

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Professor Dr. med. Alexander Storch

Sektion für Neuroimmunologie

Leiter: Professor Dr. med. Uwe Klaus Zettl

**Analyse des klinischen und paraklinischen Verlaufs sowie
der Genexpressionsveränderungen von Multiple Sklerose
Patienten unter Interferon- β -1b-Therapie**



Inauguraldissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Ole Kandulski

geboren am 12.02.1982 in Göttingen

aus Klein Trebbow

Rostock 2015

Jaro, Tammo und meiner Familie

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Dr. med. habil. Uwe Klaus Zettl

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter

Prof. Dr. med. habil. Hayrettin Tumani

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Ulm

3. Gutachter

PD Dr. med. habil. Klemens Ruprecht

Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie, Charité -

Universitätsmedizin Berlin

Datum der Einreichung: 20.11.2015

Datum der Verteidigung: 07.12.2016

1	EINLEITUNG	6
1.1	Epidemiologie und Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose	6
1.2	Symptomatik und Verlauf	7
1.3	Diagnostik und paraklinische Untersuchungen	11
1.3.1	Diagnosekriterien	11
1.3.2	Magnetresonanztomographie	11
1.3.3	Evozierte Potentiale	12
1.3.4	Liquoruntersuchungen	13
1.4	Therapieoptionen	13
1.4.1	Schubtherapie	14
1.4.2	Sekundärprophylaktische MS-Therapie	14
1.4.3	Interferon-beta	16
1.5	Biomarker	18
1.6	Messung der Genexpression mit Microarrays	19
2	FRAGESTELLUNGEN	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Studiendesign	23
3.2	Patientenkohorte	24
3.3	Klinische und paraklinische Auswertung	25
3.3.1	Evaluation des klinisch-neurologischen Krankheitsverlaufs	25
3.3.2	Auswertung der paraklinischen Befunde	27
3.3.3	Vergleichende Gegenüberstellung der klinischen und paraklinischen Non-Responder	28
3.3.4	Nebenwirkungen	29
3.4	Molekularbiologische Datenerhebung und bioinformatische Analyse	29
3.4.1	Blutprozessierung	29
3.4.2	Erhebung der Fluoreszenzsignale	30
3.4.3	Datenvorverarbeitung	30
3.4.4	Ermittlung der unter Therapie differentiell exprimierten Gene (DEG)	31
3.4.5	Validierung der unter Therapie DEG mit quantitativer rt-PCR	33
3.4.6	Biologische Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG	34
3.4.7	Geninteraktionen der unter Therapie differentiell exprimierten Genen	34
3.5	Statistische Auswertungen zur Identifikation prognostischer Biomarker	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Klinische und paraklinische Ergebnisse	36
4.1.1	Beendigung der IFN- β -1b-Therapie	36
4.1.2	Krankheitsverlauf der Patientenkohorte anhand der EDSS-Werte	37
4.1.3	Krankheitsverlauf der Patientenkohorte anhand der Schübe	38
4.1.4	Auswertung anhand der klinischen Bewertungsscores	40
4.1.5	Auswertung des Krankheitsverlaufs anhand der MS-Verlaufsform	42
4.1.6	Auswertung der paraklinischen Befunde	42
4.1.7	Vergleichende Gegenüberstellung der klinischen und paraklinischen Non-Responder	46
4.1.8	Nebenwirkungen	46
4.2	Molekularbiologische Ergebnisse	49
4.2.1	Unter Therapie differentiell exprimierte Gene	49
4.2.2	Validierung der unter Therapie DEG mit quantitativer rt-PCR	52
4.2.3	Biologische Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG	54
4.2.4	Geninteraktionen der unter Therapie differentiell exprimierten Gene	55

4.3	Statistische Auswertungen zur Identifikation prognostischer Biomarker	57
5	DISKUSSION.....	59
5.1	Patientenkohorte	59
5.2	Klinische und paraklinische Ergebnisse	61
5.2.1	Klinische Ergebnisse	61
5.2.2	Paraklinische Ergebnisse	62
5.2.3	Termini Responder und Non-Responder	64
5.2.4	Unter Therapie auftretende Nebenwirkungen und Therapieadhärenz	65
5.2.5	Parameter zur Wirksamkeitseinschätzung von Interferon- β -1b	67
5.3	Molekularbiologische Ergebnisse.....	67
5.3.1	Probenmaterial und Probenuntersuchung.....	67
5.3.2	Unter Therapie differentiell exprimierte Gene	70
5.3.3	Biologische Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG	73
5.3.4	Geninteraktionen der unter Therapie differentiell exprimierten Gene	74
5.4	Prognostische Biomarker-Kandidaten bei RRMS	75
6	ZUSAMMENFASSUNG	77
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	80
8	ANHANG.....	95
8.1	Abkürzungsverzeichnis	95
8.2	Abbildungsverzeichnis	97
8.3	Tabellenverzeichnis.....	98
8.4	Verzeichnis der supplementären Tabellen.....	99
8.5	Supplementäre Tabellen	100
8.6	Thesen zur Dissertation	108
8.7	Selbstständigkeitserklärung	111
8.8	Danksagung	112

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist die am häufigsten auftretende chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und stellt die häufigste Ursache einer nichttraumatisch bedingten neurologischen Behinderung im jungen Erwachsenenalter in Europa dar. Das Prädelektionsalter liegt beim überwiegenden Teil der Patienten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Flachenecker & Zettl 2015a). Nach neueren Schätzungen erkranken Frauen etwa drei Mal häufiger an MS als Männer (Kingwell *et al.* 2013). In Deutschland sind über 200.000 Menschen (Petersen *et al.* 2014) und weltweit ca. 2,5 Millionen Menschen an MS erkrankt (Milo & Kahana 2010, Flachenecker & Zettl 2015a). Die Prävalenzrate unterliegt regionalen Schwankungen. Sie ist in Nordeuropa und Nordamerika am höchsten (Milo & Kahana 2010).

Bisher konnte die Ätiologie nicht zufriedenstellend geklärt werden. Umweltfaktoren und die genetische Ausstattung von MS-Patienten scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen. Das Risiko an MS zu erkranken variiert zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen (Langer-Gould *et al.* 2013). Bisher wurde allerdings kein spezifischer, genetischer Marker für MS nachgewiesen. Es findet sich jedoch eine Assoziation mit bestimmten Haplotypen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) (Ramagopalan & Ebers 2009, Sadovnick 2012). Es wird angenommen, dass diese MHC-Gene für 50 % des genetischen Risikos verantwortlich sind (Comabella & Khoury 2012, Losy 2013). Es wurden auch genetische Varianten außerhalb der MHC-Regionen gefunden, die ein erhöhtes Risiko für die MS bedeuten (Sawcer *et al.* 2011, Beecham *et al.* 2013). Epidemiologische Studien verweisen auf einen bedeutenden Einfluss von verschiedenen Umweltfaktoren in der Ätiopathogenese der MS (Milo & Kahana 2010). So tritt MS in gemäßigten Klimazonen häufiger auf und es wird eine Assoziation von Schüben und der Erkrankungsmanifestation mit viralen Infekten vermutet (Ascherio & Munger 2007). Verschiedene Viren werden als MS-auslösende Agenzien diskutiert (Olival *et al.* 2013). Dies wird durch zwei Hypothesen zu rechtfertigen versucht (Ascherio & Munger 2007, Olival *et al.* 2013). Nach der sogenannten Hygienehypothese verringern frühkindliche Infektionen verschiedener Erreger das Risiko an MS zu erkranken, wogegen Infektionen im höheren Lebensalter ein höheres Erkrankungsrisiko bedeuten. Die sogenannte Prävalenzhypothese postuliert eine höhere MS-Prävalenz in Regionen mit einer hohen Prävalenz bestimmter Pathogene, wobei das Pathogen zunächst eine asymptomatische persistierende Infektion verursacht und im späteren Verlauf MS auslöst. Weitere, nichtinfektiöse Umweltfaktoren werden mit dem Auftreten und dem Verlauf von MS in Verbindung gebracht. So wird eine Assoziation zwischen einer geringen Sonneneinstrahlung bzw. einem geringen Anteil von Vitamin D₃ in der Nahrung während der Kindheit und Jugend mit dem Auftreten von MS beschrieben (McDowell *et al.* 2011). Neben einem erhöhten Erkrankungsrisiko führt eine verminderte Vitamin D₃-

Aufnahme eventuell zu einer negativen Beeinflussung des Krankheitsverlaufs bei MS (Smolders *et al.* 2008, Simpson *et al.* 2010). Rauchen wird als weiterer nichtinfektiöser Umweltfaktor mit einem erhöhten MS-Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht (Ramagopalan *et al.* 2013). Ergebnisse aus Tiermodellen lassen vermuten, dass der individuellen Darmflora ein erheblicher Einfluss bei der Entstehung von MS zukommt (Berer *et al.* 2011, Hohlfeld & Wekerle 2015). Die zugrunde liegenden Zusammenhänge von infektiösen und nichtinfektiösen Einflussfaktoren sind bisher nicht verstanden (Belbasis *et al.* 2015).

Immunologische Mechanismen unter Beteiligung von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten scheinen eine zentrale Rolle bei der Krankheitsentstehung von MS zu spielen (Comabella & Khoury 2012). Es wird angenommen, dass zunächst eine Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen in der Körperperipherie erfolgt. Der initiale Auslöser der T-Lymphozytenaktivierung ist nicht bekannt. Eventuell geschieht dies über antigene, kreuzreagierende Determinanten (Molekulare *Mimikry*), die bei Infektionserregern und körpereigenen Strukturen gleichermaßen vorkommen (Comabella & Khoury 2012). In der Regel werden autoreaktive T-Lymphozyten durch regulatorische Mechanismen der peripheren Immuntoleranz unterdrückt (Sakaguchi 2005). Diese Mechanismen scheinen bei an MS Erkrankten gestört zu sein (Kumar *et al.* 2006, Frisullo *et al.* 2009). Die aktivierten T-Lymphozyten und weitere Entzündungszellen transmigrieren die Blut-Hirn-Schranke (Larochelle *et al.* 2011, von Büdingen *et al.* 2012). Im ZNS erfolgt eine Reaktivierung der T-Lymphozyten durch ortsständige antigenpräsentierende Mikrogliazellen. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, was zu einem Anlocken und Aktivieren weiterer Effektorzellen führt. MS wurde lange als eine T-Lymphozyten-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen. Doch B-Lymphozyten und Plasmazellen scheint eine bedeutende pathophysiologische Bedeutung zu zukommen (Disanto *et al.* 2012). So wurden diverse Autoantikörper gegen ZNS-Bestandteile bei an MS-Erkrankten identifiziert (Fraussen *et al.* 2014). Darüber hinaus befinden sich monoklonale Antikörper gegen das B-Lymphozyten-Antigen CD20 im off-Label-Gebrauch bzw. in klinischen Studien (Kappos *et al.* 2011, Rommer *et al.* 2014). Die für MS typischen, multiplen, demyelinisierenden entzündlichen Infiltrate bestehen zum überwiegenden Teil aus T-Lymphozyten, mit einem Überwiegen der CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten. B-Lymphozyten und Plasmazellen sind zu einem weitaus geringeren Anteil vertreten (Lassmann 2013). Diese treten vor allem während früher Krankheitsphasen bei RRMS in Erscheinung. Im späteren Krankheitsverlauf kommt es darüber hinaus zunehmend zu axonalen und degenerativen Schädigungen (Lassmann 2013).

1.2 Symptomatik und Verlauf

Es existiert kein für MS spezifisches Krankheitssymptom. Die Symptomatik ist aufgrund polytooper Läsionsverteilungen vielgestaltig. Einen Überblick über typische neurologische Symptome bei Erkrankungsbeginn und im Gesamtverlauf der MS gibt Abb. 1.

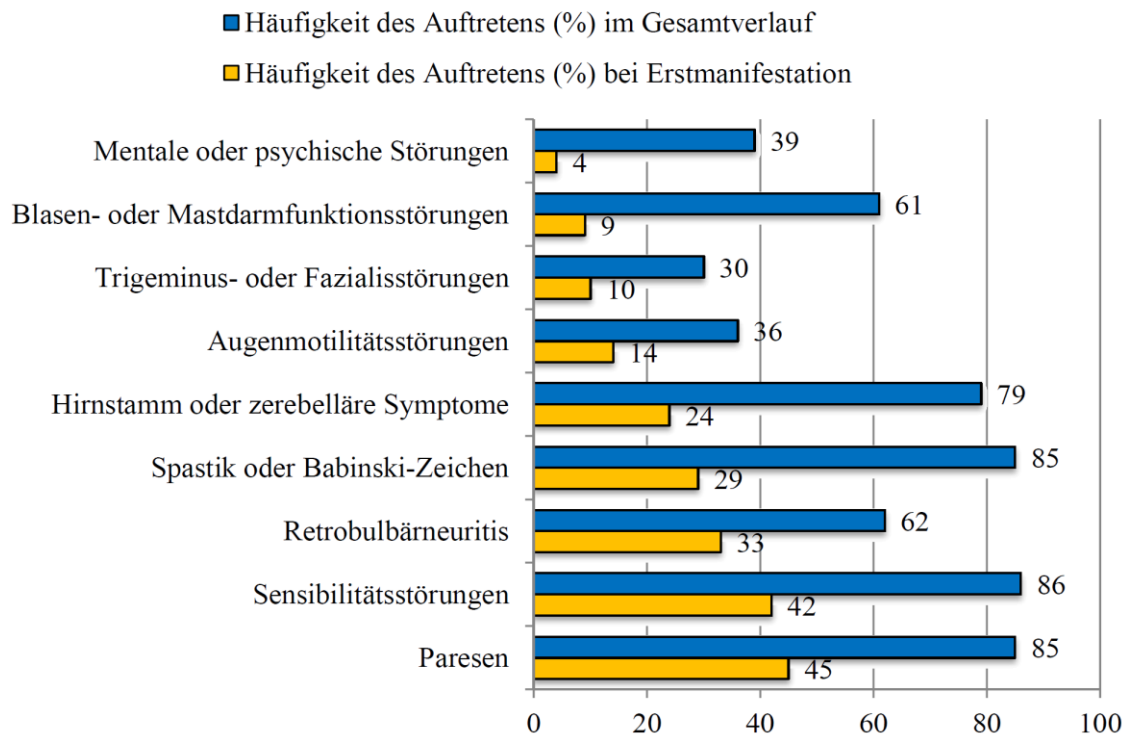


Abb. 1: Neurologische Symptome bei Erstmanifestation und im Gesamtverlauf der MS (mod. nach Poser & Ritter 1980).

Es lassen sich folgende Krankheitsverläufe bei der MS unterscheiden: Schubförmiger Verlauf (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS), primär chronisch progredienter Verlauf (*primary-progressive multiple sclerosis*, PPMS) und die sich aus der RRMS entwickelnde sekundär progrediente Verlaufsform (*secondary-progressive multiple sclerosis*, SPMS) (Lublin *et al.* 2014).

Die RRMS ist durch akute Krankheitsverschlechterungen, sogenannte Krankheitsschübe, gekennzeichnet. Sie besteht initial bei 80 – 85 % der MS-Patienten (Confavreux & Vukusic 2006). Die jährliche Schubrate beträgt gegenwärtig im Durchschnitt 0,5 Schübe pro Jahr und Patient (Flachenecker & Zettl 2015b). Zum Teil werden allerdings deutlich höhere Schubraten zu Erkrankungsbeginn bei unbehandelten Patienten beschrieben (IFNB MS Study Group 1993, Tremlett *et al.* 2008). In der Regel können sich die Schubsymptome nach 6-8 Wochen zurückbilden. Bei Symptompersistenz über ein halbes Jahr sinkt die Rückbildungswahrscheinlichkeit auf unter 5 % (Ellison *et al.* 1994). Ein MS-Schub ist als neue oder wiederkehrende neurologische Symptomatik definiert, die mindestens 24 Stunden andauert, einen Mindestabstand von 30 Tagen zu einem vorausgegangenen Schubereignis aufweist und durch keine andere Ursache, wie beispielsweise einem febrilen Infekt oder einer Änderung der Körpertemperatur, erklärbar ist. Multiple Episoden neurologischer Symptome, wie tonische Spasmen mit einer Dauer von mehr als 24 Stunden, können ebenfalls als Schub gewertet werden. Einzelne, anfallsartige Episoden dieser Art werden hingegen nicht gewertet (Schumacker *et al.* 1965). Bei ca. der Hälfte der Patienten mit einer RRMS kommt es nach der ersten Krankheitsdekade (Weinshenker *et al.* 1989) zu einem Übergang in die SPMS. Bei

mehr als 80 % der Patienten besteht nach 25 Krankheitsjahren eine SPMS (Scalfari *et al.* 2010). Die SPMS ist durch eine stetige Krankheitsprogression mit allmählicher Zunahme irreversibler Behinderungen sowie teilweise durch aufgesetzte Krankheitsschübe charakterisiert. Die Bezeichnung eines sekundär progredienten Krankheitsverlaufs fordert die kontinuierliche Zunahme neurologischer Symptome über einen Mindestzeitraum von sechs Monaten (Confavreux & Vukusic 2006). Die Diagnose einer SPMS ist aufgrund des fließenden Übergangs aus der RRMS oftmals erschwert. Die PPMS ist, wie die SPMS, durch eine stetig fortschreitende Krankheitsprogression gekennzeichnet. Eine PPMS tritt häufiger bei späterer Krankheitsmanifestation auf. Von ihr sind ca. 10-15 % der Patienten betroffen (Miller & Leary 2007). Die verschiedenen Krankheitsverläufe sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

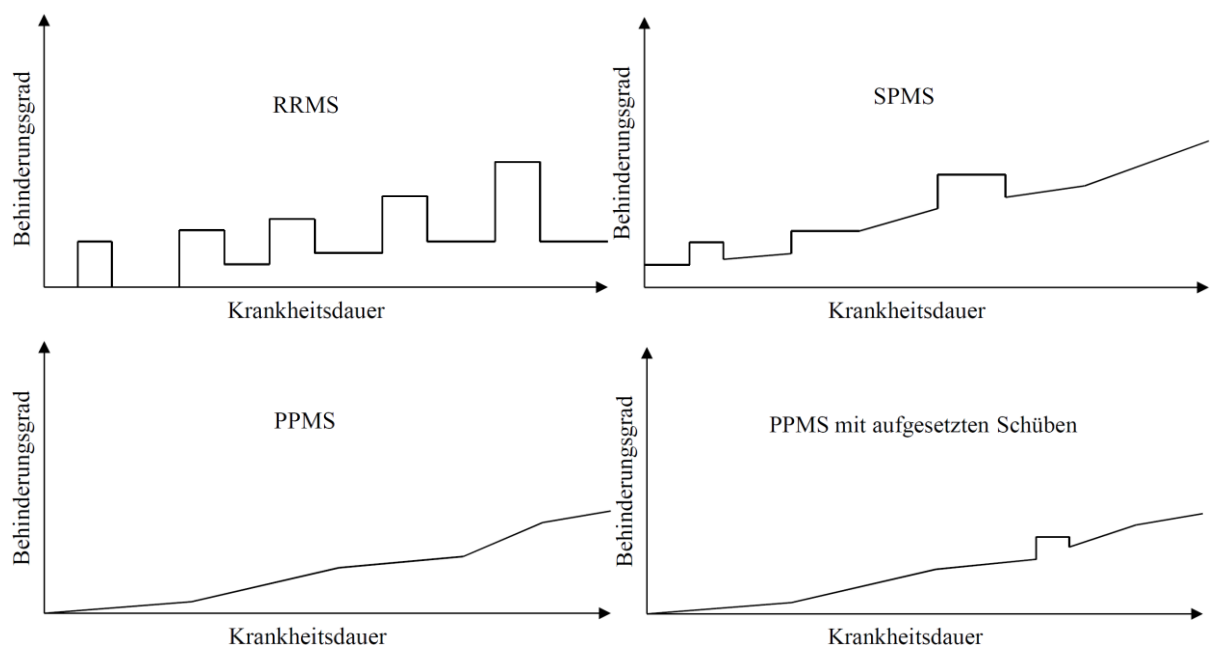


Abb. 2: Verschiedene MS-Verlaufsformen.

Bei der schubförmig verlaufenden MS (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS) treten akute Krankheitsschübe auf, wobei sich die jeweilige Symptomatik teilweise nur unvollständig wieder zurückbildet. Die sekundär chronisch progrediente MS (*secondary-progressive multiple sclerosis*, SPMS) ist durch eine schleichend zunehmende Krankheitsprogression mit/ohne schubhaften Superpositionen charakterisiert und entwickelt sich im Krankheitsverlauf aus der RRMS. Bei der primär chronisch progredienten MS (*primary-progressive multiple sclerosis*, PPMS) kommt es zu einer schleichenden Krankheitsprogression ohne Krankheitsschübe.

Ein erstmaliges, mono- oder polysymptomatisches MS-verdächtiges Ereignis wird als klinisch isoliertes Syndrom (KIS) bezeichnet (Miller *et al.* 2012). Treten MS-typische Veränderungen in der Magnetresonanztomographie (MRT) ohne eruierbare klinische Symptome auf, wird dies als radiologisch isoliertes Syndrom bezeichnet (Granberg *et al.* 2013). Dies sind meist Zufallsbefunde bei aus anderem Anlass veranlasster MRT-Bildgebung. Bei ca. einem Drittel dieser Patienten kommt es innerhalb von fünf Jahren zum Auftreten von neurologischen Symptomen (Granberg *et al.* 2013).

Der MS-Krankheitsverlauf ist individuell verschieden und hängt von der „natürlichen“ Krankheitsaktivität sowie dem Ansprechen auf eine sekundärprophylaktische Therapie ab. Zu Erkrankungsbeginn führen MS-Läsionen zum Teil nur zu geringen neurologischen Einschränkungen. So kann nicht betroffenes Hirnparenchym funktionell kompensatorisch wirken. Dies wird als zerebrale neuronale Plastizität bezeichnet (Stangel 2007). Im weiteren Krankheitsverlauf sind die kompensatorischen Mechanismen weniger stark ausgeprägt, sodass sich zunehmend klinische Symptome manifestieren. Für den kurzzeitigen Verlauf von fünf Jahren scheint die Schubrate eine prognostische Aussage zu ermöglichen (Tremlett *et al.* 2009). So gelten bei Krankheitsbeginn als prognostisch günstig: ein monosymptomatischer Beginn mit sensibler Symptomatik, Hirnstammsymptomatik oder Retrobulbärneuritis, sowie ein frühzeitiger Krankheitsbeginn und kurz anhaltende, sich schnell zurückbildende Schübe (Phadke 1990). Eine initial hohe Anzahl von Schüben mit anschließend unvollständiger Symptomregredienz wird hingegen mit einem schlechteren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht (Mowry *et al.* 2009). Im langfristigen, über 10 Jahre dauernden Krankheitsverlauf, scheint die initiale Schubanzahl nur einen geringen Einfluss auf die Krankheitsprogression zu haben (Tremlett *et al.* 2009). Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist die Lebenserwartung von MS-Patienten um sieben bis 14 Jahre reduziert, was zu einem Großteil auf immobilisationsbedingte Folgeerkrankungen zurückzuführen ist (Goodin *et al.* 2012). Es wird vermutet, dass die progrediente Phase der MS ein diffus entzündlicher, neurodegenerativer Prozess ist und unabhängig vom initialen Krankheitsverlauf abläuft (Leray *et al.* 2010).

Zur Quantifizierung der neurologischen Behinderung bei MS-Patienten werden Evaluationsskalen verwendet. Die vom Neurologen John F. Kurtzke entwickelte Bewertungsskala zur Dokumentation der neurologischen Behinderung bei MS-Patienten, der Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke 1983), ist als internationaler Goldstandard etabliert und wurde in der vorliegenden Doktorarbeit verwendet. Die Skalierung beginnt bei 0 und endet in 0,5er Schritten bei 10. Ein EDSS-Wert bis 3,5 kennzeichnet gehfähige Patienten. EDSS-Werte zwischen 4,0 und 7,0 definieren das Ausmaß der Einschränkung des Gehvermögens und EDSS-Werte > 8,0 das Ausmaß der Bettlägerigkeit. EDSS-Werte bis 3,5 entstehen durch die Summation von Funktionssystemgraden (Grad 0 = normal, Grad 1 = abnorme Zeichen ohne Behinderung, Grad zwei = leichte Behinderung, Grad 3 bis 6 = mäßige bis schwere Behinderung). Zu den Funktionssystemen zählen: die Pyramidenbahn (z.B. Lähmungen), das Cerebellum (z.B. Ataxie, Koordinationsstörungen, Tremor), der Hirnstamm (z.B. Sprech- und Schluckstörungen, Nystagmus), das Sensorium (z.B. vermindertes oder gesteigertes Berührungsempfinden, Kribbelmissempfindungen), die Blasen- und Mastdarmfunktion (z.B. Harn- oder Stuhlinkontinenz), Sehfunktionen (z.B. verminderter Visus), zerebrale Funktionen (z.B. hirnorganische Auffälligkeiten oder Demenz) und weitere neurologische Auffälligkeiten. Eine detaillierte Aufschlüsselung der verschiedenen Funktionssysteme sowie die tabellarische Darstellung des EDSS befindet sich in den Tabellen Suppl.-Tab. 1 und 2.

1.3 Diagnostik und paraklinische Untersuchungen

1.3.1 Diagnosekriterien

Die MS-Diagnosekriterien lassen die Diagnose einer MS bei verschiedenen Kombinationen von klinischen und paraklinischen Befunden zu und unterliegen einem stetigen Wandel. So wurden die McDonald-Diagnosekriterien von 2001 (Suppl.-Tab. 3) von Polman et al. 2005 und 2010 (Polman et al. 2005, Polman et al. 2011) mit dem Ziel einer vereinfachten und beschleunigten Diagnosestellung (Montalban et al. 2010) überarbeitet.

Tab. 1: McDonald-Diagnosekriterien von 2010 (mod. nach Polman et al. 2011).

Klinische Symptomatik	Erforderliche Zusatzdiagnostik
≥ 2 Schübe mit klinisch ≥ 2 objektivierbaren Läsionen oder objektivierbarer Nachweis 1 Läsion plus anamnestic Evidenz für stattgehabten Schub	Keine
≥ 2 Schübe mit einer objektivierbaren klinischen Läsion	<u>Örtliche Dissemination</u> nach den Swanton MRT-Kriterien oder weitere klinische Manifestation in einer anderen Lokalisation
Ein Schub und objektivierbarer Nachweis von ≥ 2 Läsionen	<u>Zeitliche Dissemination</u> nach den Swanton MRT-Kriterien oder zweiter klinischer Schub
Ein Schub mit klinisch objektivierbarer Evidenz einer Läsion (KIS)	<u>Örtliche Dissemination</u> nach den Swanton MRT-Kriterien oder weitere klinische Manifestation in einer anderen Lokalisation und <u>zeitliche Dissemination</u> nach den Swanton-MRT-Kriterien oder zweiter klinischer Schub
Schleichende neurologische Progression (PPMS) über ≥ 1 Jahr (retrospektiv oder prospektiv bestimmt)	2 der 3 folgenden Kriterien: • ≥ 1 T2-Läsion in mindestens einem der Areale: periventrikulär, juxtakortikal oder infratentoriell • ≥ 2 spinale T2-Läsionen (symptomatische Hirnstamm- und/oder spinale Läsionen werden nicht berücksichtigt) • Positiver Liquorbefund (Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) und/oder autochthone IgG-Synthese)

Unter klinischen Gesichtspunkten kann eine MS derzeit bei zeitlich voneinander getrennten klinischen Ereignissen (zeitliche Dissemination) und bei in unterschiedlichen Lokalisationen vorliegenden Läsionen (örtliche Dissemination) gestellt werden (Tab. 1). Der MRT kommt bei den McDonald-Kriterien und deren Revisionen eine entscheidende Rolle zu, da durch sie die zeitliche und örtliche Dissemination ohne korrelierende klinische Symptomatik belegt werden kann. Voraussetzung zur Diagnosestellung einer MS ist der differentialdiagnostische Ausschluss anderer infrage kommender Erkrankungen (McDonald et al. 2001, Polman et al. 2005, Polman et al. 2011).

1.3.2 Magnetresonanztomographie

Die für MS charakteristischen hyperintensiven T2-Läsionen liegen bevorzugt periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, pontin, zerebellär und spinal in der weißen Substanz. Dies sind die

Lokalisationen, die in den McDonald-Diagnosekriterien gefordert sind (McDonald *et al.* 2001, Polman *et al.* 2005, Polman *et al.* 2011). T2-gewichtete Pulssequenzen stellen akute und chronische MS-Läsionen dar (Sailer 2015). Bis zu 20 – 30 % der mittels T2-gewichteter Pulssequenzen darstellbaren MS-Läsionen sind in T1-gewichteten Pulssequenzen darstellbar (Sailer 2015). Akute, hypointens in T1-gewichteten Pulssequenzen darstellbare MS-Läsionen sind durch ein ausgeprägtes Ödem verursacht und häufig im späteren Krankheitsverlauf nicht mehr nachweisbar (Sailer 2015). Durch die paramagnetische Kontrastmittelapplikation (z.B. Gadolinium, Gd) lassen sich in T1-gewichteten Pulssequenzen akute MS-Läsionen mit Kontrastmittelanreicherung darstellen. Dies ist Ausdruck einer vorübergehenden Störung der Blut-Hirn-Schranke bei akuten MS-Läsionen. Gd-anreichernde MS-Läsionen sind ohne Schubtherapie bis zu 8-12 Wochen nachweisbar (Grunwald *et al.* 2008). Persistierende hypointense, T1-gewichtete MS-Läsionen, sogenannte *black holes*, stellen im Umbauprozess befindliche, meist irreversibel axonal-geschädigte MS-Läsionen dar (Sailer 2015).

Lagen den McDonald-Kriterien von 2001 und 2005 die Barkhof-MRT-Kriterien (Barkhof *et al.* 1997) zur Belegung der zeitlichen und räumlichen Dissemination zu Grunde, so richten sich die aktuellen McDonald-Kriterien nach den Swanton-MRT-Kriterien (Swanton *et al.* 2006). Die unterschiedlichen MRT-Kriterien sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Vergleich der Barkhof- und Swanton-MRT-Kriterien (Barkhof *et al.* 1997, Swanton *et al.* 2006) für die räumliche und zeitliche Dissemination.

	Barkhof-MRT-Kriterien	Swanton-MRT-Kriterien
Örtliche Dissemination	≥ 3 der folgenden 4 Bedingungen: a) mindestens eine Gd-anreichernde Läsion oder ≥ 9 T2-Läsionen b) ≥ 3 periventrikuläre Läsionen c) ≥ 1 juxtakortikale Läsion d) ≥ 1 infratentorielle oder spinale Läsion	≥ 1 T2-Läsion in ≥ 2 der folgenden MS-typischen Regionen: periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder spinal Die Läsionen werden bei klinischer Hirnstamm- oder spinaler Symptomatik nicht berücksichtigt Es bedarf keiner Gd-anreichernder Läsionen für den Nachweis der örtlichen Dissemination
Zeitliche Dissemination	≥ 1 Gd-anreichernde Läsion in einer Kontroll-MRT nach ≥ 3 Monaten oder Nachweis einer neuen T2-Läsion in einer Kontroll-MRT nach ≥ 30 Tagen	Gleichzeitiger Nachweis asymptomatischer Gd-anreichernder und nicht Gd-anreichernder Läsionen oder eine neue T2 und/oder Gd-anreichernde Läsion in einer Kontroll-MRT zu einem beliebigen Zeitpunkt

Gd = MRT-Kontrastmittel (Gadolinium).

1.3.3 Evozierte Potentiale

Anhand evozierter Potentiale können aktuelle oder im Vorfeld aufgetretene neurologische Symptome objektiviert und klinisch stumme MS-Läsionen detektiert werden (Leocani & Comi 2014, DGN & KKNMS 2015).

Einzelheiten zu den in der vorliegenden Arbeit angewandten evozierten Potentialen, den transkraniell magnetisch evozierten Potentialen (MEP), den somatosensibel evozierten Potentialen (SEP) und den visuell evozierten Potentialen (VEP), sind im Methodenteil aufgeführt (Kap. 3.3.2).

1.3.4 Liquoruntersuchungen

Durch die enge räumliche Nähe MS-typischer periventrikulärer und spinaler Läsionen zum Liquor cerebrospinalis lassen sich anhand der Liquordiagnostik MS-typische, molekulare Auffälligkeiten abbilden. Typisch für eine MS sind in absteigender Häufigkeit: der Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis, eine intrathekale IgG-Synthese mit erhöhtem IgG-Antikörperindex, eine Pleozytose unter 35 Zellen/ μ L sowie eine Schrankenfunktionsstörung bei erhöhtem Liquor-Serum-Albuminquotienten (Andersson *et al.* 1994). Als OKB werden Immunglobuline, zumeist der Klasse IgG, bezeichnet, die mittels isoelektrischer Fokussierung als Banden im Liquor, jedoch nicht im parallel untersuchten Serum nachweisbar sind (Link & Huang 2006). Sie sind Ausdruck einer klonalen Expansion antigenspezifischer B-Lymphozyten und Plasmazellen im frühen MS-Verlauf (Qin *et al.* 2003) und sind bei gesicherter MS bei über 95 % der Patienten nachweisbar (Reiber *et al.* 1998, Link & Huang 2006). Die sogenannte Masern-Röteln-Zoster-Reaktion (MRZ-Reaktion), bei der intrathekales IgG gegen mindestens zwei der drei namensgebenden neurotrophen Viren nachweisbar ist, ist bei gesicherter MS bei ca. 84 bis 94 % der Patienten positiv (Felgenhauer & Reiber 1992, Reiber *et al.* 1998). Sie gilt als Ausdruck einer polyspezifischen Immunantwort bei Autoimmunprozessen (Zettl & Tumani 2006) und wird zur Diagnosesicherung einer MS empfohlen (Brettschneider *et al.* 2009). Der Nachweis einer MRZ-Reaktion sowie der Nachweis von OKB gelten beim KIS als Prädiktor für eine Konversion in eine MS (Tintoré *et al.* 2008, Brettschneider *et al.* 2009).

1.4 Therapieoptionen

Man unterscheidet bei der Therapie die kausalerorientierte und die symptomatische Therapie.

Es stehen bei der RRMS derzeit mehrere medikamentöse Therapiestrategien mit unterschiedlicher Wirksamkeit zur Verfügung. Auch zur Therapie der SPMS stehen verschiedene medikamentöse Therapien zur Verfügung. Allerdings existieren bisher keine zugelassenen Therapien bei PPMS (Castro-Borrero *et al.* 2012). Zuletzt wurden die kausalerorientierten Therapiestrategien von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und des krankheitsbezogenen Kompetenznetz Multiple Sklerose (KKNMS) mit dem Ziel der Vereinheitlichung der Behandlung von MS überarbeitet (DGN & KKNMS 2015).

Symptomatische medikamentöse und nichtmedikamentöse Therapiestrategien richten sich gezielt gegen die durch MS hervorgerufenen Beschwerden wie Spastik, Fatiguesymptomatik, sexuelle Funktionsstörungen, Blasenfunktionsstörungen, Dysarthrie und Dysarthrophonie, kognitive Einschränkungen, Depression, ataktische Symptome, Tremor und krankheitsbezogene

Schmerzsymptome. Sie sind in den Empfehlungen der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (Henze *et al.* 2006) und in den aktuellen Therapieleitlinien der DGN und des KKNMS aufgeführt (DGN & KKNMS 2015).

1.4.1 Schubtherapie

Die intravenöse Therapie mit hochdosiertem Methylprednisolon mit je einem Gramm an drei bis fünf aufeinander folgenden Tagen stellt die Standardtherapie des akuten MS-Schubes dar (DGN & KKNMS 2015). Methylprednisolon wirkt auf verschiedene Weisen antientzündlich, antiödematös und immunsuppressiv (Sloka & Stefanelli 2005). Mit dem Ziel, eine möglichst schnelle und komplette Rückbildung der Schubsymptome zu erzielen, sollte die Schubtherapie zeitnah nach Auftreten neuer neurologischer Symptome erfolgen. Bei fehlender oder unvollständiger Symptomrückbildung wird 14 Tage nach Beendigung der hochdosierten Schubtherapie eine ultrahochdosierte, intravenöse Methylprednisolontherapie, mit je zwei Gramm Methylprednisolon an drei bis fünf aufeinander folgenden Tagen, empfohlen (DGN & KKNMS 2015). Bei hiernach fehlender Symptomlinderung sollte 14 Tage nach Beendigung des ultrahochdosierten Steroidstoßes eine Plasmapheresebehandlung erfolgen (Schilling *et al.* 2006). Bei Plasmapheresen wird unselektiv das Patienten-Plasma verworfen und durch humanes Poolplasma ersetzt, wodurch großmolekulare Substanzen, wie Antikörper und Immunkomplexe, entfernt werden (Brecher 2002). Plasmapheresezyklen führen bei bis zu 70 % der steroidrefraktären MS-Schübe zu einer klinischen Besserung (Ehler *et al.* 2015).

1.4.2 Sekundärprophylaktische MS-Therapie

Bei milden/moderaten Verlaufsformen der RRMS erfolgt die Therapie überwiegend mit Interferon (IFN)- β -Präparaten und Glatirameracetat (GLAT). Diese Medikamente scheinen, obwohl in Applikationsart, Zusammensetzung, Applikationsfrequenz und Wirkweise unterschiedlich, ähnlich effizient und sicher zu wirken (Mikol *et al.* 2008, O'Connor *et al.* 2009, Castro-Borrero *et al.* 2012). Während der letzten Jahre sind zwei weitere oral applizierbare Medikamente, Dimethylfumarat (Fox *et al.* 2012, Haghikia *et al.* 2014) und Teriflunomid (Warnke *et al.* 2013, Confavreux *et al.* 2014), sowie subkutan zu applizierendes, pegyliertes IFN- β -1a (Calabresi *et al.* 2014) und Glatirameracetat mit verändertem Applikationsregime (Khan *et al.* 2013) zur Therapie der RRMS zugelassen worden. Azathioprin gilt als Reservepräparat bei Patienten, bei denen eine IFN- β -Therapie nicht möglich ist, oder bei Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf unter Azathioprin (DGN & KKNMS 2015).

Bei (hoch-)aktiven Verlaufsformen wird die Monotherapie bei RRMS mit Natalizumab, Fingolimod oder Mitoxantron empfohlen (Abb. 3). Dies sind Immunsuppressiva mit unterschiedlichen molekularen Wirkansätzen (Castro-Borrero *et al.* 2012). Ein Wechsel zwischen ihnen wird nur innerhalb festgelegter Zeitintervalle empfohlen (DGN & KKNMS 2015). Fingolimod und Natalizumab führen zwar zu einer stärkeren Abnahme der Krankheitsaktivität, bergen aber die Gefahr schwerwiegender, mitunter tödlicher Nebenwirkungen (Castro-Borrero *et al.* 2012). Seit letztem Jahr

ist außerdem der monoklonale Antikörper Alemtuzumab (Fernández 2014) zur Therapie bei RRMS mit (hoch-)aktiver Krankheitsaktivität zugelassen (Abb. 3).

Zur Therapie der SPMS sind Mitoxantron und, insofern aufgesetzte Schübe auftreten, die beiden subkutan zu applizierenden IFN- β -Präparate zugelassen (European Study Group on IFNB-1b in SPMS 1998, Kappos *et al.* 2001, Kappos *et al.* 2004, DGN & KKNMS 2015). Bei aggressivem Krankheitsverlauf bei SPMS kann als individueller Heilversuch eine intravenöse Methylprednisolon-Intervalltherapie als Mono- bzw. als Kombinationstherapie mit Mitoxantron erfolgen (DGN & KKNMS 2015).

Einen Überblick über die derzeitigen Therapieempfehlungen der DGN und des KKNMS für verschiedene MS-Verlaufsformen gibt Abb. 3.

Indikation		KIS	RRMS		SPMS
Verlaufsmodifizierende Therapien	(Hoch-) aktive Verlaufsform		<u>1. Wahl</u> Alemtuzumab i.v. Fingolimod p.o. Natalizumab i.v.	<u>2. Wahl</u> Mitoxantron i.v.	<u>ohne aufgesetzte Schübe:</u> Mitoxantron i.v. <u>mit aufgesetzten Schüben:</u> IFN-β-1a s.c. IFN-β-1b s.c. Mitoxantron i.v.
	Milde / moderate Verlaufsform	GLAT s.c. IFN-β-1a i.m. IFN-β-1a s.c. IFN-β-1b s.c.	Dimethylfumarat p.o. GLAT s.c. IFN-β-1a i.m. IFN-β-1a s.c. IFN-β-1b s.c. Teriflunomid p.o. pegyliertes IFN-β-1a s.c. (Azathioprin p.o.)		
Schub-therapie	2. Wahl: Plasmapherese				
	1. Wahl: Methylprednisolonstoß				

Abb. 3: Aktuelle MS-Therapieempfehlungen, mod. nach den Leitlinien der DGN und des KKNMS (DGN & KKNMS 2015).

Die Applikation der einzelnen MS-Therapeutika erfolgt in folgender Dosierung und Applikationsfrequenz: Alemtuzumab im ersten Behandlungsjahr an fünf aufeinander folgenden Tagen je 12 mg, nach 12 Monaten an drei aufeinander folgenden Tagen je 12 mg, Azathioprin täglich 2-3 mg/kg Körpergewicht, Dimethylfumarat 240 mg zwei Mal täglich, Fingolimod täglich 0,5 mg, Glatirameracetat (GLAT) täglich 20 mg bzw. drei Mal wöchentlich je 40 mg, intramuskuläres (i.m.) Interferon- β -1a (IFN- β -1a) wöchentlich 30 μ g, Mitoxantron alle drei Monate bis 12 mg/m² Körperoberfläche, Natalizumab monatlich 300 mg, subkutan (s.c.) IFN- β -1a jeden zweiten Tag 22 oder 44 μ g, pegyliertes IFN- β -1a alle zwei Wochen 125 μ g, subkutanes Interferon- β -1b (IFN- β -1b) alle zwei Tage 250 μ g und Teriflunomid täglich 14 mg. i.v. = intravenös, p.o. = per os.

Bisher zeigte keine der zugelassenen MS-Therapeutika oder eine andere Substanz in klinischen Studien eine ausreichende Wirksamkeit bei PPMS-Patienten, sodass für diese Verlaufsform keine medikamentösen, sekundärprophylaktischen Therapien zugelassen sind (DGN & KKNMS 2015). Off-label werden im klinischen Alltag bei PPMS-Patienten am häufigsten zyklische, hochdosierte

Steroidstöße angewandt. Eine Limitierung stellt hierbei vor allem die im Verlauf auftretende Osteoporose dar.

1.4.3 Interferon-beta

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkohorte wurde sekundärprophylaktisch auf subkutanen IFN- β -1b (250 μ g alle zwei Tage) eingestellt. Daher wird im Folgenden zunächst allgemein auf IFN- β und detaillierter auf IFN- β -1b eingegangen.

IFN- β sind physiologisch im Körper vorkommende Proteine, die als Reaktion auf virale Infektionen produziert und sezerniert werden. Bindet IFN- β an spezifische, heterodimere Oberflächenrezeptoren von unterschiedlichen Zellen, so erfolgt, über die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression mehrerer hundert Gene regulieren (Ivashkiv & Donlin 2014). Durch die Beeinflussung der Genregulationen entfaltet IFN- β antivirale, immunmodulatorische und anti-apoptotische Effekte, wobei die exakte molekularbiologische Wirkweise von IFN- β bisher nicht geklärt ist (Kieseier 2011, Dingermann & Zündorf 2013). Physiologisch im Körper vorkommendes IFN- β führt zu einer vermehrten Produktion antiinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin (IL)-10 und TNF- β , einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-17 und IFN- γ , einer Hemmung der Migration aktivierter Immunzellen durch die Blut-Hirnschranke, einer verminderten T-Lymphozytenproliferation und einer verminderten Expression von MHC-Klasse II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (Hartung *et al.* 2013).

Es sind vier rekombinante IFN- β -Präparate zur Behandlung der RRMS zugelassen: zwei rekombinante Interferon- β -1a (IFN- β -1a)-Präparate, ein rekombinantes Interferon- β -1b (IFN- β -1b)-Präparat und seit kurzem ein pegyliertes IFN- β -1a-Präparat. Die beiden subkutan zu applizierenden IFN- β -Präparate sind außerdem zur Therapie der SPMS mit aufgesetzten Schüben zugelassen. Darüber hinaus sind die drei seit Jahren zugelassenen IFN- β -Präparate zur Therapie des KIS zugelassen (Abb. 3). In den Schlüsselstudien zeigten die vier zugelassenen IFN- β -Präparate jeweils eine Reduktion der Schubhäufigkeit sowie eine verminderte Zunahme der Anzahl MS-typischer MRT-Läsionen (IFNB MS Study Group 1993, IFNB MS Study Group & the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group 1995, Jacobs *et al.* 1996, European Study Group on IFNB-1b in SPMS 1998, PRISMS 1998, Simon *et al.* 1998, Li & Paty 1999, PRISMS-4 2001, Calabresi *et al.* 2014). Die zugelassenen IFN- β -Präparate werden gentechnisch durch das Einbringen von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen in eukaryote (die drei IFN- β -1a-Präparate) bzw. prokaryote (das IFN- β -1b-Präparat) Zelllinien rekombinant hergestellt. Ähnlich dem humanen IFN- β sind die beiden IFN- β -1a-Präparate glykosyliert und weisen eine identische Aminosäuresequenz auf. Aufgrund einer zum humanen IFN- β abweichenden Glykosylierung sind sie nicht humanidentisch (Goodin 2005). Das IFN- β -1b-Präparat ist nicht glykosyliert und weist eine abweichende und um eine Aminosäure verkürzte Aminosäuresequenz sowie ein niedrigeres Molekulargewicht auf. Diese Abweichungen sind dafür

verantwortlich, dass das IFN- β -1b-Präparat relativ starke Bindungen mit Serumalbumin eingeht, wodurch die Bioaktivität gegenüber der IFN- β -1a-Präparate um ca. 90 % reduziert ist (Goodin 2005). Dementsprechend wird das IFN- β -1b-Präparat höher dosiert (Abb. 3).

