

Medizinische Fakultät, Universität Rostock

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Reiner Benecke

Analyse des klinischen Verlaufs und der differentiellen Genexpression Interferon- β 1a therapierter Patienten mit Multipler Sklerose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Christian Wilhelm Fatum

geboren am 05.04.1983 in Münster

Rostock 2013

Gutachter

1. Gutachter

Prof. Dr. med. Uwe K. Zettl

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Rostock

2. Gutachter

Prof. Dr. med. Hayrettin Tumani

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Ulm

3. Gutachter

Prof. Dr. med. Juergen H. Faiss

Klinik für Neurologie am Asklepios Fachklinikum Teupitz

Datum der Einreichung: 29.10.2012

Datum der Verteidigung: 11.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Einleitung.....	4
1.1	Epidemiologie	5
1.2	Ätiologie und Pathogenese.....	5
1.3	Klinik.....	9
1.3.1	Symptomatik	9
1.3.2	Krankheitsverlauf und Prognose	10
1.3.3	Diagnostik	16
1.3.4	Therapie.....	18
1.3.5	Interferon- β Therapie	22
1.4	Prädiktive Marker für den Therapieerfolg.....	24
1.4.1	Molekularbiologische Biomarker.....	27
1.4.2	RNA-Profilng.....	28
2	Fragestellung.....	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Aufbau der Studie.....	32
3.2	Patientenpopulation	33
3.3	Klinische Beurteilung der Patienten.....	35
3.3.1	Response- und Non-Response Kriterien	35
3.3.1.1	Schubfrequenz.....	35
3.3.1.2	Progression	35
3.3.2	Ermittlung paraklinischer Befunde	36
3.3.3	Ermittlung des Nebenwirkungsprofils	36

3.4	Genexpressionsanalytik.....	37
3.4.1	Affymetrix GeneChip®-Technologie	37
3.4.2	Genexpressionsanalyse.....	37
3.4.3	Filterung Interferon induzierter und reprimierter Gene	39
3.5	Funktionelle Genanalytik und Netzwerkmodellierung	41
3.5.1	Biologische Funktionen der gefilterten Gene.....	41
3.5.2	Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen.....	42
3.5.3	Modell des genregulatorischen Netzwerks	43
3.6	Identifikation prädiktiver Marker	44
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Klinik.....	46
4.1.1	Klinische und soziodemographische Merkmale der Patientenpopulation	46
4.1.2	Schubfrequenz	48
4.1.3	Krankheitsprogression.....	50
4.1.4	Morphologische Befunde in der Magnetresonanztomographie	53
4.1.5	Nebenwirkungen der Interferon- β Therapie.....	56
4.2	Differentielle Genexpression.....	57
4.2.1	Transkriptionelle Änderungen im Blut durch die IFN- β 1a Therapie.....	57
4.2.2	Funktionelle Analyse der exprimierten Gene.....	59
4.3	Netzwerkanalyse	60
4.3.1	Identifikation von Transkriptionsfaktor-Gen Interaktionen	60
4.3.2	Netzwerk Interferon-modulierter Gene	62
4.4	Assoziation von Expressionsmustern und den klinischen Daten	65
4.4.1	Grippale Nebenwirkungen und deren assoziierte Gene	65
4.4.2	Differentielle Genexpression für die Kriterien EDSS und Schub	67
4.4.3	Differentielle Genexpression für das Kriterium MRT	69

5	Diskussion	70
6	Zusammenfassung	84
7	Literaturverzeichnis	87
8	Wissenschaftliches Verzeichnis	98
8.1	Abbildungsverzeichnis	98
8.2	Tabellenverzeichnis	99
8.3	Abkürzungsverzeichnis	100
9	Anhang.....	102
A	Liste der ermittelten, differentiell exprimierten Gene.....	102
B	Graphische Darstellung eines MA-Plots	105
C	Ergänzende Erläuterungen zur Methodik der vorliegenden Arbeit.....	106
10	Thesen zur Dissertation.....	107
11	Eidesstattliche Erklärung	110
12	Danksagung	111

1. Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine immunmedierte Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie ist die häufigste nicht-traumatische Ursache für eine schwerwiegende, neurologische Behinderung des jungen Erwachsenen [World Health Organization, WHO 2004]. Die Erkrankung ist durch entzündliche Prozesse an den Myelinscheiden mit Demyelinisierung und Axonschädigung sowie einer Degeneration der zentralen Nervenfasern gekennzeichnet und führt zu diversen neurologischen Defiziten. In ihrer häufigsten Form hat sie einen schubförmig-intermittierenden Verlauf (Kapitel 1.3.2 Krankheitsverlauf und Prognose). Die Ursache der MS ist bisher nicht bekannt, aufgrund dieser Tatsache existieren bisher keine kausalen Behandlungsmöglichkeiten. Genetische Einflüsse, Umweltfaktoren sowie eine autoimmunologische Dysfunktion werden mit der Pathogenese der Erkrankung in Verbindung gebracht [Weiner 2009, Compston & Coles 2008, Sospedra & Martin 2005]. Die Therapie stützt sich gegenwärtig auf eine immunmodulatorische Stufentherapie, die im Falle von auftretenden Symptomen durch eine symptomatische Behandlung ergänzt wird [Rieckmann 2006, Leitlinien zur MS, DGN 2012]. Zudem werden psychosoziale Bewältigungsstrategien, das sogenannte *Coping* eingesetzt, um dem Patienten einen besseren Umgang mit der Krankheit ermöglichen zu können [Apel et al. 2006]. Die Immunmodulation zielt auf eine Verringerung der Schubfrequenz und Krankheitsprogression ab und versucht die Entstehung neuer Hirnläsionen und einer Hirnatrophie zu verhindern. In der Behandlung der schubförmigen MS hat sich rekombinantes Interferon- β weltweit als Standard etabliert.

Trotz einer vergleichsweise guten Wirkung hat die Behandlung mit Interferonen- β nicht bei allen Patienten einen ausreichenden therapeutischen Effekt. Etwa ein Drittel aller Patienten leidet auch während der Therapie unter einer gleichbleibend hohen oder gesteigerten Krankheitsaktivität [Hemmer & Hartung 2007, Waubant et al. 2003]. Ziel aktueller Forschungen und der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, die individuelle Wirksamkeit der Interferon- β Therapie frühzeitig zu prognostizieren und dessen medikamentöse Wirkungsweise auf transkriptioneller Ebene besser zu verstehen [Zettl & Goertsches 2009].

1.1. Epidemiologie

Die MS ist die häufigste immunologische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Europa und Nordamerika. Schätzungen zufolge sind gegenwärtig etwa 2,5 Millionen Menschen weltweit an der MS erkrankt [WHO 2004]. In Europa, Nordamerika und Australien tritt die Krankheit mit einer Prävalenzrate von über 50/100.000 Menschen auf. Die MS zeigt global gesehen ein deutliches Nord-Süd-Gefälle, wobei in äquatorialen Gegenden eine besonders geringe Erkrankungshäufigkeit vorliegt. Das typische Erkrankungsalter findet sich bei 80% der Erkrankten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Durchschnittlich vergehen 12-24 Monate zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung [Multiple Sclerosis International Foundation. <http://www.msif.org>]. Frauen sind häufiger von der MS betroffen als Männer, für Deutschland beträgt das Erkrankungsverhältnis gegenwärtig 3:1 [Flachenecker et al. 2008]. Familienstudien haben gezeigt, dass das Risiko einer MS für Verwandte ersten Grades von MS-erkrankten Patienten erhöht ist, was auf genetische Einflüsse schließen lässt. Angeheiratete und adoptierte Familienmitglieder haben hingegen kein erhöhtes MS-Erkrankungsrisiko [Nielsen et al. 2005]. Die MS wird in allen ethnischen Gruppen beschrieben, bei Kaukasiern nordeuropäischer Herkunft ist sie jedoch besonders häufig. Mongolen, Japaner, Chinesen sowie Inuit erkranken sehr selten an MS. Dies ist weitestgehend unabhängig von der geographischen Region in der sie leben. Migrationsstudien haben gezeigt, dass Personen das Erkrankungsrisiko des neuen Wohnortes annehmen, wenn sie bis zum 15. Lebensjahr das Risikogebiet wechseln. Die Assoziation des Erkrankungsrisikos mit der Herkunft des Patienten lässt auf bisher nicht identifizierte Umweltfaktoren (z.B. Hygienestandards oder Virusinfektionen) schließen [Milo & Kahana 2010, Winkelmann et al. 2011].

1.2. Ätiologie und Pathogenese

Der chronisch-entzündliche Prozess der MS zeigt vordergründig eine Demyelinisierung und Axonschädigung, welche prinzipiell das gesamte ZNS betreffen kann. Eine Prädisposition findet sich für die Sehnerven, den Hirnstamm, das Kleinhirn sowie die periventrikuläre weiße Substanz. Wesentliches strukturelles Merkmal ist der fokale entzündliche, scharf begrenzte Entmarkungsherd, der mit astrozytärer Gliose und variabler Axonschädigung einhergeht.

Diese pathomorphologischen Befunde wurden bereits 1898 von Charcot, dem Erstbeschreiber der MS, publiziert. Das Infiltrat der MS-Läsion besteht im Wesentlichen aus CD4-positiven Th1- Helferzellen, CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen-Mikroglia- Ansammlungen sowie wenigen B-Zellen und Plasmazellen [Brück 2005, Sospedra & Martin 2005, Compston & Coles, 2008]. Die experimentelle Grundlage der Forschungsbemühungen zur Pathophysiologie der MS bildet die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis im Mausmodell (EAE) [Padejdl et al. 2012, Mix et al. 2010]. Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist die Ätiologie der Erkrankung nach wie vor ungeklärt. Intensiv diskutiert werden in diesem Zusammenhang autoimmunologische, infektiöse und neurodegenerative Mechanismen [Winkelmann et al. 2011, Hemmer et al. 2002 & 2006, Meinl 1999]. Diese, auf experimentellen Grundlagen basierenden Erkenntnisse, werden vorrangig in den folgenden drei pathogenetischen Modellen- bzw. Hypothesen zusammengefasst:

- Autoimmun- bzw. Immundysregulationshypothese,
- Infektions- bzw. Hygienehypothese und
- Neurodegenerationshypothese

Für den entzündlichen Prozess der MS ist nach heutigem Kenntnisstand zunächst eine Aktivierung des Immunsystems in der Peripherie notwendig. Aktivierten T-Zellen ist es möglich die Barriere der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden. Für Immunglobuline ist die BHS physiologisch praktisch undurchlässig [Wekerle et al. 1986].

Nach der Autoimmunhypothese werden enzephalitogene Antigene in der Peripherie durch Antigen präsentierende Zellen (APC) in den lymphatischen Geweben prozessiert. T-Zellen sind im Gegensatz zu B-Zellen nicht in der Lage freie Antigene zu erkennen. Nach Überwindung der BHS ist eine Reaktivierung der T-Zellen im ZNS notwendig. Als APC kommen hierbei vor allem die fakultativ Multihistokompatibilitätskomplex (MHC) exprimierenden Mikrogliazellen und Astrozyten in Frage [Aloisi et al. 2000].

Der Aktivierungsweg nach der Infektionshypothese läuft nach einem ähnlichen Mechanismus ab. Hierbei könnte es durch eine Kreuzaktivierung aufgrund von Sequenzhomologien zwischen Viren und Antigenen im ZNS zu einem *molecular mimicry* kommen [Fujinami & Oldstone 1985]. Nach Penetration der BHS kommt es dann zur Reaktivierung der Lymphozyten

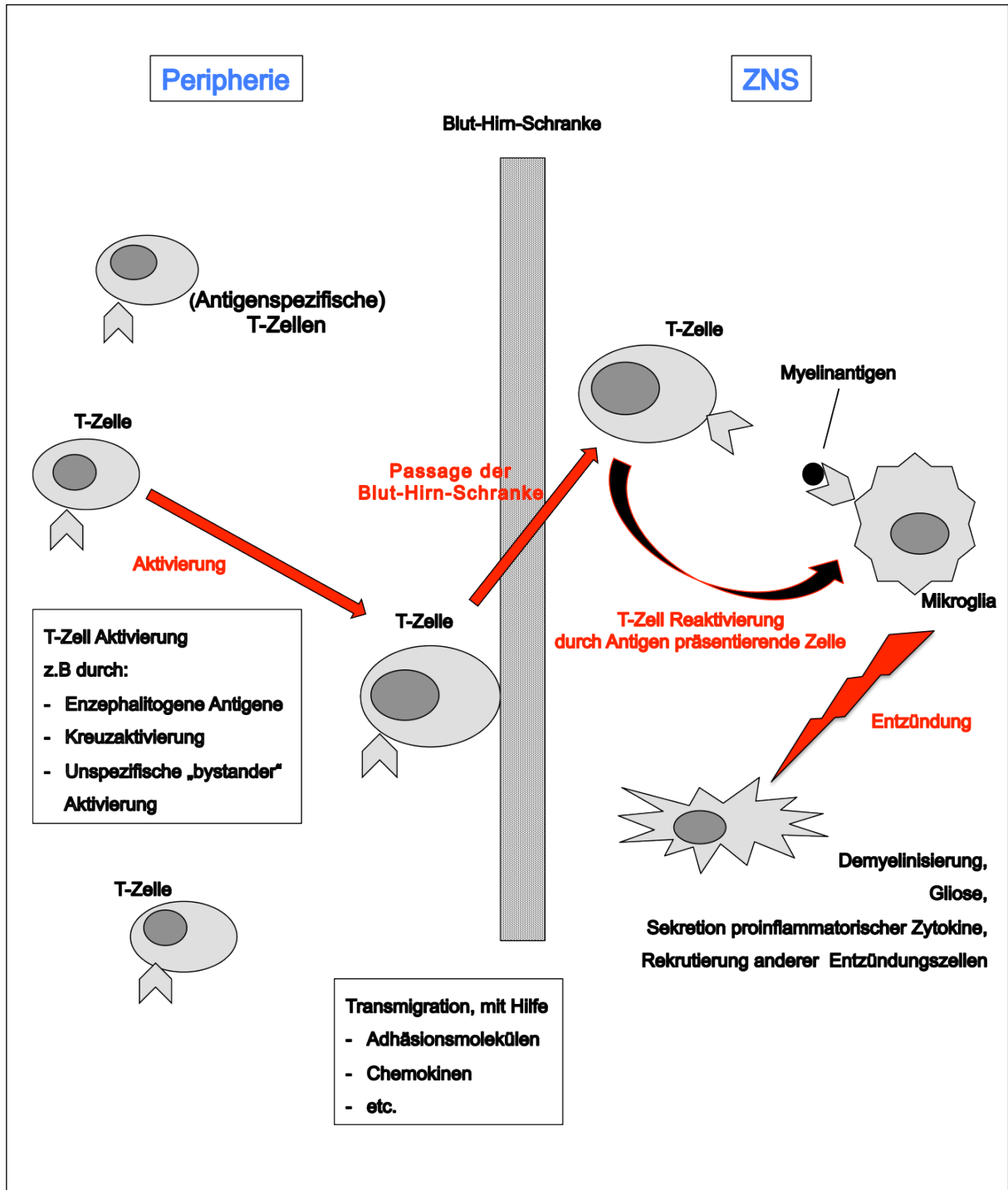
und konsekutiv zu einer Entzündung nach dem MS-typischen Muster. Möglich ist auch eine indirekte Aktivierung autoreaktiver T-Zellen nach dem Prinzip der *bystander activation*. Hierbei könnte es im Rahmen einer spezifischen Reaktion des Organismus gegen ein virales Antigen zu einer unspezifischen autoreaktiven T-Zellaktion gegen ZNS-Antigene kommen [Lipton et al. 2007]. Die Aktivierung von T-Zellen führt konsekutiv zur Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokinrezeptoren, die den autoimmunologischen Prozess unterhalten und amplifizieren.

Die Hygienehypothese steht in einem engen inhaltlichen Zusammenhang zur Infektionshypothese. Man geht davon aus, dass die Auseinandersetzung des körpereigenen Immunsystems mit typischen Infektionen bestimmter Lebensabschnitte sowie dem unterschiedlichen Aufkommen bestimmter Infektionen in unterschiedlichen Lebensräumen und Regionen mit der Entstehung der MS vergesellschaftet ist und hierdurch eine vermehrte oder reduzierte Häufigkeit für das Vorkommen der MS entsteht [Winkelmann et al. 2011, Gardner et al. 2009].

Die Neurodegenerationshypothese stützt sich auf Beobachtungen von Patienten, die charakteristische MS-Läsionen ohne einen erkennbaren immunvermittelten, pathologischen Prozess aufweisen. In der gängigen Hypothese wird davon ausgegangen, dass die MS-auslösenden Myelinschäden ohne Beteiligung des Immunsystems, z.B. durch ein Trauma entstanden seien könnten. In diesem Szenario gilt die gegen das Myelin gerichtete Immunantwort als Ergebnis und nicht als Ursache des pathogenen Prozesses. In einer aktuellen Studie zur Neurodegenerationshypothese im experimentellen Mausmodell (EAE), konnte die Entstehung einer MS nach diesem Pathomechanismus nicht bestätigt werden [Locatelli et al. 2012].

Die wesentlichen Prozesse des Pathomechanismus bei der Entstehung der MS sind in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Pathomechanismus der Multiplen Sklerose



Die Abbildung zeigt ein Schema der Immunpathogenese der MS. Berücksichtigt wurden die im Text dargestellten Hypothesen zur Pathogenese. Autoreaktive T-Zellen passieren die Blut-Hirn-Schranke und lösen nach Reaktivierung durch Autoantigene (hier: durch Mikroglia präsentiertes Myelinprotein) im ZNS eine Entzündungsreaktion aus, die schließlich zur Demyelinisierung und Gliose führt.

1.3. Klinik

1.3.1. Symptomatik

Aufgrund der Dissemination und variablen Lokalisation der MS-Läsionen an den unterschiedlichsten Stellen des ZNS weisen die betroffenen Patienten vielfältige neurologische Symptome auf. In der klinischen Praxis zeigen sich einige charakteristische Symptome, die jedoch nicht spezifisch für die MS sind. Da Auftreten und Intensität der Symptome zudem zeitlich disseminiert sind, ist die Erkrankung in ihrem Verlauf sehr vielgestaltig. Eine uniforme Symptomkonstellation existiert nicht. Häufig beginnt die Erkrankung mit einem akut oder subakut auftretenden, isolierten Einzelsymptom bzw. klinisch isolierten Syndrom (CIS), entsprechend einer einzelnen zentralnervösen Läsion, wie etwa einer Sehstörung, Parästhesie oder Parese, die sich mit Abklingen des Schubes meist vollständig zurückbildet. Eine Übersicht über die Häufigkeit der Symptome zu Beginn und im Verlauf der MS gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Klinische Symptomatik zu Beginn und im Verlauf [Poser & Ritter 1980]

Symptomatik	Initial in %	Verlauf in %
Spastik oder Babinski Zeichen	29	85
Paresen	45	85
Hirnstamm oder zerebelläre Symptome	24	79
Sensibilitätsstörungen	42	86
Blasen- oder Darmstörungen	9	61
Optikusneuritis	33	62
Mentale oder psychische Störungen	4	39
Funktionsstörungen des N. Trigemini oder N. facialis	10	30
Augenmotilität	14	36

Nach dem EDSS (Tabelle 2) werden die Symptome verschiedenen Funktionssystemen (Tabelle 3) zugeordnet. Es werden Störungen der Motorik und Koordination (Spastik, Muskelschwäche, Ataxie, Tremor), Störungen im Bereich der Hirnnerven (Nystagmus, Dysarthrie, Zentralskotom), vegetative Störungen (Blasen- und Mastdarmschwäche, Sexualfunktionsstörungen), neuropsychologische Symptome (kognitive Defizite, Fatigue, Depression) sowie Schmerzen und paroxysmale Symptome (epileptischer Anfall) unterschieden. Darüber hinaus

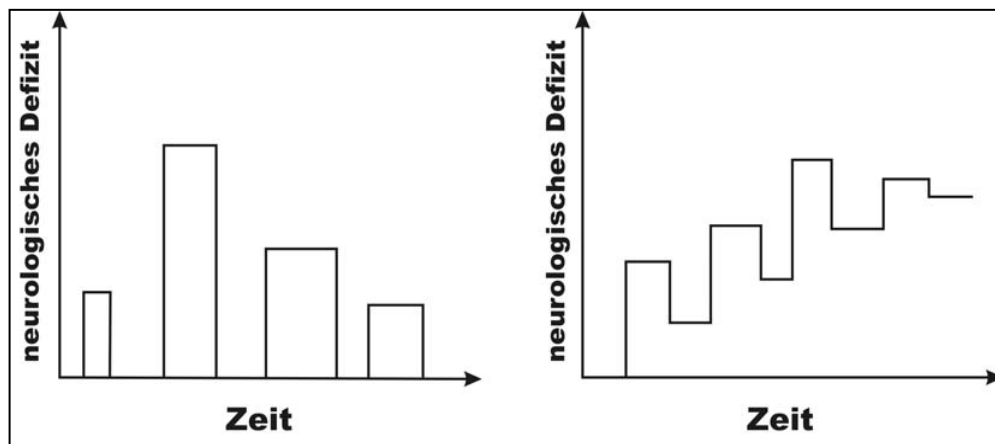
findet sich bei vielen Patienten eine Verstärkung der Beschwerden durch physische und psychische Belastungssituationen sowie durch Hitze oder Kälte (Uthoff-Phänomen).

1.3.2. Krankheitsverlauf und Prognose

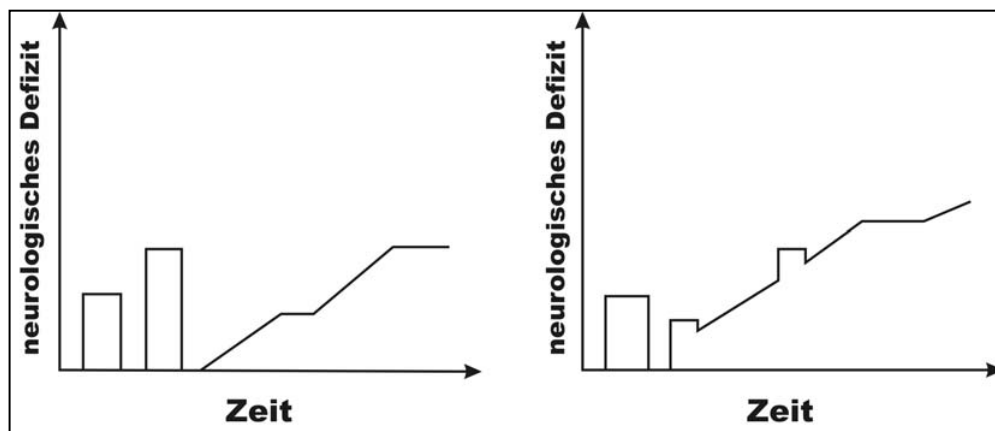
Die Erscheinungsformen der MS und dessen Verlauf reichen von einem CIS bis hin zu einem chronisch-progredienten Verlauf, der mit und ohne Schüben einhergehen kann. International hat sich die Unterscheidung der folgenden Verlaufsformen etabliert [Lublin & Reingold, 1996, Zettl et al. 2012] (Abbildung 2):

- Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)
- Radiologisch isoliertes Syndrom (RIS)
- Schubförmiger Verlauf (RRMS)
- Sekundär chronisch-progredienter Verlauf mit und ohne aufgesetzten Schüben (SPMS)
- Primär chronisch-progredienter Verlauf (PPMS)

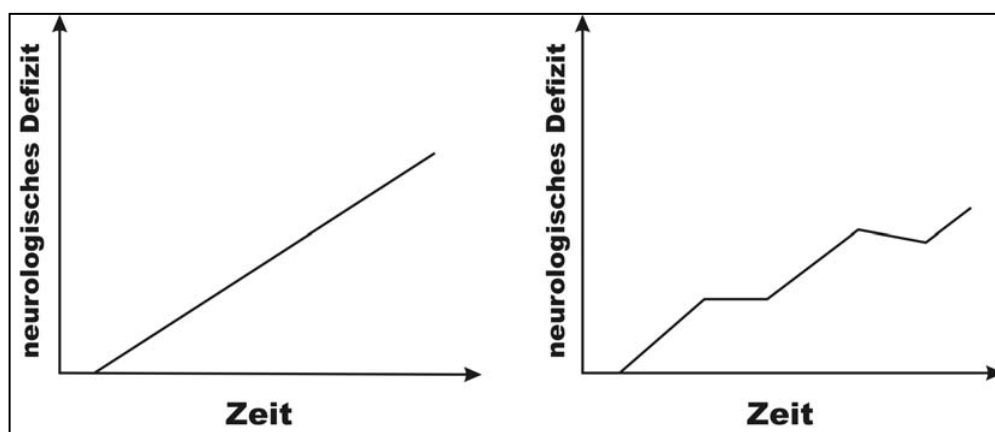
Die Erkrankung verläuft bei 80% der Patienten zunächst schubförmig mit kompletter oder partieller Rückbildung der Symptomatik im Intervall (RRMS), etwa 10-15% zeigen eingangs den primär chronisch-progredienten Typ (PPMS) [Thompson et al. 1997]. Mit zunehmender Erkrankungsdauer geht die MS bei vielen Patienten in die sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform über (SPMS). Dies ist ohne Behandlung nach 10 bis 15 Jahren bei etwa 50% der Patienten der Fall [Weinshenker 1998]. Nach 20-jähriger Erkrankungsdauer ist die chronisch-progrediente MS bei 90% der Patienten die dominierende Verlaufsform. Primär progrediente Verläufe treten in 10-20% der Fälle auf [Trojano et al. 2003]. In den meisten Fällen bilden sich die Symptome eines Schubes innerhalb von ein bis zwei Monaten zurück. Neu aufgetretene Beschwerden, die über sechs Monate persistieren, senken die Rückbildungswahrscheinlichkeit der Symptome auf unter 5% [Ellison et al. 1994]. Beim natürlichen Verlauf der unbehandelten MS liegt die Schubrate initial bei ca. ein bis zwei Schüben pro Jahr und nimmt dann in den folgenden Jahren kontinuierlich ab [Tremlett et al. 2008].

Abbildung 2: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

a) Schubförmiger Verlauf mit und ohne Remission



b) Sekundär chronisch-progredienter Verlauf ohne und mit Schüben



c) Primär chronisch-progredienter Verlauf ohne und mit Plateaus

Ein Schub ist nach den McDonald-Kriterien von 2001 [McDonald et al. 2001] definiert als ein neurologisches Defizit, das

- mindestens über 24 Stunden nachweisbar ist,
- ein Zeitintervall von mindestens 30 Tagen zu vorausgegangenen Schüben nicht unterschreitet und
- dessen Auftreten nicht mit der Erhöhung der Körpertemperatur im Sinne eines Uthoff Phänomens oder im Rahmen einer Infektion erklärbar ist.

Paroxysmale Episoden sind definitionsgemäß keine Schübe. Auch subjektiv berichtete Ereignisse werden als Schub gewertet, sofern sie den Schubkriterien entsprechen. Klinische Ereignisse, die das vorgeschriebene 30 Tage Zeitintervall unterschreiten, werden als Exazerbation des vorausgegangenen Schubes gewertet.

Der schubförmige Verlauf ist durch abgrenzbare klinische Ereignisse gekennzeichnet, die mit einer vollständigen oder unvollständigen Remission der aufgetretenen Defizite einhergehen können (Abbildung 2a). Die sekundär chronisch-progrediente Form ist durch einen initial rein schubförmigen Verlauf gekennzeichnet, der anschließend in eine permanente Verschlechterung der Erkrankung ohne Remissionen mündet (Abbildung 2b). Der primär chronisch-progrediente Verlauf zeigt von Krankheitsbeginn an eine permanente Verschlechterung der neurologischen Defizite, wobei es zu einer scheinbaren Stagnation während einzelner Plateauphasen, aber auch zu verschärften Komplikationen durch Schübe kommen kann. Eine Remission zeigen diese Patienten nicht oder nur geringfügig (Abbildung 2c). Definitionsgemäß wird bei einem chronisch progredienten Verlauf eine kontinuierliche Zunahme der Symptome und Ausfallserscheinungen über mindestens sechs Monate hinweg gefordert. Eine hohe Anzahl von Schüben innerhalb der ersten beiden Krankheitsjahre ist oft mit rascherer Progredienz verbunden [Weinshenker 1998]. Etwa 10-15% der Patienten haben im Verlauf der Erkrankung keine Schübe, bei ihnen beginnt die Erkrankung bereits mit einer schleichen- den Zunahme neurologischer Symptome (PPMS).

Als radiologisch isoliertes Syndrom (RIS) wird eine MS-typische MRT-Läsion in einem zufällig (z.B. im Rahmen von Studien) durchgeführten MRT-Scan bezeichnet, die aufgrund ihrer Morphologie keinem anderen Krankheitsbild zugerechnet werden kann und bei deren Detektion noch keine MS-typischen, klinischen Symptome vorgelegen haben. Nach zehn Jahren lässt sich bei etwa einem Drittel dieser Patienten eine zeitliche und räumliche Dissemination der MRT-Läsionen nachweisen. Insbesondere Patienten mit Kontrastmittel-anreichernden Läsionen weisen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer MS auf [Zettl et al. 2012]

Der Krankheitsverlauf ist im Einzelfall bezüglich der Schubaktivität und Progredienz sehr heterogen. Um den Krankheitsverlauf beschreiben zu können ist neben der Schubfrequenz ein weiteres Bewertungskriterium nötig. Der hierfür international gebräuchliche Goldstandard ist der „*Expanded Disability Status Scale* (EDSS)“ (Tabelle 2) [Kurtzke 1983]. Er beschreibt den jeweils aktuellen Status des Patienten bei der klinischen Untersuchung und kann somit über die Schwere eines Schubes oder die Progression Auskunft geben. Darüber hinaus lassen sich retro- und prospektiv Aussagen über den Verlauf machen. Zur weiteren Quantifizierung der krankheitsbedingten Einschränkungen hat sich in den letzten Jahren zusätzlich die *Multiple Sclerosis Functional Composite Scale* (MSFC) etabliert. Hierbei werden anhand von drei standardisierten Tests die Gehstrecke (*timed 10 foot walk*, 7,6m), ein Steckbrett-Test nach Zeit zur Quantifizierung der Armfunktion (*9 hole-peg test*) und ein Aufmerksamkeits- und Konzentrationstest (*Paced Auditory Serial Addition Test*, PASAT) durchgeführt. Nach Berechnung eines z-Scores können inter- und intraindividuelle Vergleiche angestellt werden [Cutter et al. 1999, Schwid et al. 2002].

Tabelle 2: Expanded Disability Status Scale (EDSS) [Kurtzke 1983]

Punkt wert	Beschreibung
0,0	Neurologische Untersuchung ohne pathologischen Befund
1,0	Keine Behinderung, minimale Zeichen in einem Funktionsgrad (FS) (Grad 1)
1,5	Keine Behinderung, minimale Zeichen in mehr als einem FS (Grad 1)
2,0	Minimale Behinderung in einem FS (ein FS Grad 2, andere 0 oder 1)
2,5	Minimale Behinderung in zwei FS (zwei FS Grad 2, andere 0 oder 1)
3,0	Mäßige Behinderung in einem FS oder leichte Behinderung in 3 oder 4 FS und uneingeschränkt gehfähig
3,5	Uneingeschränkt gehfähig, aber mäßige Behinderung in einem FS (Grad 3) und ein oder zwei FS (Grad 2) oder zwei FS Grad 3 oder fünf FS Grad 2 (andere 0 oder 1)
4,0	Gehfähig ohne Hilfe für 500m; selbstständig etwa 12h am Tag trotz relativ schwerer Behinderung FS Grad 4 (andere 0 oder 1) oder Kombination geringer Schweregrade, die Vorausgegangene Schritte übersteigen
4,5	Gehfähig mit Hilfe für etwa 300m, die meiste Zeit des Tages auf, vollschichtig arbeitsfähig, aber evtl. mit Einschränkung oder Hilfe, relativ schwere Behinderung mit einem FS Grad 4 (andere 0 oder 1) oder Kombination geringer Schweregrade
5,0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für etwa 200m, Behinderung stark genug um tägliche Aktivitäten einzuschränken (ein FS Grad 5, andere 0 oder 1) oder Kombination leichter Schweregrade die Schritt 4,0 überschreiten
5,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für etwa 100m; Behinderung stark genug um volle Tagesaktivität einzuschränken (üblicherweise ein FS Grad 5, andere 0 oder 1) oder Kombination leichter Schweregrade die Schritt 4,0 überschreiten
6,0	Intermittierend oder konstant eine Gehhilfe nötig, um etwa 100m zu gehen
6,5	Konstante, beidseitige Gehunterstützung notwendig um etwa 20m ohne Pause zu gehen
7,0	Unfähig mehr als 5m, auch mit Gehhilfe zu gehen; weitgehend auf den Rollstuhl angewiesen, fährt selbst im Rollstuhl, macht Transfer alleine; sitzt etwa 12h am Tag im Rollstuhl
7,5	Unfähig mehr als wenige Schritte zu gehen; auf den Rollstuhl beschränkt, benötigt Hilfe zum Transfer, fährt selbst, benötigt aber evtl. einen Elektrorollstuhl
8,0	Weitgehend auf das Bett beschränkt, kann aber die meiste Zeit des Tages sitzen, Körperpflege ist weitgehend selbstständig möglich; Armbewegung ohne größere Funktionseinschränkung
8,5	Weitgehend für die meiste Zeit des Tages auf das Bett angewiesen, einige Funktionen der Arme und zur Körperpflege erhalten
9,0	Hilfloser, bettlägeriger Patient, kann voll essen und kommunizieren
9,5	Vollkommen hilfloser Patient, unfähig effektiv zu kommunizieren, zu trinken oder zu essen
10,0	Tod durch MS

Der EDSS wird nach einem standardisierten Untersuchungsverfahren anhand von acht Funktionssystemen (FS) (Tabelle 3) erhoben.

