

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. R. Benecke

Sektion Neuroimmunologie

Leiter: Prof. Dr. med. U.K. Zettl

Die individuelle Aktivität des Interferon-Typ-I-Signalwegs in Immunzellen von Patienten mit Multipler Sklerose in Assoziation mit dem Krankheitsverlauf unter Therapie



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Alexander S. Hundeshagen

geboren am 05. November 1984 in Erfurt

Rostock 2014

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Dr. med. U. K. Zettl

Universität Rostock

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Sektion Neuroimmunologie

2. Gutachter

Prof. Dr. med. F. Paul

Charité - Universitätsmedizin Berlin

NeuroCure Clinical Research Center (NCRC)

3. Gutachter

Prof. Dr. med. J. P. Sieb

Helios Hansekllinikum Stralsund

Klinik für Neurologie

Datum der Einreichung: 26.02.2014

Datum der Verteidigung: 11.03.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3 Klinische Befunde und Prognose	4
1.1.4 Therapie	10
1.2 Interferone	13
1.2.1 Einsatz der Interferone – von der Entdeckung bis heute	13
1.2.2 Klinische Therapieergebnisse von Interferon- β bei Multipler Sklerose	14
1.2.3 Wirkmechanismen von Interferon- β auf zellulärer und molekularer Ebene	16
1.3 Biomarker bei Multipler Sklerose	18
1.3.1 Molekularbiologische Biomarker	19
1.3.2 Messung der Genexpression	20
1.3.3 Erhöhte endogene Expression Interferon-stimulierter Gene und aktuelle Studienlage	22
2. Fragestellungen	25
3. Material und Methoden	27
3.1 Studiendesign	27
3.2 Patientenkollektiv	30
3.3 Erhebung klinischer und bildgebender Verlaufsdaten	30
3.4 Probengewinnung, -prozessierung und Mikroarray-Analyse	31
3.5 Einteilung der Studienkohorten	32

3.6	Statistische Analyse der klinischen und paraklinischen Verlaufsdaten	33
3.6.1	Schubfrequenz und Expanded Disability Status Scale	33
3.6.2	Magnet-Resonanz-Tomographie	34
3.7	Statistische Analyse der MX1-Expression	34
3.8	Analyse der physiologischen MX1-Expression in einer gesunden Kohorte ...	35
3.9	Konstruktion der Interferon- β -Signalwege	36
3.10	Expressionsanalysen der Interferon- β -Signalweg-Gene	36
3.11	Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen	37
3.12	Validierung der Mikroarray-Daten mittels PCR	38
4.	Ergebnisse	40
4.1	Patientenkollektiv	40
4.2	Vergleich des klinischen und paraklinischen Verlaufs in Abhängigkeit der endogenen MX1-Expression	42
4.2.1	Schubfrequenz und Expanded Disability Status Scale	42
4.2.2	Magnet-Resonanz-Tomographie	45
4.3	Therapiespezifischer Vergleich des klinischen Verlaufs in Abhängigkeit der endogenen MX1-Expression	46
4.4	MX1-Expressionsänderung unter Interferon- β -Therapie	48
4.5	Analyse der physiologischen MX1-Expression bei Probanden	50
4.6	Interferon- β -Signalwege	51
4.7	Vergleichende Analyse der Expression von Interferon- β -Signalweg-Genen ..	54
4.8	Transkriptionsfaktorbindungsstellen	58
4.9	PCR-Validierung der Expressionsunterschiede	58

5.	Diskussion	60
5.1	Patientenkollektiv	60
5.2	Diskussion der angewandten Methodik	62
5.2.1	Probengewinnung und -untersuchung	62
5.2.2	Analyse der Interferon- β -Signalwege	64
5.2.3	Beurteilung des Krankheitsverlaufs	65
5.3	Klinischer und paraklinischer Verlauf in Abhängigkeit der endogenen MX1-Expression	66
5.4	MX1-Expression unter Interferon- β -Therapie und bei Probanden	70
5.5	Expression der Interferon- β -Signalweg-Gene	71
5.6	Expressionsänderungen der Interferon- β -Signalweg-Gene unter Therapie ..	74
5.7	Fazit und Ausblick	75
6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis	80
8.	Anhang	95
8.1	Abkürzungsverzeichnis	95
8.2	Tabellenverzeichnis	97
8.3	Abbildungsverzeichnis	98
8.4	Supplementäre Tabellen und Abbildungen	100
8.5	Thesen	115
8.6	Eidesstattliche Erklärung	118
8.7	Danksagung	119

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Immunologische Prozesse führen zu Demyelinisierung und Axonschädigung im Bereich der weißen und grauen Substanz von Gehirn und Rückenmark. Die beeinträchtigte Nervenleitung resultiert in multiplen sensiblen, motorischen und kognitiv-psychischen Symptomen.

1.1.1 Epidemiologie

MS ist die führende atraumatische Ursache persistierender neurologischer Behinderung im jungen Erwachsenenalter. Nach aktuellen Schätzungen sind weltweit 2,3 Millionen Menschen an MS erkrankt [1]. Das Prädilektionsalter liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr [2]. Die Prävalenz wird global auf 33 pro 100.000 Einwohner geschätzt, wobei ein latitudenabhängiger Gradient besteht, mit niedrigerer Prävalenz in Äquatornähe [3]. Zudem unterscheidet sich die Prävalenz zwischen verschiedenen ethnologischen Gruppen, mit sehr hohen Raten bei Kaukasiern und seltenem Auftreten bei Asiaten und Inuit [4]. Frauen sind durchschnittlich doppelt so häufig betroffen wie Männer, mit steigender Tendenz [5, 6]. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 149 pro 100.000 Menschen mit jährlich 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Somit leben aktuell geschätzte 130.000 MS-Patienten in Deutschland [7].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MS ist trotz intensiver Forschungsbemühungen bis heute nicht geklärt. Nach aktuellem Wissensstand führt eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zu einer Autoreaktivität des Immunsystems gegen enzephalere Strukturen. Der genetische Einfluss zeigt sich in der familiären Häufung von MS-Fällen mit steigendem Erkrankungsrisiko je enger das Verwandtschaftsverhältnis zu einem MS-Patienten ist, bis hin zu Konkordanzraten von etwa 25 % bei monozygoten

Zwillingen [8, 9]. Es wird ein polygenetischer Einfluss auf die Suszeptibilität angenommen [10]. Eine Assoziation der MS mit Polymorphismen in mehr als 100 Genregionen wurde postuliert. Viele der entsprechenden Gene stehen im Zusammenhang mit immunologischen Prozessen, insbesondere der Lymphozytenaktivierung und -proliferation [11, 12]. Der deutlichste Zusammenhang mit dem Erkrankungsrisiko wurde für HLA-Genregionen (Humanes Leukozyten-Antigen) beschrieben, welche für 10-60 % der genetischen Suszeptibilität verantwortlich gemacht werden [13]. Insbesondere das HLA-DRB1*1501-Allel zeigt eine starke Assoziation zur MS in kaukasischer Bevölkerung [11].

Aufgrund der global unterschiedlichen, latitudenabhängigen Prävalenz wird vermutet, dass Umwelteinflüsse ätiologisch beteiligt sind. Insbesondere eine verminderte Sonnenexposition (UV-B-Strahlen) scheint das Erkrankungsrisiko zu erhöhen, was unter anderem auf eine reduzierte Vitamin-D-Synthese zurückgeführt wurde [14]. Dieses Vitamin ist an der Regulation zahlreicher immunologischer Prozesse und MS-assoziiertes Gene beteiligt [15, 16].

Eine ätiologische Relevanz bakterieller oder viraler Infektionen in der Kindheit wurde mehrfach postuliert – allen voran ein Zusammenhang mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) [15]. Besonders eine symptomatische EBV-Infektion sowie Infektionen in der späten Adoleszenz scheinen das Erkrankungsrisiko zu erhöhen [17]. Ein bislang unbekannter Krankheitserreger wäre ursächlich denkbar und könnte epidemieartige Krankheitshäufungen, z.B. auf Sardinien und den Färöer-Inseln erklären [14, 18, 19]. Weitere mögliche Risikofaktoren sind Rauchen, diätetische und hormonelle Einflüsse, epigenetische Effekte, Impfungen sowie psychischer Stress [20].

Pathophysiologisch kommt es im Rahmen der MS zu autoaggressiven Immunreaktionen gegen ZNS-Strukturen. Als Zielantigene der Immunreaktionen bei MS-Patienten konnten zahlreiche Myelinmoleküle (u.a. Myelin-Basisches-Protein, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein), axo-gliale Proteine (z.B. Neurofascin, Contactin-2) und gliaständige Kaliumkanäle experimentell nachgewiesen werden [13, 21, 22]. Die Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) und CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten erfolgt in peripheren lymphatischen Organen durch

antigenpräsentierende Zellen. Hierdurch exprimieren T-Lymphozyten vermehrt Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die es ihnen ermöglichen, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden [14, 23]. Innerhalb des ZNS erfolgt eine erneute Aktivierung durch hirransässige, antigenpräsentierende Mikroglia und Astrozyten. Reaktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten sezernieren zahlreiche Proteasen und pro-inflammatorische Zytokine, was zur Destruktion der BHS sowie zur Rekrutierung weiterer Immunzellen führt. Infiltrierende T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Komplementfaktoren und Antikörper schädigen Myelinscheiden und Neurone über diverse direkte und indirekte Mechanismen [24]. Letztlich kommt es zur Demyelinisierung gefolgt vom Zusammenbruch des neuronalen Membranpotentials, Kalziumeinstrom, Axonschwellung und -diskonnektion [24, 25]. Die chronische Entzündung wird begleitet von Vernarbung durch astrozytäre Gliose.

Bislang ist strittig, ob die Immunaktivierung oder der ZNS-Schaden am Anfang der pathologischen Reaktionskette steht. Eine Schädigung der Oligodendrozyten – z.B. durch Trauma, Perfusionsstörungen oder oxidativen Stress – könnte zum Untergang der Markscheiden führen, woraufhin freigesetzte Myelinfragmente die Immunantwort auslösen. Hinweise hierauf brachten histologische Präparate früherer Läsionen, welche vorwiegend Myelinschäden, jedoch kaum periphere Entzündungszellen zeigten [26]. Andererseits wird gegenwärtig vorrangig eine initiale Immundefizienz als MS-Ursache postuliert. So kann die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE, ein Tiermodell der MS) durch den Transfer und auch durch periphere Aktivierung enzephalitogener CD4⁺ T-Lymphozyten induziert werden [27, 28]. Im Rahmen der MS-Ätiologie könnte eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen pathogenen und körpereigenen Antigenen im Sinne eines „*Molecular Mimicry*“ zur Kreuzaktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten führen. Dies konnte in einigen MS-Patienten zwischen EBV-Antigenen und Myelin-Basischem-Protein gezeigt werden [29]. Auch eine unspezifische Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten im Rahmen einer starken spezifischen Pathogenabwehr („*Bystander Activation*“) bzw. eine Aktivierung durch Superantigene ist denkbar [14].

Unabhängig von der Primärursache mündet eine durchbrochene Immuntoleranz in komplexen Prozessen der Entzündung, De- und Remyelinisierung sowie Astroglie. Das

morphologische Korrelat sind die sogenannten Plaques: „klassisch“ – ovale, scharf begrenzte, fokale Entmarkungsherde mit variabler Entzündung, Gliose, Neuronen- und Axonschädigung. Plaques finden sich multifokal im Bereich des gesamten ZNS, meist in enger Lagebeziehung zu kleinen Venolen. Prädilektionsstellen sind der Nervus Opticus, sowie die weiße Substanz um die Ventrikel, in Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Aber auch die graue Substanz des zerebralen und zerebellären Cortex sowie tiefer Kerngebiete zeigen, neben einer allgemeinen Atrophie, regelmäßig Läsionen [24, 30, 31]. Assoziiert mit kortikaler Demyelinisierung finden sich meningeale Entzündungsreaktionen (z.B. B-Lymphozyten-Cluster) [32, 33]. Somit kann die chronische Entzündung der MS potentiell das gesamte Gehirn betreffen, weshalb die MS in der Literatur synonym als „Enzephalomyelitis disseminata“ bekannt ist.

1.1.3 Klinische Befunde und Prognose

Symptome

Abhängig von der zerebralen Lokalisation der Plaques und dem Ausmaß der neuronalen Schädigung resultieren Ausfälle unterschiedlicher Körperfunktionen. Hierbei sind alle erdenklichen neurologischen und psychiatrischen Symptome möglich, deren Auftreten und Intensität jedoch individuell sehr unterschiedlich. Meist äußert sich die MS zu Beginn mit einem isolierten klinischen Defizit (Mono- oder Polysymptomptomatik). Häufigste Erstmanifestationen sind extremitätenbetonte sensorische Beschwerden (43 %), Paresen (37 %), visuelle Dysfunktionen (30 %) und kognitive Defizite (20-30 %) [34-36]. Im späteren Verlauf dominieren beinbetonte Spastik mit resultierenden Schmerzen und Gehstörungen, sowie Blasendysfunktionen und Ataxie die Verschlimmerung des Beschwerdebildes. Eine verstärkte psychische und physische Ermüdbarkeit (Fatigue) wird in jedem Stadium häufig beschrieben [34]. Tab. A (Anhang) -1 zeigt weitere häufig auftretende Symptome der MS.

Diagnostik

Ein erster Krankheitsschub (mono- oder polysymptomatisch) wird als klinisch isoliertes Syndrom (CIS) bezeichnet, erfüllt jedoch definitionsgemäß noch nicht die Kriterien der

MS-Diagnose. Die Wahrscheinlichkeit binnen zwei Jahren in eine klinisch gesicherte MS überzugehen wird mit 57 % angegeben [37]. Ausschlaggebend für die Diagnose der manifesten MS sind die international anerkannten McDonald-Kriterien, welche 2001 erstmals publiziert und in den Jahren 2005 und 2010 weiterentwickelt wurden [38-40]. Diese Kriterien fordern den objektiven Nachweis einer zeitlichen und räumlichen Dissemination zerebraler Entmarkungsherde, was zum einen das Auftreten neuer Läsionsherde im Verlauf (zeitlich) beschreibt, zum anderen einen multifokalen Befall verschiedener Hirnareale (räumlich). Der Herdnachweis erfolgt sowohl indirekt, durch anamnestischen und klinischen Nachweis symptomatisch manifestierter Hirnläsionen, als auch direkt, durch bildgebende Darstellung der Plaques im Magnet-Resonanz-Tomographen (MRT). Hier zeigen sich frische, aktive Läsionen durch die Anreicherung von Gadolinium (Gd)-Kontrastmittel (KM) in T1-gewichteten Aufnahmen. T1-hypointense Läsionen stellen im akuten Stadium vor allem Ödeme dar, bei Persistenz (sogenannte „Black Holes“) repräsentieren sie vorwiegend eine verminderte axonale Dichte und entsprechen somit einem lokalen Untergang von Hirngewebe. Läsionen jeden Alters werden sehr sensitiv, jedoch unspezifisch in T2-gewichteten Aufnahmen hyperintens dargestellt und verkörpern sowohl akute Infiltrate, aber auch De- und Remyelinisierung sowie narbige Gliose. Die Bestimmung des Hirnvolumens dient dem Nachweis einer globalen Atrophie. Die MRT-Bildgebung nimmt einen großen Stellenwert ein, da bis zu zehnmal mehr zerebrale Läsionen nachweisbar sind, als sich klinisch manifestieren [41]. Mit dem Ziel einer früheren Diagnosestellung hat die MRT-Untersuchung auch in den aktuellen Diagnosekriterien von 2010 [40] (Tab. 1) weiter an Relevanz gewonnen. Mitunter ist der Nachweis der zeitlichen und räumlichen Dissemination bereits anhand einer initialen MRT-Aufnahme zum Zeitpunkt erster Symptome möglich [40]. Sinnvoll ist die zusätzliche Untersuchung des Liquor cerebrospinalis, um den entzündlichen Charakter der MRT-Läsionen nachzuweisen [42, 43]. Im Liquorpunktat zeigt sich typischerweise eine autochthone, intrathekale Immunglobulin-G-Synthese als Ausdruck einer humoralen Immunantwort [44, 45]. Zusätzlich können über die Liquordiagnostik andere entzündliche und infektiöse (z.B. Neuroborreliose) Erkrankungen differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden [46]. Weitere diagnostische Sicherheit wird durch die Ableitung evozierter Potenziale, insbesondere visuell evozierter Potenziale, erreicht, da die

verlangsamte Nervenleitung subklinisch demyelinisierter Neurone hierdurch sensitiv erfasst wird. Letztlich bleibt die MS eine Ausschlussdiagnose, weshalb eine intensive differentialdiagnostische Abklärung wichtig ist. Insbesondere Infektionen, Kollagenosen, zerebrovaskuläre Angiopathien, Stoffwechselstörungen, Malignome, Intoxikationen sowie andere Autoimmunerkrankungen (z.B. Neuromyelitis Optica) und Entmarkungskrankheiten (z.B. akute disseminierte Enzephalomyelitis) gilt es auszuschließen [42, 47, 48].

