2000). The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. Annals of Neurology *47*, 694-706.

Banchereau J. und Pascual V. (2006). Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. Immunity *25*, 383-392.

Baranzini S.E., Jeong M.C., Butunoi C., Murray R.S., Bernard C.C.A. und Oksenberg J.R. (1999). B Cell Repertoire Diversity and Clonal Expansion in Multiple Sclerosis Brain Lesions. J Immunol *163*, 5133-5144.

Batten M., Groom J., Cachero T.G., Qian F., Schneider P., Tschopp J., Browning J.L. und Mackay F. (2000). BAFF Mediates Survival of Peripheral Immature B Lymphocytes. J. Exp. Med. *192*, 1453-1466.

Bertolotto A., Gilli F., Sala A., Capobianco M., Malucchi S., Milano E., Melis F., Marnetto F., Lindberg R.L.P., Bottero R., Di Sapio A. und Giordana M.T. (2003). Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon beta bioavailability in MS patients. Neurology *60*, 634-639.

Bertolotto A., Gilli F., Sala A., Audano L., Castello A., Magliola U., Melis F. und Giordana M.T. (2001). Evaluation of bioavailability of three types of IFNβ in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification. Journal of Immunological Methods *256*, 141-152.

Bitsch A., Dressel A., Meier K., Bogumil T., Deisenhammer F., Tumani H., Kitze B., Poser S. und Weber F. (2004). Autoantibody synthesis in primary progressive multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. J. Neurol. *251*, 1498-1501.

Borg F.A.Y. und Isenberg D.A. (2007). Syndromes and complications of interferon therapy. Current Opinion in Rheumatology *19*, 61-66.

Burns J., Rosenzweig A., Zweiman B. und Lisak R.P. (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. Cell Immunol. *81*, 435-440.

Carter R.H., Zhao H., Liu X., Pelletier M., Chatham W., Kimberly R. und Zhou T. (2005). Expression and occupancy of BAFF-R on B cells in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. *52*, 3943-3954.

Castigli E., Wilson S.A., Scott S., Dedeoglu F., Xu S., Lam K.P., Bram R.J., Jabara H. und Geha R.S. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. J. Exp. Med. *201*, 35-39.

Cepok S., Jacobsen M., Schock S., Omer B., Jaekel S., Boddeker I., Oertel W.H., Sommer N. und Hemmer B. (2001). Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. Brain *124*, 2169-2176.

Cheema G.S., Roschke V., Hilbert D.A. und Stohl W. (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis and Rheumatism *44*, 1313-1319.

Compston A. und Coles A. (2002). Multiple sclerosis. The Lancet *359*, 1221-1231.

Cree B.A.C., Lamb S., Morgan K., Chen A., Waubant E. und Genain C. (2005). An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica. Neurology *64*, 1270-1272.

Cross A.H., Trotter J.L. und Lyons J.A. (2001). B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. Journal of Neuroimmunology *112*, 1-14.

De Jager P.L. und Hafler D.A. (2007). New Therapeutic Approaches for Multiple Sclerosis. Annual Review of Medicine *58*, 417-432.

Deisenhammer F., Reindl M., Harvey J., Gasse T., Dilitz E. und Berger T. (1999). Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. Neurology *52*, 1239-1243.

Dillon S.R., Gross J.A., Ansell S.M. und Novak A.J. (2006). An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov *5*, 235-246.

Duddy M. und Bar-Or A. (2006). B-cells in multiple sclerosis. Int. MS J. *13*, 84-90.

Elgart G.W., Sheremata W. und Ahn Y.S. (1997). Cutaneous reactions to recombinant human interferon beta-1b: The clinical and histologic spectrum. Journal of the American Academy of Dermatology *37*, 553-558.

Esiri M.M. (1977). Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. Lancet. *2*, 478.

Fierlbeck G., Schreiner T., Schaber B., Walser A. und Rassner G. (1994). Neutralizing interferon beta antibodies in melanoma patients treated with recombinant and natural interferon beta. Cancer Immunol. Immunother. *39*, 263-268.

Fillatreau S., Sweenie C.H., McGeachy M.J., Gray D. und Anderton S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat. Immunol. *3*, 944-950.

Genain C.P., Cannella B., Hauser S.L. und Raine C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. Nature Medicine *5*, 170-175.