Tabelle 3: Funktionssysteme, vereinfachte Darstellung [Kurtzke 1983]

Grad	FS1 Pyramidenbahn	FS2 Kleinhirn	FS3 Hirnstamm	FS4 Sensorik
0	normal	normal	normal	normal
1	abnorme Befunde ohne Behinderung	abnorme Befunde oder Behinderung	abnorme Befunde ohne Behinderung	abgeschwächter Vibrations- oder epikritische Sensibilität
2	minimale Behinderung	milde Ataxie	mäßiger Nystagmus	Bewegungs-, Schmerz- oder Lagesinn gering abgeschwächt
3	mäßige Parese oder Hemiparese	mäßige Rumpf- oder Gliedmaßenataxie	schwerer Nystagmus	Bewegungs-, Schmerz- oder Lagesinn mäßig abgeschwächt
4	ausgeprägte Parese oder Hemiparese	generalisierte Ataxie	Dysarthrie oder sonstige Augenmotilitätsstörungen	Bewegungs-, Schmerz- oder Lagesinn stark abgeschwächt
5	Paraplegie, Hemiplegie, etc	unfähig Bewegungen koordiniert auszuführen	unfähig zu schlucken oder zu sprechen	weitgehender Verlust der sensiblen Qualitäten in ein oder zwei Gliedmaßen
6	Tetraplegie	-	-	weitgehender Verlust aller sensiblen Qualitäten

Grad	FS5 Blase/Darm	FS6 Sehvermögen	FS7 Psyche/ mentale Funktionen	FS8 Sonstiges
0	normal	normal	normal	normal
1	milde Blasenentleerungsstörung, Drang, Retention	Skotom mit Sehschärfe besser 0,66	ausschließlich Stimmungsveränderungen	andere neurologische Symptome
2	mäßige Entleerungsstörung, Drang, Retention	Skotom und maximaler Visus zwischen <0,66 und >0,33	milde kognitiv-mnestische Beeinflussung	-
3	häufige Harninkontinenz	großes Skotom, oder mäßige Gesichtsfeldverluste, maximaler Visus 0,33 bis >0,2	mäßige kognitiv-mnestische Beeinflussung	-
4	benötigt ständig Blasen-katheter	schlechtes Auge mit Visus maximal 0,2 - 0,1, besseres Auge Visus 0,33	starke kognitiv-mnestische Beeinflussung	-
5	Verlust der Blasenkontrolle	schlechtes Auge Visus <0,1, besseres Auge Visus <0,33	Demenz oder ausgeprägtes organisches Psychosyndrom	-
6	Blasen-/ Darmkontrollverlust	-	-	-

Insgesamt scheint die Prognose für Patienten mit einem Krankheitsbeginn nach dem 40. Lebensjahr und vor dem 20. Lebensjahr schlechter zu sein [Debouverie et al. 2008]. Ein schubförmiger Beginn ist prognostisch günstiger als ein primär chronisch-progredienter Ausgangspunkt [Cottrell et al. 1999]. Als prognostisch günstige Faktoren gelten weiter das weibliche Geschlecht, ein monosymptomatischer Beginn, eine erhaltene Gehfähigkeit, initial rein sensible Symptome, eine gute Rückbildungstendenz der Schübe und eine insgesamt niedrige Schubfrequenz. Magnetresonanztomographie-morphologisch gelten eine initial geringe T2-Läsionslast sowie initial wenige Gadolinium anreichernde (Gd+) Läsionen als günstig [Flachenecker & Zettl 2005, Confavreux et al. 2003]. Kurtzke führte des Weiteren eine „5-Jahres Regel“ zur Bewertung der Prognose ein. Der Grad der Behinderung in den ersten 5 Jahren der Erkrankung ist demnach entscheidend für die Prognose. Das neurologische Defizit nach 5 Jahren entspricht dreiviertel des Behinderungsgrades nach 15 Jahren [Flachenecker & Hartung 1996, Kurtzke et al. 1977].

1.3.3. Diagnostik

Die Diagnose MS wird anhand der Manifestation klinischer Symptome und dem subklinischen Nachweis einer zeitlichen und räumlichen Dissemination von Hirn-Läsionen in der Bildgebung (Magnetresonanztomographie, MRT) gestellt. Aufgrund zahlreicher Differentialdiagnosen (Infektionen, Kollagenosen, Stoffwechselstörungen) und unterschiedlichen symptomatischen Mustern kommen weitere Diagnoseverfahren wie die Liquoranalytik und die Neurophysiologie mittels evozierten Potentialen bei der Diagnostik zum Einsatz. Weltweit haben sich die McDonald-Kriterien [McDonald et al. 2001, Polman et al. 2005 und 2011] als Standard in der Diagnosesicherung der MS etabliert (Tabelle 4). Die Diagnosekriterien wurden seit 2001 ständig weiterentwickelt [Polman et al. 2005 und 2011]. So ist es in einigen Fällen bereits mit dem ersten MRT-Scan möglich eine Aussage über die zeitliche und räumliche Dissemination zu treffen [Polman et al. 2011]. Grundsätzlich ist die zeitliche Dissemination durch ein erneutes Schubereignis oder den Nachweis einer Gadolinium- anreichernden Läsion mit neuer Lokalisation in einem MRT-Scan mindestens drei Monate nach dem Beginn des initialen Ereignisses oder einer T2-hyperintensiven Läsion nach einem Referenz-Scan,

der mindestens 30 Tage nach dem Beginn des initialen klinischen Ereignisses durchgeführt wurde, definiert.

Tabelle 4: Revidierte Diagnosekriterien der MS [Polman et al. 2005]

Klinik (Schübe)	Objektive Läsionen	Zusätzliche Bedingungen zur Diagnosestellung
2 oder mehr	2 oder mehr	Keine
2 oder mehr	1	räumliche Dissemination - positives MRT (siehe Tab. 5) oder - positiver Liquor und ≥ 2 charakteristische Läsionen im MRT oder - ein weiterer klinischer Schub in einem anderen ZNS-Bereich
1	2 oder mehr	zeitliche Dissemination - im MRT (Definition zeitliche Dissemination siehe Text) oder - zweiter klinischer Schub
1	1	räumliche Dissemination - positives MRT (siehe Tab. 5) oder - positiver Liquor und ≥ 2 charakteristische Läsionen im MRT zeitliche Dissemination - im MRT (Definition zeitliche Dissemination siehe Text) oder - zweiter klinischer Schub
PPMS		Progression über 1 Jahr (retrospektiv oder prospektiv) und Mindestens zwei der folgenden Bedingungen: - Positive kraniale MRT (9 T2-Läsionen oder ≥ 4 T2-Läsionen mit positiven visuell evozierten Potentialen (VEP)) - Positives spinale MRT (2 fokale T2 Läsionen) - Positiver Liquor

Die Definition der räumlichen Dissemination ist in Tabelle 5 dargestellt. Generell hat die Bedeutung der MRT in der Diagnose der MS mit den revidierten McDonald-Kriterien von 2011 weiter an Bedeutung gewonnen [Polman et al. 2011].

Tabelle 5: MRT-Kriterien zur räumlichen Dissemination [Polman et al. 2005]

MRT-Kriterien zum Nachweis der räumlichen Dissemination
Mindestens drei der vier folgenden Befunde <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 Gadolinium (Gd)- aufnehmende Läsion oder ≥ 9 T2-hyperintense Läsionen • ≥ 1 infratentorielle Läsion • ≥ 1 juxtakortikale Läsion • ≥ 3 periventrikuläre Läsionen

Die Liquoranalytik wird vor allem aus differentialdiagnostischen Überlegungen und zur Sicherung der Diagnose durch den Nachweis einer chronischen Entzündungsaktivität mittels autochtoner, intrathekalen Immunglobulinsynthese und oligoklonalen Banden (OCB) geführt. Trotz der zunehmenden Bedeutung der Bildgebung in der Diagnostik der MS hat die Liquoranalytik, insbesondere aus differentialdiagnostischen Überlegungen und zur Diagnosesicherung einer primär progredienten Verlaufsform nicht an Bedeutung verloren [Tumani et al. 2011].

Neurophysiologische Untersuchungen werden bei der MS mittels evozierter Potentiale durchgeführt. Unterschieden werden hierbei nach der Auslöse- und Aufzeichnungsart visuell, sensibel, motorisch oder akustisch evozierte Potentiale (VEP, SEP, MEP, AEP). Evozierte Potentiale sind durch einen adäquaten Reiz ausgelöste elektrische Aktivitäten neuronaler Strukturen inklusive deren Ableitung und Aufzeichnung. Sie dienen der Erfassung von Leitungsgeschwindigkeiten zentraler, neuronaler Bahnen und können somit ein sensibler Marker für entmarkende Regionen im ZNS sein. Evozierte Potenziale und die MRT sollten bei der Initialsymptomatik und bei relevanten Änderungen der Krankheitsdynamik, die eine Therapieumstellung nach sich ziehen könnten, durchgeführt werden [Freedman et al. 2004, Gold & Hartung 2008].

1.3.4. Therapie

Als immunvermittelte, entzündliche Erkrankung ist die MS gegenwärtig nicht kurativ behandelbar. Auf Grundlage zahlreicher klinischer Studien gilt eine absolute Remission der Erkrankung im Sinne einer vollständigen Krankheitsfreiheit als bislang unerreichbares Ziel. In Ermangelung einer kausalen Therapie sind nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) die aktuellen Hauptziele der Behandlung [Wiendl et al. 2008]:

- die möglichst vollständige Remission schubassoziiierter Symptome,
- die Vorbeugung weiterer Krankheitsschübe,
- die Prophylaxe der Entwicklung dauerhafter neurologischer Defizite
- sowie bei dauerhaft eingetretenen Ausfällen eine Stabilisierung der funktionellen Einschränkung auf möglichst niedriger Beeinträchtigungsstufe.

Die Therapie richtet sich generell nach der jeweils vorliegenden Verlaufsform, bzw. dem Stadium der Erkrankung und basiert auf vier grundlegenden Behandlungskonzepten:

1. der Schubtherapie,
2. der verlaufsmodifizierenden Immuntherapie der schubförmigen MS,
3. der Therapie krankheitsassoziierter Symptome sowie
4. Strategien zur Krankheitsbewältigung (Coping)

In der Therapie eines akuten Schubereignisses gilt die Applikation hochdosierter intravenöser Glukokortikosteroide über zwei bis fünf Tage als Goldstandard (500mg-1000mg/Tag über 3-5 Tage). Diese haben vielfältige Effekte auf das Immun- und Gefäßsystem die u.a. durch:

- eine Okklusion der Blut-Hirn-Schranke,
- eine Ödemreduktion, die zur verringerten Diffusion entzündlicher Mediatoren und Zytokine aus dem Blut in das ZNS führt,
- eine Unterdrückung des peripheren Immunsystems, durch Hemmung der Zytokinausschüttung sowie der endothelialen Lymphozytenadhäsion,
- eine Induktion der Apoptose von Entzündungszellen sowie
- einer Reduktion proinflammatorischer Enzyme (Interleukin 2, IFN- γ , Tumor-Nekrose-Faktor- α)

erklärt werden [Burton et al. 2009]. Bei therapieresistenten Schüben kommt eine weitere Steigerung der Glukokortikosteroide oder eine Plasmapherese zum Einsatz. Der primär chronisch-progrediente Verlauf wird mit einer Steroid-Intervalltherapie und bei äußerst schweren Verläufen optional mit einer Stammzelltransplantation behandelt.

Die verlaufsmodifizierende, immunmodulatorische Stufentherapie stellt den Kern der Sekundärprophylaxe der schubförmigen MS dar (Abbildung 3) [Kappos et al. 2007, Jacobs et al. 2000, DGN-Leitlinien zur MS 2012]. Der Krankheitsbeginn der MS ist durch inflammatorische Aktivität, d.h. Entzündungen im ZNS, geprägt, die durch Reparaturmechanismen und Gegenregulationen oft kompensiert werden kann. Im Verlauf der Erkrankung nimmt diese Reparaturfähigkeit jedoch ab und neurodegenerative Prozesse nehmen zu. Die Erkenntnis, dass die pathophysiologischen Vorgänge in der inflammatorischen Phase der Erkrankung mit

den derzeit verfügbaren Substanzen therapeutisch besser zu beeinflussen sind als die im späten Verlauf vorherrschenden, eher neurodegenerativen Mechanismen, spricht für einen frühzeitigen Beginn der immunmodulierenden Therapie [Kappos et al. 2007]. Die Immunmodulation zielt generell auf eine Verringerung der Schubfrequenz und Krankheitsprogression sowie eine Verhinderung neuer Hirnläsionen und einer Hirnatrophie ab.

In der Basistherapie der schubförmigen MS hat sich rekombinantes Interferon- β weltweit als Standard etabliert. Neben den β -Interferonpräparaten kommen das synthetische Polypeptid Glatirameracetat (Tabelle 6) und in Einzelfällen Azathioprin oder intravenöse Immunglobuline zum Einsatz (Abbildung 3, Tabelle 6). Bei malignen Verlaufsformen haben sich Mitoxantron, Cyclophosphamid und Fingolimod sowie in den letzten Jahren monoklonale Antikörper (Natalizumab) als effektiv erwiesen.

Die symptomatische Therapie richtet sich nach den individuellen Symptomen des Patienten. Es stehen zahlreiche Medikamente zur Behandlung von Spastiken, Blasenentleerungsstörungen, Sensibilitätsstörungen und Erkrankungen des psychiatrischen Formenkreises zur Verfügung [DGN-Leitlinien 2012].

Darüber hinaus kommen psychotherapeutische oder alternativ-medizinische Strategien zum Einsatz, um die oft stark belastenden Krankheitssituationen zu bewältigen (Coping) [Apel et al. 2006].

Abbildung 3: Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose 2012])

Indikation	CIS	RRMS		SPMS	
Eskalationstherapie		1.Wahl Fingolimod ³ Natalizumab ³	2.Wahl Mitoxantron Cyclophosphamid ⁴	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
Basistherapie	Glatirameracetat Interferon-β1a i.m. Interferon-β1a s.c. Interferon-β1b s.c.	Glatirameracetat Interferon-β1a i.m. Interferon-β1a s.c. Interferon-β1b s.c. Azathioprin ¹ IVIg ²			
Schubtherapie	1. Wahl: Methylprednisolon 2. Wahl: Plasmaseparation				

Die Reihenfolge der Präparate ist frei gewählt und soll keine Überlegenheit eines Medikamentes signalisieren. CIS: Klinisch isoliertes Syndrom; RRMS: schubförmige Multiple Sklerose; SPMS: sekundär chronisch progrediente Multiple Sklerose; IVIg: intravenöse Immunglobuline; ¹ Zugelassen wenn Interferon-β nicht möglich oder unter Azathioprin ein besserer Verlauf gewährleistet wird; ² Einsatz nur postpartal, insbesondere bei fehlender Behandlungsoption; ³ Fingolimod und Natalizumab haben neben der Indikation zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung Therapie-naiver Patienten bei mindestens zwei behindernden Schüben mit Krankheitsprogression in den letzten 12 Monaten sowie einer Gadolinium-anreichernden Läsion oder einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT; ⁴ Nur bei fulminant verlaufenden Autoimmunerkrankungen in ausgewiesenen MS-Zentren.

1.3.5. Interferon- β Therapie

Seit Mitte der 1990er Jahre haben sich β -Interferon-Präparate als Standard in der Therapie der schubförmigen MS etabliert. Heute stehen vier unterschiedliche Medikamente zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Gewinnung und ihrer Applikationswege, intramuskulär (i.m.) oder subkutan (s.c.), unterscheiden: Avonex (Interferon- β 1a i.m., Biogen Idec, Cambridge, MA, USA), Rebif (Interferon- β 1a s.c., Merck Serono, Darmstadt, Deutschland), Betaferon (Interferon- β 1b s.c., Bayer Schering, Leverkusen, Deutschland), Extavia (Interferon- β 1b s.c., Novartis, Basel, Schweiz) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Dosierung, Indikationsgebiete und typische Nebenwirkungen der Interferon- β Präparate und Glatirameracetat (modifiziert nach [Cohen und Rae-Grant 2012])

Präparat	Dosierung	Indikation	Nebenwirkungen
Interferon β 1a (Avonex®)	30 μ g i.m. wöchentlich	EU: CIS, RRMS USA: CIS, RRMS CN: CIS, RRMS, SPMS mit Schüben	Grippale Symptome, Kopfschmerzen, Leukopenie, Leberdysfunktion, Schilddrüsendysfunktion
Interferon β 1a (Rebif®)	22 oder 44 μ g s.c. 3x wöchentlich	EU: RRMS USA: RRMS CN: RRMS	Grippale Symptome, injektionsbedingte Hauterscheinungen, Leukopenie, Leberdysfunktion
Interferon β 1b (Betaferon®)	8Mio. IE s.c. zweitäglich	EU: CIS, RRMS, SPMS USA: CIS, RRMS CN: CIS, RRMS, SPMS	Grippale Symptome, injektionsbedingte Hauterscheinungen, Depression, Leukopenie, Leberdysfunktion, Schilddrüsendysfunktion
Interferon β 1b (Extavia®)	8Mio IE s.c. zweitäglich	EU: CIS, RRMS, SPMS USA: CIS, RRMS CN: nicht verfügbar	Grippale Symptome, injektionsbedingte Hauterscheinungen, Depression, Kopfschmerzen, Leukopenie, Leberdysfunktion
Glatirameracetat (Copaxone®)	20mg s.c. täglich	EU: CIS, RRMS USA: CIS, RRMS CN: CIS RRMS	Injektionsbedingte Hauterscheinungen, Dyspnoe, Palpitationen, Nausea, Flush

EU: Europäische Union; USA: Vereinigte Staaten von Amerika; CN: Kanada; i.m.: intramuskulär; s.c.: subkutan; IE: Internationale Einheiten; CIS: Klinisch isoliertes Syndrom; RRMS: schubförmige Multiple Sklerose; SPMS: sekundär progrediente Multiple Sklerose.

Das natürliche Interferon- β (IFN- β) ist ein humanes, pleiotropes Zytokin mit antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekten. Es wird durch unterschiedliche Zelltypen wie Fibroblasten und Monozyten produziert und erlangt seine biologische Wirkung durch die Bindung an spezifische Zellmembranrezeptoren, die eine intrazelluläre Kaskade initiieren. Diese Signalkaskade mündet in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF), Interferon-regulatorischen Faktoren und NF- κ B [Stark 2007]. Obwohl der intrazelluläre Signalweg der natürlichen β -Interferone weitestgehend bekannt ist, kann bisher über den instrumentellen Mechanismus, der letztlich den therapeutischen, immunmodulatorischen Effekt der Medikation ausmacht, keine detaillierte Aussage getroffen werden. Der biologische Effekt der applizierten IFN- β Präparate im Zellkern beruht auf der Steigerung der Expression zahlreicher Gene, die sich als potentielle biologische Marker der IFN- β Aktivität messen lassen (u.a. MX1, TNFSF10, B2M und IFIT1). Die Transkriptionslevel dieser Interferon-stimulierten Gene (ISG) steigen innerhalb von 12h nach initialer Interferon-Injektion an, bleiben bis zu 72h auf diesem Niveau und fallen dann wieder ab [Gilli et al. 2005, Weinstock-Guttman et al. 2003 & 2008]. Innerhalb der zahlreichen immunologischen Prozesse, die direkt oder indirekt durch die β -Interferon-Therapie beeinflusst werden, ist möglicherweise nur ein geringer Anteil für die positiven Effekte auf den Krankheitsprogress der MS verantwortlich. Die für die Wirksamkeit bei der MS verantwortlichen zellulären und immunologischen Mechanismen konnten bisher noch nicht vollständig charakterisiert werden. Für die folgenden klinischen Wirkungen wird ein Zusammenhang mit der immunmodulatorischen Wirksamkeit der β -Interferone gesehen [Yong 2002, Reder et al. 2008, Ramgolam et al. 2009, Mendes & Sa 2011]:

- Hemmung der Antigenpräsentation
- Verminderung der Zahl autoreaktiver T-Zellen
- Verschiebung des Zytokinmusters vom proinflammatorischen zum antiinflammatorischen Profil
- Verminderung der Th17-medierten Entzündungsreaktion
- Verbesserte Abräumreaktion phagozytotischer Elemente
- Induktion von Proteinen mit anti-oxidativem und neurotrophem Potential

Weitere Effektkaskaden können außerdem zu einer der zahlreichen Nebenwirkungen führen, die bei der IFN- β Therapie beobachtet werden können (Fieber, Myalgie, Arthralgie, Asthenie, Kopfschmerz und Leberfermenterhöhung).

Der Behandlungserfolg und Misserfolg sowie die zahlreichen Nebenwirkungen sind von Patient zu Patient individuell sehr unterschiedlich und können zu Beginn der Therapie bisher nicht erfolgreich prognostiziert werden. Etwa ein Drittel aller Patienten profitiert nicht von einer β -IFN-Therapie [Waubant et al. 2003]. Hieraus lässt sich der große Bedarf an prädiktiven Markern für die Bestimmung von Erfolg oder Misserfolg der Interferon-Behandlung ableiten.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stützen sich auf Patienten die mit Interferon- β 1a i.m. (IFN- β 1a i.m.) therapiert wurden. IFN- β 1a i.m ist das erste MS-Therapeutikum, das zur Frühtherapie zugelassen wurde. Die Injektionen mittels IFN- β 1a i.m. werden allgemein gut toleriert und zeigen eine gute Therapieadhärenz behandelter Patienten [Schroeter et al. 2011]. Etwa 4% der behandelten Patienten brachen die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen in der Zulassungsstudie ab [Jacobs et al. 2000]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass IFN- β 1a i.m. die geringste Inzidenz für neutralisierende Antikörper (NAb) hat [Kappos et al. 2005]. NAb verringern den Benefit einer β -Interferontherapie, gemessen an der Schubfrequenzrate, der MRT-Aktivität sowie dem EDSS durch Bindung an das applizierte Medikament [Vosoughi & Freedman 2010].

1.4. Prädiktive Marker für den Therapieerfolg

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen den klinischen Verlauf und den Erfolg einer Therapie anhand von Surrogaten (z.B. Biomarker, MRT-Morphologie) prognostizieren zu können. Neben den bereits beschriebenen Aspekten wie der Schubfrequenz zu Beginn der Erkrankung, der Rückbildungstendenz der Schübe, einer monosymptomatischen Klinik und der 5-Jahres Regel, die den einzelnen Patienten aufgrund klinischer Kriterien beurteilen, sind insbesondere die MRT sowie biologische Marker im peripheren Blut (Kapitel 1.4.1) und im Liquor cerebrospinalis [Tumani et al. 2009] als potentiell prädiktive Marker in den Fokus der MS-Forschung gerückt.

Die MRT gilt allgemein als wichtiges Hilfsmittel beim Monitoring der subklinischen Krankheitsaktivität- und Progression sowie der Darstellung pathologisch-anatomischer Merkmale

der MS-Läsion wie Entmarkung, Entzündung, Axonverlust und Gliose [Filippi 2001, Castelijns & Barkhof 1999, McFarland 1999]. Im Mittelpunkt verschiedener Untersuchungen standen in den letzten Jahren vor allem die hypointensen T1-Läsionen, deren Auftreten als Marker einer starken Destruktion angesehen wird [van Waesberghe et al. 1999]. Die Reduktion der T1-Hypointensität gilt als Anzeichen für eine Remyelinisierung [Bitsch et al. 2001] und kann somit auf den therapeutischen Nutzen einer Behandlung hinweisen. In einer von Barkhof und van den Elskamp durchgeführten Studie finden sich Hinweise, dass die fehlende Konversion von gadoliniumanreichernden Läsionen in persistierende Black Holes als Marker für einen Therapieeffekt gelten kann [van den Elskamp et al. 2008]. Eine 3-Jahres Studie von Calabrese und Filippi [Calabrese et al. 2010] zeigte, dass kortikale Läsionen für die Prognose der MS von Bedeutung sind. Darüber hinaus konnte eine Korrelation der Zunahme des Volumens von T2-Läsionen in der MRT mit dem Grad der Behinderung nach 20 Jahren gezeigt werden [Fisniku et al. 2008].

Die Korrelation klinischer Parameter wie der Krankheitsprogression und Schubfrequenz mit den Befunden im MRT wird nach wie vor kritisch diskutiert. Der überwiegende Teil der Krankheitsaktivität verläuft subklinisch und MRT-morphologische Veränderungen treten um ein Vielfaches häufiger auf, als klinisch manifeste Schübe [Brex et al. 2002, Fisniku et al. 2008].

Die MRT hat einen festen Platz in der Diagnostik und im Monitoring der MS, sie kann aber zu Beginn einer Therapie nur wenig über den zu erwartenden Verlauf im Sinne eines Response- oder Non-Responsemarkers Auskunft geben. An dieser Stelle sind molekularbiologische Marker in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Sie bieten die Möglichkeit durch molekularbiologische Untersuchungen von Körperflüssigkeiten (Blut, Liquor, Urin, etc.) Aufschluss über beispielsweise transkriptionelle Veränderungen zu zeigen, die für den Erfolg einer Therapie prädisponieren, oder deren Effekt frühzeitig erkennbar machen (Tabelle 7) [Bielekova & Martin 2004].

Tabelle 7: Klassifikation Prozessspezifischer Biomarker und Beispiele mit Referenz zur Multiplen Sklerose (modifiziert nach [Bielekova und Martin 2004])

Biomarker für Veränderungen immunologischer Prozesse	
Zytokine und Zytokinrezeptoren	IL-1, IL-2, IL-6, TNF α
Chemokine und Zytokinrezeptoren	CCR5, CXCR3, CXCL10
Antikörper	anti-MBP, anti-MOG
Komplementsystembiomarker	activated Neo C9
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1, VCAM-1, CD31
Antigenprozessierung- und Präsentation	CD40, CD40L
Zellzyklus und Apoptose	TRAIL
Immunmedierte Neuroprotektion	BDNF-Expression
Änderungen zellulärer Subpopulationen	CD4+/CD25 T-Zellen, NK-Zellen
Biomarker der Blut-Hirnschrankendysfunktion	
Plättchenaktivierende Faktoren, Zink-abhängige Matrix-Metalloproteinasen (MMP), MMP-Inhibitoren (TIMP)	
Biomarker der Demyelinisierung	
Endogene Pentapeptide (QYNAD), Na-Kanalblocker-Proteine	
Biomarker für oxidativen Stress	
NO (Stickstoffmonoxid)	
Biomarker der axonalen oder neuronalen Schädigung	
Zytoskelettproteine, z.B. Neurofilament: light subunit (NF-L)	
Biomarker der Gliose	
GFAP (glial fibrillary acid protein), S100 Proteine	
Biomarker der Remyelinisierung	
NCAM (neural cell adhesion molecule), CNTF (ciliary neurotrophic factor)	

IL: Interleukin; CCR: CC-Chemokinrezeptor; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; MBP: Myelin-Binding Protein; MOG: Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; CXCR: CXC-Motiv-Rezeptor; CXCL: CXC-Motiv-Ligand; ICAM: intrazelluläres Adhäsionsmolekül; VCAM: vaskuläres Adhäsionsmolekül; CD: Cluster of Definition Oberflächenmolekül; TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; NK: natürliche Killerzellen.

1.4.1. Molekularbiologische Biomarker

Generell bieten sich molekularbiologische Marker, insbesondere im peripheren Blut, aus Gründen der guten Zugänglichkeit an. Als Biomarker kommen gegenwärtig DNA- (Polymorphismen), RNA, microRNA, Proteine und Metabolite infrage [Goertsches et al. 2006, 2008, 2010, Angerstein et al. 2012, Thamilarasan et al. 2012]. RNA-Messungen erzielen hierbei die größte Aufmerksamkeit, da sie im Gegensatz zur DNA-Analyse Expressionsdynamiken widerspiegeln und durch zahlreiche Methoden wie der *real-time* PCR oder mittels eines Genom-weiten Expressionsscreenings gemessen werden können. Proteine und Metabolite sind molekularbiologisch schwieriger zu messen, mit geringerer Sensitivität und Spezifität, insbesondere wenn genomweite Analysen durchgeführt werden sollen. Biomarker können für unterschiedliche Fragestellungen untersucht werden. Über die in Tabelle 7 dargestellten speziellen pathoimmunologischen Fragestellungen hinaus kann eine allgemeine Einteilung der Biomarker zur klinischen Bewertung bei der MS wie folgt vorgenommen werden:

- Diagnostische Biomarker
- Biomarker für die Krankheitsaktivität
- Biomarker für die biologische Wirksamkeit einer Therapie
- Marker der individuellen klinischen Wirkung, bzw. des Krankheitsverlaufs

Im peripheren Blut sind serielle, longitudinale Probenentnahmen einfach und risikoarm möglich, zudem lassen sich hier zahlreiche Immunzellsubgruppen nachweisen. In diesem Zusammenhang bietet ein Genom-weites Expressionsscreening die Möglichkeit, Gene oder Genkombinationen (RNA, Transkripte) und deren Expressionsverhalten im Therapieverlauf langfristig aufzuzeigen und zu analysieren [Zettl & Goertsches 2009].

Es konnte bereits eine Assoziation der IFN- β Aktivität mit differentiell exprimierten Genen wie MxA, CCL2, CXCL10, IFI27 [Sellebjerg et al. 2009] oder B2M [Santos et al. 2006] gezeigt werden. Diese zeigen die molekularbiologische Wirkung der Therapie an, ob sie auch für den langfristigen klinischen Effekt, also eine therapeutische Wirkung detektieren, wurde bislang nicht eindeutig geklärt. Für MxA-mRNA-Level wurde bereits eine Assoziation mit der zu erwartenden Schubwahrscheinlichkeit gezeigt. Patienten mit einem niedrigen MxA-Level zeigten in einer prospektiven Studie eine erhöhte Inzidenz für ein frühes Schubereignis

im Gegensatz zu Patienten mit hohen Baseline-MxA-Level [van der Voort et al. 2010]. Weiterhin steht aktuell IL17F (IL-17 Zytokin) als prädiktiver Marker der IFN-Therapie zur Diskussion [Axtell et al. 2010]. IL17F zeigte sich hierbei im Serum von einigen Therapie-Non-Respondern höher exprimiert als bei Therapie-Respondern. In einer aktuellen Reassessment-Studie von 18 IFN-Studien mit insgesamt 148 Patienten, konnten signifikant höhere Level des GPR3-Gens (G-Protein coupled membrane receptor) bei Patienten mit einem schubfreien 2jahres-Verlauf gezeigt werden. Darüber hinaus zeigte sich hier IL17RC (IL-17 Zytokin-Rezeptor) als potentiell prädiktiver Biomarker für den Therapieerfolg [Hecker et al. 2011].

1.4.2. RNA-Profiling

In ersten Studien (Kapitel 1.4.1 und Tabelle 7) konnte gezeigt werden, dass sich Genexpressionsanalysen des peripher-venösen Blutes mittels Microarrays zum Nachweis von β -Interferon-medierten Effekten eignen [Goertsches et al. 2008, 2010, Bielekova & Martin 2004]. Die Microarray-Technologie (z.B. Affymetrix, Santa Clara, USA) ermöglicht Genexpressionsmessungen von mehreren tausend Genen gleichzeitig und bietet somit die Möglichkeit Genexpressionsänderungen festzustellen und analysieren zu können. Die in Tabelle 8 dargestellten Studien haben in den vergangenen Jahren die globalen Transkriptionsänderungen von Patienten mit einer IFN- β 1a Therapie im unterschiedlichen Kontext analysiert. Zur Anwendung kamen verschiedene Genchiptechnologien sowie unterschiedliche Untersuchungsmaterialien (Vollblut; periphere mononukleäre Zellen, PBMC). In einer Studie von Weinstock-Guttman aus dem Jahr 2008 wurden 4000 Gene unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie gemessen, von denen 1500 Gene als hoch- oder runterreguliert identifiziert wurden [Weinstock-Guttman et al. 2008]. Diese Studie zeigt exemplarisch, dass die IFN- β Therapie die Expression zahlreicher Gene beeinflusst, die z.B. für Zytokine oder Adhäsionsmoleküle kodieren. Die in Tabelle 8 unter Hecker et al. 2012 erwähnte Studie enthält Daten der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 8: Interferon- β 1a i.m. Genexpressionsstudien

Autor	Jahr	Pat.	Sample	Technologie	Anzahl Gene
Hecker et al.	2012	24	PBMC	Affymetrix HG-U133 A und B	121
Hesse, Sellebjerg et al.	2009, 2010	12	PBMC	Affymetrix HG- Focus	ca.1500
Weinstock-Guttman et al.	2008, 2003	22	PBL	GeneFilter GF211 DNA Arrays	1539
Singh et al.	2007	5	PBMC	CodeLink UniSet Human Bio-array	136
Fernald et al.	2007	2	Vollblut	UCSF Human 21k Oligo Array	438

Autor = Erstautor der Publikation; Jahr = Jahr der Veröffentlichung; Pat. = Anzahl der untersuchten Patienten; Sample = Probenmaterial (PBMC = mononukleäre Zellen aus peripher-venösem Blut, PBL = Periphere Blut-Lymphozyten); Technologie = Technologie der Genexpressionsanalyse; Anzahl Gene = Anzahl der transkriptionell veränderten Gene unter Therapie.

Über die regulatorischen Interaktionen der Gene können jedoch bislang wenig Aussagen getroffen werden. Genregulatorische Netzwerke (GRN) bieten hierbei die Möglichkeit die molekularbiologische Relevanz der detektierten Kandidatengene mit Hilfe der Analyse von Subnetzwerken aufzuzeigen. GRN können auf Basis der ermittelten Expressionsdaten (Inferenz) bzw. unter zusätzlicher Verwendung von Vorwissen aus Literatur und Datenbanken erstellt werden [Hecker et al. 2012].

In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze erforscht, um GRN auf der Basis von mathematischen Modellen zu beschreiben. Aktuelle Algorithmen bieten die Möglichkeit, unterschiedliche Arten von Informationen, wie Literaturwissen, bei der GRN-Inferenz zu berücksichtigen [Hecker et al. 2009, Cho et al. 2007]. Die bislang einzigen Studien die ein solches multimodales Netzwerk auf der Grundlage einer differentiellen Genexpression bei der Therapie der MS mittels IFN- β 1a untersucht haben, wurden 2007 von Fernald et al. und 2012 von Hecker et al. veröffentlicht.