Tab. 1: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (2010) (nach [40])

Klinische Präsentation		Erfüllte Kriterien (✓) und erforderliche Nachweise	
Schubanzahl	Läsionsorte ¹	Zeitliche Dissemination	Räumliche Dissemination
≥ 2	≥ 2 ²	✓	✓
≥ 2	1	✓	Eines der Folgenden: - positives MRT ³ - weiterer klinischer Schub ⁴
1	≥ 2	Eines der Folgenden: - positives MRT ⁵ - zweiter klinischer Schub	✓
1	1 Klinisch isoliertes Syndrom	Eines der Folgenden: - positives MRT ⁵ - zweiter klinischer Schub	Eines der Folgenden: - positives MRT ³ - weiterer klinischer Schub ⁴
0	0 PPMS-verdächtige, chronische Progression	Progression über 1 Jahr (retrospektiv oder prospektiv) und Zwei der Folgenden: - positives kraniales MRT: ≥ 1 zerebrale T2-Läsionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentorial) - positives spinales MRT: ≥ 2 spinale T2-Läsionen - Positiver Liquorbefund ⁶	

¹ Objektivierbare, klinisch manifestierte ZNS-Läsionen an verschiedener anatomischer Lokalisation.
² Eine der zwei Läsionen darf anamnestisch gesichert werden.
³ Nachweis der räumlichen Dissemination im MRT durch ≥ 1 T2-Läsion in mindestens 2 von 4 MS-typischen ZNS-Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentorial, spinal)
⁴ Entsprechend einer anderen Läsionslokalisation.
⁵ Nachweis der zeitlichen Dissemination im MRT durch simultane Darstellung asymptomatischer Gadolinium-anreichernder und nicht-anreichernder Läsionen in einer MRT-Untersuchung; oder: Verlaufs-MRT mit Nachweis einer neuen Gadolinium-anreichernden oder T2-hyperintensiven Läsion.
⁶ Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor cerebrospinalis oder eines erhöhten IgG-Index.
MS = Multiple Sklerose; PPMS = Primär Progressive Multiple Sklerose; ZNS = Zentrales Nervensystem; MRT = Magnet-Resonanz-Tomographie

Klinischer Verlauf

Der Krankheitsverlauf der MS ist äußerst variabel und für den individuellen Patienten schwer prognostizierbar. Es wird unterschieden zwischen akut einsetzenden Symptomen (Schub) und einer kontinuierlich schleichenden Verschlechterung neurologischer Funktionen (chronische Progression). Das pathophysiologische Substrat des Schubes sind inflammatorische Prozesse, wohingegen die Progression zusätzlich durch zerebrale Neurodegeneration gekennzeichnet ist [30, 49]. Ein Schub ist definiert als eine akut bis subakut auftretende, mindestens 24 Stunden andauernde Episode neu aufgetretener oder verschlimmelter MS-typischer neurologischer Symptome entzündlicher und demyelinisierender Natur [50]. Konsensgemäß müssen zwei Schübe im Abstand von mindestens 30 Tagen (von Symptommanifestation zu Symptommanifestation) liegen, gelten sonst als ein Schub mit Exazerbation. Hiervon abzugrenzen ist der „Pseudoschub“, eine plötzliche Beschwerdezunahme durch Infekte, aber auch infolge sport- oder stressbedingter Erhöhung der Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen) [51].

Im Verlauf der MS können Schübe und Progression isoliert oder in Kombination auftreten, wodurch vier Hauptverlaufsformen der MS unterschieden werden [52] (Abb. 1):

- Schubförmig-remittierender Verlauf (*Relapsing Remitting MS, RRMS*)
- Sekundär chronisch-progredienter Verlauf (*Secondary Progressive MS, SPMS*)
- Primär chronisch-progredienter Verlauf (*Primary Progressive MS, PPMS*)
- Progressiv-schubförmiger Verlauf (*Progressive Relapsing MS, PRMS*)

Bei 87 % der MS-Patienten verläuft die Erkrankung zu Beginn schubförmig mit durchschnittlich etwa einem Schub pro Jahr [7, 53]. Diese Verlaufsform ist durch abgrenzbare, klinische Symptom-Attacken gekennzeichnet, zumeist gefolgt von teilweiser oder vollständiger Remission. Typischerweise besteht im Intervall eine stabile Phase ohne Beschwerdezunahme [52]. Mit längerer Krankheitsdauer nimmt die jährliche Schubrate ab [54]. Bei einem Großteil der Patienten mündet diese initiale RRMS nach einer medianen Erkrankungsdauer von etwa 19 Jahren in einer kontinuierlichen Verschlimmerung der Symptomatik mit nur gelegentlichen Plateaus des Progressionsstillstandes [55, 56]. Bei dieser SPMS können noch einzelne „aufgesetzte“ Schübe auftreten (Abb. 1). Einige

Patienten erleiden von Krankheitsbeginn an eine nahezu konstant fortschreitende Verschlechterung der neurologischen Defizite, in der Regel ohne abgrenzbare Schübe (PPMS, 9 %) (Abb. 1), selten auch mit zusätzlichen Attacken (PRMS, 2 %) [7, 52].

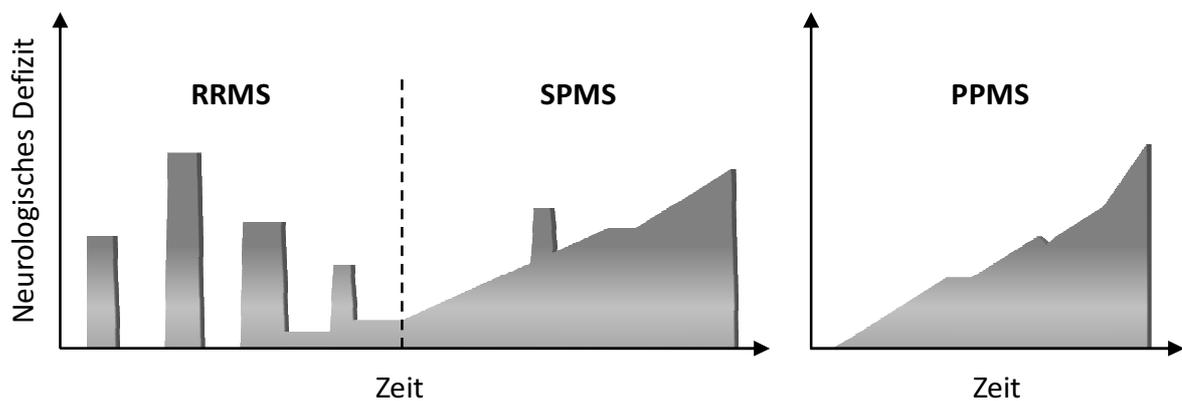


Abb. 1: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [52])

Dargestellt sind die drei häufigsten Verlaufsformen der Multiplen Sklerose. RRMS: schubförmig-remittierender Verlauf, teilweise mit residualen neurologischen Defiziten. Diese Form geht häufig über in die SPMS: sekundär chronisch-progredient verlaufende MS, zum Teil mit aufgesetzten Schüben. PPMS: primär chronisch-progredienter Verlauf mit gelegentlichen Plateaus und geringgradigen Remissionen.

Zur Beschreibung und Objektivierung des klinischen Krankheitsverlaufs haben sich die jährliche Schubrate, das „schubfreie Überleben“ und die „*Expanded Disability Status Scale*“ (EDSS) international etabliert. Die Schubrate entspricht der Häufigkeit von akuten Schubereignissen innerhalb einer definierten Zeitspanne (in der Regel ein Jahr). Der prozentuale Anteil schubfreier Patienten über einen gewissen Zeitraum wird durch das schubfreie Überleben beschrieben, ein Kriterium welches in neueren Studien zunehmend an Bedeutung gewinnt. Diese Parameter eignen sich insbesondere zur Einschätzung der Krankheitsaktivität bei RRMS-Patienten. Der EDSS erfasst die funktionellen Einschränkungen des Patienten und erlaubt die Zunahme des Behinderungsgrades objektiv zu erfassen. Somit werden sowohl die Intensität von Schüben und der Grad der Remission beschrieben, als auch das Ausmaß der chronischen Progression. Kurtzke

definierte auf funktionell-neuroanatomischer Basis acht verschiedene neurologische Funktionssysteme: Pyramidenbahn, Sensorium, Kleinhirn, Blase- und Mastdarm, Hirnstamm, Visus, Kognition und Sonstiges [57] (Tab. A-1). Diese Funktionssysteme werden in einer umfangreichen neurologischen Untersuchung erfasst, bewertet und die Ergebnisse anschließend in einen Gesamtwert, den EDSS-Wert, kodiert. Dieser reicht von 0 (normal) bis 10 (Tod durch MS) und berücksichtigt insbesondere die motorischen Fähigkeiten, allen voran die Gehfähigkeit des Patienten. Niedrigere Werte (0-3,5) repräsentieren spezifische neurologische Beeinträchtigungen, höhere Werte entsprechen abnehmender Mobilität (4-7) und Einschränkungen der oberen Extremität und Bulbärfunktion (7,5-9,5). Bedeutende Stufen der Behinderungszunahme sind ein EDSS von 4,0 (eingeschränkte Gehfähigkeit), sowie die Werte 7,0 (Rollstuhlpflichtigkeit) und 9,0 (Bettlägerigkeit). Eine detaillierte Aufschlüsselung der EDSS-Werte zeigt Tab. A-2.

Ein weiteres etabliertes Bewertungssystem für den Behinderungsgrad ist der „*Multiple Sclerosis Functional Composite*“ (MSFC) [58]. Dieser berücksichtigt neben der Arm- und Beinmotorik zusätzlich verstärkt die kognitiven Fähigkeiten und bildet somit das Krankheitsbild MS unter neuropsychologischen Aspekten sensitiver ab [59]. Bis dato ist jedoch der EDSS der Goldstandard zur klinischen Verlaufsdokumentation.

Prognose

Vorhersagen bezüglich der individuellen Prognose sind aufgrund der heterogenen Klinik und des variablen Krankheitsverlaufs äußerst schwierig. Anfänglich ist bei RRMS-Patienten eine nahezu vollständige Rückbildung der Symptome einzelner Schübe die Regel (neuronale Plastizität), im späteren Verlauf akkumulieren residuale Defizite und führen zu manifesten Behinderungen und starker Einschränkung der Lebensqualität. Nach etwa 15 Jahren sind die Hälfte aller Patienten auf eine Gehhilfe angewiesen, um 100 m zu laufen (EDSS 6,0) [60]. Die Lebenserwartung ist mit circa 35 Jahren nach Diagnosestellung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um sieben bis 14 Jahre reduziert [61]. Todesursächlich sind meist Immobilisationsfolgen, inkontinenzassoziierte Infekte oder Suizid [62]. Prognostisch vorteilhaft ist ein milder Verlauf in den ersten Krankheitsjahren (2-5 Jahren) mit geringen Schubraten und langer Phase auf niedrigem EDSS-Niveau [63].

Zudem sprechen die folgenden demographischen und klinischen Faktoren für eine vergleichsweise günstige Prognose [63-66]: weibliches Geschlecht; junges Erkrankungsalter; rein sensible Erstsymptome; monosymptomatische Erstmanifestation; weitgehende bzw. vollständige Symptomrückbildung nach dem ersten Schub; initial schubförmiger Verlauf. Diese Prädiktoren zeigen sich dabei vornehmlich während des frühen Krankheitsverlaufs (bis EDSS 3-4) prognostisch günstig, auf die spätere Krankheitsprogression haben sie keinen gesicherten Einfluss [67, 68].

1.1.4 Therapie

Eine kurative Therapie der MS ist derzeit nicht verfügbar. Vielmehr ist das Ziel der therapeutischen Ansätze, den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen und eine zunehmende Behinderung hinauszuzögern. Das Behandlungskonzept setzt sich dabei aus vier Säulen zusammen:

- Therapie des akuten Schubes
- Milderung des Krankheitsverlaufs
- Therapie krankheitsbedingter Symptome
- Krankheitsbewältigung

Zur Eindämmung eines akuten Schubereignisses hat sich die intravenöse Therapie mit hochdosierten Glukokortikosteroiden (GCS) (500-1000 mg/Tag) über drei bis fünf Tage etabliert. Bei therapierefraktärer Symptomatik kann sowohl die Dauer der Therapie, als auch die Dosierung gesteigert werden. Als Ultima Ratio bei fortdauernder Symptompersistenz kommt die Plasmapherese zum Einsatz [50].

Die zweite Säule bildet die Sekundärprophylaxe durch verlaufsmodifizierende Medikamente (*Disease-Modifying Drugs*, DMD). Ziel dieser Stufentherapie ist es, weitere Schübe und Hirnläsionen zu verhindern sowie die Progression der Krankheit und der Hirnatrophie zu minimieren und die persistierenden neurologischen Defizite auf möglichst niedrigem Niveau zu stabilisieren. DMD sind immunmodulatorisch wirksame Medikamente und somit ein kausalorientierter Therapieansatz. Mit den derzeit verfügbaren Substanzen sind die pathophysiologischen Vorgänge der inflammatorischen

Phase effektiver zu beeinflussen, als die später vorherrschende Neurodegeneration [69, 70]. Daher wird ein möglichst frühzeitiger Therapiebeginn schon nach einem ersten demyelinisierenden Ereignis angestrebt [50]. Die Wahl des Therapeutikums hängt vom vorliegenden Krankheitsverlauf ab und untergliedert sich in eine Basistherapie und eine Eskalationstherapie bei unzureichendem Ansprechen auf die Basismedikation (Abb. 2).

Indikation	CIS	RRMS	SPMS	
			mit Schüben	ohne Schübe
Eskalationstherapie		2. Wahl Mitoxantron (CPM)		
		1. Wahl Fingolimod Natalizumab		
Basistherapie	Interferon-β 1a i.m. Interferon-β 1a s.c. Interferon-β 1b s.c. Glatirameracetat	Interferon-β 1a i.m. Interferon-β 1a s.c. Interferon-β 1b s.c. Glatirameracetat Alemtuzumab* Azathioprin Dimethylfumarat (IVIg)	Interferon-β 1a s.c. Interferon-β 1b s.c. Mitoxantron (CPM)	Mitoxantron (CPM)
Schubtherapie	2. Wahl	Plasmapherese		
	1. Wahl	Methylprednisolon		

Abb. 2: Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [50])

Die Reihenfolge der Präparate ist frei gewählt und impliziert keine Überlegenheit eines Medikamentes. () = Unter Einschränkungen empfohlen; * = Bei aktivem Krankheitsverlauf; CIS = Klinisch isoliertes Syndrom; RRMS = Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose; SPMS = Sekundär progrediente Multiple Sklerose; IVIg = Intravenös applizierte Immunglobuline; CPM = Cyclophosphamid; i.m. = intramuskulär; s.c. = subkutan.

Als immunmodulatorische Basistherapie beim CIS und der schubförmigen Verlaufsform hat sich Interferon- β (IFN- β) international etabliert und durch langjährige Anwendungserfahrung ein gutes Wirkungs-Risiko-Profil in der Langzeitbehandlung bewiesen [71]. Alternativ hat sich das synthetische Polypeptidgemisch Glatirameracetat bewährt und in Ausnahmefällen kann auf Azathioprin oder intravenös applizierte Immunglobuline ausgewichen werden [50, 72, 73]. Zudem erfolgte 2014 die EU-Zulassung von Dimethylfumarat als orale Basismedikation und seit dem Vorjahr ist der monoklonale Antikörper Alemtuzumab bei aktivem Krankheitsverlauf zugelassen [74]. Bei hochaktiven Verläufen der RRMS oder mangelnder Wirksamkeit vorgenannter Medikamente kommen in Deutschland im Sinne einer Eskalationstherapie Fingolimod, Natalizumab oder Mitoxantron zum Einsatz [50, 74].

Zur Behandlung der sekundär progredienten MS besteht eine Zulassung für Mitoxantron und bei zusätzlichen klinischen Schüben findet auch hier IFN- β Anwendung. Für primär progrediente Verläufe existieren keine gesichert wirksamen DMD, ein individueller Therapieversuch durch eine GCS-Intervalltherapie oder mit Mitoxantron kann erwogen werden [50].

Die dritte Säule der MS-Therapie stellt die symptomatische Behandlung manifester Funktionseinschränkungen dar. Für die zahlreichen Symptome steht eine breite Palette an medikamentösen und nicht-medikamentösen Therapien zur Verfügung, welche multimodal eingesetzt werden, um die Lebensqualität zu steigern und Folgekomplikationen zu verhindern [50, 75].

Im Rahmen des umfassenden Therapiekonzeptes sollten zudem Strategien zur Bewältigung der Erkrankung sowie erkrankungsbedingten Belastung (Coping) vermittelt werden [76-78].