Gilli F., Marnetto F., Caldano M., Sala A., Malucchi S., Capobianco M. und Bertolotto A. (2006). Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. Mult. Scler. *12*, 47-57.

Giovannoni G., Cutter G.R., Lunemann J., Martin R., Munz C., Sriram S., Steiner I., Hammerschlag M.R. und Gaydos C.A. (2006). Infectious causes of multiple sclerosis. The Lancet Neurology *5*, 887-894.

Gorelik L., Gilbride K., Dobles M., Kalled S.L., Zandman D. und Scott M.L. (2003). Normal B Cell Homeostasis Requires B Cell Activation Factor Production by Radiation-resistant Cells. J. Exp. Med. *198*, 937-945.

Groom J., Kalled S.L., Cutler A.H., Olson C., Woodcock S.A., Schneider P., Tschopp J., Cachero T.G., Batten M., Wheway J., Mauri D., Cavill D., Gordon T.P., Mackay C.R. und Mackay F. (2002). Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. J. Clin. Invest. *109*, 59-68.

Gross J.A., Johnston J., Mudri S., Enselman R., Dillon S.R., Madden K., Xu W., Parrish-Novak J., Foster D., Lofton-Day C., Moore M., Littau A., Grossman A., Haugen H., Foley K., Blumberg H., Harrison K., Kindsvogel W. und Clegg C.H. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. Nature *404*, 995-999.

Haller O. und Kochs G. (2002). Interferon-Induced Mx Proteins: Dynamin-Like GTPases with Antiviral Activity. Traffic *3*, 710-717.

Hauser S., Waubant E., Arnold D., Vollmer T., Antel J., Fox R., Bar-Or A., Sarkar N., Langer-Gould A., Panzara M. und Smith C. (2007). A Phase II Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Trial of Rituximab in Adults with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (RRMS). 59th Annual Meeting of the American Academy of Neurology. Abstract online auf www.aan.com veröffentlicht.

Hemmer B., Archelos J.J. und Hartung H.P. (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Nat. Rev. Neurosci. *3*, 291-301.

Hoffmann L.A., Krumbholz M., Faber H., Kümpfel T., Starck M., Pöllmann W., Meinl E. und Hohlfeld R. (2007). Multiple sclerosis: Relating MxA transcription to anti-interferon-beta-neutralizing antibodies. Neurology *68*, 958-959.

Huard B., Arlettaz L., Ambrose C., Kindler V., Mauri D., Roosnek E., Tschopp J., Schneider P. und French L.E. (2004). BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. Int. Immunol. *16*, 467-475.

Isaacs A. und Lindenmann J. (1957). Virus interference. I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci. *147*, 258-267.

Ittah M., Miceli-Richard C., Gottenberg J.E., Lavie F., Lazure T., Ba N., Sellam J., Lepajolec C. und Mariette X. (2006). B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. Arthritis Research & Therapy *8(2)R51*, 1-9.

Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A., Herndon R.M., Richert J.R., Salazar A.M., Fischer J.S., Goodkin D.E., Granger C.V., Simon J.H., Alam J.J., Bartoszak D.M., Bourdette D.N., Braiman J., Brownscheidle C.M., Coats M.E., Cohan S.L., Dougherty D.S., Kinkel R.P., Mass M.K., Munschauer F.E. III, Priore R.L., Pullicino P.M., Scherokman B.J., Whitham R.H. und The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). (1996). Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. Ann. Neurol. *39*, 285-294.

Kabat E.A., Glusman M. und Knaub V. (1948). Quantitative Estimation of the Albumin and Gamma-Globulin in Normal and Pathologic Cerebrospinal Fluid by Immunochemical Methods. American Journal of Medicine *4*, 653-662.

Kalled S.L. (2005). The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. Immunological Reviews *204*, 43-54.

Kappos L., Clanet M., Sandberg-Wollheim M., Radue E.W., Hartung H.P., Hohlfeld R., Xu J., Bennett D., Sandrock A. und Goelz S. (2005). Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. Neurology. *65*, 40-47.

Karpusas M., Whitty A., Runkel L. und Hochman P. (1998). The structure of human interferon-beta: implications for activity. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) *V54*, 1203-1216.

Kato A., Truong-Tran A.Q., Scott A.L., Matsumoto K. und Schleimer R.P. (2006). Airway Epithelial Cells Produce B Cell-Activating Factor of TNF Family by an IFN-beta-Dependent Mechanism. J Immunol *177*, 7164-7172.