Rekombinantes IFN- β ist potentiell immunogen und kann zur Bildung gegen IFN- β -gerichtete Antikörper führen. Diese können mitunter Medikament-neutralisierend wirken und den Therapieeffekt mindern (Polman *et al.* 2010). Das Nebenwirkungsspektrum der drei seit Jahren zugelassenen IFN- β -Präparate ist vergleichbar (DGN & KKNMS 2015). Das Nebenwirkungsspektrum des pegylierten IFN- β -Präparats scheint ebenfalls vergleichbar zu sein (Calabresi *et al.* 2014). Einzelheiten zu Nebenwirkungen der IFN- β -1b-Therapie sind in Kap. 3.3.4 aufgeführt.

Subkutan zu applizierendes IFN- β -1b (250 μ g) erhielt als erstes Medikament in Deutschland die Zulassung zur Therapie der RRMS und SPMS. In der RRMS-Schlüsselstudie zeigte sich zwei Jahre nach Studienbeginn eine signifikant geringere Schubrate für die mit IFN- β -1b behandelten Patienten gegenüber Placebo. In der IFN- β -1b-Gruppe bestand eine jährliche Schubrate von 0,84 (vs. 1,27 in der Placebogruppe) und es blieben 29 % der Patienten schubfrei (vs. 14,5 % in der Placebogruppe). In der 250 μ g-Dosisgruppe bestand im Vergleich zur Placebogruppe eine um 50 % signifikant reduzierte Häufigkeit schwerer und mittelschwerer Schübe (IFNB MS Study Group 1993). Außerdem zeigte sich in der 250 μ g-Dosisgruppe gegenüber der Placebogruppe eine Reduktion der MRT-Läsionslast (23 %) und von Gadolinium-anreichernden MS-Läsionen (80 %) (UBC MS/MRI Study Group an the IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993). Es wird eine möglichst frühzeitige sekundärprophylaktische Einstellung auf IFN- β -1b (250 μ g) empfohlen (Kappos *et al.* 2006, Kappos *et al.* 2009). So bedeutet die Einstellung auf IFN- β -1b bei KIS-Patienten ein um 46 % vermindertes Risiko gegenüber Placebo, eine gesicherte MS nach den McDonald-Diagnosekriterien von 2001 innerhalb der ersten zwei Therapiejahre zu entwickeln. Des Weiteren wurde bei mit IFN- β -1b behandelten KIS-Patienten gegenüber Placebo eine signifikant geringere, kumulative Anzahl neuer, aktiver MS-Läsionen ($p < 0,0001$) und eine signifikant stärkere Abnahme des T2-Läsionsvolumens ($p < 0,05$) gesehen (Kappos *et al.* 2006). In der SPMS-Schlüsselstudie war der Anteil der Patienten mit einer EDSS-Progression von 2,0 nach drei Therapiejahren bei den mit IFN- β -1b behandelten Patienten gegenüber Placebo um 27 % geringer (Kappos *et al.* 2001). Die Anzahl erneuter Krankheitsschübe war bei den mit IFN- β -1b therapierten Patienten um 31 % geringer (European Study Group on IFNB-1b in SPMS 1998). 21-Jahres-Langzeitbeobachtungsdaten von Patienten, die an der RRMS-Schlüsselstudie teilnahmen, zeigten eine signifikante Reduktion der Mortalität bei den ursprünglich mit IFN- β -1b behandelten Patienten gegenüber Placebo. Die erhöhte Mortalität der ursprünglichen Placebogruppe wird im Wesentlichen auf durch MS-bedingte Todesursachen, wie Pneumonie bei zunehmender Immobilisation, zurückgeführt (Goodin *et al.* 2012).

1.5 Biomarker

Biomarker sind objektiv messbare Merkmale von physiologischen oder pathologischen biologischen Prozessen, die unter anderem Rückschlüsse über das individuelle Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie erlauben (Biomarkers Definitions Working Group 2001, Fernández 2013). Solche Merkmale können auf molekularer Ebene oder paraklinisch messbar sein (Katsavos & Anagnostouli 2013). Des Weiteren können sie klinische oder epidemiologische Informationen darstellen (Fernández 2013). Biomarker bei MS werden benötigt, um die Diagnose zu sichern, die Prognose des zu erwartenden Krankheitsverlaufs bzw. das Risiko zu erkranken abzuschätzen, die Krankheitsaktivität einzuschätzen und Entscheidungshilfen bei der Therapiewahl und der Therapieüberwachung zu bieten (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Um im klinischen Alltag breite Anwendung zu finden, sollten Biomarker hochsensitiv und hochspezifisch sein, ökonomisch vertretbar sein und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Darüber hinaus sollte die Bestimmung für die Patienten wenig belastend sein (Fitzner *et al.* 2015).

Molekulare Biomarker lassen sich in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Liquor cerebrospinalis, Blut, Tränen, Urin und Speichel, bestimmen (Katsavos & Anagnostouli 2013). Ein Großteil der Studien zu molekularen Biomarkern bei MS fokussiert sich auf Transkripte in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) (Goertsches *et al.* 2011). PBMC stellen eine Anreicherung der Lymphozyten und Monozyten im peripheren Blut dar und werden per Dichtegradientenzentrifugation aus venösem Vollblut gewonnen. Der Vorzug der Untersuchung von PBMC gegenüber Liquor cerebrospinalis ist vor allem die wenig invasive Probenentnahme (Katsavos & Anagnostouli 2013). Allerdings werden eventuell nicht alle inflammatorischen ZNS-Prozesse sensitiv in PBMC widerspiegelt. Zum einen besteht bei intakter Blut-Hirn-Schranke nur ein eingeschränkter Kontakt zwischen inflammatorischen Vorgängen des ZNS und peripheren Körperflüssigkeiten. Zum anderen werden molekulare Biomarker in peripheren Körperflüssigkeiten stärker durch MS-unabhängige Faktoren, wie systemische Infektionen oder biologischen Abbau durch Leber und Niere, beeinflusst. Das Probenmaterial kann auf Genom- (DNA), Transkript- (Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA)), Protein- und Metabolitebene analysiert werden, wobei sich die einzelnen Ebenen gegenseitig beeinflussen (Zettl & Goertsches 2009).

Diagnostische molekulare Biomarker stellen zum Teil krankheitsspezifische Marker dar. Ein Beispiel hierfür ist der Nachweis von Aquaporin-4-Antikörpern bei der Neuromyelitis Optica, welcher die Abgrenzung zur MS unterstützt (Lennon *et al.* 2004). Beispiele für diagnostische Biomarker sind ferner der Nachweis von OKB oder eine positive MRZ-Reaktion (Kap. 1.3.4). Prognostische Biomarker ermöglichen idealerweise eine Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufs. Darüber hinaus sollen sie bei betroffenen Patienten die individuell zu erwartenden medikamentösen Effekte einer Therapie vorhersehen und somit Entscheidungshilfen bei der Therapiewahl stellen. Bisher wurde eine Vielzahl prognostischer molekularer Biomarker vorgeschlagen, wobei nur wenige in

unabhängigen Studien bestätigt werden konnten (Hecker *et al.* 2011, Comabella & Montalban 2014). Ein viel diskutierter molekularer Biomarker ist die prätherapeutische Genexpression von MX1 (*myxovirus resistance protein 1*, MX1) bei mit IFN- β Patienten. Es wurde hierbei eine signifikante Korrelation hoher MX1-mRNA-Expressionsspiegel im Blut mit der Zeitdauer bis zum Auftreten eines neuen MS-Schubes postuliert (van der Voort *et al.* 2010). Eine solche Assoziation wurde durch eine die Daten der vorliegenden Arbeit berücksichtigende Publikation der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock nicht bestätigt (Hundeshagen *et al.* 2012). Des Weiteren wurden erhöhte Serumspiegel von IL17F-Protein mit einem schlechten Ansprechen auf eine IFN- β -Therapie in Verbindung gebracht (Axtell *et al.* 2010). Dies konnte durch eine unabhängige Studie mit IFN- β -1a i.m. therapierten Patienten nicht bestätigt werden (Bushnell *et al.* 2012). Beispiele klinisch angewandter molekularer Biomarker, mit Relevanz auf die weitere Behandlung, sind die Bestimmung von Medikament-neutralisierenden Antikörpern (NAK) bei mit IFN- β (Polman *et al.* 2010) oder Natalizumab (Vennegoor *et al.* 2013) behandelten Patienten sowie der Nachweis von Anti-JC-Virus-Antikörpern bei mit Natalizumab behandelten Patienten (Sørensen *et al.* 2012). Im klinischen Alltag dienen vor allem klinische (Krankheitsprogression, Schubhäufigkeit; Kap. 1.2) und paraklinische Biomarker, wie die T2-Läsionslast im MRT, als Entscheidungshilfen bei der Therapiewahl bzw. zur Einschätzung der Krankheitsaktivität. Es existieren bisher keine validen prognostischen Biomarker. Bereits heute existieren mehrere verschiedene sekundärprophylaktische MS-Therapeutika, die für verschiedene MS-Verlaufsformen zugelassen sind (Kap. 1.4.2). In naher Zukunft werden es noch mehr sein. Insbesondere vor diesem Hintergrund ist die Detektion molekularer Biomarker zur Unterstützung von Therapieentscheidungen von Bedeutung.

Um Rückschlüsse auf dynamische Prozesse, wie molekulare Reaktionen auf eine applizierte medikamentöse Therapie, zu ermöglichen, ist die Untersuchung der Transkript-, Protein- und Metabolitebene von Bedeutung. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Transkriptebene zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten anhand sogenannter Oligonukleotid-Microarrays in PBMC von 25 mit subkutanem IFN- β -1b behandelten MS-Patienten analysiert (Kap. 3.4). Genexpressionsuntersuchungen können auch anhand anderer Untersuchungsverfahren, wie der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, rt-PCR) (Nolan *et al.* 2006) oder dem *Next-Generation-Sequencing* (van Dijk *et al.* 2014), erfolgen.

1.6 Messung der Genexpression mit Microarrays

Mittels Oligonukleotid-Microarrays lässt sich in einem einzelnen Experiment gleichzeitig die mRNA-Expression Tausender Gene untersuchen (Heller 2002). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, genomweite, individuelle, longitudinale Genexpressionsmuster zu erfassen und auf mögliche therapierelevante Biomarker zu analysieren (Zettl & Goertsches 2009). In dieser Doktorarbeit wurden zur Genexpressionsanalyse Microarrays der Firma Affymetrix (*GeneChip* HG-U133A und HG-U133B) verwendet (Kap. 3.4.2). Auf diesen Microarrays befinden sich an definierten Positionen für

ca. 20.000 Gentranskripte spezifische Sonden (*Probes*). Als Sonde (*Probe*) wird ein für ein Gentranskript multiple vorliegendes spezifisches Oligonukleotid mit einer Länge von 25 Basen bezeichnet. Elf Sondenpaare, bestehend aus elf perfekt und elf nicht-perfekt passenden Sonden für das jeweilige Gentranskript, werden als *Probeset* bezeichnet. Die elf nicht-perfekt passenden Sonden eines *Probesets* fungieren als Negativkontrolle und sollen unspezifische Bindungen aufzeigen (German Cancer Research Center 2012). Werden Biotin-markierte cRNA-Fragmente (*complementary RNA*, cRNA) des gewonnenen Probenmaterials auf einen Microarray aufgebracht, so hybridisieren diese komplementär mit den auf dem Microarray befindlichen Oligonukleotidsonden. Anschließend werden fluoreszierende, an Biotin haftende Moleküle aufgetragen und mit Hilfe von Lasergeräten die Fluoreszenzintensitäten aller Sonden quantifiziert (Abb. 4, Kap. 3.4.2). Die Fluoreszenzintensitäten ermöglichen Aussagen über die jeweilige Menge der im Probenmaterial enthaltenen verschiedenen Ribonukleinsäure-Moleküle (*ribonucleic acid*, RNA). Zeitpunktvergleiche von Genexpressionsmessungen eines Individuums ermöglichen Aussagen über die Hoch- oder Herunterregulation von Genen im zeitlichen Verlauf. Die molekularbiologische Relevanz differentiell exprimierter Gene (DEG) kann durch Gennetzwerkanalysen (Kap. 3.4.7) und Funktionsanalysen (Kap. 3.4.6) näher beleuchtet werden. In Abb. 4 ist in vereinfachter Weise die Funktionsweise der in dieser Arbeit verwendeten Microarrays dargestellt.

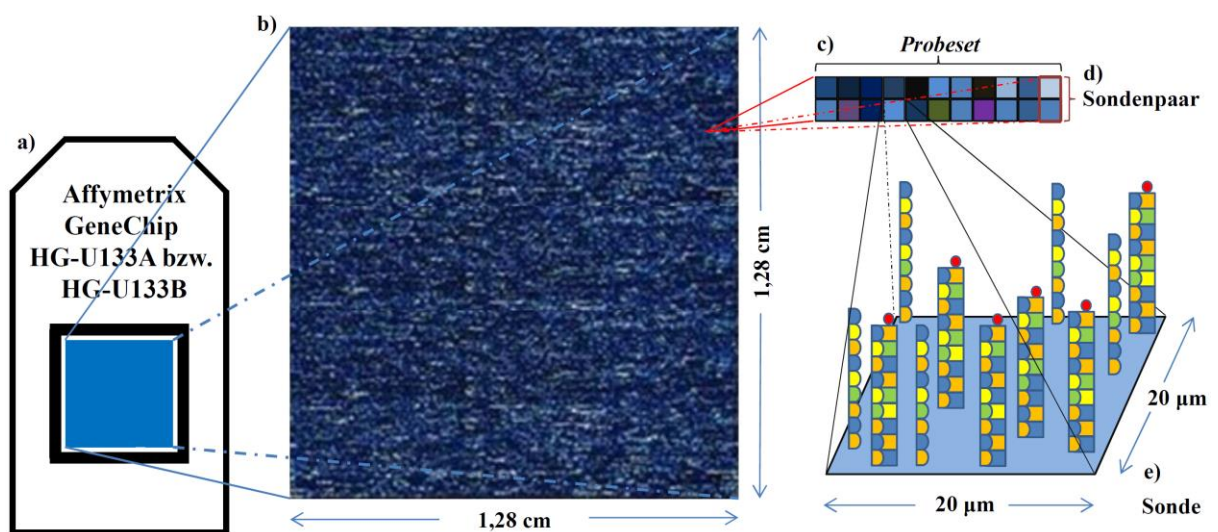


Abb. 4: Funktionsweise der verwendeten Microarrays.

Darstellung eines Affymetrix *GeneChips* (a), unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten eines per Laser gescannten *GeneChips* (b), eines *Probesets* (c), Sondenpaars (d) und einer einzelnen Sondenzone (e). Auf der Sondenzone sind die multiple vorliegenden, für ein Gentranskript spezifischen Oligonukleotidketten (25 Basen) vereinfacht und verkürzt dargestellt. Zum Teil sind komplementär Biotin-markierte (rote Punkte) cRNA-Fragmente an den spezifischen Oligonukleotidketten hybridisiert.

2 Fragestellungen

Es existiert für die MS kein spezifisches Krankheitssymptom. MS gilt als eine Erkrankung mit 1000 Gesichtern. Der Krankheitsverlauf kann klinisch anhand der Schubhäufigkeit und der Krankheitsprogression, gemessen durch den EDSS, und paraklinisch anhand evozierter Potentiale und der MRT beschrieben werden. Valide prognostische Biomarker zur Einschätzung des zu erwartenden therapeutischen Ansprechens bzw. der zu erwartenden Krankheitsaktivität existieren bisher nicht. Die Interferon (IFN)- β -Präparate gelten als Standardtherapeutika bei RRMS. Dennoch besteht bei etwa einem Drittel der mit IFN- β -Therapierten Patienten ein nur unzureichender Therapieerfolg. Vor dem Hintergrund der stetig zunehmenden Anzahl therapeutischer Alternativen sind prognostische Biomarker erforderlicher denn je, um die individuell effektivste Therapiewahl treffen zu können. Die Therapieadhärenz ist durch mitunter sehr belastende Nebenwirkungen der IFN- β -Präparate maßgeblich beeinflusst. Obwohl IFN- β bereits seit über 20 Jahren zur Behandlung der RRMS angewandt werden, sind die molekularen Effekte bisher nur unvollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das langfristige individuelle klinische und paraklinische therapeutische Ansprechen auf zweitägig zu applizierendes, subkutanen IFN- β -1b (250 μ g) von 25 MS-Patienten evaluiert. Darüber hinaus wurde eine Genexpressionsanalyse von PBMC der Patienten durchgeführt, um die molekularen Wirkmechanismen von IFN- β -1b besser zu verstehen. Aus dem klinischen Alltag heraus stellt sich die wissenschaftliche Herausforderung, ein Profil an Biomarkern zu evaluieren, die eine Aussage über das therapeutische Ansprechen auf eine IFN- β -Therapie zulassen.

Folgende Fragen wurden in der vorliegenden Doktorarbeit im Detail untersucht:

Charakterisierung des klinischen und paraklinischen Verlaufs des Patientenkollektivs

- Welchen klinischen und paraklinischen Verlauf zeigen die 25 mit IFN- β -1b behandelten Patienten, gemessen an der Schubaktivität und der EDSS-Progression bzw. den evozierten Potentialen und der zerebralen MRT (*cerebral magnetic resonance tomography*, cMRT)?
- Besteht eine Korrelation zwischen einer erhöhten Schubaktivität und einer EDSS-Progression?
- Besteht eine Korrelation der cMRT-Veränderungen bzw. von Veränderungen der evozierten Potentiale (MEP, SEP, VEP) mit dem klinischen Verlauf?
- Zu welchen Nebenwirkungen ist es unter IFN- β -1b-Therapie gekommen? Gibt es quantitative und qualitative Unterschiede der auftretenden Nebenwirkungen zu Therapiebeginn (während des ersten Therapiehalbjahrs) gegenüber einer mehrere Jahre andauernden Therapie?
- Welche Auswirkung haben Nebenwirkungen auf die Therapieadhärenz?
- Aus welchem Anlass wurde bei *Dropout*-Patienten die IFN- β -1b-Therapie beendet?

Differentielle Genexpressionsanalyse im Blut der Patienten unter subkutaner IFN- β -1b-Therapie

- Welche Gene werden unter IFN- β -1b differentiell exprimiert?
- Existieren Unterschiede in der differentiellen Genexpression in der Frühphase der Therapie und im längerfristigen Therapieverlauf?
- Existieren Gene, die zu allen Zeitpunktvergleichen durchgehend differentiell exprimiert sind?
- Welche regulatorischen Wechselwirkungen bestehen zwischen den differentiell exprimierten Genen (DEG)?
- Gelingt es durch Funktionsanalysen von unter IFN- β -1b-Therapie hochregulierten Genen eine Aussage über veränderte biologische Prozesse zu treffen?

Assoziation spezifischer Genexpressionsprofile mit dem klinischen Verlauf

- Gibt es bereits zum Zeitpunkt der Therapieinitiierung (TPI) Unterschiede in der Genexpression zwischen Patienten mit einem guten und einem schlechten Krankheitsverlauf, gemessen an der Schubaktivität während der ersten zwei Therapiejahre?
- Ermöglichen diese DEG eine Vorhersage über das individuelle langfristige Therapieansprechen auf IFN- β -1b?
- Sind in der Literatur bereits Assoziationen dieser DEG mit einem schlechten Krankheitsverlauf vorbeschrieben?

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurde über einen Zeitraum von sechs Jahren der klinische (Schubaktivität, Krankheitsprogression) und paraklinische (cMRT, MEP, SEP, VEP) Krankheitsverlauf sowie die Verträglichkeit der IFN- β -1b-Therapie bei 25 MS-Patienten evaluiert. Alle Patienten wurden zu Beginn der Studie auf IFN- β -1b eingestellt. Während der ersten zwei Therapiejahre erfolgten zu fünf definierten Untersuchungszeitpunkten molekulare Analysen mit Blutproben aller Patienten. Hierbei wurde die mRNA aus PBMC extrahiert und per Oligonukleotid-Microarrays auf signifikante Genexpressionsänderungen, als Reaktion auf die applizierte Therapie, analysiert. Um ein besseres Verständnis über die pharmakologische Wirkweise von IFN- β -1b zu erlangen, wurden die DEG in Geninteraktionsnetzwerke integriert und die biologischen Funktionen der unter IFN- β -1b hochregulierten DEG analysiert. Um Biomarker-Kandidaten für den klinischen Krankheitsverlauf zu identifizieren, erfolgte eine Assoziationsanalyse der zu TPI gemessenen Genexpressionsprofile mit den klinischen Krankheitsverläufen nach zwei Therapiejahren. In Abb. 5 ist das Studiendesign schematisch dargestellt.

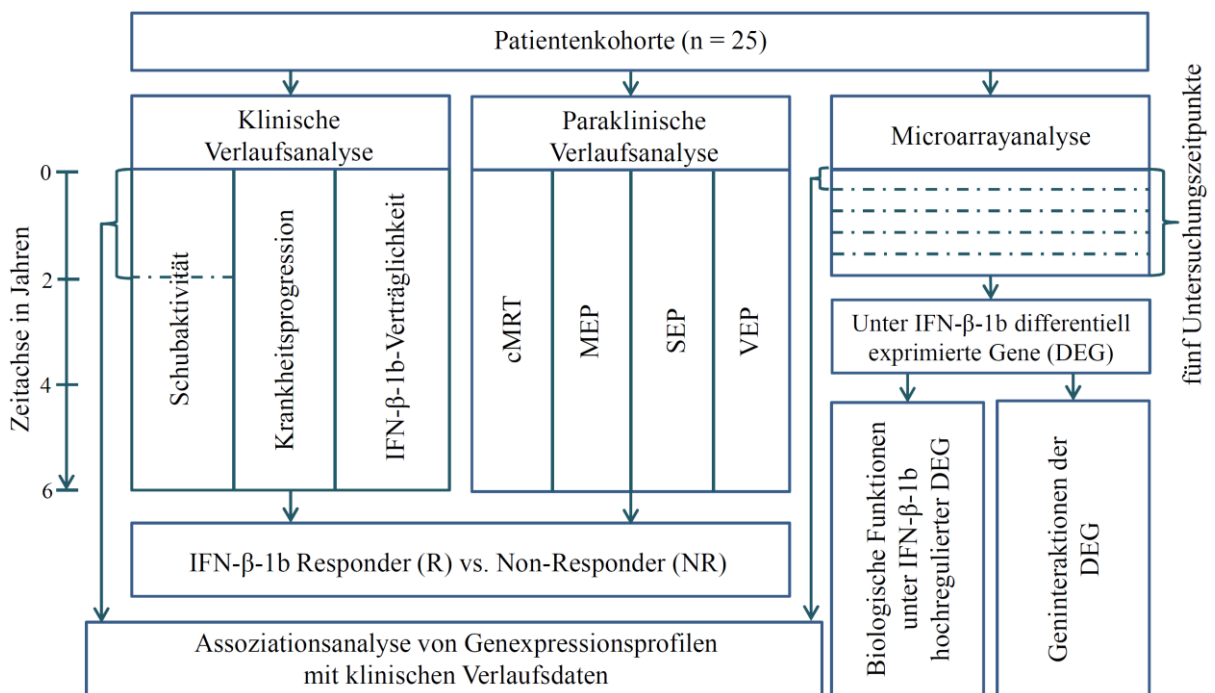


Abb. 5: Studiendesign der vorliegenden Arbeit.

Schematisch abgebildet ist das Studiendesign der vorliegenden Arbeit. Über sechs Jahre wurde der klinische und paraklinische Verlauf analysiert. Die Microarrayanalyse erfolgte während der ersten zwei Therapiejahre zu fünf definierten Zeitpunkten. IFN- β -1b = Interferon- β -1b.

3.2 Patientenkohorte

Der Rekrutierungszeitraum der Patientenkohorte lag in den Jahren 2001 bis 2004. Die Kohorte setzt sich aus 25 Patienten beiderlei Geschlechts (16 Frauen, 9 Männer) zusammen. Alle Patienten hatten nach den McDonald-Kriterien von 2001 (McDonald *et al.* 2001) (Suppl.-Tab. 3) eine klinisch gesicherte MS. Mit Ausnahme eines Patienten (Patient (Pat) 02) lag die letzte immunmodulatorische Schubtherapie mit intravenösem, hochdosiertem Methylprednisolon mindestens 30 Tage zurück. Es erfolgte eine sekundärprophylaktische Einstellung auf subkutanen IFN- β -1b, das jeden zweiten Tag appliziert wurde.

Von den 25 Patienten wurden zwei Patienten bereits im Vorfeld sekundärprophylaktisch therapiert. Eine Patientin (Pat 13) wurde vorab über acht Jahre sekundärprophylaktisch mit Azathioprin behandelt. Die zweite vorbehandelte Patientin (Pat 07) wurde über zwei Jahre bis zu einer Schwangerschaft mit IFN- β -1b therapiert und fand nach einer Therapiepause, aufgrund der Schwangerschaft und Stillzeit, Einschluss in diese Studie.

Das mittlere Alter der Patienten lag bei Studieneintritt bei 39,6 Jahren. Erstsymptome traten im Durchschnitt 8,9 Jahre vor Therapiebeginn mit IFN- β -1b auf. Die Diagnose MS wurde im Durchschnitt 8,3 Monate vor Therapiebeginn gesichert. Bei zwei Patienten lag zu Therapiebeginn eine SPMS vor, die restlichen 23 Patienten wiesen eine RRMS auf. In Tab. 3 sind die Eckdaten der Patientenkohorte zusammengefasst. Detailliertere Angaben sind im Anhang aufgeführt (Suppl.-Tab 4).

Tab. 3: Klinische und demographische Angaben über die Patienten.

Variable	Wert
Anzahl der Patienten	25
Geschlechterverhältnis (♀:♂)	16:9
Verlaufsform (RRMS:SPMS)	23:2
Basisimmunmodulatorisch unbehandelte : vorbehandelte Patienten	23:2
Alter bei TPI in Jahren (MW $\pm$ SD; SW)	39,6 $\pm$ 10,7; 18,3 - 63,2
Alter bei Diagnose in Jahren (MW $\pm$ SD; SW)	38,9 $\pm$ 10,6; 18,3 - 62,7
Mittlerer EDSS-Wert bei TPI (MW $\pm$ SD; SW)	2,2 $\pm$ 1,1; 1,0 - 4,0
Schubrate im letzten Jahr vor TPI (MW $\pm$ SD; SW)	1,1 $\pm$ 0,7; 0 - 2
Schubrate während des vorletzten Jahres vor TPI (MW $\pm$ SD; SW)	0,6 $\pm$ 0,7; 0 - 2
Zeitraum zwischen ersten Symptomen & Diagnose in Jahren (MW $\pm$ SD; SW)	8,3 $\pm$ 7,6; 0 - 30
Zeitraum zwischen ersten Symptomen & TPI in Jahren (MW $\pm$ SD; SW)	8,9 $\pm$ 7,8; 0 - 30
Zeitraum zwischen Diagnose & TPI in Monaten (MW $\pm$ SD; SW)	8,3 $\pm$ 19,4; 0 - 96

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SW = Spannweite, TPI = Therapieinitiierung.

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommissionen der Universität Rostock und der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern (Reg. Nr. II HV 27/2003) bewilligt und übereinstimmend mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Einverständnis der teilnehmenden Patienten zur Blutentnahme, Datenerhebung und Datenanalyse wurde im Vorfeld schriftlich eingeholt. Die

gewonnenen Daten wurden anonymisiert weiterverarbeitet. Die Studie ist keine klinische Studie des Medikamentenherstellers, wurde aber durch diesen gefördert.

3.3 Klinische und paraklinische Auswertung

Klinisch-neurologisch wurden in halbjährlich bis jährlichen Intervallen die Schubaktivität, der neurologische Behinderungsgrad anhand des EDSS und das Auftreten möglicher Nebenwirkungen unter IFN- β -1b dokumentiert. Traten klinische Schübe auf, erfolgten außerplanmäßige neurologische Untersuchungen. Der Krankheitsverlauf wurde paraklinisch bei klinischer Indikation mit Hilfe von evozierten Potentialen (MEP, SEP, VEP) und cMRTs dokumentiert. Die klinische Nachbeobachtung und paraklinische Diagnostik erfolgte überwiegend in Räumlichkeiten der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock. Berücksichtigt wurden allerdings auch klinische und paraklinische Untersuchungen anderer neurologischer Kliniken oder niedergelassener neurologischer Kollegen.

3.3.1 Evaluation des klinisch-neurologischen Krankheitsverlaufs

In der vorliegenden Arbeit wurde der Krankheitsverlauf der beobachteten Patientenkohorte anhand des EDSS-Verlaufs (Boxplots und tabellarische Darstellung), der jährlichen Schubrate sowie graphisch durch die Anzahl von Schüben pro Beobachtungszeitraum beschrieben. Des Weiteren wurde anhand von zweiseitigen 2-Stichproben t-Tests überprüft, ob bezüglich des EDSS-Verlaufs und der jährlichen Schubrate ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Patientengruppierungen der über sechs Jahre durchgehend behandelten Patienten und jenen Patienten, die die Therapie beendeten, bestand. Darüber hinaus wurde der individuelle Krankheitsverlauf jedes Patienten nach definierten klinischen Bewertungskriterien beschrieben (Tab. 4). Diese Kriterien berücksichtigten die Krankheitsprogression anhand der gemessenen EDSS-Werte (Responseklassifikation EDSS), die Schubhäufigkeit (Responseklassifikation Schub) sowie eine Kombination beider Einteilungen (klinische Gesamteinschätzung). Die klinische Evaluation nach diesen drei Kriterien erfolgte über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum von sechs Jahren, ungeachtet einer eventuellen Umstellung der Sekundärprophylaxe.

Die Patienten wurden unter Berücksichtigung des Krankheitsverlaufes, gemessen an dem EDSS im Vergleich zum Ausgangs-EDSS bei Therapieinitiierung (TPI), in drei Gruppen eingeteilt: gleichbleibender EDSS, verschlechterter EDSS, verbesserter EDSS (Tab. 4). Als Patienten mit verschlechtertem bzw. verbessertem EDSS wurden jene definiert, bei denen eine EDSS-Veränderung von ≥ 1 Punkt über ein halbes Jahr gegenüber dem Ausgangs-EDSS bestand. Die EDSS-Veränderung sollte mindestens ein halbes Jahr bestehen, damit Patienten mit einer passageren EDSS-Verschlechterung, beispielsweise während eines Krankheitsschubes, nicht in die Gruppe mit verschlechtertem EDSS eingestuft wurden. Patienten mit EDSS-Schwankungen ≤ 1 Punkt im Vergleich zum Ausgangs-EDSS wurden als Patienten mit gleichbleibendem EDSS definiert.

Weiter wurden die Patienten anhand des Auftretens von Schüben folgenden zwei Gruppen zugeteilt (Tab. 4): Responder und Non-Responder. Schübe während der ersten sechs Behandlungsmonate wurden in der Analyse nicht berücksichtigt, da dieser Zeitraum als zu kurz für die Einschätzung einer effektiven sekundärprophylaktischen Therapie angesehen wird (Waubant *et al.* 2003). Das erste Jahr nach TPI wurde in zwei Nachbeobachtungshalbjahre unterteilt. Als Responder nach der Responseklassifikation Schub wurden jene Patienten ohne Schubereignis definiert. Als Non-Responder nach der Responseklassifikation wurden jene Patienten mit mindestens einem Schubereignis nach TPI definiert. Die Wertung von MS-Schüben erfolgte nach der Schubdefinition von Schumacker *et al.* (Schumacker *et al.* 1965), die in den McDonald-Diagnosekriterien beibehalten wurde (McDonald *et al.* 2001, Polman *et al.* 2005, Polman *et al.* 2011).

Die klinische Gesamteinschätzung ist eine Kombination der Responseklassifikation EDSS und Schub (Tab. 4). Als Responder in der klinischen Gesamteinschätzung gelten jene Patienten mit einem stabilen EDSS und keinem Schubereignis (R nach der Responseklassifikation EDSS und Schub). Als Non-Responder in der klinischen Gesamteinschätzung gelten Non-Responder in der Responseklassifikation EDSS und/oder Responseklassifikation Schub. Eine Verbesserung der klinischen Gesamteinschätzung entsteht durch eine Verbesserung des EDSS bei gleichzeitiger Schubfreiheit (Responder nach Schub).

Tab. 4: Definition der klinischen Bewertungsscores.

Responseklassifikation EDSS	Responseklassifikation Schub	Klinische Gesamteinschätzung
1 = gleichbleibender EDSS-Wert; Responder	1 = kein Schubereignis; Responder	1 = kein Schubereignis und gleichbleibender EDSS-Wert; Responder
2 = Verschlechterung des EDSS-Wertes um ≥ 1 Punkt; Non-Responder	2 = mindestens ein Schubereignis; Non-Responder	2 = mindestens ein Schubereignis und/oder Verschlechterung des EDSS-Wertes um ≥ 1 Punkt; Non-Responder
3 = Verbesserung des EDSS-Wertes um ≥ 1 Punkt; Responder		3 = Verbesserung des EDSS-Wertes um ≥ 1 Punkt und kein Schubereignis; Responder

Die Ziffern 1-3 stellen Codes zur späteren Auswertung dar.

Um zu bewerten, inwiefern die beiden Responseklassifikationen EDSS und Schub den klinischen Krankheitsverlauf gleichermaßen als ungünstig einstufen, wurden die als Non-Responder in einer oder beiden Responseklassifikationen eingestuft Patienten, in Form von Venn-Diagrammen vergleichend gegenübergestellt. Die sechsjährige Nachbeobachtungszeit wurde hierbei in drei Beobachtungsintervalle untergliedert: die ersten zwei Nachbeobachtungsjahre, das dritte und vierte Nachbeobachtungsjahr und das fünfte und sechste Nachbeobachtungsjahr. Hierbei wurde die gesamte Patientenkohorte, unabhängig von der jeweiligen Sekundärprophylaxe, berücksichtigt.

3.3.2 Auswertung der paraklinischen Befunde

Zur Auswertung der paraklinischen Untersuchungsbefunde wurde ein Ausgangsbefund vor TPI mit einer im Behandlungsverlauf erhobenen Kontrolluntersuchung verglichen. Hierzu wurden zunächst erhobene Parameter der Ausgangsbefunde als physiologisch oder als pathologisch eingestuft. In der Verlaufsuntersuchung wurde dahingehend geprüft, ob sich eine Befundverbesserung, eine Befundverschlechterung oder ein zur Ausgangsuntersuchung unveränderter Befund darstellte. Die Tab. 5 zeigt die hierzu verwendeten Codes. Als Responder wurden jene Patienten eingestuft, die keine Verschlechterung in der paraklinischen Verlaufsuntersuchung zeigten. Als Non-Responder wurden jene Patienten mit einer Verschlechterung eines Parameters in der paraklinischen Verlaufsuntersuchung definiert.

Tab. 5: Auswertungsparameter der paraklinischen Diagnostik (cMRT, MEP, SEP und VEP).

Code	Auswertungskriterium
0	Physiologischer Ausgangsbefund
1	Pathologischer Ausgangsbefund
↑	Verschlechterung gegenüber dem Ausgangsbefund
↓	Verbesserung gegenüber dem Ausgangsbefund
∅	Kein Befundwandel gegenüber dem Ausgangsbefund

Sämtliche ausgewertete cMRTs erfolgten mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla. Die in der Universitätsmedizin Rostock durchgeführten cMRTs erfolgten nach einem standardisierten neuroradiologischen MS-Protokoll mit einer standardisierten Schichtdicke von 5 mm, einer standardisierten Positionierung der Untersuchungsschichten, einem standardisierten Verfahren der Kontrastmittelapplikation und festgelegten Untersuchungssequenzen. Zum Teil wichen die auswärtig erfolgten cMRT von diesem standardisierten MS-Protokoll ab. Sie fanden dennoch bei eindeutiger Befundlage in der Evaluation Berücksichtigung. Die cMRTs wurden nach folgenden Parametern bewertet: der Akkumulation von T2-Läsionen (T2), dem Vorhandensein von *black holes* (BH) in der T1-Wichtung, der Anreicherung des MR-Kontrastmittels Gadolinium (Gd) und der Beurteilung der globalen Atrophie des Hirnvolumens gemessen am Durchmesser des dritten Ventrikels (A, Atrophie). Diese Parameter wurden qualitativ nach den in Tab. 5 genannten Auswertungsparameter bewertet, wobei als Verschlechterung neu aufgetretene T2-Läsion, *black holes*, Gd-anreichernde Läsionen bzw. eine Zunahme des Ventrikeldurchmessers um $\geq 1,5$ mm definiert waren. Bei einer Verschlechterung in mindestens einem der vier genannten Parameter wurden die Patienten als Non-Responder eingestuft.

Die Auswertung der evozierten Potentiale erfolgte nach den Normwerten des elektrophysiologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock. Nur in Einzelfällen wurden auswärtig gemessene evozierte Potentiale berücksichtigt.

Die visuell evozierten Potentiale (VEP) erfolgten nach dem Schachbrettmuster-Prinzip, bei dem der Patient auf ein schwarz-weißes Schachbrettmuster mit Kontrastumkehr schaut. Die hierdurch entstandene visuelle Reizung wurde als Potentialdifferenz über der Sehrinde abgeleitet. Auswertungskriterium bei den VEP bildete das primär kortikale Potential P 100 und dessen Amplitudenkonfiguration (Creel 2015). Wurden Latenzverlängerungen bei der P 100 oder eine Amplitudenminderung im Seitenvergleich von mehr als 50 % gemessen, so wurden die Untersuchungsergebnisse als pathologisch gewertet.

Die transkraniell magnetisch evozierten Potentiale (MEP) wurden nach entsprechender Vorinnervation des *Musculus interosseus dorsalis I* oder des *Musculus abductor digiti minimi* an den oberen Extremitäten bzw. des *Musculus tibialis anterior* an den unteren Extremitäten nach supramaximaler, kortikaler bzw. zervikaler oder lumbaler Reizung, durch eine aufgelegte Magnetspule über den entsprechenden Muskeln, abgeleitet (Hess 2005). Als pathologisch bewertet wurden zentrilmotorische Latenzverlängerungen und Amplitudenreduktionen gegenüber den patientenspezifischen Normwerten des elektrophysiologischen Labors der neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Rostock. Sie wurden für die oberen Extremitäten (MEP-OE) und unteren Extremitäten (MEP-UE) getrennt ausgewertet.

Die somatosensibel evozierten Potentiale (SEP) wurden durch elektrische Hautimpulse im Bereich der distalen Unterarme, *Nervus medianus*-SEP (SEP-OE), und in Knöchelhöhe, *Nervus tibialis*-SEP (SEP-UE), generiert. Bewertet wurden vor allem die über dem somatosensiblen Kortex ableitbaren Latenzen N20 und P40 (Stöhr 2005). Wurden hierbei Latenzverlängerungen oder eine Amplitudenminderung im Seitenvergleich von mehr als 50 % gemessen, wurden die Untersuchungsergebnisse als pathologisch gewertet. Bestand in einer Verlaufsuntersuchung eine Verschlechterung zur Ausgangsuntersuchung, wurden die Patienten als Non-Responder eingestuft.

3.3.3 Vergleichende Gegenüberstellung der klinischen und paraklinischen Non-Responder

Um zu beurteilen, inwiefern die paraklinischen Untersuchungen den klinischen Krankheitsverlauf widerspiegeln, wurden die als Non-Responder in einer oder beiden klinischen Responseklassifikationen mit den als Non-Responder in den jeweiligen paraklinischen Untersuchungen eingestuften Patienten vergleichend gegenübergestellt. Die Ergebnisse wurden hierbei in Form von Venn-Diagrammen visualisiert. Berücksichtigt wurden hierbei jene Patienten mit paraklinischen Verlaufsuntersuchungen, die entweder in der jeweiligen paraklinischen Untersuchung oder bei der zeitgleich erfolgten klinischen Evaluation (Responseklassifikation EDSS bzw. Schub) als Non-Responder eingestuft wurden.

3.3.4 Nebenwirkungen

Unter IFN- β -Therapie sind verschiedene Nebenwirkungen beschrieben. Hierzu zählen unter anderem grippeähnliche Nebenwirkungen mit Fieber und Myalgien, Reizungen, Verhärtungen, Rötungen und Hautnekrosen im Injektionsbereich sowie erhöhte Lebertransaminasen im Serum (IFNB MS Study Group 1993, Reder *et al.* 2010, DGN & KKNMS 2015). Schwerwiegende, lebensbedrohliche Komplikationen wurden in Langzeitstudien nicht beschrieben (Reder *et al.* 2010). Nebenwirkungen, die bei den mit IFN- β therapierten Patienten während der sechs Jahre dauernden Nachbeobachtung auftraten, wurden hinsichtlich der Art (A) und der Intensität (I) eingestuft (Tab. 6). Die Art und die Intensität auftretender Nebenwirkungen wurden von 0 bis 3 in den Verkehrsampelfarben beziffert, wobei bei der Intensität die rote Ziffer 3 den Abbruch der Therapie aufgrund starker Nebenwirkungen und die grüne 0 keine bzw. selten aufgetretene Nebenwirkungen bedeuten. Die Farbwahl der Bezifferung bei der Art der Nebenwirkungen wurde hierzu analog gewählt, ohne hierdurch den Schweregrad der Nebenwirkungen zu beschreiben.

Tab. 6: Einteilung der Art und Intensität von Nebenwirkungen unter IFN- β -1b.

Art der Nebenwirkung	Intensität der Nebenwirkung
A0 = keine Nebenwirkungen	I0 = keine oder seltene Nebenwirkungen
A1 = Hauterscheinung (Rötung, Verhärtung, kleine Blutergüsse, Injektionsschmerz)	I1 = leichte Nebenwirkungen (ohne Begleitmedikation)
A2 = grippeähnliche Nebenwirkungen (Fieber, Myalgien, Kopfschmerz, Abgeschlagenheit, Schwäche, Schüttelfrost, Gliederschmerzen)	I2 = moderate Nebenwirkungen (Begleitmedikation über die ersten 6 Monate hinaus notwendig)
A3 = andere Nebenwirkungen (Transaminasenanstieg, Spritzenphobie)	I3 = starke Nebenwirkungen (Abbruch der Therapie)

3.4 Molekularbiologische Datenerhebung und bioinformatische Analyse

Zu fünf definierten Untersuchungszeitpunkten wurde während der ersten zwei Therapiejahre bei allen Patienten die mRNA aus PBMC extrahiert und per Oligonukleotid-Microarrays auf signifikante Genexpressionsänderungen untersucht. Im Folgenden sind im Detail die einzelnen Arbeitsschritte der molekularbiologischen Datenerhebung sowie die anschließende bioinformatische Analyse beschrieben.

3.4.1 Blutprozessierung

Vor der ersten IFN- β -1b-Applikation (TPI), zwei Tage nach TPI (D2), sowie einen Monat (M1), ein Jahr (M12) und zwei Jahre (M24) nach TPI erfolgte bei allen untersuchten Patienten die Entnahme von 15 ml peripher venösem Blut in Ethylendiamintetraacetat- (EDTA) Röhrchen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahmen bestand bei keinem Patienten ein klinischer oder laborparametrischer Hinweis auf das Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion. Die Blutproben wurden jeweils morgens in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock abgenommen und innerhalb einer

Stunde nach Entnahme im Labor des Instituts für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock weiterverarbeitet. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Protokoll) erfolgte die Separation von PBMC.

3.4.2 Erhebung der Fluoreszenzsignale

Die RNA-Signaturen der jeweiligen PBMC-Proben wurden mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays (*GeneChip Human Genome U133A* und *U133B*, Affymetrix) bestimmt. Zunächst erfolgte aus jeder PBMC-Probe die Isolation der Gesamt-RNA. Hierbei wurden die PBMC durch einen chaotropen Puffer lysiert (*QIAzol Lysis Reagenz*) und die RNA nach dem *RNeasy*-Protokoll (Qiagen) isoliert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Standard-Protokoll von Affymetrix (*Expression Analysis Technical Manual*, Affymetrix). Da komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) haltbarer ist als RNA, wurde die RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente später als Matrize, um Biotin-markierte cRNA herzustellen. Die initiale RNA- und finale cRNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch mit Hilfe eines *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific) Spektrophotometers bestimmt. Zudem erfolgte eine Qualitätskontrolle durch eine Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese. Die Biotin-markierte cRNA wurde fragmentiert (Fragmentlänge 30 bis 400 Basen) und anschließend jeweils 15 µg cRNA an die komplementären Oligonukleotidsonden auf den Affymetrix Human Genome Microarrays über 16 Stunden bei 45°C hybridisiert. Die Microarrays wurden anschließend gewaschen und in der Affymetrix Fluidics Station 400 mit an Biotin-haftenden fluoreszierenden Molekülen versehen. Die Microarrays wurden anschließend mit 3 µm Auflösung mit dem Hewlett Packard *GeneArray Scanner 2500A* gescannt. Je mehr RNA-Moleküle an einem *Probeset* hybridisiert waren, desto stärker fluoreszierten diese und umso stärker war die Signalintensität, die detektiert wurde. Anhand der Fluoreszenzmuster konnte quantifiziert werden, wie hoch die einzelnen Gene/*Probesets* exprimiert waren. Die Abb. 6 zeigt schematisch die Arbeitsschritte der Rohdatengewinnung.