2. Fragestellung

Die MS ist eine Erkrankung mit einem heterogenen klinischen Erscheinungsbild. Bewertet wird der individuelle Krankheitsverlauf anhand der Schubfrequenz, der Progression (EDSS-Zunahme) und paraklinischen Befunden (MRT). Eine Prognose der Krankheitsentwicklung und des Therapieerfolges bei der MS kann bislang nicht valide getroffen werden. Die Wahl des individuell geeigneten Basistherapeutikums ist durch eine ungenaue Krankheitsprognose und dem Phänomen des teilweise unzureichenden Ansprechens auf die Therapie sowie z.T. erheblichen interindividuellen Nebenwirkungen erschwert. Darüber hinaus sind die Wirkmechanismen der β -Interferone auf molekularbiologischer Ebene bislang nur teilweise geklärt. Etwa 40% der Patienten mit einer IFN- β Therapie zeigen einen nur unzureichenden Therapieerfolg. Konsekutiv entsteht ein großer Bedarf an prognostischen Markern für den langfristigen Behandlungsverlauf. In der vorliegenden Arbeit wurden der klinische Verlauf sowie die transkriptionellen Expressionsänderungen im peripheren Blut von 24 Patienten unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie untersucht und miteinander assoziiert. Es stellten sich Fragen aus den folgenden Bereichen:

Klinik

- Welchen klinischen Verlauf zeigen die 24 Patienten anhand der Schubfrequenz, des EDSS und der MRT-Befunde?
- Welches Nebenwirkungsprofil zeigen die Patienten?
- Wie ist die Therapieadhärenz des Patientenkollektivs?

Genexpression

- Welche Gene werden durch die IFN- β 1a i.m.-Therapie im Blut signifikant stärker exprimiert oder reprimiert?
- Welche Funktionen und Interaktionen haben die in ihrer Expression modulierten Gene?
- Welche Transkriptionsfaktoren partizipieren bei der Regulation dieser Gene?
- Wie sieht das durch die Therapie beeinflusste genregulatorische Netzwerk aus und kann mit dessen Hilfe die molekulare Wirkung der IFN- β Therapie möglicherweise besser verstanden werden?

Assoziation des klinischen Verlaufs mit Genexpressionsmustern

- Existieren bereits zu Beginn, bzw. in einer frühen Therapiephase, prognostische Biomarker auf transkriptioneller Ebene für den langfristigen klinischen Verlauf im peripheren Blut von Patienten mit einer IFN- β 1a i.m. Therapie?
- Gibt es molekulare Marker, die für Nebenwirkungen der IFN- β 1a i.m. Therapie prädisponieren?

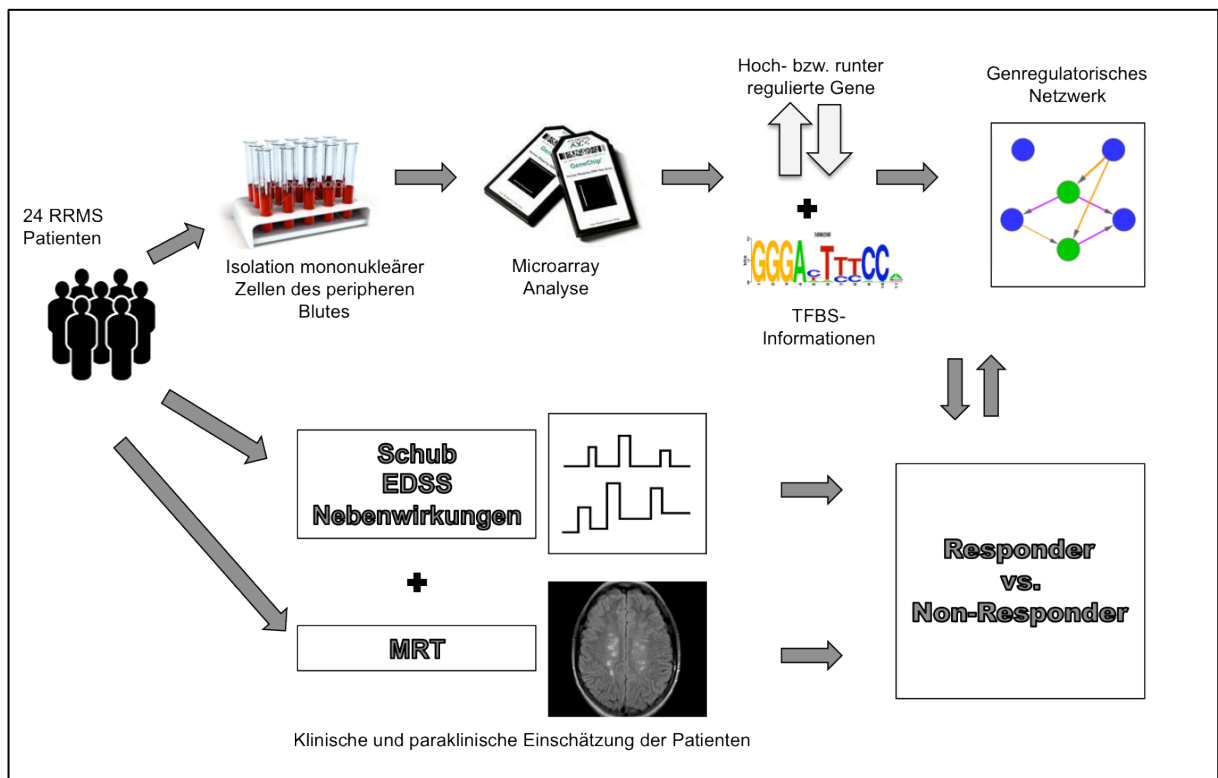
3. Material und Methoden

3.1. Aufbau der Studie

Das Studiendesign der vorliegenden Arbeit besteht aus einem longitudinalen klinischen Monitoring und einer Genom-weiten Expressionsanalyse mittels DNA-Microarray-Profilung. Die Patientenpopulation (n=24) wurde für einen Zeitraum von bis zu 48 Monaten klinisch und paraklinisch (MRT) beobachtet (Tabelle 9). Die Genexpressionsanalysen unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie fanden zu einem Baseline-Zeitpunkt unmittelbar vor Therapiebeginn sowie nach einer Woche und einem Monat nach Therapiebeginn statt. Schwerpunkte der Arbeit waren die Detektion differentiell exprimierter Gene im zeitlichen Verlauf, die Rekonstruktion des GRN dieser Gene sowie der Vergleich der Genexpression zwischen Patienten mit unterschiedlichem klinischen Verlauf. Eine graphische Übersicht des Studiendesigns findet sich in Abbildung 4 (weiterführende Informationen zur Methodik finden sich in Anhang C).

Tabelle 9: Longitudinale Übersicht der Analysezeitpunkte

	Baseline	7. Tag	1. Monat	3. Monat	6. Monat	12. Monat	24. Monat	48. Monat
RNA-Analyse	✓	✓	✓	-	-	-	-	-
Schub	✓	-	(✓)	-	✓	✓	✓	✓
Progression	✓	-	(✓)	-	✓	✓	✓	✓
Nebenwirkungen	✓	(✓)	(✓)	(✓)	✓	✓	✓	✓
Bildgebung (MRT)	✓	-	-	-	-	-	-	✓

Abbildung 4: Studiendesign der vorliegenden Arbeit

Abgebildet ist das Studiendesign der vorliegenden Arbeit. Schematisch dargestellt sind sowohl die Gewinnung der experimentellen Daten sowie die Evaluierung des klinischen und paraklinischen Verlaufs der Patientenpopulation (n = 24). TFBS = Transkriptionsfaktorbindungsstelle.

3.2. Patientenpopulation

In die Studie wurden 24 Patienten (18 weiblich / 6 männlich, Durchschnittsalter 35,8 Jahre, Standardabweichung (SD) 8,3 Jahre) mit der Diagnose einer RRMS aufgenommen (Tabelle 10). Die Diagnose erfolgte nach den McDonald-Kriterien von 2001 [McDonald et al. 2001]. Sämtliche Patienten erhielten erstmalig eine immunmodulatorische Therapie mit 30µg IFN-β1a einmal pro Woche als i.m Injektion. Keiner der Patienten ist vorab mit einem verlaufsmodifizierenden, immunmodulatorischen oder immunsupprimierenden Medikament behandelt worden. Im Falle einer vorhergehenden Schubtherapie mit Glukokortikosteroiden lag der letzte Behandlungszyklus mindestens 30 Tage vor der ersten Blutentnahme zurück. Die gesamte Patientenpopulation wurden durch die Klinik und Poliklinik für Neurologie der

Universitätsklinik Rostock betreut. Es fanden Routineuntersuchungen in einem drei- bzw. sechsmonatigen Intervall für bis zu 48 Monate durch die MS-Ambulanz oder stationär statt. Alle Patienten wurden eingangs durch ein Injektionstraining in die Selbstmedikation eingewiesen oder durch Fachkräfte ambulant mediziert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock geprüft und genehmigt (Reg.-Nr.: II HV 27/2003), nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt und nach ausführlicher Aufklärung und Einverständniserklärung des Patienten begonnen.

Tabelle 10: Klinische und soziodemographische Daten der Studienpopulation

Patient	Alter (Jahre)	Geschlecht	Therapiebeginn (Mo)	Familiäre MS
1	47,0	W	1	Nein
2	45,8	W	1	Ja
3	30,9	W	8	Nein
4	40,0	W	2	Nein
5	28,3	W	1	Nein
6	31,9	W	1	Nein
7	44,8	W	1	Nein
8	45,0	W	96	Nein
9	24,0	W	1	Nein
10	44,7	M	2	Nein
11	43,4	M	4	Nein
12	27,8	M	1	Nein
13	39,0	W	1	Nein
14	22,3	M	1	Nein
15	34,7	W	1	Nein
16	20,3	W	2	Nein
17	30,1	W	1	Nein
18	38,7	W	2	Nein
19	41,7	M	3	Nein
20	35,0	W	2	Nein
21	38,9	W	1	Nein
22	49,1	W	6	Nein
23	26,5	M	36	Nein
24	40,6	W	134	Nein

Alter: Angaben in Jahren zu Studienbeginn; Geschlecht: w = weiblich, m = männlich; Therapiebeginn = Dauer von der Diagnose der MS bis Therapiebeginn mit IFN- β 1a i.m. in Monaten (Mo); familiäre MS: nein, ja.

3.3. Klinische Beurteilung der Patienten

3.3.1. Response- und Non-Responsekriterien

Ziel der klinischen Charakterisierung der Patienten war es, ein Bild des individuellen Krankheitsverlaufs und der Schubfrequenz während der Behandlung zu erstellen, um somit eine Einteilung der Patienten in eine Gruppe Therapie-Responder und Non-Responder zu ermöglichen. Die Ermittlung dieser Patientenprofile wurde in einen klinischen und paraklinischen Anteil getrennt. Darüber hinaus wurde das Nebenwirkungsspektrum der Patienten ausführlich untersucht und mitbewertet.

3.3.1.1. Schubfrequenz

Als Schub wurden alle Ereignisse nach der aktuellen Schubdefinition von McDonald et al. 2001 gewertet [McDonald et al. 2001]. Alle Schubereignisse der Patienten wurden seit dem Auftreten der ersten Symptome der MS sowie während des gesamten Studienzeitraums protokolliert. Als Schub-Non-Responder wurden alle Patienten gewertet, die während des Therapie- und Beobachtungszeitraums einen Schub erlitten haben, als Schub-Responder nur Patienten, die keine Schübe zeigten. Schübe innerhalb der ersten sechs Monate nach Therapiebeginn wurden nicht gewertet, da die Therapieperiode als zu kurz für einen effektiven therapeutischen Effekt angesehen wird [Waubant et al. 2003].

3.3.1.2. Progression

Die Untersuchung der Krankheitsprogression erfolgte mittels des EDSS (Tabelle 2) [Kurtzke 1983]. Bei jeder Vorstellung bzw. Untersuchung eines Patienten wurde der aktuelle Status der Progression von einem EDSS-zertifizierten Untersucher anhand der Funktionssysteme (Tabelle 3) Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorik, Blasen- und Darmkontrolle, Sehvermögen und Psyche sowie der Gehfähigkeit untersucht und dem EDSS-Punktesystem zugeordnet. Bei einer bestätigten EDSS-Änderung $\geq 1,0$ über drei Monate im Vergleich zum Baseline-Wert wurde die Änderung klinisch als Verschlechterung gewertet.

3.3.2. Ermittlung paraklinischer Befunde

Für das paraklinische Monitoring des Krankheitsverlaufs der Patienten wurde das hierzu etablierte Verfahren der MRT genutzt. Die Beurteilung erfolgte jeweils zu einem Baseline-Zeitpunkt in unmittelbarer Nähe des Therapiebeginns und zu einem Folgezeitpunkt (Follow-up) nach mindestens 24 Monaten Therapie, im Durchschnitt nach 4 Jahren. Im Rahmen der apparativen Diagnostik war es grundsätzlich möglich, dass sich die Befunde unabhängig vom klinischen Verlauf progredient, regredient oder stabil/unverändert zeigten. In der Studie wurde analysiert, ob die kraniale MRT eine Befundprogredienz in der

- Anzahl der Entzündungsherde in T2-Wichtung und
- in der Anzahl der Entzündungsherde in T1-Wichtung mit Kontrastmittel,
- eine Änderung der Anzahl der hypointensen, T1-gewichteten Herde (Black Holes), oder
- eine Hirnatrophie aufwies.

Die Befunde wurden entsprechend der vier oben genannten Kriterien jeweils als gleichbleibend (0), verschlechtert (1) oder verbessert (-1) zum jeweiligen Ausgangswert eingestuft. Als MRT-Responder wurden jene Personen eingestuft, die in keinem der Kriterien eine Progression aufwiesen, deren Befunde sich somit gleichbleibend (0) oder verbessert (-1) darstellten.

3.3.3. Ermittlung des Nebenwirkungsprofils

Die Nebenwirkungen der IFN- β 1a Therapie wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten der Patienten erhoben und nach Art und Intensität klassifiziert. Unterschieden wurde zwischen grippeähnlichen Symptomen (Hyperthermie, Myalgie, Arthralgie, Kopfschmerz, Schwäche), Hauterscheinungen (Rötung oder Induration an der Injektionsstelle mit kleinen Blutergüssen oder Injektionsschmerz) und Nebenwirkungen sonstiger Art (Transaminasenanstieg, neutralisierende Antikörper, Übelkeit). Außerdem wurden die Nebenwirkungen nach ihrer Intensität in leichte Nebenwirkungen (medikamentös gut beherrschbar und/oder Beschwerdefreiheit; keine Regelmedikation), in moderate Nebenwirkungen (Regelmedikation

erforderlich, mit ggf. Wechsel der Begleitmedikation oder Dosissteigerung) und in starke Nebenwirkungen (Abbruch der Therapie) unterteilt.

3.4. Genexpressionsanalytik

3.4.1. Affymetrix GeneChip®-Technologie

Die GeneChip®-Technologie (Affymetrix, Santa Clara, USA) ermöglicht Genexpressionsmessungen von mehreren tausend Genen gleichzeitig und beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung von RNA-Transkripten mit spezifischen Oligonukleotiden, die auf einer Quarzoberfläche fixiert sind. Vom Hersteller sind für jedes Gen elf verschiedene Oligonukleotide (25mere) vorgesehen, die als Sonden zur Detektion der entsprechenden fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren dienen. Die Stärke des detektierten Lichtsignals ist abhängig von der Spezifität der Bindung der RNA an die Sonde (Probe) sowie von der Menge der zur Verfügung stehenden RNA und kann deshalb zur Bestimmung und Berechnung des Transkriptionslevels eines Gens herangezogen werden. Die ermittelten Messdaten werden zunächst als Bilddateien gespeichert und anschließend mit einer Verarbeitungssoftware in eine Signaltabelle verrechnet. Da sich die Annotation der Gene seit der Entschlüsselung des Genoms im Jahr 2001 teilweise geändert hat, werden in dieser Arbeit „custom Chip Definition Files“ (CDF) verwendet, wodurch Sonden die zu mehreren Genen passen (kreuzhybridisieren), oder Sonden die zu keinem Gen passen, ausgeschlossen werden.

3.4.2. Genexpressionsanalyse

Allen Patienten wurde mit deren schriftlicher Zustimmung 15ml peripher-venöses EDTA-Vollblut entnommen. Die Entnahme wurde vor der ersten Injektion von IFN- β 1a i.m. und nach der ersten und vierten Therapiewoche, jeweils direkt vor der nächsten Injektion durchgeführt. Die Proben wurden jeweils zur gleichen Tageszeit gewonnen und innerhalb einer Stunde verarbeitet.

Aus den Vollblutproben wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC: B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen) aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen extrahiert. Anschließend erfolgte die Isolation des Gesamt-RNA-Pools der PBMC unter Verwendung eines RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden, Niederlande). Die Entscheidung zur Nutzung der PBMC-RNA fiel aufgrund der Überlegung, dass diese immunologisch relevante Zellen enthalten und darüber hinaus um Interferenzen mit der im peripheren Blut vorhandenen Globin-mRNA zu vermeiden und somit eine höhere Sensitivität der Microarray-Biochiphybridisierung zu erreichen. Die RNA-Konzentrationen wurden spektrophotometrisch mit einem Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt und mit einer qualitativen Kontrolle durch eine Ethidiumbromid DNA-Agarosegelelektrophorese beurteilt. Proben mit jeweils 7 µg Gesamt-RNA wurden prozessiert, mit Biotin gelabelt, auf jeweils einen Affymetrix HG-U133 A und B Mikrochip aufgetragen und hybridisiert (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Das Scannen der hybridisierten Chips erfolgte mit einem Hewlett-Packard GeneArray Scanner G2500A (Affymetrix), der das nach der Färbung emittierte Licht mit einer Auflösung von 3 µm detektierte. Die Rohdatenspeicherung erfolgte nach dem MIAME-Standard. Die Daten sind in der Datenbank für Genexpressionsanalysen des National Center for Biotechnology, dem Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (GSE19285) abrufbar.

Um das Ergebnis der DNA-Microarray-Expressionsanalyse zu validieren, wurde anschließend eine *quantitative real-time reverse transkriptase* PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Exemplarisch gemessen wurden die Expressionslevel von 12 Genen aus dem Ergebnis der Microarraydaten und GAPDH als Referenzgen sowie drei zusätzliche Gene (MX1, B2M und IFIT1) die aus anderen Studien bereits als Marker der IFN-β Aktivität bekannt waren [Gilli et al. 2005, Santos et al. 2006, Goertsches et al. 2008]. Die qRT-PCR-Messungen wurden mittels TaqMan-Reagenzien in einem 7900HT Sequenz-Detektionssystem durchgeführt (Biosystems, Foster City, CA, USA). 1 µg der Gesamt-RNA einer Probe wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase zu cDNA-Sequenzen transkribiert (Reverse Transcription Kit, Biosystems, Foster City, CA, USA), die anschließend in qRT-PCR-Reaktionen vervielfältigt und gemessen wurden. Eine Übersicht der gemessenen Gene findet sich in Tabelle 11. Diese Reanalyse wurde für den Zeitpunkt unmittelbar vor der ersten IFN-Gabe und zum Zeitpunkt nach einer Woche durchgeführt. Die Expression wurde für 14 der 24 Patienten mit qRT-PCR nachgemessen, die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Tabelle 11: Mit *real-time PCR* untersuchte Gene

Gensymbol	GeneCards ID	Entrez Gene ID	TaqMan Assay ID
FCER1A	GC01P157526	2205	Hs00758600_m1
TNFSF10	GC03M173706	8743	Hs00234356_m1
CSF1R	GC05M149413	1436	Hs00911250_m1
CDKN1C	GC11M002861	1028	Hs00175938_m1
OAS1	GC12P111807	4938	Hs00973637_m1
AQP9	GC15P056217	366	Hs00175573_m1
ALOX12	GC17P006840	239	Hs00167524_m1
GANZ	GC22P021728	2781	Hs00157731_m1
ESAM	GC11M124128	90952	Hs00332781_m1
MS4A7	GC11P059902	58475	Hs00960227_m1
CTSW	GC11P065405	1521	Hs00175160_m1
FGFBP2	GC04M015571	83888	Hs00230605_m1
MX1	GC21P041720	4599	Hs00182073_m1
IFIT1	GC10P091142	3434	Hs01675197_m1
B2M	GC15P042790	567	Hs00984230_m1
GAPDH	GC12P006514	2597	Hs99999905_m1

Dargestellt sind das Gensymbol, die GeneCards ID sowie die Entrez Gene ID, um die Gene in den entsprechenden Datenbanken (NCBI und GeneCards) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> und <http://www.genecards.org> zu identifizieren. Außerdem ist die verwendete TaqMan-Reagenz angegeben.

3.4.3. Filterung Interferon induzierter und reprimierter Gene

Verglichen wurden die Daten der Microarraychips von 24 Patienten zum Zeitpunkt unmittelbar vor der ersten IFN-Injektion (t0) mit den Daten zum Zeitpunkt nach der ersten (t1) und vierten Therapiewoche (t2).

Die Verarbeitung der Rohdaten wurde mit dem MAS5.0-Algorithmus und „custom Chip Definition Files“ (CDF) der GeneAnnot-Datenbank Version 1.8 (<http://bioinfo2.weizmann.ac.il/geneannot/>) durchgeführt. Um systematische Abweichungen in den Daten vor der weiteren Analyse zu korrigieren, erfolgte eine Normalisierung. Die Normalisierung der Daten wurde getrennt für den A-Chip und den B-Chip mit der statistischen Software „R“ berechnet und nach der LOESS-Methode durchgeführt [Hecker et al. 2012]. Der A-Chip umfasste insgesamt 11220 humane Gene, der B-Chip umfasste 6771

Gene. Für die 2257 Gene, die auf beiden Chips gemessen wurden, wurden die Daten des A-Chips verwendet. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der Genexpressionsänderung vom Baseline-Zeitpunkt zum Zeitpunkt nach einer und nach vier Wochen Therapie wurde ein paariger t-Test ($p\text{-Wert} < 0,01$) verwendet. Um die Filterungsergebnisse anschließend weiter einzugrenzen, wurde eine signalintensitätsabhängige Fold Change-Evaluierung durchgeführt (MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change, MAID-Filtering) [Hecker et al. 2009] (<http://www.hki-jena.de/index.php/0/2/490>). Diese Methode ermöglicht ein statistisches „filtering“ von Genen, die im Zeitverlauf im Blut der Patienten besonders stark hoch- oder runterreguliert sind. Die Gene müssen in Abhängigkeit von ihrem Expressionsniveau im Vergleich zum Baselineniveau um einen bestimmten Faktor höher oder niedriger exprimiert sein. Dieser Faktor ist höher für niedrige Expressionsniveaus, um nicht bzw. schwach exprimierte Gene zu verwerfen.

Ein Vorteil der MAID-Methode ist, dass das Filterergebnis mit einem MA-Plot visualisiert werden kann. MA-Plots können Signalintensitätsverteilungen von Microarraydatensätzen graphisch darstellen (Anhang B). In diesem Fall wurden jeweils zwei Zeitpunkte miteinander verglichen. Die detektierten Signalintensitäten werden mathematisch wie folgt für die Achsen eines MA-Plots umgerechnet:

$$M = \log_2 \text{Daten} (t_1) - \log_2 \text{Daten} (t_0)$$

$$A = \frac{1}{2} \times (\log_2 \text{Daten} (t_0) + \log_2 \text{Daten} (t_1))$$

M beschreibt die logarithmische Signalintensitätsänderung auf der y-Achse und A die durchschnittliche Signalintensität auf der x-Achse. In genomweiten Expressionsanalysen ist davon auszugehen, dass die meisten Gene keine oder eine nur sehr geringe Änderung der Expression zeigen und sich somit keine Signalintensitätsänderungen in der Fluoreszenz ergibt. Die meisten Werte sind daher auf der y-Achse (M) nahe der Nulllinie lokalisiert. Der MAID-Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens erhöht ist bzw. negativ wenn die Transkription eines Gens geringer ist. Es wurde berücksichtigt, dass die Fold Change-Änderung bei gleicher absoluter Änderung höher ist, wenn die gemessene Signalintensität geringer ist [Yang et al. 2002]. Der absolute MAID-Wert ist daher generell höher je mehr sich die Genexpression gegenüber dem Baseline-Zeitpunkt geändert hat und insgesamt niedriger bei nur schwacher Genexpression. Berücksichtigt wird somit die relative Signaländerung in

Abhängigkeit von der Signalintensität. Als IFN- β 1a modulierte Gene wurden diejenigen gewertet, deren absoluter MAID-Score $> 3,0$ war und die gleichzeitig ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert $< 0,01$ aufwiesen.

In einem weiteren Schritt wurde analysiert, welche der unter der Therapie differentiell exprimierten Gene signifikant mit den Nebenwirkungen der IFN- β 1a Therapie assoziiert waren. Hierzu wurden die Baseline-Transkriptionslevel jener Patientenpopulation, welche Therapienebenwirkungen in den ersten drei Monaten aufwies, mit der Patientenpopulation ohne Nebenwirkungen mit einem zweiseitigen t-Test verglichen und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gefordert.

3.5. Funktionelle Genanalytik und Netzwerkmodellierung

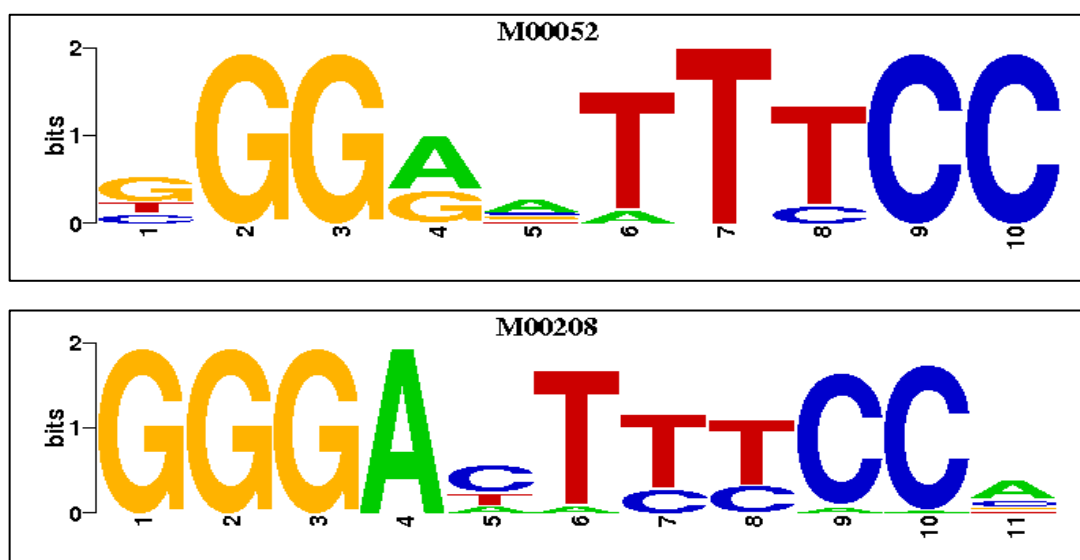
3.5.1. Biologische Funktionen der gefilterten Gene

Um die biologischen Funktionen der identifizierten IFN- β 1a-modulierten Gene zu untersuchen, wurden sie einer Gene-Ontology-Analyse (GO) zur Suche nach überrepräsentierten GO-Termen unterzogen. GO ist eine Datenbank, in der zelluläre Komponenten, biologische Prozesse und molekulare Funktionen von Genen abrufbar sind. Die Analyse wurde mit der statistischen Datenanalysesoftware „R“ unter Verwendung des Software Paketes GOSTATS mit dem Bioconductor Annotations-Paket org.Hs.eg.db Version 2.2.6 (<http://bioconductor.org>) durchgeführt. Jeder GO-Term wurde auf eine signifikante Assoziation mit den von uns gefilterten Genen im Vergleich zur Gesamtmenge der gemessenen Gene analysiert. Gefordert wurde ein p-Wert von $< 0,01$ für jeden GO-Term und das mindestens drei der gefilterten Gene dieser Kategorie angehören. Die Berechnung des Signifikanzniveaus erfolgte mit Hilfe einer hypergeometrischen Verteilung [Falcon & Gentleman 2007]. Auf diese Weise erhält man eine Liste von Funktionen (biologischen Prozessen), die für die gefilterten Gene besonders typisch sind.

3.5.2. Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Um die Regulatoren der gefilterten Gene zu identifizieren, führten wir eine Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) durch. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die für die Initiation der RNA-Polymerase bei der Transkription von Bedeutung sind. Transkriptionsfaktoren können an die DNA im Promotorbereich ihrer Zielgene binden und so deren Transkription aktivieren oder reprimieren. Die TFBS-Analyse nutzt hierzu Vorhersagen zu konservierten TFBS aus der UCSC-Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>) (UCSC Genome Browser, University of California, Santa Cruz). Die vorhergesagten TFBS für die gefilterten Gene wurden hierbei äquivalent zur GO-Analyse mit den TFBS der 15734 detektierten Gene verglichen. Es wurde eine hypergeometrische Verteilung zur Berechnung angewandt und ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ gefordert. Als regulatorische Region eines Gens wurde hierbei eine Region von 1000 Basenpaaren um die Transkriptionsstartstelle definiert. Transkriptionsfaktoren mit einer hohen Ähnlichkeit in ihren DNA-Bindungseigenschaften sind mit dem Web-Tool STAMP [Mahony & Benos 2007] zu gleichen TF-Entitäten zusammengefasst worden (Abbildung 5).

Abbildung 5: Zusammenfassung ähnlicher DNA-Bindemotive bei der Transkriptionsfaktorbindungsstellen-Analyse

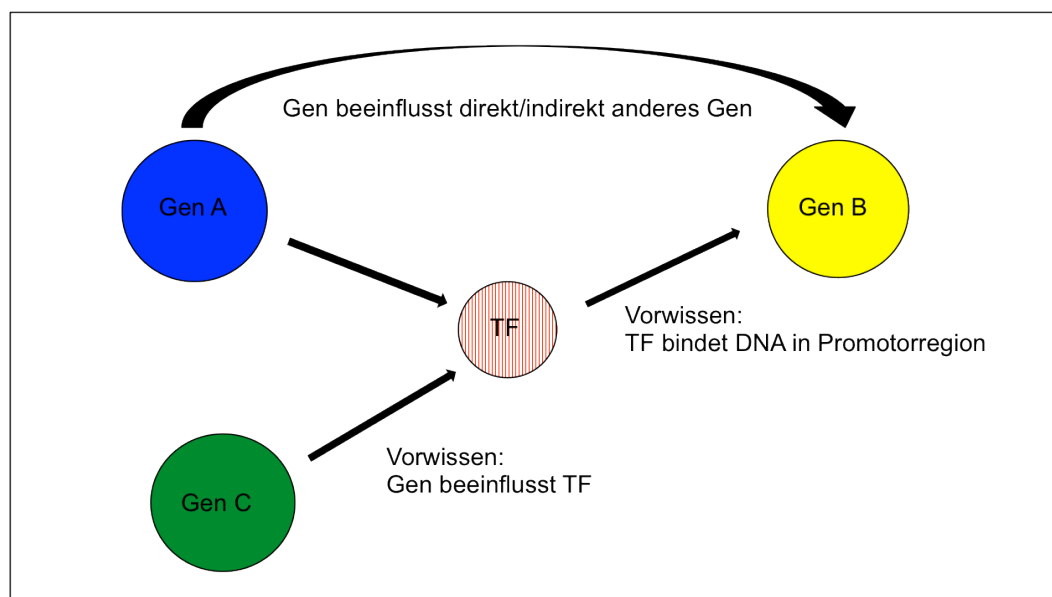


Die in der Transfac-Datenbank unter den IDs M00052 und M00208 gespeicherten TFBS-Motive gehören zu Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie (Tabelle 17). Auf der y-Achse ist die Häufigkeit der Nukleinbase und auf der x-Achse ist die Position im Motiv dargestellt.

3.5.3. Modell des genregulatorischen Netzwerks

Die regulatorischen Interaktionen zwischen den gefilterten Genen wurden unter Verwendung des TILAR-Algorithmus (TFBS- integrating- least angle regression) inferiert [Hecker et al. 2009]. Mit Hilfe der TILAR-Methode ist es möglich, Genexpressionsdaten, Transkriptionsfaktor-Analysen und Vorwissen aus der Literatur über Gen-Transkriptionsfaktor-Interaktionen für die Rekonstruktion eines GRN integrativ zu verwenden [Hecker et al. 2009]. Gene und Transkriptionsfaktoren können direkt und indirekt beeinflusst werden. Gene können beispielsweise Transkriptionsregulatoren für bestimmte Transkriptionsfaktoren sein, oder ein Genprodukt, welches innerhalb einer Signalkaskade die Aktivität eines Transkriptionsfaktors auf der Proteomebene kontrolliert. Auf diese Weise regulieren Gene indirekt über Transkriptionsfaktoren die Aktivität anderer Gene (Abbildung 6). Beide Interaktionstypen (Gen-TF, TF-Gen) werden im TILAR-Algorithmus, der das GRN-Modell aus den Expressionsdaten und dem Vorwissen berechnet, berücksichtigt. Weiterführende Informationen zur TILAR-Methode und deren Parametern finden sich unter <http://www.hki-jena.de/index.php/0/2/490>.

Abbildung 6: Prinzip genregulatorischer Mechanismen und deren Integration in ein Netzwerkmodell



Schematische Darstellung der Gen-TF-Interaktionen, die auf Basis von Literaturvorwissen mit Hilfe des TILAR-Algorithmus in die mathematische Modellierung (Berechnung) des GRN integriert werden können.