1.2 Interferone

1.2.1 Einsatz der Interferone – von der Entdeckung bis heute

Interferone wurden erstmals 1957 von Isaacs und Lindemann beschrieben [79]. In den darauffolgenden Jahren wurde zunehmend das antivirale, antitumoröse und immunmodulatorische Potential der autokrin und parakrin sezernierten Interferone erkannt [80]. Diverse Subtypen dieser helikalen Glykoproteine konnten identifiziert, isoliert und sequenziert werden. Entsprechend ihrer Sequenzhomologie und der genutzten Rezeptoren werden die zahlreichen humanen Interferone in drei Kategorien eingeteilt (Typ I-III). Interferone des Typs I sind IFN- α (Subtypen $\alpha 1$ - $\alpha 13$), IFN- β und die wenig erforschten IFN- ω , IFN- ϵ und IFN- κ . Typ II umfasst nur IFN- γ und Typ III wird durch IFN- λ ($\lambda 1$ -3 = Interleukin(IL)-29, IL-28A, IL-28B) repräsentiert [81, 82].

Der erste erfolgreiche klinische Einsatz der Interferone glückte 1976 an vier Patienten mit Hepatitis-B-Virus-Infektion [83]. Die breite laboratorische und klinische Erforschung wurde jedoch erst möglich, nachdem es 1979 gelang, ein menschliches Interferon-Gen in Bakterien zu übertragen und somit die Herstellung rekombinanter Interferone in großer Menge zu ermöglichen [84, 85]. Seither wurden die Wirkungen verschiedener Interferone im Rahmen diverser Pathologien erforscht. Heute wird IFN- $\alpha 2$ in der Therapie der chronischen Hepatitis-B und -C eingesetzt sowie bei verschiedenen malignen Indikationen, z.B. chronisch-myeloische Leukämie. IFN- γ ist für die Behandlung der septischen Granulomatose und der Osteoporose zugelassen [86, 87].

Erste Studien zum Einsatz der Interferone im Rahmen der MS erfolgten in den 80er Jahren mit anfänglichen Rückschlägen. Unter IFN- γ -Therapie stieg die Schubrate an und auch der Einsatz von IFN- α ergab keinen gesicherten Nutzen [88, 89]. Erst durch die intrathekale und später subkutane Applikation von IFN- β konnte eine Reduktion der Schubrate bewirkt werden [90-92]. Eine große multizentrische Doppelblind-Studie führte schließlich Mitte der 90er Jahre zur Zulassung von rekombinantem IFN- β für die Behandlung der schubförmigen MS [93, 94]. In den darauffolgenden Jahren wurde die Zulassung auf das CIS und die SPMS erweitert. Zudem kamen weitere IFN- β -Präparate auf den Markt,

welche sich in ihrer Herstellung, Struktur, Applikationsart und -häufigkeit sowie Dosierung unterscheiden [86]. Aktuell stehen drei verschiedene IFN- β -Wirkstoffe zur Behandlung der MS zur Verfügung (Tab. 2).

Tab. 2: Interferon- β -Wirkstoffe: Herstellung und Anwendungscharakteristika

Wirkstoff	Herstellung	Applikation	Dosierung	EU-Zulassung
IFN- β -1a	Hamster-Ovarzellen	intramuskulär	30 μ g 1 x pro Woche	CIS, RRMS
IFN- β -1a	Hamster-Ovarzellen	subkutan	22/44 μ g 3 x pro Woche	CIS, RRMS, SPMS ¹
IFN- β -1b	Escherichia Coli	subkutan	250 μ g alle zwei Tage	CIS, RRMS, SPMS ¹

¹ Für SPMS zugelassen, wenn zusätzlich klinische Schübe auftreten

IFN- β -1a wird rekombinant in Ovarzellen des chinesischen Hamsters hergestellt. Es entspricht in seiner Aminosäuresequenz der humanen Form und ist glykosyliert. IFN- β -1a ist in subkutaner (s.c.) und intramuskulärer (i.m.) Applikationsform verfügbar: s.c. injiziert in der Dosierung 22 μ g (= 6 Mio. Internationale Einheiten, IE) bzw. 44 μ g (= 12 Mio. IE) 3 x wöchentlich; i.m. injiziert in der Dosierung 30 μ g (= 6 Mio. IE) 1 x wöchentlich. IFN- β -1b wird rekombinant in einem Stamm der prokaryoten Escherichia Coli Bakterien produziert und unterscheidet sich von der humanen Form durch einen Austausch von Cystein gegen Serin an Position 17 sowie eine Methionin-Abspaltung am N-Terminus. Zudem ist IFN- β -1b nicht glykosyliert, wodurch es zur Aggregatbildung neigt und eine etwa zehnfach geringere spezifische Aktivität zeigt [95]. Entsprechend wird es klinisch höher dosiert mit 250 μ g (= 8 Mio. IE) alle zwei Tage s.c. injiziert.

1.2.2 Klinische Therapieergebnisse von Interferon- β bei Multipler Sklerose

Die klinische Wirksamkeit der drei IFN- β -Wirkstoffe konnte in großen randomisierten, multizentrischen Doppelblind-Studien mit Evidenzgrad 1 belegt werden [93, 94, 96, 97]. Unter zweijähriger IFN- β -Therapie zeigte sich eine Reduktion der Schubrate um etwa 30 %. Im Vergleich zur Placebogruppe blieb zudem ein größerer Patientenanteil komplett

schubfrei. Der Nutzen einer IFN- β -Therapie zeigte sich radiologisch sowohl an einer reduzierten Anzahl neuer T2-Läsionen und aktiver Gd-aufnehmender Läsionen, als auch in einem geringeren Läsionsvolumen. Eine mögliche Verlangsamung der EDSS-Progression wird kontrovers diskutiert [98-100]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass eine IFN- β -Therapie beim CIS das Risiko der Konversion zur gesicherten MS um über 50 % verringert [69, 97, 101]. Im Rahmen der SPMS reduziert IFN- β vornehmlich die Zahl aufgesetzter Schübe [55, 102]. Die Wirksamkeit der einzelnen IFN- β -Formen weist insgesamt eine Dosisabhängigkeit auf, jedoch ohne weiteren klinischen Nutzen oberhalb der aktuell empfohlenen Dosierungen [73, 93, 96, 103, 104]. Zusammenfassend verlangsamt IFN- β signifikant das Voranschreiten der MS und verlängert die Lebensdauer, jedoch kann unter Therapie der Krankheitsverlauf meist nicht gestoppt werden [105].

In direkten Vergleichsstudien der drei IFN- β -Wirkstoffe wurde eine vergleichbare Therapiewirksamkeit gezeigt. Gemessen an klinischen (Schubrate, Verzögerung eines erneuten Schubes, EDSS-Progression) und radiologischen (Anzahl neuer Läsionen) Parametern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Therapieeffekte [106-109]. Einige Autoren postulieren jedoch eine Überlegenheit der höher dosierten, subkutanen Wirkstoffe gegenüber dem intramuskulär applizierten IFN- β [100, 110].

Bei einigen Patienten kann eine reduzierte molekulare und klinische Wirkung aus der Bildung sogenannter neutralisierender Antikörper (NAb) resultieren [111, 112]. Dies sind Antikörper gegen appliziertes IFN- β , welche die Interaktion zwischen Medikament und zellulärem Rezeptor verhindern und somit dessen biologische Wirkung aufheben. Solche NAb entwickeln sich relativ spät, bis zu zwei Jahre nach Therapieinitiierung, persistieren jedoch nicht zwangsläufig [113, 114]. Die Prävalenz von NAb variiert stark zwischen den einzelnen Präparaten mit niedrigsten Raten (2-6 %) für i.m. verabreichtes IFN- β und 15-47 % bei s.c. Applikation [115, 116]. Im klinischen Alltag wird in Deutschland bislang nicht routinemäßig auf NAb getestet, sondern meist nur bei Verdacht auf unzureichende klinische Wirksamkeit der IFN- β -Therapie.

Insgesamt ist IFN- β ein sehr sicheres und gut verträgliches Medikament. Die häufigsten Nebenwirkungen sind insbesondere in den ersten drei Therapiemonaten grippeähnliche

Symptome wie Fieber, „Abgeschlagenheit“, Kopfschmerzen und Myalgien. Entzündliche Hautreaktionen um die Einstichstelle werden oftmals, vorwiegend bei s.c. Applikation, berichtet [117]. Daneben tritt gehäuft ein transienter Anstieg der Leberenzyme auf. Durch korrekte Injektionstechnik, begleitende antipyretische und analgetische Medikation und adäquates Monitoring lassen sich diese Nebenwirkungen gut mildern und kontrollieren. Schwerwiegendere Nebenwirkungen wie Depressionen, allergische Reaktionen, Hautnekrosen, Schilddrüsenfunktionsstörungen und Leberschädigungen sind selten [118]. Auch bei langjähriger Anwendung zeigt die IFN- β -Therapie ein gutes Sicherheitsprofil [71, 119].

Das Ansprechen auf eine IFN- β -Therapie ist individuell sehr verschieden und klare Kriterien eines „Therapieversagens“ existieren bislang nicht. Je nach zugrunde liegender Definition (Schübe, EDSS-Progression, MRT-Veränderungen oder Kombinationen der vorgenannten) und Länge des Beobachtungszeitraums sprechen bis zu knapp 50 % der MS-Patienten nicht oder nur unzureichend auf die IFN- β -Therapie an [120-123]. Etwa ein Drittel der Patienten zeigt auch unter Therapie keine Reduktion der Schubrate [124].

1.2.3 Wirkmechanismen von Interferon- β auf zellulärer und molekularer Ebene

Das natürliche IFN- β ist ein α -helikales Zytokin bestehend aus 166 Aminosäuren, welches vornehmlich von Fibroblasten und Leukozyten sezerniert wird [125]. Nach Bindung an membranständige Rezeptoren führt es zur Aktivierung einer bislang unvollständig geklärten Signalkaskade, an deren Ende die Expression hunderter sogenannter Interferon-stimulierter Gene (ISG) steht [126]. Nach heutigem Wissensstand vermitteln die Genprodukte der ISG die facettenreiche immunologische Wirkung von IFN- β , wobei die genauen Mechanismen nur teilweise bekannt sind. Einige therapeutisch relevante Wirkungen des IFN- β werden vorrangig durch Beeinflussung der Lymphozytenaktivität, der BHS-Permeabilität sowie der Zytokin- und Chemokinproduktion erklärt.

IFN- β vermindert die Expression der HLA-Klasse-II-Rezeptoren und kostimulatorischer Moleküle, wodurch die Antigenprozessierung und -präsentation gehemmt wird. Dies führt zu einer geringeren Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten [70, 127]. Zudem wird die

Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten gehemmt und vermehrte Apoptose trägt zur Reduktion autoreaktiver T-Lymphozyten bei. Zugleich werden regulatorische T-Lymphozyten induziert, welche ihrerseits eine Immunsuppression bewirken [127]. Durch diverse Mechanismen verhindert IFN- β das Einwandern von Leukozyten in die zerebralen Entzündungsherde. In Lymphozyten wird die Expression des membranständigen Chemokinrezeptors CCR7 induziert, wodurch diese statt in das ZNS, vermehrt in periphere Lymphknoten gelenkt werden [128]. Darüber hinaus wird die Adhäsion der Leukozyten an die BHS sowie die Transmigration verhindert, da die Expression der hierfür nötigen Adhäsionsmoleküle (z.B. *Very Late Antigen-4*) und Metalloproteinasen (z.B. *Matrix Metalloproteinase-9*) reduziert wird [70, 126]. Eine verstärkte systemische Zytokinproduktion könnte zur Abschwächung des Chemokingradienten zwischen ZNS und Blut führen und somit ebenfalls die zerebrale Infiltration vermindern. Zudem wird eine IFN- β -bedingte Veränderung des Zytokinmusters von einem proinflammatorischen Th1-Muster (z.B. IL-12, IFN- γ) hin zu einem antiinflammatorischen Th2-Expressionsmuster (z.B. IL-10) postuliert [127].

Darüber hinaus werden IFN- β neuroprotektive Wirkungen zugeschrieben. Vermutet werden eine erhöhte Resistenz von Neuronen und Oligodendrozyten gegenüber dem inflammatorischen Milieu, eine verringerte Gliose, sowie eine gesteigerte Remyelinisierung. Als Basis dieser Prozesse werden veränderte Aktivitäten von Mikroglia und Astrozyten sowie die Ausschüttung neurotropher Faktoren und neuronaler Wachstumsfaktoren diskutiert [25, 129].

1.3 Biomarker bei Multipler Sklerose

Ein Biomarker stellt einen objektiv messbaren biologischen Parameter dar, der physiologische oder pathologische Zustände und Prozesse oder auch therapeutische Effekte im Körper widerspiegelt [130]. Als Biomarker können sowohl klinische oder radiologische Befunde dienen, als auch molekularbiologische Marker auf zellulärer, molekularer oder genetischer Ebene. An einen idealen Biomarker werden Anforderungen wie eine hohe Sensitivität und Spezifität gestellt, sowie eine einfache, minimal-invasive und kostengünstige Messung mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [130, 131]. Entsprechend der klinischen Fragestellungen lassen sich Biomarker wie folgt klassifizieren:

- Diagnostische Biomarker
- Biomarker der Krankheitsaktivität
- Biomarker der klinischen Therapiewirkung
- Prognostische Biomarker

In der Diagnostik der MS hat sich beispielsweise die elektrophoretische Bestimmung oligoklonaler Banden im Liquor als Biomarker einer intrathekalen Antikörperproduktion etabliert [45]. Dies dient einerseits zum Nachweis einer chronisch-entzündlichen Reaktion, andererseits zum Ausschluss von Differentialdiagnosen und ermöglicht somit eine frühere Diagnosesicherung.

Schubfrequenz, EDSS-Werte und MRT-Befunde sind etablierte Biomarker sowohl für die aktuelle Krankheitsaktivität, als auch für das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie. Eine Abgrenzung des natürlichen Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens ist jedoch schwierig, weshalb klinisch-radiologisch meist nur das Mischbild – der „Krankheitsverlauf unter Therapie“ – bewertet werden kann. Ein etablierter Biomarker mit der Möglichkeit, die pharmakologische Therapiewirkung separat abzubilden sind NAb. Hohe persistierende NAb-Titer gegen IFN- β sprechen für eine reduzierte oder aufgehobene biologische und klinische Wirkung der Therapie [132-134].

Von diesen Biomarkern abzugrenzen und von besonderem Interesse sind prognostische Biomarker, welche klinische Endpunkte oder therapeutische Effekte schon im Voraus

prognostizieren lassen. Die prognostische Wertigkeit von Klinik und Bildgebung wurde intensiv erforscht, ist jedoch limitiert. Zwar können EDSS-Verläufe, Schubraten und MRT-Befunde in den ersten Jahren unter Therapie den Verlauf in den Folgejahren zu einem gewissen Grad vorhersagen, jedoch ist die Beurteilung frühestens sechs bis zwölf Monate nach Therapieinitiierung möglich [113, 135, 136]. Der NAb-Status lässt ebenfalls keine sichere Prognose zu, da diese Antikörper erst im Therapieverlauf auftreten und nicht zwangsläufig persistieren [114]. In Anbetracht der hohen Rate an Patienten mit ungünstigem Krankheitsverlauf unter IFN- β -Therapie und dem nachgewiesenen Nutzen eines DMD-Wechsels bei unzureichender Wirkung [137], ist eine frühe Vorhersage der Therapiewirkung wünschenswert. Dies könnte dem Patienten schneller die optimale immunmodulierende Therapie ermöglichen und Nebenwirkungen sowie sozio-ökonomische Kosten durch ineffektive Medikamentenversorgung reduzieren. Daher ist ein bedeutendes Ziel der aktuellen Forschung, einen prädiktiven Biomarker zu finden, der das therapeutische Ansprechen und den klinischen Verlauf schon vor Initiierung einer IFN- β -Therapie prognostizieren kann. In diesem Zuge sind molekularbiologische Marker in den Fokus gerückt.

1.3.1 Molekularbiologische Biomarker

Als molekularbiologische Biomarker können beispielsweise Variationen der DNA, RNA, mikroRNA oder Proteine dienen. Als Untersuchungsmaterial zur Biomarkeranalyse eignen sich bei MS-bezogenen Fragestellungen insbesondere zerebrale Gewebeproben sowie Blut und Liquor. Blut hat hierbei einen besonderen Stellenwert, da es die peripheren Immunprozesse der Erkrankung [13] widerspiegelt und zugleich einfach und risikoarm gewonnen werden kann [138]. Im Rahmen der molekularen Biomarker-Forschung bei MS werden häufig mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) untersucht, welche aus Vollblut separiert werden können und ein Gemisch verschiedener Zellen des Immunsystems darstellen [139]. Zu den PBMC gehören vorwiegend zirkulierende Lymphozyten und Monozyten, in geringerem Anteil auch dendritische und andere Zellen.