3.4.3 Datenvorverarbeitung

Um aus den gescannten Rohdaten (Fluoreszenzsignale der einzelnen *Probesets*) unter IFN-β-1b-Therapie DEG zu ermitteln, erfolgte zunächst eine Datenvorverarbeitung. Hierzu wurde die *GeneChip Operating Software* (GCOS 1.4, Affymetrix) und der MAS5.0-Algorithmus (Microarray Suite 5.0, Affymetrix) verwendet.

Als erstes wurden nach den MAS5.0 *Calls* nicht-informative *Probesets* entfernt. Als solche wurden *Probesets* definiert, die nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal aufwiesen, da sie keine oder nur geringe Mengen cRNA gebunden hatten. Solche *Probesets* wurde als in den PBMC nicht exprimiert angesehen (MAS5.0 *Call* war „absent“). Nach Entfernen der als konsistent für alle Proben „absent“ eingestuften *Probesets* waren nur noch *Probesets* zu Genen vorhanden, die als in PBMC exprimiert angesehen wurden (MAS5.0 *Call* „present“). Im nächsten Analyseschritt wurden alle *Probesets*

entfernt, bei denen der MAS5.0-Algorithmus für einen Zeitpunktvergleich, z.B. TPI vs. D2, konsistent für alle 25 Patienten den *Call* „no change“ vergeben hatte. Dies bedeutet, dass keine Expressionsänderungen der entsprechenden *Probesets* zwischen den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten festgestellt wurden. Dieses Vorgehen erfolgte für alle vier Zeitpunktvergleiche: TPI vs. D2, M1, M12 und M24.

Zu jedem der 25 Patienten wurde zu den Zeitpunkten TPI, D2, M1, M12 und M24 ein Expressionsprofil gewonnen. Die vollständigen und normalisierten Microarray-Daten sind im *Gene Expression Omnibus* (GEO-Datenbank) öffentlich hinterlegt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24427>).

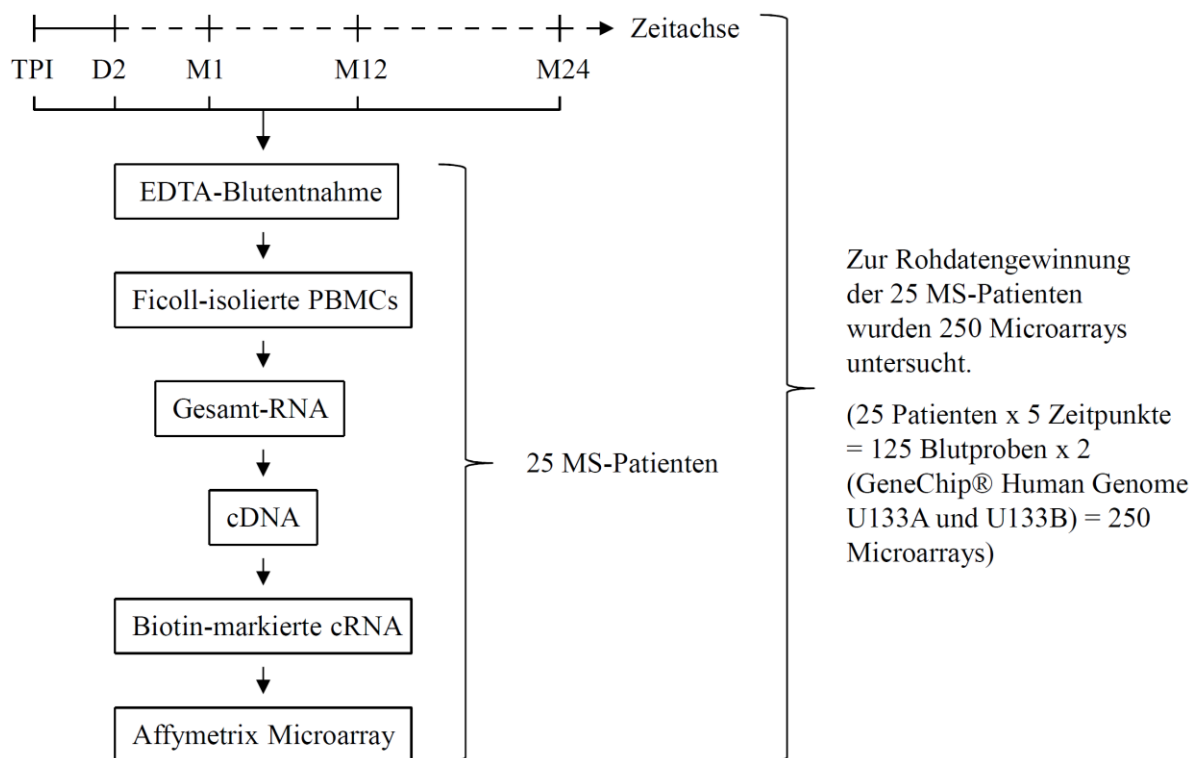


Abb. 6: Arbeitsschritte der Rohdatengewinnung.

Es wurde von 25 MS-Patienten vor der Therapieinitiierung (TPI), zwei Tage (D2), einen Monat (M1), zwölf Monate (M12) und 24 Monate (M24) nach der ersten IFN- β -1b-Applikation peripher venöses Blut entnommen. Mittels einer Ficoll-Separation wurden hiervon die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) abgetrennt. Aus den PBMC wurde die Gesamt-RNA extrahiert, über Zwischenschritte wurde fragmentierte Biotin-markierte cRNA hergestellt und auf den Affymetrix-Microarrays hybridisiert. Die an den Microarrays hybridisierte Biotin-markierte cRNA wurde mit fluoreszierenden Molekülen versehen und anschließend gescannt. Anhand der gescannten Fluoreszenzmuster wurde quantifiziert, wie hoch die einzelnen Gene/*Probesets* exprimiert waren.

3.4.4 Ermittlung der unter Therapie differentiell exprimierten Gene

Mit Hilfe weiterer Kriterien wurden in der Folge jene Gene ermittelt, die deutliche Expressionsänderungen zu den vier Zeitpunktvergleichen TPI vs. D2, M1, M12 und M24 unter rIFN- β -1b-Therapie aufwiesen. Solche Gene werden als differentiell exprimierte Gene (DEG) bezeichnet.

Dabei erfolgte die Analyse der Expressionsveränderungen logarithmisch (*log fold-change*) zwischen den Untersuchungszeitpunkten TPI vs. D2, M1, M12 und M24. Der *log fold-change* stellt eine Methode zur Identifizierung von DEG dar (Cui & Churchill 2003). Der *fold-change* vergleicht die gemessenen Genexpressionsintensitäten zwischen zwei Zeitpunkten und zeigt somit das Ausmaß der Signalveränderung unter Therapie an. Ein Nachteil der *fold-change*-Methode stellt allerdings die zunehmende Variabilität bei abnehmender Signalintensität dar (Yang *et al.* 2002). Es wurden daher signalintensitätsabhängige *fold-changes* mit Hilfe von *MA-Plots* bewertet (*MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion*, MAID) (Hecker *et al.* 2009a). Anhand *MA-Plots* werden die Signalintensitätsverteilungen der einzelnen Zeitpunktvergleiche visualisiert. Auf der y-Achse wird hierbei die logarithmische Signalintensitätsänderung ($\log_2 \text{Daten (t1)} - \log_2 \text{Daten (t0)}$) und auf der x-Achse die durchschnittliche Signalintensität ($\frac{1}{2} \times (\log_2 \text{Daten (t0)} + \log_2 \text{Daten (t1)})$) aufgetragen. Die MAID-Filterung berücksichtigt, dass die Variabilität in *log fold-changes* bei abnehmender Signalintensität ansteigt. Es wurden auf diese Weise angepasste logarithmische *fold-changes*, sogenannte MAID-Scores, berechnet. Der Absolutbetrag eines MAID-Scores eines Gens ist umso höher, je mehr sich dessen Expression gegenüber dem Ausgangswert verändert hat, und er ist im Allgemeinen geringer für schwach exprimierte Gene. *Probesets* wurden als hochreguliert eingestuft, wenn sie einen MAID-Score von > 2 aufwiesen. Als herunterregulierte *Probesets* wurden jene eingestuft, die einen MAID-Score von < -2 aufwiesen.

Anhand des paarigen t-Tests wurde die Expression eines jeden Gens vor Therapie (TPI) mit der Expression dieses Gens zu einem Zeitpunkt unter Therapie (D2, M1, M12 und M24) über alle 25 Patienten verglichen. Für jedes Gen wurde so für jeden Zeitpunktvergleich ein p-Wert berechnet, der eine statistische Aussage über den jeweiligen Expressionsunterschied ermöglichte. *Probesets* wurden als differentiell exprimiert angesehen, wenn sie einen p-Wert $< 0,05$ aufwiesen.

Als weiteres Kriterium zur Ermittlung der DEG lieferte der MAS5.0 Algorithmus die *Calls* „*increase*“ (erhöht) und „*decrease*“ (vermindert). Für jedes *Probeset* und jeden Zeitpunktvergleich war das Kriterium erfüllt, wenn ein *Probeset* für den Zeitpunktvergleich, z.B. TPI vs. D2, bei mindestens 50 % der Patienten unter rIFN- β -1b höher (*increase*) bzw. geringer (*decrease*) exprimiert war.

Die verwendeten Microarrays befinden sich seit ihrer Entwicklung im Jahr 2000/2001 nahezu unverändert auf dem Markt. Die Genannotation, das bedeutet, das Wissen darüber, an welcher Stelle im Genom sich die Gene befinden und das Wissen über die mRNA-Sequenzfolge, hat sich seither verändert (Yin *et al.* 2010). Die verwendeten Microarrays enthalten daher Sonden (Kap. 1.6), die zu mehr als einem Gentranskript passen (niedrige Spezifität), sowie Sonden, die zu keiner transkribierten Sequenz passen (niedrige Sensitivität) (Ferrari *et al.* 2007). Es wurde daher eine *Probeset*-Spezifität von $> 0,7$ gefordert, um mehrdeutige *Probesets* aus den Daten zu entfernen. Die Spezifitäten basierten auf Informationen der *GeneAnnot*-Datenbank der Version 1.7 (Chalifa-Caspi *et al.* 2004).

3.4.5 Validierung der unter Therapie DEG mit quantitativer rt-PCR

Die Validierung der Genexpressionsveränderungen erfolgte mittels der sensitiveren, quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, rt-PCR). Hierzu wurden exemplarisch 15 Gene (Tab 7), die nach den Ergebnissen der Microarrayanalyse zu den Zeitpunktvergleichen TPI vs. D2, M1, M12 und M24 differentiell exprimiert waren, bei 18 der 25 Patienten untersucht.

Tab. 7: Quantitative rt-PCR-Validierung ausgewählter DEG (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Gensymbol	Entrez Gene ID	TaqMan Assay ID
APOBEC3A	200315	Hs00377444_m1
CMPK2	129607	Hs00332806_m1
EPSTI1	94240	Hs01566789_m1
FCER1A	2205	Hs00758600_m1
GAPDH	2597	Hs99999905_m1
HERC5	51191	Hs00180943_m1
IFI44	10561	Hs00197427_m1
IFI44L	10964	Hs00199115_m1
IFIT1	3434	Hs01675197_m1
IFIT2	3433	Hs00533665_m1
IFIT3	3437	Hs00155468_m1
ISG15	9636	Hs00192713_m1
LY6E	4061	Hs00158942_m1
MX1	4599	Hs00182073_m1
RSAD2	91543	Hs00369813_m1
SIGLEC1	6614	Hs00988063_m1

Zur Identifikation der Gene sind die Entrez Gene Identifikatoren (ID) angegeben. Des Weiteren sind die verwendeten TaqMan Assay ID angegeben. DEG = differentiell exprimierte Gene, rt-PCR = Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*).

Es wurden hierzu die Transkriptproben der Zeitpunkte TPI und M1 mittels *TaqMan*-Assays und einem *7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) analysiert. Als Referenzgen für die Nachmessung wurde GAPDH verwendet, da dieses zu den sog. Haushaltsgenen zählt. Als Haushaltsgene werden jene Gene bezeichnet, die konstitutiv exprimiert sind und somit keinen wesentlichen Expressionsschwankungen unterliegen. Zur Minimierung der Variabilität erfolgten alle quantitativen rt-PCR in dreifacher Ausführung. Nach den Herstellerangaben wurde von jeder Probe 1 µg der Gesamt-RNA mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) zu cDNA umgeschrieben und anschließend mittels quantitativer rt-PCR mit *TaqMan*-Assays vervielfältigt und analysiert. Erreichen die Fluoreszenzsignale der Sonden einen definierten Schwellenwert (*threshold*, t), werden sie detektiert und dem entsprechenden rt-PCR-Zyklus (*cycle*, C) zugeordnet (Ct-Wert), bei dem dieser Schwellenwert überschritten wird (SDS 2.3, Applied Biosystems). Die gemessenen Ct-Werte sind logarithmisch umgekehrt proportional zur Menge der

gemessenen mRNA in der untersuchten Probe. Die medianen Ct-Werte jedes Triplikates wurden bestimmt und anschließend gegen den medianen Ct-Wert des Referenzgens GAPDH ($\Delta Ct^{\text{Gen}} = Ct^{\text{Gen}} - Ct^{\text{GAPDH}}$) normalisiert. Als nächstes wurden die Daten anhand der Gleichung $2^{-\Delta Ct}$ transformiert und zur besseren Darstellbarkeit mit dem Faktor 1000 skaliert. Die vorverarbeiteten rt-PCR-Daten wurden verwendet, um die Genexpression jedes der 15 Gene zum Zeitpunkt der TPI mit dem Zeitpunkt M1 anhand paariger t-Tests zu vergleichen. Um zu bewerten, ob die Daten der quantitativen rt-PCR mit den Ergebnissen der Microarrays übereinstimmen, erfolgte eine Korrelationsanalyse durch Berechnung des nicht-parametrischen Pearson-Korrelationskoeffizienten r (Pearson r) und des dazu gehörigen Signifikanzniveaus (Pearson p -Wert). Expressionsunterschiede und Korrelationen mit p -Werten $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.4.6 Biologische Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG

Mittels *Gene Ontology* (GO) wurden die biologischen Funktionen (GO-Terme) der unter IFN- β -1b hochregulierten DEG analysiert. GO stellt eine Experten-kuratierte, ständig wachsende Datenbank dar, die Genen verschiedene funktionale Kategorien zuweist. GO verfolgt das Ziel, die Rolle von Genen präzise zu definieren und strukturiert und allgemein gültig zu beschreiben (Ashburner *et al.* 2000). GO unterscheidet hierbei drei Kategorien, die jeweils spezielle Informationen zum untersuchten Gen bzw. Genprodukt gewähren: die molekulare Funktion (*molecular function*), den zugehörigen biologischen Prozess (*biological process*) und das zelluläre Kompartiment, in dem es wirkt (*cellular component*) (Ashburner *et al.* 2000). Die GO-Unterkategorien (GO-Terme) sind hierarchisch durch übergeordnete GO-Terme strukturiert. Dabei stehen allgemeine Begriffe oberhalb von spezifischen GO-Termen. Allerdings stehen zum Teil spezifische GO-Terme mit mehreren übergeordneten, weniger spezifischen GO-Termen in Verbindung (Blake *et al.* 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die GO-Terme der Kategorie „*biological process*“ unter Verwendung von GStats, einem Bioconductor Software-Paket (Falcon & Gentleman 2007), für die hochregulierten DEG zu den Zeitpunkten D2, M1, M12 und M24 ermittelt. Jeder GO-Term wurde anhand GStats auf eine signifikante Überrepräsentation in der Liste der hochregulierten DEG im Vergleich zu der Gesamtheit der gemessenen Gene überprüft. Hierzu wurde für jeden Zeitpunktvergleich die Anzahl der Gene eines jeden GO-Terms unter den hochregulierten DEG (Anzahl) anhand aller gemessenen Gene (erwartete Anzahl) verglichen. Lag der Quotient aus Anzahl und erwarteter Anzahl > 1 , so bedeutete dies eine Überrepräsentation des entsprechenden GO-Terms in der Liste der hochregulierten DEG. Es wurden nur GO-Terme mit einem p -Wert $< 0,01$ erfasst.

3.4.7 Geninteraktionen der unter Therapie differentiell exprimierten Genen

Das in der vorliegenden Arbeit erstellte Geninteraktionsnetzwerk hatte zum Ziel, die wechselseitigen Interaktionen zwischen den gefilterten DEG darzustellen. Die gefilterten DEG wurden unter Verwendung der Interaktionsinformationen der *Pathway Architect* 2.0.1 Software (Stratagene) für

jeden Zeitpunktvergleich (TPI vs. D2, M1, M12 und M24) in ein Geninteraktionsnetzwerk integriert. Die Interaktionsinformationen der *Pathway Architect* Software stammen überwiegend aus der Literatur und wurden über Text-Mining-Algorithmen generiert. Es wurden verschiedene biologische Beziehungen unterschieden, wie z.B. positive Regulation = Stimulation und negative Regulation = Inhibition. Die graphische Darstellung der Geninteraktionen erfolgte mit Hilfe der Software *Cytoscape* 2.6.1 (Shannon *et al.* 2003). Bei der graphischen Darstellung symbolisieren Kreise Gene. Die Größe der dargestellten Kreise korreliert mit der Anzahl an Interaktionen. Bei Genen, die Bestandteil eines anderen Geninteraktionsnetzwerks waren, wurde der Kreis grau hinterlegt. Wurde der Kreis, der ein Gen darstellt, grün umrandet, so bedeutet dies, dass das jeweilige Gen unter IFN β -1b-Therapie hochreguliert war. Wurde der Kreis rot umrandet, so bedeutet dies, dass das jeweilige Gen herunterreguliert war. Verbindungslinien stellen im Geninteraktionsnetzwerk die molekularen Wechselwirkungen zwischen einzelnen Genen dar. Schwarze Pfeile symbolisieren hierbei stimulierende bzw. hemmende Interaktionen. Die restlichen, zumeist grau gezeichneten Verbindungslinien wurden mit Erläuterungen zur jeweiligen Wechselwirkung versehen.

3.5 Statistische Auswertungen zur Identifikation prognostischer Biomarker

Es erfolgte eine Assoziationsanalyse der gemessenen Genexpressionsprofile der 25 Patienten zum Zeitpunkt der TPI mit den klinischen Krankheitsverläufen nach zwei Jahren (M24), um Biomarker-Kandidaten für den klinischen Krankheitsverlauf zu identifizieren. Der Krankheitsverlauf wurde hierbei anhand des Auftretens von Schüben bewertet. Die Patienten wurden hierzu in zwei Gruppen eingeteilt. Die Einteilung in die Gruppe „Schub-schlecht“ erfolgte, wenn zwischen dem siebten und 24. Monat nach TPI ≥ 1 Schub auftrat. Traten während der ersten zwei Nachbeobachtungsjahre keine Schübe auf, so wurden die Patienten in die Gruppe „Schub-gut“ eingeteilt.

Die Genexpressionsprofile der beiden Gruppen vor TPI wurde mit der MAID-Analyse (Hecker *et al.* 2009a) verglichen. Es wurde hierbei gefordert, dass die *Probesets*/Gene einen MAID-Score $> 2,5$ oder $< -2,5$ aufwiesen. Dies bedeutet, dass die mittlere Expression in der Gruppe mit einem ungünstigen klinischen Krankheitsverlauf („Schub-schlecht“) deutlich höher bzw. niedriger war als in der Gruppe mit einem günstigen klinischen Krankheitsverlauf („Schub-gut“). Die verbliebenen *Probesets*/Gene wurden anschließend nach dem p-Wert des zweiseitigen 2-Stichproben t-Tests sortiert. Die hiernach 20 am stärksten differentiell exprimierten *Probesets*/Gene wurden tabellarisch als prognostische Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der Therapieeinstellung aufgeführt.

Anschließend wurden die Datenbanken *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), *GeneCards* (<http://www.genecards.org>) und *OMIM* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) nach den Gennamen/Gensymbolen und dem jeweiligen Zusatz „*interferon*“ bzw. „*multiple sclerosis*“ durchsucht, um zu erfassen, in welchem Zusammenhang sie hierbei bereits vorbeschrieben worden sind.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische und paraklinische Ergebnisse

Die Patientenkohorte wurde, mit Ausnahme zweier Patienten (Pat 16 und 20), über 72 Monate klinisch nachuntersucht. Um eine höhere Anzahl von paraklinischen Verlaufsuntersuchungen zu erzielen, wurden auch Verlaufsuntersuchungen berücksichtigt, die erst nach Beendigung der IFN- β -1b-Therapie bzw. nach der eigentlichen Nachbeobachtungszeit von 72 Monaten erfolgten (Maximum 88,6 Monate nach TPI). Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden IFN- β -1b-Therapie weitestgehend durch Therapie ersetzt.

4.1.1 Beendigung der IFN- β -1b-Therapie

Während der sechsjährigen Nachbeobachtungszeit beendeten insgesamt acht Patienten (Pat 02, 03, 07, 14, 16, 20, 22 und 24) die IFN- β -1b-Therapie. Die mittlere Behandlungsdauer lag hierbei bei $44,6 \pm 16,2$ Monaten (SW 23 - 68). Eine Patientin (Pat 07) beendete aufgrund einer Schwangerschaft die Therapie nach 23 Behandlungsmonaten. Sie wies bis dahin keine Krankheitsaktivität auf und wurde nach Beendigung der Stillzeit wieder auf IFN- β -1b eingestellt. Bis zur Vollendung des sechsten Nachbeobachtungsjahrs bestand bei ihr keine klinische Krankheitsaktivität (keine EDSS-Zunahme und kein Schub). Bei zwei Patienten (Pat 16 und 20) bestand unter Therapie keine Krankheitsaktivität (kein Schub und keine EDSS-Zunahme) (Suppl-Tab. 5 und 6). Die Therapie wurde aufgrund von Unannehmlichkeiten und Unbequemlichkeiten bei der Applikation (Pat 20, nach 46 Behandlungsmonaten) bzw. aufgrund einer Entscheidung der Patientin (Pat 16, nach 44 Behandlungsmonaten) gegen die Fortführung der Therapie beendet. Bei Pat 20 wurden zuvor bereits mehrfach kürzere Therapiepausen dokumentiert. Bei Pat 16 lag zum Zeitpunkt des Therapieendes eine subdepressive Stimmungslage vor. Zu beiden Patienten (Pat 16 und 20) liegen keine späteren Nachbeobachtungsdaten vor. Vier Patienten (Pat 02 nach 25 Behandlungsmonaten, Pat 14 nach 26 Behandlungsmonaten, Pat 03 nach 35 Behandlungsmonaten, Pat 22 nach 54 Behandlungsmonaten) beendeten die Therapie aufgrund einer gesteigerten Krankheitsaktivität und wurden auf Mitoxantron eingestellt. Bei diesen Patienten kam es unter Therapie zu einer mittleren EDSS-Zunahme von 2,5 Punkten (SW 2,0 – 3,0) sowie zu ein bis drei Schüben. Zwei dieser Patienten (Pat 14 und 22) beendeten die IFN- β -1b-Therapie ohne unmittelbare ärztliche Konsultation. Bei beiden Patienten wurden zuvor niedrigtitrige NAK nachgewiesen und eine nicht ausreichende Medikamentenwirkung diskutiert. Eine weitere Patientin (Pat 24 nach 57 Behandlungsmonaten) wurde aufgrund eines Übergangs in eine SPMS auf Mitoxantron umgestellt. Bei ihr bestand bereits zum Zeitpunkt TPI ein EDSS-Wert von 4,0. Insgesamt sind in der beobachteten Patientenkohorte vier Patienten (Pat 14, 16, 20 und 22) (16 %) als therapieinadhärent einzustufen, da diese ohne ärztliche Rücksprache die Therapie beendeten.

4.1.2 Krankheitsverlauf der Patientenkohorte anhand der EDSS-Werte

Die individuelle Krankheitsprogression der Patienten, gemessen anhand der EDSS-Werte, war unterschiedlich ausgeprägt. Zum Zeitpunkt der TPI wies die Patientenkohorte (n=25) einen EDSS-Wert von $2,16 \pm 1,12$ (MW $\pm$ SD) (SW 1,0 - 4,0) auf. Zwei Jahre nach TPI hatte sich der EDSS-Wert im Mittel auf $2,44 \pm 1,27$ (SW 1,0 - 5,5) erhöht. Während der folgenden vier Jahre beendeten acht Patienten die Therapie. Bei den Patienten, die über den sechsjährigen Nachbeobachtungszeitraum mit IFN- β -1b behandelt wurden (n=17), lag der EDSS-Wert vier Jahre nach TPI bei $2,44 \pm 0,90$ (SW 1,0 - 4,0) und sechs Jahre nach TPI bei $2,91 \pm 1,16$ (SW 1,0 - 6,0) (Boxplot A der Abb. 7 bzw. Tab. 8). Unter Berücksichtigung der gesamten Patientenkohorte (n=25) fiel eine stärkere EDSS-Zunahme auf. So lag der EDSS-Wert in der gesamten Patientenkohorte vier Jahre nach TPI (n=25) bei $2,82 \pm 1,43$ (SW 1,0 - 6,0) und sechs Jahre nach TPI (n=23) bei $3,44 \pm 1,68$ (SW 1,0 - 6,5) (Boxplot B der Abb. 7 bzw. Tab. 8).

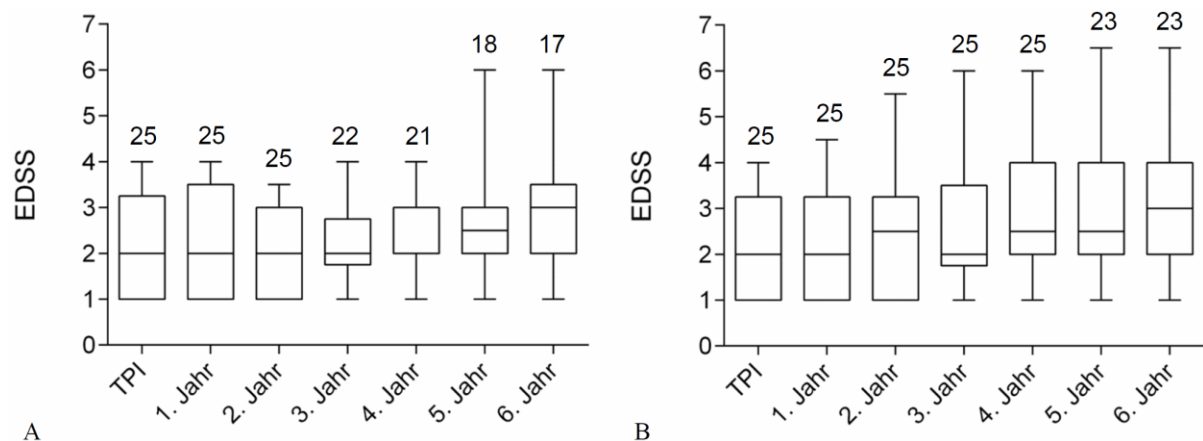


Abb. 7: Boxplots der EDSS-Werte.

Dargestellt ist die Verteilung der EDSS-Werte der durchgehend mit Interferon (IFN)- β -1b therapierten Patienten (A) und aller Patienten (B). Die aufgeführten Zahlen oberhalb jeder Box im linken Boxplot geben die Anzahl der mit IFN- β -1b therapierten Patienten pro Jahr an. Die Zahlen oberhalb jeder Box im rechten Boxplot geben die beobachtete Gesamtpatientenzahl pro Jahr an. TPI = Therapieinitiiierung.

Tab. 8: Durchschnittliche EDSS-Werte verschiedener Patientengruppierungen.

	TPI	2. Jahr nach TPI	4. Jahr nach TPI	6. Jahr nach TPI
A	$2,19 \pm 1,19$ (SW 1,0 - 4,0)	$3,00 \pm 1,69$ (SW 1,0 - 5,5)	$3,63 \pm 2,01$ (SW 1,0 - 6,0)	$4,92 \pm 2,13$ (SW 1,0 - 6,5)
B	$2,15 \pm 1,12$ (SW 1,0 - 4,0)	$2,18 \pm 0,97$ (SW 1,0 - 3,5)	$2,44 \pm 0,90$ (SW 1,0 - 4,0)	$2,91 \pm 1,16$ (SW 1,0 - 6,0)
C	$2,16 \pm 1,12$ (SW 1,0 - 4,0)	$2,44 \pm 1,27$ (SW 1,0 - 5,5)	$2,82 \pm 1,43$ (SW 1,0 - 6,0)	$3,43 \pm 1,68$ (SW 1,0 - 6,5)
D	0,9347	0,1330	0,0509	0,0084

Die EDSS-Werte der Gruppe der „Therapieabbrecher“ (A, n=8, ab dem fünften Nachbeobachtungsjahr nur Daten zu sechs Patienten vorliegend) wiesen zu jedem Beobachtungszeitraum eine höhere neurologische Beeinträchtigung auf als die 17 über sechs Jahre durchgehend mit Interferon- β -1b therapierten Patienten (B). Im sechsten Jahr nach Therapieinitiiierung (TPI) war dieser Unterschied statistisch signifikant (p-Wert 0,0084). C = gesamte Patientenkohorte (n=25, ab dem fünften Nachbeobachtungsjahr nur Daten zu 23 Patienten vorliegend), D = p-Wert für den Vergleich der EDSS-Werte der Gruppen A und B mittels t-Test.

Bei den Patienten, die während der sechsjährigen Nachbeobachtungszeit die Therapie beendet haben (n=8), lagen die durchschnittlichen EDSS-Werte stets über denen, der durchgehend mit IFN- β -1b behandelten Patienten (n=17). Im sechsten Nachbeobachtungsjahr lag der durchschnittliche EDSS-Wert in der Gruppe der „Therapieabbrecher“ im Mittel um 2,01 EDSS-Punkte signifikant höher (p-Wert 0,0084) als in der Gruppe der durchgängig therapierten Patienten (Tab. 8). Der individuelle EDSS-Verlauf jedes einzelnen Patienten ist in Suppl.-Tab. 5 aufgeführt.

4.1.3 Krankheitsverlauf der Patientenkohorte anhand der Schübe

Die Schubanzahl variierte zwischen den Patienten von Schubfreiheit bis drei Schübe pro Jahr. In den folgenden zwei Abbildungen sind die Anzahl festgestellter Schübe und die Anzahl der Patienten mit mindestens einem Schubereignis pro Beobachtungszeitraum dargestellt. Die Abb. 8 berücksichtigt hierbei die gesamte Patientenkohorte (n=25, ab dem fünften Jahr nach TPI n=23), während in Abb. 9 ausschließlich die durchgehend mit IFN- β -1b therapierten Patienten (n=17) berücksichtigt wurden. Um Schubereignisse während des ersten Behandlungshalbjahres aufzuzeigen, ist das erste Nachbeobachtungsjahr in beiden Abbildungen in zwei Halbjahre untergliedert. Schübe während des ersten Nachbeobachtungshalbjahrs wurden in der Responseklassifikation Schub nicht berücksichtigt (Kap. 3.3.1 und 4.1.4).

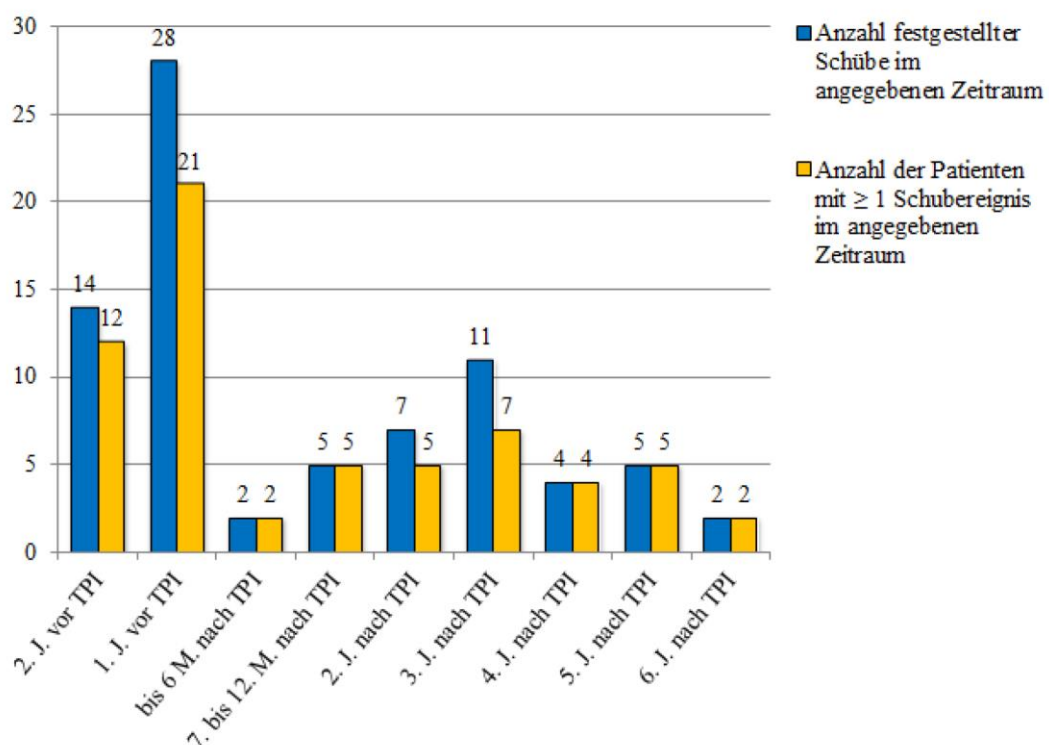


Abb. 8: Schubanzahl der gesamten Patientenkohorte zu verschiedenen Zeiträumen.

Es wurden bis zum vierten Jahr nach Therapieinitiation (TPI) Schubereignisse aller 25 Patienten dokumentiert, ab dem fünften Nachbeobachtungsjahr konnten die klinischen Daten nur von 23 Patienten erhoben werden. Die Anzahl beobachteter Schübe und die Anzahl der Patienten mit mindestens einem Schubereignis waren vor TPI relativ hoch. In den Beobachtungszeiträumen nach TPI war die Anzahl der beobachteten Schübe auf niedrigerem Niveau. J. = Jahr, M. = Monat(e).

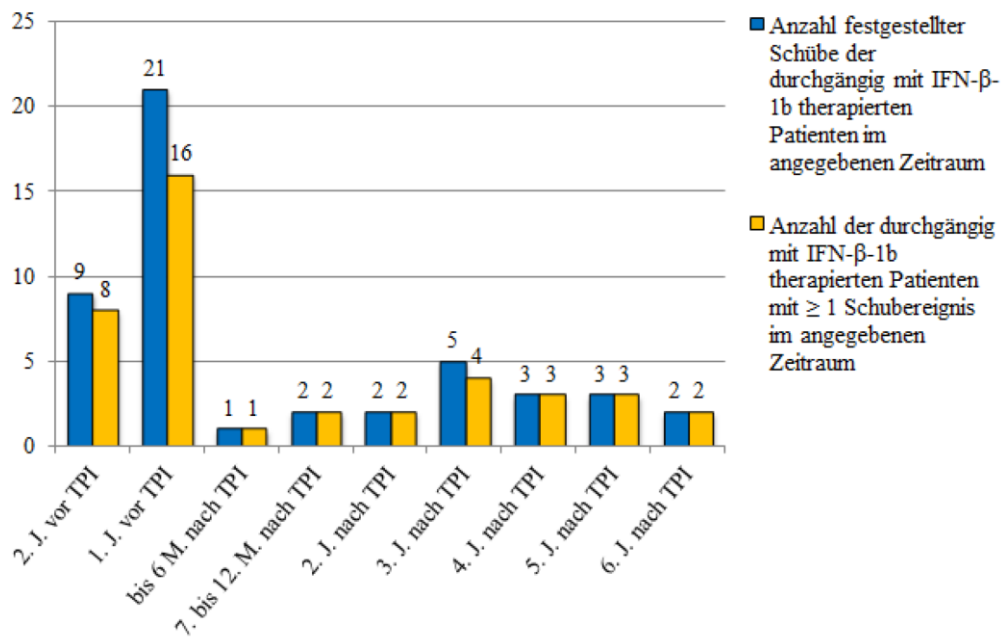


Abb. 9: Schubanzahl der durchgängig mit IFN-β-1b therapierten Patienten zu verschiedenen Beobachtungszeiträumen.

Über den Nachbeobachtungszeitraum von sechs Jahren wurden insgesamt 17 Patienten durchgängig mit Interferon (IFN)-β-1b therapiert. Vor Therapieinitiierung (TPI) waren die Anzahl beobachteter Schübe und die Anzahl der Patienten mit mindestens einem Schubereignis relativ hoch. In den Beobachtungszeiträumen nach TPI lag die Schubanzahl auf niedrigerem Niveau. J. = Jahr, M. = Monat(e).

Um die Schubhäufigkeit der über sechs Jahre durchgängig therapierten Patienten (n=17) mit der gesamten Patientenkohorte (n=25) bzw. den Patienten, die während der sechsjährigen Nachbeobachtungszeit die IFN-β-1b-Therapie beendeten („Therapieabbrecher“ n=8), zu vergleichen, wurde jeweils die jährliche Schubrate berechnet. Die jährliche Schubrate lag ein Jahr vor TPI in der Gruppe der „Therapieabbrecher“ (0,88) noch leicht unter der jährlichen Schubrate der durchgängig mit IFN-β-1b therapierten Patienten (1,24). Während der ersten drei Behandlungsjahre lag die mittlere jährliche Schubrate der „Therapieabbrecher“ über der mittleren jährlichen Schubrate der durchgängig mit IFN-β-1b therapierten Patienten (Tab. 9). Ab dem vierten Nachbeobachtungsjahr unterschieden sich beide Patientengruppen bezüglich der Schubaktivität nur unwesentlich (mittlere jährliche Schubrate der „Therapieabbrecher“ 0,13 bzw. 0,16 bei den durchgängig mit IFN-β-1b therapierten Patienten). Die individuelle jährliche Schubanzahl jedes einzelnen Patienten ist im Anhang in der Suppl.-Tab. 6 widergegeben.

Tab. 9: Vergleichende Gegenüberstellung der Schubraten verschiedener Patientengruppierungen.

	bis 6 Monate nach TPI	7.-12. Monat nach TPI	2. Jahr nach TPI	3. Jahr nach TPI
A	0,13	0,38	0,63	0,75
B	0,06	0,12	0,12	0,29
C	0,08	0,20	0,28	0,44
D	0,5881	0,1449	0,0516	0,2014

Die durchschnittliche Schubrate der „Therapieabbrecher“ (A, n=8, ab dem fünften Nachbeobachtungsjahr nur Daten zu sechs Patienten vorliegend) lag während der ersten drei Behandlungsjahre über der durchschnittlichen Schubrate der durchgängig therapierten Patienten (B, n=17). Dieser Unterschied war jedoch zu keinem der Vergleichszeiträume statistisch signifikant (p-Wert > 0,05). C = gesamte Patientenkohorte (n=25, ab dem fünften Nachbeobachtungsjahr nur Daten zu 23 Patienten vorliegend). D = p-Wert für den Vergleich der Schubraten der Gruppe A und B. TPI = Therapieinitiierung.

4.1.4 Auswertung anhand der klinischen Bewertungsscores

Die klinische Evaluation nach den drei klinischen Bewertungsscores erfolgte über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum von sechs Jahren, ungeachtet einer eventuell abweichenden Sekundärprophylaxe. Zu zwei Patienten (Pat 16 und 20) liegen ab dem fünften Nachbeobachtungsjahr keine weiteren Nachbeobachtungsdaten vor. Sie wurden bis dahin als Responder aller drei klinischen Bewertungsscores eingestuft.

Nach der Responseklassifikation Schub wurden nach dem ersten Nachbeobachtungsjahr fünf und nach dem sechsten Nachbeobachtungsjahr 14 Patienten als Non-Responder eingestuft. Nach der Responseklassifikation EDSS wurden sechs Jahre nach TPI insgesamt zwölf Patienten als Non-Responder eingestuft. Dieser klinische Bewertungsscore berücksichtigte auch Verbesserungen des EDSS, was dazu führte, dass zwei zwischenzeitlich als Non-Responder eingestufte Patienten später wieder als Responder eingestuft wurden (Pat 04 und 18). Drei Patienten hatten vorübergehend einen verbesserten EDSS von mindestens 1 Punktwert (Pat 10, 12 und 24). Die Ergebnisse der klinischen Bewertungsscores pro Nachbeobachtungsjahr sind in Tab. 10 aufgeführt.

Die Abb. 10 veranschaulicht, dass auftretende Schübe nicht zwangsläufig eine EDSS-Progression bedeuten (Pat 09, 23 und 24) bzw. dass es auch zu einer EDSS-Progression ohne Auftreten von Schüben kommen kann (Pat 06). Insgesamt ist die Korrelation der Responseklassifikationen EDSS und Schub relativ hoch. So waren sechs Jahre nach TPI elf Patienten als Non-Responder und acht Patienten als Responder nach beiden Kriterien eingestuft. Des Weiteren fällt auf, dass die Anzahl der Non-Responder nach der Responseklassifikation Schub stets größer war als die Anzahl der Non-Responder nach der Responseklassifikation EDSS. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Responseklassifikation Schub einen restriktiveren Parameter zur Einschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs darstellt.

Tab. 10: Ergebnisse der klinischen Bewertungsscores.

Patient	Responseklassifikation Schub						Responseklassifikation EDSS						Klinische Gesamteinschätzung					
	0-12 M.	0-24 M.	0-36 M.	0-48 M.	0-60 M.	0-72 M.	0-12 M.	0-24 M.	0-36 M.	0-48 M.	0-60 M.	0-72 M.	0-12 M.	0-24 M.	0-36 M.	0-48 M.	0-60 M.	0-72 M.
1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
4	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
9	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
10	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2
16	1	1	1	1	*		1	1	1	1	*		1	1	1	1	*	
17	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
18	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	*		1	1	1	1	*		1	1	1	1	*	
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
23	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
24	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
25	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
R:NR	20:5	17:8	12:13	12:13	9:14	9:14	23:2	19:6	17:8	17:8	14:9	11:12	20:5	15:10	11:14	10:15	8:15	8:15

1 = Responder, 2 = Non-Responder, 3 = Verbesserung gegenüber der Therapieinitiation (TPI), M. = Monate, * = keine klinischen und paraklinischen Nachbeobachtungen ab dem fünften Jahr nach TPI, grau markierte Felder = Interferon- β -1b-Therapie beendet.

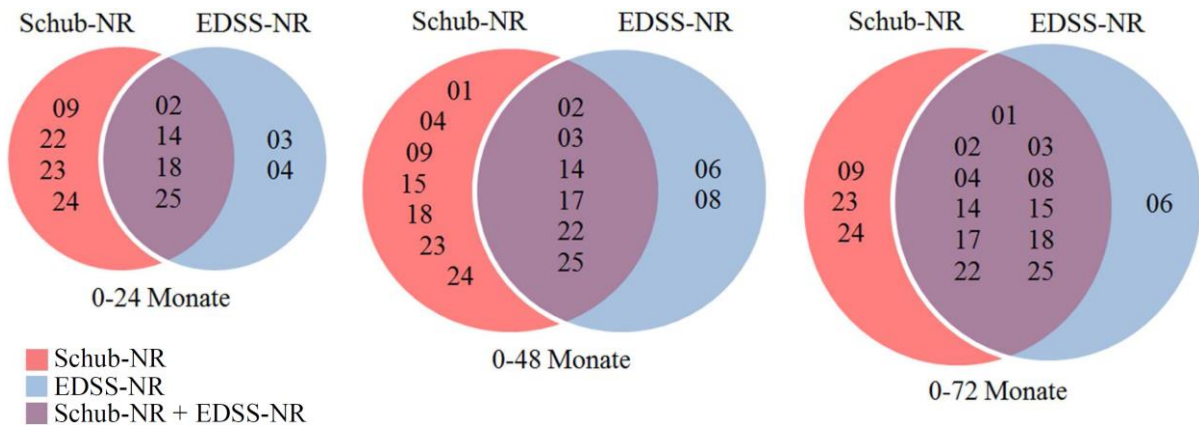


Abb. 10: Vergleich der Schub- und EDSS-Non-Responder.

Vergleichende Gegenüberstellung der Patienten (mit Ziffern bezeichnet), die nach der Responseklassifikation Schub oder EDSS nach 24, 48 und 72 Monate nach Therapiebeginn als Non-Responder (NR) eingestuft wurden. In den roten Kreisen sind die als Non-Responder in der Responseklassifikation Schub eingestuft Patienten aufgeführt. In den blauen Kreisen sind jene Patienten beziffert, die als Non-Responder der Responseklassifikation EDSS eingestuft wurden. Die Überlappung der Kreise (lila) zeigt die Patienten, die als Non-Responder beider Responseklassifikationen (EDSS und Schub) eingestuft wurden. Die Venn-Diagramme veranschaulichen eine deutliche Überlappung beider Responseklassifikationen. Es überwiegt jedoch die Anzahl der Schub-Non-Responder. Die Schubaktivität scheint einen restriktiveren Parameter zur Einschätzung kurzfristiger Krankheitsverläufe darzustellen als die EDSS-Progression.

4.1.5 Auswertung des Krankheitsverlaufs anhand der MS-Verlaufsform

Zum Zeitpunkt der TPI lag bereits bei zwei Patienten (Pat 03 und 10) eine SPMS vor. Beide Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits relativ alt (Pat 03 62,7 Jahre, Pat 10 54,4 Jahre; Suppl-Tab. 4). Bei den restlichen 23 Patienten bestand zum Zeitpunkt der TPI eine RRMS. Nach durchschnittlich $3,5 \pm 0,9$ (SW 2,3 – 4,7) Jahren kam es bei vier weiteren Patienten (Pat 02, 14, 22 und 24) unter IFN- β -1b-Therapie zu einer Konversion zu einer SPMS. Die klinische Erstmanifestation erfolgte bei diesen vier Patienten retrospektiv betrachtet $10,5 \pm 5,5$ (SW 7 – 20) Jahre vor Therapieeinstellung.