3.6. Identifikation prädiktiver Marker

Zur Identifikation potentieller, prädiktiver Kandidatengene für den klinischen Verlauf zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn führten wir eine Assoziation der Baseline-Expression der gemessenen Gene mit dem klinischen und paraklinischen Verlauf der Patientenpopulation durch. Die Patienten wurden in zwei Kohorten a) Responder und b) Non-Responder unterteilt und miteinander verglichen. Die Einteilung erfolgte 1. nach der Schubfrequenz, 2. nach der Krankheitsprogression gemessen am EDSS und 3. nach der Krankheitsprogression gemessen in der MRT:

1. Schub-Non-Responder: Mindestens ein Schub zwischen dem 7. und 24. Monat seit Therapiebeginn
2. EDSS-Non-Responder: bestätigte Verschlechterung im EDSS um mindestens einen Punktwert nach zwei Jahren im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn
3. MRT-Non-Responder: verschlechterter Status anhand der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Kriterien

Aus den klinischen Daten ergab sich für das Kriterium Schub eine Gruppe Responder, also Patienten die keine Schübe im 24monatigen Untersuchungszeitraum aufwiesen und eine Gruppe Non-Responder, die durch das Auftreten von Schüben gekennzeichnet war. Gleiches gilt analog für das Kriterium EDSS. Patienten, die keine bestätigte Verschlechterung des EDSS aufwiesen galten als Responder. Patienten, die durch einen klinischen Progress gekennzeichnet waren galten als Non-Responder. Analog dazu wurde die subklinische Krankheitsaktivität anhand der MRT-Bildgebung nach Respondern und Non-Respondern analysiert (Kapitel 3.2). Die PBMC-Genexpression vor Therapiebeginn in den zwei Patientenkohorten wurde mit einer MAID-Analyse verglichen (Kapitel 3.4.3 und Anhang B). Es wurde gefordert, dass die Gene einen MAID- Score $> 2,5$ oder $< -2,5$ aufweisen und somit die mittlere Genexpression der vermuteten Non-Responder um einiges höher bzw. niedriger ist als in der Gruppe der klinisch vermuteten Responder.

Die durch die MAID-Analyse gefilterten Gene wurden anschließend mittels eines zweiseitigen t-Tests sortiert. Aus der somit identifizierten Gruppe der potentiell prädiktiven Kandidatengene wurden jeweils für die unterschiedlichen Responder/Non-Responder-Einteilungen die 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene ermittelt.

4. Ergebnisse

In dem folgenden Kapitel werden zunächst die soziodemographischen Charakteristika der Patientenpopulation sowie die Ergebnisse der klinischen und paraklinischen Verlaufsbeobachtungen präsentiert. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Interaktionen der unter IFN- β 1a Therapie differentiell exprimierten Gene in einem mathematisch modellierten, genregulatorischen Netzwerk aufgezeigt. Den Abschluss bilden die Ergebnisse der Assoziation des klinischen Verlaufs mit den Genexpressionsdaten hinsichtlich prädiktiver RNA-Marker für das Auftreten von Nebenwirkungen sowie den Krankheitsverlauf.

4.1. Klinik

4.1.1. Klinische und soziodemographische Merkmale der Patientenpopulation

Es wurden 24 Patienten mit der Diagnose einer RRMS untersucht. Das Patientenalter lag bei Therapiebeginn im Mittel bei 36,3 (Standardabweichung, SD: 8,3) Jahren. 18 Patienten waren weiblichen Geschlechts, 6 Patienten waren männlichen Geschlechts. Alle Patienten waren kaukasischer Abstammung. Eine familiäre Häufung der MS fand sich anamnestisch bei einem Patienten (Tabelle 10). Die mittlere Dauer vom ersten Symptom (z.B. Optikusneuritis, Sensibilitätsstörungen, Ataxie) bis zur definitiven Diagnose betrug 1,2 (0-4) Jahre. Entsprechend der aktuellen, leitliniengerechten Therapieempfehlungen der MSTKG zur Schubprophylaxe mit Immunmodulatoren bei schubförmiger MS wurden die Patienten frühzeitig auf eine medikamentöse Therapie mit IFN- β 1a i.m. eingestellt [Rieckmann et al. 2006, Kappos et al. 2007, DGN-Leitlinien MS 2012]. Bei 21 Patienten konnte ein Therapiebeginn innerhalb der ersten acht Monate nach dem Diagnosezeitpunkt erreicht werden. Bei drei weiteren Patienten lag die Diagnose bereits durchschnittlich sieben Jahre zurück (Tabelle 10).

Alle Patienten dieser Studie wurden für 4 Jahre ab Therapiebeginn nachbeobachtet. In einem Intervall von drei bzw. sechs Monaten fanden Vorstellungen der Patienten zur klinischen Evaluation statt. Ein Patient beendete die Therapie aufgrund von fehlender Therapieadhärenz vorzeitig nach Vollendung von 12 Therapiemonaten (im 13. Monat), ein weiterer Patient nach Vollendung von 24 Therapiemonaten (im 25. Monat). Bei zwei Patienten wurde die Behandlung aufgrund von starken Nebenwirkungen, bei einem Patienten aufgrund von Therapieversagen bei starker Krankheitsprogression und bei einer weiteren Patientin aufgrund eines Kinderwunsches zwischen dem zweiten und vierten IFN- β 1a Therapie- und Beobachtungsjahr beendet. Eine Übersicht der Gründe für ein Ausscheiden der Patienten findet sich in Tabelle 12. Berücksichtigt wurden jene Patienten, die unabhängig von ihrem klinischen Verlauf durchgehend eine IFN- β 1a i.m. Therapie erhielten. Insgesamt fanden somit 23 Patienten in die klinischen Analysen innerhalb der ersten zwei Jahre und 18 Patienten in die klinischen Analysen innerhalb des vierjahres-Follow-up Eingang. MRT-morphologisch konnten insgesamt 20 Patienten untersucht werden.

Tabelle 12: Gründe für den Abbruch der β -Interferon Therapie im Evaluationszeitraum

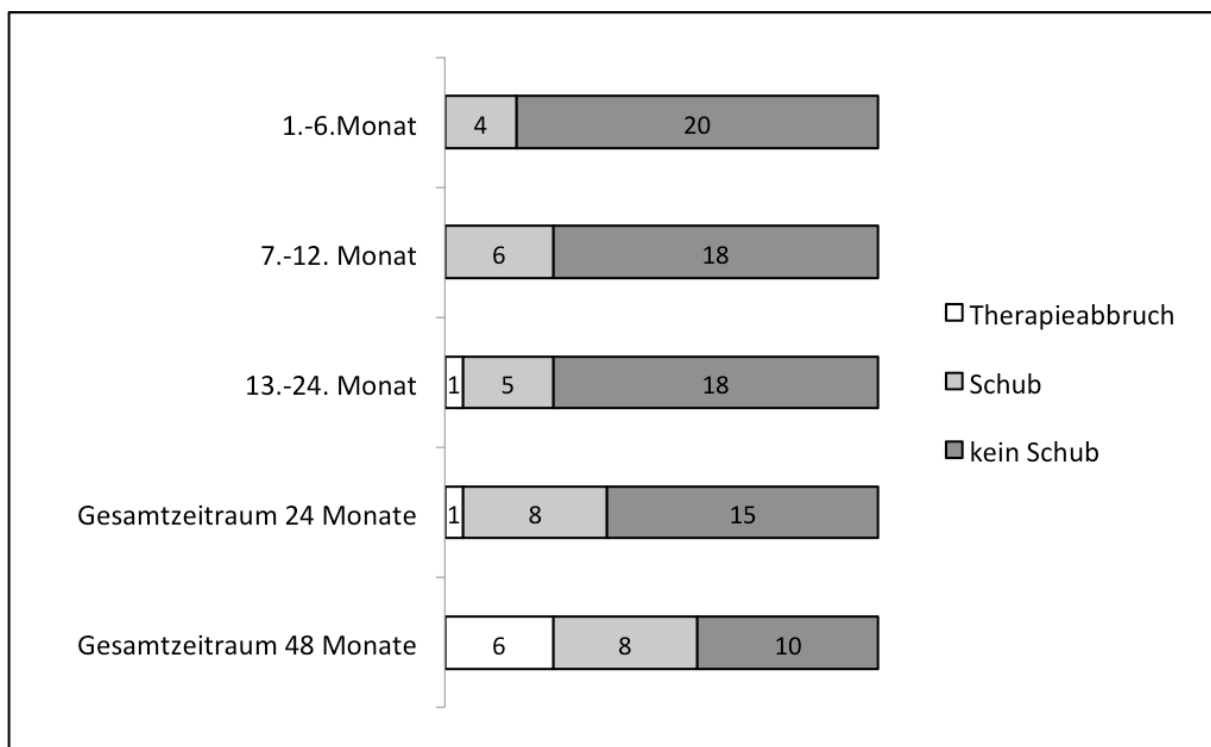
	Gründe für Therapieabbruch				
Zeitraum (Monate)	Fehlende Therapieadhärenz (n)	Nebenwirkung (n)	Progress (n)	Kinderwunsch (n)	Anzahl (n)
0-24	1	-	-	-	1
24-48	1	2	1	1	5
0-48	2	2	1	1	6

Dargestellt sind die Gründe für einen Abbruch der Therapie während der Untersuchungsperiode von 24 bzw. 48 Monaten.

4.1.2. Schubfrequenz

Die Schubfrequenz ist ein wichtiger Parameter für die Beurteilung des klinischen Status IFN- β -therapierter Patienten [Rudick et al. 2004, Waubant et al. 2003]. Die mittlere Schubfrequenzrate der Gesamtpopulation vor Therapiebeginn (Zeitraum erstes Symptom der MS bis Therapiebeginn) lag im Mittel bei 1,4 Schüben (1-3 Schübe). Gemessen an der Anzahl der Schübe ab Therapiebeginn galten 15 Patienten in den ersten 24 Therapiemonaten als Responder (kein Schubereignis). Bei acht Patienten konnte zwischen dem 7. und 24. Monat mindestens ein Schubereignis eruiert werden, sie gelten als Schub-Non-Responder. Ein Patient wurde aufgrund eines frühen Therapieabbruchs nicht berücksichtigt (Kapitel 4.1.1). Die Anzahl der Patienten mit und ohne Schübe während der klinischen Beobachtungsphase ist in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7: Anzahl der Patienten mit und ohne Schub während des 24 bzw. 48 monatigen Untersuchungszeitraums



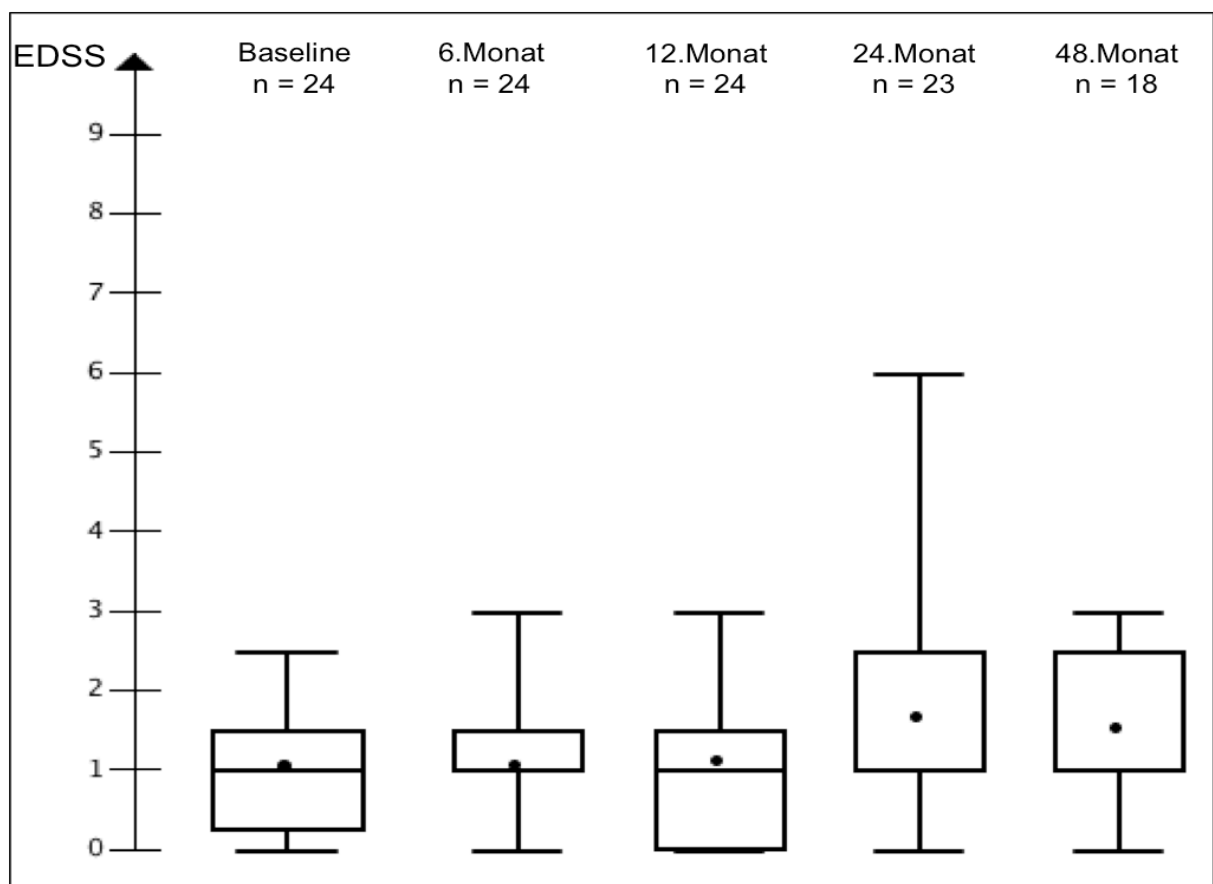
Die Säulen stellen die Anzahl der Patienten mit und ohne Schub für den jeweils abgebildeten Zeitraum dar. Die Säulen „Gesamtzeitraum 24 Monate“ und „Gesamtzeitraum 48 Monate“ stellen den für die Auswertung relevanten Evaluationszeitraum vom 6. bis zum 24. Monat bzw. vom 6. bis 48. Monat dar (Kapitel 4.1.2).

Ebenfalls in Abbildung 7 dargestellt ist die Anzahl der schubfreien Patienten und jener Patienten mit Schubereignis nach insgesamt 48-monatiger Evaluation. Berücksichtigt wurde die gesamte Patientenpopulation ($n=24$), wobei sechs Patienten nicht gewertet wurden, da sie während der Beobachtungsphase (4 Jahre) die Therapie abbrachen bzw. einen Therapiewechsel durchlaufen haben (Kapitel 4.1.1 und Tabelle 12).

4.1.3. Krankheitsprogression

Die Krankheitsprogression wurde anhand der EDSS-Werte der Patienten bestimmt. Insgesamt zeigten alle 24 Patienten bei Therapiebeginn einen niedrigen EDSS von durchschnittlich 1,0 (0,0 – 2,5). Sie waren somit nicht oder nur gering körperlich eingeschränkt. Gemessen am EDSS nach zweijähriger Therapie im Vergleich zum Baseline-Wert bei Therapiebeginn (Änderung ≥ 1 EDSS-Punktwert) wurden 15 Patienten als Therapie-Responder und acht Patienten als Non-Responder eingestuft, ein Patient wurde aufgrund eines Therapieabbruchs nicht gewertet (Kapitel 4.1.1). Eine Übersicht der EDSS-Verteilung im zeitlichen Verlauf in Form von Boxplots zeigt Abbildung 8.

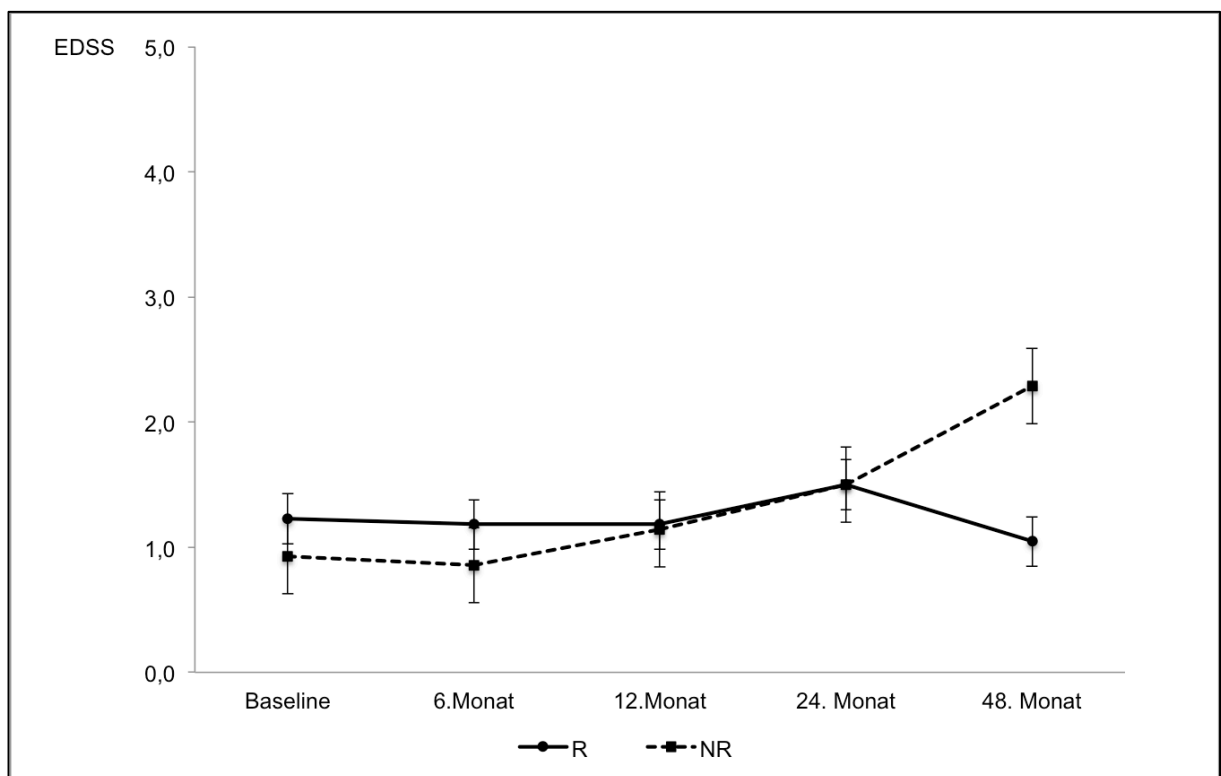
Abbildung 8: Krankheitsprogression gemessen am EDSS über einen Beobachtungszeitraum von 48 Monaten



Übersicht der Krankheitsprogression gemessen am EDSS für das gesamte Patientenkollektiv im zeitlichen Verlauf anhand von Boxplots, unabhängig vom Responderstatus (Whisker: größter und kleinster Wert; Box: 1. und 3. Quartil, Punkt = Mittelwert)

Ein weiterer Nachbeobachtungszeitpunkt konnte nach circa vier Therapiejahren eruiert werden. 11 Patienten der Gruppe „EDSS-Responder“ zeigten für diesen späten Beobachtungszeitpunkt keine Verschlechterung gemessen am EDSS, verglichen zum Baseline-EDSS ≥ 1 . Sie sind demnach langfristig als Responder zu werten. Die Entwicklung der Progression gemessen am EDSS ist für die Gruppe der Responder und Non-Responder in Abbildung 9 dargestellt (mittlerer EDSS und Standardfehler). Es wird deutlich, dass sich insbesondere in der frühen Therapiephase keine wesentlichen Änderungen des EDSS in der Gruppe der Responder wie auch in der Gruppe der Non-Responder zeigten.

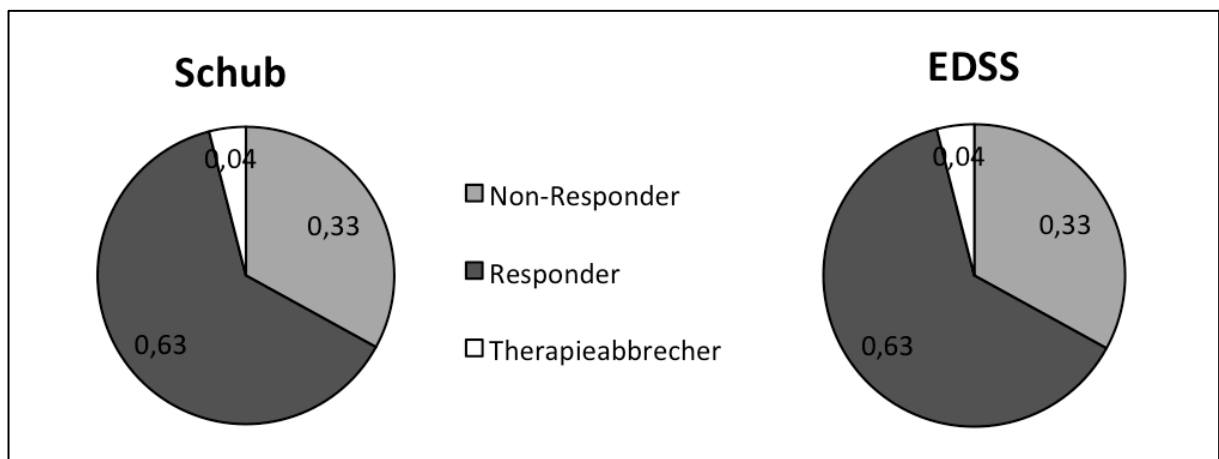
Abbildung 9: Krankheitsprogression, Responder versus Non-Responder



Dargestellt ist der Verlauf der Krankheitsprogression gemessen am EDSS (Mittelwert + Standardfehler) für die Gruppe der Responder (n=11) und Non-Responder (n=7) im Vergleich. Zur Darstellung kommt der gesamte klinische Beobachtungszeitraum. Gewertet wurden alle Patienten, die über vier Jahre durchgehend eine IFN- β 1a Therapie erhielten und die Behandlung nicht abgebrochen haben (n=18).

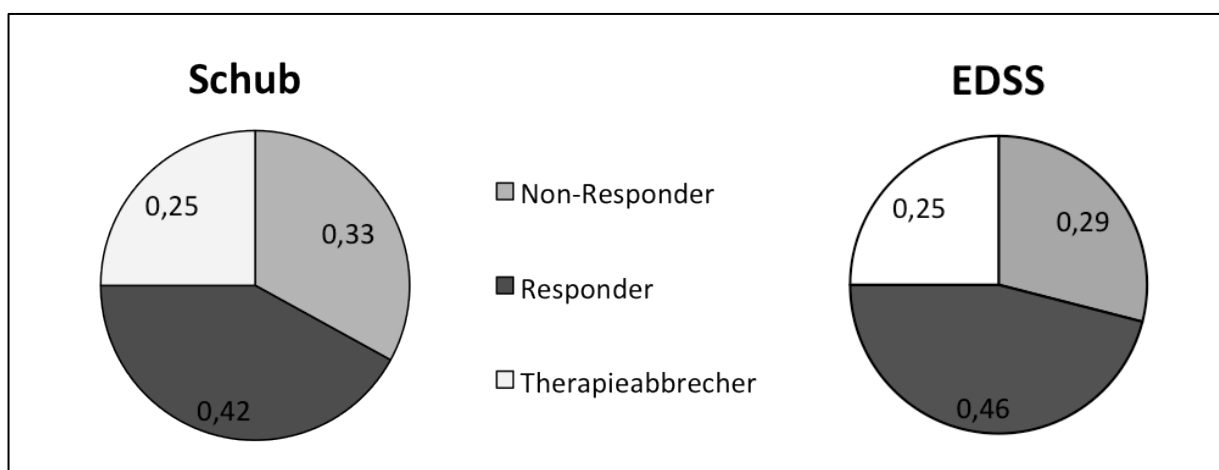
In Abbildung 10 und 11 ist der Anteil der Patienten mit Response/Non-Response-Status gemessen an der Schubfrequenz und der Progression sowie der Anteil der Therapieabbrecher nach zwei- und vierjähriger Therapie vergleichend dargestellt.

Abbildung 10: Response, Non-Response und Therapieabbruch nach zweijähriger Therapie



Berücksichtigt wurden insgesamt 24 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden. Es fanden sich jeweils n=15 Responder, n=8 Non-Responder, sowie n=1 Therapieabbrecher für das Kriterium Schub und EDSS.

Abbildung 11: Response, Non-Response und Therapieabbruch nach vierjähriger Therapie

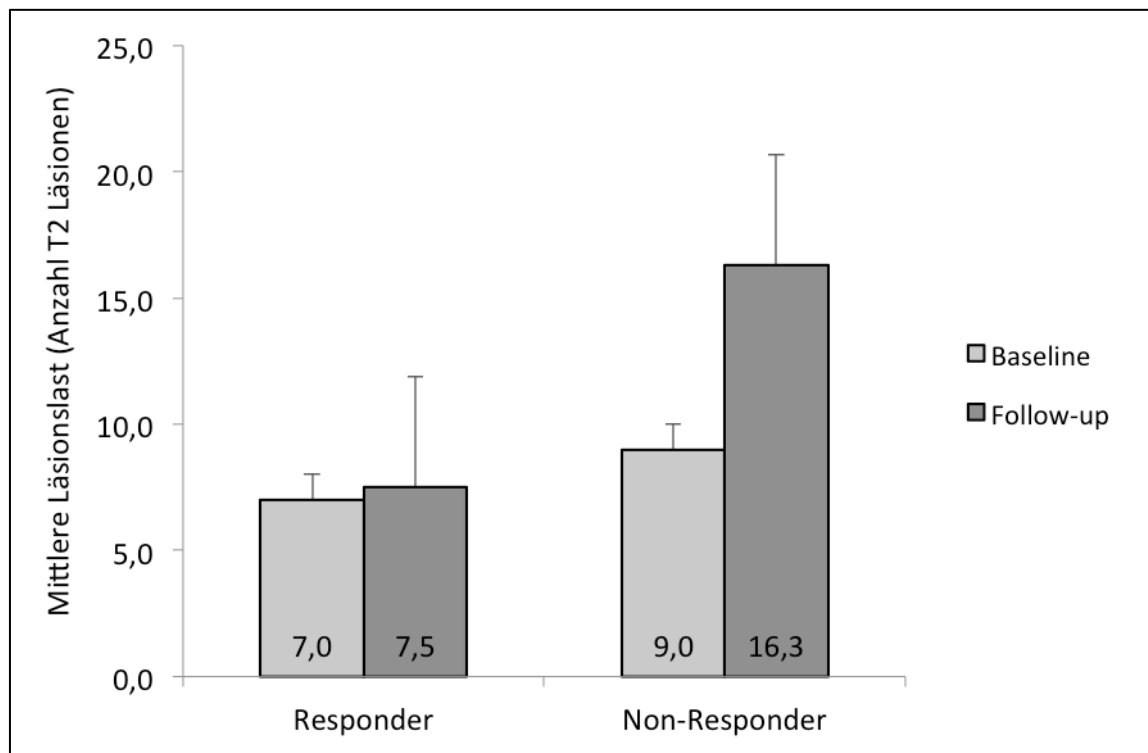


Berücksichtigt wurden insgesamt 24 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden. Für das Kriterium Schub fanden sich n=10 Responder, n=8 Non-Responder, für das Kriterium EDSS fanden sich n=11 Responder, n=7 Non-Responder. Insgesamt brachen n=6 Patienten die Therapie ab.

4.1.4. Morphologische Befunde in der Magnetresonanztomographie

Als MRT-Responder wurden jene Patienten gewertet, die in allen vier Bewertungskriterien (T2-Läsionen, Gadolinium-positive T1-Läsionen, Black Holes, Atrophie) keine Progression aufwiesen. Gemessen wurden die Veränderungen vom Baseline-MRT zum Follow-up nach durchschnittlich vierjähriger Therapie. Aus 20 Patienten, bei denen sowohl Baseline MRT-Untersuchungen als auch Follow-up MRT-Untersuchungen durchgeführt wurden, wurden sechs (30%) Responder und 14 (70%) Non-Responder identifiziert. In Abbildung 12 ist eine graphische Übersicht der Entwicklung der T2-Läsionslast (Anzahl der Läsionen) im Vergleich der beiden Gruppen zwischen dem Baseline-MRT und dem Follow-up-MRT nach im Mittel vierjähriger Therapie dargestellt. Zum Ausdruck kommt die mittlere Anzahl sowie der Standardfehler der detektierten Läsionen für die Kohorte der Responder und Non-Responder.

Abbildung 12: Mittlere Läsionslast am Beispiel der T2-Läsionen



Dargestellt ist die mittlere Läsionslast und Standardfehler gemessen an der Anzahl der T2-Läsionen für die Gruppe der Responder (n=14) und Non-Responder (n=6) nach dem MRT zum Baselinezeitpunkt und zum Follow-up nach durchschnittlich vierjähriger Nachbeobachtungszeit.

Bei insgesamt 13 Patienten zeigte sich eine Zunahme der T2-Läsionen, bei sechs Patienten gleichfalls eine Zunahme der Gd+-Herde. Eine Remission einzelner MRT-Befunde zeigte sich bei zwei Patienten (1x Rückgang der T2-Läsionen; 2x Rückgang der Gd+-Läsionen). Eine Übersicht der Untersuchungsergebnisse ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Progression in den MRT-Verlaufsbeobachtungen

Patient ID	T2	BH	KM	A	R / NR
1	0	0	0	0	R
2	1	1	0	1	NR
3	0	0	0	0	R
4	1	0	0	1	NR
5	0	0	0	0	R
6	0	0	0	0	R
7	1	1	1	1	NR
8	1	0	0	0	NR
9	1	0	1	0	NR
10	1	1	0	1	NR
11	0	0	0	0	R
12	1	0	1	0	NR
13	1	0	0	0	NR
14	1	0	1	0	NR
15	kein Follow-up				
16	kein Follow-up				
17	kein Follow-up				
18	-1	1	-1	1	NR
19	1	0	-1	0	NR
20	0	0	0	0	R
21	1	0	0	1	NR
22	1	1	1	0	NR
23	kein Follow-up				
24	1	0	1	0	NR
n = 20					(n) R = 6
					(n) NR = 14

Dargestellt sind die Ergebnisse der MRT-Befundbeurteilung des Patientenkollektivs anhand der T2-Läsionen (T2), der hypointensen T1-Läsionen (Black Holes, BH), der T1-Läsionen mit Kontrastmittelaufnahme (KM) und der Hirnatrophie (A). R = Responder; NR = Non-Responder. Beurteilungskriterien: 0 = Befunde gleichbleibend gegenüber Baseline; 1 = Befunde verschlechtert gegenüber Baseline; -1 = Befunde verbessert gegenüber Baseline.

Für 15 Patienten konnte eine vergleichende Gegenüberstellung der klinischen und paraklinischen Parameter durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass die Zuordnungen der Kategorien Responder und Non-Responder für die Kriterien Krankheitsprogression (EDSS), Schubfrequenz und Progression in der MRT nicht immer kongruent sind. Insgesamt wiesen vier Patienten das gleiche Muster für alle drei Kriterien auf (Tabelle 14). Nach vierjähriger Beobachtung zeigten zwei der 24 Patienten keine Schübe, keine Zunahme der Progression und gleichfalls keine Verschlechterungen der MRT-Befunde. Zwei Patienten zeigten gleichfalls einen Progress der Befunde in allen drei Kriterien. Schließt man die MRT-Befunde zur paraklinischen Verlaufsbeurteilung aus, zeigen sich für den klinischen Verlauf Überschneidungen für insgesamt 9 der 15 Patienten nach zweijähriger Beobachtung.

Tabelle 14: Gegenüberstellung von EDSS, Schubfrequenz und MRT

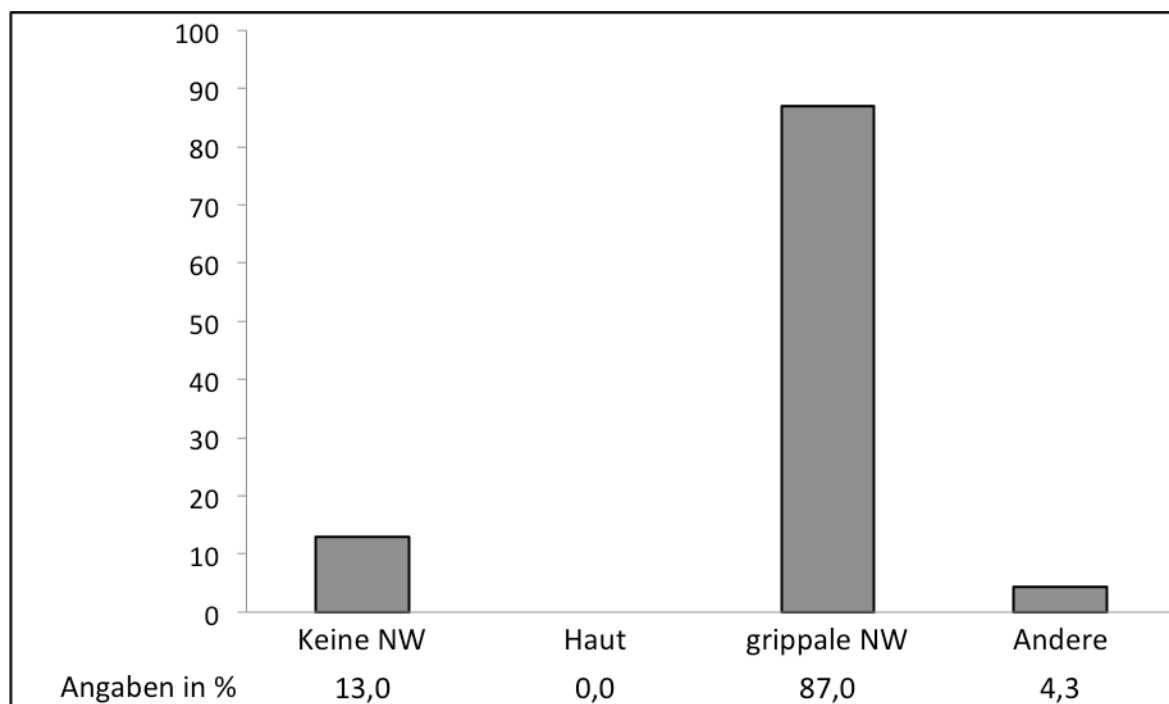
Pat ID	EDSS (2Jahre)	Schub (2Jahre)	MRT (4Jahre)	EDSS + Schub identisch	EDSS + Schub + MRT identisch
2	R	R	NR	✓	
3	R	R	R	✓	✓
4	R	NR	NR		
6	R	R	R	✓	✓
7	NR	R	NR		
8	NR	R	NR		
10	NR	R	NR		
12	R	R	NR	✓	
13	R	R	NR	✓	
14	NR	NR	NR	✓	✓
18	R	R	NR	✓	
19	R	NR	NR		
21	NR	NR	NR	✓	✓
22	NR	R	NR		
24	R	R	NR	✓	
n=15				n=9	n=4

Die Tabelle zeigt einen gegenüberstellenden Vergleich des klinischen und MRT-morphologischen Verlaufs aller Patienten, die sowohl klinisch als auch bildmorphologisch nachbeobachtet werden konnten. R = Responder; NR = Non-Responder.