PBMC können mit modernen Techniken auf verschiedenen Ebenen analysiert werden. RNA-Messungen erlangen hierbei aktuell große Aufmerksamkeit. Sie erfassen die *messenger RNA* (mRNA) als Transkriptionsprodukt aktiv exprimierter Gene, wodurch die individuelle Expressionsstärke einzelner Gene bestimmt werden kann. Durch RNA-Untersuchungen können dynamische Einflüsse auf das Expressionsniveau beurteilt werden und zu einem gewissen Grad sind Rückschlüsse auf zellulär vorhandene Protein- und Enzymmengen möglich [138]. Zudem existieren Methoden zur parallelen Analyse des kompletten Transkriptom, also der gesamten, in einem Probenmaterial vorhandenen RNA. Entsprechende Proteinbestimmungen sind methodisch deutlich schwieriger, mit geringerer Sensitivität und Spezifität.

1.3.2 Messung der Genexpression

Zur Bestimmung der mRNA hat sich die *quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) als sensitive Messmethode bewährt. Ein bestimmter RNA-Strang wird hierbei durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die resultierende cDNA wird anschließend mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase dupliziert und mit Farbsonden markiert. Durch mehrfach wiederholte Duplikation wächst die Menge markierter cDNA exponentiell an, bis das Fluoreszenzsignal der Sonden intensiv genug ist, um vor dem Hintergrundsignal detektiert zu werden. Die Anzahl der PCR-Zyklen bis zur Detektion wird als Schwellenwert oder C_T -Wert bezeichnet und lässt Rückschlüsse auf die Menge ursprünglich vorhandener mRNA zu. Demnach entspricht eine doppelte RNA-Ausgangsmenge einer C_T -Wert-Reduktion um einen Zyklus. Die qRT-PCR ist jedoch nur zur gezielten Expressionsmessung einzelner Gene geeignet.

Mit der Entwicklung der sogenannten Mikroarray-Technik ist es möglich geworden, das komplette Transkriptom zu bestimmen und quantitativ zu messen. Somit kann die Expression des Genoms simultan zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst werden, was auch als *RNA-Profiling* oder genomweites Expressionscreening bezeichnet wird. Das Prinzip der Mikroarray-Technik basiert auf der Bindung des zu untersuchenden Materials an spezifische Sonden auf einem Mikrochip und wird im Folgenden exemplarisch anhand des „GeneChip® HG-U133 Plus 2.0“ der Firma Affymetrix® erklärt [140-142] (Abb. 3).

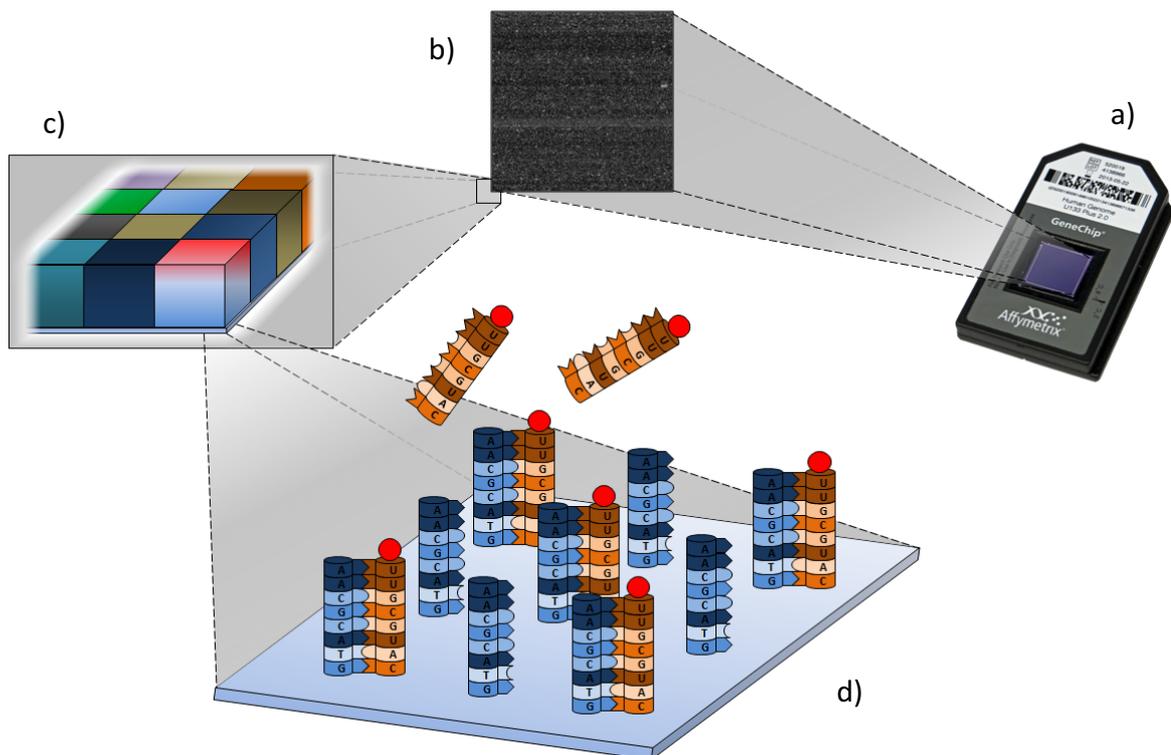


Abb. 3: Funktionsweise eines Affymetrix® Mikroarray-Chips, vereinfachte Darstellung

Bei dem Mikrochip der Firma Affymetrix® (a) sind auf einer Fläche von circa $1,6 \text{ cm}^2$ über eine Million sogenannter „Probe“-Quadranten an definierter Stelle aufgebracht (b, c). Die zahlreichen Sonden innerhalb jedes Probe haben eine spezifische, 25 Basen lange Oligonukleotid-DNA-Sequenz (verkürzt in Blautönen dargestellt), die komplementär zu einem bestimmten RNA-Fragment eines Gentranskripts ist (d). Unter Zugabe der zu analysierenden RNA-Fragmente (verkürzt in Ockertönen dargestellt, RNA-Fragment-Länge circa 35 – 200 Basen) kommt es zur Hybridisierung von Sonden und RNA-Molekülen (d). Mittels Laser wird anschließend das Lichtsignal der Fluoreszenzmarkierung (roter Punkt) an den RNA-Fragmenten jedes Probe gemessen und somit ist die quantitative Bestimmung von Gentranskripten möglich.

Ein solcher Mikroarray-Chip ist in über eine Million sogenannter „Probe“-Quadranten unterteilt. Jeder Quadrant enthält wiederum bis zu mehrere Millionen Kopien einer spezifischen Oligonukleotid-Sonde (25 DNA-Basen), welche komplementär zu einem Teilabschnitt eines bestimmten Gentranskripts ist. Wird das aus Zellen extrahierte und aufbereitete RNA-Untersuchungsmaterial auf den Chip gegeben, kommt es zur Bindung der RNA-Fragmente an die komplementären Sonden (Hybridisierung). Die gebundene,

fluoreszenzmarkierte RNA jedes *Probe*-Quadranten kann anschließend quantitativ gemessen werden. Ein Gentranskript wird in der Regel durch mehrere *Probes* (= *Probeset*) repräsentiert. Die Leuchtintensität eines *Probeset* gibt somit Aufschluss über das Expressionsniveau des entsprechenden Gens [143]. Durch die Mikroarray-Technik ist es möglich, mit einer geringen Probenmenge die Expression aller auf dem Chip repräsentierten Gene (über 17.000) simultan zu messen [142].

1.3.3 Erhöhte endogene Expression Interferon-stimulierter Gene und aktuelle Studienlage

Durch serielles Expressionsscreening vor und nach IFN- β -Applikation konnten Gene identifiziert werden, die durch IFN- β hoch- oder herabreguliert werden. Dies hat enorm zum Verständnis der molekularen Wirkmechanismen von IFN- β beigetragen und zahlreiche IFN-regulierte Gene (IRG) identifiziert [144-147]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die pharmakodynamischen Effekte auf die Genexpression im peripheren Blut nur von relativ kurzer Dauer sind und die mRNA-Level vieler IFN-stimulierter Gene (ISG) innerhalb von vier Tagen wieder auf ein prätherapeutisches Expressionsniveau zurückkehren [139, 148-150].

Durch Genexpressions-Studien wurde vielfach versucht, Gene zu identifizieren, deren Transkriptlevel den individuellen klinischen Verlauf von MS-Patienten unter Therapie vorhersagen können. In diesem Zusammenhang wurden zum einen medikamentös induzierte Expressionsänderungen, zum anderen aber auch prätherapeutische Unterschiede der endogenen¹ Genexpression mit klinischen Verlaufsdaten bezüglich des IFN- β -Therapieerfolgs korreliert. Über 100 Gene und Genkombinationen wurden als potentielle prognostische Biomarker postuliert [151]. Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. GPR3, DNM1, YEATS2) konnten diese jedoch nicht unabhängig bestätigt werden [151]. Ein weiterer vielversprechender Biomarker wurde von Axtell *et al.* vorgeschlagen [152]. Sie berichteten eine Assoziation zwischen hoher Expression von IL-17F und einem schlechteren Ansprechen auf IFN- β -Therapie mit vermehrten Schüben.

¹ „Endogen“ wird in der Literatur mehrdeutig verwendet. Im Folgenden bezieht es sich auf die Bedeutung „körpereigen“ bzw. „vom Körper produziert“ im Gegensatz zu „pharmakologisch induziert“.

Jedoch konnte dieser Zusammenhang von Bushnell *et al.* nicht bestätigt werden [153]. Bis dato konnte keiner dieser potentiellen prognostischen Biomarker im klinischen Alltag etabliert werden.

Eines der prominentesten ISG ist *Myxovirus Resistance Protein 1* (MX1). Dessen gleichnamiges Genprodukt ist ein Protein mit GTPase-Aktivität, welches als helikales Oligomer die Replikation diverser Viren behindert [154]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MX1 die immunregulatorische Aktivität seines Induktors – IFN- β – sensitiv widerspiegelt [155-157]. Daher gilt MX1 als Surrogatparameter für die Bioverfügbarkeit und molekulare Bioaktivität von IFN- β . Labormedizinisch konnte die quantitative Messung der MX1-mRNA für den indirekten Nachweis von NAb in die klinische Praxis implementiert werden und ist somit ein nützlicher Biomarker während der IFN- β -Therapie [158-161].

Gegenstand kontroverser Diskussion ist aktuell die Frage, ob die Expression von MX1 bereits vor Einleitung einer IFN- β -Behandlung den individuellen, langfristigen klinischen Verlauf prognostizieren kann.

Van Baarsen *et al.* beobachteten, dass einige MS-Patienten schon vor Initiierung einer IFN- β -Therapie eine erhöhte endogene Expression von MX1 und anderen ISG aufwiesen und somit eine verstärkte endogene IFN-Typ-I-ähnliche Aktivität zeigten [162]. Zudem reagierten diese Patienten auf molekularer Ebene nicht adäquat auf IFN- β -Applikationen [163]. Comabella *et al.* beschrieben daraufhin eine Assoziation zwischen prätherapeutisch erhöhter ISG-Expression und einem ungünstigen klinischen Verlauf unter IFN- β -Therapie [164]. Sie zeigten, dass die anschließende therapeutische Induktion dieser ISG bei *Non-Respondern* ausblieb, bei *Therapie-Respondern* jedoch sehr ausgeprägt war. Die verstärkte IFN-Typ-I-Signatur führten sie auf endogen vermehrte Expression und Phosphorylierung der IFN- β -Signalweg-Komponente STAT1 sowie auf erhöhte Level des IFN- α/β -Rezeptors 1 (IFNAR1) in Monozyten zurück [165, 166]. Darüber hinaus fanden Axtell *et al.* bei Patienten mit schlechtem Therapieansprechen höhere prätherapeutische Serumkonzentrationen von IFN- β selbst, was durch Bustamante *et al.* auf Expressionsebene bestätigt werden konnte [152, 165].

Im Widerspruch zu diesen Studien beschrieben Feng *et al.* eine verminderte ISG-Expression in Patienten mit aktiver MS, was sie auf unterschiedliche STAT1-Phosphorylierungen zurückführten [167]. Sie vermuteten, dass ein Defekt der IFN- β -Signalwege den klinischen Verlauf unter Therapie vorhersagen könnte. Erhöhte endogene MX1-mRNA-Level beschrieben van der Voort *et al.* als ein prognostisch günstiges Charakteristikum, da sie eine Assoziation zwischen hoher prätherapeutischer MX1-Expression und niedrigeren Schubraten sowie einem längeren schubfreien Überleben beobachteten [168]. Eine indirekte negative Korrelation zwischen der endogenen IFN-Typ-I-ähnlichen Aktivität und der Krankheitsaktivität wurde von Hesse *et al.* auch bei untherapierten Patienten berichtet. Hier zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von MX1 und IL-10 sowie eine negative Korrelation zwischen IL-10 und der Krankheitsaktivität im MRT [169].

Trotz dieser zum Teil kontroversen Studienergebnisse, zeigen die zahlreichen Assoziationen zum klinischen Verlauf, dass MX1 ein vielversprechender prognostischer Biomarker ist. Jedoch bedarf es der unabhängigen Validierung, ob die individuelle endogene MX1-Expression den klinischen Verlauf der MS unter IFN- β -Therapie vorhersagen kann.

2. Fragestellungen

Die MS ist eine entzündliche Erkrankung des ZNS mit individuell sehr variablem Verlauf. Eine international etablierte immunmodulatorische Pharmakotherapie stellt IFN- β dar, jedoch ist das Ansprechen auf diese Therapie bei etwa 40 % der Patienten unzureichend. Eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf unter Therapie ist im Einzelfall bislang nicht möglich, da kein entsprechender prognostischer Biomarker zur Verfügung steht. Einige MS-Patienten zeigen bereits vor Initiierung einer IFN- β -Therapie eine verstärkte Expression von MX1 und anderen ISG, entsprechend einer endogenen IFN-Typ-I-ähnlichen Aktivität. Die Relevanz dieses Phänomens für das individuelle Therapieansprechen wird kontrovers diskutiert und die molekularen Ursachen konnten bislang nicht geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die endogene MX1-Expression mit dem langfristigen Krankheitsverlauf von MS-Patienten unter Therapie assoziiert. Hierbei wurden folgende Fragen untersucht:

- Welche prätherapeutische prognostische Relevanz ergibt sich aus einem veränderten endogenen MX1-mRNA-Level bezüglich
 - der klinischen Parameter Schubfrequenz und EDSS
 - des paraklinischen Parameters MRTunter IFN- β -Therapie über einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren?
- Gibt es Unterschiede zwischen verschiedenen IFN- β -Präparaten bezüglich der prognostischen Relevanz einer erhöhten prätherapeutischen MX1-Expression für den klinischen Verlauf unter Therapie?

Zur genaueren Charakterisierung des Expressionsverhaltens von MX1 wurden folgende molekularbiologische Fragen analysiert:

- Wie verhält sich die MX1-Expression unter IFN- β -Therapie?
- Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen IFN- β -Präparaten bezüglich des Verhaltens der MX1-Expression im Therapieverlauf?
- Wie ist der physiologische Verlauf der MX1-Expression über die Zeit?

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen und regulatorischen Interaktionen, die zu einer vermehrten Transkription des MX1-Gens führen, wurden folgende Fragen adressiert:

- Gibt es systembiologische Hinweise auf eine Ursache für die individuell unterschiedliche endogene MX1-Gensignatur?
- Welchen Einfluss hat eine IFN- β -Therapie auf die Expression der Signalweg-Gene der IFN-Typ-I-Immunantwort?

3. Material und Methoden

Eine Zusammenfassung des Studienkonzeptes wird in Kapitel 3.1 als Übersicht gegeben. Detaillierte Ausführungen zu den einzelnen Teilaspekten der Studie finden sich in den nachfolgenden Abschnitten.

3.1 Studiendesign

Aus Blutproben von 61 Patienten mit schubförmiger MS wurden Genexpressionsprofile mit Mikroarray-Technik erstellt, bevor eine IFN- β -Therapie eingeleitet wurde. Anhand der mRNA-Level des MX1-Gens (als Surrogatparameter der endogenen IFN- β -Aktivität) erfolgte die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, MX1_{hoch} und MX1_{niedrig}. Nach einem Monat unter Therapie folgten erneute Genexpressionsmessungen aller Studienteilnehmer. Anschließend wurden die Patienten über fünf Jahre regelmäßig klinisch beobachtet und der Krankheitsverlauf zwischen den beiden Kohorten verglichen. Paraklinische MRT-Untersuchungen erfolgten über sieben Jahre bei klinischer Indikation. Eine Zusammenfassung der Datenerhebung und Gruppeneinteilung zeigt Abb. 4.

Um die molekulare Ursache einer unterschiedlichen IFN- β -Aktivität besser zu verstehen, wurden darüber hinaus die intrazellulären IFN- β -Signalwege aus der aktuellen Literatur konstruiert [170]. Die Expression der darin beteiligten Signalweg-Gene wurde zwischen den Patientengruppen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} verglichen, sowohl vor Therapiebeginn, als auch nach einem Monat unter Therapie. Zudem wurde die Genexpressionsänderung jeder Kohorte zwischen den beiden Zeitpunkten analysiert. Abb. 5 zeigt ein Schema der durchgeführten Genexpressionsvergleiche.