4.1.6 Auswertung der paraklinischen Befunde

Die Ausgangsuntersuchungen der paraklinischen Diagnostik (cMRT, MEP, SEP und VEP) erfolgten durchschnittlich $3,0 \pm 3,6$ (SW 0 - 21) Monate vor TPI. Die Verlaufsuntersuchungen erfolgten im Mittel fünfeinhalb Jahre ($65,7 \pm 19,1$ Monate; SW 27,4 - 88,6) nach TPI und zum überwiegenden Teil während der IFN- β -1b-Therapie. Um eine größere Anzahl von Patienten mit Verlaufsuntersuchungen zu erzielen, wurden von sechs Patienten Verlaufsuntersuchungen nach Beendigung der IFN- β -1b-Therapie ausgewertet (bei Pat 01, 02, 03 und 14: cMRT, MEP, SEP und VEP; bei Pat 17: SEP und bei Pat 20: VEP). Diese erfolgten im Mittel 2,6 Monate (SW 0,7 – 8) nach Beendigung der IFN- β -1b-Therapie. Außerdem wurden von zehn Patienten Verlaufsuntersuchungen zur Evaluation herangezogen, die erst nach dem 72. Nachbeobachtungsmonat erfolgten (bei Pat 01, 04, 05, 06, 09, 10, 12, 17 und 18: cMRT, MEP, SEP und VEP; bei Pat 24: cMRT). Insgesamt konnten so bei 20 Patienten

Vergleichspaare für die cMRT und VEP, bei 19 Patienten Vergleichspaare für die SEP und bei 17 Patienten Vergleichspaare für die MEP ermittelt und evaluiert werden. Zu den restlichen Patienten lagen entweder keine Ausgangsuntersuchungen oder keine paarigen Verlaufsuntersuchungen vor. Wurde bei einem Patienten mehr als eine Untersuchung unter Therapie ermittelt, so wurde jene mit dem größten zeitlichen Abstand zur TPI als Verlaufsuntersuchung gewählt.

Die cMRT-Ausgangsuntersuchung jener Patienten mit paariger Verlaufsuntersuchung (n=20) war bei allen Patienten pathologisch. Alle Patienten wiesen MS-typische T2-Läsionen auf. *Black holes* (35 %), Gd-anreichernde Herde (40 %) oder Atrophie-Zeichen (30 %) wurden weniger häufig beobachtet (Tab. 11). Die cMRT-Verlaufsuntersuchungen von zwölf Patienten (Pat 01, 02, 03, 04, 08, 09, 12, 14, 18, 19, 21 und 22) wiesen einen bildmorphologischen Progress hinsichtlich MS-typischer T2-Läsionen auf. Abweichend hierzu wurden drei dieser Patienten (Pat 12, 19 und 21) zum Zeitpunkt der cMRT-Verlaufsuntersuchung als Responder nach den klinischen Bewertungsscores (Responseklassifikationen EDSS und Schub) eingestuft. Bei drei Patienten (Pat 01, 22 und 23) wurden, korrelierend zur klinischen Symptomatik, Gd-anreichernde MS-Herde nachgewiesen. Bei elf Patienten (Pat 01, 02, 03, 10, 12, 17, 18, 19, 22, 23 und 24) wurden in der Verlaufs-cMRT *black holes* gesehen. Diese waren bei sechs Patienten (Pat 01, 10, 17, 19, 22 und 23) zum Zeitpunkt der Ausgangsuntersuchung noch nicht darstellbar. Bei zwei Patienten (Pat 14 und 21) waren hingegen in der Ausgangsuntersuchung darstellbare *black holes* in den Verlaufsuntersuchungen nicht mehr nachweisbar. Bei sechs Patienten (Pat 10, 15, 19, 20, 22 und 24) bestand in der Ausgangsuntersuchung eine kortikale Atrophie, die im Verlauf nicht progredient war. Neu aufgetretene Atrophiezeichen lagen bei zwei Patienten (Pat 12 und 18) in der Verlaufsuntersuchung vor. Bildmorphologisch wurden 75 % der Patienten nach der Responseklassifikation MRT als Non-Responder eingestuft. Dies bedeutet, dass in mindestens einer der ausgewerteten cMRT-Kategorien (T2, BH, Gd oder A) eine Verschlechterung in der Verlaufsuntersuchung bestand.

Zu 20 Patienten lagen paarige VEP-Verlaufsuntersuchungen, zu 19 Patienten paarige SEP-Verlaufsuntersuchungen und zu 17 Patienten paarige MEP-Verlaufsuntersuchungen vor. Die VEP-Ausgangsuntersuchungen waren bei 18 Patienten (90 %), die SEP-Ausgangsuntersuchungen bei 14 Patienten (~ 74 %) und die MEP-Ausgangsuntersuchungen bei 12 Patienten (~ 71 %) pathologisch. Bei den MEP und SEP wurden die Befunde an den „oberen Extremitäten“ (*Nervus medianus*-SEP bzw. MEP des *Musculus interosseus dorsalis I* bzw. des *Musculus abductor digiti minimi*) und „unteren Extremitäten“ (*Nervus tibialis*-SEP bzw. MEP des *Musculus tibialis anterior*) separat bewertet. Hierbei fiel auf, dass Befundverschlechterungen vor allem in den Messungen der „unteren Extremitäten“ auftraten (Tab. 12). Eine Verschlechterung der Befunde an den oberen oder unteren Extremitäten bei den MEP- bzw. SEP-Verlaufsuntersuchungen führte zur Einstufung als Non-Responder. Nach den Responsekriterien für die paraklinische Diagnostik wurden 50 % der Patienten

bei den VEP-Verlaufsuntersuchungen, ~ 58 % der Patienten bei den SEP und ~ 65 % der Patienten bei den MEP als Non-Responder eingestuft.

Von insgesamt 17 Patienten lagen paarige Verlaufsuntersuchungen der kompletten paraklinischen Diagnostik (cMRT, MEP, SEP und VEP) vor, wobei kein Patient in allen vier paraklinischen Untersuchungen als Responder eingestuft wurde. Nur zwei Patienten (Pat 08 und 17) wurden als Responder bei allen drei evozierten Potentialen eingestuft. Insgesamt besteht, gemessen an der paraklinischen Diagnostik, ein uneinheitliches Bild im Ansprechverhalten der Patienten auf die Therapie.

Tab. 11: Ergebnisse der cMRT-Auswertung.

cMRT-Vergleichspaare (n = 20)													
Patient		T2	BH	Gd	A	M-		T2	BH	Gd	A	M+	Klassifikation
1	Ausgangsuntersuchung	1	0	1	0	1	Verlaufsuntersuchung	↑	↑	↑	∅	83	NR
2		1	1	1	0	1		↑	∅	↓	∅	30	NR
3		1	1	1	0	8		↑	∅	↓	∅	35	NR
4		1	0	0	0	6		↑	∅	∅	∅	89	NR
5		1	0	1	0	5		∅	∅	↓	∅	78	R
6		1	0	0	0	4		∅	∅	∅	∅	78	R
8		1	0	0	0	1		↑	∅	∅	∅	55	NR
9		1	0	0	0	6		↑	∅	∅	∅	83	NR
10		1	0	0	1	1		∅	↑	∅	∅	75	NR
12		1	1	0	0	2		↑	∅	∅	↑	78	NR
14		1	1	0	0	14		↑	↓	∅	∅	39	NR
15		1	0	0	1	8		∅	∅	∅	∅	68	R
17		1	0	1	0	0		∅	↑	↓	∅	86	NR
18		1	1	1	0	21		↑	∅	↓	↑	79	NR
19		1	0	0	1	2		↑	↑	∅	∅	69	NR
20		1	0	1	1	1		∅	∅	↓	∅	29	R
21	1	1	0	0	4	↑	↓	∅	∅	71	NR		
22	1	0	0	1	3	↑	↑	↑	∅	50	NR		
23	1	0	0	0	7	∅	↑	↑	∅	76	NR		
24	1	1	1	1	1	∅	∅	↓	∅	57	R		
Verhältnis Responder (R) : Non-Responder (NR)												5 : 15	

Zu 20 Patienten lagen paarige Verlaufsuntersuchungen zu den Ausgangsuntersuchungen vor. Die cMRT-Ausgangsuntersuchungen waren bei allen 20 Patienten pathologisch. Die Ausgangsuntersuchungen erfolgten durchschnittlich fünf Monate vor der Therapieinitiierung (TPI). Die Verlaufsuntersuchungen erfolgten durchschnittlich 65 Monate nach TPI. Insgesamt 15 der 20 Patienten (75 %) wurden bildmorphologisch als Non-Responder eingestuft, d.h. es kam zu einer Verschlechterung in mindestens einer der ausgewerteten cMRT-Kategorien T2 (MS-typische T2-Läsionen), BH (*black holes*), Gd (Gadolinium-Anreicherung) oder A (cMRT-morphologische Hirnatrophie). 0 = physiologischer Ausgangsbefund, 1 = pathologischer Ausgangsbefund, ∅ = kein Befundwandel, ↑ = Verschlechterung, ↓ = Verbesserung, M- = Anzahl der Monate zwischen der Ausgangsuntersuchung und TPI, M+ = Anzahl der Monate zwischen TPI und der Verlaufsuntersuchung, n = Anzahl der Patienten mit paarigen Ausgangs- und Verlaufsuntersuchungen, NR = Non-Responder, R = Responder.

Tab. 12: Ergebnisse der Auswertung der evozierten Potentiale.

VEP-Vergleichspaare (n = 20)							
Patient		VEP	M-		VEP	M+	Klass.
1	Ausgangsuntersuchung	1	1	Verlaufsuntersuchung	↑	83	NR
2		1	1		↑	27	NR
3		1	2		↑	35	NR
4		0	1		↑	89	NR
5		1	0		↑	78	NR
6		1	5		∅	78	R
8		1	1		↓	55	R
9		1	6		↑	83	NR
10		1	1		↑	75	NR
12		1	1		↑	78	NR
14		1	2		∅	28	R
15		1	1		∅	71	R
17	1	2	↓	86	R		
18	1	12	↓	79	R		
19	1	2	∅	69	R		
20	0	1	∅	53	R		
21	1	2	↑	71	NR		
22	1	3	↓	50	R		
23	1	6	∅	53	R		
24	1	1	↑	57	NR		
Verhältnis R : NR					10 : 10		

SEP-Vergleichspaare (n = 19)									
Patient		OE	UE	M-		OE	UE	M+	Klass.
1	Ausgangsuntersuchung	0	1	1	Verlaufsuntersuchung	∅	∅	83	R
2		1	1	1		∅	↑	27	NR
3		0	1	2		↑	↑	35	NR
4		0	1	1		∅	↑	89	NR
5		0	1	0		∅	↑	78	NR
6		0	0	5		∅	↑	78	NR
8		0	1	1		∅	∅	55	R
9		0	0	6		↑	↑	83	NR
10		0	1	1		∅	∅	75	R
12		1	1	1		↓	↓	78	R
14		1	1	2		↑	↓	28	NR
15		1	1	1		∅	↑	71	NR
17	0	0	2	∅	∅	86	R		
18	0	1	12	∅	∅	79	R		
19	1	1	2	∅	∅	69	R		
20									
21	0	0	2	∅	∅	71	R		
22	0	0	3	↑	↑	50	NR		
23	1	1	6	∅	↑	53	NR		
24	0	1	1	∅	↑	57	NR		
Verhältnis R : NR					8 : 11				

MEP-Vergleichspaare (n = 17)									
Patient		OE	UE	M-		OE	UE	M+	Klass.
1	Ausgangsuntersuchung	1	1	1	Verlaufsuntersuchung	↓	∅	83	R
2		1	1	1		∅	↑	27	NR
3		1	1	2		∅	↓	35	R
4		0	1	1		∅	∅	89	R
5		1	0	0		∅	↑	78	NR
6		0	0	5		∅	↑	78	NR
8		0	0	1		∅	∅	55	R
9		0	0	6		↑	↑	83	NR
10		1	1	1		∅	↑	75	NR
12		1	1	1		↓	↓	78	R
14		1	1	2		↑	↑	28	NR
15		1	1	1		↑	↑	71	NR
17	0	0	2	∅	∅	86	R		
18	1	1	12	↑	↑	79	NR		
19	1	1	2	↑	↑	69	NR		
20									
21	0	0	2	∅	↑	71	NR		
22									
23									
24	0	1	1	↑	↓	57	NR		
Verhältnis R : NR					6 : 11				

Die VEP-Ausgangsuntersuchungen waren bei 18 Patienten (90 %), die SEP-Ausgangsuntersuchungen bei 14 Patienten (~ 74 %) und die MEP-Ausgangsuntersuchungen bei 12 Patienten (~ 71 %) pathologisch. Nach den Responsekriterien für die paraklinische Diagnostik wurden 50 % der Patienten bei den VEP, ~ 58 % der Patienten bei den SEP und ~ 65 % der Patienten bei den MEP als Non-Responder eingestuft. 0 = physiologischer Ausgangsbefund, 1 = pathologischer Ausgangsbefund, ∅ = kein Befundwandel, ↑ = Verschlechterung, ↓ = Verbesserung, Klass. = Klassifikation, M- = Anzahl der Monate zwischen der Ausgangsuntersuchung und der Therapieinitiierung (TPI), M+ = Anzahl der Monate zwischen TPI und der Verlaufsuntersuchung, n = Anzahl der Patienten mit paarigen Ausgangs- und Verlaufsuntersuchungen, NR = Non-Responder, OE = obere Extremitäten, R = Responder, UE = untere Extremitäten.

4.1.7 Vergleichende Gegenüberstellung der klinischen und paraklinischen Non-Responder

Bei einer vergleichenden Gegenüberstellung der klinischen und paraklinischen Befunde wurden jene Patienten berücksichtigt, die paraklinische Verlaufsuntersuchungen aufwiesen und entweder in der jeweiligen paraklinischen Untersuchung oder bei der zeitgleich erfolgten klinischen Evaluation (Responseklassifikation EDSS bzw. Schub) als Non-Responder eingestuft wurden. Es fiel ein deutliches Überwiegen der als cMRT-Non-Responder eingestuften Patienten gegenüber den als Non-Responder nach den klinischen Bewertungsscores (Responseklassifikationen EDSS bzw. Schub) eingestuften Patienten auf. Außerdem überwog die Anzahl der nach den klinischen Bewertungsscores eingestuften Non-Responder gegenüber den VEP-Non-Respondern bzw. SEP-Non-Respondern (Abb. 11). Die cMRT scheint demnach einen restriktiveren Parameter zur Einschätzung des klinischen Krankheitsverlaufs darzustellen als die klinischen Bewertungsscores. Außerdem scheinen die klinischen Bewertungsscores, insbesondere die Responseklassifikation Schub, sensiblere Parameter zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs darzustellen, als die Ergebnisse der paraklinischen Untersuchungen VEP und SEP. Insgesamt bestand eine relativ große Schnittmenge zwischen den nach den klinischen Bewertungsscores als Non-Responder eingestuften Patienten und den in den paraklinischen Untersuchungen als Non-Responder eingestuften Patienten, insbesondere mit den cMRT-Non-Respondern und SEP-Non-Respondern.

4.1.8 Nebenwirkungen

Mit Ausnahme von vier Patienten (Pat 01, 05, 20 und 23) traten unter IFN- β -1b-Therapie bei allen Patienten während der sechsjährigen Nachbeobachtung Nebenwirkungen unterschiedlicher Art (A) und Intensität (I) auf. Die Schweregrade der Art (A0-A3) und der Intensität (I0-I3) der Nebenwirkungen wurden mit 0 bis 3 eingestuft (Tab. 6). Das erste Behandlungsjahr wurde in zwei Halbjahre untergliedert, um auftretende Nebenwirkungen kurz nach Therapiebeginn besser von später auftretenden Nebenwirkungen abgrenzen zu können. Die übrigen Nachbeobachtungsintervalle spiegeln jeweils ein Therapiejahr wider. Die folgenden zwei Abbildungen (Abb. 12 und 13) zeigen die Häufigkeit der aufgetretenen Nebenwirkungen unter Therapie mit IFN- β -1b. Eine detaillierte Einstufung der Nebenwirkungen für jeden einzelnen Patienten ist in Suppl.-Tab. 7 aufgeführt.

Auffällig ist eine relative Häufung grippeähnlicher Nebenwirkungen (A2) während des ersten Behandlungshalbjahres (elf Patienten, 44 %). In allen späteren Nachbeobachtungszeiträumen traten grippeähnliche Nebenwirkungen deutlich seltener auf (~ 10 %). Eine symptomatische Begleitmedikation mit Ibuprofen oder Paracetamol (I2) war lediglich bei zwei Patientinnen (Pat 02 und 24) über die ersten sechs Behandlungsmonate hinaus erforderlich (Abb. 13). Bei der einen Patientin (Pat 02) traten unter fortlaufender Begleitmedikation bis zur Beendigung der Therapie nach zwei Jahren grippeähnliche Nebenwirkungen auf. Die zweite Patientin (Pat 24) beanspruchte lediglich

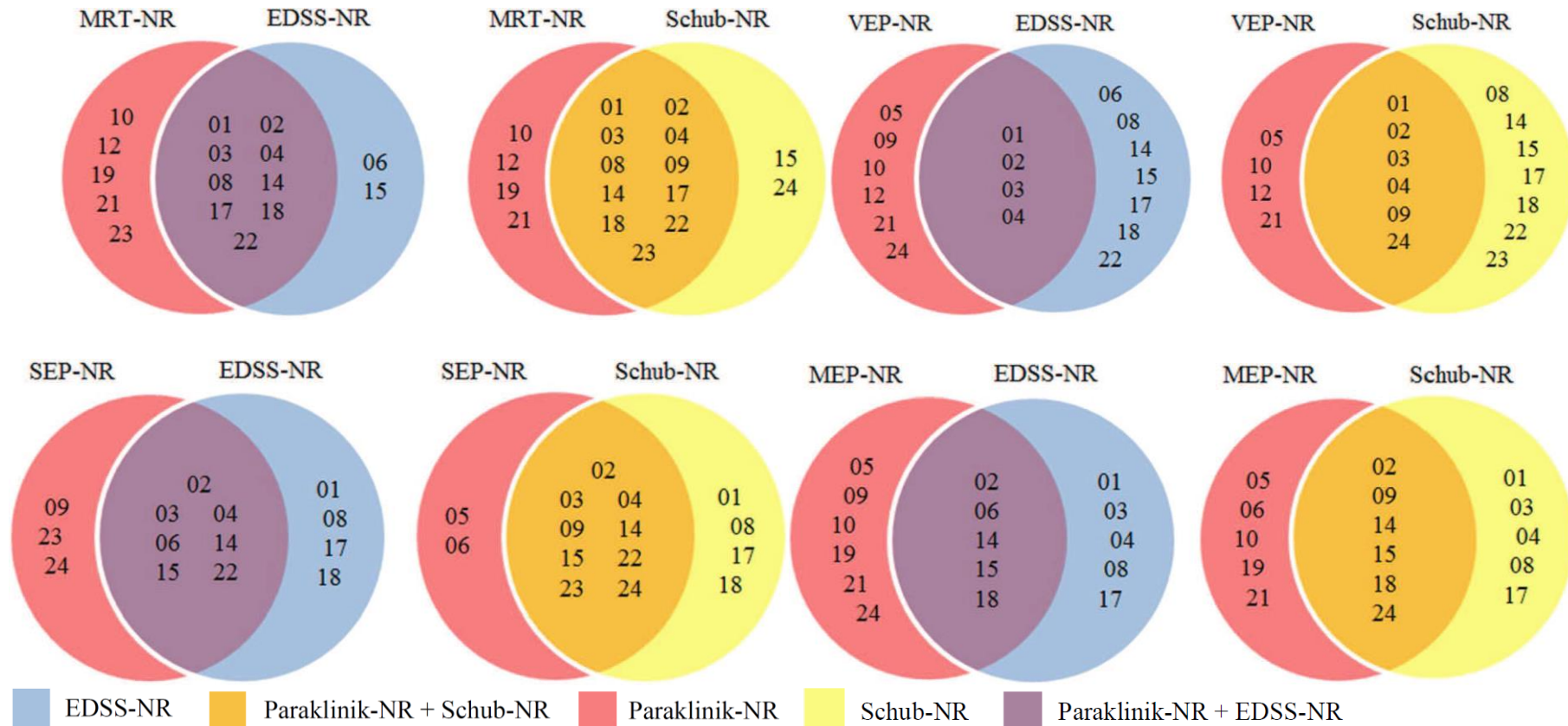


Abb. 11: Vergleich der klinischen und paraklinischen Non-Responder.

Vergleichende Gegenüberstellung der Patienten (mit Ziffern bezeichnet), die nach der Responseklassifikation EDSS bzw. Schub zum Zeitpunkt der paraklinischen Verlaufsuntersuchung als Non-Responder (NR) eingestuft wurden mit den Non-Respondern der paraklinischen Untersuchungen (cMRT, VEP, SEP, MEP). Die Anzahl der cMRT-Non-Responder ist höher als die Anzahl der EDSS-Non-Responder bzw. Schub-Non-Responder. Demnach scheint die cMRT einen sensibleren Parameter zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs darzustellen als die klinischen Bewertungsscores. Die klinischen Bewertungsscores scheinen hingegen einen sensibleren Parameter zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs darzustellen als die VEP und SEP. Auffällig sind jedoch relativ große Schnittmengen zwischen den nach den klinischen Bewertungsscores und den cMRT und SEP als Non-Responder eingestuften Patienten.

im zweiten Behandlungsjahr eine Begleitmedikation und wurde insgesamt knapp fünf Jahre mit IFN- β -1b behandelt. Da während der Einstellungsphase auf IFN- β -1b alle Patienten zunächst mit Ibuprofen oder Paracetamol behandelt wurden, blieb das erste Behandlungshalbjahr bei der Frage nach einer erforderlichen Begleitmedikation unberücksichtigt. Ab dem dritten Therapiejahr traten keine Nebenwirkungen mehr auf, die eine Begleitmedikation erforderten (I2).

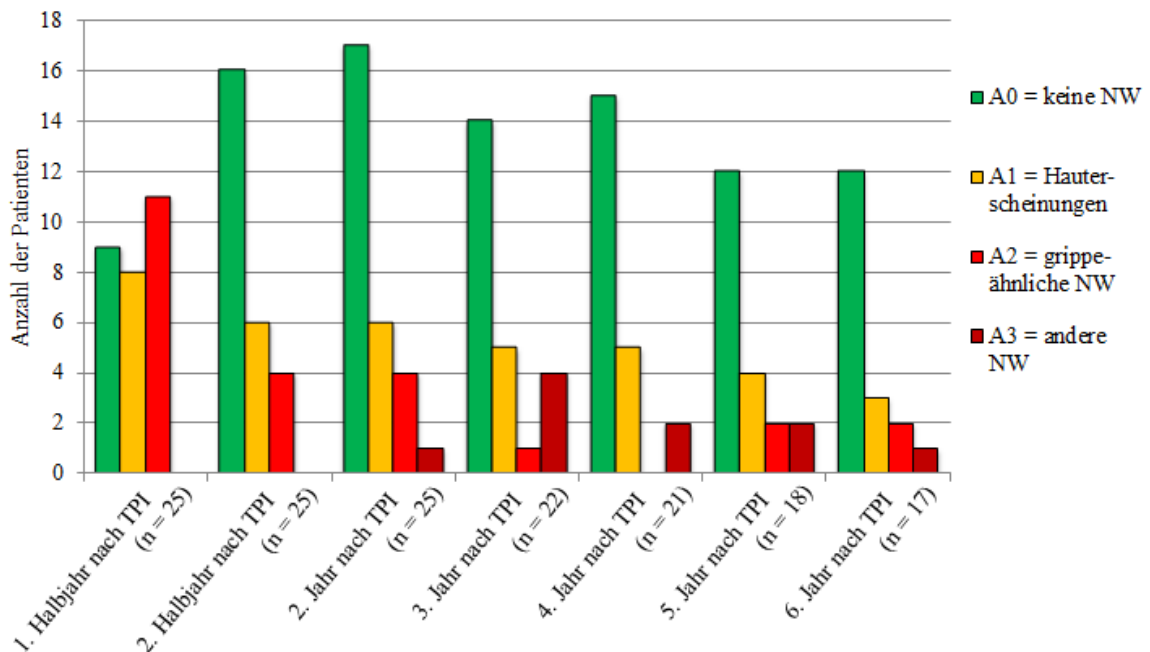


Abb. 12: Art der Nebenwirkungen der Patienten unter IFN- β -1b-Therapie.

Die Art (A) der Nebenwirkungen (NW) ist in den Farben einer Verkehrsampel für A0 bis A3 dargestellt. Die Balkenhöhe entspricht der Anzahl (n) der Patienten mit der jeweilig eingestuft Art der Nebenwirkung pro Zeitraum. Unterhalb der Bezeichnung der Beobachtungszeiträume steht in Klammern die Anzahl der pro Beobachtungszeitraum mit Interferon (IFN)- β -1b behandelten Patienten. Traten im ersten Behandlungshalbjahr noch relativ häufig Nebenwirkungen der Klassifikationen A1 und A2 auf, so blieben diese in den Folgejahren auf relativ niedrig-konstantem Niveau. Insbesondere im Langzeitverlauf wurde die IFN- β -1b relativ nebenwirkungsarm toleriert. TPI = Therapieinitiierung.

Hauterscheinungen im Injektionsareal (A1) wurden während der gesamten Nachbeobachtungsphase dokumentiert (Abb. 12). Während des ersten Behandlungshalbjahres kam es bei rund einem Drittel der Patienten zu als A1 eingestuften Nebenwirkungen. Während nachfolgender Nachbeobachtungszeiträume (zweites Halbjahr nach TPI bis sechstes Jahr nach TPI) wurden A1-Nebenwirkungen von im Mittel 22 % der Patienten berichtet. Als A3 eingestufte Nebenwirkungen (Transaminasenanstieg, Spritzenphobie) wurden ab dem zweiten Jahr nach TPI bei insgesamt fünf Patienten (Pat 03, 04, 06, 10 und 19) dokumentiert. Bei einer Patientin (Pat 04) wurde während des dritten und vierten Jahres nach TPI eine Spritzenphobie dokumentiert. Sie wurde über die sechs Jahre dauernde Nachbeobachtungszeit durchgängig mit IFN- β -1b therapiert. Bei den übrigen Patienten (Pat 03, 06, 10 und 19) traten Transaminasenanstiege unterschiedlicher Ausprägung im

Behandlungsverlauf auf. Die Transaminasenanstiege führten bei keinem der Patienten zum Therapieabbruch.

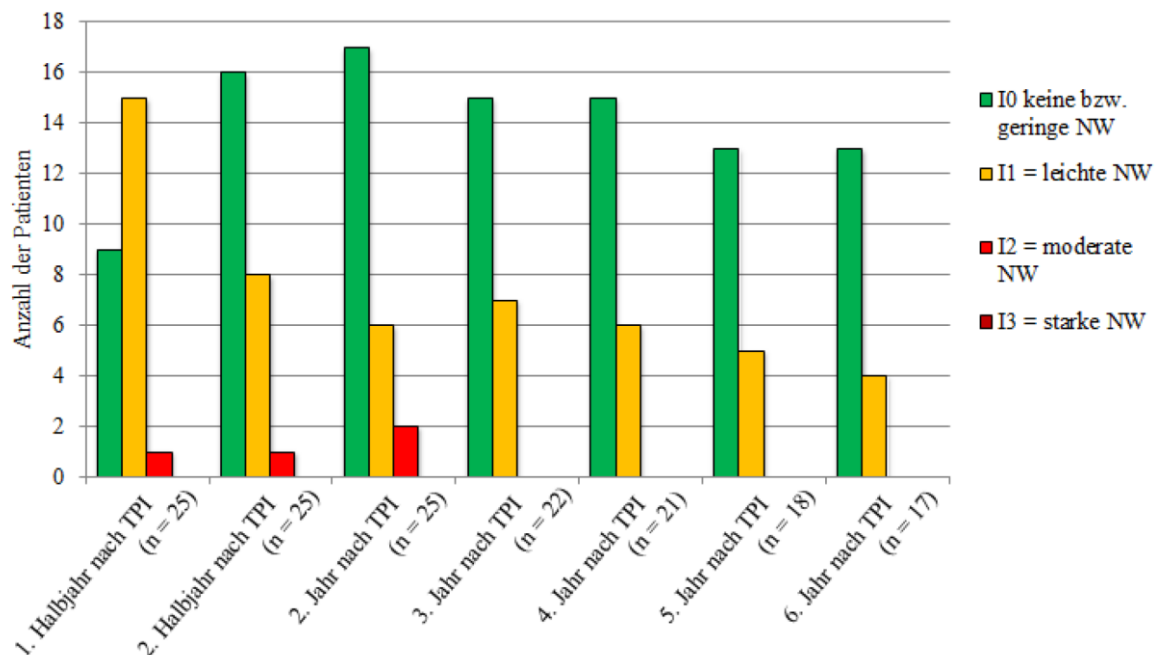


Abb. 13: Intensität der Nebenwirkungen der Patienten unter IFN-β-1b-Therapie.

Die Intensität (I) der Nebenwirkungen (NW) ist mit I0 bis I3 pro Zeitraum beziffert. Die Balkenhöhe visualisiert die Anzahl (n) der Patienten mit der jeweilig eingestuften Intensität der NW pro Zeitraum. In Klammern ist unterhalb der Bezeichnung der Beobachtungszeiträume die Anzahl der pro Beobachtungszeitraum mit Interferon (IFN)-β-1b behandelten Patienten vermerkt. Insgesamt wurde IFN-β-1b über die sechsjährige Nachbeobachtungsphase gut toleriert. Moderate NW (I2), die eine Begleitmedikation über das erste Behandlungshalbjahr erforderten, traten nur bei zwei Patienten auf. TPI = Therapieinitiierung.

4.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden per Oligonukleotid-Microarrays in PBMC Gene als unter Therapie differentiell exprimiert identifiziert. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sowie die Ergebnisse der Analysen der Geninteraktionen und Genfunktionen von differentiell exprimierten Genen wiedergegeben.

4.2.1 Unter Therapie differentiell exprimierte Gene

Anhand der im Methodenteil beschriebenen Filterkriterien (Kap. 3.4.3 – 3.4.4) wurden die Expressionsdaten zu den 125 PBMC-Proben der 25 MS-Patienten über die Zeitpunktvorgleiche TPI vs. D2, M1, M12 und M24 auf signifikante Genexpressionsänderungen als Reaktion auf die zweitägig applizierte IFN-β-1b-Therapie (250 µg) analysiert. Die einzelnen Subtraktionsschritte bei der Berechnung der DEG sind in Abb. 14 dargestellt. Nach zwei Tagen (D2) waren im Vergleich zur TPI 42 Gene differentiell exprimiert (38 ↑ (= hochreguliert) und vier ↓ (= herunterreguliert)). Nach einem Monat (M1), zwölf Monaten (M12) und 24 Monaten (M24) waren im Vergleich zur TPI 175 (117 ↑, 58 ↓), 103 (85 ↑, 18 ↓) bzw. 108 (79 ↑, 29 ↓) Gene differentiell exprimiert. Auffällig ist eine deutlich

höhere Anzahl DEG zu den Zeitpunktvergleichen TPI vs. M1, M12 und M24 verglichen mit dem Zeitpunktvergleich TPI vs. D2. Des Weiteren fällt ein deutliches Überwiegen der Anzahl hochregulierter Gene gegenüber der Anzahl herunterregulierter Gene auf.

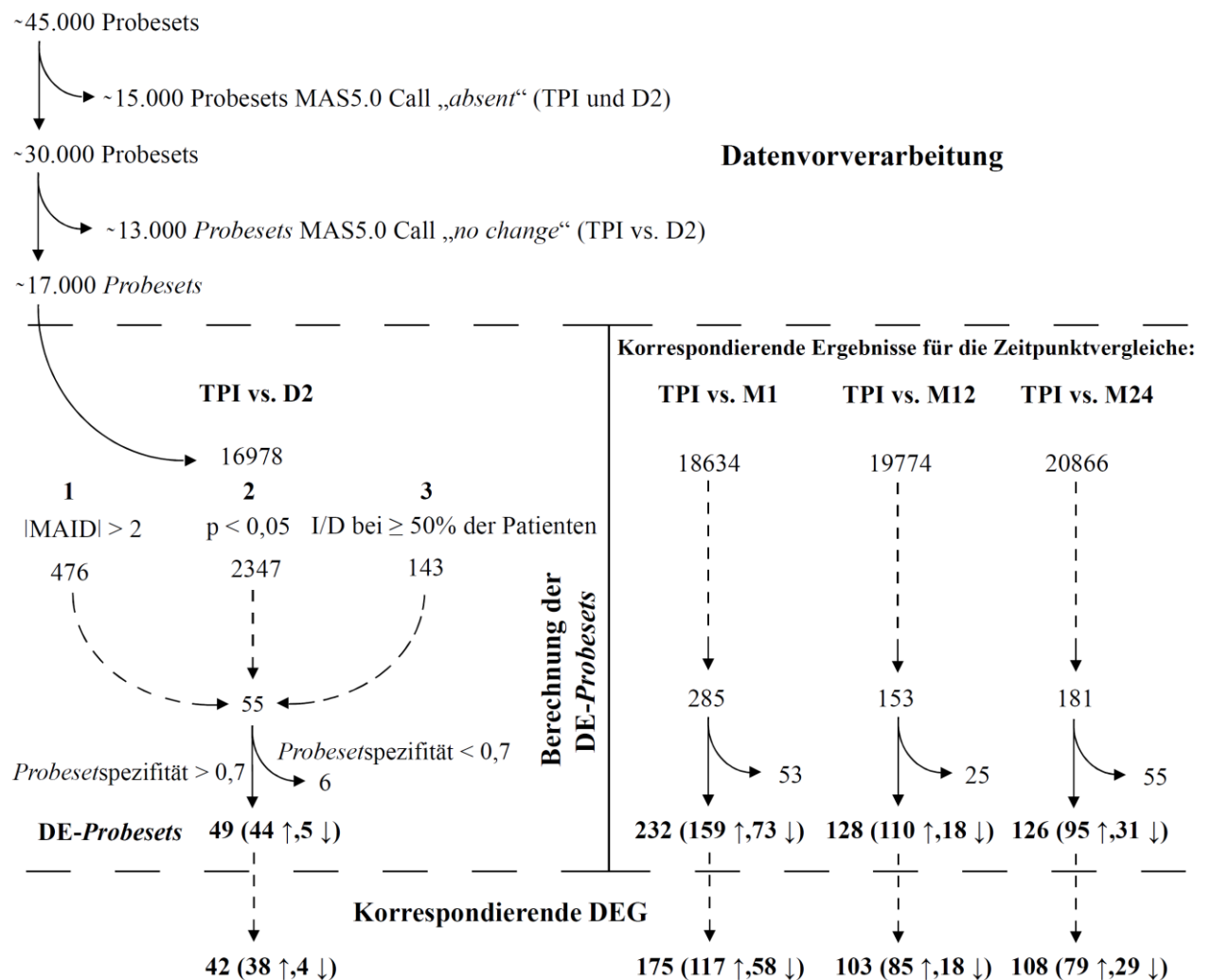


Abb. 14: Überblick der einzelnen Filterschritte zur Berechnung der DEG der vier Zeitpunktvergleiche TPI vs. D2, M1, M12 und M24 (mod. nach Goertsches et al. 2010).

Zur Berechnung der DEG erfolgten insgesamt sechs Filterschritte (Kap. 3.4.3 – 3.4.4). Da einige *Probesets* für das gleiche Gen spezifisch sind, übersteigt die Anzahl der gefilterten *Probesets* (DE-*Probesets*) die Anzahl der DEG. Zum Zeitpunktvergleich TPI vs. D2 war die Anzahl der DEG verhältnismäßig niedrig. Die Anzahl der DEG lag bei TPI vs. M1 am höchsten. Es waren zu allen Zeitpunktvergleichen mehr DEG hochreguliert als herunterreguliert. ↑ = hochregulierte DE-*Probesets*/DEG, ↓ = herunterregulierte DE-*Probesets*/DEG, D = MAS5.0 Call *Decrease*, I = MAS5.0 Call *Increase*. DEG = differentiell exprimierte Gene. TPI = Therapieinitiiierung, zwei Tage (D2), ein Monat (M1), ein Jahr (M12) und zwei Jahre (M24) nach TPI.

Eine detaillierte Aufschlüsselung der differentiell exprimierten *Probesets* und der korrespondierenden DEG ist im Supplement der Publikation „Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN-β-1b treatment in relapsing remitting MS“ (Goertsches et al. 2010) der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock aufgeführt.

Die Vereinigungsmenge der DEG aller Zeitpunktvergleiche (TPI vs. D2, M1, M12 und M24) umfasste 269 DEG (171 hoch- und 96 herunter- und zwei hoch- wie herunterregulierte Gene). Von den 269 DEG waren 19 Gene zu allen vier Zeitpunktvergleichen differentiell exprimiert (18 Gene waren hochreguliert und ein Gen war herunterreguliert) (Tab. 13).

Tab. 13: Vereinigungs- und Schnittmenge der DEG aller Zeitpunktvergleiche (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Vereinigungsmenge der DEG aller Zeitpunktvergleiche	269 Gene
Schnittmenge der DEG aller Zeitpunktvergleiche	19 (18↑, 1↓)
Gensymbole der zu allen Zeitpunktvergleichen hochregulierten DEG	
APOBEC3A, CMPK2, EIF2AK2, EPSTI1, FFAR2, HERC5, IFI44, IFI44L, IFIT1, IFIT2, IFIT3, ISG15, LY6E, MX1, OAS2, OAS3, RSAD2, SIGLEC1	
Gensymbole der zu allen Zeitpunktvergleichen herunterregulierten DEG	
FCER1A	

Von den insgesamt 269 differentiell exprimierten Genen (DEG) waren 19 Gene zu allen vier Zeitpunktvergleichen (TPI vs. D2, M1, M12 und M24) differentiell exprimiert. FCER1A war hierbei als einziges Gen stets herunterreguliert. D2 = zwei Tage nach Therapieinitiierung (TPI), M1 = ein Monat nach TPI, M12 = ein Jahr nach TPI, M24 = zwei Jahre nach TPI, ↓ = herunterregulierte Gene, ↑ = hochregulierte Gene.

Die MAID-Scores der 19 zu allen Zeitpunktvergleichen DEG sind in Abb. 15 dargestellt. Das Gen FCER1A war als einziges DEG stets herunterreguliert. Den größten transkriptionellen Effekt schien die applizierte IFN- β -1b-Therapie zum Zeitpunkt M1 zu haben. Zu diesem Zeitpunkt waren die Expressionsunterschiede der DEG im Vergleich zu TPI am größten. Eine Ausnahme hierzu stellte FFAR2 dar. Dieses Gen war erst zum Zeitpunkt M12 am stärksten hochreguliert. Die mittleren Expressionswerte der 19 zu allen Zeitpunktvergleichen DEG sind in Suppl.-Tab. 8 aufgeführt.

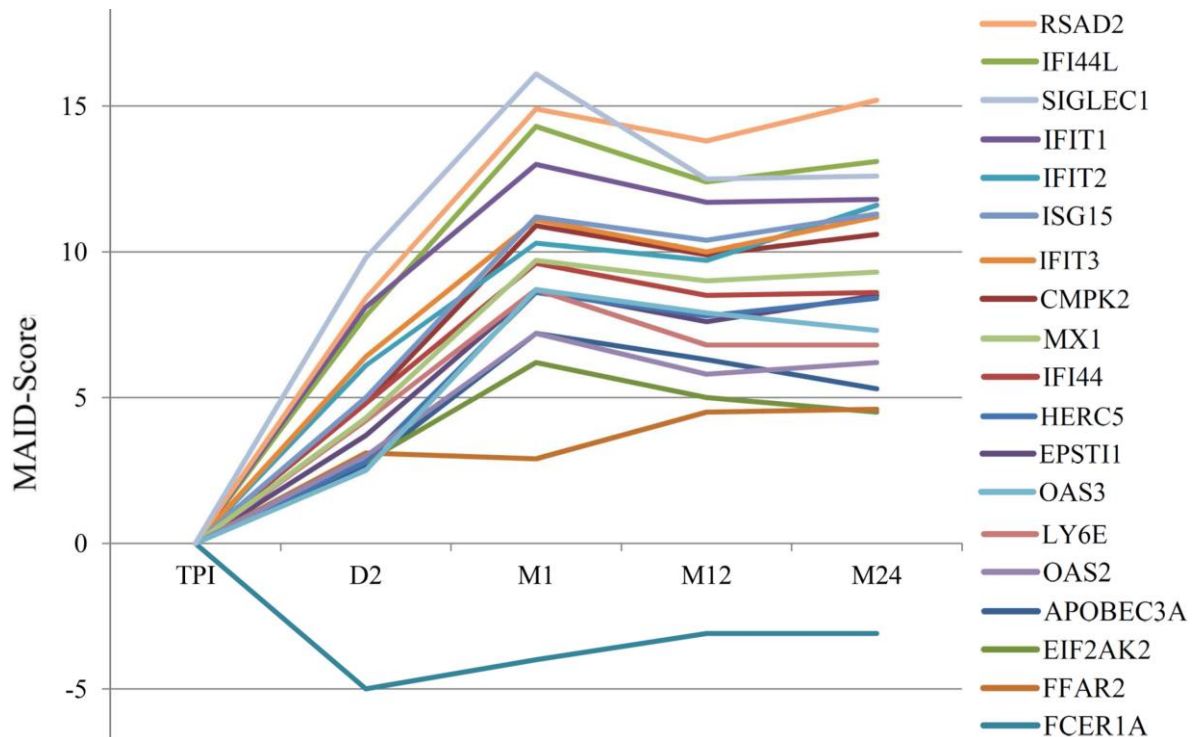


Abb. 15: Die MAID-Scores der 19 stets DEG (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Hochregulierte Gene weisen positive, herunterregulierte Gene negative MAID-Scores auf. Der Absolutbetrag des MAID-Scores eines Gens ist umso höher, je mehr sich die Expression gegenüber dem Ausgangswert verändert hat, und er ist im Allgemeinen geringer für schwach exprimierte Gene. Nach einem Monat Therapie (M1) waren 17 der 19 zu allen Zeitpunktvergleichen DEG am stärksten differentiell exprimiert. DEG = differentiell exprimierte Gene, D2 = zwei Tage nach Therapieinitiierung (TPI), M1 = ein Monat nach TPI, M12 = ein Jahr nach TPI, M24 = zwei Jahre nach TPI.

4.2.2 Validierung der unter Therapie DEG mit quantitativer rt-PCR

Von den 19 zu allen vier Zeitpunktvergleichen DEG wurde die mRNA-Expression von 15 Genen in den PBMC-Proben für den Zeitpunktvergleich TPI vs. M1 mittels der quantitativen rt-PCR nachgemessen. Dies erfolgte bei insgesamt 18 der insgesamt 25 Patienten. Hierdurch wurden die Genexpressionsänderungen der 15 nachuntersuchten Gene für den Zeitpunktvergleich TPI vs. M1 validiert (14 hoch- und ein herunterreguliertes Gen). Mit Ausnahme des Gens EPSTI1 korrelierten die gemessenen Transkriptspiegel der Microarraydaten und der rt-PCR-Nachuntersuchung hochsignifikant miteinander (Tab. 14). Insgesamt bestand eine hohe Qualität der gewonnenen Microarray-Daten.