4.1.5. Nebenwirkungen der Interferon- β Therapie

Insgesamt fanden 23 Patienten Eingang in die zunächst zweijährige Evaluationsphase des Nebenwirkungsprofils (Kapitel 4.1.1, Tabelle 12). Zwei Patienten beendeten die Therapie zwischen dem zweiten und vierten Therapiejahr aufgrund von Nebenwirkungen. Kein Patient zeigte signifikante, injektionsbedingte Hautreaktionen (Abszesse, Rötung oder Induration der Punktionsstelle, Blutergüsse). Das Nebenwirkungsprofil der Studienpopulation ist in Abbildung 13 dargestellt. Von allen Patienten, die Nebenwirkungen aufwiesen, mussten 85,7% symptomatisch oder prophylaktisch medikamentös behandelt werden. 14,3% der Patienten benötigten trotz Nebenwirkungen keine symptomatische Therapie. Zur Therapie wurde Paracetamol oder Ibuprofen eingesetzt. Insgesamt zeigte sich das Auftreten von Nebenwirkungen im Verlauf der Behandlung rückläufig. Zum vierjährigen Nachbeobachtungszeitpunkt gaben 40% der noch behandelten Patienten an, nebenwirkungsfrei zu sein.

Abbildung 13: Nebenwirkungen unter der IFN- β 1a Therapie



Dargestellt sind die prozentualen Anteile der detektierten Nebenwirkungen jener Patienten, die über zwei Jahre durchgehend mit IFN- β 1a therapiert wurden (n=23).

4.2. Differentielle Genexpression

4.2.1. Transkriptionelle Änderungen im Blut durch die IFN- β 1a Therapie

Die Datenverarbeitung der Microarray-Genchips resultierte in einem Expressionsdatensatz von 15734 Genen. Die Expression dieser Gene wurde in 72 PBMC-Proben bestimmt, die bei 24 Studienpatienten zum Baselinezeitpunkt, eine Woche nach der ersten Injektion sowie nach vier Wochen Therapie gewonnen wurden. Es wurden jene Gene bestimmt, welche nach dem Therapiebeginn mit IFN-1 β a i.m. signifikant hoch- oder runterreguliert waren. Es wurden 102 Gene identifiziert, die nach der ersten Injektion verglichen zu Baseline differentiell exprimiert waren und 24 Gene, die nach der vierten Woche verglichen zu Baseline differentiell exprimiert waren. Insgesamt wurden 121 verschiedene Gene gefiltert, von denen im Beobachtungszeitraum gegenüber den Baseline-Werten 72 hochreguliert und 49 runterreguliert waren (Anhang A).

Die für ausgewählte Gene durchgeführte Überprüfung der Expressionsänderungen durch *real-time PCR* ergab bei allen quantitativ überprüften mRNA-Messungen signifikante Korrelationen zwischen den Daten der Microarray-Analyse und den Daten der *real-time PCR* Methode. Ein Vergleich der Expressionslevel vor der ersten und zweiten Injektion bestätigte die in der Microarray-Analyse festgestellten Expressionsänderungen der getesteten Gene (Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der *real-time* PCR-Messungen mit den Affymetrix Genchip-Messungen

Gen-Symbol	Real-time PCR Daten (14 Patienten)				Affymetrix Daten (14 Patienten)				Korrelationskoeffizient	
	Mittel Baseline	Mittel Woche 1	T-Test Woche1 vs. Baseline	Regulation 1 Woche	Mittel Baseline	Mittel Woche 1	T-Test Woche1 vs. Baseline	Regulation 1 Woche	Pearson R	Pearson P
FCER1A	22	12	<0,001	↓	1227	738	<0,001	↓	0,90	<0,001
TNFSF10	129	79	0,039	↓	3637	2665	0,012	↓	0,92	<0,001
CSF1R	210	104	<0,001	↓	4707	2752	<0,001	↓	0,67	<0,001
CDKN1C	63	20	<0,001	↓	855	385	<0,001	↓	0,91	<0,001
OAS1	59	36	0,038	↓	1156	791	0,005	↓	0,85	<0,001
AQP9	77	128	0,021	↑	1690	2475	0,027	↑	0,94	<0,001
ALOX12	40	66	0,003	↑	737	1207	0,002	↑	0,92	<0,001
GANZ	61	90	0,023	↑	873	1282	0,007	↑	0,81	<0,001
ESAM	33	51	0,006	↑	356	739	0,004	↑	0,82	<0,001
MS4A7	58	26	<0,001	↓	2808	1422	<0,001	↓	0,94	<0,001
CTSW	69	79	0,113	■	2687	3094	0,040	↓	0,73	<0,001
FGFBP2	70	90	0,053	■	5993	7071	0,132	■	0,93	<0,001
MX1	117	77	0,295	■	2178	1561	0,219	■	0,99	<0,001
IFIT1	1	1	0,238	■	667	464	0,199	■	0,90	<0,001
B2M	14612	14087	0,608	■	24768	25504	0,172	■	0,38	0,047

Untersucht wurden 12 der 121 gemäß der Affymetrix-Messungen differentiell exprimierten Gene sowie drei weitere Gene (unterer Tabellenteil, grau hinterlegt) mit *real-time PCR* in einer Subpopulation von 14 Patienten (Kapitel 3.3.2). Zur Bestimmung des linearen Zusammenhangs zwischen den PCR-Messungen und den Affymetrixdaten wurden der Korrelationskoeffizient „Pearson R“ und das dazugehörige Signifikanzniveau „Pearson P“ aus insgesamt 28 Datenpunkten bestimmt (Affymetrixdaten und PCR-Daten zu zwei Zeitpunkten: Baseline und eine Woche nach Therapiebeginn). Mit Hilfe von t-Tests wurde die Expression von beiden Zeitpunkten (Baseline und nach einer Woche Therapie) miteinander verglichen. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Gene als signifikant hoch- oder runterreguliert angesehen. Legende: Mittel Baseline = Transkriptionslevel des Gens zu Baseline gemittelt über die 14 Patienten; Mittel Woche 1 = Transkriptionslevel des Gens nach der ersten Therapiewoche; ↓(rot) = Gen wurde runterreguliert; ↑(grün) = Gen wurde hochreguliert; ■(gelb) = keine signifikante Expressionsänderung.

4.2.2. Funktionelle Analyse der exprimierten Gene

Die Gene Ontology-Analyse zeigte, dass viele der gefilterten Gene bei Prozessen des Immunsystems partizipieren. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 16 dargestellt. Gene, die mit einer positiven Regulation der Immunantwort assoziiert sind, sind beispielsweise in dem gefilterten Genset signifikant überrepräsentiert. Die entsprechende Gene Ontology-Kategorie GO:0050896 (*Positive Regulation of Immune Response*) enthält 26 der 121 gefilterten Gene, unter anderem TNFSF10, TLR7, FCER1A, IL1R2, OAS1 und AQP9.

Tabelle 16: Überrepräsentierte GO-Terme (Gene Ontology)

GO ID	GO Terminus	p-Wert	Gene (n)
GO:0006955	Immune response	< 0,0001	14
GO:0002376	Immune system process	0,0001	16
GO:0009605	Defense response	0,0005	13
GO:0030334	I-κB kinase / NF-κB cascade	0,0019	4
GO:0009611	Pos. regulation of immune system process	0,0025	9
GO:0050896	Pos. regulation of immune response	0,0026	26
GO:0051270	Protein kinase cascade	0,0028	4
GO:0007218	Inflammatory response	0,0028	4
GO:0051046	Regulation of immune system process	0,0030	4
GO:0051047	Regulation of immune response	0,0034	3
GO:0042108	Positive regulation of multicellular organismal process	0,0036	3
GO:0006954	Fatty acid metabolic process	0,0046	7
GO:0006916	Immunoglobulin mediated immune response	0,0062	5
GO:0042221	B cell mediated immunity	0,0078	10
GO:0051050	Activation of immune response	0,0086	3
GO:0009967	Lymphocyte mediated immunity	0,0090	5

Dargestellt sind die GO-Terme mit abnehmender Relevanz bzgl. der 121 gefilterten Gene; GO ID = Identifikationsnummer für die GO-Datenbank (<http://geneontology.org>); p-Wert = basierend auf einer hypergeometrischen Verteilung [Falcon & Gentleman 2007]; Gene = es wurde gefordert, dass jeder GO-Term zu mindestens 3 der 121 differentiell exprimierten Gene assoziiert ist, angegeben ist die tatsächliche Anzahl assoziierter Gene.

Eine weitere identifizierte GO-Kategorie, die charakteristisch für die gefilterten 121 Gene ist, umfasst Gene, die bei der positiven Regulation der B-Zell-medierten Immunreaktion eine Rolle spielen. In dieser Kategorie (GO:0042221) fanden sich 10 Gene als differentiell exprimiert unter der IFN- β Therapie. Bei der Analyse der Genefunktionen fanden sich darüber hinaus signifikante Expressionsänderungen von G-Protein- und G-Proteinrezeptor-kodierenden Genen. Aus der Liste der 121 gefilterten Gene finden sich hier die folgenden Gene: GNAZ, GNG8, GPR20, GPR44, GPR56 und GPR97. Außerdem wurde die Hochregulation der Gene JAM3, ESAM, CLDN5, ITGA2B und ITGB3 festgestellt, die für Adhäsionsmoleküle (AM) kodieren.

4.3. Netzwerkanalyse

4.3.1. Identifikation von Transkriptionsfaktor-Gen Interaktionen

Die gefilterten Gene stehen unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität wiederum direkt oder indirekt von der Interferon-Therapie abhängig ist. Um eine Aussage über die regulatorischen Interaktionen zwischen den Genen und Transkriptionsfaktoren tätigen zu können, wurden die Promotorbereiche aller Gene nach TFBS analysiert. Eine Übersicht der resultierenden, überrepräsentierten TFBS zeigt Tabelle 17. Überrepräsentierte TFBS konnten für 11 verschiedene Transkriptionsfaktorgruppen gefunden werden. Diese 11 Transkriptionsfaktoren regulieren nach den Vorhersagen 77 der 121 Gene über 152 unterschiedliche TF-Gen-Interaktionen. Jeder Transkriptionsfaktor interagiert mit dem Promotorbereich von mindestens acht Genen. Besonders erwähnenswert ist, dass bei einer Untergruppe von 21 Genen eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle für NF- κ B festgestellt wurde.

Tabelle 17: Überrepräsentierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den regulatorischen Regionen der 121 Gene

TF Symbol	Transfac Zugang	Name	p-Wert	Gene (n)
SRF	M00152, M00186, M00215	Serum response factor	0,003	17
TFCP2	M00072	Transcription factor CP2	0,019	11
TOPORS	M00480	Topoisomerase I binding	0,019	11
HOXA9, MEIS1, TGIF1	M00418, M00419, M00420, M00421	Homeobox A9, Meis homeobox 1, TGFB-induced factor homeobox 1	0,022	20
HNF1A	M00132, M00206	HNF1 homeobox A	0,040	8
TBP	M00216, M00252, M00471	TATA box binding protein	0,081	11
IRF1, IRF2	M00062, M00063	Interferon regulatory factor 1 und 2	0,086	9
ZIC1, ZIC2, ZIC3	M00448, M00450, M00449	Zic family members 1-3	0.091	14
MEF2A	M00006, M00232, M00231, M00233, M00026	Myocyte enhancer factor 2A	0,094	12
TFAP4	M00175, M00176, M00005	Transcription factor AP-4	0,097	18
NFKB1, NFKB2, REL, RELA	M00051, M00052, M00053, M00054, M00194, M00208	Nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B cells family member	0,098	21

$\Sigma = 152$

TF = Transkriptionsfaktor; Transfac Zugang = Transfac-Datenbank; p-Wert = basierend auf einer Hypergeometrischen Verteilung; Gene = Anzahl der Gene, die eine DNA-Bindungsstelle für den entsprechenden Transkriptionsfaktor aufweisen; Σ = Summe der Gen-Transkriptionsfaktor-Interaktionen.

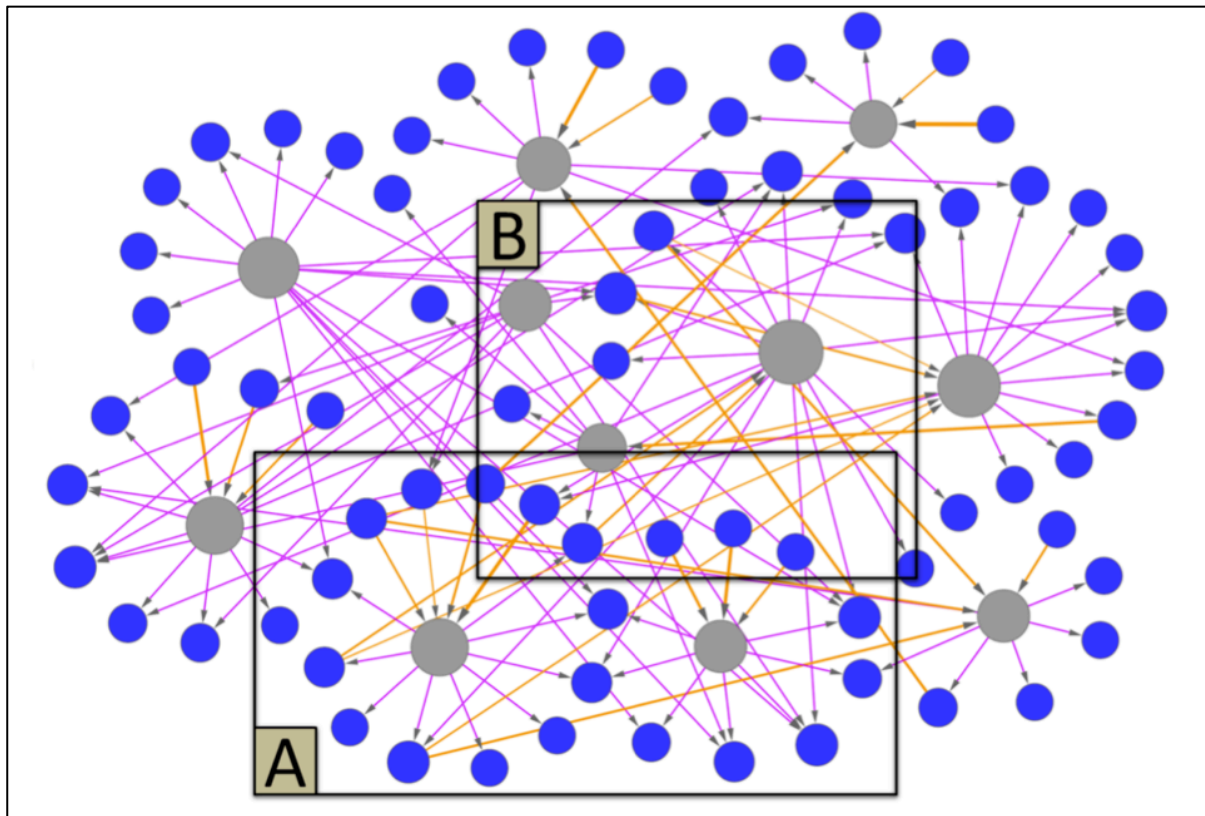
NF- κ B-Proteine sind Schlüsselregulatoren in der Transkription einer Vielzahl von inflammatorischen Genen und werden durch zahlreiche intra- und extrazelluläre Stimuli, wie beispielsweise Interferon, aktiviert. Die Informationen der TFBS-Analyse wurden verwendet, um ein GRN-Modell mit Hilfe des TILAR-Algorithmus [Hecker et al. 2009] zu erstellen.

4.3.2. Netzwerk Interferon- β modulierter Gene

Die mit Hilfe des TILAR-Algorithmus erstellten GRN-Modelle können u.a. folgende genregulatorische Aspekte aufzeigen:

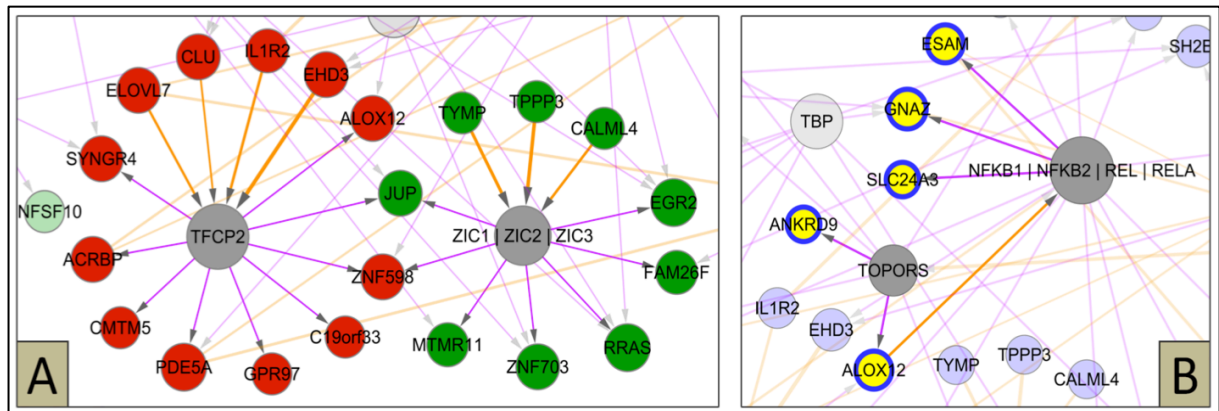
- Gene, die von Transkriptionsfaktoren co-reguliert werden
- Transkriptionsfaktoren, die funktionell verwandte Gene regulieren
- Subnetzwerke unterschiedlicher Aktivität
- Selbstregulation durch Rückkopplung und Vorwärtskopplung

Auf Basis der Expressionsanalyse der 72 Proben mit 121 differentiell exprimierten Genen, sowie 152 identifizierten TF-Gen-Interaktionen aus der TFBS-Analyse, wurde ein GRN mit Hilfe des TILAR-Algorithmus [Hecker et al. 2009] konstruiert. Das auf diese Weise berechnete GRN wies 28 Gen-TF-Interaktionen und 102 TF-Gen-Interaktionen auf [Hecker et al. 2012]. 72 der 121 differentiell exprimierten Gene wurden dabei mindestens mit einem der TF assoziiert und sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Die Analyse der TF zeigt, dass diese durch wenige Gene beeinflusst werden. Maximal fünf, durchschnittlich 1,6 regulierende Gene beziehen sich in dem mathematischen Modell auf je einen TF. Einige Netzwerkknotenpunkte sind über besonders viele Interaktionen verbunden. Hierzu zählt insbesondere der NF- κ B-Komplex, der 15 TF-Gen-Interaktionen im Netzwerk aufweist (Abbildung 15).

Abbildung 14: Genregulatorisches Netzwerk

Das GRN enthält 72 der 121 gefilterten Gene (siehe Text). Die übrigen 49 Gene sind nicht dargestellt. Zwei Subnetzwerke (A, B) werden detailliert in Abbildung 15 gezeigt. Grauer Punkt = Transkriptionsfaktor (11x); blauer Punkt = Gen (72x); roter Pfeil = Transkriptionsfaktor-Gen Interaktion; gelber Pfeil = Gen-Transkriptionsfaktor Interaktion. Darstellung modifiziert nach Hecker et al. 2012.

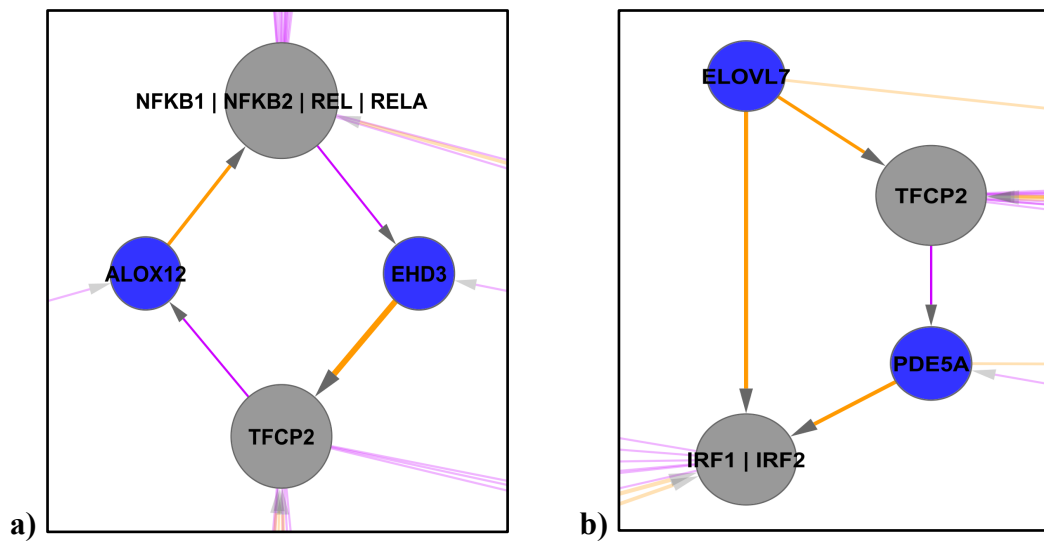
Abbildung 15(A) zeigt, dass im Modell der Transkriptionsfaktor TFCP2 die Expression von 9 Genen reguliert. Diese Gene (u.a. ALOX12, GPR97, CMTM5) werden bis auf das JUP-Gen durch TFCP2 hochreguliert. In ähnlicher Weise hat der Netzwerkknoten ZIC1, ZIC2, ZIC3 vorhergesagte regulatorische Einflüsse auf sieben vorwiegend runterregulierte Gene unter der IFN- β Therapie. Das JUP-Gen wird durch die Transkriptionsfaktoren TFCP2 und die ZIC-TF-Familie co-reguliert. Beide haben dem Modell nach auf die mRNA-Expression des Gens insgesamt einen runterregulierenden Effekt. Bei der ZIC-Familie handelt es sich um Zink-Finger-Proteine. Die ZIC-Familie wurde in der TFBS-Analyse zu einem TF zusammengefasst, da die Mitglieder gleiche oder ähnliche DNA-Sequenzen binden (Kapitel 3.4.2) [Mizugishi et al. 2001].

Abbildung 15: Detailabbildungen des Genregulatorischen Netzwerks

Dargestellt sind zwei ausgewählte Subnetzwerke des in dieser Arbeit rekonstruierten GRN (Abb.14). Es werden die regulatorischen Wechselwirkungen der Gene und TF gezeigt. **(A)** Zahlreiche Gene werden co-reguliert. Exemplarisch gezeigt sind hoch- bzw. runterregulierende Mechanismen der Transkriptionsfaktoren TFCP2 und ZIC1-3 (Kapitel 4.3.2). **(B)** Einige der gefilterten Gene partizipieren potentiell bei der Ausprägung von therapie-assoziierten Nebenwirkungen. Dargestellt ist das Subnetzwerk einiger Gene, deren Expressionslevel vor Therapiebeginn bei Patienten, die Nebenwirkungen entwickelten, erhöht waren. Auffälliger Regulator ist hierbei NF-κB (Kapitel 4.4.1). Roter Punkt = hochreguliertes Gen; grüner Punkt = runterreguliertes Gen; grauer Punkt = Transkriptionsfaktor; gelber Punkt = zu Baseline differenziell exprimiertes Gen bei Patienten mit Nebenwirkungen; roter Pfeil = Transkriptionsfaktor-Gen Interaktion; gelber Pfeil = Gen-Transkriptionsfaktor Interaktion. Abbildung modifiziert nach Hecker et al. 2012.

Das rekonstruierte GRN weist vier Rückkopplungsmechanismen (feedback loops) und 25 Vorwärtskopplungsmechanismen (feedforward loops), die aus maximal vier Verbindungen bestehen, auf. Zwei exemplarisch dargestellte Mechanismen mit Rückwärts- und Vorwärtskopplung finden sich in Abbildung 16. Der exemplarisch dargestellte Rückkopplungsmechanismus NF-κB → EHD3 → TFCP2 → ALOX12 → NF-κB erklärt möglicherweise die höhere Expression von EHD3 und ALOX12 unter IFN-β Therapie.

Abbildung 16: Beispiel eines Feedback-Loop (a) und eines Feedforward-Loop (b) im genregulatorischen Netzwerkmodell

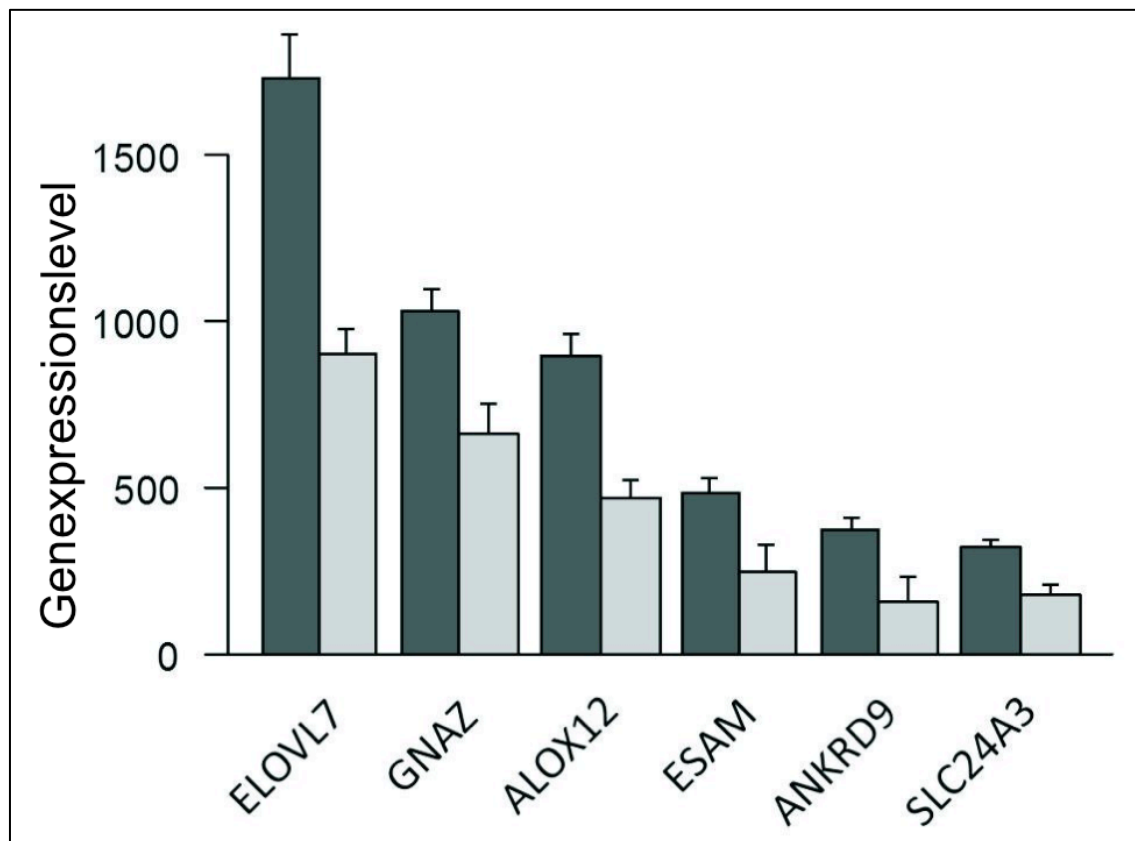


a) Feedback-Loop = Rückkopplungsmechanismus, hierbei wird das Ausgangsereignis durch Folgemechanismen beeinflusst und reagiert somit auf das von ihm verursachte Ergebnis; b) Feedforward-Loop = Vorwärtskopplungsmechanismus, hierbei reagieren mehrere Folgeaktionen auf das Zielereignis. Blauer Punkt = Gen; grauer Punkt = Transkriptionsfaktor; roter Pfeil = Transkriptionsfaktor-Gen Interaktion; gelber Pfeil = Gen-Transkriptionsfaktor Interaktion.

4.4. Assoziation von Expressionsmustern und den klinischen Daten

4.4.1. Grippale Nebenwirkungen und deren assoziierte Gene

In einer weiteren Analyse wurden signifikante Unterschiede im Genexpressionsniveau zwischen Patienten mit grippalen Nebenwirkungen (n = 20) und nebenwirkungsfreien Patienten (n = 4) in den ersten drei Monaten nach Therapieinitiierung ermittelt. Patienten, die innerhalb der ersten drei Therapiemonate an grippalen Nebenwirkungen litten, zeigten bereits zum Baselinezeitpunkt im Blut signifikant erhöhte Expressionslevel von sechs der 121 gefilterten Gene, die in Abbildung 17 gezeigt werden.

Abbildung 17: Expressionsunterschiede bei Patienten mit und ohne Nebenwirkungen

Dargestellt sind die Expressionsunterschiede von Patienten mit und ohne Nebenwirkungen. Auf der y-Achse sind die Genexpressionlevel dargestellt (Mittelwert + Standardfehler). Die x-Achse zeigt sechs der 121 Gene, die signifikant differentiell zwischen den beiden Gruppen exprimiert waren (t-Test, p-Wert < 0,05). Hellgrauer Balken = Patienten ohne Nebenwirkungen, dunkelgrauer Balken = Patienten mit Nebenwirkungen. Darstellung modifiziert nach Hecker et al. 2012.

Fünf Gene, ESAM, GANZ, SLC24A3, ANKRD9 und ALOX12, die in Bezug auf die grippalen Nebenwirkungen der IFN- β 1a Therapie als signifikant differentiell exprimiert gefunden wurden, finden sich in einem Subnetzwerk des oben dargestellten GRN wieder. Sie stehen in regulatorischer Interaktion mit NF- κ B und TOPORS. In Abbildung 15 (B) sind die Interaktionen graphisch dargestellt.

4.4.2. Differentielle Genexpression für die Kriterien EDSS und Schub

Die Ergebnisse der statistischen Analyse zur Identifikation potentieller Markergene für den weiteren langfristigen klinischen Verlauf der Patienten finden sich in den Tabellen 18 und 19. Die Ergebnisse der Analyse für das klinische Kriterium Schub finden sich in Tabelle 18. Es wurde eine Gruppe Schub-Responder (n = 15) gegen eine Gruppe Schub-Non-Responder (n = 8) verglichen (Kapitel 4.1.2). Die Gene LOC440456, SLC25A29, SEL1L2, GLIS2, ENSG00000215067, FOXN4, PPM1J, PPP1R3B und Gcom1 wiesen in der Non-Responder-Gruppe signifikant höhere Expressionslevel vor Therapiebeginn auf, ihr MAID-Score ist positiv. Die übrigen Gene zeigten signifikant niedrigere Expressionslevel mit einem negativen MAID-Score.

Tabelle 18: Top 20 der differentiell exprimierten Gene für das Kriterium Schub

GeneCard ID	Gensymbol	Name	MAID-Score	P-Wert
GC17M060211	LOC440456	similar to pleckstrin homology domain	3,59	0,0002
GC06M027947	HIST1H3I	histone cluster 1, H3i	-3,31	0,0003
GC14M099827	SLC25A29	solute carrier family 25, member 29	3,13	0,0004
GC20M013779	SEL1L2	sel-1 suppressor of lin-12-like 2 (C. elegans)	3,40	0,0016
GC16P004304	GLIS2	GLIS family zinc finger 2	3,09	0,0021
GC15P038462	C15orf23	chromosome 15 open reading frame 23	-2,72	0,0026
GC01P045925	TMEM69	transmembrane protein 69	-3,07	0,0033
GC17M006829	ENSG00215067		2,68	0,0037
GC20P031404	ENSG00131062		-2,97	0,0038
GC03M049899	MST1R	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	-3,26	0,0039
GC12M108178	FOXN4	forkhead box N4	3,51	0,0071
GC04M000425	ZNF721	zinc finger protein 721	-3,00	0,0085
GC01M100327	LRRC39	leucine rich repeat containing 39	-3,09	0,0092
GC01M112965	PPM1J	protein phosphatase 1J (PP2C domain containing)	2,93	0,0111
GC14P064450	CHURC1	churchill domain containing 1	-3,26	0,0117
GC20M029899	DUSP15	dual specificity phosphatase 15	-2,63	0,0121
GC08M009032	PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	2,66	0,0123
GC19M060354	TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)	-3,07	0,0129
GC15P055673	Gcom1	GRINL1A combined protein	4,26	0,0135
GC0XP084146	APOOL	apolipoprotein O-like	-2,65	0,0137

Tabellarisch dargestellt sind die 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene (Kandidatengene), sortiert nach dem Signifikanzniveau für das Bewertungskriterium „Schub“ auf Basis der klinischen Daten nach dem 2-Jahres-Follow-up.

Die Ergebnisse der Expressionsdatenanalyse für das Kriterium Progression gemessen am EDSS finden sich in Tabelle 19. Es wurde eine Gruppe EDSS-Responder (n = 15) gegen eine Gruppe EDSS-Non-Responder (n = 8) verglichen (Kapitel 4.1.3). Die Gene REEP3, FPR2, AQP8 und ASIP wiesen in der Non-Responder-Gruppe signifikant niedrigere Expressionslevel zu Baseline auf, ihr MAID-Score ist negativ. Die übrigen zeigten signifikant höhere Expressionslevel mit einem positiven MAID-Score (Anhang B).