Keegan B.M. und Noseworthy J.H. (2002). Multiple Sclerosis. Annual Review of Medicine *53*, 285-302.

Keegan M., König F., McClelland R., Brück W., Morales Y., Bitsch A., Panitch H., Lassmann H., Weinshenker B., Rodriguez M., Parisi J. und Lucchinetti C.F. (2005). Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. Lancet *366*, 579-582.

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

Krumbholz M.*, Faber H.*, Steinmeyer F., Hoffmann L.A., Kümpfel T., Pellkofer H., Derfuss T., Ionescu C., Starck M., Hafner C., Hohlfeld R. und Meinl E. (2008). Interferon-β increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. Brain *131*, 1415-1463.

Krumbholz M., Specks U., Wick M., Kalled S.L., Jenne D. und Meinl E. (2005a). BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. J. Autoimmun. *25*, 298-302.

Krumbholz M., Theil D., Derfuss T., Rosenwald A., Schrader F., Monoranu C.M., Kalled S.L., Hess D.M., Serafini B., Aloisi F., Wekerle H., Hohlfeld R. und Meinl E. (2005b). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. J. Exp. Med. *201*, 195-200.

Kurtzke J.F. (1983). Rating Neurologic Impairment in Multiple-Sclerosis - An Expanded Disability Status Scale (Edss). Neurology *33*, 1444-1452.

Lange-Asschenfeldt C., Boor S., Kahaly G.J. und Thomke F. (2004). Thyroid autoimmunity disorders during interferon beta-1b treatment in patients with multiple sclerosis: review and case report. Nervenarzt *75*, 589-594.

Lanzavecchia A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. Nature. *314*, 537-539.

Le Bon A., Schiavoni G., D'Agostino G., Gresser I., Belardelli F. und Tough D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. Immunity *14*, 461-470.

Le Bon A., Thompson C., Kamphuis E., Durand V., Rossmann C., Kalinke U. und Tough D.F. (2006). Cutting edge: Enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. Journal of Immunology *176*, 2074-2078.

Lesley R., Xu Y., Kalled S.L., Hess D.M., Schwab S.R., Shu H.B. und Cyster J.G. (2004). Reduced Competitiveness of Autoantigen-Engaged B Cells due to Increased Dependence on BAFF. Immunity *20*, 441-453.

Lindert R.B., Haase C.G., Brehm U., Linington C., Wekerle H. und Hohlfeld R. (1999). Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. Brain *122*, 2089-2100.

Litinskiy M.B., Nardelli B., Hilbert D.M., He B., Schaffer A., Casali P. und Cerutti A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat. Immunol. *3*, 822-829.

Litzenburger T., Fassler R., Bauer J., Lassmann H., Linington C., Wekerle H. und Iglesias A. (1998). B Lymphocytes Producing Demyelinating Autoantibodies: Development and Function in Gene-targeted Transgenic Mice. J. Exp. Med. *188*, 169-180.

Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M. und Lassmann H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. Annals of Neurology *47*, 707-717.

Lucchinetti C.F., Mandler R.N., McGavern D., Brück W., Gleich G., Ransohoff R.M., Trebst C., Weinshenker B., Wingerchuk D., Parisi J.E. und Lassmann H. (2002). A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. Brain *125*, 1450-1461.

Lund F.E., Garvy B.A., Randall T.D. und Harris D.P. (2005). Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. Curr. Dir. Autoimmun. *8:25-54.*, 25-54.

Mäurer M., Gold R., Toyka K.V. und Rieckmann P. (2001). Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose mit rekombinanten Interferon-β-Präparaten. Der Nervenarzt *V72*, 108-116.

Mackay F. und Ambrose C. (2003). The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. Cytokine & Growth Factor Reviews *14*, 311-324.

Mackay F. und Browning J.L. (2002). BAFF: A fundamental survival factor for B cells. Nature Reviews Immunology *2*, 465-475.

Mackay F., Woodcock S.A., Lawton P., Ambrose C., Baetscher M., Schneider P., Tschopp J. und Browning J.L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J Exp. Med. *190*, 1697-1710.

Mackay I.R., Groom J. und Mackay C.R. (2002). Levels of BAFF in serum in primary biliary cirrhosis and autoimmune diabetes. Autoimmunity *35*, 551-553.