Tab. 14: Vergleich der Ergebnisse der Microarrays und der quantitativen rt-PCR (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Gensymbol	Microarraydaten von 18 Patienten				rtPCR-Daten von 18 Patienten				Korrelationskoeffizient rtPCR vs. Microarray	
	MW TPI	MW M1	t-Test p-Wert M1 vs. TPI	Regulation zu M1	MW TPI	MW M1	t-Test p-Wert M1 vs. TPI	Regulation zu M1	Pearson r	Pearson p-Wert
APOBEC3A	911	2762	$4,1 \times 10^{-6}$	↑	314	1062	$8,7 \times 10^{-6}$	↑	0,86	$2,5 \times 10^{-11}$
CMPK2	2616	11438	$2,2 \times 10^{-8}$	↑	37	184	$4,2 \times 10^{-6}$	↑	0,82	$8,0 \times 10^{-10}$
EPSTI1	3482	10646	$1,6 \times 10^{-7}$	↑	93	428	$2,0 \times 10^{-16}$	↑	0,32	0,056
FCER1A	1285	684	$6,0 \times 10^{-5}$	↓	28	19	$2,0 \times 10^{-16}$	↓	0,85	$7,9 \times 10^{-11}$
HERC5	486	1749	$1,3 \times 10^{-5}$	↑	39	183	$6,3 \times 10^{-6}$	↑	0,96	$2,0 \times 10^{-16}$
IFI44	851	4360	$1,6 \times 10^{-14}$	↑	27	243	$4,3 \times 10^{-11}$	↑	0,88	$2,0 \times 10^{-16}$
IFI44L	618	4653	$3,0 \times 10^{-8}$	↑	22	292	$2,0 \times 10^{-6}$	↑	0,87	$8,4 \times 10^{-12}$
IFIT1	555	3548	$4,0 \times 10^{-7}$	↑	4	28	$2,0 \times 10^{-16}$	↑	0,80	$7,2 \times 10^{-9}$
IFIT2	1770	7285	$1,4 \times 10^{-5}$	↑	218	638	$2,0 \times 10^{-16}$	↑	0,67	$9,6 \times 10^{-6}$
IFIT3	705	3477	$7,2 \times 10^{-7}$	↑	45	362	$4,5 \times 10^{-6}$	↑	0,93	$2,2 \times 10^{-16}$
ISG15	1416	6949	$9,4 \times 10^{-8}$	↑	28	187	$8,5 \times 10^{-7}$	↑	0,93	$2,0 \times 10^{-16}$
LY6E	1259	4273	$6,7 \times 10^{-8}$	↑	241	1021	$1,6 \times 10^{-7}$	↑	0,89	$3,6 \times 10^{-13}$
MX1	1710	6700	$1,8 \times 10^{-8}$	↑	186	967	$4,7 \times 10^{-7}$	↑	0,94	$2,0 \times 10^{-16}$
RSAD2	1010	7587	$1,9 \times 10^{-6}$	↑	124	452	$2,0 \times 10^{-16}$	↑	0,76	$7,5 \times 10^{-8}$
SIGLEC1	152	2117	$7,9 \times 10^{-8}$	↑	52	548	$9,9 \times 10^{-5}$	↑	0,85	$6,1 \times 10^{-11}$

Bei 18 Patienten wurden die Messergebnisse von 15 der 19 stets in der MA-Analyse differentiell exprimierten Gene (DEG) mit den Messergebnissen der rt-PCR-Analyse für den Zeitpunktvergleich Therapieinitiation (TPI) vs. einen Monat nach TPI (M1) verglichen. Zur Korrelation wurde der Pearson Korrelationskoeffizient r (Pearson r) und das dazu gehörige Signifikanzniveau (Pearson p -Wert) verwendet, wobei ein p -Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Danach korrelierten bei 14 der 15 nachuntersuchten Gene (Ausnahme EPSTI1, Pearson p -Wert braun markiert) die Microarray-Daten und die rt-PCR-Daten signifikant. Anhand paariger t-Tests (t-Test p -Wert M1 vs. TPI) wurde die Expression jedes der 15 Gene zu den Zeitpunkten TPI und M1 verglichen. Signifikant hoch- (↑) bzw. herunterreguliert (↓) Gene besitzen einen p -Wert $< 0,05$. Die Genexpressionsänderungen aller 15 nachgemessenen Gene konnten so validiert werden. MW = Mittelwert.

4.2.3 Biologische Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG

Um die Genfunktionen der 173 hochregulierten DEG zu beschreiben, erfolgte eine GO-Analyse (Kap. 3.4.6). Es wurden hierbei vier Genlisten, jeweils bestehend aus den hochregulierten DEG zu den vier Zeitpunkten D2, M1, M12 und M24, durch die GOSTATS-Software auf überrepräsentierte Genfunktionen der GO-Kategorie „*biological process*“ überprüft. Die Ergebnisse der GO-Analyse zeigen somit GO-Terme, die besonders typisch für die vier Genlisten sind ($p\text{-Wert} < 0,01$ in allen vier GO-Analysen). Sie sind in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Signifikant überrepräsentierte GO-Terme der GO-Kategorie *biological process* der hochregulierten differentiell exprimierten Gene zu den Zeitpunkten D2, M1, M12 und M24 (mod. nach Goertsches et al. 2010).

Biological process	Zeitpunkt	Anzahl	Erwartete Anzahl	p-Wert
<i>Response to stimulus</i>	D2	17	5,96	$1,6 \times 10^{-5}$
	M1	44	15,51	$4,7 \times 10^{-12}$
	M12	40	12,10	$6,7 \times 10^{-14}$
	M24	29	10,91	$1,2 \times 10^{-7}$
<i>Immune system process</i>	D2	9	2,13	$1,8 \times 10^{-4}$
	M1	24	5,53	$5,5 \times 10^{-10}$
	M12	23	4,31	$1,2 \times 10^{-11}$
	M24	15	3,89	$4,8 \times 10^{-6}$
<i>Immune response</i>	D2	8	1,61	$1,5 \times 10^{-4}$
	M1	22	4,20	$9,7 \times 10^{-11}$
	M12	21	3,28	$3,9 \times 10^{-12}$
	M24	14	2,95	$9,6 \times 10^{-7}$
<i>Defense response</i>	D2	9	1,46	$9,5 \times 10^{-6}$
	M1	21	3,79	$1,0 \times 10^{-10}$
	M12	16	2,96	$2,5 \times 10^{-8}$
	M24	9	2,67	$1,3 \times 10^{-3}$
<i>Multiorganism process</i>	D2	5	0,76	$8,6 \times 10^{-4}$
	M1	18	1,96	$6,7 \times 10^{-13}$
	M12	17	1,53	$1,0 \times 10^{-13}$
	M24	15	1,38	$4,3 \times 10^{-12}$
<i>Response to biotic stimulus</i>	D2	5	0,67	$4,9 \times 10^{-4}$
	M1	19	1,74	$5,5 \times 10^{-15}$
	M12	16	1,35	$2,3 \times 10^{-13}$
	M24	15	1,22	$7,1 \times 10^{-13}$
<i>Response to other organism</i>	D2	5	0,47	$9,9 \times 10^{-5}$
	M1	17	1,23	$3,5 \times 10^{-15}$
	M12	16	0,96	$9,8 \times 10^{-16}$
	M24	15	0,86	$4,3 \times 10^{-15}$
<i>Response to virus</i>	D2	5	0,25	$5,0 \times 10^{-6}$
	M1	17	0,66	$6,8 \times 10^{-20}$
	M12	16	0,52	$3,5 \times 10^{-20}$
	M24	15	0,47	$3,0 \times 10^{-19}$

Es zeigte sich, dass mehr Gene mit den aufgeführten Termen der GO-Kategorie *biological process* assoziiert sind, als zufällig erwartet worden wäre (Anzahl vs. erwartete Anzahl). Die Tabelle zeigt biologische Prozesse, bei denen die unter Interferon- β -1b-Therapie hochregulierten Gene typischerweise partizipieren. D2 = zwei Tage nach Therapieinitiierung (TPI), M1 = ein Monat nach TPI, M12 = ein Jahr nach TPI, M24 = zwei Jahre nach TPI.

In Tab. 16 sind exemplarisch die Gensymbole der hochregulierten DEG des GO-Terms „*response to stimulus*“ getrennt für die vier Zeitpunktvergleiche aufgelistet. Die Genlisten der anderen in Tab. 15 aufgeführten GO-Terme sowie weitere Ergebnislisten der GO-Analyse, wie für die herunterregulierten Gene, sind im *Supplementary Table 5* der Publikation „*Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN- β -1b treatment in relapsing remitting MS*“ (Goertsches *et al.* 2010) der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock aufgeführt. Zum überwiegenden Anteil repräsentieren die gefilterten hochregulierten DEG bekannte IFN-stimulierte Gene (ISG) mit antiviralen Eigenschaften (Kap. 5.3.3).

Tab. 16: Auflistung der hochregulierten DEG des GO-Terms „*response to stimulus*“ zu den vier Zeitpunktvergleichen TPI vs. D2, M1, M12 und M24 (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Zeitpunktvergleich TPI vs. D2 (n=17)	Zeitpunktvergleich TPI vs. M1 (n=41)
C1QA, C1QB, CD163, CLU, EIF2AK2, IFI44, IFI6, IL1R2, ISG15, LY6E, MX1, OAS2, OAS3, PTGDS, RSAD2, SIGLEC1, TNFAIP6	BAFF, BST2, C3AR1, CCL2, CCR1, CXCL10, CYSLTR1, DDX58, EIF2AK2, GBP1, HPSE, IFI16, IFI35, IFI44, IFI6, IFIH1, IFITM1, IL1RN, IRF7, ISG15, ISG20, LGALS3BP, LY6E, MX1, MX2, NMI, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLSCR1, PRF1, RSAD2, RTP4, SERPING1, SIGLEC1, STAT1, TAP1, TLR7, TNFSF10, TOR1B
Zeitpunktvergleich TPI vs. M12 (n=40)	Zeitpunktvergleich TPI vs. M24 (n=29)
ADM, AQP9, BAFF, C3AR1, CCR1, CLEC4E, DDX58, EIF2AK2, FCAR, FPR1, GBP1, HPSE, IFI16, IFI35, IFI44, IFI6, IFIH1, IL1RN, IRF7, ISG15, ISG20, LGALS3BP, LILRB2, LY6E, MX1, MX2, NFIL3, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLSCR1, SAD2, SERPING1, SIGLEC1, STAT1, TNFAIP6, TNFSF10, TRIM22, TYMP	BAFF, BST2, CCR1, CYSLTR1, DDX58, EIF2AK2, FAS, IFI16, IFI35, IFI44, IRF7, IRF9, ISG15, ISG20, LILRB2, LY6E, MX1, MX2, OAS1, OAS2, OAS3, OASL, PLSCR1, RSAD2, RTP4, SIGLEC1, STAT2, TNFSF10, TREM1

DEG = differentiell exprimierte Gene, D2 = zwei Tage nach Therapieinitiation (TPI), M1 = ein Monat nach TPI, M12 = ein Jahr nach TPI, M24 = zwei Jahre nach TPI.

4.2.4 Geninteraktionen der unter Therapie differentiell exprimierten Gene

Die 269 DEG wurden mit der *Pathway Architect* Software auf wechselseitige Interaktionen hin untersucht (Kap. 3.4.7) und als Geninteraktionsnetzwerke zu den Zeitpunktvergleichen TPI vs. M1, D2, M12 und M24 dargestellt (Abb. 16). Insgesamt zeigten 54 DEG wechselseitige Interaktionen, wobei 15 DEG mehrfach Bestandteil der Geninteraktionsnetzwerke waren. Von den 19 zu allen Zeitpunktvergleichen DEG (Kap. 4.2.1) zeigten sieben Gene (EIF2AK2, FFAR2, IFI44, IFIT2, ISG15, MX1, RSAD2) in mindestens einem Geninteraktionsnetzwerk Interaktionen. Die größte Anzahl an wechselseitigen Interaktionen bestand zum Zeitpunktvergleich TPI vs. M1 mit 42 DEG. Das DEG STAT1 stand hierbei im Zentrum zweier Geninteraktionsnetzwerke (TPI vs. M1 bzw. vs. M12) und zeigte die größte Anzahl wechselseitiger Interaktionen aller DEG (Abb. 16).

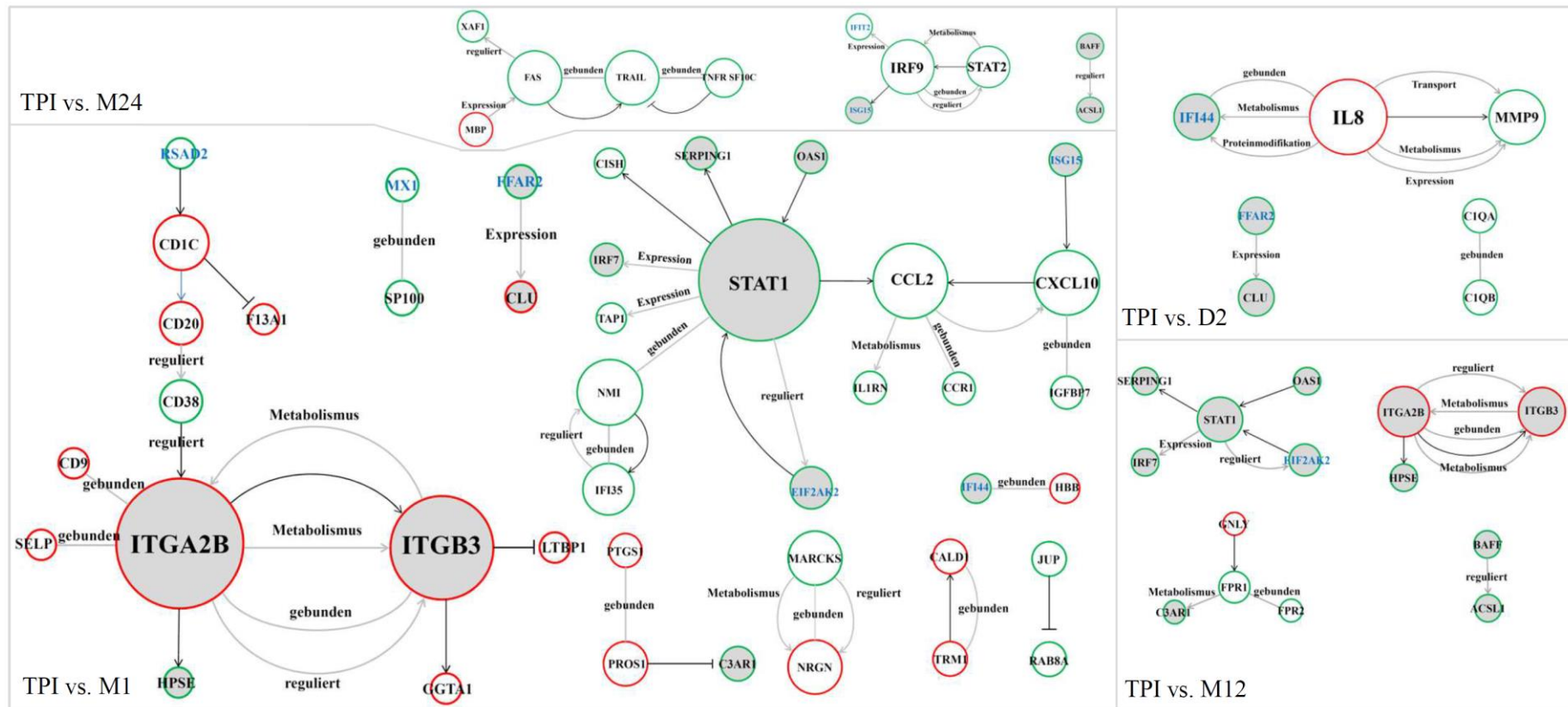


Abb. 16: Geninteraktionen der differentiell exprimierten Gene (DEG) (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Bei TPI vs. D2 wiesen sieben der 42 DEG, bei TPI vs. M1 42 der 175 DEG, bei TPI vs. M12 14 der 103 DEG und bei TPI vs. M24 elf der 108 DEG molekulare Interaktionen auf. Die größte Anzahl an molekularen Interaktionen wurde zum Zeitpunkvergleich TPI vs. M1 nachgewiesen (42 der 175 DEG). 15 DEG bilden hiervon ein großes Netzwerk mit überwiegend stimulierenden und 12 DEG ein Netzwerk mit überwiegend inhibierenden Interaktionen. Die Kreisgröße der dargestellten DEG korreliert mit der Anzahl an Interaktionen. **Grün umrandete Kreise** = hochregulierte DEG, **rot umrandete Kreise** = herunterregulierte DEG, grau hinterlegte Kreise = DEG sind Bestandteil mehrerer Geninteraktionsnetzwerke, **schwarze Pfeile** = stimulierende/inhibierende Interaktion auf das gerichtete Gen, graue Verbindungen = andere Interaktionen mit Erläuterung versehen. Blau geschriebene DEG = zu allen Zeitpunkten DEG. D2 = zwei Tage nach Therapieinitiation (TPI), M1 = ein Monat nach TPI, M12 = ein Jahr nach TPI, M24 = zwei Jahre nach TPI.

4.3 Statistische Auswertungen zur Identifikation prognostischer Biomarker

Nach den im Methodenteil beschriebenen Kriterien (Kap. 3.5) wurden bezüglich des Auftretens von ≥ 1 Schub zwischen dem siebten und 24. Monat nach TPI 17 Patienten als „Schub-gut“ und acht Patienten als „Schub-schlecht“ eingestuft. Die Genexpressionsprofile vor TPI der beiden Gruppen wurden mit der MAID-Analyse (Hecker *et al.* 2009a) verglichen. Hierbei wurden in der Gruppe mit ungünstigen klinischen Krankheitsverlauf („Schub-schlecht“) deutlich höhere (MAID-Score $> 2,5$) bzw. niedrigere Expressionswerte (MAID-Score $< -2,5$) als in der Gruppe mit günstigen klinischen Krankheitsverlauf („Schub-gut“) gefordert. Die Abb. 17 zeigt die Darstellung des für diese Berechnung zugrunde liegenden MA-Plots (visualisierte MAID-Filterung).

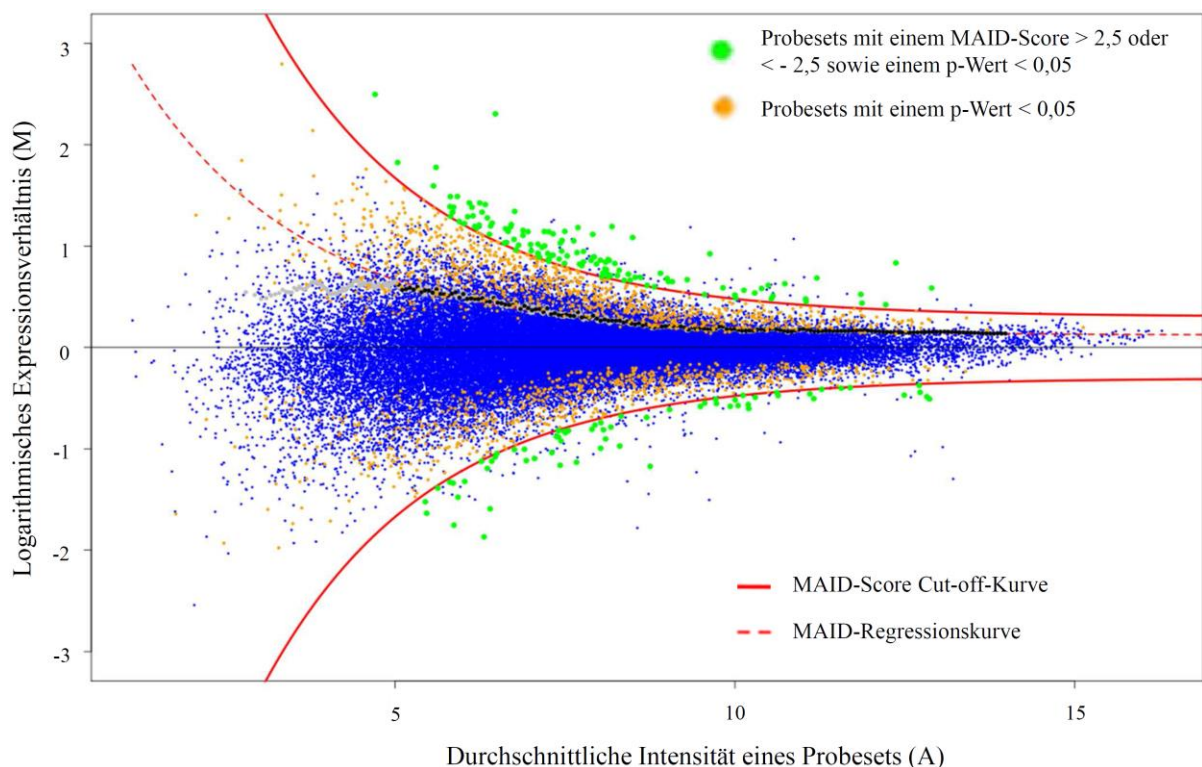


Abb. 17: MA-Plot-Darstellung.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Expressionsintensitäten sowie die logarithmischen Expressionsverhältnisse der *Probesets* (dargestellt als Punkte). Als grüne Punkte dargestellt sind jene *Probesets*, die als prognostische Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf, gemessen an der Schubhäufigkeit (Kap. 3.5), gefiltert wurden. $M > 0$ bedeutet höher exprimiert bei „Schub-schlecht“, $M < 0$ bedeutet niedriger exprimiert bei „Schub-schlecht“.

Die *Probesets*/Gene wurden nach dem p-Wert des zweiseitigen 2-Stichproben t-Tests sortiert. Die hiernach 20 am stärksten differentiell exprimierten *Probesets*/Gene (MAID-Score $> 2,5$ bzw. $< -2,5$) sind tabellarisch als prognostische Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der Therapieeinstellung aufgeführt (Tab. 17).

Tab. 17: Die Top 20 Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der TPI.

Probeset	Gensymbol	Name des Gens	MAID-Score	p-Wert
224342_x_at	BMS1P20	BMS1 pseudogene 20	2,55	0,0002
238962_at	ZNF681	zinc finger protein 681	2,88	0,0002
230548_at	LOC100505942	uncharacterized LOC100505942	3,08	0,0004
224423_x_at	PMCHL2	pro-melanin-concentrating hormone-like 2, pseudogene	3,17	0,0006
228140_s_at	PPP2R2C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	3,21	0,0006
228740_at	BC031314	∅	3,00	0,0008
230995_at	CMBL	Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	2,55	0,0008
241709_s_at	DOCK1	dedicator of cytokinesis 1	3,38	0,0009
240280_at	UFSP1	UFM1-specific peptidase 1 (non-functional)	3,60	0,0011
230035_at	BOC	Boc homolog (mouse)	-2,80	0,0011
236589_at	ZNF701	zinc finger protein 701	2,54	0,0011
217728_at	S100A6	S100 calcium binding protein A6	-3,56	0,0012
217148_x_at	IGLJ3	immunoglobulin lambda joining 3	3,63	0,0012
235965_at	Hs.511979	∅	2,65	0,0012
209949_at	NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	-3,08	0,0013
235367_at	MYPN	myopalladin	3,08	0,0014
228976_at	ICOSLG	inducible T-cell co-stimulator ligand	3,08	0,0014
236859_at	RUNX2	runt-related transcription factor 2	2,99	0,0014
244226_s_at	H60543	∅	-2,75	0,0015
237827_at	Hs.571602	∅	-3,56	0,0017

Aufgeführt sind die 20 am stärksten differentiell exprimierten *Probesets*/Gene, sortiert nach dem Signifikanzniveau auf der Basis der klinischen Daten zwei Jahre nach der Therapieinitiation (TPI). Positive MAID-Scores bedeuten, dass die *Probesets* signifikant höhere Expressionsspiegel in der Gruppe „Schub-schlecht“ vor TPI aufwiesen, negative MAID-Scores bedeuten, dass die *Probesets* signifikant niedrigere Expressionsspiegel in der Gruppe „Schub-schlecht“ vor TPI aufwiesen.

Die anschließende *PubMed*-, *GeneCards*- und *OMIM*-Datenbank-Analyse der Top 20 Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf, mit dem Zusatz *interferon* bzw. *multiple sclerosis*, führte zu keinen Treffern.

5 Diskussion

5.1 Patientenkohorte

Das Geschlechterverhältnis der beobachteten Patientenkohorte entspricht mit 9 männlichen (36 %) und 16 weiblichen (64 %) Patienten dem Geschlechterverhältnis der IFN- β -1b-RRMS-Schlüsselstudie (IFNB MS Study Group 1993) sowie dem allgemeinen Geschlechterverhältnis bei MS in Deutschland (Petersen *et al.* 2014). Bei den meisten Patienten wurde kurz vor TPI ($8,25 \pm 19,35$ Monate vor TPI; SW 0 – 96) eine MS diagnostiziert. Bei drei Patienten lag die Diagnosestellung mehr als zwei Jahre vor Studienbeginn (Pat 05, 07 und 13, Suppl.-Tab. 4). Eine Patientin (Pat 13) wurde acht Jahre vor Studieneintritt sekundärprophylaktisch mit Azathioprin behandelt. Azathioprin gilt heute als Reservepräparat bei der schubförmig verlaufenden MS (DGN & KKNMS 2015). Vor der Zulassung von IFN- β -1b galt es als ein gängiges sekundärprophylaktisches Medikament bei MS (Yudkin *et al.* 1991). Bei einem Patienten (Pat 05) erfolgte die Diagnosestellung 27 Monate vor TPI. Da dieser Patient zunächst nur eine geringgradige neurologische Beeinträchtigung aufwies, erfolgte zunächst keine sekundärprophylaktische Einstellung. Dieses Vorgehen entspricht nicht den aktuellen Therapieempfehlungen, wonach eine frühestmögliche sekundärprophylaktische Einstellung bereits bei Vorliegen eines KIS empfohlen wird (Kappos *et al.* 2009, Noyes & Weinstock-Guttman 2013, DGN & KKNMS 2015). Die Zeitspanne zwischen klinischer Erstmanifestation bis zur Diagnosestellung nach den McDonald-Kriterien von 2001 (McDonald *et al.* 2001) lag in der untersuchten Patientenkohorte mit $8,25 \pm 7,56$ (SW 0 – 30) Jahren deutlich über den von Flachenecker *et al.* für Deutschland für das Jahr 2005/2006 angegebenen $3,4 \pm 5,5$ Jahren (Flachenecker *et al.* 2008). Des Weiteren lag das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ($38,9 \pm 10,6$ Jahre; SW 18,3 – 62,7) über dem des deutschen MS-Registers ($31,4 \pm 10,2$ Jahre; SW 7 – 75) (Flachenecker *et al.* 2008) und der IFN- β -1b-RRMS-Schlüsselstudie (30,5 Jahre; SW 18 – 50 im mit 250 μ g behandelten Studienarm) (IFNB MS Study Group 1993). Scalfari *et al.* beschrieben, dass ein hohes Alter bei klinischer Erstmanifestation einer RRMS eine schnellere Konversion zur SPMS zur Folge habe (Scalfari *et al.* 2011). Zum Zeitpunkt der TPI lag bei zwei Patienten (Pat 03 und 10) retrospektiv betrachtet bereits eine SPMS vor. Diese Patienten waren zum Zeitpunkt der TPI mit 63 (Pat 03) bzw. 54 (Pat 10) Jahren deutlich älter als die restlichen 23 untersuchten Patienten sowie die in der europäischen IFN- β -1b-SPMS-Schlüsselstudie untersuchten Patienten ($41,0 \pm 7,2$; SW 18,0 – 55,0) (European Study Group on IFNB-1b in SPMS 1998). Die Zeitspanne zwischen klinischer Erstmanifestation einer RRMS und der Konversion zu einer SPMS wird mit zehn bis 25 Jahren angegeben (Weinshenker *et al.* 1989, Scalfari *et al.* 2010). Die klinische Erstmanifestation der MS erfolgte bei beiden Patienten retrospektiv betrachtet bereits Jahre zuvor (Pat 03: 27 Jahre vor TPI, Pat 10: 30 Jahre vor TPI; Suppl.-Tab. 4) und damit deutlich früher als in der 250 μ g-Dosisgruppe der europäischen IFN- β -1b-SPMS-Schlüsselstudie ($12,8 \pm 6,6$ Jahre vor TPI) (European Study Group on

IFNB-1b in SPMS 1998). MS wurde bei beiden Patienten erst kurz vor TPI diagnostiziert (Suppl.-Tab. 4).

Die durchschnittliche Schubrate betrug ein Jahr vor TPI $1,12 \pm 0,73$ (SW 0 – 2), was in etwa der jährlichen Schubrate der Placebo-Gruppe der IFN- β -1b-RRMS-Schlüsselstudie während der ersten zwei Jahre nach Studienbeginn entspricht (IFNB MS Study Group 1993). Mit einem mittleren EDSS von $2,16 \pm 1,12$ (SW 1,0 – 4,0) zum Zeitpunkt der TPI war die untersuchte Patientenkohorte im Vergleich mit der IFN- β -1b-RRMS-Schlüsselstudie (durchschnittlicher EDSS 2,9) weniger stark betroffen (IFNB MS Study Group 1993). Bei den untersuchten Patienten handelte es sich zum Zeitpunkt der TPI überwiegend (92 %) um unbehandelte Patienten. Nach den aktuellen Therapieempfehlungen, nach denen eine frühestmögliche sekundärprophylaktische Therapieeinstellung empfohlen wird (Kappos *et al.* 2009, Noyes & Weinstock-Guttman 2013, DGN & KKNMS 2015), erscheinen die Patienten zum Zeitpunkt der TPI klinisch bereits relativ stark betroffen. In einer jüngeren IFN- β -Studie der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock, bei der mit intramuskulärem IFN- β -1a behandelte Patienten untersucht wurden, lag der durchschnittliche EDSS mit $1,04 \pm 0,75$ (SW 0 – 2,5) zum Zeitpunkt der Therapieeinstellung deutlich niedriger (Hecker *et al.* 2012).

Die fortlaufende Überarbeitung der MS-Diagnosekriterien (Kap. 1.3.1) sowie der Therapieeinschlusskriterien bzw. neue Therapieoptionen (Kap. 1.4.2) erschweren den Vergleich alter und neuer MS-Therapiestudien. In heutigen Studien werden dem Grundsatz folgend, frühestmöglich sekundärprophylaktische Therapien zu beginnen, milde MS-Fälle eingeschlossen. Die jährlichen Schubraten lagen in den Placebogruppen der Schlüsselstudien der zuletzt zugelassenen oralen MS-Therapeutika Teriflunomid (0,54) (O'Connor *et al.* 2011, Confavreux *et al.* 2014) und Dimethylfumarat (0,36 bzw. 0,40) (Fox *et al.* 2012, Gold *et al.* 2012) deutlich niedriger als in der RRMS-Schlüsselstudie (1,27 bzw. 1,21) (IFNB MS Study Group 1993).

Zur Quantifizierung der neurologischen Behinderung der MS-Patienten wurde in der vorliegenden Arbeit die von John F. Kurtzke entwickelte Bewertungsskala, der EDSS (Kurtzke 1983), verwendet (Kap. 1.2). Beim EDSS kommt der motorischen Einschränkung, insbesondere der Gehfähigkeit, eine besondere Tragweite zu. Kognitive und vegetative Symptome werden hingegen weniger stark berücksichtigt. Des Weiteren ist die Graduierung des EDSS zum Teil deutlich von der Erfahrung bzw. der Akribie der Befunderhebung des Untersuchers abhängig (Freedman *et al.* 2013). Eine Alternative zum EDSS stellt der *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) dar, welcher neben der Gehstrecke, die Armfunktion, die Konzentrationsfähigkeit und die Aufmerksamkeit gleichermaßen quantifiziert (Rudick *et al.* 2002). Im klinischen Alltag und in klinischen Studien findet der EDSS die breiteste Akzeptanz (Meyer-Moock *et al.* 2014).

5.2 Klinische und paraklinische Ergebnisse

Während der sechsjährigen klinischen und paraklinischen Nachbeobachtungszeit konnten zu 23 der 25 Patienten regelmäßig Daten erhoben werden. Diese lange Nachbeobachtungszeit unterstreicht die Einzigartigkeit dieser Arbeit, da klinische und paraklinische Nachbeobachtungszeiträume anderer Studien meist deutlich kürzer waren.

5.2.1 Klinische Ergebnisse

Das erste Behandlungshalbjahr einer IFN- β -Therapie gilt allgemein als zu kurz, um die Effektivität einer sekundärprophylaktischen Therapie mit IFN- β -Präparaten einzuschätzen (Waubant *et al.* 2003). Dies ist darauf zurückzuführen, dass IFN- β -Präparate zunächst mutmaßlich eine gewisse „Anlaufzeit“ benötigen, um ihre immunmodulatorischen Effekte voll zu entfalten. In der untersuchten Patientenkohorte zeigte sich bereits ab dem ersten Behandlungshalbjahr eine deutliche Schubreduktion unter IFN- β -1b (Kap. 4.1.3). Die Schubratenreduktion der untersuchten Patientenkohorte war mit ca. 75 % (jährliche Schubrate 0,28 im zweiten Therapiejahr) um ein Vielfaches höher als in der 250 μ g-Dosisgruppe der IFN- β -1b-RRMS-Schlüsselstudie (jährliche Schubrate 0,84 im zweiten Therapiejahr) (IFNB MS Study Group 1993). In den darauffolgenden Jahren zeigte sich in der Gruppe der durchgängig mit IFN- β -1b therapierten Patienten (n=17, Abb. 9) eine anhaltend starke Schubreduktion im Vergleich mit einem Jahr vor TPI (Schubrate im Jahr vor TPI: 1,24, durchschnittliche Schubrate während der sechs Therapiejahre: 0,18). Hinsichtlich der Schubreduktion schien die untersuchte Patientenkohorte (insbesondere die 17 über sechs Jahre durchgängig therapierten Patienten) besonders gut von IFN- β -1b zu profitieren.

In der vorliegenden Arbeit (n=25) kam es während der ersten zwei Therapiejahre durchschnittlich zu einer jährlichen Krankheitsprogression von 0,14 EDSS-Punkten. Über die sechsjährige Nachbeobachtungszeit fiel eine deutlich höhere EDSS-Zunahme in der Gruppe der „Therapieabbrecher“ (n=8) gegenüber der 17 durchgängig mit IFN- β -1b therapierten Patienten auf (mittlere EDSS-Progression der „Therapieabbrecher“ gegenüber durchgängig über sechs Jahre therapierten Patienten: 2,73 zu 0,75 EDSS-Punkte, Tab. 8). In den IFN- β -Schlüsselstudien (IFNB MS Study Group 1993, European Study Group on IFNB-1b in SPMS 1998) wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, zur Definition eines schlechten Therapieansprechens eine EDSS-Zunahme von ≥ 1 Punkt im Vergleich zum Zeitpunkt der TPI definiert. In der 250 μ g-Dosisgruppe (250 μ g drei Mal/Woche) der IFN- β -1b-RRMS-Schlüsselstudie wurden hiernach 20 % der untersuchten Patienten nach drei Behandlungsjahren (IFNB MS Study Group 1993) und 35 % nach vier Behandlungsjahren (IFNB MS Study Group & the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group 1995) als verschlechtert eingestuft. Dies passt zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wonach 32 % der untersuchten Patienten (n=25) drei bzw. vier Jahre nach TPI als Non-Responder nach der Responseklassifikation EDSS eingestuft wurden (Tab. 10).

Während der sechsjährigen Nachbeobachtungsphase wurde die IFN- β -1b-Therapie bei acht Patienten (32 %) beendet. Die Therapieabbruchrate in Studien mit vergleichbar langen Nachbeobachtungszeiträumen bei IFN- β -behandelten RRMS-Patienten liegt zwischen 13,5 und 67,6 % (Ruggieri *et al.* 2003, Río *et al.* 2005, Portaccio *et al.* 2008), wobei sich diese starken Schwankungen durch unterschiedliche Definitionen des Therapieabbruchs erklären lassen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von mit IFN- β behandelten Patienten, lag die Therapieabbruchrate während einer zweijährigen Nachbeobachtungsphase bei ca. zwei Dritteln (Hansen *et al.* 2015). Der vorwiegende Grund für einen Therapieabbruch in der untersuchten Patientenkohorte lag in einer unverändert hohen oder erneut aktivierten Krankheitsaktivität. Weitere Gründe waren Zweifel an der Notwendigkeit einer sekundärprophylaktischen Therapie, bei fehlender klinischer Krankheitsaktivität unter Therapie (Pat 16), sowie ein Schwangerschaftswunsch (Pat 07). Die mittlerweile etablierten MS-Therapeutika zur Behandlung der (hoch-) aktiven Verlaufsform der RRMS, Natalizumab und Fingolimod (Kap. 1.4.2), waren zum damaligen Zeitpunkt nicht zugelassen bzw. befanden sich in der klinischen Erprobung. Bei unter Therapie anhaltend hoher Krankheitsaktivität bzw. der Konversion zu einer SPMS (Pat 02, 03, 14, 22 und 24) erfolgte nach den Empfehlungen der MS-Therapie-Konsensus-Gruppe die Therapieumstellung auf Mitoxantron (Rieckmann & Toyka 2002). Eine Mitoxantron-Behandlung wird nach wie vor zur Therapie von SPMS-Patienten empfohlen (DGN & KKNMS 2015). Theoretisch wäre bei den Patienten mit einer Konversion zur SPMS mit aufgesetzten Schüben die Fortsetzung der IFN- β -1b-Therapie denkbar gewesen (Abb. 3) (Kappos *et al.* 2001, Rieckmann & Toyka 2002). Dies war aber von Patientenseite nicht gewünscht. Während mittlerweile mehrere Therapiealternativen zur Behandlung der RRMS zugelassen sind (Kap. 1.4.2), stehen zur Therapie der SPMS lediglich die zwei subkutan zu applizierenden IFN- β -Präparate (Indikation: aufgesetzte Schübe) sowie Mitoxantron (unabhängig von aufgesetzten Schüben) zur Verfügung (Abb. 3) (DGN & KKNMS 2015). Es besteht demnach ein großer Bedarf an Therapieoptionen zur Behandlung der SPMS.

5.2.2 Paraklinische Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die cMRT qualitativ hinsichtlich vorhandener und im Verlauf zunehmender hyperintenser T2-Läsionen, hypointenser T1-Läsionen (*black holes*), Gd-Anreicherungen und Atrophiezeichen beurteilt. Bei allen 20 untersuchten Patienten (Tab. 11) bestanden in der cMRT-Ausgangsuntersuchung, wie von den MS-Diagnosekriterien zum Nachweis der örtlichen Dissemination gefordert, MS-typische T2-Läsionen (McDonald *et al.* 2001, Polman *et al.* 2005, Polman *et al.* 2011). Gd-anreichernde Herde, als Zeichen einer akuten Krankheitsaktivität (Filippi & Rocca 2011), wurden bei 40 % gesehen. *Black holes* und globale Atrophiezeichen, als Zeichen neurodegenerativer Prozesse (Sormani *et al.* 2014, Sailer 2015), waren in der cMRT-Ausgangsuntersuchung bei 35 bzw. 30 % der untersuchten Patienten nachweisbar.

Bei zwölf Patienten (60 %) fiel in der cMRT-Verlaufsuntersuchung ein bildmorphologischer Progress hinsichtlich MS-typischer T2-Läsionen auf. Drei dieser Patienten wurden nach den klinischen Bewertungsscores (Responseklassifikation EDSS und Schub) als Responder eingestuft. Demnach scheint die cMRT einen sensibleren Marker zur Feststellung der Krankheitsaktivität darzustellen als die klinischen Bewertungsscores. Zu dieser Einschätzung kann man beim Betrachten der Venn-Diagramme der als Non-Responder eingestuften Patienten der Responseklassifikation cMRT und der klinischen Bewertungsscores kommen (Abb. 11). Der feste Stellenwert der MRT in den klinisch-pharmakologischen Studien, zur Einschätzung der klinischen Effektivität einer MS-Therapie, häufig quantitativ anhand einer verminderten Zunahme von T2-Läsionen und einem verminderten Auftreten von Gd-anreichernden MS-Läsionen gemessen (UBC MS/MRI Study Group an the IFNB Multiple Sclerosis Study Group 1993, Dobson *et al.* 2014), scheint somit nachvollziehbar. Bei drei Patienten (15 %) wurden, korrelierend zur klinischen Symptomatik, in der cMRT-Verlaufsuntersuchung Gd-anreichernde MS-Herde nachgewiesen (Tab. 11). Gd-anreichernde Herde wurden als ungünstigster Prädiktor bezüglich der Krankheitsprogression beschrieben (Rudick *et al.* 2004, Río *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Gd-anreichernden Herden und der Krankheitsprogression gesehen werden. Zwei der drei betroffenen Patienten wurden nach der Responseklassifikation EDSS über fünf Jahre als Responder eingestuft (Tab. 10). Bei sieben Patienten (35 %) waren in der cMRT-Ausgangsuntersuchung und bei elf Patienten (55 %) in der Verlaufs-cMRT *black holes* darstellbar. Des Weiteren waren bei zwei Patienten (10 %) in der cMRT-Verlaufsuntersuchung zuvor beschriebene *black holes* nicht mehr abgrenzbar. Vier der sieben Patienten, bei denen in der cMRT-Ausgangsuntersuchung *black holes* zur Darstellung kamen, wurden zwei Jahre nach TPI als Non-Responder nach der Responseklassifikation EDSS eingestuft. Es wird allgemein zwischen persistierenden und sich wieder rückbildenden *black holes* unterschieden, wobei von persistierenden *black holes* gesprochen wird, sofern sie über mindestens sechs Monate bestehen (Sahraian *et al.* 2010). Eine Assoziation zwischen einer sekundärprophylaktischen Therapie mit IFN- β -1b und dem „Verschwinden“ von *black holes* wurde beschrieben (Filippi *et al.* 2011, Nagtegaal *et al.* 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden die evozierten Potentiale qualitativ hinsichtlich sich im Verlauf ändernder elektrophysiologischer Parameter (Kap. 3.3.2) beurteilt. Nach den Responsekriterien wurden 50 – 65 % der Patienten mit vorliegenden Verlaufsuntersuchungen als Non-Responder eingestuft (Tab. 12). Darüber hinaus erfolgte eine vergleichende Gegenüberstellung der Patienten, die zum Zeitpunkt der paraklinischen Verlaufsuntersuchung nach der Responseklassifikation EDSS bzw. Schub als Non-Responder eingestuft wurden, mit den Non-Respondern der paraklinischen Untersuchung. Die MEP scheinen hierbei sensibler den Krankheitsverlauf widerzuspiegeln als die SEP und VEP (Abb. 11). Invernizzi und Kollegen beschrieben eine Korrelation für die MEP und der Krankheitsprogression, gemessen anhand des EDSS. Allerdings wurde hier eine etwa gleich starke Korrelation für die SEP sowie eine geringer ausgeprägte Korrelation für die VEP mit der

Krankheitsprogression beschrieben. Es wird postuliert, dass Veränderungen bei den evozierten Potentialen besser mit der Krankheitsprogression, gemessen anhand des EDSS, korrelieren, als MRT-Veränderungen (Invernizzi *et al.* 2011). Auch andere Arbeitsgruppen postulieren einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von evozierten Potentialen und der zu erwartenden Krankheitsprogression (Margaritella *et al.* 2012, Schlaeger *et al.* 2014). Mit Aufkommen der MRT haben die evozierten Potentiale, zumindest bei der Diagnosestellung, zunehmend an Bedeutung verloren und finden in den aktuellen Diagnosekriterien keine Berücksichtigung mehr (Polman *et al.* 2011). Evozierte Potentiale geben Auskunft über die funktionelle Integrität der jeweils untersuchten physiologisch-anatomischen Leitungsbahnen. Mittels MRTs erhält man hingegen lediglich morphologische Informationen, die nicht zwangsläufig eine klinisch messbare Einschränkung bedeuten.

5.2.3 Termini Responder und Non-Responder

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten nach dem klinischen (EDSS, Schubfrequenz; Kap. 3.3.1) und paraklinischen (cMRT, MEP, SEP, VEP; Kap. 3.3.2) Verlauf jeweils in die zwei Gruppen, „Responder“ bzw. „Non-Responder“, eingestuft. Analog zu den IFN- β -1b-Schlüsselstudien (IFNB MS Study Group 1993, European Study Group on IFNB-1b in SPMS 1998) wurde eine EDSS-Progression von ≥ 1 Punkt im Vergleich zum Zeitpunkt der TPI als Verschlechterung (Non-Responder in der Responseklassifikation EDSS) gewertet. Alternativ hierzu hätte eine EDSS-Progression von $\geq 1,5$ oder $\geq 2,0$ EDSS-Punkten im Vergleich zur TPI als Verschlechterung klassifiziert werden können. Ebenso wäre eine Staffelung nach Therapiejahren, bei der während der ersten Therapiejahre eine EDSS-Progression von ≥ 1 und während späterer Therapiejahre eine EDSS-Progression von $\geq 1,5$ oder ≥ 2 im Vergleich zum Zeitpunkt der TPI als Verschlechterung gewertet werden können, denkbar gewesen. Eine solche Staffelung würde dem chronischen Krankheitsverlauf von MS Rechnung tragen. Eine vergleichbare Staffelung bei der Beschreibung des neurologischen Behinderungsgrades wird beispielsweise von der *Canadian MS Working Group* zur Entscheidungsfindung bei einer eventuellen Therapieumstellung empfohlen (Freedman *et al.* 2013). Gleiches gilt bei der Einstufung nach der Responseklassifikation Schub. Hier hätte alternativ die fehlende Symptomregredienz unter Schubtherapie, die Schwere der Schübe oder die Dauer einzelner Schübe quantifiziert werden können und zu einer detaillierteren Analyse der Non-Responder nach der Responseklassifikation Schub führen können (Cohen *et al.* 2004, Freedman *et al.* 2013). Derartige Quantifizierung von Schüben und der EDSS-Progression hätte die Auswertung der 25 Patienten-fassenden Patientenkohorte verkompliziert. Zielsetzung war es anhand sehr stringenter Kriterien eine Einteilung in Responder und Non-Responder zu ermöglichen. Da eine möglichst frühzeitige sekundärprophylaktische Einstellung empfohlen wird (Noyes & Weinstock-Guttman 2013, DGN & KKNMS 2015) und dadurch bedingt nur eine kurze Krankheitsphase bis zur TPI vorliegt, wird es sich in zukünftigen Studien schwierig gestalten, eine Schubreduktion unter Therapie festzustellen. Bei den paraklinischen Untersuchungen hätten ebenfalls andere Kriterien zur Einstufung als Responder vs. Non-Responder führen können. So hätte neben der

qualitativen Auswertung eine quantitative Auswertung erfolgen können. Auch bezüglich der MRT-Aktivität gibt die *Canadian MS Working Group* Empfehlungen, die bei der Entscheidungsfindung über eine Therapieumstellung helfen sollen (Freedman *et al.* 2013).