Tabelle 19: Top 20 der differentiell exprimierten Gene für das Kriterium Progression

GeneCard ID	Gen symbol	Name	MAID-Score	P-Wert
GC01M154310	MEX3A	Mex-3 homolog A (C. elegans)	2,84	0,0001
GC01M023705	E2F2	E2F transcription factor 2	3,05	0,0004
GC19P046312	CYP2F1	Cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1	2,77	0,0005
GC18P010444	APCDD1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	3,07	0,0007
GC20P060191	GTPBP5	GTP binding protein 5 (putative)	3,36	0,0008
GC19P059158	CACNG8	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	3,88	0,0011
GC16P056134	GPR114	G protein-coupled receptor 114	2,51	0,0014
GC10P064952	REEP3	receptor accessory protein 3	-2,64	0,0018
GC19P056955	FPR2	formyl peptide receptor 2	-2,54	0,0019
GC15M066286	CLN6	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	2,89	0,0027
GC0XM152590	PNCK	pregnancy up-regulated non-ubiquitously expressed CaM kinase	2,54	0,0028
GC10P050487	CHAT	choline acetyltransferase	2,96	0,0029
GC16P025135	AQP8	aquaporin 8	-2,58	0,0029
GC22U990226	KIAA1652	KIAA1652 protein	3,30	0,0031
GC12M010456	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	3,16	0,0031
GC19M052623	SLC8A2	solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 2	2,84	0,0038
GC01P154573	C1orf182	chromosome 1 open reading frame 182	3,61	0,0043
GC20P032312	ASIP	agouti signaling protein, nonagouti homolog (mouse)	-2,61	0,0048
GC17M035330	ORMDL3	ORM1-like 3 (S. cerevisiae)	3,60	0,0064
GC0XP075564	MAGEE1	melanoma antigen family E 1	4,58	0,0065

Tabellarisch dargestellt sind die 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene (Kandidatengene), sortiert nach dem Signifikanzniveau für das Bewertungskriterium Progression auf Basis der klinischen Daten nach dem 2-Jahres-Follow-up.

4.4.3. Differentielle Genexpression für das Kriterium MRT

Als paraklinisches Bewertungskriterium fand die MRT Eingang in die Analyse der differentiellen Genexpression. Die Ergebnisse der Assoziationsanalyse für das Kriterium „Progression in der MRT“ finden sich in Tabelle 20. Es wurde die Baseline-Expression einer Gruppe MRT-Responder (n=6) gegen die einer Gruppe MRT-Non-Responder (n=14) verglichen (Kapitel 4.1.4). Die Gene MGC10981, C1orf83, LOC553137, UBQLN4, ONECUT2, HLA-DPA1, PUSL1, ROGDI und C6orf154 wiesen signifikant höhere Expressionslevel in der Gruppe der MRT Non-Responder mit einem positiven MAID-Score auf. Die übrigen Gene zeigten signifikant niedrigere Expressionslevel, ihr MAID-Score ist negativ.

Tabelle 20: Top 20 der differentiell exprimierten Gene für das Kriterium MRT

GeneCard ID	Gensymbol	Name	MAID-Score	P-Wert
GC16P030391	ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	-2,69	0,0004
GC04U900429	MGC10981	hypothetical protein MGC10981	4,30	0,0005
GC03P197955	PAK2	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	-2,62	0,0009
GC09P033740	PRSS3	protease, serine, 3	-2,75	0,0012
GC01P054291	C1orf83	chromosome 1 open reading frame 83	2,78	0,0018
GC06U900777	LOC553137	hypothetical LOC553137	3,50	0,0024
GC05M172127	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-3,31	0,0042
GC01M154271	UBQLN4	ubiquilin 4	2,86	0,0045
GC05P137829	EGR1	early growth response 1	-6,35	0,0048
GC18P053253	ONECUT2	one cut homeobox 2	2,63	0,0049
GC11P065143	PCNXL3	pecanex-like 3 (Drosophila)	-4,57	0,0075
GC06M033140	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II alpha 1	3,40	0,0078
GC01P001233	PUSL1	pseudouridylate synthase-like 1	2,66	0,0083
GC01M085103	MCOLN2	mucolipin 2	-2,58	0,0088
GC16M004787	ROGDI	rogdi homolog (Drosophila)	2,79	0,0100
GC11P061340	FADS2	fatty acid desaturase 2	-3,76	0,0103
GC16P069239	IL34	interleukin 34	-2,81	0,0109
GC01M110848	KCNA2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	-2,56	0,0113
GC02P202380	PFTK2	PFTAIRE protein kinase 2	-3,18	0,0113
GC06M043582	C6orf154	chromosome 6 open reading frame 154	3,20	0,0115

Tabellarisch dargestellt sind die 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene (Kandidatengene), sortiert nach dem Signifikanzniveau für das Bewertungskriterium „MRT“ auf Basis der klinischen Daten nach dem 4-Jahres-Follow-up.

5. Diskussion

Die MS ist die häufigste immunvermittelte Erkrankung des ZNS und hat innerhalb der Neurologie einen bedeutenden diagnostischen und therapeutischen Stellenwert [World Health Organization, WHO 2004]. In ihrer häufigsten klinischen Manifestation hat sie einen schubförmig-intermittierenden Verlauf [Lublin & Reingold 1996]. Die Therapie der RRMS stützt sich gegenwärtig auf eine immunmodulatorische Basistherapie, die im Falle von auftretenden Symptomen durch eine symptomatische Behandlung ergänzt wird [Leitlinien zur MS, DGN 2012]. Bei der immunmodulatorischen Therapie hat sich weltweit rekombinantes IFN- β als Standard etabliert [Kappos et al. 2007, Jacobs et al. 2000]. Die Wahl des geeigneten Basistherapeutikums wird durch eine ungenaue Krankheitsprognose, einem interindividuell unterschiedlichen Ansprechverhalten auf das verwendete Präparat und z.T. erheblichen Nebenwirkungen erschwert [Hemmer & Hartung 2007, Waubant et al. 2003]. Darüber hinaus sind die Wirkmechanismen der medikamentös eingesetzten β -Interferone auf molekularbiologischer Ebene nur teilweise geklärt. Die Suche nach klinischen und molekularbiologischen Markern für den Behandlungserfolg ist Gegenstand zahlreicher internationaler Forschungsbemühungen (Kapitel 1.4.). In der vorliegenden Arbeit wurden der klinische Verlauf und die transkriptionellen Veränderungen in den peripheren Blutzellen von 24 RRMS-Patienten untersucht. Die Patientenpopulation erhielt einmal wöchentlich eine Applikation von 30 μ g IFN- β 1a i.m.. Die Evaluation des Krankheitsverlaufs wurde anhand der Schubfrequenz, der Progression (EDSS) und der MRT-Befunde durchgeführt [Rio et al. 2009].

Klinik

Innerhalb des vierjährigen Therapie- und Beobachtungszeitraums wurde bei sechs der 24 Patienten ein Therapieabbruch verzeichnet. Bei zwei Patienten musste die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen beendet werden, ein Patient musste bei zunehmender Krankheitsprogression die Therapie abbrechen, bzw. umstellen, zwei Patienten brachen die Therapie selbstständig aufgrund von fehlender Therapieadhärenz ab. Insgesamt betrug die Abbruchrate 25% nach vier Jahren. Die Abbruchrate aufgrund von fehlender Adhärenz betrug etwa 8%. Dies entspricht den Ergebnissen einer großen multinationalen Phase-IV-Beobachtungsstudie aus dem Jahr 2011 [Devonshire et al. 2011].

Die Patienten wurden innerhalb von durchschnittlich 12,6 (1-136) Monaten (Median 1,5 Monate) nach Diagnosestellung auf die Therapie mit IFN- β 1a i.m. eingestellt (Kapitel 4.1.1). In dem untersuchten Patientenkollektiv wurde den aktuellen Therapieleitlinien Rechnung getragen, wonach eine frühzeitige Primärprophylaxe mit einem hierfür zugelassenen IFN- β Präparat empfohlen wird [DGN-Leitlinien 2012, Kappos et al. 2006, 2007]. Das untersuchte Patientenkollektiv spiegelt repräsentativ den Behandlungsverlauf IFN- β -therapierter MS-Patienten wider [Hemmer & Hartung 2007, Waubant et al. 2003]. Vor Therapiebeginn lag die mittlere Schubfrequenzrate bei 0,9 Schüben/Jahr. Dies entspricht in etwa der durchschnittlichen Schubfrequenzrate einer unbehandelten MS-Patientenpopulation im natürlichen Verlauf [Tremlett et al. 2008]. Von Beginn der IFN- β 1a Therapie bis zum Follow-up Zeitpunkt nach zweijähriger Behandlung waren etwa zwei Drittel der Patienten schubfrei. Nach 48 Monaten Therapie wurde bei 33% der Patienten, die für diesen Zeitraum durchgehend eine IFN- β 1a Therapie erhielten, ein Schubereignis eruiert. Eine Therapie-Responserate von etwa 60% entspricht den Ergebnissen von großen IFN-Vergleichsstudien (EVIDENCE-Studie [Panitch et al. 2002]).

Der EDSS der Patientenpopulation lag bei Therapiebeginn bei durchschnittlich 1,0 (0,0-2,5). Im zeitlichen Verlauf stieg der mittlere EDSS aller Patienten auf 1,5 nach zwei- und vierjähriger Therapie an. Unterscheidet man zwischen der Gruppe der Responder und Non-Responder gemessen am EDSS, so zeigten die Responder einen geringen Anstieg des EDSS von 1,2 zu Baseline auf 1,5 nach zwei Jahren Therapie. Nach vier Jahren Therapie betrug der EDSS in der Gruppe der Responder 1,0. Die Gruppe der Non-Responder stieg nach einer stabilen zweijährigen Therapiephase (EDSS im Mittel 0,9) auf einen mittleren EDSS von 2,3 nach vier Therapiejahren an. Verglichen mit einer großen Multi-Center-Verlaufsstudie von Bermel et al. aus dem Jahr 2010 zeigt die untersuchte Patientenpopulation eine im Vergleich geringere Krankheitsaktivität zu Beginn der Therapie sowie zu den einzelnen Verlaufsbeobachtungszeitpunkten. Die 122 gewerteten Patienten der Untersuchung von Bermel et al. zeigten vor Therapiebeginn einen EDSS von 2,2 (1,0-3,5), nach 2 Jahren einen EDSS von 2,6 (0,0-6,5) und nach 8 Jahren von 3,9 (0,0-8,0) [Bermel et al. 2010]. In der in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorte waren 63% der Patienten EDSS-Responder nach zwei Jahren und 46% der Patienten EDSS-Responder nach vier Jahren IFN- β 1a Therapie. Nahezu identische Ergebnisse zeigten sich in der INCOMIN-Studie, in der die Wirkung der IFN- β 1a i.m. und IFN- β 1b s.c. Präparate untersucht und verglichen wurde (INCOMIN-Studie [Durelli et al. 2002]).

Bei 20 der insgesamt 24 Patienten wurden nach einer durchschnittlich 48monatigen IFN- β 1a Therapie MRT-Untersuchungen durchgeführt. MRT-morphologisch zeigte sich bei 70% der Patienten eine Zunahme pathomorphologischer Veränderungen (T2-Läsionen, Gd+-Läsionen, Black Holes, Atrophie). Die vorliegende Patientenpopulation zeigt trotz einer vergleichsweise stabilen und schubfreien Klinik (EDSS-Responder/Non-Responder nach 4 Jahren 46%/29%, Schub-Responder/Non-Responder nach 4 Jahren 42%/33%, 25% Therapieabbrecher) eine deutliche Zunahme der pathologischen MRT-Befunde. Die stärkste Korrelation von Klinik- und MRT-Befunden fand sich bislang in klinischen MS-Studien in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung bzw. vor Diagnose einer klinisch definitiven MS [Brex et al. 2002]. In größeren, über mehrere Jahre dauernden Untersuchungen konnte bisher eine nur schwach signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der MRT-Läsionen bzw. dem Auftreten neuer Herde und dem klinischen Verlauf der Patienten aufgezeigt werden. Kleinere Studien zeigten häufig keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Klinik und MRT-Befunden [Filippi & Agosta 2010]. Die klinischen und paraklinischen Untersuchungen der vorliegenden Patientenpopulation bestätigen dieses vorbeschriebene klinisch-bildmorphologische Paradoxon. Je nach Bewertungsparameter (Schub, EDSS, MRT) zeigten sich unterschiedliche Einschätzungen des Responder-oder Non-Responderstatus (Tabelle 14). Der klinische Progress und die pathomorphologischen Veränderungen in der MRT des untersuchten Patientenkollektivs sind nicht immer kongruent. Lediglich vier Patienten wiesen nach 48monatiger Therapie sowohl für die klinischen Kriterien Schub und EDSS, als auch in der MRT konsistent einen Responder- bzw. Non-Responderstatus auf (Tabelle 14). Die Korrelation klinischer Parameter wie der Krankheitsprogression und Schubfrequenz mit den Befunden im MRT wird generell kritisch diskutiert. Der überwiegende Teil der Krankheitsaktivität verläuft vermutlich subklinisch und MRT-morphologische Veränderungen treten um ein Vielfaches häufiger auf, als klinisch manifeste Schübe [Brex et al. 2002, Fisniku et al. 2008]. Unter Berücksichtigung dieses klinisch-bildmorphologischen Paradoxons wird deutlich, dass eine Beurteilung des Krankheitsverlaufs anhand einzelner klinischer und paraklinischer Kriterien nur eingeschränkt möglich ist. Hierdurch wird der Bedarf an prädiktiven Markern für den Krankheitsverlauf und den Therapieerfolg unterstrichen. Bei der Ermittlung potentieller Markergene für den Therapieverlauf wurde diese Problematik berücksichtigt und die statistischen Analysen der differentiellen Genexpression jeweils unabhängig für die Schubfrequenz, den klinischen Progress und die MRT durchgeführt. Generell soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten MRT-Befunde aus den klinischen Verlaufskontrollen der Patienten stammen und nicht Teil eines standardisierten Studienprotokolls sind. In folgenden Studien

zum klinischen und paraklinischen Verlauf der Patienten sollten serielle standardisierte Follow-up Kontrollen zu definierten Zeitpunkten durchgeführt werden [Sailer et al. 2008].

Die Nebenwirkungen der IFN- β 1a Therapie nehmen im klinischen Alltag einen wesentlichen Bestandteil des Patientenmanagements ein. Grippeähnliche Symptome wie Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Muskel- und Gliederschmerzen, Übelkeit, Schwächegefühl und Müdigkeit spielen hierbei eine herausragende Rolle. Des Weiteren kann es zu Hautreaktionen (z.B. Reizung, Schmerzen, Rötung, Schwellung, Verhärtung) im Bereich der Injektionsstelle kommen. Diese Reaktionen treten vorwiegend zu Beginn der Therapie auf und können im Laufe der Behandlung an Intensität abnehmen oder persistieren [Schroeter 2011]. Meistens beginnen sie ein bis drei Stunden nach der Injektion und dauern maximal bis zu 24 Stunden an [Devonshire et al. 2011]. Ein nicht unerheblicher Teil der Patienten hat aufgrund der Nebenwirkungen einen hohen Leidensdruck, der ggf. zur Aufgabe der Therapie oder einer verminderten Therapietreue führt [Tremlett und Oger 2004, Ross 2008]. In Bezug auf das Nebenwirkungsprofil zeigten die untersuchten Patienten ein typisches Aufkommen grippaler und anderer Symptome. Nur 3 der Patienten blieben während der ersten 24 Therapiemonate nebenwirkungsfrei. Insgesamt zwei Patienten mussten die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen beenden. Ein Patient zeigte hierbei nachweislich schwere, intermittierende grippale Symptome innerhalb des vierjährigen Evaluationszeitraums, ein weiterer Patient musste aufgrund von Leberfermenterhöhungen die Therapie abbrechen. Laut einer Untersuchung von Devonshire et al. sind die wichtigsten Prädiktoren für eine gute Therapieadhärenz eine einfache Injektion, die Dauer der Erkrankung, die Wahl der jeweiligen Basistherapie sowie die generelle Therapiezufriedenheit, die insbesondere mit der Nebenwirkungssituation vergesellschaftet ist [Devonshire et al. 2011]. Aufgrund der z.T. ausgeprägten Nebenwirkungsproblematik ist ein intensives Therapiemanagement mit ausführlicher Patientenaufklärung und -beratung sowie ständiger Motivation zur konsequenten Therapietreue notwendig. Unterstützt werden könnte dieses Therapiemanagement durch molekulare Marker, die das Risiko für Nebenwirkungen angeben, um ggf. einen Therapiewechsel frühzeitig initiieren zu können. Bislang ist dieser Ansatz nur wenig untersucht worden. Lediglich in einer Studie von Montalban et al. wurde eine Assoziation von hochreguliertem Interleukin-6 mit Fieber unter einer IFN- β Therapie postuliert [Montalban et al. 2000]. Die in dieser Arbeit vorliegenden Expressionsdaten wurden hinsichtlich differentiell exprimierter Gene im Zusammenhang mit der Manifestation von Nebenwirkungen und den biologischen Funktionen dieser Gene untersucht.

Generell ergeben sich für die klinischen Untersuchungen einige verfahrenstechnische Limitierungen. Die Definition der Patientengruppen in Responder und Non-Responder wurde mit einer bestätigten EDSS-Änderung von ≥ 1 Punkt innerhalb von zwei Jahren definiert, wobei andere Grenzwerte ebenfalls möglich gewesen wären [Freedman et al. 2004]. Ähnliches gilt für das Kriterium Schub. Schübe während der ersten sechs Therapiemonate wurden ignoriert (Kapitel 3.3.1.1.). Diese hätten ebenso mitgezählt werden können, wobei auch hier international Konsens besteht, da von einer Latenzzeit bis zum Erreichen ausreichender Wirkspiegel ausgegangen werden kann [Waubant et al. 2003]. Die Einteilung in Responder und Non-Responder anhand von EDSS, Schub und MRT ist in internationalen, klinischen und molekularbiologischen Studien üblich [Rio et al. 2009]. Insbesondere der Terminus Non-Responder ist in diesem Zusammenhang jedoch missverständlich, da die Einschätzung „Non-Responder“ nicht generell zum Abbruch der Therapie führt. Andere Studien gebrauchen aus diesem Grund den weichen Terminus „guter“ und „schlechter“ Krankheitsverlauf bei der Einteilung der Patientenpopulationen [Hecker et al. 2011]. Zu beachten ist, dass die klinischen Daten zum einen den Erfolg der Therapie und zum anderen den natürlichen Krankheitsverlauf des einzelnen Patienten widerspiegeln. Die Einteilung nach Respondern und Non-Respondern könnte daher noch komplexer ausfallen, wenn zudem die Krankheitsaktivität vor Therapiebeginn in die Einschätzung mit einfließt. Die in dieser Arbeit gewählten Entscheidungskriterien richten sich nach den international gebräuchlichen Standards [Rio et al. 2009].

Genexpression

Insgesamt wurden in den PBMC der 24 Patienten unter der IFN- β 1a Therapie 121 signifikant differentiell exprimierte Gene während der ersten vier Therapiewochen ermittelt (Anhang A). Bezüglich molekularbiologischer Transkriptomuntersuchungen finden sich in der Literatur diverse Studien mit unterschiedlichen Therapieregimen (IFN- β 1a i.m., IFN- β 1a s.c., IFN- β 1b s.c.) und z.T. heterogenen Patientenpopulationen [Goertsches et al. 2008 und 2011]. Die vorliegende Arbeit weist eine, hinsichtlich des angewandten Präparates, homogene Patientenkohorte auf (Kapitel 3.2.), sodass die Ergebnisse nicht durch Unterschiede in der Applikationsart (i.m., s.c.), der Dosierung oder unterschiedlichen Injektionsintervallen beeinflusst wurden. Die Genexpression unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Tabelle 8). Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die im internationalen Vergleich größte longitudinale IFN- β 1a i.m. Genexpressionsstudie hinsichtlich der Anzahl

der untersuchten Patienten und Gene sowie der Dauer der klinischen Beobachtungsphase von 4 Jahren [Hecker et al. 2012]. Die Genexpressionsdatensätze sind in der *gene expression omnibus*-Datenbank (GEO) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> mit der Zugangsnummer GSE19285 öffentlich zugänglich.

Der Einfluss der IFN- β 1a Therapie auf die Genexpression war nach einer Woche deutlich größer als nach vier Therapiewochen, was in anderen Studien in ähnlicher Weise gezeigt wurde [Weinstock-Guttman et al. 2008, Singh et al. 2007]. Dies lässt auf gegenregulatorische Effekte bezüglich der IFN- β 1a Wirkung auf die Genexpression durch homeostatische Mechanismen bereits zu Beginn der Therapie schließen. Eine GO-Analyse der ermittelten differentiell exprimierten Gene zeigte eine große Anzahl immunologisch relevanter Gene (Tabelle 16). Darüber hinaus wurden mit einer statistischen Analyse der TFBS in den Promotorregionen der Gene Transkriptionsfaktoren identifiziert, die als Mediatoren der genregulatorischen Effekte durch die IFN- β 1a Therapie in Frage kommen.

Auf Basis der ermittelten Gene und TF wurde ein GRN-Modell konstruiert, wobei anhand von Subnetzwerken Rückkopplungs- und Vorwärtskopplungsmechanismen zwischen Genen und TF festgestellt werden konnten. Die mögliche Bedeutung dieses Netzwerks konnte an einem Subnetzwerk, welches bei Patienten mit einem verstärkten Aufkommen von grippeähnlichen Symptomen aktiver ist, demonstriert werden. Bei der Beurteilung des GRN ist zu berücksichtigen, dass TF mit hoher Ähnlichkeit in ihren DNA-Bindungseigenschaften zur gleichen TF-Entität zusammengefasst wurden (z.B. ZIC1-3 TF-Familie) (Abbildung 5). Die Transkriptionsfaktoren einer Entität können unterschiedliche oder antagonistische Effekte aufweisen. Ein Beispiel hierfür sind die Interferon-Regulationsfaktoren IRF1 und IRF2. Sie sind strukturell ähnlich und binden an das gleiche regulatorische DNA-Element, wobei IRF2 ein Repressor mit kompetitiver Inhibition der von IRF1-medierten, transkriptionalen Aktivierung von IFN- β und Interferon- β -induzierten Genen ist [Tanaka et al. 1993].

Die Analyse der gefilterten Gene bezüglich ihrer biologischen Funktionen zeigte, dass viele dieser Gene bei Prozessen des Immunsystems partizipieren. Das TNFSF10-Gen wurde in unserem Datensatz nach der ersten Woche als runterreguliert gemessen. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in den Microarray-Datensätzen, als auch in der *real-time* PCR Validierung. TNFSF10 kodiert für ein Zytokin aus der Tumor-Nekrose-Faktor Ligandenfamilie, welches allgemein an der Induktion der Apoptose und Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist. Beim Ver-

gleich von MS-erkrankten Personen mit gesunden Kontrollgruppen gelten die mRNA-Level von TNFSF10 in den peripheren mononukleären Blutzellen von MS-Patienten als signifikant erhöht [Huang et al. 2000]. In einer Studie von Wandinger et al. wurde gezeigt, dass eine veränderte TNFSF10-Expression als möglicher Marker für den klinischen Erfolg einer IFN- β Therapie angenommen werden kann [Wandinger et al. 2003].

CSF1R ist ein weiteres Gen, welches in der vorliegenden Arbeit in der ersten und vierten Woche als runterreguliert gemessen werden konnte. Auch dieses Ergebnis konnte mit der *real-time* PCR Methode validiert werden. CSF1R ist ein Rezeptor für den *Colony-Stimulating-Factor-1*. Das an diesen Rezeptor bindende CSF1-Zytokin hat eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Funktion von Monozyten und Makrophagen [Hamilton 1997]. In einer Genom-weiten Expressionsstudie von Fernald et al., die sich auf die frühzeitigen Expressionsänderungen im peripheren Blut innerhalb der ersten 48 Stunden nach Therapiebeginn fokussierte, wurde ebenfalls die Expression des Immunsystem-Prozessgens CSF1R sowie von OAS1, CST7 und SNCA als moduliert gemessen [Fernald et al. 2007].

AQP9 konnte nach der ersten Therapiewoche in den Genchip-Expressionsdatensätzen und der *real-time* PCR als hochreguliert identifiziert werden. Das durch dieses Gen kodierte Protein ist ein Wasser-selektiver Membrankanale, dem eine Rolle bei spezifischen Leukozytenfunktionen im Rahmen immunologischer Prozesse zugeschrieben wird [Ishibashi et al. 1998]. OAS1 wurde in dem vorliegenden Expressionsdatensatz und in der *real-time* PCR Validierung nach einer Woche als runterreguliert gemessen. OAS1 kodiert für ein Mitglied der 2'-5'-Synthetase-Familie. Es wird durch Interferon- β selbst aktiviert und aktiviert die latente RNase L, welche virale RNA degeneriert und die Virusreplikation inhibiert [Melchjorsen et al. 2009]. In einer Studie von Singh et al. wurde die Genexpression in PBMC 24 Stunden vor und 24 Stunden nach Therapiebeginn mit IFN- β 1a gemessen [Singh et al. 2007]. Die Gene TNFSF10, OAS1 und AQP9 sowie fünf weitere Gene (JUP, FGFBP2, MS4A4A, TYMP und FAM26F) ließen sich sowohl in den vorliegenden Expressionsdaten dieser Arbeit als auch in den Expressionsdaten von Singh et al. 2007 als differentiell exprimiert unter Therapie im Vergleich zum Baselinezeitpunkt feststellen. Das FCER1A-Gen wurde als signifikant runterreguliert identifiziert. FCER1A kodiert einen Rezeptor für Immunglobulin E. Immunglobulin E aktiviert nach Bindung an den Rezeptor den TF NF- κ B und somit die Zytokinproduktion in Monozyten [Kraft und Kinet 2007]. Eine Microarray-Studie mit 25 IFN- β 1b s.c. therapierten Patienten zeigte ebenfalls runterregulierte Expressionslevel dieses Gens über den gesamten Be-

obachtungszeitraum von 24 Monaten [Goertsches et al. 2010], sodass eine generelle Repressionierung der FCER1A-Expressionslevel unter einer IFN- β Therapie festgestellt werden kann. Hypothetisch bewirkt die Runterregulation von FCER1A unter einer IFN-Therapie eine verminderte Sezernierung proinflammatorischer Zytokine in Monozyten und damit gegebenenfalls eine vermehrte Aktivität antiinflammatorischer Mechanismen. Die genaue Bedeutung von FCER1A für den medikamentösen IFN-Wirkmechanismus ist bislang jedoch noch ungeklärt und muss in weiteren experimentellen Studien mit sensitiven Methoden in großen Patientenkohorten eruiert werden. In Frage kommen hierbei z.B. Monozyten-spezifische Untersuchungen von FCER1A auf RNA- und Proteinebene mittels PCR, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) oder *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS).

Die Gene OAS1 und TNFSF10 sind als Regulatoren der körpereigenen Immunantwort bekannt und wurden bereits bei Patienten, die mindestens sechs Monate eine IFN- β 1b s.c.-Therapie erhielten, als hochreguliert beschrieben [Stürzebecher et al. 2003]. Diese Gene waren in dem vorliegenden Datensatz nach einer Woche jedoch niedriger exprimiert als zum Baselinezeitpunkt. Das hierbei als vermindert gemessene Expressionsniveau von OAS1 und anderen früh induzierten IFN-Genen ist möglicherweise durch die einmal wöchentliche Injektion sowie zwischenzeitlich ablaufende Gegenregulationsmechanismen zu erklären. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die (kurzfristigen) Genexpressionsveränderungen in den ersten Stunden nach Therapieinitiierung bislang besonders intensiv untersucht wurden [Fernald et al. 2007, Sellebjerg et al. 2009, Singh et al. 2007, Weinstock-Guttman et al. 2003 und 2008]. Es konnte gezeigt werden, dass Genexpressionsänderungen im Blut von Patienten bereits in den ersten zwei bis vier Stunden nach Therapiebeginn detektiert werden können [Gilli et al. 2005, Santos et al. 2006, Weinstock-Guttman et al. 2003 und 2008]. Hierunter finden sich insbesondere die hochregulierten Gene MX1, B2M, TNFSF10 und OAS1, deren mRNA- und Proteinlevel zwischen dem vierten bis sechsten Tag nach Therapieinitiierung wieder abfallen [Santos et al. 2006, Weinstock-Guttman et al. 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Blutentnahmen unmittelbar vor der ersten Injektion sowie vor der zweiten und fünften wöchentlichen i.m. Injektion durchgeführt. Die gefilterten Gene aus dem Expressionsdatensatz repräsentieren somit jene Gene, die indirekt, als Konsequenz auf die frühzeitig induzierten Gene, über einen Zeitraum von einer Woche beeinflusst werden und damit mittelfristige Transkriptionsänderungen zeigen. Generell ergeben sich hieraus Limitierungen für die vorliegende Studie. In folgenden Untersuchungen sollten die Genexpressionsänderungen zu

weiteren Zeitpunkten im langfristigen zeitlichen Verlauf der IFN- β 1a Therapie bestimmt werden, um ein umfangreicheres Verständnis der Genexpressionsdynamiken zu erhalten.

Die durchgeführten Analysen haben außerdem gezeigt, dass die Expressionslevel zahlreicher Gene, die für Adhäsionsmoleküle (AM) kodieren, durch die IFN- β 1a Therapie beeinflusst werden. Änderungen der für AM-kodierenden Gene auf RNA-Ebene im peripheren Blut von MS-Patienten unter einer IFN- β Therapie sind in der Literatur bereits beschrieben [Kraus et al. 2004, Floris et al. 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurden signifikant erhöhte Expressionslevel für die Integrinproteine ITGA2B und ITGB3 nach einer Therapiewoche gemessen. Beide Proteine sind Bestandteile des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes, der als Transmembranrezeptor für Fibrinogen und andere Liganden eine Rolle bei der Thrombozytenaggregation spielt [Calvete 1995]. Aufgrund der Bedeutung des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes bei der Thrombozytenaggregation und somit dem Verschluss des Endothels verletzter Gefäße, ist möglicherweise ein positiver Effekt auf die eingeschränkte Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke durch die Hochregulation des ITGA2B- und ITGB3-Gens bei der Therapie der MS mit IFN- β 1a i.m. anzunehmen. Des Weiteren wurde das ESAM-Gen (*endothelial cell adhesion molecule*) als signifikant hochreguliert identifiziert, was in anderen Arbeiten ebenfalls gezeigt werden konnte [Annibali et al. 2007]. In der Arbeit von Annibali et al. wurden die PBMC von sieben Patienten, die eine IFN- β 1a s.c. Therapie erhielten, mit Microarray-Analysen untersucht. Das ESAM-Gen kodiert für ein Transmembranprotein, welches bei Zell-Zell-Kontakten aktivierter Thrombozyten partizipiert [Stalker et al. 2009]. ESAM steht in dem rekonstruierten GRN unter direkter Kontrolle von NF- κ B und ist verwandt mit der JAM-Genfamilie (*junctional adhesion molecule*). In dem vorliegenden Expressionsdatensatz zeigten sich hochregulierte Expressionslevel des JAM3-Gens, welches durch Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen produziert wird und die Migration dieser Zellen bei Inflammationszuständen reguliert [Weber et al. 2007]. Obschon der tatsächliche Effekt der JAM-Regulation durch die IFN- β -Therapie bislang unbekannt ist, kommen verschiedene Wirkmechanismen für dessen Hochregulation hypothetisch in Frage. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass JAM3 primär in Thrombozyten hochreguliert wird, wo es als Antagonist für das Leukozyten-Integrin Mac-1 agiert [Weber et al. 2007]. Auf diese Weise würde die Mac-1-abhängige Adhäsion von Leukozyten und deren transendotheliale Migration durch die Blut-Hirn-Schranke bei MS-Patienten inhibiert werden. Andererseits könnte die IFN- β Therapie generell zu einer Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke führen und somit die Migration von Immunzellen vom Blut in das ZNS-Parenchym verringern. Zurückgebliebene, aktivierte

PBMC im peripheren Blut würden dann im Durchschnitt die Expressionslevel von AM und somit auch der JAM-Gene relativ erhöhen.

Die postulierten Zusammenhänge beziehen sich auf transkriptionelle Veränderungen auf mRNA-Ebene und nicht auf die tatsächlich aktiven Proteine. Hieraus ergeben sich Limitierungen für deren Aussagekraft. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass es sich bei den PBMC um eine heterogene Zellpopulation handelt, die durch die Ficoll-Separation vom Vollblut getrennt wird. Zelltypspezifische Untersuchungen sind nicht durchgeführt worden. Dies gilt insbesondere für einige der besprochenen Gene die bislang nur für bestimmte Zelltypen (z.B. Thrombozyten, B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen) funktionell beschrieben wurden. Als Beispiel können hier ITGA2B und ITGB3 erwähnt werden, die für Proteine des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes kodieren und deren Funktion bislang vor allem bei der Thrombozytenaggregation bekannt ist. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass weitere zelltyp-spezifische Untersuchungen sinnvoll erscheinen, um zu klären, in welchen Zellen sich die Expression IFN-modulierter Gene tatsächlich verändert.

Assoziation von Klinik und Genexpression

Zur Evaluation potentiell prädiktiver Marker für den klinischen und paraklinischen Verlauf wurden aus dem Expressionsdatensatz jeweils die top 20 Kandidatengene für die Progression, die Schubfrequenz und die MRT als signifikant differentiell exprimiert gefiltert (Tabelle 18 bis 20). Einige dieser Gene wurden bereits in anderen Studien mit der IFN- β Therapie bei MS-Patienten in Verbindung gebracht. Für das Kriterium Responder/Non-Responder nach dem EDSS wurde das E2F2-Gen in der Gruppe der Non-Responder als signifikant höher exprimiert vor Therapiebeginn gemessen. E2F2 ist Mitglied der E2F-TF-Familie, die den IL-2-Signalweg über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) am IL-2-Rezeptor runterreguliert [Brennan et al. 1997]. IL-2 wiederum aktiviert die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen sowie die Produktion von Interleukinen, Interferonen und Tumornekrosefaktoren [Bachmann & Oxenius 2007]. Die Bedeutung von E2F für die MS wurde in einer Studie von Iglesias et al. anhand des EAE-Mausmodells bestätigt. Hier zeigte sich, dass E2f1-defiziente Mäuse eine nur milde Behinderung im EAE-Mausmodell aufwiesen. Bei Patienten unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie fanden sich in dieser Studie zudem erniedrigte ESF-Expressionslevel [Iglesias et al. 2004]. Möglicherweise werden die Genexpressionslevel von

E2F durch eine IFN- β 1a i.m. Therapie moduliert und Änderungen des Genexpressionsniveaus dieses Gens könnten somit einen Therapieerfolg auf molekularbiologischer Ebene aufzeigen. Diese Hypothese muss durch weitere serielle Genexpressionsstudien bestätigt werden.