Martin F. und Chan A.C. (2006). B cell immunobiology in disease: Evolving Concepts from the Clinic. Annual Review of Immunology *24*, 467-496.

Mathey E.K., Derfuss T., Storch M.K., Williams K.R., Hales K., Woolley D.R., Al Hayani A., Davies S.N., Rasband M.N., Olsson T., Moldenhauer A., Velhin S., Hohlfeld R., Meinl E. und Linington C. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. J. Exp. Med. *204*, 2363-2372.

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

Meinl E. (1999). Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. Curr. Opin. Neurol. *12*, 303-307.

Meinl E., Krumbholz M. und Hohlfeld R. (2006). B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. Ann. Neurol. *59*, 880-892.

Mizoguchi A. und Bhan A.K. (2006). A Case for Regulatory B Cells. J Immunol *176*, 705-710.

Moore P.A., Belvedere O., Orr A., Pieri K., LaFleur D.W., Feng P., Soppet D., Charters M., Gentz R., Parmelee D., Li Y., Galperina O., Giri J., Roschke V., Nardelli B., Carrell J., Sosnovtseva S., Greenfield W., Ruben S.M., Olsen H.S., Fikes J. und Hilbert D.M. (1999). BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science *285*, 260-263.

Mukhopadhyay A., Ni J., Zhai Y., Yu G.L. und Aggarwal B.B. (1999). Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. J Biol. Chem. *274*, 15978-15981.

Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) und Rieckmann P. (2006). Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. Der Nervenarzt *V77*, 1506-1518.

Nardelli B., Belvedere O., Roschke V., Moore P.A., Olsen H.S., Migone T.S., Sosnovtseva S., Carrell J.A., Feng P., Giri J.G. und Hilbert D.M. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood *97*, 198-204.

Ng L.G., Mackay C.R. und Mackay F. (2005). The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes. Molecular Immunology *42*, 763-772.

Ng L.G., Sutherland A.P.R., Newton R., Qian F., Cachero T.G., Scott M.L., Thompson J.S., Wheway J., Chtanova T., Groom J., Sutton I.J., Xin C., Tangye S.G., Kalled S.L., Mackay F. und Mackay C.R. (2004). B Cell-Activating Factor Belonging to the TNF Family (BAFF)-R Is the Principal BAFF Receptor Facilitating BAFF Costimulation of Circulating T and B Cells. J Immunol *173*, 807-817.

Noseworthy J.H., Lucchinetti C., Rodriguez M. und Weinshenker B.G. (2000). Multiple Sclerosis. N Engl J Med *343*, 938-952.

Novak A.J., Bram R.J., Kay N.E. und Jelinek D.F. (2002). Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. Blood *100*, 2973-2979.

O'Connor B.P., Raman V.S., Erickson L.D., Cook W.J., Weaver L.K., Ahonen C., Lin L.L., Mantchev G.T., Bram R.J. und Noelle R.J. (2004). BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. J. Exp. Med. *199*, 91-98.

Ohata J., Zvaifler N.J., Nishio M., Boyle D.L., Kalled S.L., Carson D.A. und Kipps T.J. (2005). Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-

activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. Journal of Immunology *174*, 864-870.

Pachner A., Narayan K., Price N., Hurd M. und Dail D. (2003a). MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. Mol. Diagn. *7*, 17-25.

Pachner A.R., Narayan K. und Pak E. (2006). Multiplex analysis of expression of three IFNbeta-induced genes in antibody-positive MS patients. Neurology. *66*, 444-446.

Pachner A.R., Bertolotto A. und Deisenhammer F. (2003b). Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of IFNbeta bioactivity: Detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB). Neurology *61*, 24S-26.

Pachner A.R., Dail D., Pak E. und Narayan K. (2005). The importance of measuring IFNbeta bioactivity: Monitoring in MS patients and the effect of anti-IFNbeta antibodies. Journal of Neuroimmunology *166*, 180-188.

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

Paty D.W. und Li D.K. (1993). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Neurology. *43*, 662-667.

Polman C.H., Kappos L., Dahlke F., Graf R., Beckmann K., Bogumil T., Pozzilli C., Thompson A.J. und the European Study Group on Interferon Beta- (2005a). Interferon beta-1b treatment does not induce autoantibodies. Neurology *64*, 996-1000.