Der Krankheitsverlauf von MS ist maßgeblich von der individuellen Krankheitsaktivität und dem individuellen Therapieansprechen abhängig. In klinischen und pharmakogenetischen Studien werden zur Einstufung des individuellen Therapieansprechens die Termini „Responder“ bzw. „Non-Responder“ verwendet. Der Terminus „Non-Responder“ suggeriert eine fehlende bzw. ungenügende Wirksamkeit der applizierten Therapie. Eine internationale, einheitliche Definition dieser Begriffspaarung existiert nicht. Häufig erfolgt die Einstufung anhand klinischer Parameter, wie des EDSS-Wertes und der Schubfrequenz, oder bildmorphologisch anhand der MRT (Río *et al.* 2009). Sekundärprophylaktische Therapien bei MS vermögen die Krankheitsaktivität zu vermindern, führen jedoch nicht zu einer Konservierung des Istzustands bei Therapiebeginn. Zum Teil wird daher die Einteilung in einen guten bzw. einen schlechten Krankheitsverlauf favorisiert. Ein schlechter Krankheitsverlauf ist nicht notwendigerweise kausal auf eine weniger effektive Sekundärprophylaxe zurückzuführen (Hecker *et al.* 2011). Die Einteilung in Responder vs. Non-Responder hängt maßgeblich von der Strenge der zugrunde liegenden Auswertungsparameter ab. Dies spiegelt sich in den angegebenen Häufigkeiten der Therapie-Non-Responder wider, die unter IFN- β -Präparaten mit 20 bis 55 % angegeben werden (Río *et al.* 2002). Seit Aufkommen der MS-Therapeutika für die (hoch-) aktiven RRMS-Verlaufsformen (Abb. 3), wird als Therapieziel die Freiheit von messbarer Krankheitsaktivität (Schubfreiheit, keine EDSS-Progression und keine qualitative und/oder quantitative Zunahme von MRT-Läsionen), „*no evidence of disease activity*“, propagiert (Rotstein *et al.* 2015). Die Anwendung derartiger Kriterien zielt auf eine frühzeitige Therapieumstellung, bei als unzureichend eingestufte Behandlung von RRMS-Patienten, ab (Stangel *et al.* 2015). Ein Nachteil aller bisher gebräuchlichen Responsemarker besteht darin, dass diese erst retrospektiv eine Aussage über das Therapieansprechen ermöglichen. Idealerweise ermöglichen prognostischer Therapiemarker vor Therapiebeginn eine Einteilung in Therapie-Responder vs. Therapie-Non-Responder (Kap. 3.5 und 4.3).

5.2.4 Unter Therapie auftretende Nebenwirkungen und Therapieadhärenz

Die Art und Intensität auftretender Nebenwirkungen einer Therapie beeinflussen maßgeblich die Therapietreue und führen mitunter zur Beendigung einer Therapie. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten zeigten ein für die IFN- β -Therapie typisches Nebenwirkungsprofil (Abb. 12 und 13; Kap. 4.1.8). So fiel insbesondere zu Behandlungsbeginn eine Häufung grippeähnlicher Nebenwirkungen auf. Hautirritationen im Injektionsareal blieben im späteren Behandlungsverlauf auf einem niedrigen Niveau. Zum Teil wurde durch Änderungen des Behandlungsregimes versucht, Nebenwirkungen zu verringern. So wurden bei Hautreaktionen im Injektionsareal dünnere Injektionsnadeln verwendet. Vor allem zu Therapiebeginn wurde Paracetamol oder Ibuprofen zum

Kupieren von grippeähnlichen Nebenwirkungen verabreicht. Ein Therapieabbruch aufgrund aufgetretener Nebenwirkungen wurde nicht dokumentiert. Nur zwei Patienten (Pat 01 und 05) gaben an, unter IFN- β -1b keinerlei Nebenwirkungen registriert zu haben.

In der untersuchten Patientenkohorte beendeten insgesamt vier Patienten (Pat 14, 16, 20 und 22) (16 %) die IFN- β -1b-Therapie ohne Arztkonsultation und wurden demnach als therapieinadhärent eingestuft. Einer der Patienten (Pat 20) beendete die Therapie vorrangig wegen Unannehmlichkeiten und Unbequemlichkeiten bei der Applikation von IFN- β -1b. Ein Autoinjektor, mit dessen Hilfe die Medikamentenapplikation erleichtert wird und dessen Anwendung als starker Therapieadhärenz-Prädiktor angesehen wird (Pozzilli *et al.* 2011), kam in der Patientenkohorte nicht zur Anwendung. Seit 2014 befindet sich ein Autoinjektor für rIFN- β -1b (BETACONNECT™) mit visueller bzw. akustischer Erinnerungsfunktion sowie der Möglichkeit, Injektionsdaten, wie die einzelnen Injektionszeitpunkte, aufzuzeichnen und zusammen mit dem behandelnden Arzt auszuwerten, auf dem Markt (FirstWord MEDTECH 2014). Von einem derartigen Autoinjektor hätten möglicherweise einige Patienten der untersuchten Patientenkohorte profitiert. Eine der als therapieinadhärent eingestuften Patientinnen (Pat 16) war zum Zeitpunkt des selbstständigen Absetzens subdepressiv bis depressiv. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob IFN- β -Therapien das Auftreten von Depressionen begünstigen (DGN & KKNMS 2015). Begleiterkrankungen wie Depressionen führen jedoch zu einer negativen Beeinflussung der Therapieadhärenz bei MS-Patienten (Fernández *et al.* 2012). Bis zum Absetzen der IFN- β -1b-Therapie bestand bei beiden Patienten (Pat 16 und 20) ein stabiler Krankheitsverlauf. Zwei Patienten (Pat 14 und 22) beendeten die Therapie aufgrund einer gesteigerten Krankheitsaktivität (Tab. 10).

Aufgrund der kleinen Patientenkohorte sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt mit den Daten zur Therapieadhärenz in größeren Patientenkohorten (Devonshire *et al.* 2011, Fernández *et al.* 2012) zu vergleichen. Die Therapietreue bei MS-Patienten wird, je nach Definition des Begriffs, mit 60 bis 90 % angegeben (Fernández *et al.* 2012). Als wichtige Voraussetzung für eine hohe Therapieadhärenz gelten: die einfache Applikation, die Erkrankungsdauer, das jeweilige Sekundärtherapeutikum und die Therapiezufriedenheit, die unter anderem durch auftretende Nebenwirkungen beeinflusst wird (Devonshire *et al.* 2011) sowie eine gute Arzt-Patienten-Beziehung (Koudriavtseva *et al.* 2012). MS ist eine unheilbare, chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung, die eine fortlaufende Medikamentenapplikation zur Entschleunigung der Erkrankung erfordert. Besonders wichtig ist es daher, Patienten ärztlicherseits, trotz empfundener Rückschläge durch eine Krankheitsprogression oder belastende Nebenwirkungen, zur weiteren regelmäßigen Einnahme der Medikation zu motivieren (Koudriavtseva *et al.* 2012). Andernfalls drohen Wirkverlust der Therapie und Zunahme des neurologischen Behinderungsgrades. Als häufigste Ursachen für eine geringe Therapietreue gelten das schlichte Vergessen der Medikamentenapplikation (Devonshire *et al.* 2011, Fernández *et al.* 2012) bzw. Nebenwirkungen der IFN- β -Präparate (Stewart & Tran 2012). Die

mittlerweile zugelassenen Therapiealternativen, wie Dimethylfumarat, Teriflunomid und pegyliertes s.c. IFN- β -1a, für moderate Krankheitsverläufe der RRMS (Kap. 1.4.2) sowie das mit verändertem Applikationsregime kürzlich zugelassene Glatirameracetat (Khan *et al.* 2013), führen möglicherweise durch die geringere Applikationsfrequenz bzw. die perorale Darreichung zu einer höheren Therapiezufriedenheit und somit zu einer höheren Therapieadhärenz.

5.2.5 Parameter zur Wirksamkeitseinschätzung von Interferon- β -1b

IFN-neutralisierende Antikörper (NAK) können sich klinisch und paraklinisch nachteilig auf den Behandlungserfolg mit IFN- β -Präparaten auswirken (Polman *et al.* 2010). Die Interpretation der Ergebnisse bei der Untersuchung auf NAK gegen IFN- β ist durch eine fehlende Standardisierung erschwert (Hartung *et al.* 2012). Im klinischen Alltag sind vom Krankheitsverlauf unabhängig vorgenommene NAK-Bestimmungen bisher nicht etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich bei klinischer Indikation auf NAK untersucht. Dies stellt nach heutigen Gesichtspunkten eine Limitierung dieser Arbeit dar. Als Alternative zur Wirksamkeitseinschätzung einer IFN- β -Therapie wird die Bestimmung der Proteinkonzentration des Chemokins CXCL10 im Blut postuliert (Hegen *et al.* 2014). CXCL10 zählte zu den in der vorliegenden Arbeit als unter Therapie hochregulierten DEG und war bei 24 der 25 Patienten (96 %) einen Monat nach TPI hochreguliert.

5.3 Molekularbiologische Ergebnisse

Eine Besonderheit der vorliegenden Arbeit besteht in der Genexpressionsbestimmung in PBMC von mit IFN- β -1b behandelten Patienten über einen Zeitraum von zwei Therapiejahren. Vorherige PBMC-Genexpressionsstudien befassten sich hingegen meist mit Genexpressionsänderungen unmittelbar nach der Erstapplikation von IFN- β -Präparaten (Weinstock-Guttman *et al.* 2003, Gilli *et al.* 2005, Reder *et al.* 2008, Weinstock-Guttman *et al.* 2008). Darüber hinaus sind die Microarray-Daten vollständig und normalisiert im Gene Expression Omnibus (GEO-Datenbank) öffentlich hinterlegt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24427>).

5.3.1 Probenmaterial und Probenuntersuchung

Wie beim Großteil longitudinaler Genexpressionsstudien zu molekularen Biomarkern bei MS, wurde in der vorliegenden Arbeit die Transkriptebene in PBMC untersucht (Goertsches *et al.* 2008, Goertsches *et al.* 2011). PBMC werden aus Vollblut separiert und stellen eine Anreicherung von Immunzellen, wie Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen, dar. Vollblutbestandteile, wie Globin-mRNA, die zu einer geringeren Sensitivität bei Microarraystudien führen, sind in PBMC nicht übermäßig enthalten (Nikula *et al.* 2013). Die Untersuchung von PBMC erlaubt Rückschlüsse über die bei MS systemisch ablaufenden immunologischen Prozesse. In zukünftigen Studien sollten zelltypspezifische Analysen erwogen werden. Es wurden beispielsweise in Monozyten die höchsten Spiegel von phosphoryliertem STAT1 nachgewiesen (Comabella *et al.* 2009, van Boxel-Dezaire *et al.*

2010). Dies legt den Verdacht nahe, dass der IFN- β -induzierte JAK-STAT-Signalweg vornehmlich in Monozyten aktiviert wird. Ein Vorteil zelltypspezifischer Untersuchungen ist die Einengung des Untersuchungsfeldes. Allerdings birgt dies die Gefahr, sich im Nachhinein auf einen weniger bedeutsamen Zelltyp fokussiert zu haben.

Mittels der angewandten Oligonukleotid-Microarrays (*GeneChip* HG-U133A und HG-U133B, Affymetrix) wurden in PBMC bei 25 MS-Patienten die Expressionsspiegel tausender Gene zu fünf verschiedenen Untersuchungszeitpunkten hypothesenfrei gemessen (Kap. 3.4). Dies erlaubte, globale Genexpressionsunterschiede unter der IFN- β -Therapie zu detektieren. Neben der Transkriptanalyse per Microarrays können Genexpressionsveränderungen anhand anderer Untersuchungsverfahren, wie der rt-PCR (Nolan *et al.* 2006) oder dem *Next-Generation-Sequencing* (van Dijk *et al.* 2014), erfolgen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Validierung spezifischer Gene mit großen Expressionsunterschieden mittels quantitativer rt-PCR. Diese stellt vor allem für niedrig exprimierte Gene ein sehr sensitives Verfahren dar (Provenzano & Mocellin 2007) (Kap. 3.4.5 und 4.2.2). Die Untersuchung einer Vielzahl an unterschiedlichen Genen, wie im Microarray abgebildet, ist mittels rt-PCR sehr arbeitsaufwendig und damit kostenintensiv. Eine Limitierung der Microarrays besteht darin, dass lediglich bekannte Gentranskripte, für die spezifische Sonden vorliegen, untersucht werden können. Die neuere Generation von Microarrays, wie der *GeneChip* HTA 2.0 von Affymetrix, bei dem die aktuellste Genannotation berücksichtigt wurde, enthält Sonden zur Detektion von Exon-Exon-Übergängen, sodass gezielt nach Veränderungen durch alternatives Spleißen gesucht werden kann (Xu *et al.* 2011). Allerdings bleibt es unter Verwendung der neueren Generation von Microarrays eine Herausforderung, niedrig exprimierte Gene zu detektieren. Zum Zeitpunkt der Genexpressionsdatenerhebung stellten Oligonukleotid-Microarrays den Goldstandard bei Genexpressionsstudien dar. Aufgrund der fehlenden Standardisierung bei der praktischen Anwendung des *Next-Generation-Sequencings* sowie der anschließenden statistischen Analyse (Auer *et al.* 2012), stellen Microarrays unverändert die praktikabelste Methode dar, nach globalen Unterschieden im Expressionsmuster unterschiedlicher Gene zu suchen (Malone & Oliver 2011). Ein neues Forschungsfeld bei Genexpressionsstudien stellt die Untersuchung von *microRNA* dar (Ha & Kim 2014). Dies sind kurze, nicht-kodierende RNA-Stränge mit einer Nukleotid-Länge von 21-25 Basen, die unter anderem die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene regulieren. Bei MS wurden einige *microRNAs* als diagnostische Marker bzw. therapeutische Ziele postuliert (Thamilarasan *et al.* 2012, Ma *et al.* 2014). In einer *microRNA*-Studie der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock wurden die molekularen Effekte in PBMC von mit IFN- β -1b therapierten KIS- und RRMS-Patienten untersucht (Hecker *et al.* 2013b).

Alternativ zur Transkriptebene hätte das gewonnene Probenmaterial (PBMC) auf der Protein- (*Proteomics*) oder der Metabolitebene (*Metabolomics*) analysiert werden können. Sowohl die Transkript-, Protein- und Metabolitebene reflektieren, im Gegensatz zum Genom, im Allgemeinen

dynamische, durch biologische und experimentelle Faktoren beeinflussbare Prozesse. Zu den biologischen Faktoren zählen unter anderem das Alter der Patienten, die genetischen Ausstattung der Patienten, Umwelteinflüsse durch Viren, Bakterien, Krankheiten, Ernährung und Sonnenexposition sowie medikamentöse Therapien. Als experimenteller Einflussfaktor gilt unter anderem die Zeitspanne zwischen der Probenentnahme und der Probenuntersuchung (Goertsches & Zettl 2007). Die gemessenen Transkriptspiegel stellen ein Zwischenprodukt zwischen der Genom- und der Proteinebene dar und lassen zu einem gewissen Ausmaß Rückschlüsse auf die entsprechend resultierenden Proteinmengen zu. Somit sind Aussagen über die zum Zeitpunkt der Probenentnahme ablaufenden molekularbiologischen Prozesse möglich (Paap *et al.* 2013). Die Untersuchung auf Proteinebene ist durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen deutlich komplexer und kann nur für eine Auswahl von Proteinen sensitiv durchgeführt werden. Im Rahmen weiterer Forschungsprojekte könnten die 19 in der vorliegenden Arbeit durchgehend DEG (Tab. 13) auf Proteinebene mittels Immunoassayverfahren (*Western Blot*) oder Durchflusszytometrie analysiert und validiert werden. Dies könnte zu einem besseren Verständnis intrazellulär ablaufender Signalwege führen.

Um die Beeinflussung der Transkriptspiegel durch Probenaufarbeitungsprozeduren zu minimieren und um der Instabilität der Transkripte Rechnung zu tragen (Paap *et al.* 2013), erfolgte die Verarbeitung der gewonnenen EDTA-Blutproben standardisiert innerhalb einer Stunde nach der Blutentnahme. Allerdings war die Zeitspanne zwischen den IFN- β -1b-Injektionen und den Blutentnahmen nicht genau in Anzahl von Stunden definiert. Mittlerweile ist bekannt, dass die Applikation von IFN- β -Präparaten transiente Genexpressionsdynamiken bewirken (Gilli *et al.* 2005, Reder *et al.* 2008, Weinstock-Guttman *et al.* 2008, Goertsches *et al.* 2011). Um noch einheitlichere und besser vergleichbare Daten bei zukünftigen Genexpressionsstudien zu erhalten, sollte bei der Festlegung des Probenentnahmezeitpunktes eine Standardisierung erfolgen.

Seit der Entwicklung der verwendeten Microarrays (*GeneChip* HG-U133A und HG-U133B, Affymetrix) hat sich die Genannotation verändert (Yin *et al.* 2010), was eine verminderte Spezifität und Sensitivität der *Probesets* zur Folge haben kann (Kap. 1.6 und 3.4.4). Zum Zeitpunkt der Auswertung der Genexpressionsdaten fand die zum Teil verminderte Spezifität/Sensitivität der *Probesets* in anderen MS-Genexpressionsstudien wenig Beachtung. Um niedrig spezifische *Probesets* auszusortieren, wurde in der vorliegenden Arbeit hingegen eine *Probeset*-Spezifität von $> 0,7$ gefordert (Kap. 3.4.4). Nach heutigem Wissensstand sollte in zukünftigen Studien, bei noch nicht die aktuellste Genannotation berücksichtigenden Microarrays, eine abweichende Chipdefinition, eine *Custom Chip Definition File*, verwendet werden. Eine solche *Custom Chip Definition File* für humane Affymetrix Microarrays basiert auf der *GeneAnnot*-Datenbank (Ferrari *et al.* 2007). Bei einer *Custom Chip Definition File* enthält ein *Probeset* sämtliche Sonden, die nach heutiger Genannotation spezifisch für ein bestimmtes Gentranskript sind, alle anderen Sonden werden verworfen. Die

Bestimmung der Transkriptspiegel ist dadurch genauer. Darüber hinaus besteht nach der Datenprozessierung mit einer *Custom Chip Definition File* für jedes Gentranskript genau ein Expressionssignal (Hecker *et al.* 2013a), während in der vorliegenden Arbeit mehrere *Probesets* für ein Gen vorliegen können (Kap. 1.6).

5.3.2 Unter Therapie differentiell exprimierte Gene

Bei den unter IFN- β -1b-Therapie DEG handelt es sich mehrheitlich um bekannte ISG mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften, wie MX1, Mitglieder der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase(OAS)-Familie, wie auch EIF2AK2, RSAD2, Mitglieder der IFIT-Familie, IFI44 und ISG15. Die durch die ISG entfalteten Eigenschaften sind nicht so spezifisch wie deren Bezeichnungen vermuten lassen. Unter IFN- β -1b-Therapie waren die meisten DEG hierbei hochreguliert, was sich mit den Ergebnissen anderer IFN- β -Genexpressionsstudien deckt (Hecker *et al.* 2013a, Hecker *et al.* 2013b). MX1 stellt eines der bekanntesten ISG dar, dessen Genprodukt eine Rolle in der IFN-induzierten antiviralen Abwehr gegen eine Vielzahl von Viren zukommt (Haller & Kochs 2011). Das Genprodukt von RSAD2 entfaltet durch die Inhibition der Replikation einer Vielzahl von Viren ebenfalls antivirale Eigenschaften (Seo *et al.* 2011, Schoggins 2014). Die Mitglieder der OAS-Familie (OAS1, -2 und -3) aktivieren unter Anwesenheit von viraler RNA die latente Ribonuklease L, wodurch doppelsträngige RNA degeneriert und die Virusreplikation durch die Blockierung der Proteinsynthese unterdrückt wird (Hovanessian 2007, Sadler & Williams 2008, Melchjorsen *et al.* 2009). Die Proteinkinase R, das Genprodukt von EIF2AK2, ist eines der am besten beschriebenen Effektormoleküle von Interferonen (Pindel & Sadler 2011). EIF2AK2 wird ebenfalls durch doppelsträngige RNA aktiviert und katalysiert die Phosphorylierung des Translations-Initiations-Faktors EIF2S1, was ebenfalls zu einer Unterdrückung der Proteinsynthese führt und somit antiproliferativ wirkt (Hovanessian 2007, Pindel & Sadler 2011). Darüber hinaus ist EIF2AK2 in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Inflammations- und Apoptoseprozesse, involviert (Schoggins 2014). Die Genprodukte der IFIT-Familie (IFIT1, -2, -3 und -5) entfalten antivirale Effekte durch die Blockierung bzw. Alteration der Proteinsynthese viraler und zellulärer RNA (Zhou *et al.* 2013, Vladimer *et al.* 2014). Ferner wurde beschrieben, dass die Genprodukte der IFIT-Familie die Translationsregulation (Sadler & Williams 2008, Schoggins 2014), die Zellmigration und die Zellproliferation (Fensterl & Sen 2011) beeinflussen. ISG15 ist ein weiteres Gen mit antiviralen Eigenschaften (Sadler & Williams 2008, Schoggins 2014). ISG15 zählt zu den sogenannten Ubiquitin-ähnlichen Molekülen, welches an intrazelluläre Proteine konjugiert wird (Liu *et al.* 2011, Zhang & Zhang 2011). Diese Proteinmodifikation, unter anderem als ISGylation beschrieben, wird durch die IFN-induzierte E3 Proteinligase HERC5 vermittelt (Wong *et al.* 2006) und moduliert IFN- β -induzierte Genprodukte, wie MX1, EIF2AK2, STAT1, IFIT1–3 und IFIT5 (Zhao *et al.* 2005).

Mit Ausnahme von IFIT5 zählen alle im vorherigen Absatz diskutierten Gene zu den 19 zu allen vier Zeitpunktvergleichen durchgehend DEG (Tab. 13). Die meisten dieser 19 Gene sind bekannte ISG

(Goertsches *et al.* 2008, Paap *et al.* 2012) und stellen Marker der biologischen Aktivität von IFN- β -Präparaten dar. Die Bedeutung der Gene CMPK2 und FFAR2 (beides durchgehend DEG) ist bei MS und IFN- β -Reaktionen bisher unklar und sollte weitergehend erforscht werden. Analog zu der Gesamtheit der DEG bestanden zum Zeitpunktvergleich TPI vs. M1 die stärksten Genexpressionsunterschiede dieser 19 Gene (Abb. 15).

Malhotra *et al.* untersuchte in einer kleinen PBMC-Genexpressionsstudie über zwei Therapiejahre zu MX1 vergleichbare Genexpressionsdynamiken bei mit subkutan IFN- β -therapierten MS-Patienten (Malhotra *et al.* 2011). Neun Gene wiesen vergleichbare Genexpressionsdynamiken wie MX1 auf. Sechs dieser Gene (IFI44L, IFIT1, HERC5, LY6E, RSAD2 und SIGLEC1) zählen zu den 19 durchgehend DEG der vorliegenden Arbeit, weitere zwei Gene (IFI6, IFI27) zählen zu den 269 DEG der vorliegenden Arbeit.

Vergleichbar mit anderen IFN- β -Studien (Annibali *et al.* 2007, Hecker *et al.* 2013a, Hecker *et al.* 2013b) hatte nach den Daten IFN- β -1b den größten genregulatorischen Effekt einen Monat nach TPI. Zu diesem Zeitpunktvergleich (TPI vs. M1) waren 175 Gene differentiell exprimiert. Die Anzahl der DEG ein Jahr (M12) und zwei Jahre (M24) nach TPI lag auf einem relativ stabilen Niveau (TPI vs. M12 n=103, TPI vs. M24 n=108), wobei zu beiden Zeitpunktvergleichen gegenüber den vorherigen Zeitpunktvergleichen sieben zuvor nicht ermittelte DEG (SAT1, FPR2, ANKRD22, LILRB2, MXD1, HOPX und GZMK) registriert wurden. Unmittelbar nach TPI (TPI vs. D2) waren nur wenige Gene (n = 42) differentiell exprimiert (Abb. 14). Zu erklären sind die zu den vier Zeitpunktvergleichen unterschiedlich ausgeprägten transkriptionellen Effekte von IFN- β -1b womöglich dadurch, dass unmittelbar nach Therapiebeginn (TPI vs. D2) erst die Aktivierung des IFN- β -induzierten JAK-STAT-Signalwegs (Ivashkiv & Donlin 2014) beginnt. Es ist allgemein bekannt, dass sich die molekulare und klinische Wirkung erst nach wiederholter, mehrmonatiger Medikamentenapplikation vollständig entfaltet. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Krankheitsschübe erst nach einem halben Therapiejahr berücksichtigt (Kap. 3.3.1 und 4.1.3). Als weitere mögliche Erklärung für die relativ niedrige Anzahl von DEG unmittelbar nach TPI gilt die bei Therapieneueinstellung empfohlene Dosistitration von IFN- β -1b (European Medicines Agency 2006), nach der erst nach mehreren Tagen die Dosis von 250 μ g IFN- β -1b appliziert wird. Die im späteren Therapieverlauf (TPI vs. M12 und M24) zurückgehenden transkriptionellen Effekte sind unter anderem durch homöostatische Reaktionen sowie durch eine mit zunehmende Therapiedauer abnehmenden Therapieadhärenz erklärbar. Darüber hinaus wäre ein Wirkungsverlust von IFN- β -1b durch NAK erklärbar.

Zwei weitere PBMC-Genexpressionsstudien der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock analysierten ebenfalls die transkriptionellen Effekte von IFN- β -Präparaten mittels Microarrays (Hecker *et al.* 2012, Hecker *et al.* 2013a). Abweichend zu der vorliegenden Arbeit wurden in diesen Studien *Custom Chip Definition Files* angewandt und entweder dreimal wöchentlich mit subkutanem IFN- β -1a (n=12) oder wöchentlich mit intramuskulärem IFN- β -

1a (n=24) behandelt. Von den 96 DEG der „subkutanen IFN- β -1a-Genexpressionsstudie“ (Hecker *et al.* 2013a) zählen 72 Gene zu den DEG der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus wurden die 19 durchgehend DEG (Tab. 13) ebenfalls in der „subkutanen IFN- β -1a-Genexpressionsstudie“ als unter Therapie differentiell exprimiert identifiziert (Hecker *et al.* 2013a). Dies deutet auf vergleichbare zugrunde liegende molekulare Wirkmechanismen beider subkutanen IFN- β -Präparate. Die „intramuskuläre IFN- β -1a-Genexpressionsstudie“ lieferte ausschließlich Genexpressionsdaten über eine Therapiedauer von einem Monat. Von den 121 DEG der „intramuskulären IFN- β -1a-Genexpressionsstudie“ (Hecker *et al.* 2012) zählten lediglich 31 Gene zu den in der vorliegenden Arbeit als unter Therapie DEG. Als Erklärung für diese relativ geringere Überschneidung ist die größere Zeitspanne zwischen der Medikamentenapplikation und der Blutentnahme bei der „intramuskulären IFN- β -1a-Genexpressionsstudie“ anzusehen. Die Blutentnahmen erfolgten in den drei IFN- β -Genexpressionsstudien in der Regel am Tag der nächsten Medikamentenapplikation. Mittlerweile weiß man, dass die größten transkriptionellen Effekte ca. 12 Stunden nach der Medikamentenapplikation auftreten und nach ca. zwei Tagen wieder deutlich abnehmen (Gilli *et al.* 2005, Reder *et al.* 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass alle drei zugelassenen IFN- β -Präparate zu einer vergleichbaren Induktion der MX1-Genexpression, mit Spitzenexpressionsspiegeln 2-24 Stunden nach der Applikation, führen (Gilli *et al.* 2005, Reder *et al.* 2008, Weinstock-Guttman *et al.* 2008).

Ein Gen, FCER1A, war in der bereits zuvor angesprochenen vergleichbar konzipierten Rostocker Genexpressionsstudie unter IFN- β -1a-Therapie ebenfalls über zwei Therapiejahre durchgehend herunterreguliert (Hecker *et al.* 2013a). Auch in der zuvor erwähnten, anders konzipierten Rostocker Genexpressionsstudie nach Applikation von intramuskulärem IFN- β -1a war FCER1A herunterreguliert (Hecker *et al.* 2012). In allen drei Arbeiten wurde die Herunterregulierung von FCER1A mittels rt-PCR validiert. FCER1A scheint somit generell unter IFN- β -Therapien herunterreguliert zu sein. Das Gen FCER1A kodiert einen Rezeptor auf Monozyten und dendritischen Zellen, der durch Bindung von Immunglobulin E zu einer gesteigerten Zytokinproduktion führt (Kraft & Kinet 2007). Um die genaue Bedeutung von FCER1A und der anderen DEG bei der MS-Therapie mit IFN- β -Präparaten besser einschätzen zu können, bedarf es weitergehender, mitunter zelltypspezifischer und proteomischer Untersuchungen.

In zukünftigen Studien könnte in größeren Patientenkohorten auf eine Korrelation zwischen dem klinischen Ansprechen einer IFN- β -Therapie und den individuellen Genexpressionsprofilen untersucht werden. Hierzu könnten die in der vorliegenden Arbeit als unter Therapie durchgehend DEG (n=19, Tab. 13) analysiert werden. Ferner sollte ermittelt werden, inwiefern das Vorliegen von NAK im Therapieverlauf veränderte Genexpressionsspiegel erklärt. Möglicherweise gelingt es so, Biomarker zu identifizieren, die Aussagen über das therapeutische Ansprechen geben und somit bei der Entscheidung bei erwogenen Therapieumstellungen helfen.

5.3.3 Biologische Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG

Eine generelle Herausforderung bei Genexpressionsstudien besteht darin, die sehr umfangreichen Ergebnisse aus den Genexpressionsdaten zu interpretieren. Um mehr über die biologischen Funktionen der unter Therapie hochregulierten Gene ($n=173$) zu erfahren, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine *Gene-Set-Enrichment-Analyse*, bei der auf überrepräsentierte funktionelle *Gene Ontology* (GO)-Terme der GO-Kategorie „*biological process*“ untersucht wurde (Kap. 3.4.6 und 4.2.3). Auf die Analyse der zwei weiteren GO-Kategorien „*molecular function*“ und „*cellular component*“ wurde verzichtet, um die Anzahl der auszuwertenden GO-Terme einzugrenzen. Da unter Therapie mehr DEG hochreguliert waren, wurde ebenfalls zur Eingrenzung in der vorliegenden Arbeit auf eine GO-Analyse der 98 unter IFN- β -1b-Therapie herunterregulierten Gene verzichtet. Diese sind im *Supplementary Table 5* der Publikation „*Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN- β -1b treatment in relapsing remitting MS*“ (Goertsches *et al.* 2010) der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock zu finden.

Die durchgeführte GO-Analyse der hochregulierten DEG führte zu insgesamt vier GO-Term-Ergebnislisten. Die GO-Terme, die zu allen vier Zeitpunktvergleichen (TPI vs. D2, M1, M12 und M24) für die hochregulierten DEG signifikant überrepräsentiert waren, stellen übergeordnete GO-Terme dar und sind in Tab. 15 wiedergegeben. Die GO-Terme „*response to virus*“, „*response to biotic stimulus*“, „*response to other organism*“ und „*multiorganism process*“ zeigten eine hohe Überschneidung der hochregulierten DEG, wobei der GO-Term „*response to virus*“ am stärksten überrepräsentiert war. Diesen Kategorien gehörten unter anderem ISG, wie EIF2AK2, IFI44, ISG15, MX1, OAS1 und RSAD2, IFN-regulatorische Faktoren, wie IRF7 und IRF9, Transkriptionsfaktoren, wie STAT1 und STAT2 sowie Toll-like Rezeptoren, wie TLR7, an. Manche Autoren postulieren, dass der Hochregulation von TLR7 durch IFN- β eine entscheidende Rolle bei der klinischen Wirksamkeit, durch eine geringere Anzahl von Virus-getriggerten Schüben, zukommt (Derkow *et al.* 2013). Allerdings ist die Rolle von Viren bei MS noch nicht verstanden (Kap. 1.1). Ein weiterer übergeordneter GO-Term stellte „*response to stimulus*“ dar. Bei diesem GO-Term fiel eine Beteiligung einer Vielzahl von DEG, die an Immun-, Entzündungs- und Abwehrreaktionen beteiligt sind (Tab. 16), auf. Beispiele hierfür sind CCL2, CCR1, CXCL10 (TPI vs. M1), FPR1 und TYMP (TPI vs. M12). Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen bei MS bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut und der Migration zu den Entzündungsherden ins ZNS eine bedeutende Rolle (Szcucinski & Losy 2007, Cheng & Chen 2014).

Bisher existieren nur wenige Studien, die eine Assoziation molekularer Biomarker mit dem Auftreten von grippeähnlichen Nebenwirkungen beschreiben. Eine Studie postuliert eine Assoziation von hochreguliertem Interleukin-6 mit Fieber unter IFN- β -1b (Montalban *et al.* 2000), eine andere eine Assoziation grippeähnlicher Nebenwirkungen mit der sprunghaften Hochregulation der Zytokine CXCL10 und CCL2 nach der Applikation von IFN- β (Buttmann *et al.* 2007). Des Weiteren wurde

eine Assoziation zwischen der transienten Hochregulation von CXCL10 und entzündlichen Hautveränderungen beschrieben (Buttmann *et al.* 2005). Validierte molekulare Biomarker existieren hierzu nicht. Da die lokale Verträglichkeit einer applizierten Therapie bedeutenden Einfluss auf die Therapieadhärenz hat (Stewart & Tran 2012), wären molekulare Biomarker hierzu erstrebenswert. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Therapiealternativen erscheint es aktueller denn je, Patienten mit hohem Risiko für Nebenwirkungen unter einer IFN- β -Therapie, eine möglichst nebenwirkungsarme und gut verträgliche Therapie anbieten zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Assoziationsanalyse aufgetretener Nebenwirkungen mit den Genexpressionsdaten durchgeführt. Dies könnte ein Schwerpunkt weitergehender Untersuchungen mit diesen Daten sein.

5.3.4 Geninteraktionen der unter Therapie differentiell exprimierten Gene

Um wechselseitige Interaktionen der 269 DEG unter IFN- β -1b-Therapie zu untersuchen, erfolgte unter Verwendung der Interaktionsinformationen der *Pathway Architect* 2.0.1. Software (Stratagene) eine Geninteraktionsnetzwerkanalyse. Die Interaktionsinformationen der verwendeten Software stammen überwiegend aus der Literatur und wurden über Text-Mining-Algorithmen generiert (Kap. 3.4.7). Demnach spiegeln die Geninteraktionsnetzwerke bekannte Geninteraktionen wider. Die erstellten Geninteraktionsnetzwerke vermitteln einen Ausschnitt aller molekularen Interaktionen der 269 DEG. Alternativ hierzu hätte eine deutlich aufwändigere Netzwerkinferenz-Analyse erfolgen können, bei der, neben aus der Literatur und aus Datenbanken stammenden Interaktionsinformationen, Daten zur Genexpression oder zu Protein-DNA-Interaktionen berücksichtigt werden können (Hecker *et al.* 2009). Hierdurch hätten in der Literatur bisher unbekannte Geninteraktionen aufgezeigt werden können. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es jedoch die 269 DEG bekannten wechselseitigen Interaktionen zuordnen zu können.

Von den 269 DEG zeigten 54 DEG wechselseitige molekulare Interaktionen. Insgesamt 15 dieser DEG interagierten in Geninteraktionsnetzwerken verschiedener Zeitpunktvergleiche. Insbesondere wurden zu sieben der 19 zu allen Zeitpunktvergleichen DEG (Tab. 13) in mindestens einem Geninteraktionsnetzwerk Interaktionen aufgezeigt (Abb. 16). Da die verwendete *Pathway Architect* Software verschiedene Interaktionstypen unterscheidet, bestanden zwischen einigen Genen mehrere Verbindungen. Ein Beispiel hierfür sind die beiden herunterregulierten Gene ITGA2B und ITGB3. Diese bilden einen Proteinkomplex, wobei ITGA2B außerdem die Genexpression von ITGB3 auf RNA-Ebene reguliert (Abb. 16). Zwischen einzelnen Genen innerhalb der Geninteraktionsnetzwerke fielen Rückkopplungsmechanismen auf, wobei sich diese verstärkend oder selbstregulierend auswirken können.

Erwartungsgemäß bestand einen Monat nach TPI, dem Zeitpunktvergleich mit dem größten transkriptionellen Effekt der applizierten IFN- β -1b-Therapie (Kap. 5.3.2), die größte Anzahl (n=42, Abb. 16) wechselseitiger Interaktionen. Die häufigsten Interaktionen zeigte zu diesem Zeitpunktvergleich STAT1 (n=8, Abb. 16). Der Transkriptionsfaktor STAT1 ist substantieller

Bestandteil des JAK-STAT-Signalwegs (Ivashkiv & Donlin 2014). Beim JAK-STAT-Signalweg führt die Bindung von IFN- β zu einer Aktivierung des IFNAR-Komplexes. Dieser Komplex setzt sich aus den auf der Zelloberfläche lokalisierten Untereinheiten des IFNAR-Rezeptors (IFNAR1 und 2) sowie zellständig gebundenen Tyrosinkinasen (JAK1 und TYK2) zusammen. Durch die Aktivierung des IFNAR-Komplexes werden die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 phosphoryliert und bilden mit dem Transkriptionsfaktor IRF9 den ISGF3-Komplex. Dieser Komplex bewirkt durch die Bindung an das DNA-Bindemotiv *Interferon-stimulated Response Element* im Nukleus die Expression zahlreicher ISG (Ivashkiv & Donlin 2014). Die Bindung von STAT2 und IRF9 sowie einen verstärkenden Rückkopplungsmechanismus dieser beiden DEG zeigt das Geninteraktionsnetzwerk zum Zeitpunktvergleich TPI vs. M24. In den beiden großen Geninteraktionsnetzwerken zum Zeitpunktvergleich TPI vs. M1 bzw. vs. M12 (Abb. 16) ist ferner zu sehen, dass STAT1 eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors IRF7 bewirkt. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors wird ebenfalls durch den ISGF3-Komplex induziert (Sato *et al.* 1998), woraufhin IRF7 die Transkription einer Vielzahl anderer ISG reguliert. Hierdurch kommt IRF7 eine Schlüsselrolle bei verstärkenden Rückkopplungsmechanismen zu (Panne *et al.* 2007, Paun & Pitha 2007).

Die Hochregulation und Aktivierung von STAT1 bewirkt darüber hinaus eine Hochregulation des Chemokins CCL2, welches wiederum wechselseitig mit dem Chemokin CXCL10 interagiert. Chemokine und Chemokinrezeptoren führen zu einer vermehrten Rekrutierung von Leukozyten zu den MS-Entzündungsherden (Cheng & Chen 2014). CCL2 bindet an den CCR2-Rezeptor (O'Boyle *et al.* 2007) und CXCL10 an den CXCR3-Rezeptor (Müller *et al.* 2010), was zu einer stärkeren chemotaktischen Stimulation CCR2- und CXCR3-exprimierender Zellen, wie Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten, führt (Szcucinski & Losy 2007, Deshmane *et al.* 2009). In zukünftigen Studien sollte die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren bei Rückkopplungsmechanismen und die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei MS und MS-Therapien weitergehend untersucht werden.

5.4 Prognostische Biomarker-Kandidaten bei RRMS

Obwohl mittlerweile eine Vielzahl medikamentöser Therapieoptionen zur Auswahl steht (Kap. 1.4), bleibt MS eine nicht kausal heilbare, chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung. Eine individuelle Langzeitprognose bei Erkrankungsbeginn zu stellen, ist derzeit nicht möglich. Die medikamentösen Therapien führen zu einer Entschleunigung der Erkrankung, dies allerdings bei individuell unterschiedlich ausgeprägtem Therapieansprechen. Prognostische Biomarker vermögen idealerweise den individuellen Krankheitsverlauf vorherzusagen und Entscheidungshilfen bei der individuell wirksamsten und nebenwirkungsärmsten Therapiewahl darzustellen (Kap. 1.5). Mit der individuell wirksamsten Therapieoption ließe sich nicht nur der Krankheitsverlauf des einzelnen günstig beeinflussen, sondern zudem die sehr hohen sozioökonomischen Kosten reduzieren (Reese *et al.* 2011).

Bisher wurden mehrere prognostische molekulare Biomarker bei MS vorgeschlagen, wobei nur wenige unabhängig bestätigt werden konnten und im klinischen Alltag implementiert und angewendet werden (Comabella & Montalban 2014, Fitzner *et al.* 2015). Schwierigkeiten bei der Identifizierung und Validierung prognostischer Biomarker bestehen in der noch unzureichend verstandenen multifaktoriellen Ätiopathogenese der MS, dem individuell sehr heterogen ausgeprägten Krankheitsverlauf sowie biologischen und experimentellen Einflussfaktoren (Kap. 5.3.1). Zusätzlich kommt erschwerend hinzu, dass die Beurteilung des Krankheitsverlaufes erst mehrere Jahre nach Krankheitsbeginn erfolgen kann, was die Durchführung entsprechender prospektiver Studien langwierig macht.

Zur Bestimmung prognostischer Biomarker für den klinischen Krankheitsverlauf erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Assoziationsanalyse der Genexpressionsprofile der 25 Patienten zu Therapiebeginn mit dem Krankheitsverlauf anhand der Schubhäufigkeit (Kap. 3.5). Schübe während des ersten Therapiehalbjahres wurden aufgrund der anfangs noch unzureichenden therapeutischen Effekte nicht berücksichtigt (Waubant *et al.* 2003). Die klinische Nachbeobachtungszeitspanne wurde auf 24 Monate beschränkt. Die Assoziationsanalyse brachte 20 differentiell exprimierte *Probesets*/Gene als prognostische Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf (≥ 1 Schub) hervor (Tab. 17). Einer der 20 Biomarker-Kandidaten stellt ICOSLG dar. ICOSLG wird von Endothelzellen des ZNS exprimiert und wirkt als Kostimulator und Aktivator von T-Lymphozyten im ZNS (Wheway *et al.* 2013). Es wird propagiert, dass die Dysregulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort im ZNS eine zentrale Rolle bei der Krankheitsentstehung von MS spielt (Comabella & Khoury 2012). Die Beurteilung des prognostischen Wertes der in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Biomarker-Kandidaten könnte in einer mehrere Genexpressionsstudien umfassenden, und somit eine große Patientenkohorte berücksichtigenden, Metaanalyse erfolgen. Ziel weiterer Studien könnte es außerdem sein, die Zusammenhänge der vorgeschlagenen 20 Biomarker-Kandidaten mit Multiple Sklerose zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine sechs Jahre dauernde klinische und paraklinische Evaluation des Krankheitsverlaufs von 25 mit IFN- β -1b behandelten MS-Patienten. Darüber hinaus erfolgte zu fünf Untersuchungszeitpunkten während der ersten zwei Therapiejahre eine Genexpressionsanalyse, um die molekularen Wirkmechanismen der Therapie näher zu beleuchten und um prognostische molekulare Biomarker-Kandidaten aufzuzeigen. Andere derart umfassende, eine Zeitachse von sechs Jahren abdeckende, Studien sind bisher nicht publiziert. Die dargelegten Ergebnisse spiegeln zum Teil Bekanntes wider. Es wurden bisher aber auch nicht mit MS oder IFN- β in Zusammenhang gebrachte Gene/*Probesets* als Biomarker-Kandidaten gefiltert. Des Weiteren wurden Gene, wie FCER1A, CMPK2 und FFAR2, als unter Therapie differentiell exprimiert identifiziert, zu denen bisher wenig bekannt ist und die daher in zukünftiger Studien weitergehend untersucht werden sollten.

6 Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung, die zu Beginn der Erkrankung überwiegend durch einen schubförmigen (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS), in der weiteren Entwicklung der Erkrankung häufig durch einen chronisch progredienten Krankheitsverlauf (*secondary-progressive multiple sclerosis*, SPMS) charakterisiert ist. Das Krankheitsbild ist vielgestaltig, der Verlauf und die Progression sind bei Diagnosestellung schwer abzuschätzen und das Ansprechen auf applizierte Medikamente individuell verschieden. Mittlerweile existieren mehrere medikamentöse Therapieoptionen, wobei IFN- β -Präparate derzeit als Standardtherapie der RRMS gelten. Die Schlüsselstudien der IFN- β -Präparate zeigten signifikante Reduktionen der Krankheitsaktivität, gemessen anhand der klinischen Schubaktivität und bildgebend anhand von MS-typischen T2-Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT). Dennoch besteht bei ca. einem Drittel der mit einem IFN- β -Präparat therapierten Patienten eine anhaltend hohe Krankheitsaktivität. Bisher angewandte klinische und paraklinische Therapiemarker ermöglichen erst nach einigen Monaten eine Aussage über das individuelle therapeutische Ansprechen. Zu diesem Zeitpunkt können bereits irreversible neurologische Beeinträchtigungen bestehen. Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben ist die Identifizierung von Biomarkern zum Therapiemonitoring, zur Einschätzung des therapeutischen Ansprechens bzw. der zu erwartenden Krankheitsprogression. Des Weiteren soll ein besseres Verständnis über die kurz- und langfristigen molekularen Wirkmechanismen von IFN- β im Blut erlangt werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde über einen Zeitraum von sechs Jahren der klinische und paraklinische Krankheitsverlauf bei 25 MS-Patienten evaluiert. Alle Patienten wurden auf zweitägig zu applizierendes, subkutanen IFN- β -1b (250 μ g) eingestellt und über einen Mindestzeitraum von zwei Jahren behandelt. Erfolgte eine Therapieumstellung, wurden weiterhin klinische und paraklinische Daten dokumentiert. Der klinische Krankheitsverlauf der Patienten wurde anhand der EDSS-Werte und der Anzahl der Schübe evaluiert. Paraklinisch wurden bei klinischer Indikation angefertigte evozierte Potentiale (MEP, SEP und VEP) und zerebrale MRT-Untersuchungen berücksichtigt. Klinisch wurde außerdem die Verträglichkeit der IFN- β -1b-Therapie ausgewertet. Darüber hinaus erfolgte bei allen Patienten eine Genexpressionsanalyse im Blut, um die molekularen Wirkmechanismen von IFN- β -1b besser zu verstehen und um prognostische molekulare Biomarker-Kandidaten zu benennen. Hierzu wurde zu fünf definierten Zeitpunkten (Therapieinitiierung (TPI), zwei Tage nach TPI (D2), einen Monat nach TPI (M1), zwölf Monate nach TPI (M12) und 24 Monate nach TPI (M24)) bei allen Patienten die mRNA aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) extrahiert und per Oligonukleotid-Microarrays auf signifikante Genexpressionsänderungen, als Reaktion auf die applizierte IFN- β -1b-Therapie, analysiert. Um die wechselseitigen Interaktionen zwischen den unter Therapie als differentiell exprimiert identifizierten Genen (DEG) darzustellen, erfolgte eine Gennetzwerkanalyse. Darüber hinaus wurden die biologischen Funktionen der unter IFN-

β -1b hochregulierten DEG analysiert. Zur Identifikation prognostischer Biomarker-Kandidaten erfolgte eine Assoziationsanalyse der Genexpressionsprofile zum Zeitpunkt der TPI mit dem klinischen Krankheitsverlauf, gemessen an der Schubaktivität innerhalb der ersten zwei Therapiejahre.