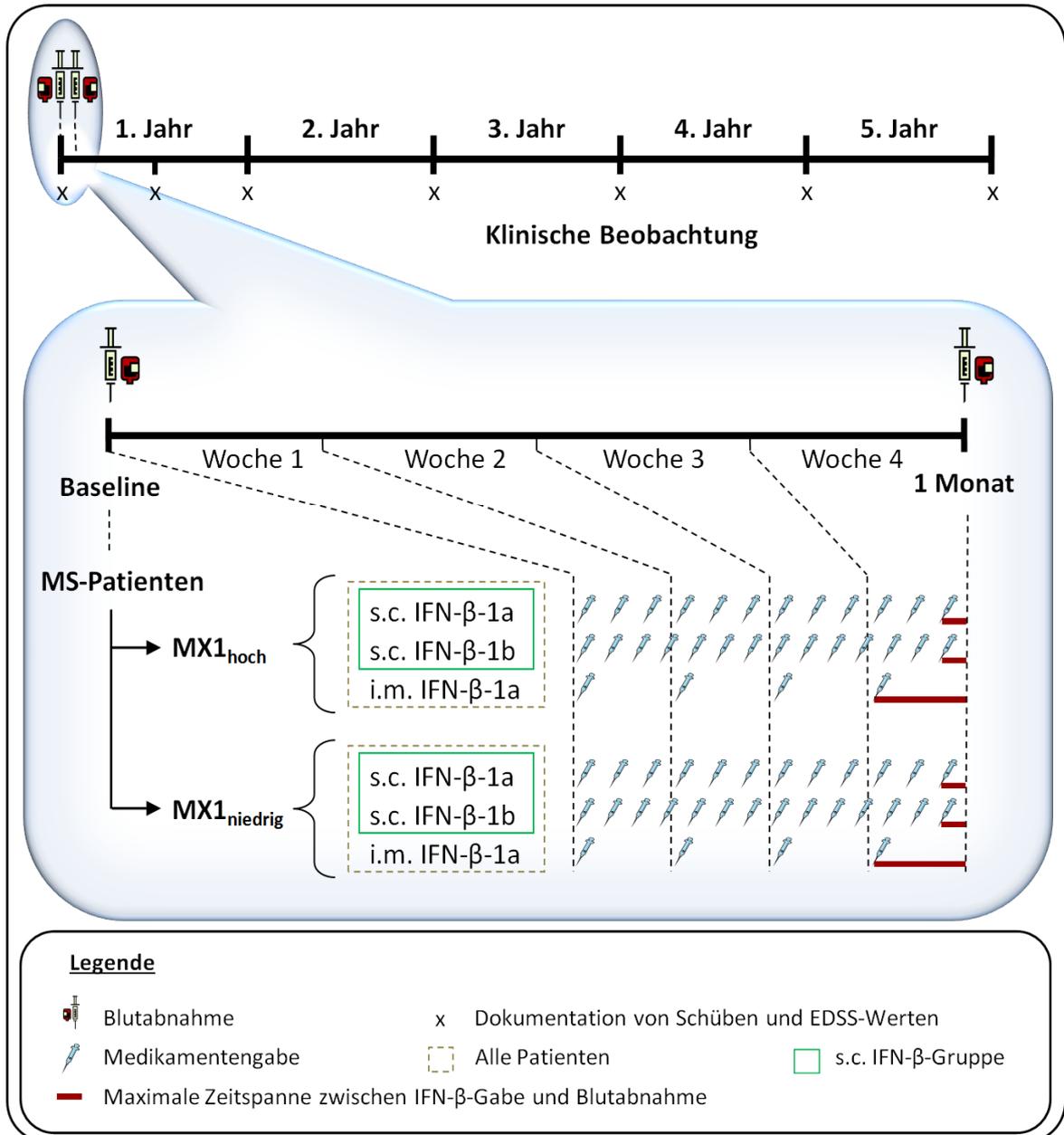


Abb. 4: Übersicht der Datenerhebung, Kohortenbildung und Therapieschemata

Die Einteilung der MS-Patienten erfolgte entsprechend der prätherapeutischen MX1-Transkriptlevel in „MX1_{hoch}“ und „MX1_{niedrig}“. Aufgrund unterschiedlicher Therapieschemata der drei IFN-β-Präparate (s.c. IFN-β-1a: dreimal pro Woche, s.c. IFN-β-1b: alle 2 Tage; i.m. IFN-β-1a: einmal pro Woche) resultieren unterschiedliche Zeitspannen zwischen Medikamentengabe und zweiter Blutabnahme, was einen Einfluss auf die gemessenen mRNA-Level hat [139, 149, 150]. Daher wurden für alle Genexpressions-Vergleiche nur Patienten berücksichtigt, die s.c. IFN-β-Präparate erhielten. Klinische Verlaufskontrollen der Patienten erfolgten über fünf Jahre durch Dokumentation aufgetretener Schübe und Erhebung des Behinderungsgrades entsprechend der Expanded Disability Status Scale (EDSS). MRT-Befunde wurden während eines siebenjährigen Zeitraums bei klinischer Indikation erhoben. Für klinische und paraklinische Vergleiche wurden Patienten aller Therapiegruppen eingeschlossen.

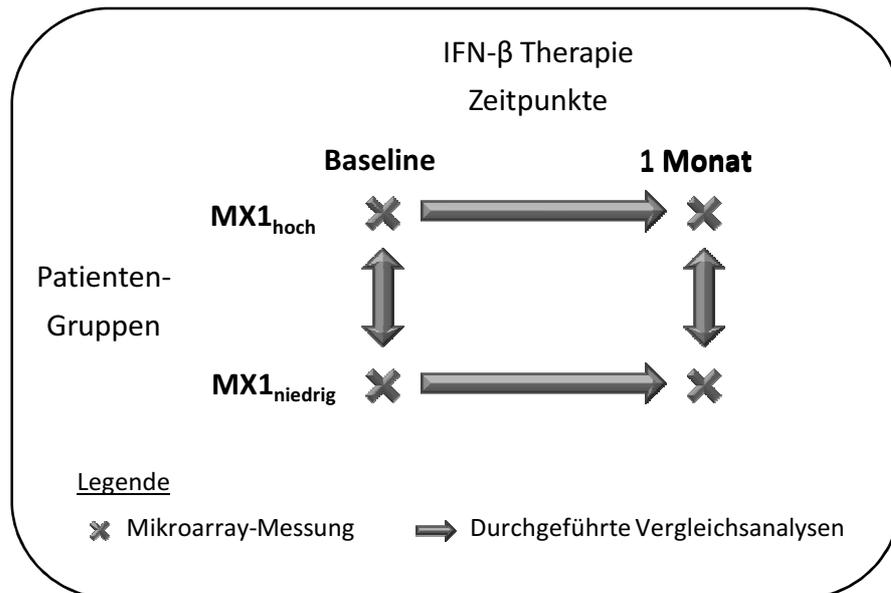


Abb. 5: Übersicht der Genexpressions-Vergleiche

Für jedes Gen der IFN-β-Signalwege wurde die mittlere Expression in den beiden Kohorten (MX1_{hoch} und MX1_{niedrig}) zu zwei Zeitpunkten verglichen – vor Therapiebeginn (Baseline) und nach einem Monat regelmäßiger IFN-β-Applikation. Zudem wurden Änderungen der Genexpression zwischen den Messzeitpunkten für beide Patientengruppen separat analysiert.

Vor Studienbeginn wurde von allen Patienten nach Aufklärung über Inhalt und etwaige Risiken der Studie das schriftliche Einverständnis zur Teilnahme eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt (Reg.-Nr. II HV 27/2003) und erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki.

Für die Analysen dieser Arbeit wurden Patientendaten und Mikroarray-Datensätze aus vorherigen Studien der Sektion Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock verwendet [145-147]. Im Folgenden wird ein Überblick über die Erhebung und Prozessierung der klinischen und paraklinischen Daten sowie der Genexpressionsdaten gegeben.

3.2 Patientenkollektiv

An dieser Studie nahmen 61 Patienten (42 weiblich, 19 männlich) der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock teil. Diese wurden über einen Zeitraum von dreieinhalb Jahren zwischen Oktober 2001 und Februar 2005 rekrutiert. Bei allen Patienten wurde eine schubförmig-remittierende Multiple Sklerose nach den McDonald-Kriterien von 2001 (Tab. A-3) diagnostiziert [38]. Eine eingeleitete Interferontherapie erfolgte mit s.c. IFN- β -1a (3 x 22 μ g oder 3 x 44 μ g / Woche; n=12), s.c. IFN- β -1b (250 μ g jeden zweiten Tag; n=25) oder i.m. IFN- β -1a (1 x 30 μ g / Woche; n=24). In der Regel erhielten die Patienten in der Vergangenheit noch keine immunmodulatorische oder zytotoxische Therapie (93 % der Studienteilnehmer); die übrigen 7 % wurden nach mehrmonatiger Schwangerschafts- oder Nebenwirkungs-bedingter Therapiepause rekrutiert. Bei 95 % der Patienten erfolgte 30 Tage vor Studienbeginn keine GCS-Schubtherapie.

Das Patientenalter zu Therapiebeginn lag zwischen 18 und 63 Jahren (Mittelwert: 38 Jahre, Standardabweichung: 10 Jahre). Für 53 Patienten betrug der Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn weniger als neun Monate, für die übrigen acht Patienten zwischen 25 und 134 Monaten.

3.3 Erhebung klinischer und bildgebender Verlaufsdaten

Zur Einschätzung des klinischen Zustandes der Patienten bei Studienbeginn wurden vor Therapieinitiierung (Baseline) die Anzahl von Schüben in den vorangegangenen zwölf Monaten erfasst und der Grad der Behinderung mittels EDSS beurteilt. Anschließend wurden bei allen Patienten nach sechs Monaten, zwölf Monaten und nachfolgend jährlich das Auftreten von Krankheitsschüben dokumentiert sowie EDSS-Werte erhoben. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über fünf Jahre und die Fortführung der klinischen Datenerhebung und -dokumentation erfolgte, wenn möglich, auch im Falle eines vorzeitigen Therapieabbruchs.

Bildgebende Untersuchungen erfolgten in Form kranialer Magnetresonanztomographien (cMRT) in 1,5 Tesla Tomographen mit einer Schichtdicke von 5 mm. Bei 58 der 61 Patienten wurde binnen eines Jahres vor Studienbeginn eine kraniale MRT-Untersuchung durchgeführt, welche als Ausgangswert für die bildgebende Beurteilung des Krankheitsverlaufs gewertet wurde (Baseline-cMRT). Die Aufnahmen erfolgten in T2-Wichtung sowie T1-gewichtet vor und nach Gd-KM-Applikation. Beurteilt wurden die Darstellung von T2-Hyperintensitäten (T2-Läsionen), T1-Hypointensitäten (T1-Läsionen), KM-aufnehmenden Läsionen in T1-Wichtung (T1 mit KM), sowie die globale Atrophie des Gehirns gemessen am Durchmesser des III. Ventrikels (Atrophie). Diese Parameter wurden rein qualitativ erfasst und kategorisiert in „normal“ oder „pathologisch“. MRT-Verlaufskontrollen der einzelnen Patienten wurden über einen Zeitraum von sieben Jahren unregelmäßig bei klinischer Indikation durchgeführt. Hierbei erfolgte ein Vergleich des Verlaufs-cMRT mit dem Baseline-cMRT und jede Veränderung der vier Parameter wurde qualitativ beurteilt und eingeteilt in „verschlechtert“, „unverändert“ oder „verbessert“. Als Verschlechterung galt für die entsprechenden Parameter mindestens eine neue T2-Läsion, neue T1-hypointense oder KM-aufnehmende Läsionen bzw. die Zunahme des Ventrikeldurchmessers um $\geq 1,5$ mm.

3.4 Probengewinnung, -prozessierung und Mikroarray-Analyse

Jedem Patienten wurden vor Therapiebeginn und nach einem Monat unter Therapie jeweils 15 ml peripher-venöses Blut abgenommen. Die Blutabnahmen erfolgten hierbei jeweils vor der nächsten IFN- β -Applikation. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme gab es keinen klinischen oder labormedizinischen (erhöhte Leukozytenzahlen, erhöhte CRP-Werte) Hinweis auf eine akute Infektion.

Aus den Blutproben wurden PBMC mittels Ficoll-Dichtegradienten separiert, nachfolgend lysiert und die Gesamt-RNA mithilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) extrahiert. Eine Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA erfolgte mit dem „2100 Bioanalyzer“ (Agilent Technologies). Die Gesamt-RNA wurde nach standardisierter Vorgehensweise präpariert, revers transkribiert und die resultierende cDNA wiederum in Biotin-markierte cRNA umgeschrieben. Nach Fragmentierung der cRNA erfolgte die Hybridisierung auf

Oligonukleotid-Mikroarrays (Affymetrix® HG-U133 A und B für i.m. IFN- β -1a und s.c. IFN- β -1b oder Plus 2.0 für s.c. IFN- β -1a) gemäß der Herstellerangaben [143].

Nach dem Scannen der Arrays erfolgte die Berechnung der Genexpressionslevel mithilfe der „GeneChip Operating Software“ (GCOS 1.4) und dem statistischen Algorithmus „MAS5.0“ (Mikroarray Analysis Suite 5.0) der Firma „Affymetrix®“. Mit den Fortschritten der Genomforschung hat sich die Gen-Annotation geändert, wodurch manche der *Probes* auf den Affymetrix® GeneChips zu keinem Transkriptionsprodukt passen und andere gleich mehrere binden. Um derartige *Probes* aus der Analyse auszuschließen, wurde ein sogenannter „*custom Chip Definition File*“ (Version 2.1.0) angewandt [171, 172]. Die *Probeset*-Gen-Zuordnung basierte hierbei auf den aktuellen Informationen der Datenbanken „GeneAnnot“ (Version 1.9) [173, 174] und „GeneCards“ (Version 2.41) [175, 176]. Die Primäranalyse der *Probe*-Signalintensitäten erfolgte in der Programmierumgebung „R“ (R Foundation for Statistical Computing).

Durch das beschriebene Vorgehen konnte zu jedem der 61 MS-Patienten an zwei verschiedenen Zeitpunkten ein Expressionsprofil von jeweils über 17.000 Genen gewonnen werden. Die kompletten Datensätze können über die Gene-Expression-Omnibus-Datenbank (GEO) [177, 178] eingesehen werden (GEO-Eintragungsnummern: GSE19285, GSE24427, GSE33464).

3.5 Einteilung der Studienkohorten

Basierend auf dem Baseline-Transkriptlevel von MX1 wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Die gemessenen MX1-Signale reichten von einem Wert von 875 bis zu 11.588. Ein Grenzwert wurde bei 3.000 gelegt, was genau dem zweifachen Standardfehler (*Standard Error*, SE) oberhalb des Mittelwertes entsprach. Folglich konnten Werte oberhalb von 3.000 als erhöht gegenüber dem Durchschnitt betrachtet werden. Patienten, deren MX1-Level oberhalb des Grenzwertes lag, wurden der Kohorte MX1_{hoch} zugeordnet (n=11), Patienten mit niedrigeren Werten bildeten die Gruppe MX1_{niedrig} (n=50).

Um mögliche prätherapeutische Unterschiede der Kohortenzusammensetzung zu erkennen, wurden die Patientengruppen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} in Bezug auf folgende Parameter miteinander verglichen: Patientenalter und EDSS vor Studienbeginn, Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Studienbeginn, sowie Anzahl von Schüben in den letzten 12 Monaten vor Studienbeginn. Hierzu wurde der zweiseitige t-Test herangezogen mit einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$. Die Geschlechtsverteilung innerhalb der Kohorten sowie die Patientenanzahl pro IFN- β -Präparat wurden mithilfe des exakten Fisher-Tests bei einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ verglichen.

3.6 Statistische Analyse der klinischen und paraklinischen Verlaufsdaten

Die statistischen Tests dieser Studie wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit der Software „PASW Statistics“ (Version 18.0.0, SPSS Inc.) durchgeführt.

3.6.1 Schubfrequenz und Expanded Disability Status Scale

Zur Eruierung der prognostischen Bedeutung einer erhöhten Baseline-MX1-Expression wurden die Gruppen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} im Hinblick auf den langfristigen klinischen Krankheitsverlauf über fünf Jahre verglichen. Hierzu wurden die mittleren EDSS-Werte sowie die kumulative Anzahl von Schüben mittels t-Test mit Welch-Korrektur (bei inhomogenen Varianzen) gegenübergestellt (Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$). Anschließend wurden diese Analysen separat für die drei einzelnen IFN- β -Präparate wiederholt, um mögliche medikamentenspezifische Unterschiede zu evaluieren. Ein Interaktionseffekt zwischen den Patientengruppen und den drei Präparaten auf die Schubrate beziehungsweise den EDSS-Wert wurde durch eine Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA) mit F-Statistik geprüft [179]. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit „SigmaPlot“ (Version 10.0, Systat Software Inc.).