Das FPR2-Gen wurde in der Gruppe der EDSS-Responder als signifikant niedriger exprimiert gemessen. Das FPR2-Gen kodiert für einen Rezeptor, der auf phagozytotischen Leukozyten, Endothelzellen, Astrozyten und Hepatozyten gefunden wird. Die Aktivierung dieses Rezeptors mediert die Induktion der neutrophilen Chemotaxis, die Produktion phagozytotischer Metabolite sowie die transkriptionelle Regulation von Neutrophilen und deren Zytokinproduktion [Lee 2012]. In weiteren Studien zur differentiellen Genexpression von IFN- β -therapierten MS-Patienten konnte dieses Gen als IFN-moduliert nachgewiesen werden [Goertsches et al. 2010, Lindsey et al. 2011].

Einige Gene wurden bereits in verschiedenen Untersuchungen zur IFN- β Wirkung beschrieben. Hierzu zählen das PAK2-Gen, welches in der Gruppe der MRT-assoziierten potentiellen Kandidatengene als signifikant differentiell exprimiert zwischen Respondern und Non-Respondern gefunden wurde sowie das Gcom1-Gen aus der Gruppe der Schub-assoziierten Kandidatengene [Pappas et al. 2009]. Für viele der identifizierten potentiell prädiktiven Kandidatengene sind die physiologischen Wirkmechanismen noch nicht verstanden. Bei Bewertung dieser Analyse muss erwähnt werden, dass sich durch die relativ kleine Patientenkohorte (n=24) und die insgesamt große Anzahl an gemessener mRNA-Marker statistische Probleme ergeben können. In der vorliegenden Arbeit wurden die 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene für den jeweiligen klinischen und paraklinischen Verlauf diskutiert. Ihre statistische Bewertung hängt wesentlich von der angewandten Response- und Non-Response-Einschätzung sowie dem verwendeten statistischen Testverfahren ab (hier zweiseitiger t-Test). Zur Diskussion steht außerdem, ob erst die Kombination der Expression mehrerer Gene mit dem klinischen Verlauf assoziiert ist. Die enorme Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten macht eine multivariate Analyse, bei der Daten zu mehreren Genen für einen Prädiktor genutzt werden, jedoch schwierig. Ob die identifizierten Expressionsunterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern allgemein als prädiktive Marker für den klinischen Verlauf interpretiert werden können, muss in prospektiven Untersuchungen, insbesondere mit größeren Patientenkohorten, validiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Gene bei Patienten mit grippeähnlichen Symptomen in den ersten drei Monaten nach Therapieinitiierung als signifikant höher exprimiert zu Baseline identifiziert (ESAM, ALOX12, ELOVL7, ANKRD9, GNAZ und SLC24A3) (Abbildung 17). Änderungen der Genexpressionslevel von AM stehen im Verdacht mit grippalen Nebenwirkungen vergesellschaftet zu sein [Kraus et al. 2004]. Das bereits diskutierte ESAM-Gen steht demnach, neben seiner Bedeutung für die intrazelluläre Adhäsion, im Verdacht mit grippalen Nebenwirkungen der IFN- β Therapie vergesellschaftet zu sein. Das ALOX12-Gen kodiert für ein Lipoxigenaseenzym, welches in Leukozyten und Thrombozyten für die Synthese von Leukotrienen (12(S)-HETE) verantwortlich ist [Nie et al. 2000, Pidgeon et al. 2003]. Diese Leukotriene partizipieren als bioaktive Lipide bei allergischen und inflammatorischen Reaktionen. Sie sind potente Effektoren von Hypersensibilitätsreaktionen und können durch Bronchokonstriktion und erhöhte Mukosaproduktion zu grippeähnlichen Symptomen führen [Shelharner et al. 1982]. In verschiedenen Studien konnten für 12(S)-HETE weitere Funktionen, wie die Modulation der Integrin-Expression [Pidgeon et al. 2003] oder eine Stimulation der Angiogenese [Nie et al. 2000], gezeigt werden. Die Gene ANKRD9 und ELOVL7 sind wie ALOX12 in den Lipidmetabolismus involviert [Tamura et al. 2009, Wang et al. 2009]. In dem rekonstruierten GRN ist NF- κ B als TF mit zahlreichen Genen verbunden und partizipiert möglicherweise bei der Ausprägung grippeähnlicher Nebenwirkungen (Abbildung 15B). Der TF HNF1A ist bei der Regulation der Expression verschiedener leberspezifischer Gene beteiligt und steht mit sieben Genen im rekonstruierten GRN in Verbindung. Möglicherweise partizipiert dieser TF bei der Ausprägung von Leberfunktionsstörungen mit konsekutiver Leberfermenterhöhung, die bei einigen IFN-therapierten Patienten auftreten [Tremlett und Oger 2004]. Die Signifikanz und klinische Relevanz der differentiell exprimierten Gene sowie die Bedeutung von NF- κ B und HNF1A bei Patienten mit Nebenwirkungen unter einer IFN- β 1a Therapie muss in prospektiven Studien untersucht werden.

Für eine Bestimmung der Wirkung der β -Interferone und demnach für den Responder-/Non-Responderstatus sind nach heutigem Wissensstand Bestimmungen von NAb nach 6-12 Therapiemonaten sinnvoll [Farrell et al. 2012], obschon IFN- β 1a i.m. das geringste Aufkommen von NAb im Vergleich der medikamentös eingesetzten β -Interferone zeigt [Kappos et al. 2005]. NAb verringern den Benefit einer β -Interferontherapie, gemessen an der Schubfrequenzrate, der MRT-Aktivität sowie dem EDSS, durch Bindung an das applizierte Medikament [Vosoughi & Freedman 2010]. In dem vorliegenden Patientenkollektiv wurden keine Routinemessungen von NAb durchgeführt. Bei fünf Patienten wurde jedoch eine Bestim-

mung von NAbS, bei fortschreitender Krankheitsprogression vorgenommen, um ein Therapieversagen aufgrund von Antikörpern gegen IFN- β 1a auszuschließen (z.B. Tabelle 8, EDSS-Ausreißer im 24. Monat). Bei diesen untersuchten Patienten konnten keine NAbS nachgewiesen werden. In nachfolgenden Studien sollten Routine-NAb-Bestimmungen im Intervall generell durchgeführt werden.

Ausblick und abschließende Bemerkungen

Obschon das untersuchte Patientenkollektiv und damit die statistische Aussagekraft der experimentellen Ergebnisse relativ klein erscheint, ist die Studienpopulation mit insgesamt 24 untersuchten Patienten zur IFN- β 1a Therapie die im internationalen Vergleich bislang größte longitudinale Genexpressionsstudie (Tabelle 8). Hinsichtlich des klinischen und paraklinischen Verlaufs, des Nebenwirkungsprofils und soziodemographischer Daten zur MS (z.B. Geschlechterverhältnis und Durchschnittsalter) handelt es sich zudem um eine für die Erkrankung charakteristische Patientengruppe [Hemmer & Hartung 2007, Waubant et al. 2003]. In prospektiven Studien an größeren Patientenpopulationen muss die prädiktive Aussagekraft der vermuteten Markergene für den klinischen Verlauf zukünftig weiter validiert werden. Generell sind weitere molekularbiologische Untersuchungen notwendig, um die genaue Bedeutung der ermittelten Gene im Rahmen der IFN- β 1a Therapie zu bestimmen. Denkbar sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen zur Wirkung der β -Interferone auf anderen molekularbiologischen Ebenen, z.B. mit ELISA- und FACS-Analysen (Proteinebene), oder auf microRNA-Ebene [Angerstein et al. 2012, Thamilarasan et al. 2012]. Mit Hilfe neuer Technologien aus dem Bereich der DNA-Sequenzierung (z.B. *next-generation sequencing*) werden zukünftig Genom-weite Analysen von MS-Patienten noch sensitiver durchzuführen sein und somit neue Informationen über prädispositionierende Faktoren (Markergene) für den Therapieerfolg und den klinischen Verlauf der MS liefern [Baranzini & Nickles 2012]. In Zukunft sollten außerdem zelltyp-spezifische Untersuchungen (z.B. T-Zellen- oder B-Zellenspezifisch) durchgeführt werden, um das Verständnis der Wirkmechanismen von IFN-Therapien auf zellulärer Ebene zu erhöhen.

Ein großes internationales Interesse an Genom-weiten β -Interferonstudien, sowie eine wachsende Anzahl an Microarraydatensätzen im Rahmen der MS, macht datensatzübergreifende Analysen zur IFN- β Wirkung in zunehmenden Maße möglich. Die Nutzung verschiedener

β -Interferonstudien auf Basis von Genexpressionsanalysen bietet die Möglichkeit, große Patientenpopulationen nach Genen als potentiell prädiktive Marker für den klinischen Verlauf zu untersuchen. Erste Schritte sind in diesem Zusammenhang bereits unternommen worden. Ergebnisse dieser Arbeit fanden unter anderem Eingang in eine Reassessment-Studie (Neubewertungsstudie) von 18 Biomarker-Studien mit insgesamt 148 untersuchten MS-Patienten [Hecker et al. 2011].

In der vorliegenden Arbeit wurde ermittelt, welche Gene im Blut von RRMS-Patienten mittelfristig unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie in den ersten vier Wochen nach Therapieinitiierung auf mRNA-Ebene hoch- oder runter-reguliert sind. Hierbei zeigte sich, dass der Einfluss der IFN- β 1a Therapie auf die Genexpression nach einer Woche deutlich größer war, als nach vier Therapiewochen, was in anderen Studien in ähnlicher Weise demonstriert wurde. Um die Bedeutung der ermittelten Gene für die Therapie besser verstehen zu können, wurde eine Promotor-, eine Funktions- und eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Darüber hinaus liefern die vorliegenden Untersuchungen durch eine Assoziationsanalyse der Genexpressionsdaten mit den klinischen Patientendaten potentielle prognostische Biomarker für den klinischen Verlauf und das Auftreten von Nebenwirkungen.

6. Zusammenfassung

Bis heute ist das Verständnis der pathologischen Prozesse bei der MS sowie die Effizienz und Sicherheit der zur Verfügung stehenden immuntherapeutischen Möglichkeiten limitiert. Eine individualisierte Therapie sowie ein optimales Therapiemonitoring mit Hilfe von klinischen, paraklinischen sowie molekularbiologischen Markern verspricht die Möglichkeit, vorhandene Therapiekonzepte selektiv einzusetzen und somit die Effizienz und den Behandlungserfolg perspektivisch zu verbessern.

Anhand von 24 Patienten mit der Diagnose einer RRMS konnte deren Verlauf klinisch bezüglich Schubfrequenzrate und Progression sowie bei 20 Patienten zusätzlich subklinisch bezüglich MRT-morphologischer Veränderungen untersucht werden. Die Patienten zeigten während der zunächst 24monatigen Evaluationsphase zu 63% einen schubfreien Verlauf und eine nur geringe Zunahme der Krankheitsprogression unter der Basistherapie mit IFN- β 1a i.m.. Nach 48 Monaten IFN- β 1a Therapie konnte bei 33% der durchgehend behandelten Patienten ein Schubereignis eruiert werden, 46% der Patienten waren weiterhin ohne Krankheitsprogression. Insgesamt 25% der Patienten hatten die Therapie nach 48 Monaten beendet. Bei 70% der MRT-morphologisch untersuchten Patienten zeigte sich eine Zunahme der zum Teil subklinisch ablaufenden Krankheitsaktivität gemessen an den MRT-Befunden. Es konnte gezeigt werden, dass klinische und MRT-morphologische Veränderungen nicht äquivalent verändert sind. Über 80% der Patienten zeigten typische IFN- β -medierte Nebenwirkungen, die in zwei Fällen zu einem Therapieabbruch führten. Bei mehr als 85% der Patienten war eine symptomatische Therapie der zumeist grippalen Symptome notwendig.

Um das Verständnis der Wirksamkeit von IFN- β 1a i.m auf molekularer Ebene besser zu verstehen sowie zur Identifikation potentiell prädiktiver Biomarker für den klinischen Verlauf, wurde die Genexpression in den PBMC der Patienten mit Hilfe von Affymetrix Genchips zu drei Zeitpunkten unmittelbar vor der ersten IFN- β 1a i.m. Injektion und zum Zeitpunkt nach der ersten und vierten Therapiewoche bestimmt. Anschließend wurde eine Validierung der Ergebnisse mit Hilfe von PCR-Messungen durchgeführt. Die ermittelten Genexpressionsdaten zu den einzelnen Zeitpunkten wurden statistisch miteinander verglichen. Bei der untersuchten Patientenpopulation (n=24) handelt es sich um die im internationalen Vergleich größte Studie bezüglich der differentiellen Genexpression unter einer IFN- β 1a i.m.

Therapie. Des Weiteren ist sie die bislang einzige Studie zur IFN- β 1a i.m. Therapie, die die mittelfristigen Effekte der Therapie auf RNA-Ebene untersucht und eine langfristige (48 Monate) klinische Nachbeobachtungsphase einschließt.

Es wurden aus 15734 Genen 121 Gene als unter der IFN- β 1a Therapie differentiell exprimiert ermittelt. Die Genexpressionsunterschiede waren hierbei nach einer Woche deutlich größer, als nach vier Wochen Therapie. Um die Bedeutung dieser Gene für die Therapie besser verstehen zu können, wurde eine Promotor-, eine Funktions- und eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Einige der Gene sind als Regulatoren der körpereigenen Immunantwort bekannt und partizipieren beispielsweise bei der Differenzierung von Monozyten und Makrophagen sowie der Regulation der Apoptose und Aktivierung des TF NF- κ B. Die Gene FCER1A, TNFSF10, CSF1R, OAS1, AQP9 und IL1R2 sind Immunprozessgene und wurden als signifikant verändert gemessen. FCER1A wurde unter der IFN- β 1a Therapie als signifikant runterreguliert identifiziert. Dies zeigte sich bereits in anderen IFN- β Studien, sodass FCER1A unter einer IFN- β Therapie als generell reprimiert angenommen werden kann. Neben der Bedeutung einiger dieser Gene für die körpereigene Immunantwort, fanden sich differentiell exprimierte Gene, die für Adhäsionsmoleküle kodieren und bei Zell-Zellkontakten sowie der Endothelmigration partizipieren. Hierzu gehören unter anderem ITGA2B und ITGB3, ESAM und JAM3. Möglicherweise haben diese Gene einen Einfluss auf die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke und sind somit für die positiven Effekte der IFN- β 1a Therapie mitverantwortlich. Durch die Analyse der TFBS in den Promotorregionen der differentiell exprimierten Gene konnten 11 überrepräsentierte TFBS identifiziert werden, die möglicherweise bei der Regulation dieser Gene eine Rolle spielen. Für den TF NF- κ B konnte eine Partizipation bei der Entstehung grippaler Nebenwirkungen postuliert werden. Der TF HNF1A spielt möglicherweise bei der Ausprägung von Leberfunktionsstörungen im Rahmen der IFN- β 1a Therapie eine Rolle.

Durch eine integrative mathematische Modellierung der Interaktionen, der unter Therapie differentiell exprimierten Gene und identifizierten TF in einem genregulatorischen Netzwerk, konnten die regulatorischen Beziehungen zwischen den Genen graphisch dargestellt werden. Einen zentralen Knotenpunkt bildet hierbei der TF NF- κ B. Außerdem konnte ein Sub-Netzwerk von sechs Genen identifiziert werden, die eine signifikant höhere Genexpression vor Therapiebeginn bei Patienten mit grippalen Nebenwirkungen in den ersten drei Therapiemonaten aufwiesen. Es handelt sich hierbei um ESAM, ALOX12, ELOVL7,

ANKRD9, GNAZ und SLC24A3. Abschließend wurden durch eine statistische Analyse der Baseline-Genexpression von klinischen Respondern und Non-Respondern Kandidatengene als potentiell prädiktive Marker für den individuellen therapeutischen Effekt der IFN- β 1a Therapie in Aussicht gestellt. Hierzu zählen insbesondere E2F2, FPR2, PAK2 und Gcom1.

Es konnte somit gezeigt werden, welche Gene mittelfristig unter einer IFN- β 1a i.m. Therapie in den ersten vier Wochen nach Therapieinitiierung in ihrer Expression verändert sind. Für zahlreiche Gene wurde eine Interaktion bei immunologischen Prozessen festgestellt. Hierdurch konnten Wirkmechanismen von IFN- β 1a i.m. postuliert werden. Es zeigte sich darüber hinaus, dass genregulatorische Netzwerke die Möglichkeit bieten, das Verständnis der transkriptionellen Zusammenhänge von Gen-TF-Interaktionen besser zu verstehen und das auf dieser Grundlage potentielle Marker z.B. für den Therapieerfolg oder die Ausprägung von Nebenwirkungen diskutieren werden können. Es wurden mehrere Gene ermittelt, die potentiell mit Nebenwirkungen des applizierten Interferons in Verbindung stehen und teilweise durch NF- κ B beeinflusst werden. Darüber hinaus konnten Gene identifiziert werden, die signifikant unterschiedlich in den Gruppen der Responder und Non-Responder exprimiert sind und als potentielle molekularbiologische Prädiktoren für den Therapieerfolg in Frage kommen. In prospektiven Studien an größeren Patientenpopulationen muss die prädiktive Aussagekraft der vermuteten Markergene als Surrogate für den klinischen Verlauf und das Auftreten von Nebenwirkungen weiter validiert werden. Die integrative Nutzung verschiedener Interferonstudien auf Basis von Microarraydatensätzen bietet zukünftig die Möglichkeit, große Patientenpopulationen nach differentiell exprimierten Genen als potentiell prädiktive Marker für den klinischen Verlauf zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

Aloisi, F., Ria, F., Adorini, L. (2000). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 21(3), 141-147.

Angerstein, C., Hecker, M., Paap, B. K., Koczan, D., Thamilarasan, M., Thiesen, H. J., Zettl, U. K. (2012). Integration of MicroRNA Databases to Study MicroRNAs Associated with Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol.*, 45(3), 520-535.

Annibaldi, V., Di Giovanni, S., Cannoni, S., Giugni, E., Bompreszi, R., Mattei, C. et al. (2007). Gene expression profiles reveal homeostatic dynamics during interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 40(1), 16-22.

Apel, A., Klauer, T., Zettl, U. K. (2006). Stress and progression in multiple sclerosis. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 74(10), 567-574.

Axtell, R. C., de Jong, B. A., Boniface, K., van der Voort, L. F., Bhat, R., De Sarno, P. et al. (2010). T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med*, 16(4), 406-412.

Bachmann, M. F., & Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*, 8(12), 1142-1148.

Baranzini, S. E., & Nickles, D. (2012). Genetics of multiple sclerosis: swimming in an ocean of data. *Curr Opin Neurol*, 25(3), 239-245.

Bermel, R. A., Weinstock-Guttman, B., Bourdette, D., Foulds, P., You, X., Rudick, R. A. (2010). Intramuscular interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a 15-year follow-up study. *Mult Scler*, 16(5), 588-596.

Bielekova, B., Martin, R. (2004). Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, 127, 1463-1478.

Bitsch, A., Kuhlmann, T., Stadelmann, C., Lassmann, H., Lucchinetti, C., Bruck, W. (2001). A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 49(6), 793-796.

Brennan, P., Babbage, J. W., Burgering, B. M., Groner, B., Reif, K., & Cantrell, D. A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity*, 7(5), 679-689.

Brex, P. A., Ciccarelli, O., O'Riordan, J. I., Sailer, M., Thompson, A. J., Miller, D. H. (2002). A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 346, 158-164.

Brück, W., Stadelmann-Nessler, C. (2005). Pathologie und Pathophysiologie. In H. F. Schmidt R. (Ed.), *Multiple Sklerose* (pp. 33-42). München, Jena: Urban & Fischer.

- Burton, J. M., O'Conner, P. W., Hohol, M., Beyene, J. (2009). Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 8(3).
- Calabrese, M., Rocca, M. A., Atzori, M., Mattisi, I., Favaretto, A., Perini, P. et al. (2010). A 3-year magnetic resonance imaging study of cortical lesions in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 67(3), 376-383.
- Calvete, J. J. (1995). On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(4), 346-360.
- Castelijns, J. A., & Barkhof, F. (1999). Magnetic resonance (MR) imaging as a marker for multiple sclerosis. *Biomed Pharmacother*, 53(8), 351-357.
- Cho, K. H., Choo, S. M., Jung, S. H., Kim, J. R., Choi, H. S., & Kim, J. (2007). Reverse engineering of gene regulatory networks. *IET Syst Biol*, 1(3), 149-163.
- Cohan, J. A., & Rae-Grant, A. (2012). *Handbook of Multiple Sclerosis*. London: Springer Healthcare.
- Comabella, M., & Martin, R. (2007). Genomics in multiple sclerosis--current state and future directions. *J Neuroimmunol*, 187(1-2), 1-8.
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502-1517.
- Confavreux, C., Vukusic, S., Adeleine, P. (2003). Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*, 126(Pt 4), 770-782.
- Cottrell, D. A., Kremenchutzky, M., Rice, G. P., Koopman, W. J., Hader, W., Baskerville, J. et al. (1999). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 122(Pt 4), 625-639.
- Cutter, G. R., Baier, M. L., Rudick, R. A., Cookfair, D. L., Fischer, J. S., Petkau, J. et al. (1999). Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain*, 122(Pt 5), 871-882.
- Debouverie, M., Pittion-Vouyovitch, S., Louis, S., & Guillemin, F. (2008). Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort. *Eur J Neurol*, 15(9), 916-921.
- Devonshire, V., Lapierre, Y., Macdonell, R., Ramo-Tello, C., Patti, F., Fontoura, P., Suchet, L., Hyde, R., Balla, I., Frohman, E.M., Kieseier, B.C., GAP Study Group (2011). The Global Adherence Project (GAP): a multicenter observational study on adherence to disease-modifying therapies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 18(1), 69-77.
- DGN. (2012). Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Retrieved 01.06.2012, <http://www.dgn.org/pressemitteilungen/neue-leitlinie-ms/2026-neu-diagnostik-und-therapie-der-multiplen-sklerose.html>.

- Durelli, L., Verdun, E., Barbero, P., Bergui, M., Versino, E., Ghezzi, A., Montanari, E., Zaffaroni, M., Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group (2002). Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet*, 359(9316), 1453-1460.
- Ellison, G.W., Myers, L. W., Leake, B.D., Mickey, M.R., Ke, D., Syndulko, K., Tourtellotte, W.W. (1994). Design strategies in multiple sclerosis clinical trials. The Cyclosporine Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol*, 36, 108-112.
- Falcon, S., & Gentleman, R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*, 23(2), 257-258.
- Farrell, R.A., Marta, M., Gaeguta, A.J., Souslova, V., Giovannoni, G., Creeke, P.I. (2012). Development of resistance to biologic therapies with reference to IFN. *Rheumatology*, 51(4), 590-599.
- Fernald, G. H., Knott, S., Pachner, A., Caillier, S. J., Narayan, K., Oksenberg, J. R. et al. (2007). Genome-wide network analysis reveals the global properties of IFN-beta immediate transcriptional effects in humans. *J Immunol*, 178(8), 5076-5085.
- Ferrari, F., Bortoluzzi, S., Coppe, A., Sirota, A., Safran, M., Shmoish, M. et al. (2007). Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot. *BMC Bioinformatics*, 8, 446.
- Filippi, M. (2001). Linking structural, metabolic and functional changes in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 8(4), 291-297.
- Filippi M, Agosta, F. (2010). Imaging biomarkers in multiple sclerosis. *J Magn Reson Imaging*, 31(4), 770-788.
- Fisniku, L. K., Brex, P. A., Altmann, D. R., Miszkiel, K. A., Benton, C. E., Lanyon, R. et al. (2008). Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*, 131(Pt 3), 808-817.
- Flachenecker, P., Zettl U. K. (2005). Krankheitsverlauf und Prognose. In H. F. Schmidt R (Ed.), *Multiple Sklerose* (pp. 61-70). München, Jena: Urban & Fischer.
- Flachenecker, P., & Hartung, H. P. (1996). Course of illness and prognosis of multiple sclerosis. 2: Predictive value of clinical and paraclinical factors. *Nervenarzt*, 67(6), 444-451.
- Flachenecker, P., Stuke, K., Elias, W., Freidel, M., Haas, J., Pitschnau-Michel, D. et al. (2008). Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Dtsch Arztebl Int*, 105(7), 113-119.
- Floris, S., Ruuls, S. R., Wierinckx, A., van der Pol, S. M., Dopp, E., van der Meide, P. H. et al. (2002). Interferon-beta directly influences monocyte infiltration into the central nervous system. *J Neuroimmunol*, 127(1-2), 69-79.

- Freedman, M. S., Patry, D. G., Grand'Maison, F., Myles, M. L., Paty, D. W., Selchen, D. H., Canadian MS Working Group. (2004). Treatment optimization in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 31(2), 157-168.
- Fujinami, R. S., & Oldstone, M. B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science*, 230(4729), 1043-1045.
- Gardener, H., Munger, K. L., Chitnis, T., Michels, K.B., Spiegelman, D., Ascherio, A. (2009). Prenatal and perinatal factors and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology*, 20(4), 611-618.
- Gilli, F., Marnetto, F., Caldano, M., Sala, A., Malucchi, S., Di Sapio, A. et al. (2005). Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 158(1-2), 195-203.
- Giorelli, M., Livrea, P., Defazio, G., Iacovelli, L., Capobianco, L., Picascia, A. et al. (2002). Interferon beta-1a counteracts effects of activation on the expression of G-protein-coupled receptor kinases 2 and 3, beta-arrestin-1, and regulators of G-protein signalling 2 and 16 in human mononuclear leukocytes. *Cell Signal*, 14(8), 673-678.
- Goertsches, R., Serrano-Fernandez, P., Moller, S., Koczan, D., & Zettl, U. K. (2006). Multiple sclerosis therapy monitoring based on gene expression. *Curr Pharm Des*, 12(29), 3761-3779.
- Goertsches, R. H., Hecker, M., & Zettl, U. K. (2008). Monitoring of multiple sclerosis immunotherapy: from single candidates to biomarker networks. *J Neurol*, 255 Suppl 6, 48-57.
- Goertsches, R. H., Hecker, M., Koczan, D., Serrano-Fernandez, P., Moeller, S., Thiesen, H. J. et al. (2010). Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN-beta-1b treatment in relapsing remitting MS. *Pharmacogenomics*, 11(2), 147-161.
- Gold, R., & Hartung, H. P. (2008). Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. In H. C. Diener (Ed.), *Multiple Sklerose* (Seiten 364-383). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Hamilton, J. A. (1997). CSF-1 signal transduction. *J Leukoc Biol*, 62(2), 145-155.
- Hecker, M., Goertsches, R. H., Engelmann, R., Thiesen, H. J., & Guthke, R. (2009). Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy. *BMC Bioinformatics*, 10, 262.
- Hecker, M., Goertsches, R. H., Fatum, C., Koczan, D., Thiesen, H. J., Guthke, R. et al. (2012). Network analysis of transcriptional regulation in response to intramuscular interferon-beta-1a multiple sclerosis treatment. *Pharmacogenomics J*, 12(2), 134-146.
- Hecker, M., Paap, B. K., Goertsches, R. H., Kandulski, O., Fatum, C., Koczan, D. et al. (2011). Reassessment of blood gene expression markers for the prognosis of relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One*, 6(12), e29648.

- Hemmer, B., Archelos, J. J., & Hartung, H. P. (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 3(4), 291-301.
- Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., & Hartung, H. P. (2006). Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*, 2(4), 201-211.
- Hemmer, B., & Hartung, H. P. (2007). Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: what is on the horizon? *Ann Neurol*, 62(4), 314-326.
- Huang, W.-X., Huang, M. P., Gomes, M. A., & Hillert, J. (2000). Apoptosis mediators fasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. *Neurology*, 55(7), 928-934.
- Iglesias, A. H., Camelo, S., Hwang, D., Villanueva, R., Stephanopoulos, G., & Dangond, F. (2004). Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol*, 150(1-2), 163-177.
- Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Tanaka, Y., Marumo, F., & Sasaki, S. (1998). Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun*, 244(1), 268-274.
- Jacobs, L. D., Beck, R. W., Simon, J. H., Kinkel, R. P., Brownschidle, C. M., Murray, T. J. et al. (2000). Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med*, 343(13), 898-904.
- Kale, N., Agaoglu, J., Onder, G., & Tanik, O. (2009). Correlation between disability and transcranial magnetic stimulation abnormalities in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*, 16(11), 1439-1442.
- Kappos, L., Clanet, M., Sandberg-Wollheim, M., Radue, E. W., Hartung, H. P., Hohlfeld, R. et al. (2005). Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. *Neurology*, 65(1), 40-47.
- Kappos, L., Polman, C. H., Freedman, M. S., Edan, G., Hartung, H. P., Miller, D. H. et al. (2006). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*, 67(7), 1242-1249.
- Kappos, L., Freedman, M. S., Polman, C.H., Edan, G., Hartung, H.P., Miller, D.H., Montalbán, X., Barkhof, F., Radü, E.W., Bauer, L., Dahms, S., Lanius, V., Pohl, C., Sandbrink, R. (2007). Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet*, 370, 389-397.
- Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 365-378.

- Kraus, J., Bauer, R., Chatzimanolis, N., Engelhardt, B., Tofighi, J., Bregenzer, T. et al. (2004). Interferon-beta 1b leads to a short-term increase of soluble but long-term stabilisation of cell surface bound adhesion molecules in multiple sclerosis. *J Neurol*, 251(4), 464-472.
- Kurtzke, J. F., Beebe, G. W., Nagler, B., Kurland, L. T., & Auth, T. L. (1977). Studies on the natural history of multiple sclerosis--8. Early prognostic features of the later course of the illness. *J Chronic Dis*, 30(12), 819-830.
- Kurtzke, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), 1444-1452.
- Lee, C. H. (2012). Resolvins as new fascinating drug candidates for inflammatory diseases. *Arch Pharm Res*, 35(1), 3-7.
- Lettre, G., & Rioux, J. D. (2008). Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet*, 17(R2), R116-R121.
- Lindsey, J. W., Agarwal, S. K., & Tan, F. K. (2011). Gene expression changes in multiple sclerosis relapse suggest activation of T and non-T cells. *Mol Med*, 17(1-2), 95-102.
- Lipton, H. L., Liang, Z., Hertzler, S., & Son, K. N. (2007). A specific viral cause of multiple sclerosis: one virus, one disease. *Ann Neurol*, 61(6), 514-523.
- Locatelli, G., Wörtge, S., Buch, T., Ingold, B., Frommer, F., Sobottka, B., Krüger, M., Karram, K., Bühlmann, C., Bechmann, I., Heppner, F.L., Waisman, A., Becher, B. (2012). Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nat Neurosci*, 15(4), 543-550.
- Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907-911.
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D. et al. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50(1), 121-127.
- McFarland, H. F. (1999). Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 20(10), 1777-1778.
- Meinl, E. (1999). Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 12(3), 303-307.
- Melchjorsen, J., Kristiansen, H., Christiansen, R., Rintahaka, J., Matikainen, S., Paludan, S. R. et al. (2009). Differential Regulation of the OASL and OAS1 Genes in Response to Viral Infections. *J Interferon Cytokine Res*, 29(4), 199-207.

- Mendes, A., & Sa, M. J. (2011). Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. *Arq Neuropsiquiatr*, 69(3), 536-543.
- Milo, R., & Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*, 9(5), A387-M394.
- Mizugishi, K., Aruga, J., Nakata, K., & Mikoshiba, K. (2001). Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *J Biol Chem*, 276(3), 2180-2188.
- Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.P., Zettl, U.K. (2010). Animal models of multiple sclerosis - potentials and limitations. *Prog Neurobiol*, 92(3), 386-404.
- Montalban, X., Duran, I., Rio, J., Saez-Torres, I., Tintore, M., & Martinez-Caceres, E. M. (2000). Can we predict flu-like symptoms in patients with multiple sclerosis treated with interferon-beta? *J Neurol*, 247(4), 259-262.
- MSIF. (2011). Multiple sclerosis international foundation. Retrieved 06.12.2011, <http://www.msif.org>.
- Nie, D., Tang, K., Diglio, C., & Honn, K. V. (2000). Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood*, 95(7), 2304-2311.
- Nielsen, N. M., Westergaard, T., Rostgaard, K., Frisch, M., Hjalgrim, H., Wohlfahrt, J. et al. (2005). Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol*, 162(8), 774-778.
- Panitch, H., Godin, D.S., Francis, G., Chang, P., Coyle, P.K., O'Connor, P., Monaghan, E., Li, D., Weinshenker, B., EVIDENCE Study Group (2002). Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology*, 59(10), 1496-1506.
- Pappas, D. J., Coppola, G., Gabatto, P. A., Gao, F., Geschwind, D. H., Oksenberg, J. R. et al. (2009). Longitudinal system-based analysis of transcriptional responses to type I interferons. *Physiol Genomics*, 38(3), 362-371.
- Pidgeon, G. P., Tang, K., Cai, Y. L., Piasentin, E., & Honn, K. V. (2003). Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrin expression. *Cancer Res*, 63(14), 4258-4267.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., Kappos, L. et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, 58(6), 840-846.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M. et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69(2), 292-302.