Während der sechsjährigen Nachbeobachtungszeit beendeten acht Patienten nach im Mittel $44,6 \pm 16,2$ (SW 23 - 68) Monaten die IFN- β -1b-Therapie. Gründe hierfür waren: Vorliegen einer Schwangerschaft, Therapieinadhärenz, Zweifel der Therapieerfordernis bei stabilem Krankheitsverlauf, eine unverändert hohe Krankheitsaktivität sowie der Übergang in eine SPMS. Insgesamt zeigten die durchgängig mit IFN- β -1b therapierten Patienten (n=17) einen günstigeren Krankheitsverlauf als die „Therapieabbrecher“ (n=8). Bei den „Therapieabbrechern“ lag die EDSS-Progression sechs Jahre nach TPI um im Mittel 2,01 EDSS-Punkte signifikant höher (p-Wert 0,0084) als bei den durchgängig therapierten Patienten. Bei den „Therapieabbrechern“ fiel eine höhere mittlere jährliche Schubrate auf. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit angewandten klinischen Bewertungsscores lassen die Schubaktivität gegenüber der EDSS-Progression als restriktiveren Parameter zur Einschätzung kurzfristiger Krankheitsverläufe erscheinen.

Die paraklinische Diagnostik erfolgte bevorzugt bei klinischer Indikation. Aus diesem Grund lagen nicht zu jedem Patienten Verlaufsuntersuchungen vor. Die Ausgangsuntersuchungen erfolgten durchschnittlich $3,0 \pm 3,6$ (SW 0 - 21) Monate vor und die Verlaufsuntersuchungen im Mittel fünfeinhalb Jahre ($65,7 \pm 19,1$ Monate; SW 27,4 - 88,6) nach TPI. Nach den angewandten Responsekriterien wurden die Patienten mehrheitlich als Non-Responder eingestuft (cMRT 75 %, VEP 50 %, SEP $\sim$ 58 % und MEP $\sim$ 65 %). Ein Vergleich der Ergebnisse der klinischen und paraklinischen Evaluation ließ die cMRT als restriktiveren Parameter zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs erscheinen. In klinischen MS-Studien und den Schlüsselstudien aller zur Therapie der RRMS zugelassenen Therapeutika stellen MRT-Untersuchungen gemeinsam mit der Schubratenreduktion die wesentlichen Parameter zur medikamentösen Effektivitätsbeurteilung dar.

Die lokale und systemische Verträglichkeit der IFN- β -1b-Therapie kann in der untersuchten Patientenkohorte als gut bezeichnet werden. Lokale Nebenwirkungen im Injektionsbereich traten am stärksten während des ersten Behandlungsjahres (bei $\sim$ 30 % der Patienten) auf, wurden jedoch während der gesamten Nachbeobachtungszeit dokumentiert (im späteren Therapieverlauf $\sim$ 22 %). Grippeähnliche Nebenwirkungen traten vor allem während des ersten Behandlungshalbjahres auf (44 %, im späteren Therapieverlauf $\sim$ 10 %). Eine Begleitmedikation zum Kupieren grippeähnlicher Nebenwirkungen war lediglich bei zwei Patientinnen über die ersten sechs Behandlungsmonate hinaus erforderlich.

Während der ersten zwei IFN- β -1b-Therapiejahre erfolgte bei allen 25 MS-Patienten zu fünf definierten Zeitpunkten eine Microarray-Genexpressionsanalyse in PBMC. Es wurden ca. 20.000 Gene untersucht, wobei insgesamt 269 Gene als unter IFN- β -1b differentiell exprimiert identifiziert

wurden. Insgesamt fiel hierbei ein deutliches Überwiegen der verstärkt exprimierten Gene auf. Den größten transkriptionellen Effekt zeigte die applizierte Therapie einen Monat nach TPI (175 DEG). Viele der hochregulierten DEG sind bekannte IFN-stimulierte Gene (ISG) mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften. Sie stellen Marker der biologischen Aktivität von IFN- β -Präparaten dar. Exemplarisch seien hier MX1, Mitglieder der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase(OAS)-Familie, EIF2AK2, RSAD2, Mitglieder der IFIT-Familie, IFI44 und ISG15 genannt. Von den 269 DEG waren 19 Gene zu allen vier Zeitpunktvergleichen (TPI vs. D2, M1, M12 und M24) differentiell exprimiert. Während die meisten dieser 19 DEG zu bekannten ISG gehören, ist die genaue Bedeutung anderer Gene, wie von FCER1A, CMPK2 und FFAR2, bei MS weitgehend unbekannt. Das Gen FCER1A, dessen Genprodukt ein Rezeptor auf Monozyten und dendritischen Zellen darstellt, scheint generell unter IFN- β -Therapien herunterreguliert zu sein. Es ist bekannt, dass der IFN- β -induzierte JAK-STAT-Signalweg besonders in Monozyten aktiviert wird. Aus diesen Gründen sollte in zukünftigen zelltypspezifischen Studien die Rolle von Monozyten bei der Wirkweise von IFN- β -Präparaten näher untersucht werden. Von den 269 unter IFN- β -1b DEG zeigten 54 Gene wechselseitige molekulare Interaktionen, wobei der Transkriptionsfaktor STAT1 hierbei die meisten Geninteraktionen aufwies. Die Analyse der biologischen Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG (n=173) zeigte, dass die überrepräsentierten Genfunktionen vor allem Abwehrreaktionen und Immunreaktionen zugeordnet werden können. Die in dieser Arbeit durchgeführte Assoziationsanalyse zur Identifikation prognostischer Biomarker führte zu 20 Biomarker-Kandidaten. Keiner dieser Biomarker-Kandidaten wurde bisher als solcher vorbeschrieben und muss daher in zukünftigen Studien validiert werden.

Die vorliegende Arbeit untersuchte den langfristigen klinischen und paraklinischen Krankheitsverlauf von mit IFN- β -1b therapierten Patienten. Darüber hinaus wurden anhand einer zwei Therapiejahre umfassenden Genexpressionsanalyse die molekularbiologischen Wirkweisen der Therapie näher untersucht. Es wurden hierbei DEG detektiert, zu denen bisher wenig bekannt ist und DEG detektiert, die zu allen Untersuchungszeitpunkten durchgängig differentiell exprimiert sind und somit biologische Aktivitätsmarker der Therapie darstellen. Des Weiteren wurden Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf benannt. Der Stellenwert der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Biomarker-Kandidaten sowie der biologischen Aktivitätsmarker sollten in zukünftigen Studien weitergehend untersucht werden. Diesbezüglich besteht weiterhin erheblicher Forschungsbedarf. Um eine individuell bestmögliche Therapie zu gewährleisten, werden valide diagnostische, prognostische und Krankheitsaktivitätsmarker benötigt.

7 Literaturverzeichnis

Andersson, M., J. Alvarez-Cermeño, G. Bernardi, I. Cogato, P. Fredman, J. Frederiksen, S. Fredrikson, P. Gallo, L. M. Grimaldi, M. Gronning et al. (1994). "Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**(8): 897-902.

Annibali, V., S. Di Giovanni, S. Cannoni, E. Giugni, R. Bomprezzi, C. Mattei, A. Elkahouloun, E. M. Coccia, M. Alfo, F. Orzi et al. (2007). "Gene expression profiles reveal homeostatic dynamics during interferon-beta therapy in multiple sclerosis." *Autoimmunity* **40**(1): 16-22.

Ascherio, A. & K. L. Munger (2007). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection." *Ann Neurol* **61**(4): 288-299.

Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig et al. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet* **25**(1): 25-29.

Auer, P. L., S. Srivastava & R. W. Doerge (2012). "Differential expression--the next generation and beyond." *Brief Funct Genomics* **11**(1): 57-62.

Axtell, R. C., B. A. de Jong, K. Boniface, L. F. van der Voort, R. Bhat, P. De Sarno, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J. G. Castellanos 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.

Barkhof, F., M. Filippi, D. H. Miller, P. Scheltens, A. Campi, C. H. Polman, G. Comi, H. J. Adèr, N. Losseff & J. Valk (1997). "Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis." *Brain* **120**(Pt 11): 2059-2069.

Beecham, A. H., N. A. Patsopoulos, D. K. Xifara, M. F. Davis, A. Kempainen, C. Cotsapas, T. S. Shah, C. Spencer, D. Booth, A. Goris et al. (2013). "Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis." *Nat Genet* **45**(11): 1353-1360.

Belbasis, L., V. Bellou, E. Evangelou, J. P. Ioannidis & I. Tzoulaki (2015). "Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses." *Lancet Neurol* **14**(3): 263-273.

Berer, K., M. Mues, M. Koutoulos, Z. A. Rasbi, M. Boziki, C. Johnner, H. Wekerle & G. Krishnamoorthy (2011). "Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination." *Nature* **479**(7374): 538-541.

Biomarkers Definitions Working Group (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." *Clin Pharmacol Ther* **69**(3): 89-95.

Blake, J. A., M. Dolan, H. Drabkin, D. P. Hill, N. Li, D. Sitnikov, S. Bridges, S. Burgess, T. Buza, F. McCarthy et al. (2013). "Gene Ontology annotations and resources." *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue): D530-535.

Brecher, M. E. (2002). "Plasma exchange: why we do what we do." *J Clin Apher* **17**(4): 207-211.

Brettschneider, J., H. Tumani, U. Kiechle, R. Muche, G. Richards, V. Lehmannsiek, A. C. Ludolph & M. Otto (2009). "IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome." *PLoS One* **4**(11): e7638.

Bushnell, S. E., Z. Zhao, C. C. Stebbins, D. Cadavid, A. M. Buko, E. T. Whalley, J. A. Davis, E. M. Versage, J. R. Richert, R. C. Axtell et al. (2012). "Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFN-beta-1a in relapsing-remitting MS." *Neurology* **79**(6): 531-537.

- Buttmann, M., M. Goebeler, A. Toksoy, S. Schmid, W. Graf, F. Berberich-Siebelt & P. Rieckmann (2005). "Subcutaneous interferon-beta injections in patients with multiple sclerosis initiate inflammatory skin reactions by local chemokine induction." *J Neuroimmunol* **168**(1-2): 175-182.
- Buttmann, M., C. Merzyn, H. H. Hofstetter & P. Rieckmann (2007). "TRAIL, CXCL10 and CCL2 plasma levels during long-term Interferon-beta treatment of patients with multiple sclerosis correlate with flu-like adverse effects but do not predict therapeutic response." *J Neuroimmunol* **190**(1-2): 170-176.
- Calabresi, P. A., B. C. Kieseier, D. L. Arnold, L. J. Balcer, A. Boyko, J. Pelletier, S. Liu, Y. Zhu, A. Seddighzadeh, S. Hung et al. (2014). "Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study." *Lancet Neurol* **13**(7): 657-665.
- Castro-Borrero, W., D. Graves, T. C. Frohman, A. B. Flores, P. Hardeman, D. Logan, M. Orchard, B. Greenberg & E. M. Frohman (2012). "Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review." *Ther Adv Neurol Disord* **5**(4): 205-220.
- Chalifa-Caspi, V., I. Yanai, R. Ophir, N. Rosen, M. Shmoish, H. Benjamin-Rodrig, M. Shklar, T. I. Stein, O. Shmueli, M. Safran et al. (2004). "GeneAnnot: comprehensive two-way linking between oligonucleotide array probesets and GeneCards genes." *Bioinformatics* **20**(9): 1457-1458.
- Cheng, W. & G. Chen (2014). "Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis." *Mediators Inflamm* **2014**: 659206.
- Cohen, B. A., O. Khan, D. R. Jeffery, K. Bashir, S. A. Rizvi, E. J. Fox, M. Agius, R. Bashir, T. E. Collins, R. Herndon et al. (2004). "Identifying and treating patients with suboptimal responses." *Neurology* **63**(12 Suppl 6): S33-40.
- Comabella, M. & S. J. Khoury (2012). "Immunopathogenesis of multiple sclerosis." *Clin Immunol* **142**(1): 2-8.
- Comabella, M., J. D. Lünemann, J. Río, A. Sánchez, C. López, E. Julia, M. Fernández, L. Nonell, M. Camiña-Tato, F. Deisenhammer et al. (2009). "A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis." *Brain* **132**(Pt 12): 3353-3365.
- Comabella, M. & X. Montalban (2014). "Body fluid biomarkers in multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **13**(1): 113-126.
- Confavreux, C., P. O'Connor, G. Comi, M. S. Freedman, A. E. Miller, T. P. Olsson, J. S. Wolinsky, T. Bagulho, J. L. Delhay, D. Dukovic et al. (2014). "Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial." *Lancet Neurol* **13**(3): 247-256.
- Confavreux, C. & S. Vukusic (2006). "Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept." *Brain* **129**(Pt 3): 606-616.
- Creel, D. J. (2015). "Visually Evoked Potentials." *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Stand 14.07.2015. Abgerufen am 19.11.2015, verfügbar unter <http://webvision.med.utah.edu/book/electrophysiology/visually-evoked-potentials/>.
- Cui, X. & G. A. Churchill (2003). "Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments." *Genome Biol* **4**(4): 210.
- Derkow, K., J. M. Bauer, M. Hecker, B. K. Paap, M. Thamilarasan, D. Koczan, E. Schott, K. Deuschle, J. Bellmann-Strobl, F. Paul et al. (2013). "Multiple sclerosis: modulation of toll-like receptor (TLR) expression by interferon-beta includes upregulation of TLR7 in plasmacytoid dendritic cells." *PLoS One* **8**(8): e70626.

- Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini & B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." *J Interferon Cytokine Res* **29**(6): 313-326.
- Devonshire, V., Y. Lapierre, R. Macdonell, C. Ramo-Tello, F. Patti, P. Fontoura, L. Suchet, R. Hyde, I. Balla, E. M. Frohman et al. (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 & KKNMS (2015). "Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Online-Version, Stand 21.08.2015." AWMF-Registernummer: 030-050.
- Dingermann, T. & I. Zündorf (2013). Pharmakologie von Interferon beta-1b. In: Betaferon®: 25 Jahre Multiple Sklerose Forschung. T. Berger, H. Linnebank und H. Wiendl. Wien, Springer-Verlag: 28-38.
- Disanto, G., J. M. Morahan, M. H. Barnett, G. Giovannoni & S. V. Ramagopalan (2012). "The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis." *Neurology* **78**(11): 823-832.
- Dobson, R., R. A. Rudick, B. Turner, K. Schmierer & G. Giovannoni (2014). "Assessing treatment response to interferon-beta: is there a role for MRI?" *Neurology* **82**(3): 248-254.
- Ehler, J., S. Koball, M. Sauer, S. Mitzner, H. Hickstein, R. Benecke & U. K. Zettl (2015). "Response to Therapeutic Plasma Exchange as a Rescue Treatment in Clinically Isolated Syndromes and Acute Worsening of Multiple Sclerosis: A Retrospective Analysis of 90 Patients." *PLoS One* **10**(8): e0134583.
- Ellison, G. W., L. W. Myers, B. D. Leake, M. R. Mickey, D. Ke, K. Syndulko & W. W. Tourtellotte (1994). "Design strategies in multiple sclerosis clinical trials. The Cyclosporine Multiple Sclerosis Study Group." *Ann Neurol* **36**(Suppl): 108-112.
- European Medicines Agency. (2006). "Betaferon®: Summary of product characteristics." Abgerufen am 19.11.2015, verfügbar unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000081/WC500053225.pdf.
- European Study Group on IFNB-1b in SPMS (1998). "Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis." *Lancet* **352**(9139): 1491-1497.
- Falcon, S. & R. Gentleman (2007). "Using GStats to test gene lists for GO term association." *Bioinformatics* **23**(2): 257-258.
- Felgenhauer, K. & H. Reiber (1992). "The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system." *Clin Investig* **70**(1): 28-37.
- Fensterl, V. & G. C. Sen (2011). "The ISG56/IFIT1 gene family." *J Interferon Cytokine Res* **31**(1): 71-78.
- Fernández, O. (2013). "Integrating the tools for an individualized prognosis in multiple sclerosis." *J Neurol Sci* **331**(1-2): 10-13.
- Fernández, O. (2014). "Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis." *J Inflamm Res* **7**: 19-27.
- Fernández, O., E. Agüera, G. Izquierdo, J. Millán-Pascual, I. T. L. Ramió, P. Oliva, J. Argente, Y. Berdei, J. M. Soler, O. Carmona et al. (2012). "Adherence to interferon beta-1b treatment in patients with multiple sclerosis in Spain." *PLoS One* **7**(5): e35600.

- Ferrari, F., S. Bortoluzzi, A. Coppe, A. Sirota, M. Safran, M. Shmoish, S. Ferrari, D. Lancet, G. A. Danieli & S. Bicciato (2007). "Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot." *BMC Bioinformatics* **8**: 446.
- Filippi, M. & M. A. Rocca (2011). "MR imaging of multiple sclerosis." *Radiology* **259**(3): 659-681.
- Filippi, M., M. A. Rocca, F. Camesasca, S. Cook, P. O'Connor, B. G. Arnason, L. Kappos, D. Goodin, D. Jeffery, H. P. Hartung et al. (2011). "Interferon beta-1b and glatiramer acetate effects on permanent black hole evolution." *Neurology* **76**(14): 1222-1228.
- FirstWord MEDTECH. (2014). "Bayer Introduces First Bluetooth-enabled Injection Management System for Multiple Sclerosis Patients." Abgerufen am 19.11.2015, verfügbar unter <http://www.firstwordmedtech.com/node/968294>.
- Fitzner, B., M. Hecker & U. K. Zettl (2015). "Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." *Autoimmun Rev* **14**(10): 903-913.
- Flachenecker, P., K. Stuke, W. Elias, M. Freidel, J. Haas, D. Pitschnau-Michel, S. Schimrigk, U. K. Zettl & P. Rieckmann (2008). "Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006." *Dtsch Arztebl Int* **105**(7): 113-119.
- Flachenecker, P. & U. K. Zettl (2015a). Epidemiologie. In: Multiple Sklerose. R. M. Schmidt, F. A. Hoffmann, J. H. Faiss und W. Köhler. München, Urban & Fischer Verlag: 11-18.
- Flachenecker, P. & U. K. Zettl (2015b). Krankheitsverlauf und Prognose. In: Multiple Sklerose. R. M. Schmidt, F. A. Hoffmann, J. H. Faiss und W. Köhler. München, Urban & Fischer Verlag: 63-74.
- Fox, R. J., D. H. Miller, J. T. Phillips, M. Hutchinson, E. Havrdova, M. Kita, M. Yang, K. Raghupathi, M. Novas, M. T. Sweetser et al. (2012). "Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis." *N Engl J Med* **367**(12): 1087-1097.
- Fraussen, J., N. Claes, L. de Bock & V. Somers (2014). "Targets of the humoral autoimmune response in multiple sclerosis." *Autoimmun Rev* **13**(11): 1126-1137.
- Freedman, M. S., D. Selchen, D. L. Arnold, A. Prat, B. Banwell, M. Yeung, D. Morgenthau & Y. Lapierre (2013). "Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations." *Can J Neurol Sci* **40**(3): 307-323.
- Frisullo, G., V. Nociti, R. Iorio, A. K. Patanella, M. Caggiula, A. Marti, C. Sancricca, F. Angelucci, M. Mirabella, P. A. Tonali et al. (2009). "Regulatory T cells fail to suppress CD4T⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients." *Immunology* **127**(3): 418-428.
- German Cancer Research Center. (2012). "Affymetrix technology." Abgerufen am 19.11.2015, verfügbar unter http://www.dkfz.de/gpcf/affymetrix_genechips.html.
- Gilli, F., F. Marnetto, M. Caldano, A. Sala, S. Malucchi, A. Di Sapio, M. Capobianco & A. Bertolotto (2005). "Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **158**(1-2): 195-203.
- Goertsches, R. & U. K. Zettl (2007). "MS therapy research applying genome-wide RNA profiling of peripheral blood." *Int MS J* **14**(3): 98-107.
- Goertsches, R. H., M. Hecker, D. Koczan, P. Serrano-Fernandez, S. Moeller, H. J. Thiesen & U. K. Zettl (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.

- Goertsches, R. H., M. Hecker & U. K. Zettl (2008). "Monitoring of multiple sclerosis immunotherapy: from single candidates to biomarker networks." *J Neurol* **255 Suppl 6**: 48-57.
- Goertsches, R. H., U. K. Zettl & M. Hecker (2011). "Sieving treatment biomarkers from blood gene-expression profiles: a pharmacogenomic update on two types of multiple sclerosis therapy." *Pharmacogenomics* **12**(3): 423-432.
- Gold, R., L. Kappos, D. L. Arnold, A. Bar-Or, G. Giovannoni, K. Selmaj, C. Tornatore, M. T. Sweetser, M. Yang, S. I. Sheikh et al. (2012). "Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **367**(12): 1098-1107.
- Goodin, D. S. (2005). "Treatment of multiple sclerosis with human beta interferon." *Int MS J* **12**(3): 96-108.
- Goodin, D. S., G. C. Ebers, G. Cutter, S. D. Cook, T. O'Donnell, A. T. Reder, M. Kremenchutzky, J. Oger, M. Rametta, K. Beckmann et al. (2012). "Cause of death in MS: long-term follow-up of a randomised cohort, 21 years after the start of the pivotal IFNbeta-1b study." *BMJ Open* **2**(6): e001972.
- Granberg, T., J. Martola, M. Kristoffersen-Wiberg, P. Aspelin & S. Fredrikson (2013). "Radiologically isolated syndrome - incidental magnetic resonance imaging findings suggestive of multiple sclerosis, a systematic review." *Mult Scler* **19**(3): 271-280.
- Grunwald, I. Q., A. L. Kühn, M. Backens, K. Shariat, P. Kostopoulos & P. Papanagiotou (2008). "Multiple Sklerose." *Radiologe* **48**(6): 544-552.
- Ha, M. & V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(8): 509-524.
- Haghikia, A., R. Linker & R. Gold (2014). "Fumarsäure in der Therapie der Multiplen Sklerose." *Nervenarzt* **85**(6): 720-726.
- Haller, O. & G. Kochs (2011). "Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity." *J Interferon Cytokine Res* **31**(1): 79-87.
- Hansen, K., K. Schüssel, M. Kieble, J. Werning, M. Schulz, R. Friis, D. Pohlau, N. Schmitz & J. Kugler (2015). "Adherence to Disease Modifying Drugs among Patients with Multiple Sclerosis in Germany: A Retrospective Cohort Study." *PLoS One* **10**(7): e0133279.
- Hartung, H. P., J. Haas, M. Meergans, F. Tracik & S. Ortler (2013). "Interferon-β1b in der Multiple-Sklerose-Therapie: Mehr als 20 Jahre klinische Erfahrung." *Nervenarzt* **84**(6): 679-704.
- Hartung, H. P., B. Kieseier, D. S. Goodin, B. G. Arnason, G. Comi, S. Cook, M. Filippi, D. R. Jeffery, L. Kappos, T. Bogumil et al. (2012). "Variability in detection and quantification of interferon beta-1b-induced neutralizing antibodies." *J Neuroinflammation* **9**: 129.
- Hecker, M., R. H. Goertsches, R. Engelmann, H. J. Thiesen & R. Guthke (2009a). "Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy." *BMC Bioinformatics* **10**: 262.
- Hecker, M., R. H. Goertsches, C. Fatum, D. Koczan, H. J. Thiesen, R. Guthke & U. K. Zettl (2012). "Network analysis of transcriptional regulation in response to intramuscular interferon-beta-1a multiple sclerosis treatment." *Pharmacogenomics J* **12**(2): 134-146.
- Hecker, M., C. Hartmann, O. Kandulski, B. K. Paap, D. Koczan, H. J. Thiesen & U. K. Zettl (2013a). "Interferon-beta therapy in multiple sclerosis: the short-term and long-term effects on the patients' individual gene expression in peripheral blood." *Mol Neurobiol* **48**(3): 737-756.

- Hecker, M., S. Lambeck, S. Toepfer, E. van Someren & R. Guthke (2009). "Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models-a review." *Biosystems* **96**(1): 86-103.
- Hecker, M., B. K. Paap, R. H. Goertsches, O. Kandulski, C. Fatum, D. Koczan, H. P. Hartung, H. J. Thiesen & U. K. Zettl (2011). "Reassessment of blood gene expression markers for the prognosis of relapsing-remitting multiple sclerosis." *PLoS One* **6**(12): e29648.
- Hecker, M., M. Thamilarasan, D. Koczan, I. Schröder, K. Flechtner, S. Freiesleben, G. Füllen, H. J. Thiesen & U. K. Zettl (2013b). "MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients." *Int J Mol Sci* **14**(8): 16087-16110.
- Hegen, H., A. Millonig, A. Bertolotto, M. Comabella, G. Giovannoni, M. Guger, M. Hoelzl, M. Khalil, J. Killestein, R. Lindberg et al. (2014). "Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development." *Mult Scler* **20**(5): 577-587.
- Heller, M. J. (2002). "DNA microarray technology: devices, systems, and applications." *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 129-153.
- Henze, T., P. Rieckmann & K. V. Toyka (2006). "Symptomatic treatment of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG) of the German Multiple Sclerosis Society." *Eur Neurol* **56**(2): 78-105.
- Hess, C. W. (2005). Motorisch evozierte Potentiale. In: *Evozierte Potentiale*. 4., vollständig überarbeitete und überarbeitete Auflage. M. Stöhr, J. Dichgans, U. W. Buettner und C. W. Hess. Heidelberg, Springer Medizin Verlag: 539-597.
- Hohlfeld, R. & H. Wekerle (2015). "Multiple Sklerose und Mikrobiota. Vom Genom zum Metagenom?" *Nervenarzt* **86**(8): 925-933.
- Hovanessian, A. G. (2007). "On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR." *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(5-6): 351-361.
- Hundeshagen, A., M. Hecker, B. K. Paap, C. Angerstein, O. Kandulski, C. Fatum, C. Hartmann, D. Koczan, H. J. Thiesen & U. K. Zettl (2012). "Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance." *J Neuroinflammation* **9**: 140.
- IFNB MS Study Group (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Neurology* **43**(4): 655-661.
- IFNB MS Study Group & the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (1995). "Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial." *Neurology* **45**(7): 1277-1285.
- Invernizzi, P., L. Bertolasi, M. R. Bianchi, M. Turatti, A. Gajofatto & M. D. Benedetti (2011). "Prognostic value of multimodal evoked potentials in multiple sclerosis: the EP score." *J Neurol* **258**(11): 1933-1939.
- Ivashkiv, L. B. & L. T. Donlin (2014). "Regulation of type I interferon responses." *Nat Rev Immunol* **14**(1): 36-49.
- Jacobs, L. D., D. L. Cookfair, R. A. Rudick, R. M. Herndon, J. R. Richert, A. M. Salazar, J. S. Fischer, D. E. Goodkin, C. V. Granger, J. H. Simon et al. (1996). "Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG)." *Ann Neurol* **39**(3): 285-294.

- Kappos, L., M. S. Freedman, C. H. Polman, G. Edan, H. P. Hartung, D. H. Miller, X. Montalbán, F. Barkhof, E. W. Radu, C. Metzger et al. (2009). "Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial." *Lancet Neurol* **8**(11): 987-997.
- Kappos, L., D. Li, P. A. Calabresi, P. O'Connor, A. Bar-Or, F. Barkhof, M. Yin, D. Leppert, R. Glanzman, J. Tinbergen et al. (2011). "Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial." *Lancet* **378**(9805): 1779-1787.
- Kappos, L., C. Polman, C. Pozzilli, A. Thompson, K. Beckmann & F. Dahlke (2001). "Final analysis of the European multicenter trial on IFNbeta-1b in secondary-progressive MS." *Neurology* **57**(11): 1969-1975.
- Kappos, L., C. H. Polman, M. S. Freedman, G. Edan, H. P. Hartung, D. H. Miller, X. Montalban, F. Barkhof, L. Bauer, P. Jakobs 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., B. Weinshenker, C. Pozzilli, A. J. Thompson, F. Dahlke, K. Beckmann, C. Polman & H. McFarland (2004). "Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials." *Neurology* **63**(10): 1779-1787.
- Katsavos, S. & M. Anagnostouli (2013). "Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview." *Mult Scler Int* **2013**: 340508.
- Khan, O., P. Rieckmann, A. Boyko, K. Selmaj & R. Zivadinov (2013). "Three times weekly glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis." *Ann Neurol* **73**(6): 705-713.
- Kieseier, B. C. (2011). "The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis." *CNS Drugs* **25**(6): 491-502.
- Kingwell, E., J. J. Marriott, N. Jetté, T. Pringsheim, N. Makhani, S. A. Morrow, J. D. Fisk, C. Evans, S. G. Béland, S. Kulaga et al. (2013). "Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review." *BMC Neurol* **13**(1): 128.
- Koudriavtseva, T., E. Onesti, I. F. Pestalozza, I. Sperduti & B. Jandolo (2012). "The importance of physician-patient relationship for improvement of adherence to long-term therapy: data of survey in a cohort of multiple sclerosis patients with mild and moderate disability." *Neurol Sci* **33**(3): 575-584.
- Kraft, S. & J. P. Kinet (2007). "New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition." *Nat Rev Immunol* **7**(5): 365-378.
- Kumar, M., N. Putzki, V. Limmroth, R. Remus, M. Lindemann, D. Knop, N. Mueller, C. Hardt, E. Kreuzfelder & H. Grosse-Wilde (2006). "CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **180**(1-2): 178-184.
- Kurtzke, J. F. (1983). "Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)." *Neurology* **33**(11): 1444-1452.
- Langer-Gould, A., S. M. Brara, B. E. Beaber & J. L. Zhang (2013). "Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups." *Neurology* **80**(19): 1734-1739.
- Larochelle, C., J. I. Alvarez & A. Prat (2011). "How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?" *FEBS Lett* **585**(23): 3770-3780.

- Lassmann, H. (2013). "Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis." *J Neurol Sci* **333**(1-2): 1-4.
- Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima & B. G. Weinshenker (2004). "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." *Lancet* **364**(9451): 2106-2112.
- Leocani, L. & G. Comi (2014). "Clinical neurophysiology of multiple sclerosis." *Handb Clin Neurol* **122**: 671-679.
- Leray, E., J. Yaouanq, E. Le Page, M. Coustans, D. Laplaud, J. Oger & G. Edan (2010). "Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis." *Brain* **133**(Pt 7): 1900-1913.
- Li, D. K. & D. W. Paty (1999). "Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. Prevention of Relapses and Disability by Interferon-beta1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis." *Ann Neurol* **46**(2): 197-206.
- Link, H. & Y. M. Huang (2006). "Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness." *J Neuroimmunol* **180**(1-2): 17-28.
- Liu, S. Y., D. J. Sanchez & G. Cheng (2011). "New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon." *Curr Opin Immunol* **23**(1): 57-64.
- Losy, J. (2013). "Is MS an inflammatory or primary degenerative disease?" *J Neural Transm* **120**(10): 1459-1462.
- Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sørensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof et al. (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions." *Neurology* **83**(3): 278-286.
- Ma, X., J. Zhou, Y. Zhong, L. Jiang, P. Mu, Y. Li, N. Singh, M. Nagarkatti & P. Nagarkatti (2014). "Expression, regulation and function of microRNAs in multiple sclerosis." *Int J Med Sci* **11**(8): 810-818.
- Malhotra, S., M. F. Bustamante, F. Pérez-Miralles, J. Río, M. C. Ruiz de Villa, E. Vegas, L. Nonell, F. Deisenhammer, N. Fissolo, R. N. Nurtudinov et al. (2011). "Search for specific biomarkers of IFNbeta bioactivity in patients with multiple sclerosis." *PLoS One* **6**(8): e23634.
- Malone, J. H. & B. Oliver (2011). "Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome." *BMC Biol* **9**: 34.
- Margaritella, N., L. Mendozzi, M. Garegnani, R. Nemni, E. Colicino, E. Gilardi & L. Pugnetti (2012). "Exploring the predictive value of the evoked potentials score in MS within an appropriate patient population: a hint for an early identification of benign MS?" *BMC Neurol* **12**: 80.
- McDonald, W. I., A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H. P. Hartung, F. D. Lublin, H. F. McFarland, D. W. Paty, C. H. Polman, S. C. Reingold 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.
- McDowell, T. Y., S. Amr, W. J. Culpepper, P. Langenberg, W. Royal, C. Bever & D. D. Bradham (2011). "Sun exposure, vitamin D and age at disease onset in relapsing multiple sclerosis." *Neuroepidemiology* **36**(1): 39-45.

- Melchjorsen, J., H. Kristiansen, R. Christiansen, J. Rintahaka, S. Matikainen, S. R. Paludan & R. Hartmann (2009). "Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections." *J Interferon Cytokine Res* **29**(4): 199-207.
- Meyer-Moock, S., Y. S. Feng, M. Maeurer, F. W. Dippel & T. Kohlmann (2014). "Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis." *BMC Neurol* **14**: 58.
- Mikol, D. D., F. Barkhof, P. Chang, P. K. Coyle, D. R. Jeffery, S. R. Schwid, B. Stubinski & B. Uitdehaag (2008). "Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REBif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial." *Lancet Neurol* **7**(10): 903-914.
- Miller, D. H., D. T. Chard & O. Ciccarelli (2012). "Clinically isolated syndromes." *Lancet Neurol* **11**(2): 157-169.
- Miller, D. H. & S. M. Leary (2007). "Primary-progressive multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **6**(10): 903-912.
- Milo, R. & E. Kahana (2010). "Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment." *Autoimmun Rev* **9**(5): A387-394.
- Montalban, X., I. Duran, J. Río, I. Saez-Torres, M. Tintoré & E. M. Martinez-Caceres (2000). "Can we predict flu-like symptoms in patients with multiple sclerosis treated with interferon-beta?" *J Neurol* **247**(4): 259-262.
- Montalban, X., M. Tintoré, J. Swanton, F. Barkhof, F. Fazekas, M. Filippi, J. Frederiksen, L. Kappos, J. Palace, C. Polman et al. (2010). "MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes." *Neurology* **74**(5): 427-434.
- Mowry, E. M., M. Pesic, B. Grimes, S. Deen, P. Bacchetti & E. Waubant (2009). "Demyelinating events in early multiple sclerosis have inherent severity and recovery." *Neurology* **72**(7): 602-608.
- Müller, M., S. Carter, M. J. Hofer & I. L. Campbell (2010). "Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum." *Neuropathol Appl Neurobiol* **36**(5): 368-387.
- Nagtegaal, G. J., C. Pohl, M. P. Wattjes, H. E. Hulst, M. S. Freedman, H. P. Hartung, D. Miller, X. Montalban, L. Kappos, G. Edan et al. (2014). "Interferon beta-1b reduces black holes in a randomised trial of clinically isolated syndrome." *Mult Scler* **20**(2): 234-242.
- Nikula, T., J. Mykkänen, O. Simell & R. Lahesmaa (2013). "Genome-wide comparison of two RNA-stabilizing reagents for transcriptional profiling of peripheral blood." *Transl Res* **161**(3): 181-188.
- Nolan, T., R. E. Hands & S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nat Protoc* **1**(3): 1559-1582.
- Noyes, K. & B. Weinstock-Guttman (2013). "Impact of diagnosis and early treatment on the course of multiple sclerosis." *Am J Manag Care* **19**(17 Suppl): s321-331.
- O'Boyle, G., J. G. Brain, J. A. Kirby & S. Ali (2007). "Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2." *Mol Immunol* **44**(8): 1944-1953.
- O'Connor, P., M. Filippi, B. Arnason, G. Comi, S. Cook, D. Goodin, H. P. Hartung, D. Jeffery, L. Kappos, F. Boatang et al. (2009). "250 microg or 500 microg interferon beta-1b versus 20 mg

glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, randomised, multicentre study." *Lancet Neurol* **8**(10): 889-897.

O'Connor, P., J. S. Wolinsky, C. Confavreux, G. Comi, L. Kappos, T. P. Olsson, H. Benzerdjeb, P. Truffinet, L. Wang, A. Miller et al. (2011). "Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **365**(14): 1293-1303.

Olival, G. S., B. M. Lima, L. M. Sumita, V. Serafim, M. C. Fink, L. H. Nali, C. M. Romano, R. B. Thomaz, V. B. Cavenaghi, C. P. Tilbery et al. (2013). "Multiple sclerosis and herpesvirus interaction." *Arq Neuropsiquiatr* **71**(9B): 727-730.

Paap, B. K., M. Hecker, D. Koczan & U. K. Zettl (2013). "Molecular Biomarkers in Multiple Sclerosis." *J Clin Cell Immunol*(S10:009. DOI: 10.4172/2155-9899.S10-009).

Paap, B. K., A. Hundeshagen, M. Hecker & U. K. Zettl (2012). "An inventory of short term and long term changes in gene expression under interferon beta treatment of relapsing remitting MS patients." *Curr Pharm Des* **18**(29): 4475-4484.

Panne, D., T. Maniatis & S. C. Harrison (2007). "An atomic model of the interferon-beta enhanceosome." *Cell* **129**(6): 1111-1123.

Paun, A. & P. M. Pitha (2007). "The IRF family, revisited." *Biochimie* **89**(6-7): 744-753.

Petersen, G., R. Wittmann, V. Arndt & D. Göppfarth (2014). "Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland: Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung." *Nervenarzt* **85**(8): 990-998.

Phadke, J. G. (1990). "Clinical aspects of multiple sclerosis in north-east Scotland with particular reference to its course and prognosis." *Brain* **113**(Pt 6): 1597-1628.

Pindel, A. & A. Sadler (2011). "The role of protein kinase R in the interferon response." *J Interferon Cytokine Res* **31**(1): 59-70.

Polman, C. H., A. Bertolotto, F. Deisenhammer, G. Giovannoni, H. P. Hartung, B. Hemmer, J. Killestein, H. F. McFarland, J. Oger, A. R. Pachner et al. (2010). "Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **9**(7): 740-750.

Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos et al. (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." *Ann Neurol* **69**(2): 292-302.

Polman, C. H., S. C. Reingold, G. Edan, M. Filippi, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, L. M. Metz, H. F. McFarland, P. W. O'Connor et al. (2005). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". " *Ann Neurol* **58**(6): 840-846.

Portaccio, E., V. Zipoli, G. Siracusa, S. Sorbi & M. P. Amato (2008). "Long-term adherence to interferon beta therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis." *Eur Neurol* **59**(3-4): 131-135.

Poser, S. & G. Ritter (1980). *Multiple Sklerose in Forschung, Klinik und Praxis*. Stuttgart - New York, Schattauer.

Pozzilli, C., B. Schweikert, U. Ecarl & W. Oentrich (2011). "Supportive strategies to improve adherence to IFN beta-1b in multiple sclerosis--results of the betaPlus observational cohort study." *J Neurol Sci* **307**(1-2): 120-126.

PRISMS-4 (2001). "PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS." *Neurology* **56**(12): 1628-1636.

PRISMS (1998). "Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group." *Lancet* **352**(9139): 1498-1504.

Provenzano, M. & S. Mocellin (2007). "Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR." *Adv Exp Med Biol* **593**: 66-73.

Qin, Y., P. Duquette, Y. Zhang, M. Olek, R. R. Da, J. Richardson, J. P. Antel, P. Talbot, N. R. Cashman, W. W. Tourtellotte et al. (2003). "Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis." *Lab Invest* **83**(7): 1081-1088.

Ramagopalan, S. V. & G. C. Ebers (2009). "Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation." *Genome Med* **1**(11): 105.

Ramagopalan, S. V., J. D. Lee, I. M. Yee, C. Guimond, A. L. Traboulsee, G. C. Ebers & A. D. Sadovnick (2013). "Association of smoking with risk of multiple sclerosis: a population-based study." *J Neurol* **260**(7): 1778-1781.

Reder, A. T., G. C. Ebers, A. Traboulsee, D. Li, D. Langdon, D. S. Goodin, T. Bogumil, K. Beckmann & A. Konieczny (2010). "Cross-sectional study assessing long-term safety of interferon-beta-1b for relapsing-remitting MS." *Neurology* **74**(23): 1877-1885.

Reder, A. T., S. Velichko, K. D. Yamaguchi, K. Hamamcioglu, K. Ku, J. Beekman, T. C. Wagner, H. D. Perez, H. Salamon & E. Croze (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.

Reese, J. P., A. John, G. Wienemann, A. Wellek, N. Sommer, B. Tackenberg, M. Balzer-Geldsetzer & R. Dodel (2011). "Economic burden in a German cohort of patients with multiple sclerosis." *Eur Neurol* **66**(6): 311-321.

Reiber, H., S. Ungefehr & C. Jacobi (1998). "The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis." *Mult Scler* **4**(3): 111-117.

Rieckmann, P. & K. V. Toyka (2002). "Immunomodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose." *Nervenarzt* **73**(6): 556-563.

Río, J., M. Comabella & X. Montalban (2009). "Predicting responders to therapies for multiple sclerosis." *Nat Rev Neurol* **5**(10): 553-560.

Río, J., C. Nos, M. Tintoré, C. Borrás, I. Galán, M. Comabella & X. Montalban (2002). "Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials." *Ann Neurol* **52**(4): 400-406.

Río, J., J. Porcel, N. Téllez, A. Sánchez-Betancourt, M. Tintoré, M. J. Arévalo, C. Nos & X. Montalban (2005). "Factors related with treatment adherence to interferon beta and glatiramer acetate therapy in multiple sclerosis." *Mult Scler* **11**(3): 306-309.

Río, J., A. Rovira, M. Tintoré, E. Huerga, C. Nos, N. Tellez, C. Tur, M. Comabella & X. Montalban (2008). "Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients." *Mult Scler* **14**(4): 479-484.

- Rommer, P. S., A. Dudesek, O. Stüve & U. K. Zettl (2014). "Monoclonal antibodies in treatment of multiple sclerosis." *Clin Exp Immunol* **175**(3): 373-384.
- Rotstein, D. L., B. C. Healy, M. T. Malik, T. Chitnis & H. L. Weiner (2015). "Evaluation of no evidence of disease activity in a 7-year longitudinal multiple sclerosis cohort." *JAMA Neurol* **72**(2): 152-158.
- Rudick, R. A., G. Cutter & S. Reingold (2002). "The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sclerosis trials." *Mult Scler* **8**(5): 359-365.
- Rudick, R. A., J. C. Lee, J. Simon, R. M. Ransohoff & E. Fisher (2004). "Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients." *Ann Neurol* **56**(4): 548-555.
- Ruggieri, R. M., N. Settipani, L. Viviano, M. Attanasio, L. Giglia, P. Almasio, V. La Bella & F. Piccoli (2003). "Long-term interferon-beta treatment for multiple sclerosis." *Neurol Sci* **24**(5): 361-364.
- Sadler, A. J. & B. R. Williams (2008). "Interferon-inducible antiviral effectors." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 559-568.
- Sadovnick, A. D. (2012). "Genetic background of multiple sclerosis." *Autoimmun Rev* **11**(3): 163-166.
- Sahraian, M. A., E. W. Radue, S. Haller & L. Kappos (2010). "Black holes in multiple sclerosis: definition, evolution, and clinical correlations." *Acta Neurol Scand* **122**(1): 1-8.
- Sailer, M. (2015). Magnetresonanztomographie. In: Multiple Sklerose. R. M. Schmidt, F. A. Hoffmann, J. H. Faiss und W. Köhler. München, Urban & Fischer Verlag: 137-176.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." *Nat Immunol* **6**(4): 345-352.
- Sato, M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi & N. Tanaka (1998). "Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7." *FEBS Lett* **441**(1): 106-110.
- Sawcer, S., G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt et al. (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* **476**(7359): 214-219.
- Scalfari, A., A. Neuhaus, M. Daumer, G. C. Ebers & P. A. Muraro (2011). "Age and disability accumulation in multiple sclerosis." *Neurology* **77**(13): 1246-1252.
- Scalfari, A., A. Neuhaus, A. Degenhardt, G. P. Rice, P. A. Muraro, M. Daumer & G. C. Ebers (2010). "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability." *Brain* **133**(Pt 7): 1914-1929.
- Schilling, S., R. A. Linker, F. B. König, M. Koziol, M. Bahr, G. A. Müller, W. Paulus, J. Gartner, W. Brück, A. Chan et al. (2006). "Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben." *Nervenarzt* **77**(4): 430-438.
- Schlaeger, R., C. Schindler, L. Grize, S. Dellas, E. W. Radue, L. Kappos & P. Fuhr (2014). "Combined visual and motor evoked potentials predict multiple sclerosis disability after 20 years." *Mult Scler* **20**(10): 1348-1354.
- Schoggins, J. W. (2014). "Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis." *Curr Opin Virol* **6**: 40-46.