Zusätzlich erfolgte eine vergleichende Analyse des schubfreien Überlebens in den Kohorten MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} durch Konstruktion rechts-zensierter Kaplan-Meier-Kurven in „PASW Statistics“. Die Kurven beider Gruppen wurden mittels Log-Rank-Test und proportionaler *Hazard*-Regression nach Cox auf eine signifikante

Abweichung getestet. Dies wurde anschließend ebenfalls für die drei IFN- β -Präparate einzeln durchgeführt.

3.6.2 Magnet-Resonanz-Tomographie

Die prognostische Relevanz der endogenen MX1-Expression auf den paraklinischen Krankheitsverlauf in der MRT wurde ebenfalls untersucht. In diese Analyse wurden alle Patienten eingeschlossen, deren bildmorphologischer Verlauf durch mindestens zwei (Baseline und Verlauf) MRT-Untersuchungen beurteilt werden konnte. Um den betreffenden Patientenanteil zu vergrößern, wurde der Beobachtungszeitraum für die paraklinische Analyse um weitere 24 Monate auf sieben Jahre erweitert. Ein Vergleich zwischen den Patienten der MX1_{hoch}- und MX1_{niedrig}-Kohorte erfolgte separat für jeden MRT-Parameter (T2-Läsionen, T1-Läsionen, T1 mit KM und Atrophie). Hierfür wurde die Verteilung der Befunde „verbessert“, „unverändert“ oder „verschlechtert“ innerhalb beider Kohorten mithilfe des exakten Fisher-Tests in der Programmierumgebung „R“ gegenübergestellt (Signifikanzlevel $\alpha = 0,05$). Auf diese Weise wurden die Baseline-Befunde sowie folgende Beobachtungszeiträume analysiert: 2.-3. Jahr, 4.-5. Jahr, 6.-7. Jahr, 1.-7. Jahr. Bei Mehrfachuntersuchungen eines Patienten innerhalb eines Zeitraums wurde der jeweils schlechtere MRT-Befund berücksichtigt.

3.7 Statistische Analyse der MX1-Expression

Für statistische Vergleiche der Genexpressionsdaten wurden lediglich Patienten berücksichtigt, die s.c. IFN- β -Präparate erhielten (s.c. IFN- β -1a, s.c. IFN- β -1b). Dies ist der unterschiedlichen Applikationshäufigkeit von s.c. IFN- β (drei bis vier Injektionen pro Woche) und i.m. IFN- β (eine Injektion pro Woche) geschuldet, wodurch folglich verschiedene Zeitintervalle zwischen zwei aufeinanderfolgenden Injektionen resultieren. Da die Blutabnahmen stets vor der nächsten Injektion stattfanden, ergibt sich eine unterschiedliche Zeitspanne zwischen letzter IFN- β -Applikation und Blutabnahme (Abb. 4), was nach heutigem Wissensstand einen erheblichen Einfluss auf die gemessenen mRNA-Level hat (Kapitel 1.3.3).

Zunächst wurde die Signifikanz der unterschiedlichen MX1-Expression zwischen den beiden Kohorten geprüft. Hierzu erfolgte ein Vergleich der MX1-mRNA-Level beider Gruppen sowohl zu Baseline als auch nach einem Monat Interferongabe unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (Wilcoxon-Rangsummentest für unverbundene Stichproben).

Anschließend wurde die Wirkung von IFN- β auf die Expression des MX1-Gens beurteilt. Hierzu erfolgte innerhalb jeder Kohorte ein Vergleich der Expression zu Baseline mit dem Expressionslevel nach einem Monat, wofür der Wilcoxon-Rangsummentest für verbundene Stichproben Anwendung fand. Für das Signifikanzlevel wurde $\alpha = 0,01$ gewählt. Eine Visualisierung der Verteilung der MX1-Daten wurde mit der Funktion „ehplot“ [180] des R-Softwarepaketes „plotrix“ [181] erstellt.

Diese Analysen erfolgten im Anschluss noch einmal separat für die Patienten der jeweiligen IFN- β -Präparate, um medikamentenspezifische Unterschiede in der MX1-Modulation zu evaluieren. Für diese, nach Therapieform getrennte Betrachtung, wurde zusätzlich die Patientengruppe mit einbezogen, welche i.m. IFN- β -1a erhalten hatte.

3.8 Analyse der physiologischen MX1-Expression in einer gesunden Kohorte

Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Expression des MX1-Gens eine charakteristische Eigenschaft einiger MS-Patienten war, oder nur ein temporäres Phänomen zum Zeitpunkt der Blutabnahme darstellte. Beispielsweise könnte die Interferonaktivität der PBMC in MX1_{hoch}-Patienten durch eine subklinische akute Virusinfektion nur vorübergehend gesteigert gewesen sein. Zur Klärung dieser Frage sollte der langfristige physiologische Verlauf der MX1-Expression in gesunden Personen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die GEO-Datenbank im August 2011 nach geeigneten Datensätzen durchsucht und der Affymetrix® Mikroarray-Datensatz von Karlovich *et al.* ausgewählt (GEO-Eintragungsnummer: GSE16028). Dieser enthält Vollblut-Genexpressionsmessungen von 22 gesunden Testpersonen, gemessen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten über eine Spanne von sechs Monaten [182]. Die Rohdaten wurden in gleicher Weise prä-prozessiert wie die Daten der MS-Patienten (Kapitel 3.4). Anschließend wurde die Korrelation der

MX1-Level zu Studienbeginn und nach sechs Monaten mittels Spearman Rangkorrelationskoeffizienten beurteilt. Es folgte zudem eine Varianzanalyse, um den Einfluss von Alter, Geschlecht, Zeitpunkt und individuellem Probanden² auf die gemessenen MX1-Transkriptmengen zu erfassen. Das lineare ANOVA-Modell mit F-Statistik wurde mithilfe des R-Programms „car“ [183] berechnet.

3.9 Konstruktion der Interferon- β -Signalwege

Zur Untersuchung der molekularen Ursache für die individuell unterschiedliche MX1-Expression vor Therapiebeginn wurden involvierte Signalwege eingehender betrachtet. Da die MX1-Transkription physiologischerweise durch IFN- β induziert wird, wurden zunächst die Gene eruiert, welche in den IFN- β -assoziierten Signalwegen involviert sind; entweder in Signalwegen, welche die IFN- β -Expression regulieren, oder in Signalwegen, die durch IFN- β aktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde die PubMed-Datenbank [184] nach Review-Artikeln durchsucht, welche diese Signalwege beschrieben und deren Publikation maximal fünf Jahre zurücklag. Hierbei konnten elf relevante Veröffentlichungen ausgewählt werden [81, 82, 126, 185-192]. Aus diesen wurden Gene und deren Interaktionen extrahiert, sofern sie redundant in mehreren Artikeln genannt wurden. Anschließend wurde ein Netzwerk aus den entsprechenden Genen konstruiert mit Darstellung der verschiedenen Interaktionen (z.B. Bindung, Aktivierung, Inhibierung). Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm „Cytoscape“ (Version 2.8.1, Cytoscape Consortium) [193, 194].

3.10 Expressionsanalysen der Interferon- β -Signalweg-Gene

Im Anschluss wurden zu allen Signalweg-Genen die Expressionsdaten der MS-Patienten extrahiert und analysiert. Zunächst wurde für jedes Gen überprüft, ob eine signifikante Korrelation besteht zwischen Expressionshöhe und den klinischen Baseline-Daten (Alter und EDSS zu Therapiebeginn, Geschlecht, Zeitspanne zwischen Diagnose und

² „Proband“ bezeichnet in der vorliegenden Arbeit ausschließlich gesunde Testpersonen.

Therapiebeginn, Schubhäufigkeit binnen 12 Monaten vor Therapie). Hierfür fand der Pearson-Korrelationskoeffizient Anwendung. Aufgrund der multiplen Testung (Korrelationstest für jedes Gen mit jedem Baseline-Parameter) steigt das Risiko, dass ein Test zufällig eine Korrelation ergibt, da sich die Irrtumswahrscheinlichkeiten (α) der einzelnen Tests aufsummieren. Aus diesem Grund wurde eine α -Adjustierung mit $\alpha = 0,001$ gewählt und nur kleinere p-Werte als statistisch signifikant gewertet.

Bei den folgenden Expressionsanalysen wurden wiederum lediglich Patienten berücksichtigt, welche s.c. IFN- β -Präparate erhielten (Kapitel 3.7). Für jedes Signalweg-Gen erfolgte ein Vergleich der Baseline-Expression zwischen den MX1_{hoch}-Patienten und den MX1_{niedrig}-Patienten unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$. Zur Beurteilung der IFN- β -Wirkung auf die Transkription der Signalweg-Gene wurde in gleicher Weise die RNA-Menge jedes Gens nach einem Monat regelmäßiger IFN- β -Applikation zwischen den Kohorten verglichen. Zudem wurden therapieabhängige Expressionsänderungen innerhalb jeder Patientengruppe evaluiert. Hierzu erfolgte für beide Kohorten eine Betrachtung der mRNA-Level nach dem ersten Therapiemonat im Vergleich zu den Baseline-Werten unter Anwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Expressionsunterschiede mit einem p-Wert $< 0,01$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Zur Darstellung von Unterschieden und Änderungen der Expression der Signalweg-Gene im Netzwerk wurden die Daten in Cytoscape importiert und visualisiert.

3.11 Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Das Muster der zu Baseline differentiell exprimierten Gene wurde auf eventuell bestehende genregulatorische Interaktionen untersucht. Hierfür erfolgte eine Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) in den Promotorbereichen der Signalweg-Gene. Ausgangspunkt der Analyse bildeten diejenigen Gene, welche am Ende der betreffenden Signalwege stehen und als Transkriptionsfaktoren direkt an die chromosomale DNA binden können. Es wurde überprüft, ob für diese Transkriptionsfaktoren passende Bindungsstellen in den regulatorischen DNA-Abschnitten

der anderen Signalweg-Gene vorhanden sind. Als regulatorische Region wurde derjenige DNA-Abschnitt definiert, der 1.000 Basenpaare in 3'- und 5'-Richtung der entsprechenden Transkriptions-Startstelle liegt [195]. Die Startpositionen entstammen der GeneCards-Datenbank (Version 2.41). Innerhalb der regulatorischen Regionen erfolgte die TFBS-Analyse mithilfe computerbasierter Vorhersagen über evolutionär konservierte TFBS, welche von dem „tfbsConsSites track“ (Version hg18) [196] der UCSC- (University of California, Santa Cruz) Datenbank gewonnen wurden [197]. Hierbei handelt es sich um *in silico* Vergleiche der Basensequenz im zu untersuchenden Genabschnitt mit der Basenabfolge bekannter Bindemotive des jeweiligen TFs, wobei Bindemotiv-Informationen der öffentlichen Transfac-Datenbank [198] entstammen. Um die Spezifität der Sequenzübereinstimmungen zu erhöhen, wurden diejenigen TFBS gefiltert, die evolutionär zwischen Mensch, Maus und Ratte konserviert sind, da phylogenetisch erhaltene DNA-Bereiche mit höherer Wahrscheinlichkeit regulatorisch relevant sind [199].

3.12 Validierung der Mikroarray-Daten mittels PCR

Die RNA-Proben der MS-Patienten wurden verwendet, um die mRNA-Level für 14 der ermittelten Signalweg-Gene nachträglich mittels qRT-PCR nachzumessen. Zuvor wurden Quantität und Qualität der RNA mittels UV-Spektrometer („NanoDrop 1000“, Thermo Scientific) und „2100 Bioanalyzer“ (Agilent Technologies) überprüft. Ausreichende RNA-Mengen waren bei 44 der 61 MS-Patienten in beiden Blutproben (Baseline, nach einem Monat) vorhanden. Von jeder Probe wurden 0,2 µg Gesamt-RNA revers transkribiert unter Anwendung des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems). Mit Hilfe des „7900HT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) wurde die so gewonnene, stabilere cDNA anschließend in 384-Well-Platten mit vorgefertigten TaqMan-Reagenzien und -Primern nach Herstellerangaben quantifiziert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte während jedes PCR-Zyklus und Schwellenwerte (C_T -Werte) wurden automatisch mithilfe der Programme „SDS 2.3“ und „RQ Manager 1.2“ (Applied Biosystems) berechnet. Für vier Patienten wurden die PCR-Messungen wiederholt und aus den Einzelmessungen jeweils der C_T -Mittelwert gebildet.

Zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse wurde geprüft, ob die PCR-Daten mit den Mikroarray-Daten korrelieren. Hierfür wurden Spearman Rangkorrelationskoeffizienten und p-Werte in der Programmierumgebung „R“ berechnet.

Von den insgesamt 44 MS-Patienten, für die eine PCR-Nachbestimmung durchgeführt werden konnte, gehörten neun Patienten zur MX1_{hoch}-Kohorte und 35 Patienten zur MX1_{niedrig}-Kohorte. Für jedes der 14 nachbestimmten Gene folgten verschiedene kohorten- und zeitabhängige Vergleiche der C_T-Werte. Dies geschah in exakt der gleichen Weise, wie schon zuvor für die Mikroarray-Daten beschrieben. Folglich wurden die Expressionslevel der Gruppen sowohl zu Baseline als auch nach einem Monat Therapie gegenübergestellt und ebenfalls die Expressionsänderungen zwischen den beiden Zeitpunkten für jede Gruppe analysiert (Kapitel 3.10).

4. Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Von den 61 Studienteilnehmern konnten 55 Patienten kontinuierlich über den gesamten, fünfjährigen klinischen Beobachtungszeitraum an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock nachverfolgt werden. Diese 55 Patienten erlitten durchschnittlich 1,7 Schübe (SE: 0,27) während des Beobachtungszeitraums, was einer mittleren jährlichen Schubrate von 0,34 entspricht. Nach fünf Jahren waren 40 % der Patienten schubfrei und die übrigen Patienten hatten durchschnittlich 2,8 Schübe (SE: 0,32) erlitten (mittlere jährliche Schubrate: 0,56). Der mittlere EDSS-Wert lag zu Studienbeginn bei 1,8 (SE: 0,16) und stieg binnen der fünf Jahre auf 2,7 (SE: 0,23). Die IFN- β -Therapie wurde bei insgesamt 20 Patienten vorzeitig beendet. Gründe hierfür waren Kinderwunsch, Nebenwirkungen, Krankheitsprogression, Wohnortwechsel oder fehlende Adhärenz.

Von den 61 rekrutierten RRMS-Patienten zeigten 11 Patienten zu Studienbeginn erhöhte endogene MX1-Expressionslevel. Sie wurden der Studienkohorte $MX1_{hoch}$ zugeteilt. Die übrigen 50 Patienten bildeten die Kohorte $MX1_{niedrig}$ (Abb. 6).

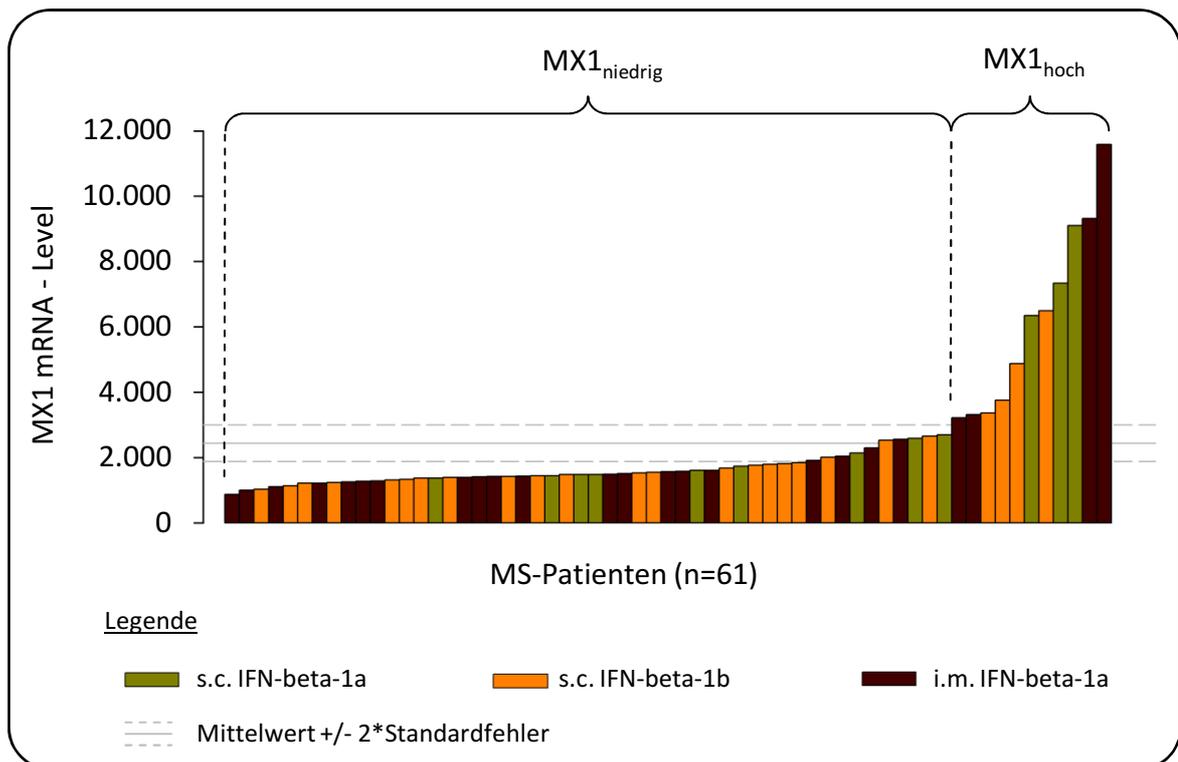


Abb. 6: Kohorteneinteilung der Studienpopulation

Dargestellt sind die prätherapeutisch gemessenen MX1-mRNA-Level aller 61 MS-Patienten. Die Expressionshöhe diente als Kriterium der Kohorteneinteilung, wobei der zweifache Standardfehler oberhalb des Mittelwertes den Grenzwert bildete (MX1-mRNA-Level: 3000). Patienten mit höheren Werten wurden der Kohorte $MX1_{hoch}$ zugeordnet (n=11), Patienten mit geringerer Expression bildeten die Gruppe $MX1_{niedrig}$ (n=50). Farblich hervorgehoben ist die jeweilige, anschließend eingeleitete IFN- β -Therapieform. Man beachte die schiefe Verteilung der Messwerte.