Polman C.H., Reingold S.C., Edan G., Filippi M., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Metz L.M., McFarland H.F., O'Connor P.W., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Weinshenker B.G. und Wolinsky J.S. (2005b). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria". Annals of Neurology *58*, 840-846.

Poser C.M. (1994). The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. Ann. Neurol. *36 Suppl 2*, S180-S193.

Poser C.M., Paty D.W., Scheinberg L., McDonald W.I., Davis F.A., Ebers G.C., Johnson K.P., Sibley W.A., Silberberg D.H. und Tourtellotte W.W. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann. Neurol. *13*, 227-231.

Pradet-Balade B., Medema J.P., Lopez-Fraga M., Lozano J.C., Kolfschoten G.M., Picard A., Martinez C., Garcia-Sanz J.A. und Hahne M. (2002). An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. Embo Journal *21*, 5711-5720.

PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group (1998). Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. Lancet. *352*, 1498-1504.

Qin Y.F., Duquette P., Zhang Y.P., Talbot P., Poole R. und Antel J. (1998). Clonal expansion and somatic hypermutation of V-H genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. J. Clin. Invest. *102*, 1045-1050.

Reindl M., Khantane S., Ehling R., Schanda K., Lutterotti A., Brinkhoff C., Oertle T., Schwab M.E., Deisenhammer F., Berger T. und Bandtlow C.E. (2003). Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. Journal of Neuroimmunology *145*, 139-147.

Santos R., Weinstock-Guttman B., Tamano-Blanco M., Badgett D., Zivadinov R., Justinger T., Munschauer III F. und Ramanathan M. (2006). Dynamics of interferon-β modulated mRNA biomarkers in multiple sclerosis patients with anti-interferon-β neutralizing antibodies. Journal of Neuroimmunology *176*, 125-133.

Scapini P., Carletto A., Nardelli B., Calzetti F., Roschke V., Merigo F., Tamassia N., Pieropan S., Biasi D., Sbarbati A., Sozzani S., Bambara L. und Cassatella M.A. (2005). Proinflammatory mediators elicit the secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator (BLyS) pool that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. Blood *105*, 830-837.

Scapini P., Nardelli B., Nadali G., Calzetti F., Pizzolo G., Montecucco C. und Cassatella M.A. (2003). G-CSF-stimulated Neutrophils Are a Prominent Source of Functional BLyS. J. Exp. Med. *197*, 297-302.

Schneider P., Mackay F., Steiner V., Hofmann K., Bodmer J.L., Holler N., Ambrose C., Lawton P., Bixler S., Acha-Orbea H., Valmori D., Romero P., Werner-Favre C., Zubler R.H., Browning J.L. und Tschopp J. (1999). BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth. J. Exp. Med. *189*, 1747-1756.

Schwab M.E. (2004). Nogo and axon regeneration. Current Opinion in Neurobiology *14*, 118-124.

Serra P. und Santamaria P. (2006). To `B' regulated: B cells as members of the regulatory workforce. Trends in Immunology *27*, 7-10.

Shu H.B., Hu W.H., und Johnson H. (1999). TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. J Leukoc. Biol. *65*, 680-683.

Sibley W.A., Bamford C.R. und Clark K. (1985). Clinical viral infections and multiple sclerosis. Lancet. *1*, 1313-1315.

Sorensen P.S., Deisenhammer F., Duda P., Hohlfeld R., Myhr K.M., Palace J., Polman C., Pozzilli C. und Ross C. (2005). Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody

measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. European Journal of Neurology *12*, 817-827.

Sorensen P.S., Ross C., Clemmesen K.M., Bendtzen K., Frederiksen J.L., Jensen K., Kristensen O., Petersen T., Rasmussen S., Ravnborg M., Stenager E. und Koch-Henriksen N. (2003). Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. The Lancet *362*, 1184-1191.

Sospedra M. und Martin R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. Annual Review of Immunology *23*, 683-747.

Stohl W., Cheema G.S., Briggs W.S., Xu D., Sosnovtseva S., Roschke V., Ferrara D.E., Labat K., Sattler F.R., Pierangeli S.S. und Hilbert D.M. (2002). B Lymphocyte Stimulator Protein-Associated Increase in Circulating Autoantibody Levels May Require CD4+ T Cells: Lessons from HIV-Infected Patients. Clinical Immunology *104*, 115-122.