- Poser, S., & Ritter, G. (1980). *Multiple Sklerose in Forschung, Klinik und Praxis*. Stuttgart: Schattauer.
- Ramgolam, V. S., Sha, Y., Jin, J., Zhang, X., Markovic-Plese, S. (2009). IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol.*, 183(8), 5418-5427.
- Reder, A. T., Velichko, S., Yamaguchi, K. D., Hamamcioglu, K., Ku, K., Beekman, J., Wagner, T. C., Perez, H. D., Salamon, H., Croze, E. (2008). IFN-beta1b induces transient and variable gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients independent of neutralizing antibodies or changes in IFN receptor RNA expression. *J Interferon Cytokine Res.*, 28(5), 317-331.
- Rieckmann, P. (2006). Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006). *Nervenarzt*, 77(12), 1506-1518.
- Rio, J., Comabella, M., Montalban, X. (2009). Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nature Rev Neurology*, 5(10), 553-560.
- Ross, A. P. (2008). Tolerability, adherence, and patient outcomes. *Neurology*, 71(24 Suppl 3), 21-33.
- Rudick, R. A., Lee, J. C., Simon, J., Ransohoff, R. M., & Fisher, E. (2004). Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*, 56(4), 548-555.
- Sailer, M., Fazekas, F., Gass, A., Kappos, L., Radue, E. W., Rieckmann, P., Toyka, K., Wiendl, H., Bendszus, M. (2008). Cerebral and spinal MRI examination in patients with clinically isolated syndrome and definite multiple sclerosis. *Rofo*, 180(11), 994-1001.
- Santos, R., Weinstock-Guttman, B., Tamano-Blanco, M., Badgett, D., Zivadinov, R., Justinger, T. et al. (2006). Dynamics of interferon-beta modulated mRNA biomarkers in multiple sclerosis patients with anti-interferon-beta neutralizing antibodies. *J Neuroimmunol*, 176(1-2), 125-133.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L. et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), 214-219.
- Schroeter, M. (2011). Lokale Reaktionen auf die Injektion immunmodulatorischer Substanzen bei schubförmig remittierender Multipler Sklerose. *Der Neurologe und Psychiater*, 1, 1-8.
- Schwid, S. R., Covington, M., Segal, B. M., & Goodman, A. D. (2002). Fatigue in multiple sclerosis: current understanding and future directions. *J Rehabil Res Dev*, 39(2), 211-224.
- Sellebjerg, F., Krakauer, M., Hesse, D., Ryder, L. P., Alsing, I., Jensen, P. E. et al. (2009). Identification of new sensitive biomarkers for the in vivo response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis using DNA-array evaluation. *Eur J Neurol*, 16(12), 1291-1298.

- Singh, M. K., Scott, T. F., LaFramboise, W. A., Hu, F. Z., Post, J. C., & Ehrlich, G. D. (2007). Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients undergoing beta-interferon therapy. *J Neurol Sci*, 258(1-2), 52-59.
- Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 23, 683-747.
- Stalker, T. J., Wu, J., Morgans, A., Traxler, E. A., Wang, L., Chatterjee, M. S. et al. (2009). Endothelial cell specific adhesion molecule (ESAM) localizes to platelet-platelet contacts and regulates thrombus formation in vivo. *J Thromb Haemost*, 7(11), 1886-1896.
- Stark, G. R. (2007). How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18(5-6), 419-423.
- Sturzebecher, S., Wandinger, K. P., Rosenwald, A., Sathyamoorthy, M., Tzou, A., Mattar, P. et al. (2003). Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain*, 126(Pt 6), 1419-1429.
- Tamura, K., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kobayashi, T., Furihata, M., Chung, S. et al. (2009). Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res*, 69(20), 8133-8140.
- Tanaka, N., Kawakami, T., & Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol*, 13(8), 4531-4538.
- Thamilarasan, M., Koczan, D., Hecker, M., Paap, B., Zettl, U.K. (2012). MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev*, 11(3), 174-179.
- Thompson, A. J., Polman, C. H., Miller, D. H., McDonald, W. I., Brochet, B., Filippi, M. M. X. et al. (1997). Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 120(Pt 6), 1085-1096.
- Tremlett, H., & Oger, J. (2004). Hepatic injury, liver monitoring and the beta-interferons for multiple sclerosis. *J Neurol*, 251(11), 1297-1303.
- Tremlett, H., Zaho, Y., Joseph, J., Devonshire, V. (2008). Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79(12), 1368-1374.
- Trojano, M., Paolicelli, D., Bellacosa, A., & Cataldo, S. (2003). The transition from relapsing-remitting MS to irreversible disability: clinical evaluation. *Neurol Sci*, 24 Suppl 5, 268-270.
- Tumani, H., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Gold, R., Hartung, H.P., Hemmer, B., Hohlfeld, R., Otto, M., Stangel, M., Wildemann, B., Zettl, U.K. (2011). Revised McDonald criteria: the persisting importance of cerebrospinal fluid analysis. *Ann Neurol*, 70(3), 292-302.

- Tumani, H., Hartung, H. P., Hemmer, B., Teunissen, C., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Zettl, U.K. (2009). Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*, 35(2), 117-127.
- van den Elskamp, I. J., Lembcke, J., Dattola, V., Beckmann, K., Pohl, C., Hong, W. et al. (2008). Persistent T1 hypointensity as an MRI marker for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 14(6), 764-769.
- van der Voort, L. F., Vennegoor, A., Visser, A., Knol, D. L., Uitdehaag, B. M., Barkhof, F. et al. (2010). Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS. *Neurology*, 75(14), 1228-1233.
- van Waesberghe, J. H., Kamphorst, W., De Groot, C. J., van Walderveen, M. A., Castelijns, J. A., Ravid, R. et al. (1999). Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol*, 46(5), 747-754.
- Vosoughi, R., & Freedman, M. S. (2010). Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg*, 112(5), 365-385.
- Wandinger, K. P., Lunemann, J. D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A. et al. (2003). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet*, 361(9374), 2036-2043.
- Wang, X., Newkirk, R. F., Carre, W., Ghose, P., Igobudia, B., Townsel, J. G. et al. (2009). Regulation of ANKRD9 expression by lipid metabolic perturbations. *BMB Rep*, 42(9), 568-573.
- Waubant, E., Vukusic, S., Gignoux, L., Dubief, F. D., Achiti, I., Blanc, S. et al. (2003). Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology*, 61(2), 184-189.
- Weber, C., Fraemohs, L., & Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7(6), 467-477.
- Weiner, H. L. (2009). The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol*, 65(3), 239-248.
- Weinshenker, B. G., Bass, B., Rice, G. P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J. et al. (1989). The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*, 112(Pt 1), 133-146.
- Weinshenker, B. G. (1998). The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol*, 18(3), 301-307.
- Weinstock-Guttman, B., Badgett, D., Patrick, K., Hartrich, L., Santos, R., Hall, D. et al. (2003). Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients. *J Immunol*, 171(5), 2694-2702.

- Weinstock-Guttman, B., Bhasi, K., Badgett, D., Tamano-Blanco, M., Minhas, M., Feichter, J. et al. (2008). Genomic effects of once-weekly, intramuscular interferon-beta1a treatment after the first dose and on chronic dosing: Relationships to 5-year clinical outcomes in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 205(1-2), 113-125.
- Wekerle, H., Schwab, M., Linington, C., & Meyermann, R. (1986). Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol*, 16(12), 1551-1557.
- WHO. (2004). *Neurology Atlas*,
http://www.who.int/mental_health/neurology/epidemiology/en/index.html,
abgerufen am 01.08.2012
- Wiendl, H., Toyka, K. V., Rieckmann, P., Gold, R., Hartung, H. P., & Hohlfeld, R. (2008). Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J Neurol*, 255(10), 1449-1463.
- Winkelmann, A., Löbermann, M., Reisinger, E. C., & Zettl, U. K. (2011). Multiple sclerosis and infections. *Akt Neurol*, 38, 339-350.
- Yang, I. V., Chen, E., Hasseman, J. P., Liang, W., Frank, B. C., Wang, S. et al. (2002). Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol*, 3(11), research0062.
- Yong, V. W. (2002). Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*, 59(6), 802-808.
- Zettl, U. K., & Goertsches, R. H. (2009). Therapy monitoring in patients with multiple sclerosis based on transcriptomic analysis. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 77 Suppl 1, 64-68.
- Zettl, U. K., Stüve, O., & Patejdl, R. (2012). Immune-mediated CNS diseases: a review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun Rev*, 11(3), 167-173.
- Zettl, U. K., Patejdl, R. (2012). Animal Models in Neurology: Drawbacks and Opportunities. *Curr Pharm Des.*, Epub ahead of print.

8. Wissenschaftliches Verzeichnis

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des Pathomechanismus der Multiplen Sklerose	8
Abb. 2	Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.....	11
Abb. 3	Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose 2012]).....	21
Abb. 4	Studiendesign der vorliegenden Arbeit	33
Abb. 5	Zusammenfassung ähnlicher DNA-Bindemotive bei der Transkriptionsfaktorbindungsstellen-Analyse	42
Abb. 6	Prinzip genregulatorischer Mechanismen und deren Integration in ein Netzwerkmodell	43
Abb. 7	Anzahl der Patienten mit und ohne Schub während des 24 bzw. 48monatigen Untersuchungszeitraums	48
Abb. 8	Krankheitsprogression gemessen am EDSS über einen Beobachtungszeitraum von 48 Monaten.....	50
Abb. 9	Krankheitsprogression, Responder versus Non-Responder	51
Abb. 10	Response, Non-Response und Therapieabbruch nach zweijähriger Therapie	52
Abb. 11	Response, Non-Response und Therapieabbruch nach vierjähriger Therapie.....	52
Abb. 12	Mittlere Läsionslast am Beispiel der T2-Läsionen	53
Abb. 13	Nebenwirkungen unter der IFN- β 1a Therapie	56
Abb. 14	Genregulatorisches Netzwerk	63
Abb. 15	Detailabbildungen des Genregulatorischen Netzwerks.....	64
Abb. 16	Beispiel eines Feedback-Loop (a) und eines Feedforward-Loop (b) im genregulatorischen Netzwerkmodell.....	65
Abb. 17	Expressionsunterschiede bei Patienten mit und ohne Nebenwirkungen	66

8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Klinische Symptomatik zu Beginn und im Verlauf [Poser & Ritter 1980]	9
Tab. 2	Expanded Disability Status Scale (EDSS) [Kurtzke 1983].....	14
Tab. 3	Funktionssysteme, vereinfachte Darstellung [Kurtzke 1983]	15
Tab. 4	Revidierte Diagnosekriterien der MS [Polman et al. 2005]	17
Tab. 5	MRT-Kriterien zur räumlichen Dissemination [Polman et al. 2005].....	17
Tab. 6	Dosierung, Indikationsgebiete und typische Nebenwirkungen der IFN- β Präparate und Glatirameracetat (modifiziert nach [Cohen und Rae-Grant 2012]).....	22
Tab. 7	Klassifikation Prozessspezifischer Biomarker und Beispiele mit Referenz zur Multiplen Sklerose (modifiziert nach [Bielekova und Martin 2004]).....	26
Tab. 8	Interferon- β 1a i.m. Genexpressionsstudien.....	29
Tab. 9	Longitudinale Übersicht der Analysezeitpunkte	32
Tab. 10	Klinische und soziodemographische Daten der Studienpopulation	34
Tab. 11	Mit <i>real-time</i> PCR untersuchte Gene	39
Tab. 12	Gründe für den Abbruch der β -Interferon Therapie im Evaluationszeitraum.....	47
Tab. 13	Progression in den MRT-Verlaufsbeobachtungen	54
Tab. 14	Gegenüberstellung von EDSS, Schubfrequenz und MRT	55
Tab. 15	Vergleich der <i>real-time</i> PCR-Messungen mit den Affymetrix Genchip- messungen	58
Tab. 16	Überrepräsentierte GO-Terme (Gene Ontology)	59
Tab. 17	Überrepräsentierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den regulatorischen Regionen der 121 Gene	61
Tab. 18	Top 20 der differentiell exprimierten Gene für das Kriterium Schub	67
Tab. 19	Top 20 der differentiell exprimierten Gene für das Kriterium Progression	68
Tab. 20	Top 20 der differentiell exprimierten Gene für das Kriterium MRT	69

8.3. Abkürzungsverzeichnis

AEP	Akustisch evozierte Potentiale
AM	Adhäsionsmolekül
APC	Antigen präsentierende Zelle
CDF	<i>(Custom) Chip Definition File</i>
CDMS	<i>Clinically Definite Multiple Sclerosis</i>
CIS	<i>Clinically Isolated Syndrome</i> (Klinisch isoliertes Syndrom)
CN	Kanada
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EU	Europäische Union
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FS	Funktionssystem
Gd	Gadolinium
Gd+	Gadolinium-anreichernd
GO	<i>Gene Ontology</i>
GRN	Genregulatorisches Netzwerk
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IFN- β	Interferon- β
i.m.	intramuskulär
ISG	Interferon-stimulierte Gene
IVIg	intravenöse Immunglobuline
KM	Kontrastmittel
MAID	<i>MA-plot-Based Signal Intensity-Dependent Fold-Change</i>
MEP	Motorisch evozierte Potentiale
MIAME	<i>Minimum Information About A Microarray Experiment</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose

MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite Scale</i>
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
NAb	Neutralisierende Antikörper
NF	<i>nuclear factor</i>
NW	Nebenwirkungen
OCB	<i>Oligoclonal Bands</i> (Oligoklonale Banden)
PASAT	<i>Paced Auditory Serial Addition Test</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPMS	<i>Primary Progressive Multiple Sklerosis</i> (Primär progressive Multiple Sklerose)
qRT	<i>quantitative Real-Time</i>
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RRMS	<i>Relapsing Remitting Multiple Sclerosis</i> (Schubförmige Multiple Sklerose)
s.c.	subkutan
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SPMS	<i>Secondary Progressive Multiple Sclerosis</i> (Sekundär progressive Multiple Sklerose)
SEP	Sensorisch evozierte Potentiale
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
Th17	Interleukin-17-produzierende T-Helfer-Zelle
TILAR	<i>TFBS-Integrating-Least Angle Regression</i>
USA	<i>United States of America</i>
VEP	Visuell evozierte Potentiale
ZNS	Zentrales Nervensystem
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

Anhang A

Liste der ermittelten, differentiell exprimierten Gene (n=121)

Offizielles Gensymbol	GeneCards ID	Offizieller Name
ABLIM3	GC05P148501	actin binding LIM protein family, member 3
ACRBP	GC12M006617	acrosin binding protein
ADAMTS2	GC05M178473	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2
ALOX12	GC17P006840	arachidonate 12-lipoxygenase
ALPL	GC01P021708	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
ANKRD9	GC14M102042	ankyrin repeat domain 9
ANO7	GC02P241849	anoctamin 7
AQP9	GC15P056217	aquaporin 9
ARG1	GC06P131936	arginase, liver
BASP1	GC05P017270	brain abundant, membrane attached signal protein 1
C11orf75	GC11M092852	chromosome 11 open reading frame 75
C15orf52	GC15M038411	chromosome 15 open reading frame 52
C19orf33	GC19P043490	chromosome 19 open reading frame 33
C1orf111	GC01M160610	chromosome 1 open reading frame 111
C3orf34	GC03M197923	chromosome 3 open reading frame 34
C9orf75	GC09M139205	chromosome 9 open reading frame 75
CABP5	GC19M053229	calcium binding protein 5
CALML4	GC15M066270	calmodulin-like 4
CDKN1C	GC11M002861	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
CLDN5	GC22M017885	claudin 5
CLEC10A	GC17M006919	C-type lectin domain family 10, member A
CLIC2	GC0XM154158	chloride intracellular channel 2
CLU	GC08M027510	clusterin
CMTM5	GC14P022916	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5
CPVL	GC07M029001	carboxypeptidase, vitellogenic-like
CSF1R	GC05M149413	colony stimulating factor 1 receptor
CST7	GC20P024877	cystatin F (leukocystatin)
CTSW	GC11P065405	cathepsin W
DAAM2	GC06P039868	dishevelled associated activator of morphogenesis 2
DCLRE1A	GC10M115584	DNA cross-link repair 1A (PSO2 homolog, S. cerevisiae)
DENND2D	GC01M111442	DENN/MADD domain containing 2D
EGR2	GC10M064241	early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)
EHD3	GC02P031310	EH-domain containing 3
ELOVL7	GC05M060083	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids
EMR1	GC19P006838	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
ESAM	GC11M124128	endothelial cell adhesion molecule
FAM113B	GC12P045759	family with sequence similarity 113, member B
FAM26F	GC06P116891	family with sequence similarity 26, member F
FCER1A	GC01P157526	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
FGD6	GC12M093976	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6
FGFBP2	GC04M015571	fibroblast growth factor binding protein 2

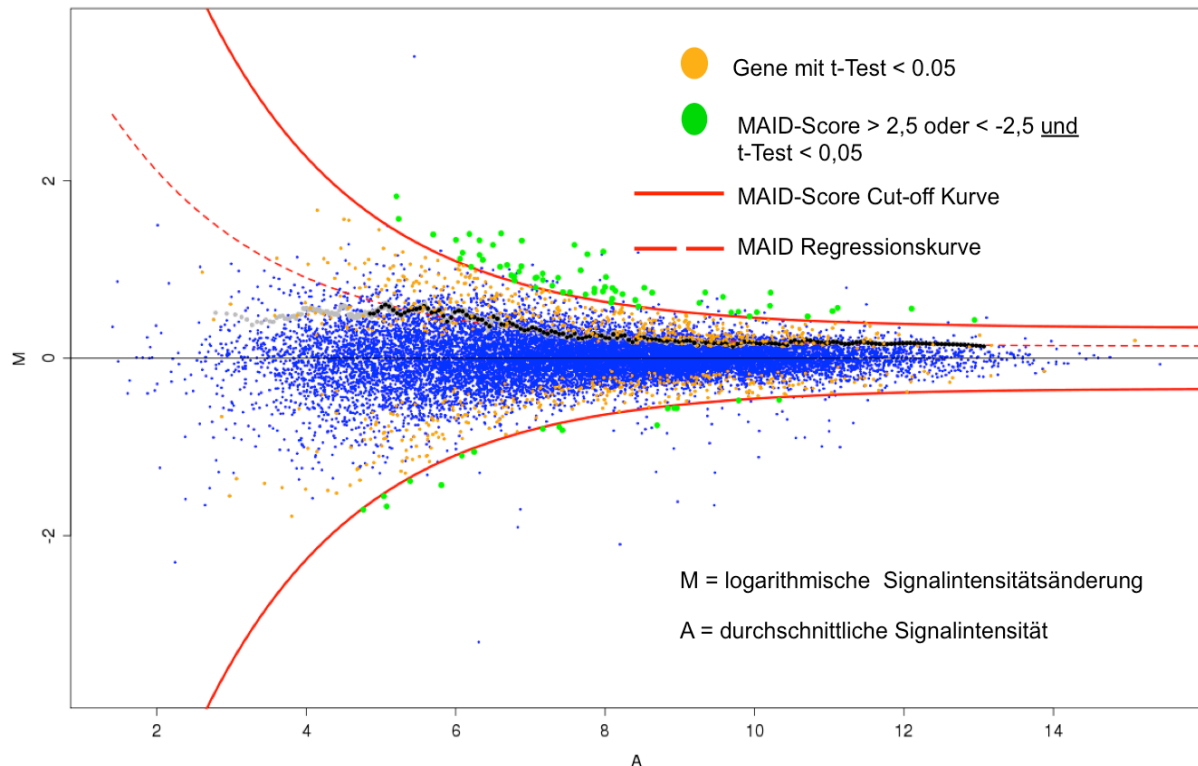
FLRT1	GC11P063627	fibronectin leucine rich transmembrane protein 1
FSTL1	GC03M121595	folliculin-like 1
GCH1	GC14M054378	GTP cyclohydrolase 1
GLRA2	GC0XP014457	glycine receptor, alpha 2
GNAZ	GC22P021728	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide
GNG8	GC19M051829	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8
GPR20	GC08M142437	G protein-coupled receptor 20
GPR44	GC11M060374	G protein-coupled receptor 44
GPR56	GC16P056211	G protein-coupled receptor 56
GPR97	GC16P056259	G protein-coupled receptor 97
GRAP2	GC22P038621	GRB2-related adaptor protein 2
hCG_1776018	GC17M010671	phosphoinositide-interacting regulator of transient receptor potential channels
HEMGN	GC09M099729	hemogen
HIST1H2AE	GC06P026325	histone cluster 1, H2ae
HIST1H2BD	GC06P026266	histone cluster 1, H2bd
HIST1H4H	GC06M026389	histone cluster 1, H4h
HLA-DQA1	GC06P032649	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
HMOX1	GC22P034101	heme oxygenase (decycling) 1
HSPC159	GC02P064593	galectin-related protein
IL1R2	GC02P102066	interleukin 1 receptor, type II
ITGA2B	GC17M039805	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
ITGB3	GC17P042686	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
JAM3	GC11P133444	junctional adhesion molecule 3
JUP	GC17M037164	junction plakoglobin
KCNJ15	GC21P038550	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15
KRT23	GC17M036332	keratin 23 (histone deacetylase inducible)
LCN2	GC09P129951	lipocalin 2
LGALS2	GC22M036290	lectin, galactoside-binding, soluble, 2
LILRA4	GC19M059540	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A member 4
LOC51233	GC22M022293	hypothetical protein LOC51233
LYPD6B	GC02P149604	LY6/PLAUR domain containing 6B
MGAM	GC07P141342	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)
MGLL	GC03M128893	monoglyceride lipase
MMP25	GC16P003037	matrix metalloproteinase 25
MS4A14	GC11P059922	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14
MS4A4A	GC11P059804	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4
MS4A7	GC11P059902	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
MTMR11	GC01M148167	myotubularin related protein 11
MYL9	GC20P034603	myosin, light chain 9, regulatory
MYLK	GC03M124813	myosin light chain kinase
MYOF	GC10M095056	myoferlin
NKG7	GC19M056566	natural killer cell group 7 sequence
OAS1	GC12P111807	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
OLFM4	GC13P052500	olfactomedin 4
PBX1	GC01P162795	pre-B-cell leukemia homeobox 1
PDE5A	GC04M120698	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific
PDGFRB	GC05M149473	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PI3	GC20P043236	peptidase inhibitor 3, skin-derived

PLA2G7	GC06M046780	phospholipase A2, group VII
PPP1R3B	GC08M009032	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
PRF1	GC10M072027	perforin 1 (pore forming protein)
PROS1	GC03M095074	protein S (alpha)
RASAL3	GC19M015423	RAS protein activator like 3
RRAS	GC19M054830	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog
S100P	GC04P006812	S100 calcium binding protein P
SH2B3	GC12P110328	SH2B adaptor protein 3
SLC24A3	GC20P019141	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3
SLC25A24	GC01M108389	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24
SLPI	GC20M043314	secretory leukocyte peptidase inhibitor
SNCA	GC04M090948	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
SPOCD1	GC01M032028	SPOC domain containing 1
SYNGR4	GC19P053559	synaptogyrin 4
TCF7L2	GC10P114700	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
TLR7	GC0XP012795	toll-like receptor 7
TMEM140	GC07P134483	transmembrane protein 140
TMEM176A	GC07P150128	transmembrane protein 176A
TNFRSF10C	GC08P022997	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain
TNFSF10	GC03M173706	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TP53INP2	GC20P032755	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2
TPPP3	GC16M065984	tubulin polymerization-promoting protein family member 3
TSHZ2	GC20P051024	teashirt zinc finger homeobox 2
TTYH2	GC17P069721	tweety homolog 2 (Drosophila)
TYMP	GC22M049312	thymidine phosphorylase
VMO1	GC17M004636	vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken)
VSIG4	GC0XM065158	V-set and immunoglobulin domain containing 4
WARS	GC14M099869	tryptophanyl-tRNA synthetase
XK	GC0XP037430	X-linked Kx blood group (McLeod syndrome)
ZNF598	GC16M001990	zinc finger protein 598
ZNF630	GC0XM047802	zinc finger protein 630
ZNF703	GC08P037673	zinc finger protein 703

Dargestellt sind die Ergebnisse der Affymetrix-Genchipanalyse. Insgesamt wurden 121 Gene unter der IFN- β -1a i.m. Therapie als differentiell exprimiert gemessen. Verglichen wurde die Genexpression von 24 Patienten unmittelbar vor der ersten IFN-Injektion mit der Genexpression nach der ersten Therapiewoche und nach vier Wochen Therapie (Kapitel 3.4). Angegeben sind für jedes Gen das offizielle Gensymbol und der offizielle Genname nach HGNC-Nomenklatur (www.genenames.org) sowie der entsprechende Identifier für die GeneCards-Datenbank (www.genecards.org, Version 2.39). Weitergehende Gen-Informationen sind mit Hilfe der GeneCards®ID = Genidentifikationsnummer unter www.genecards.org abrufbar.

Anhang B

Graphische Darstellung eines MA-Plots



Dargestellt ist ein MA-Plot (visualisiertes MAID-Filtering) zum Vergleich der Transkriptionslevel von Patienten mit starker bzw. milder klinischer Progression der MS gemessen am EDSS (Kapitel 3.3.3 und Kapitel 3.5). Die statistische Analyse dient der Identifikation potentieller, prädiktiver Kandidatengene für den klinischen Verlauf (hier gemessen am EDSS). Jeder dargestellte Punkt der Daten-Punktwolke entspricht einem gemessenen Gen (n=15734). Die PBMC-Genexpression vor Therapiebeginn wurde für eine Gruppe Responder und eine Gruppe Non-Responder nach den in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Kriterien miteinander verglichen, um Genexpressionsunterschiede der beiden Gruppen zu identifizieren. Die MAID-Methode wurde verwendet, um Gene zu selektieren, die besonders stark differentiell exprimiert sind. Dabei wurde eine Regressionskurve an die Daten-Punktwolke im MA-Plot gefittet, die die Variabilität der Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Signalintensität beschreibt. Gene, deren M-Wert um einen Faktor von 2,5 höher liegt als die Regressionskurve, wurden als höher exprimiert in der Responder-Gruppe angesehen. Analog wurden niedriger exprimierte Gene selektiert.

Anhang C

Ergänzende Erläuterungen zur Methodik der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 2006 bis 2012 an der Klinik und Poliklinik für Neurologie (Direktor: Prof. Dr. R. Benecke), in der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie (Leitung: Prof. Dr. U.K. Zettl) der Universitätsklinik Rostock verfasst. Die klinischen und paraklinischen Informationen wurden aus stationären und ambulanten Patientenakten und Epikrisen sowie dem vorliegenden MRT-Bildmaterial zusammengestellt. Der Einschluss der Patienten in die Studie erfolgte in den Jahren 2003 bis 2007. Die Datenerhebung erfolgte sowohl retrospektiv als auch prospektiv und wurde von Herrn Prof. Dr. Zettl geleitet. Die Affymetrix-Genchipanalysen wurde von 2003 bis 2007 am Institut für Immunologie der Universitätsklinik Rostock unter der Leitung von Herrn Dr. Koczan durchgeführt. Von 2006 bis 2012 erfolgte die Rohdatenverarbeitung der Genchipanalysen, die Gennetzwerkanalyse und der Vergleich der Transkriptomdaten mit den erhobenen klinischen und paraklinischen Patienteninformationen unter Anleitung von Dr. R. Goertsches (bis 2009) und Dr. M. Hecker in interdisziplinärer Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsklinik Rostock und dem Steinbeis-Transferzentrum für Proteomanalyse Rostock.

10. Thesen zur Dissertation

1. Der Behandlungsverlauf Interferon- β 1a therapierter Patienten mit Multipler Sklerose sowie das Aufkommen von therapieassoziierten Nebenwirkungen ist bislang nicht ausreichend prognostizierbar. Die pharmakologischen Wirkmechanismen der Interferon- β Präparate sind zudem weitestgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse von Interferon- β 1a-therapierten Patienten mit Multipler Sklerose hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs und der Wirkung des verabreichten Interferonpräparates auf transkriptioneller Ebene im peripheren Blut der Patienten sowie wie eine Assoziation der ermittelten klinischen und experimentellen Daten.
2. Für 24 Patienten mit der Diagnose einer schubförmigen MS konnte deren Verlauf bezüglich Schubfrequenzrate, klinischer Progression und MRT-morphologischen Veränderungen während einer vierjährigen prospektiven Evaluationsphase untersucht werden. Bei allen Patienten wurde die Therapie mit Interferon- β 1a erstmalig initialisiert.
3. Zwei Drittel der Patienten zeigten einen schubfreien Verlauf und keine Zunahme der Krankheitsprogression unter einer Therapie mit einmal wöchentlich appliziertem Interferon- β 1a i.m innerhalb der ersten 24 Monate. Nach durchschnittlich 48 Monaten zeigten 33% der Patienten ein Schubereignis, 63% der Patienten waren weiterhin ohne Krankheitsprogression. Bei 70% der MRT-morphologisch untersuchten Patienten zeigte sich eine Zunahme der zum Teil subklinisch ablaufenden Krankheitsaktivität gemessen an den MRT-Befunden. Es konnte gezeigt werden, dass klinische- und MRT-morphologische Veränderungen nicht äquivalent verändert sind
4. Die Microarray-Genchip-Technologie erlaubt Expressionsmessungen von mehreren Tausend Genen. Sie wurde verwendet um Genexpressionsmessungen in den peripheren mononukleären Zellen aus dem peripher-venösen Vollblut der Patienten durchzuführen.

5. Die MAID-Methode und ein statistischer Signifikanztest wurden zur Auswertung der Transkriptomdaten angewendet, um die differentielle Genexpression der Patienten im Vergleich von drei Untersuchungszeitpunkten in den ersten vier Therapiewochen zu untersuchen. 121 Gene wurden unter der Interferon- β Therapie als differentiell exprimiert identifiziert.
6. Einige der gemessenen Gene sind als Regulatoren der körpereigenen Immunantwort bekannt und partizipieren bei der Differenzierung von Monozyten und Makrophagen sowie der Regulation der Apoptose und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Gene FCER1A, TNFSF10, CSF1R, OAS1, AQP9, IL1R2 und TLR7 sind Immunprozessgene und wurden als signifikant verändert gemessen. FCER1A wurde in dieser und in anderen Studien unter einer Interferon- β Therapie als signifikant runterreguliert identifiziert. Diese Runterregulation führt möglicherweise zu einer Verminderung der Aktivität proinflammatorischer Zytokine und kommt als Indikator für die Interferonwirkung in Frage.
7. Die Gene ITGA2B und ITGB3, ESAM und JAM3 kodieren für Adhäsionsmoleküle und partizipieren bei Zell-Zell-Kontakten sowie der Endothelmigration von Zellen. Sie waren nach der ersten Therapiewoche signifikant hochreguliert. Diese Gene haben eine potentielle Bedeutung für die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke, die bei der MS beeinträchtigt zu sein scheint. Sie sind möglicherweise für die reduzierte Krankheitsaktivität unter der Interferon- β 1a Therapie mitverantwortlich.
8. Durch eine statistische Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen in den Promotorregionen der unter Therapie differentiell exprimierten Gene wurden 11 überrepräsentierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert. Besondere Bedeutung bei der Entstehung von Nebenwirkungen kommt möglicherweise den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und HNF1A zu.
9. Unter Anwendung des TILAR-Algorithmus wurden die wechselseitigen, regulatorischen Beziehungen der unter Therapie differentiell exprimierten Gene auf Grundlage der identifizierten Transkriptionsfaktoren und Vorwissen aus Literaturdatenbanken rekonstruiert und graphisch dargestellt. Einen zentralen Knotenpunkt in dem ermittelten Gennetzwerk bildet der Transkriptionsfaktor NF- κ B.

10. Etwa 80% der Patienten wiesen typische Interferon- β -medierte Nebenwirkungen auf. Bei mehr als 85% der Patienten war eine symptomatische Therapie der zumeist grippalen Symptome notwendig.
11. Für die Gene ESAM, ALOX12, ELOVL7, ANKRD9, GNAZ und SLC24A3 wurde eine signifikant höhere Genexpression vor Therapiebeginn bei Patienten mit grippalen Nebenwirkungen in den ersten drei Behandlungsmonaten gemessen. Fünf dieser Gene sind in dem rekonstruierten genregulatorischen Netzwerk repräsentiert.
12. Durch eine statistische Analyse der Baseline-Genexpression von klinischen Respondern und Non-Respondern konnten Kandidatengene als potentiell prädiktive Marker für den therapeutischen Effekt der Interferon- β -Therapie in Aussicht gestellt werden. Hierzu zählt insbesondere die Transkription der Gene E2F2, FPR2, PAK2 und Gcom1.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation mit dem Thema „*Analyse des klinischen Verlaufs und der differentiellen Genexpression Interferon- β 1a therapierter Patienten mit Multipler Sklerose*“ ohne unzulässige fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Für die umfangreichen Analysen, Datenerhebungen und Bewertungen der Ergebnisse möchte ich einigen Personen danken, die mich hierbei in besonderem Maße unterstützt haben und durch deren Wirken die Fertigstellung dieser Dissertation erst möglich wurde.

An erste Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. U.K. Zettl für die Überlassung des Themas. In den Jahren seiner Betreuung habe ich viel über die Arbeit mit wissenschaftlichen Texten gelernt und von seiner exakten und klar verständlichen Arbeit profitiert. Seine wissenschaftlich-medizinische Begleitung durch viele Jahre meines Studiums wird meine ärztliche Tätigkeit über diese Dissertation hinaus nachhaltig beeinflussen.

In besonderem Maße bedanke ich mich bei Dr. Michael Hecker und Dr. Robert Goertsches aus der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie für deren unermüdlichen Einsatz mir das komplexe Feld der Genexpressionsanalysen aus mathematisch-naturwissenschaftlicher Sicht verständlich zu machen und die Entstehung dieser Dissertation von Anfang an begleitet und möglich gemacht zu haben.

Ohne die molekularbiologischen Untersuchungen von Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiesen und Herrn Dr. D. Koczan wären die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich an dieser Stelle in aller Form bedanken.

Mein spezieller Dank gilt den an der Studie teilnehmenden Patienten und ganz besonders den Mitarbeitern der neurologischen Universitätsklinik Rostock, insbesondere den Mitarbeitern der MS-Spezialambulanz.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Rhea Ranke für die notwendige private Unterstützung und deren ständige Motivation diese Dissertation voranzutreiben und abzuschließen.