Es ergab sich kein signifikanter prätherapeutischer Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen in Bezug auf die Baseline-Parameter (Tab. 3).

Tab. 3: Vergleich der Kohorten bezüglich demographischer und klinischer Baseline-Parameter

Demographische und klinische Parameter	MX1 _{hoch} (n=11)	MX1 _{niedrig} (n=50)	p-Wert
Alter zu Studienbeginn (Jahre)	34,8 ± 8,7	38,3 ± 10,4	0,31
Zeit Diagnosestellung bis Studienbeginn (Monate)	2,4 ± 2,4	11,6 ± 26,6	0,26
Anzahl von Schüben im Jahr vor Studienbeginn	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,6	0,17
EDSS-Wert zu Studienbeginn	2,0 ± 1,5	1,7 ± 1,1	0,51
Geschlecht (weiblich/männlich)	8 / 3	34 / 16	1,00
Verabreichtes IFN-β-Präparat (1a im./1a sc./1b sc.)	4 / 3 / 4	20 / 9 / 21	0,83

Für die oberen vier Parameter sind Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Unterschiede zwischen den Patientengruppen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} wurden mittels zweiseitigen t-Tests auf Signifikanz geprüft. Geschlechtsverteilung und die Anzahl an Patienten pro IFN-β-Präparat sind in absoluten Zahlen angegeben. P-Werte wurden hierfür mittels exakten Fisher-Tests berechnet.

4.2 Vergleich des klinischen und paraklinischen Verlaufs in Abhängigkeit der endogenen MX1-Expression

4.2.1 Schubfrequenz und Expanded Disability Status Scale

Die prognostische Bedeutung einer erhöhten prätherapeutischen MX1-Expression auf den klinischen Krankheitsverlauf wurde untersucht. Hierfür erfolgte ein Vergleich der Kohorten MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} bezüglich ihrer Schubraten und EDSS-Werte über fünf Jahre. Berücksichtigt wurden alle Patienten, welche über den kompletten Studienzeitraum klinisch evaluiert wurden (MX1_{hoch}: n=10; MX1_{niedrig}: n=45).

Die mittlere kumulative Schubanzahl wurde zwischen $MX1_{hoch}$ und $MX1_{niedrig}$ nach sechs Monaten, zwölf Monaten und anschließend jährlich verglichen. Zu keinem Zeitpunkt ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die mittlere Fünf-Jahres-Schubrate betrug 1,6 (SE: 0,7) in der $MX1_{hoch}$ -Gruppe und 1,7 (SE: 0,3) bei $MX1_{niedrig}$ -Patienten (Abb. 7).

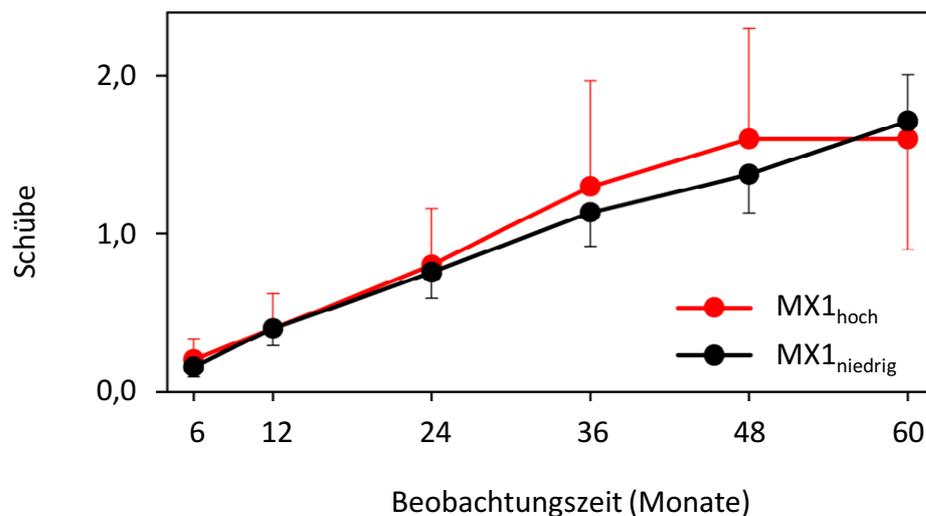
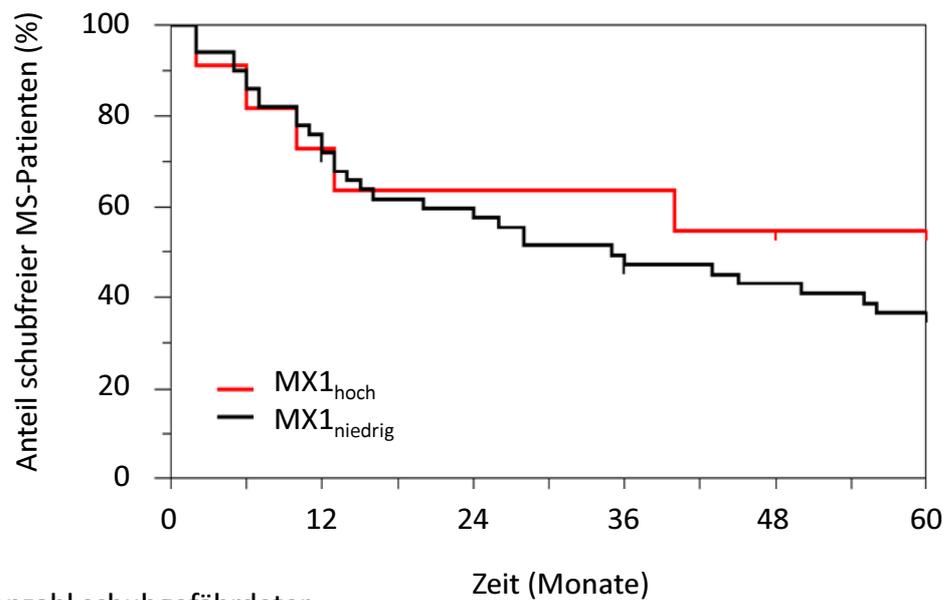


Abb. 7: Mittlere kumulative Schubanzahl der beiden Kohorten

Dargestellte Punkte zeigen die mittlere Schubanzahl seit Studienbeginn für $MX1_{hoch}$ -Patienten (rot, n=10) und $MX1_{niedrig}$ -Patienten (schwarz, n=45). Die Kurven der beiden Gruppen zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Entsprechende Ergebnisse lieferte auch die Analyse des schubfreien Überlebens in den beiden Patientengruppen. Die hierfür konstruierten Kaplan-Meier-Kurven der Kohorten $MX1_{hoch}$ und $MX1_{niedrig}$ zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf. Insbesondere während der ersten zwei Jahre war der Anteil an Patienten, die einen Schub erlitten, nahezu identisch. Nach fünf Jahren waren noch 5 der verbliebenen 10 $MX1_{hoch}$ -Patienten und 17 der 45 $MX1_{niedrig}$ -Patienten schubfrei. Über fünf Jahre betrachtet ergaben der Log-Rank-Test (p-Wert = 0,424) und die *Hazard-Ratio* (HR = 0,68; Konfidenzintervall: 0,27-1,76) keinen signifikanten Unterschied im Anteil schubfreier Patienten in den Kohorten (Abb. 8).



Anzahl schubgefährdeter
Patienten:

MX1 _{hoch} :	11	8	7	7	5	5
MX1 _{niedrig} :	50	35	28	22	20	17

Abb. 8: Schubfreies Überleben beider Patientengruppen

Die Kurven repräsentieren den Anteil an Patienten, die seit Studienbeginn keinen Schub erlitten. Absolute Patientenzahlen zeigt untenstehende Tabelle. Vertikale Striche entsprechen rechts-zensierten Studienabbruchern (n=3). Der Kurvenverlauf der beiden Patientengruppen (MX1_{hoch}: rot; MX1_{niedrig}: schwarz) stellte sich insbesondere während der ersten 18 Monate sehr ähnlich dar. Auch statistisch ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Des Weiteren wurden die EDSS-Werte als Maß des Behinderungsgrades zwischen den beiden Gruppen verglichen. Die Werte der einzelnen MS-Patienten zeigten hierbei erhebliche interindividuelle Unterschiede und zum Teil auch intraindividuelle Schwankungen über die Zeit. Bei Betrachtung der mittleren EDSS-Werte der beiden Kohorten ergab sich eine ähnliche Krankheitsprogression. Nach fünf Jahren waren die EDSS-Werte der MX1_{hoch}-Kohorte und der MX1_{niedrig}-Kohorte um durchschnittlich 0,85 bzw. 0,92 Punkte angestiegen (Abb. 9).

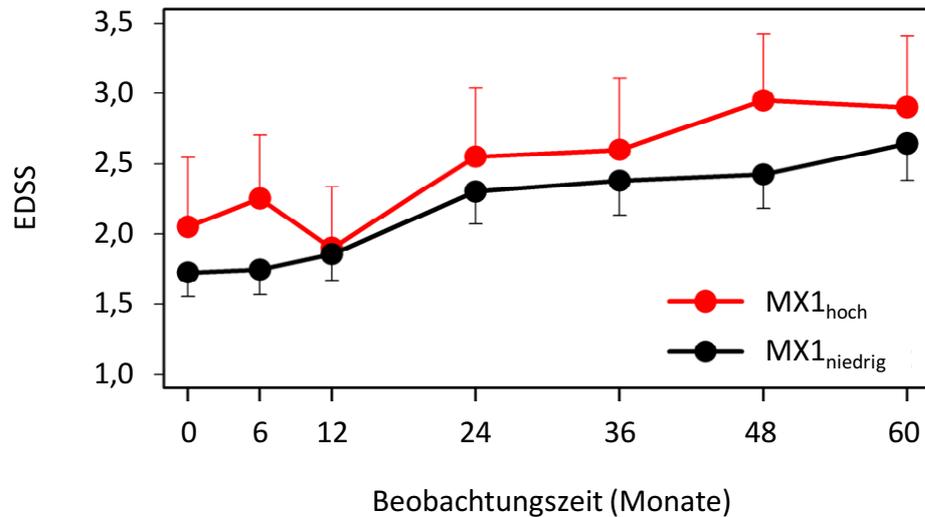


Abb. 9: EDSS-Mittelwerte im Zeitverlauf für beide Patientenkohorten

MX1_{hoch}-Patienten (rot, n=10) zeigten einen etwas höheren EDSS-Ausgangswert als MX1_{niedrig}-Patienten (schwarz, n=45). Dieser nicht signifikante Unterschied persistierte während des fünfjährigen Beobachtungszeitraums. Die Zunahme des Behinderungsgrades war nahezu identisch in beiden Kohorten. Standardfehler sind durch Fehlerbalken dargestellt.

4.2.2 Magnet-Resonanz-Tomographie

Der paraklinische Krankheitsverlauf wurde anhand von MRT-Befunden zwischen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} verglichen. Für insgesamt 46 MS-Patienten lagen Baseline- und Verlaufs-cMRT-Daten vor (MX1_{hoch}: n=10; MX1_{niedrig}: n=36). Die Zeitspanne zwischen beiden Untersuchungen war sehr inhomogen, betrug im Durchschnitt etwa vier Jahre (Mittelwert: 49 Monate, Standardabweichung: 22 Monate). Eine Übersicht der durchgeführten MRT-Untersuchungen zeigt Tab. A-4. Das Baseline-MRT stellte sich bei allen Patienten pathologisch dar. Im Verlauf blieben drei Patienten der MX1_{hoch}-Kohorte und 13 Patienten der MX1_{niedrig}-Gruppe bildmorphologisch progressionsfrei (p-Wert = 1,00), die übrigen Patienten zeigten unter Therapie eine Zunahme von MRT-Läsionen in mindestens einem Parameter (T2-Läsionen, T1-Läsionen, T1 mit KM, Atrophie). Bei Einzelparameteranalyse der MRT-Befunde unterschieden sich MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} in keinem Untersuchungszeitraum signifikant (Tab. A-5).

4.3 Therapiespezifischer Vergleich des klinischen Verlaufs in Abhängigkeit der endogenen MX1-Expression

Die klinischen Parameter Schubhäufigkeit und EDSS wurden noch einmal separat für die drei IFN- β -Präparate analysiert, um medikamentenspezifische Unterschiede zu evaluieren.

Bei Betrachtung der Schubraten zeigten sich hierbei deutliche Divergenzen. Alle i.m. IFN- β -therapierten MX1_{hoch}-Patienten waren über fünf Jahre komplett schubfrei, während die entsprechenden MX1_{niedrig}-Patienten durchschnittlich 1,6 Schübe erlitten. Im Gegensatz dazu zeigten in der Patientengruppe, welche mit s.c. IFN- β -1b behandelt wurde, MX1_{niedrig}-Patienten (mittlere Schubanzahl: 1,3) eine geringere Krankheitsaktivität als MX1_{hoch}-Patienten (mittlere Schubanzahl: 2,7). Die Fünf-Jahres-Schubrate der mit s.c. IFN- β -1a therapierten Patienten war in beiden Kohorten ähnlich (MX1_{hoch}: 2,7; MX1_{niedrig}: 3,0) (Abb. 10). Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse für die verschiedenen Präparate wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse vorgenommen, welche einen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den beiden Patientengruppen und den drei Medikamenten auf die Schubrate zeigte (p-Wert = 0,0002).

Auch die Analyse des schubfreien Überlebens ergab Unterschiede zwischen den IFN- β -Präparaten. Bei Patienten, welche s.c. IFN- β erhielten, waren die Zeiten von Therapiebeginn bis zum Auftreten des ersten Schubes in beiden Kohorten ähnlich. Hingegen gab es bei i.m. IFN- β -behandelten Patienten eine deutliche Abweichung zwischen der schubfreien MX1_{hoch}-Kohorte und der MX1_{niedrig}-Kohorte, die jedoch knapp oberhalb des Signifikanzlevels lag (p-Wert = 0,072, nach Log-Rank-Test) (Abb. A-1).

Bei separater Auswertung der EDSS-Werte ließ sich für keine Medikamentenform ein signifikanter Unterschied zwischen den EDSS-Änderungen der MX1_{hoch}-Gruppe und der MX1_{niedrig}-Gruppe feststellen. Allerdings lag der EDSS-Wert zu Studienbeginn deutlich niedriger bei i.m. IFN- β -Therapierten (mittlerer EDSS_{Baseline}: 1,0), als bei Patienten, denen s.c. IFN- β verordnet wurde (mittlerer EDSS_{Baseline}: 2,3) (Abb. 10). Es bestand kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Kohorten und den IFN- β -Präparaten auf den EDSS-Wert.