Takahashi T., Fujihara K., Nakashima I., Misu T., Miyazawa I., Nakamura M., Watanabe S., Shiga Y., Kanaoka C., Fujimori J., Sato S. und Itoyama Y. (2007). Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. Brain. *130*, 1235-1243.

Tangye S.G., Bryant V.L., Cuss A.K. und Good K.L. (2006). BAFF, APRIL and human B cell disorders. Seminars in Immunology *18*, 305-317.

Thangarajh M., Gomes A., Masterman T., Hillert J. und Hjelmstrom P. (2004). Expression of B-cell-activating factor of the TNF family (BAFF) and its receptors in multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology *152*, 183-190.

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Neurology. *43*, 655-661.

The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2007). Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. N Engl J Med *357*, 851-862.

Theofilopoulos A.N., Baccala R., Beutler B. und Kono D.H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. Annual Review of Immunology *23*, 307-336.

Thompson J.S., Schneider P., Kalled S.L., Wang L., Lefevre E.A., Cachero T.G., Mackay F., Bixler S.A., Zafari M., Liu Z.Y., Woodcock S.A., Qian F., Batten M., Madry C., Richard Y., Benjamin C.D., Browning J.L., Tsapis A., Tschopp J. und Ambrose C. (2000). BAFF Binds to the Tumor Necrosis Factor Receptor-like Molecule B Cell Maturation Antigen and Is Important for Maintaining the Peripheral B Cell Population. J. Exp. Med. *192*, 129-136.

Torcia M., Bracci-Laudiero L., Lucibello M., Nencioni L., Labardi D., Rubartelli A., Cozzolino F., Aloe L. und Garaci E. (1996). Nerve Growth Factor Is an Autocrine Survival Factor for Memory B Lymphocytes. Cell *85*, 345-356.

Toubi E., Gordon S., Kessel A., Rosner I., Rozenbaum M., Shoenfeld Y. und Zuckerman E. (2006). Elevated serum B-Lymphocyte activating factor (BAFF) in chronic hepatitis C virus infection: Association with autoimmunity. Journal of Autoimmunity *27*, 134-139.

Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R.M., Rudick R., Mork S. und Bo L. (1998). Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. N Engl J Med *338*, 278-285.

Vargas-Leal V., Bruno R., Derfuss T., Krumbholz M., Hohlfeld R. und Meinl E. (2005). Expression and Function of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Ligands and Their Receptors on Human Immune Cells. J Immunol *175*, 2301-2308.

von Wussow P., Jakschies D., Hochkeppel H.K., Fibich C., Penner L. und Deicher H. (1990). The human intracellular Mx-homologous protein is specifically induced by type I interferons. Eur. J. Immunol. *20*, 2015-2019.

Walsh M.J. und Tourtellotte W.W. (1986). Temporal Invariance and Clonal Uniformity of Brain and Cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in Multiple-Sclerosis. Journal of Experimental Medicine *163*, 41-53.

Wandinger K.P., Lunemann J.D., Wengert O., Bellmann-Strobl J., Aktas O., Weber A., Grundstrom E., Ehrlich S., Wernecke K.D., Volk H.D. und Zipp F. (2003). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. Lancet *361*, 2036-2043.

Warabi Y., Matsumoto Y. und Hayashi H. (2007). Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination. J. Neurol. Sci. *252*, 57-61.

Warrington A.E., Asakura K., Bieber A.J., Ciric B., Van Keulen V., Kaveri S.V., Kyle R.A., Pease L.R. und Rodriguez M. (2000). Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. PNAS *97*, 6820-6825.

Weinstock-Guttman B., Ransohoff R.M., Kinkel R.P. und Rudick R.A. (1995). The interferons: biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis. Ann. Neurol. *37*, 7-15.

Wucherpfennig K.W., Catz I., Hausmann S., Strominger J.L., Steinman L. und Warren K.G. (1997). Recognition of the Immunodominant Myelin Basic Protein Peptide by Autoantibodies and HLA-DR2-restricted T Cell Clones from Multiple Sclerosis Patients. Identity of Key Contact Residues in the B-cell and T-cell Epitopes. J. Clin. Invest. *100*, 1114-1122.