- Schumacker, G. A., G. Beebe, R. F. Kibler, L. T. Kurland, J. F. Kurtzke, F. McDowell, B. Nagler, W. A. Sibley, W. W. Tourtellotte & T. L. Willmon (1965). "Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis." *Ann N Y Acad Sci* **122**: 552-568.
- Seo, J. Y., R. Yaneva & P. Cresswell (2011). "Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication." *Cell Host Microbe* **10**(6): 534-539.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski & T. Ideker (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res* **13**(11): 2498-2504.
- Simon, J. H., L. D. Jacobs, M. Campion, K. Wende, N. Simonian, D. L. Cookfair, R. A. Rudick, R. M. Herndon, J. R. Richert, A. M. Salazar et al. (1998). "Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group." *Ann Neurol* **43**(1): 79-87.
- Simpson, S., Jr., B. Taylor, L. Blizzard, A. L. Ponsonby, F. Pittas, H. Tremlett, T. Dwyer, P. Gies & I. van der Mei (2010). "Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **68**(2): 193-203.
- Sloka, J. S. & M. Stefanelli (2005). "The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis." *Mult Scler* **11**(4): 425-432.
- Smolders, J., P. Menheere, A. Kessels, J. Damoiseaux & R. Hupperts (2008). "Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis." *Mult Scler* **14**(9): 1220-1224.
- Sørensen, P. S., A. Bertolotto, G. Edan, G. Giovannoni, R. Gold, E. Havrdova, L. Kappos, B. C. Kieseier, X. Montalban & T. Olsson (2012). "Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab." *Mult Scler* **18**(2): 143-152.
- Sormani, M. P., D. L. Arnold & N. De Stefano (2014). "Treatment effect on brain atrophy correlates with treatment effect on disability in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **75**(1): 43-49.
- Stangel, M. (2007). Regeneration und neuronale Plastizität bei Multipler Sklerose. In: Multiple Sklerose im Kindes- und Jugendalter. U. K. Zettl, W. Köhler und J. Buchmann. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 8-12.
- Stangel, M., I. K. Penner, B. A. Kallmann, C. Lukas & B. C. Kieseier (2015). "Towards the implementation of 'no evidence of disease activity' in multiple sclerosis treatment: the multiple sclerosis decision model." *Ther Adv Neurol Disord* **8**(1): 3-13.
- Stewart, T. M. & Z. V. Tran (2012). "Injectable multiple sclerosis medications: a patient survey of factors associated with injection-site reactions." *Int J MS Care* **14**(1): 46-53.
- Stöhr, M. (2005). Somatosensible Reizantworten von Nerven, Rückenmark und Gehirn. In: Evozierte Potentiale. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. M. Stöhr, J. Dichgans, U. W. Buettner und C. W. Hess. Heidelberg, Urban & Fischer Verlag: 21-254.
- Swanton, J. K., K. Fernando, C. M. Dalton, K. A. Miszkil, A. J. Thompson, G. T. Plant & D. H. Miller (2006). "Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**(7): 830-833.
- Szczucinski, A. & J. Losy (2007). "Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies." *Acta Neurol Scand* **115**(3): 137-146.

- Thamilarasan, M., D. Koczan, M. Hecker, B. Paap & U. K. Zettl (2012). "MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." *Autoimmun Rev* **11**(3): 174-179.
- Tintoré, M., A. Rovira, J. Río, C. Tur, R. Pelayo, C. Nos, N. Téllez, H. Perkal, M. Comabella, J. Sastre-Garriga et al. (2008). "Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis?" *Neurology* **70**(13 Pt 2): 1079-1083.
- Tremlett, H., M. Yousefi, V. Devonshire, P. Rieckmann & Y. Zhao (2009). "Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time." *Neurology* **73**(20): 1616-1623.
- Tremlett, H., Y. Zhao, J. Joseph & V. Devonshire (2008). "Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79**(12): 1368-1374.
- UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group." *Neurology* **43**(4): 662-667.
- van Boxel-Dezaire, A. H., J. A. Zula, Y. Xu, R. M. Ransohoff, J. W. Jacobberger & G. R. Stark (2010). "Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta." *J Immunol* **185**(10): 5888-5899.
- van der Voort, L. F., A. Vennegoor, A. Visser, D. L. Knol, B. M. Uitdehaag, F. Barkhof, C. B. Oudejans, C. H. Polman & J. Killestein (2010). "Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS." *Neurology* **75**(14): 1228-1233.
- van Dijk, E. L., H. Auger, Y. Jaszczyszyn & C. Thermes (2014). "Ten years of next-generation sequencing technology." *Trends Genet* **30**(9): 418-426.
- Vennegoor, A., T. Rispens, E. M. Strijbis, A. Seewann, B. M. Uitdehaag, L. J. Balk, F. Barkhof, C. H. Polman, G. Wolbink & J. Killestein (2013). "Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis." *Mult Scler* **19**(5): 593-600.
- Vladimer, G. I., M. W. Górna & G. Superti-Furga (2014). "IFITs: Emerging Roles as Key Anti-Viral Proteins." *Front Immunol* **5**: 94.
- von Büdingen, H. C., T. C. Kuo, M. Sirota, C. J. van Belle, L. Apeltsin, J. Glanville, B. A. Cree, P. A. Gourraud, A. Schwartzburg, G. Huerta et al. (2012). "B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis." *J Clin Invest* **122**(12): 4533-4543.
- Warnke, C., G. Meyer zu Hörste, T. Menge, O. Stüve, H. P. Hartung, H. Wiendl & B. C. Kieseier (2013). "Teriflunomid zur Behandlung der Multiplen Sklerose." *Nervenarzt* **84**(6): 724-731.
- Waubant, E., S. Vukusic, L. Gignoux, F. D. Dubief, I. Achiti, S. Blanc, C. Renoux & C. Confavreux (2003). "Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS." *Neurology* **61**(2): 184-189.
- Weinshenker, B. G., B. Bass, G. P. Rice, J. Noseworthy, W. Carriere, J. Baskerville & G. C. Ebers (1989). "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability." *Brain* **112**(Pt 1): 133-146.
- Weinstock-Guttman, B., D. Badgett, K. Patrick, L. Hartrich, R. Santos, D. Hall, M. Baier, J. Feichter & M. Ramanathan (2003). "Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients." *J Immunol* **171**(5): 2694-2702.
- Weinstock-Guttman, B., K. Bhasi, D. Badgett, M. Tamaño-Blanco, M. Minhas, J. Feichter, K. Patrick, F. Munschauer, R. Bakshi & M. Ramanathan (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.

Wheway, J., S. Obeid, P. O. Couraud, V. Combes & G. E. Grau (2013). "The brain microvascular endothelium supports T cell proliferation and has potential for alloantigen presentation." *PLoS One* **8**(1): e52586.

Wong, J. J., Y. F. Pung, N. S. Sze & K. C. Chin (2006). "HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10735-10740.

Xu, W., J. Seok, M. N. Mindrinos, A. C. Schweitzer, H. Jiang, J. Wilhelmy, T. A. Clark, K. Kapur, Y. Xing, M. Faham et al. (2011). "Human transcriptome array for high-throughput clinical studies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(9): 3707-3712.

Yang, I. V., E. Chen, J. P. Hasseman, W. Liang, B. C. Frank, S. Wang, V. Sharov, A. I. Saeed, J. White, J. Li et al. (2002). "Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays." *Genome Biol* **3**(11): research0062.

Yin, J., S. McLoughlin, I. B. Jeffery, A. Glaviano, B. Kennedy & D. G. Higgins (2010). "Integrating multiple genome annotation databases improves the interpretation of microarray gene expression data." *BMC Genomics* **11**: 50.

Yudkin, P. L., G. W. Ellison, A. Ghezzi, D. E. Goodkin, R. A. Hughes, K. McPherson, J. Mertin & C. Milanese (1991). "Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis." *Lancet* **338**(8774): 1051-1055.

Zettl, U. K. & R. H. Goertsches (2009). "Monitoring der Therapie von Multiple-Sklerose-Patienten basierend auf Transkriptomuntersuchungen." *Fortschr Neurol Psychiatr* **77**(Suppl 1): 64-68.

Zettl, U. K. & H. Tumani (2006). Multiple Sklerose. In: Multiple Sklerose und Liquordiagnostik. U. K. Zettl und H. Tumani. Oxford, Blackwell Publishing: 5-25.

Zhang, D. & D. E. Zhang (2011). "Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system." *J Interferon Cytokine Res* **31**(1): 119-130.

Zhao, C., C. Denison, J. M. Huibregtse, S. Gygi & R. M. Krug (2005). "Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(29): 10200-10205.

Zhou, X., J. J. Michal, L. Zhang, B. Ding, J. K. Lunney, B. Liu & Z. Jiang (2013). "Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense." *Int J Biol Sci* **9**(2): 200-208.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Art der Nebenwirkung(en)
C	Zyklus (<i>cycle</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cMRT	zerebrales MRT
cRNA	komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)
D2	2 Tage nach TPI
DEG	differentiell exprimierte Gene
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDSS	<i>Expanded disability status scale</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FS	Funktionssystem(e)
Gd	Gadolinium, MRT-Kontrastmittel
GLAT	Glatirameracetat
GO	<i>Gene Ontology</i>
I	Intensität der Nebenwirkung(en)
ID	Identifikator(en)
IFN	Interferon
IFN- β -1a	Interferon- β -1a
IFN- β -1b	Interferon- β -1b
i.m.	intramuskulär
ISG	IFN-stimulierte Gene
i.v.	intravenös
J.	Jahr
KIS	klinisch isoliertes Syndrom
<i>log fold-change</i>	logarithmische Expressionsveränderungen
M.	Monat(e)
M1	Ein Monat nach TPI
M12	zwölf Monate nach TPI
M24	24 Monate nach TPI
MEP	transkraniell magnetisch evozierte Potentiale
MEP-OE	MEP des <i>Musculus interosseus dorsalis I</i> bzw. des <i>Musculus abductor digiti minimi</i>
MEP-UE	MEP des <i>Musculus tibialis anterior</i>

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
MRZ-Reaktion	Masern-Röteln-Zoster-Reaktion
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
MX1	<i>myxovirus resistance protein 1</i>
NAK	neutralisierende Antikörper
NR	Non-Responder
NW	Nebenwirkung(en)
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
OKB	oligoklonale Banden
Pat	Patient
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
p.o.	per os
PPMS	primär chronisch progrediente MS (<i>primary-progressive MS</i>)
Probe(s)	Sonde(n)
Probeset(s)	Sondensatz/Sondensätze
R	Responder
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RRMS	schubförmige MS (<i>relapsing-remitting MS</i>)
rt-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time polymerase chain reaction</i>)
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEP	somatosensibel evozierte Potentiale
SEP-OE	<i>Nervus medianus</i> -SEP
SEP-UE	<i>Nervus tibialis</i> -SEP
SPMS	sekundär chronisch progrediente MS (<i>secondary-progressive MS</i>)
SW	Spannweite
t	Schwellenwert (<i>threshold</i>)
TPI	Therapieinitiierung
VEP	visuell evozierte Potentiale
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neurologische Symptome bei Erstmanifestation und im Gesamtverlauf der MS.....	8
Abb. 2: Verschiedene MS-Verlaufsformen.....	9
Abb. 3: Aktuelle MS-Therapieempfehlungen.....	15
Abb. 4: Funktionsweise der verwendeten Microarrays.....	20
Abb. 5: Studiendesign der vorliegenden Arbeit.....	23
Abb. 6: Arbeitsschritte der Rohdatengewinnung.....	31
Abb. 7: Boxplots der EDSS-Werte.	37
Abb. 8: Schubanzahl der gesamten Patientenkohorte zu verschiedenen Zeiträumen.	38
Abb. 9: Schubanzahl der durchgängig mit IFN- β -1b therapierten Patienten.....	39
Abb. 10: Vergleich der Schub- und EDSS-Non-Responder.	42
Abb. 11: Vergleich der klinischen und paraklinischen Non-Responder.	47
Abb. 12: Art der Nebenwirkungen der Patienten unter IFN- β -1b-Therapie.	48
Abb. 13: Intensität der Nebenwirkungen der Patienten unter IFN- β -1b-Therapie.....	49
Abb. 14: Überblick der einzelnen Filterschritte zur Berechnung der DEG.....	50
Abb. 15: Die MAID-Scores der 19 stets DEG.....	52
Abb. 16: Geninteraktionen der differentiell exprimierten Gene.....	56
Abb. 17: MA-Plot-Darstellung.....	57

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: McDonald-Diagnosekriterien von 2010.....	11
Tab. 2: Vergleich der Barkhof- und Swanton-MRT-Kriterien.....	12
Tab. 3: Klinische und demographische Angaben über die Patienten.....	24
Tab. 4: Definition der klinischen Bewertungsscores.....	26
Tab. 5: Auswertungsparameter der paraklinischen Diagnostik.....	27
Tab. 6: Einteilung der Art und Intensität von Nebenwirkungen unter IFN- β -1b.....	29
Tab. 7: Quantitative rt-PCR-Validierung ausgewählter DEG.....	33
Tab. 8: Durchschnittliche EDSS-Werte verschiedener Patientengruppierungen.....	37
Tab. 9: Vergleichende Gegenüberstellung der Schubraten verschiedener Patientengruppierungen.....	40
Tab. 10: Ergebnisse der klinischen Bewertungsscores.....	41
Tab. 11: Ergebnisse der cMRT-Auswertung.....	44
Tab. 12: Ergebnisse der Auswertung der evozierten Potentiale.....	45
Tab. 13: Vereinigungs- und Schnittmenge der DEG aller Zeitpunktvergleiche.....	51
Tab. 14: Vergleich der Ergebnisse der Microarrays und der quantitativen rt-PCR.....	53
Tab. 15: Signifikant überrepräsentierte GO-Terme der GO-Kategorie <i>biological process</i>	54
Tab. 16: Auflistung der hochregulierten DEG des GO-Terms „ <i>response to stimulus</i> “.....	55
Tab. 17: Die Top 20 Biomarker-Kandidaten für einen ungünstigen Krankheitsverlauf.....	58

8.4 Verzeichnis der supplementären Tabellen

Suppl.-Tab. 1: Expanded Disability Status Scale.....	100
Suppl.-Tab. 2: Bewertung der Funktionssysteme des Expanded Disability Status Scale	101
Suppl.-Tab. 3: McDonald-Diagnosekriterien von 2001	102
Suppl.-Tab. 4: Detaillierte klinische und demographische Angaben der Patientenkohorte	103
Suppl.-Tab. 5: Individueller EDSS-Verlauf während der Nachbeobachtungszeit.	104
Suppl.-Tab. 6: Individuelle Schubanzahl während der sechsjährigen Nachbeobachtungszeit.....	105
Suppl.-Tab. 7: Art und Intensität der Nebenwirkungen der untersuchten Patientenkohorte.....	106
Suppl.-Tab. 8: Gemittelte Expressionswerte der 19 zu allen vier Zeitpunktvgleichen DEG	107

8.5 Supplementäre Tabellen

Suppl.-Tab. 1: Expanded Disability Status Scale (EDSS) nach Kurtzke (Kurtzke 1983).

EDSS	Neurologische Symptomatik
0,0	Normale neurologische Untersuchung (alle FS Grad 0)
1,0	Keine Behinderung, minimale Zeichen in einem FS (Grad 1)
1,5	Keine Behinderung, minimale Zeichen in mehr als einem FS (Grad 1)
2,0	Leichte Behinderung in einem FS (ein FS Grad 2, andere 0 oder 1)
2,5	Leichte Behinderung in zwei FS (zwei FS Grad 2, andere 0 oder 1)
3,0	Mäßige Behinderung in einem FS (Grad 3, andere 0 oder 1); oder leichte Behinderung in drei oder vier FS (Grad 2, andere 0 oder 1) und uneingeschränkte Gehfähigkeit
3,5	Uneingeschränkte Gehfähigkeit, aber eine 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 oder Pausen für ca. 500 m; selbstständig, etwa 12 Stunden am Tag trotz relativ schwerer Behinderung aktiv mit einem FS Grad 4 (andere 0 oder 1); oder eine Kombination geringerer Schweregrade, die vorausgegangene EDSS-Schritte übersteigen
4,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pausen für ca. 300 m; die meiste Zeit des Tages aktiv, vollschichtig arbeitsfähig, aber eventuell mit geringer Einschränkung oder Hilfe; relativ schwere Behinderung mit einem FS Grad 4 (andere 0 oder 1); oder eine Kombination geringerer Schweregrade
5,0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pausen für ca. 200 m; die Behinderung ist stark genug, um tägliche Aktivitäten zu beeinträchtigen (üblicherweise ein FS Grad 5, andere 0 oder 1; oder eine Kombination leichter Grade, die Schritt 4,0 überschreiten)
5,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pausen für ca. 100 m; die Behinderung ist stark genug, um die Tagesaktivitäten zu beeinträchtigen (üblicherweise ein FS Grad 5, andere 0 oder 1; oder eine Kombination leichter Grade, die Schritt 4,0 überschreiten)
6,0	Eine intermittierende oder konstante Gehhilfe wird benötigt, um 100 m weit zu gehen
6,5	Eine konstante, beidseitige Gehunterstützung wird benötigt, um ca. 20 m ohne Pause zu gehen
7,0	Unfähig, mehr als 5 m (auch mit Hilfe) zu gehen, weitestgehend auf einen Rollstuhl angewiesen, fährt selbstständig Rollstuhl und erledigt selbständig den Transfer zum Rollstuhl; sitzt etwa 12 Stunden am Tag im Rollstuhl
7,5	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu gehen, auf einen Rollstuhl dauerhaft angewiesen; benötigt Hilfe beim Transfer; fährt selbstständig, kann aber nicht den ganzen Tag im Rollstuhl sitzen und benötigt eventuell einen Elektrorollstuhl
8,0	Weitestgehend auf das Bett beschränkt, kann aber die meiste Zeit des Tages außerhalb des Bettes sitzen; besitzt noch viele Funktionen zur Körperpflege sowie weitestgehend gebrauchsfähige Arme
8,5	Die meiste Zeit des Tages auf das Bett angewiesen; einige Funktionen der Arme und der Körperpflege sind erhalten
9,0	Hilfloser, bettlägeriger Patient; kann essen und kommunizieren
9,5	Vollkommen hilfloser, bettlägeriger Patient; unfähig, effektiv zu kommunizieren oder zu essen und zu schlucken
10,0	Tod infolge MS

Die Funktionssysteme (FS) (Suppl.-Tab. 2) werden von 0-6 bewertet. Grad 0 = normal, Grad 1 = abnorme Zeichen ohne Behinderung, Grad zwei = leichte Behinderung, Grad 3-6 = mäßige bis schwere Behinderungen. Ein EDSS-Wert bis 3,5 wird aus einer Kombination der FS bestimmt und bezeichnet gehfähige Patienten. EDSS-Werte zwischen 4,0 und 7,0 definieren das Ausmaß der Einschränkung des Gehvermögens. EDSS-Werte > 8,0 definieren das Ausmaß der Bettlägerigkeit.

Suppl.-Tab. 2: Bewertung der Funktionssysteme des Expanded Disability Status Scale (nach Kurtzke 1983).

FS Funktionsgrad	
Pyramidenbahn	0 Normal
	1 Abnormer Befund ohne Behinderung
	2 Minimale Behinderung
	3 Leichte bis mäßige Para- oder Hemiparese; schwere Monoparese
	4 Ausgeprägte Para- oder Hemiparese; mäßige Tetraparese; oder Monoplegie
	5 Paraplegie, Hemiplegie, schwere Tetraparese
	6 Tetraplegie
Zerebellum	0 Normal
	1 Abnormer Befund ohne Behinderung
	2 Leichte Ataxie
	3 Mittelgradige Rumpf- oder Extremitätenataxie
	4 Schwere Ataxie aller Extremitäten
	5 Unfähig, aufgrund der Ataxie koordinierte Bewegungen auszuführen
Hirnstamm	0 Normal
	1 Abnormer Befund ohne Behinderung
	2 Mäßiger Nystagmus oder leichte Behinderung
	3 Ausgeprägter Nystagmus, deutliche Okulomotorikstörung oder mäßige Behinderung anderer HN
	4 Deutliche Dysarthrie oder andere schwere Behinderung
	5 Unfähig, zu schlucken oder zu sprechen
Sensibilität	0 Normal
	1 Beeinträchtigte Pallästhesie oder Graphästhesie an einer oder zwei Extremitäten
	2 Leichte Beeinträchtigung für Berührungsempfinden, Schmerz oder Lagesinn und/oder mäßige Beeinträchtigung der Vibration an ein oder zwei Extremitäten oder beeinträchtigte Pallästhesie oder Graphästhesie an drei oder vier Extremitäten
	3 Mäßige Einschränkung der Berührungsempfindung, Schmerz oder Lagesinn an ein oder zwei Extremitäten oder leichte Einschränkung der Berührungsempfindung, Schmerz und/oder Propriozeption an drei oder vier Extremitäten
	4 Deutliche Einschränkung von Berührungsempfindung, Schmerz oder Lagesinn an ein oder zwei Extremitäten oder mäßige Einschränkung der Berührungsempfindung, Schmerz und/oder Propriozeption an mehr als zwei Extremitäten
	5 Erloschene Sensibilität an ein oder zwei Extremitäten oder mittelgradig eingeschränkte Berührungs- und/oder Schmerzempfindung und/oder schwere Lagesinnstörung unterhalb des Kopfes
	6 Sensibilitätsverlust unterhalb des Kopfes
Blase/Mastdarm	0 Normal
	1 Leichte Blasenentleerungsstörung: Harndrang oder Retention der Blase
	2 Mäßige Blasenentleerungsstörung: Harndrang, Retention der Blase oder seltene Harninkontinenz
	3 Häufige Harninkontinenz
	4 Nahezu konstante Katheterisierung erforderlich
	5 Verlust der Blasenfunktion
	6 Verlust der Blasen- und Mastdarmfunktion
Visus	0 Normal
	1 Skotom mit Visus > 0,7
	2 Schwächeres Auge mit Skotom und Visus zwischen 0,3 und 0,7
	3 Schwächeres Auge mit Skotom und Visus zwischen 0,2 und 0,3
	4 Schwächeres Auge mit Visus 0,1 bis 0,2 oder schwächeres Auge Grad 3 und besseres Auge Visus < 0,3
	5 Schwächeres Auge Visus < 0,1 oder Grad 4 und besseres Auge Visus < 0,3
	6 Schwächeres Auge Grad 5 und besseres Auge Visus < 0,3
Zerebral	0 Normal
	1 Stimmungsschwankungen
	2 Leichte Minderung der Aufmerksamkeit, des Antriebs, der Belastbarkeit
	3 Mäßige Minderung der Aufmerksamkeit, der Belastbarkeit und des Antriebs
	4 Deutlich eingeschränkte Aufmerksamkeit und Belastbarkeit, Antriebsarmut; mäßiges HOPS
	5 Demenz oder schweres HOPS
*	0 Keine
	1 Jegliche andere neurologische Symptome, die auf eine MS zurückzuführen sind

* = andere Funktionen, 0-2 = keine bis leichte Behinderung, 3-6 = mäßige bis schwere Behinderung, HN = Hirnnerven, HOPS = hirorganisches Psychosyndrom.

Suppl.-Tab. 3: McDonald-Diagnosekriterien von 2001 (mod. nach McDonald *et al.* 2001).

Klinische Symptomatik	Zusätzliche Parameter für die MS-Diagnose
≥ 2 Schübe mit klinisch ≥ 2 objektivierbaren Läsionen	Keine
≥ 2 Schübe mit einer objektivierbaren klinischen Läsion	Örtliche Dissemination: nach den Barkhof-MRT-Kriterien oder ≥ 2 MS-bedingte MRT-Läsionen + positiver Liquorbefund oder weiterer klinischer Schub (durch eine andere Läsion verursacht)
Ein Schub und klinisch objektivierbarer Nachweis von ≥ 2 Läsionen	Zeitliche Dissemination: durch die Barkhof-MRT-Kriterien oder 2. klinischer Schub
Ein Schub mit klinisch objektivierbarer Evidenz einer Läsion (KIS)	Örtliche Dissemination: durch die Barkhof-MRT-Kriterien oder ≥ 2 MS-bedingte Läsionen in der MRT + positiver Liquorbefund <u>und</u> zeitliche Dissemination nach den Barkhof-MRT-Kriterien oder 2. klinischer Schub
Schleichende neurologische Progression (PPMS) über ≥ 1 Jahr (retrospektiv oder prospektiv bestimmt)	Positiver Liquorbefund <u>und</u> Örtliche Dissemination durch ≥ 9 Hirnläsionen oder ≥ 2 Rückenmarksläsionen oder 4-8 Hirnläsionen und 1 Rückenmarksläsion oder pathologisches VEP + 4-8 Hirnläsionen oder pathologisches VEP + < 4 Hirnläsionen und 1 Rückenmarks- läsion <u>und</u> zeitliche Dissemination nach den Barkhof-MRT-Kriterien oder kontinuierliche klinische Krankheitsprogression ≥ 1 Jahr

Positiver Liquorbefund: Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) und/oder autochthone IgG-Synthese.

Suppl.-Tab. 4: Detaillierte klinische und demographische Angaben der Patientenkohorte.

Patient	Geschlecht	Alter bei TPI in Jahren	Alter bei Diagnosestellung in Jahren	EDSS-Wert bei TPI	Verlaufsform bei TPI	Vorherige Therapie	Zeitraum zwischen ersten Symptomen und der Diagnose in Jahren	Zeitraum zwischen ersten Symptomen und TPI in Jahren	Zeitraum zwischen Diagnose und TPI in Monaten	Schubanzahl im vorletzten Jahr vor TPI	Schubanzahl im letzten Jahr vor TPI	Anzahl der Schubtherapien sechs Monate vor TPI	Anzahl der Schubtherapien im letzten Jahr vor TPI
1	♂	30,9	30,8	1,5	RRMS	Keine	8,9	9	1	0	1	1	1
2	♀	41,6	41,6	2,0	RRMS	Keine	7	7	0,5	1	1	1	1
3	♀	63,2	62,7	4,0	SPMS	Keine	26,5	27	5,6	1	0	0	0
4	♀	42,7	42,6	2,0	RRMS	Keine	15	15	0,5	1	1	0	1
5	♀	51,4	49,2	3,0	RRMS	Keine	10,8	13	27	0	1	0	0
6	♂	38,2	37,8	1,0	RRMS	Keine	2,6	3	5	0	0	0	0
7	♀	24,6	22,2	1,0	RRMS	IFN-β-1b	1,6	4	29	0	0	0	0
8	♀	48,4	48,3	1,0	RRMS	Keine	6,9	7	1	0	2	1	2
9	♂	18,3	18,3	1,5	RRMS	Keine	0	0	0,5	0	1	1	1
10	♂	54,4	54,4	3,0	SPMS	Keine	30	30	0	1	1	0	0
11	♀	25,6	25,5	1,0	RRMS	Keine	1	1	0,5	0	3	0	0
12	♀	26,3	26,2	4,0	RRMS	Keine	2,8	3	2	1	1	1	1
13	♀	47,8	39,8	3,5	RRMS	Azathioprin	10	18	96	0	1	1	1
14	♂	37,0	36,5	1,5	RRMS	Keine	7,5	8	6	2	0	0	0
15	♀	27,9	27,7	4,0	RRMS	Keine	2,8	3	2	0	2	1	1
16	♀	43,9	43,3	2,0	RRMS	Keine	14,4	15	7,5	0	1	0	1
17	♂	40,8	40,6	1,0	RRMS	Keine	0,2	0,2	2,5	0	1	0	0
18	♀	38,2	37,5	2,0	RRMS	Keine	5,3	6	8	2	1	0	0
19	♀	50,3	50,2	3,5	RRMS	Keine	6,9	7	1	1	1	1	1
20	♂	42,4	42,3	1,0	RRMS	Keine	2,9	3	1	0	2	1	1
21	♂	45,0	44,9	1,0	RRMS	Keine	4,9	5	1,5	1	2	0	0
22	♂	29,0	29,0	2,0	RRMS	Keine	7	7	0,3	1	2	1	1
23	♀	48,7	48,2	2,0	RRMS	Keine	8,5	9	6,5	1	1	0	1
24	♀	44,3	44,3	4,0	RRMS	Keine	20	20	0,3	0	1	0	0
25	♀	28,2	28,1	1,5	RRMS	Keine	2,9	3	1	1	1	1	1

♂ = männlich, ♀ = weiblich, IFN-β-1b = Interferon-β-1b, RRMS = schubförmige MS (*relapsing-remitting MS*), SPMS = sekundär chronisch progrediente MS (*secondary-progressive MS*), TPI = Therapieinitiation.

Suppl.-Tab. 5: Individueller EDSS-Verlauf während der Nachbeobachtungszeit.

Patient	TPI	6. Monat	1. Jahr	2. Jahr	3. Jahr	4. Jahr	5. Jahr	6. Jahr
1	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0
2	2,0	2,5	2,0	4,5	5,5	5,5	5,5	5,5
3	4,0	4,5	4,5	5,5	6,0	6,0	6,0	6,0
4	2,0	2,0	2,5	3,0	3,0	2,0	2,5	3,0
5	3,0	3,0	2,5	2,5	2,5	3,0	3,0	3,0
6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0
7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
8	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0
9	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2,0
10	3,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,5	2,5
11	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
12	4,0	4,0	3,5	3,5	2,0	2,5	2,5	4,0
13	3,5	3,5	3,5	3,0	4,0	4,0	3,0	3,0
14	1,5	1,5	3,0	4,5	5,5	5,0	6,0	6,5
15	4,0	4,0	4,0	3,5	4,0	4,0	6,0	6,0
16	2,0	2,0	1,5	2,0	2,0	2,0	*	
17	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0
18	2,0	4,0	3,5	3,0	2,0	2,0	2,0	4,0
19	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4,0	4,0	4,0
20	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	*	
21	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5
22	2,0	2,0	2,0	2,5	3,0	4,5	6,5	6,5
23	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
24	4,0	3,5	3,0	3,0	3,5	4,0	4,0	4,0
25	1,5	1,5	1,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Dunkelgrau hinterlegt sind jene EDSS-Werte von Patienten, die die IFN- β -1b-Therapie abgebrochen haben. TPI = Therapieinitiation, * = keine klinischen und paraklinischen Nachbeobachtungen ab dem fünften Jahr nach TPI.

Suppl.-Tab. 6: Individuelle Schubanzahl während der sechsjährigen Nachbeobachtungszeit.

P	Vor TPI		Nach TPI						
	24.-13. M.	12.-1. M.	1.-6. M.	7.-12. M.	2. Jahr	3. Jahr	4. Jahr	5. Jahr	6. Jahr
1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
2	1	1	0	1	2	3	0	0	0
3	1	0	0	0	0	1	0	1	0
4	1	1	1	0	0	2	1	1	0
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	2	0	0	0	0	0	1	0
9	0	1	0	0	1	0	1	0	1
10	1	1	0	0	0	0	0	0	0
11	0	3	0	0	0	0	0	0	0
12	1	1	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	2	0	1	1	1	2	0	0	0
15	0	2	0	0	0	1	0	1	0
16	0	1	0	0	0	0	0	*	
17	0	1	0	0	0	1	0	0	0
18	2	1	0	1	0	0	0	0	0
19	1	1	0	0	0	0	0	0	0
20	0	2	0	0	0	0	0	*	
21	1	2	0	0	0	0	0	0	0
22	1	2	0	0	2	0	1	1	0
23	1	1	0	1	0	0	0	0	0
24	0	1	0	1	0	0	0	0	0
25	1	1	0	0	1	0	1	0	0

Hellgrau hinterlegt = vor der IFN- β -1b-Therapie, weiß hinterlegt = während der IFN- β -1b-Therapie, dunkelgrau hinterlegt = nach Beendigung der IFN- β -1b-Therapie. M. = Monate, P = Patient, TPI = Therapieinitiation. * = keine klinischen und paraklinischen Nachbeobachtungen ab dem fünften Jahr nach TPI.

Suppl.-Tab. 7: Art und Intensität der Nebenwirkungen der untersuchten Patientenkohorte pro Beobachtungszeitraum.

P	1.-6. M.		7.-12. M.		2. Jahr		3. Jahr		4. Jahr		5. Jahr		6. Jahr	
1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0
2	A2	I2	A1	I2	A1+A2	I2								
3	A1	I1	A1	I1	A0	I0	A3	I1						
4	A2	I1	A2	I1	A2	I1	A1+A3	I1	A1+A3	I1	A1+A2	I1	A1+A2	I1
5	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0
6	A1	I1	A1	I1	A1	I1	A3	I1	A3	I1	A3	I1	A1	I1
7	A1	I1	A0	I0	A1	I1								
8	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A1	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0
9	A2	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A2	I0
10	A2	I1	A0	I0	A0	I0	A3	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0
11	A1	I1	A1	I1	A1+A2	I1	A0	I0	A0	I0	A1	I1	A0	I0
12	A1	I1	A1+A2	I1	A0	I0	A0	I0	A1	I1	A0	I0	A0	I0
13	A1+A2	I1	A2	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A2	I0	A0	I0
14	A1+A2	I1	A0	I0	A0	I0								
15	A0	I0	A0	I0	A1	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0
16	A1+A2	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A1	I1	*			
17	A2	I1	A2	I1	A0	I0	A0	I0	A1	I1	A1	I1	A1	I1
18	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A1	I1	A1	I1	A1	I1	A0	I0
19	A0	I0	A0	I0	A3	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A3	I1
20	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	*			
21	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A1	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0
22	A2	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0				
23	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0
24	A2	I1	A1	I1	A1+A2	I2	A1+A2	I1	A0	I0	A0	I0		
25	A2	I1	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0	A0	I0

Breite, hellgrau hinterlegte Spalte = Art (A) der Nebenwirkungen, schmale, weiß hinterlegte Spalte = Intensität (I) der Nebenwirkungen, dunkelgrau hinterlegte Spalten = Beendigung der IFN- β -1b-Therapie. M. = Monat, P = Patient, * = keine klinischen und paraklinischen Nachbeobachtungen ab dem fünften Jahr nach TPI. Die Art und die Intensität der Nebenwirkungen wurden von 0 bis 3 in den Verkehrsfarben beziffert. Bei der Intensität würde die rote Ziffer 3 den Abbruch der Therapie aufgrund starker Nebenwirkungen bedeuten, die grüne 0 bedeutet hingegen keine bzw. selten aufgetretene Nebenwirkungen (Tab. 6). Die Farbwahl bei der Bezifferung der Art der Nebenwirkungen wurde hierzu analog gewählt, beschreibt jedoch nicht den Schweregrad der Nebenwirkungen.

Suppl.-Tab. 8: Gemittelte Expressionswerte der 19 zu allen vier Zeitpunktvergleichen DEG (mod. nach Goertsches *et al.* 2010).

Gensymbol	TPI	D2	M1	M12	M24
APOBEC3A	984	1264	2588	2066	1814
CMPK2	2733	4141	10867	7833	7768
EIF2AK2	767	1004	1809	1384	1320
EPSTI1	3414	4674	10182	7667	7767
FCER1A	1248	775	709	854	857
FFAR2	538	734	822	980	972
HERC5	190	602	1967	1179	1125
IFI44	1333	1674	4174	3252	2933
IFI44L	671	1405	4564	2932	2969
IFIT1	576	1258	3341	2395	2317
IFIT2	1024	2183	7155	4474	4460
IFIT3	751	1373	3358	2466	2693
ISG15	1863	3166	6987	5408	5890
LY6E	1428	1876	3694	2769	2796
MX1	1556	2427	6593	4910	5000
OAS2	1147	1775	4049	3048	2946
OAS3	1325	1936	4160	2871	2784
RSAD2	1886	2761	6584	5046	4911
SIGLEC1	498	668	1658	1364	1421

D2 = zwei Tage nach Therapieinitiierung (TPI), DEG = differentiell exprimierte Gene, M1 = ein Monat nach TPI, M12 = 12 Monate nach TPI, M24 = 24 Monate nach TPI.

8.6 Thesen zur Dissertation

- 1.) Multiple Sklerose (MS) ist die am häufigsten auftretende chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und stellt die gewichtigste Ursache einer nichttraumatisch bedingten neurologischen Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar. Das Krankheitsbild ist vielgestaltig. Zu Krankheitsbeginn überwiegt ein schubförmiger, im späteren Verlauf ein chronisch progredienter Krankheitsverlauf.
- 2.) Interferon- β -Präparate (IFN- β -Präparate) sind Standardtherapeutika bei der schubförmigen MS (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS). Sie zeigen trotz unterschiedlicher Applikationsart, Applikationsfrequenz und molekularer Zusammensetzung eine vergleichbare Effizienz bezüglich der Reduktion der Schubaktivität und der Anzahl neuer MS-typischer MRT-Läsionen. Allerdings sprechen nicht alle Patienten effektiv auf eine IFN- β -Therapie an. Der Behandlungserfolg ist derzeit bei Therapieinitiierung (TPI) nicht prognostizierbar und kann erst retrospektiv, nach mehreren Therapiemonaten, beurteilt werden. Bei Feststellung eines ungenügenden therapeutischen Ansprechens bestehen zum Teil bereits irreversible neurologische Funktionseinschränkungen.
- 3.) Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des klinischen und paraklinischen Krankheitsverlaufs sowie die Analyse von dynamischen transkriptionellen Effekten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von 25 mit IFN- β -1b therapierten MS-Patienten. Es sollte so das langfristige therapeutische Ansprechen auf eine IFN- β -1b-Therapie sowie die zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen näher beleuchtet werden. Darüber hinaus sollte eine Assoziationsanalyse der klinischen und molekularbiologischen Ergebnisse prognostische Biomarker-Kandidaten aufzeigen.
- 4.) Das Patientenkollektiv setzte sich zum Zeitpunkt der TPI aus 23 Patienten mit einer RRMS und zwei Patienten mit einer sekundär chronisch progredienten MS (*secondary-progressive MS*, SPMS) zusammen. Das mittlere Patientenalter lag bei 39,6 Jahren, erste klinische MS-typische Symptome traten retrospektiv im Mittel 8,9 Jahre vor TPI auf. Die Diagnose MS wurde im Durchschnitt 8,3 Monate vor TPI gesichert. Das Geschlechterverhältnis entsprach mit neun männlichen und 16 weiblichen Patienten dem allgemeinen Geschlechterverhältnis bei RRMS in Deutschland.
- 5.) Der Therapieverlauf der 25 MS-Patienten wurde über einen Zeitraum von sechs Jahren klinisch anhand der Krankheitsprogression und der Schubhäufigkeit und paraklinisch bezüglich cMRTs und evozierter Potentiale (MEP, SEP, VEP) evaluiert. Darüber hinaus wurden die unter IFN- β -1b auftretenden Nebenwirkungen dokumentiert und ausgewertet.

- 6.) Während der ersten zwei IFN- β -1b-Therapiejahre erfolgte bei allen 25 MS-Patienten zu fünf definierten Zeitpunkten eine Microarray-Genexpressionsanalyse von PBMC. PBMC eignen sich aufgrund der wenig invasiven Gewinnung von Blutproben für die Durchführung longitudinaler Genexpressionsstudien. Mittels Microarrays lässt sich in einem einzigen Experiment gleichzeitig die mRNA-Expression Tausender Gene untersuchen.
- 7.) Während der Nachbeobachtungszeit beendeten acht Patienten nach durchschnittlich $44,6 \pm 16,2$ Monaten die IFN- β -1b-Therapie. Gründe hierfür waren: Vorliegen einer Schwangerschaft, Unannehmlichkeiten und Unbequemlichkeiten bei der Medikamentenapplikation, Zweifel der Therapieerfordernis, eine gesteigerte Krankheitsaktivität sowie der Übergang in eine SPMS.
- 8.) Die durchschnittlichen EDSS-Werte lagen bei den „Therapieabbrechern“ während der gesamten Nachbeobachtungszeit höher als bei den durchgehend mit IFN- β -1b behandelten Patienten. Sechs Jahre nach TPI lag der durchschnittliche EDSS-Wert der „Therapieabbrecher“ um 2,0 EDSS-Punkte signifikant höher (p-Wert 0,0084) als bei den über durchgängig mit IFN- β -1b behandelten Patienten. Auch die Schubaktivität war in der Gruppe der „Therapieabbrecher“ während der ersten Nachbeobachtungsjahre höher als bei den durchgehend mit IFN- β -1b behandelten Patienten (Schubrate während des zweiten Nachbeobachtungsjahres 0,63 vs. 0,12).
- 9.) Die paraklinische Diagnostik erfolgte bei klinischer Indikation. Daher liegen nicht zu allen 25 Patienten Verlaufspaaruntersuchungen vor (cMRT und VEP 20, SEP 19 und MEP 17 Patienten) und die Zeitpunkte der durchgeführten paraklinischen Diagnostik sind uneinheitlich (die Ausgangsuntersuchungen erfolgten im Mittel $3,0 \pm 3,6$ Monate vor und die Verlaufsuntersuchungen im Mittel fünfeinhalb Jahre ($65,7 \pm 19,1$ Monate) nach TPI). Patienten mit vorliegenden paraklinischen Verlaufspaaruntersuchungen wurden mehrheitlich als Non-Responder eingestuft (bei den cMRT 75 %, bei den VEP 50 %, bei den SEP ~ 58 % und bei den MEP ~ 65 %). Ein Vergleich der Ergebnisse der klinischen und paraklinischen Evaluation dieser Arbeit lässt die cMRT als restriktiveren Parameter zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs erscheinen.
- 10.) Am häufigsten traten in der untersuchten Patientenkohorte lokale Nebenwirkungen im Bereich der Einstichstelle auf (im ersten Behandlungsjahr bei 30 %, im Therapieverlauf bei 22 %). Grippeähnliche Nebenwirkungen traten gehäuft während des ersten Behandlungshalbjahres auf (initial bei 44 %, im Therapieverlauf bei 10 %). Eine Begleitmedikation zum Kupieren grippeähnlicher Nebenwirkungen erfolgte lediglich bei zwei Patientinnen über die ersten sechs Behandlungsmonate hinaus.

- 11.) Während vorherige Studien bevorzugt Transkriptspiegel unmittelbar nach der Erstapplikation von IFN- β -Präparaten untersuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von PBMC über einen Zeitraum von zwei Therapiejahren zu fünf definierten Zeitpunkten analysiert. Im untersuchten Patientenkollektiv wurden insgesamt 269 Gene als unter Therapie differentiell exprimiert identifiziert. Viele dieser Gene sind bekannte IFN-stimulierte Gene (ISG). Der größte transkriptionelle Effekt bestand einen Monat nach IFN- β -1b-TPI. Insgesamt 19 Gene waren über die zwei Jahre durchgehend differentiell exprimiert. Die genaue Bedeutung einiger dieser 19 Gene, wie beispielsweise FCER1A, CMPK2 und FFAR2, ist bei MS bisher weitgehend unbekannt.
- 12.) Es wurden bei 54 der 269 unter IFN- β -1b DEG wechselseitige molekulare Interaktionen in einer Gennetzwerkanalyse festgestellt, wobei der Transkriptionsfaktor STAT1 hierbei die größte Anzahl Interaktionen aufzeigte. In einer Analyse der biologischen Funktionen der unter Therapie hochregulierten DEG (n=173) wurden die überrepräsentierten Genfunktionen vor allem Abwehr- und Immunreaktionen zugeordnet.
- 13.) Die Assoziationsanalyse der klinischen und molekularbiologischen Ergebnisse identifizierte 20 prognostische Biomarker-Kandidaten für einen zu erwartenden ungünstigen Krankheitsverlauf zum Zeitpunkt der TPI. Bisher ist keiner dieser prognostischen Biomarker-Kandidaten als solcher in der Literatur beschrieben. Daher sollte in zukünftigen Studien der Vorhersagewert dieser Biomarker-Kandidaten überprüft werden.
- 14.) In weiteren Forschungsprojekten sollte analysiert werden, ob die Protein- und Transkriptspiegel gleichermaßen unter IFN- β -1b-Therapie beeinflusst werden. Dies könnte zunächst anhand der 19 unter IFN- β -1b-Therapie durchgehend DEG geschehen. Weitere Erkenntnisse zu den Wirkmechanismen von IFN- β -Präparaten könnten in Zukunft durch zelltypspezifische Untersuchungen erlangt werden.

8.7 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Schwerin, den 19. November 2015



Ole Kandulski

8.8 Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Uwe K. Zettl für die Bereitstellung der Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock, für die Betreuung der Dissertation und die zahlreichen und wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. rer. nat. Robert Goertsches und Herrn Dr. rer. nat. Dirk Koczan danke ich für die Durchführung und die Bereitstellung der Ergebnisse des RNA-Profilings, ohne die diese interdisziplinäre Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Hecker danke ich ganz besonders für seine zahlreichen Anregungen, seine Geduld beim Diskutieren der komplexen Arbeitsschritte und Ergebnisse der Genexpressionsanalyse, dem Korrekturlesen, seiner Nachsicht bei zeitlichen Verzögerungen und für die stete Motivation diese Arbeit zeitnah abzuschließen.

Bei Frau Gabriele Gillwaldt und Frau Christa Tiffert bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung bei der Sammlung der klinischen und paraklinischen Daten.

Den Ärzten der neuroimmunologischen Spezialambulanz der Universitätsmedizin Rostock danke ich für Ihre Unterstützung bei der Generierung klinischer und paraklinischer Untersuchungsdaten.

Ein besonderer Dank gilt den MS-Patienten, die an dieser Studie teilnahmen.

Des Weiteren danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre Zeit und Geduld, ihre wertvollen Tipps, das Korrekturlesen, ihren Zuspruch und ihre Unterstützung. Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Marlies Nelle und Mutter meiner Kinder. Sie verstand es allzu gut, mich auf andere Gedanken zu bringen, insbesondere in Zeiten, in denen das Vorankommen der Arbeit stockte. Außerdem war sie stets bemüht, zeitliche Freiräume zu schaffen, um es mir neben dem Familien- und Arbeitsleben zu ermöglichen, diese Arbeit abzuschließen.