Yan M., Wang H., Chan B., Roose-Girma M., Erickson S., Baker T., Tumas D., Grewal I.S. und Dixit V.M. (2001). Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. Nat. Immunol. *2*, 638-643.

Yong V.W., Chabot S., Stuve O. und Williams G. (1998). Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis - Mechanisms of action. Neurology *51*, 682-689.

Yong V.W. (2002). Differential mechanisms of action of interferon-β and glatiramer acetate in MS. Neurology *59*, 802-808.

Zhang J., Roschke V., Baker K.P., Wang Z., Alarcon G.S., Fessler B.J., Bastian H., Kimberly R.P. und Zhou T. (2001). Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J Immunol *166*, 6-10.

Zhang J., Hutton G. und Zang Y. (2002). A comparison of the mechanisms of action of interferon beta and glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. Clinical Therapeutics *24*, 1998-2021.

8 Danksagung

Meinem Betreuer **Herrn Dr. Markus Krumbholz** danke ich für die ausgezeichnete Einführung sowohl in die experimentellen Arbeitstechniken als auch in die Tücken von Excel und anderen Softwareprogrammen sowie die stets vorhandene Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen Phasen meiner Doktorarbeit.

Meinem Doktorvater **Herrn Prof. Edgar Meinl** gilt mein ganz besonderer Dank für sein enormes Engagement mit ständiger Verfügbarkeit, seinen unglaublichen Wissensschatz, die angenehme menschliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses spannenden Themas.

Herrn Prof. Reinhard Hohlfeld, Direktor des Institutes für klinische Neuroimmunologie der LMU München, sei gedankt für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seinen ansteckenden Enthusiasmus auf dem Gebiet der MS-Forschung.

Herrn Prof. Hartmut Wekerle, Direktor der Abteilung Neuroimmunologie des Max-Planck-Institutes für Neurobiologie in Martinsried, danke ich für die anregende wissenschaftliche Umgebung und die hervorragende Infrastruktur seiner Abteilung.

Frau Dr. Tania Kümpfel, **Frau Dr. Hannah Pellkofer**, **Herr Dr. Tobias Derfuß** (alle Neurologische Klinik des Universitätsklinikums Großhadern) und **Frau Dr. Camelia Ionescu** (Marianne-Strauss-Klinik, Kempfenhausen) haben sich als fleißige Sammler von Blutproben unverzichtbar gemacht.

Herr Prof. Dr. Dr. Heesemann (Lehrstuhl Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes der LMU München) hat mit dem von ihm ins Leben gerufenen Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ des Förderprogrammes für Forschung und Lehre (FöFoLe) meine Arbeit nicht nur finanziell großartig unterstützt, sondern vor allem auch über das attraktive Rahmenprogramm wesentlich zu meiner Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten beigetragen.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

	Hans Faber geboren am 27.09.1978 in Freiburg im Breisgau ledig

SCHULAUSBILDUNG

1995	Viermonatiger Aufenthalt in England
1998	Abitur am Friedrich-Gymnasium, Freiburg

ZIVILDIENST

1998 – 1999	Mobile Soziale Dienste, Arbeiterwohlfahrt Freiburg

HOCHSCHULAUSBILDUNG

1999 – 2001	Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Herbst 2001	Ärztliche Vorprüfung
Oktober 2001	Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München
Herbst 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2002	Aufnahme in den Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“
Frühjahr 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2005 – März 2006	Praktisches Jahr in München Allgemeinchirurgie, KH Dritter Orden Neurochirurgie, Klinikum Großhadern Medizinische Poliklinik Innenstadt Dermatologie, Klinikum Innenstadt der LMU
Mai 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2006	Approbation als Arzt

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

März – September 2007	Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg
Seit Oktober 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Neurologie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München-Schwabing

10 Publikationen

Krumbholz M.*, Faber H.*, Steinmeyer F., Hoffmann L.A., Kümpfel T., Pellkofer H., Derfuss T., Ionescu C., Starck M., Hafner C., Hohlfeld R. und Meinl E. (2008). Interferon-β increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. Brain *131*, 1415-1463.
* Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu der Arbeit bei.

Hoffmann L.A., Krumbholz M., Faber H., Kümpfel T., Starck M., Pöllmann W., Meinl E. und Hohlfeld R. (2007). Multiple sclerosis: Relating MxA transcription to anti-interferon-beta-neutralizing antibodies. Neurology *68*, 958-959.