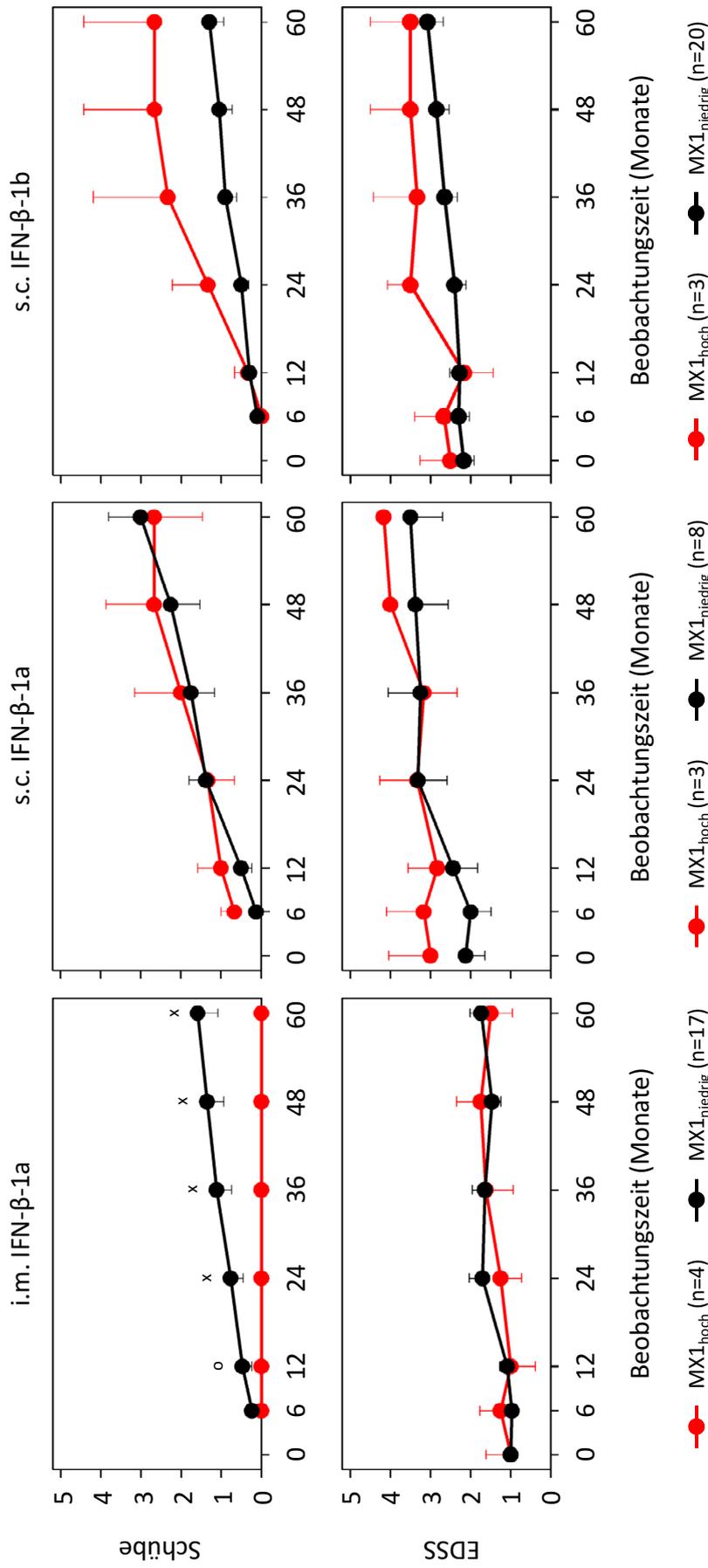


Abb. 10: Schubraten und EDSS-Veränderungen dargestellt für beide MX1-Kohorten und die drei Interferon-β-Präparate

Gemessen an der Schubrate zeigte sich eine erhöhte Baseline-MX1-Expression in der i.m. IFN-β-1a-Gruppe prognostisch günstig. In der s.c. IFN-β-1b-Gruppe hingegen erlitten MX1_{hoch}-Patienten (rot) mehr Schübe als MX1_{niedrig}-Patienten (schwarz). Bezüglich der EDSS-Progression unterschieden sich MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} bei keiner Medikamentenform. Der Baseline-EDSS-Wert lag jedoch bei i.m. IFN-β-1a-behandelten Patienten durchschnittlich niedriger und verhielt sich über fünf Jahre etwas stabiler als bei Patienten, die s.c. IFN-β-Präparate applizierten. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. ° p-Wert < 0,10; x p-Wert < 0,05 nach Welch-Test.

4.4 MX1-Expressionsänderung unter Interferon- β -Therapie

Für Vergleiche der Genexpression wurden nur s.c. IFN- β -therapierte Patienten eingeschlossen (Kapitel 3.7). Hiervon hatten sieben Patienten prätherapeutisch erhöhte MX1-Level und 30 Patienten gehörten zur Gruppe MX1_{niedrig}. Nach einem Monat unter IFN- β -Therapie blieben die MX1-Transkriptlevel der MX1_{hoch}-Kohorte relativ unverändert. MX1_{niedrig}-Patienten hingegen zeigten eine stark induzierte MX1-Expression (p-Wert: $1,9 \cdot 10^{-9}$), sodass die beiden Patientengruppen nach einem Monat ähnliche MX1-mRNA-Mengen exprimierten (Abb. 11).

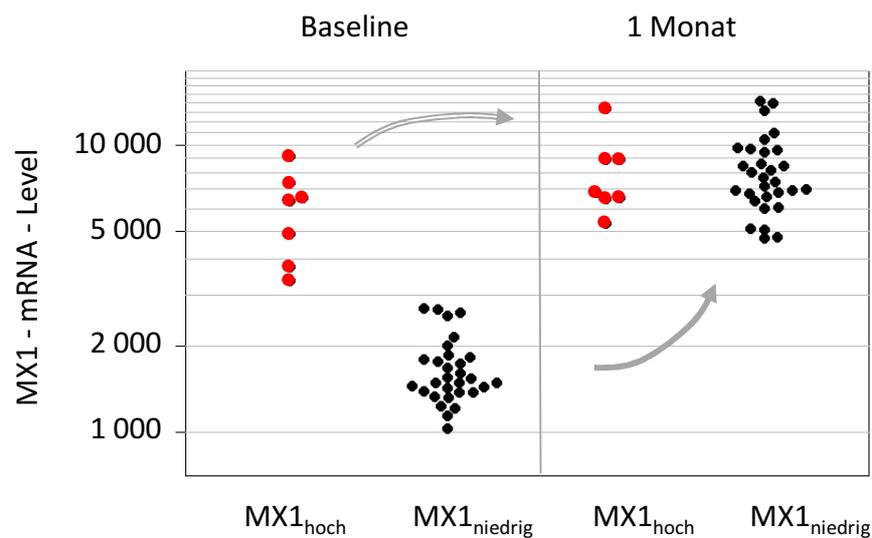


Abb. 11: Wirkung der Interferon- β -Therapie auf die MX1-Genexpression

Logarithmische Darstellung der individuellen MX1-mRNA-Level in PBMC von MX1_{hoch}-Patienten (rote Punkte, n=7) und MX1_{niedrig}-Patienten (schwarze Punkte, n=30) vor und nach einem Monat s.c. IFN- β -Therapie. Studienteilnehmer mit erhöhter endogener MX1-Baseline-Expression zeigten unter Therapie nur eine schwache Induktion der Genexpression. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten der MX1_{niedrig}-Kohorte eine signifikante Expressionssteigerung auf und erreichten nach dem ersten Therapiemonat MX1-Transkriptlevel, die vergleichbar waren mit denen der MX1_{hoch}-Gruppe.

Ein ähnliches Expressionsverhalten des MX1-Gens zeigte sich auch bei einzelner Betrachtung der beiden s.c. IFN- β -Präparate. Hingegen blieben bei i.m. IFN- β -therapierten Patienten die MX1-mRNA-Level der MX1_{niedrig}-Kohorte relativ unverändert, während die Transkription in MX1_{hoch}-Patienten abfiel (Abb. 12).

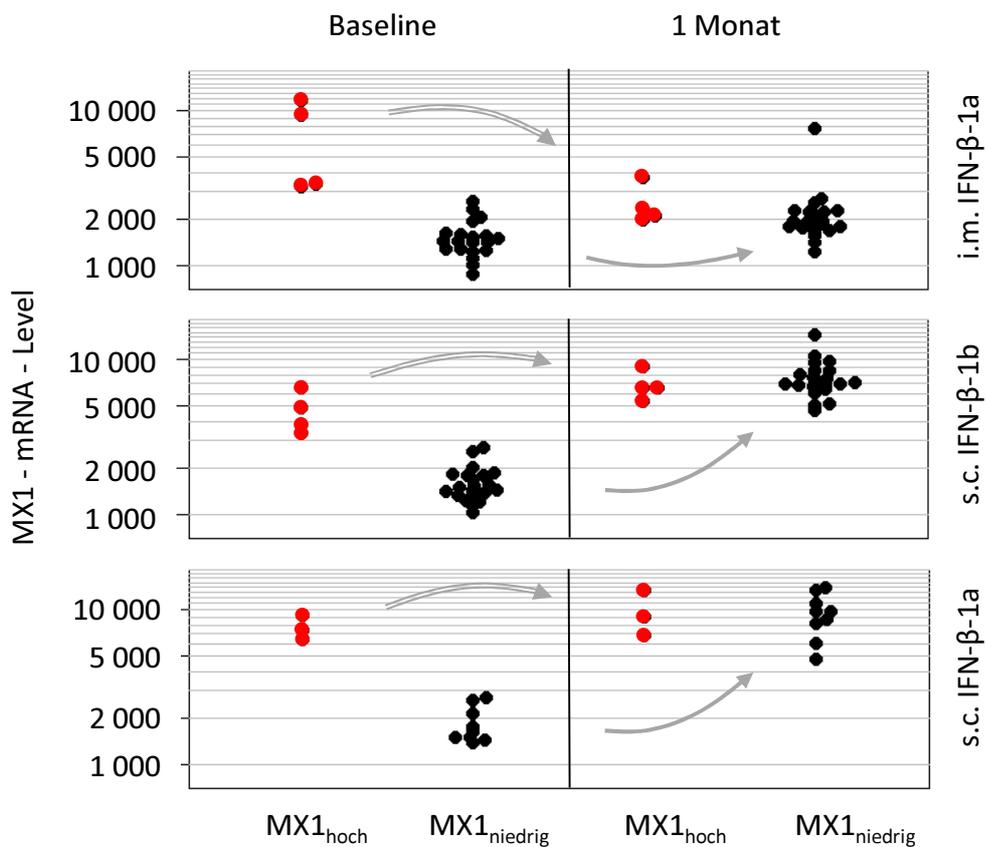


Abb. 12: MX1-Genexpression vor und nach einem Monat Interferon- β -Therapie dargestellt für beide MX1-Kohorten und die drei Interferon- β -Präparate

Nach einem Monat unter IFN- β -Therapie lagen die MX1-mRNA-Level der beiden Kohorten MX1_{hoch} (rot) und MX1_{niedrig} (schwarz) innerhalb jeder Präparategruppe auf vergleichbarem Expressionsniveau. Die Abbildung verdeutlicht jedoch, dass die MX1-Transkriptmengen bei i.m. IFN- β -behandelten Patienten unter Therapie deutlich geringer waren, als bei s.c. IFN- β -therapierten Patienten, wohingegen die prätherapeutischen Baseline-Level in allen drei Therapiegruppen ähnliche Verteilungen aufwiesen.

4.5 Analyse der physiologischen MX1-Expression bei Probanden

In den Genexpressionsdaten von Karlovich *et al.* fanden sich bei etwa einem Fünftel der Probanden zu Studienbeginn relativ erhöhte MX1-Transkriptlevel (5 von 22 Probanden) [182]. Dies entsprach ungefähr dem Anteil, der auch bei den MS-Patienten als MX1_{hoch} eingestuft wurde (11 von 61 Patienten). Darüber hinaus war das Expressionslevel der einzelnen Probanden über die Zeit stabil (Abb. 13). Die Höhe der MX1-Expression zu Studienbeginn korrelierte stark mit den gemessenen Leveln nach 6 Monaten (p-Wert = 0,00003). Zudem ergab die ANOVA-Analyse, dass die Varianz der Daten am besten durch interindividuelle Unterschiede erklärt werden kann (p-Wert = $3,6 \cdot 10^{-12}$), wohingegen die Effekte von Alter und Geschlecht nicht signifikant waren.

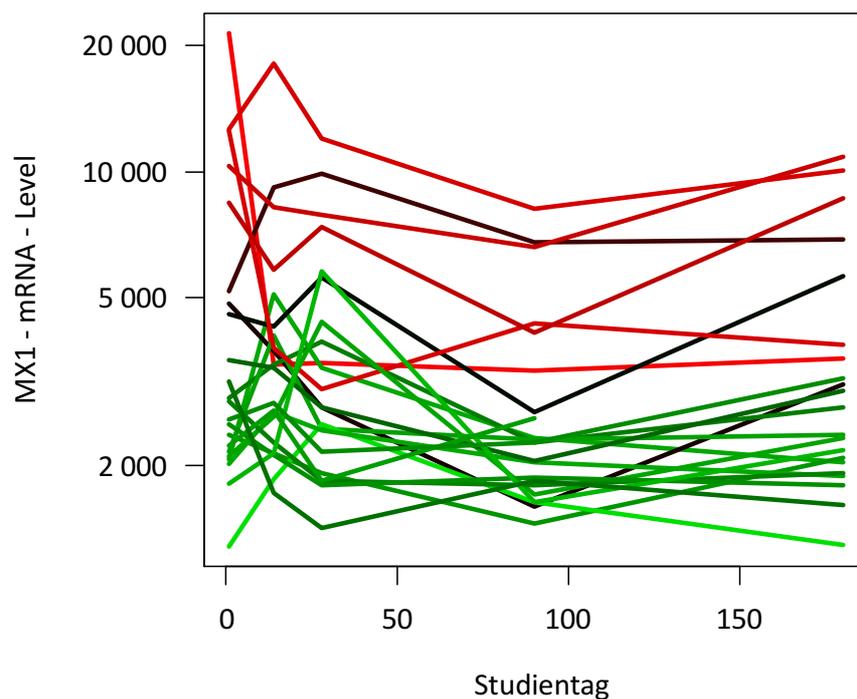


Abb. 13: Physiologischer Verlauf der MX1-Transkriptmengen bei Probanden

Linien repräsentieren den MX1-Expressionsverlauf einzelner Personen (n=22) über sechs Monate, wobei die Höhe der zu Studienbeginn gemessenen mRNA-Level farblich kodiert ist (rot: hohe MX1-Level >6000, schwarz: mittlere MX1-Level, grün: niedrige MX1-Level <4000). Probanden mit initial hohen MX1-Werten zeigten auch nach sechs Monaten hohe Werte (Spearman Rangkorrelationskoeffizient: 0,79, p-Wert = 0,00003). Zur Analyse wurden Genexpressions-Rohdaten von Karlovich *et al.* genutzt [182].

4.6 Interferon- β -Signalwege

Es konnten 43 Gene identifiziert werden, die in der Literatur wiederholt als Komponenten der IFN- β -assoziierten Signalwege beschrieben wurden. Zusätzlich wurde das Gen ZBP1 (*Z-DNA-Binding Protein 1*) in die Signalkaskaden integriert, da es einen intrazellulären DNA-Rezeptor kodiert, welcher mit der Fähigkeit zur Pathogen-unabhängigen IFN-Typ-I-Induktion im aktuellen Interesse der Autoimmunforschung steht [200, 201]. Entsprechend wurden auch die beiden Inhibitoren der IFN-Antwort, SOCS1 und SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*), eingearbeitet [202]. Diese Liste wurde durch zehn weitere Gene ergänzt, die redundant als bedeutende ISG und somit Ziel- und Effektorgene des IFN- β -Signalwegs genannt wurden, allen voran MX1. Diese insgesamt 56 resultierenden Gene und deren Interaktionen innerhalb der IFN- β -induzierenden und IFN- β -Effektor-Signalwege sind in Abb. 14 dargestellt und werden im Folgenden kurz vorgestellt. Im Rahmen der physiologischen Immunabwehr wird der IFN- β -Induktionsweg durch intrazelluläre und membrangebundene Rezeptoren angestoßen, sobald diese virale bzw. bakterielle Nukleinsäuren oder Hüllproteine erkennen [81]. Ebenso können abgebaute körpereigene Nukleinsäuren sowie extranukleäre endogene Doppelstrang-DNA – als Zeichen eines Zellschadens – zur Rezeptoraktivierung führen [185]. Das Signal zur Aktivierung der IFN- β -Transkription wird anschließend, je nach Rezeptor, über einen von zwei Hauptsignalwegen weitergeleitet. Die endosomalen Toll-like-Rezeptoren (TLR) TLR7, -8 und -9 aktivieren einen MyD88-abhängigen Signalweg mit den Signaltransduktoren IRAK4, IRAK1 und TRAF6. Letzterer wiederum führt mittels MAP3K7 (=TAK1) zur Phosphorylierung der drei Kinasen IKK, MAPK8 (=JNK) und MAPK14 (=p38), welche ihrerseits die entsprechenden Transkriptionsfaktoren NF κ B, JUN und ATF2 aktivieren. Der zweite Hauptsignalweg wird durch den endosomalen Rezeptor TLR3 sowie durch die zytoplasmatischen Rezeptoren IFIH1 (=MDA5), DDX58 (=RIG-I) und ZBP1 (=DAI) aktiviert. Über TRAF3 und TBK1/IKK ϵ führen diese zur Phosphorylierung der IFN-regulierenden Faktoren (IRF) IRF3 und IRF7, welche daraufhin Homo- und Heterodimere bilden und in den Nukleus translozieren. Es sei erwähnt, dass zur vollen Aktivierung von IRF3 eine zweite Phosphorylierung über TLR3-PIK3R1(=PI3K)-AKT1-IRF3 notwendig ist [81]. Der zellmembrangebundene Rezeptor TLR4 erkennt virale und bakterielle Hüllmoleküle und

kann beide Signalwege aktivieren, sowohl den MyD88-abhängigen, als auch den TRAF3-abhängigen Signalweg. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren binden schließlich an die Promotorregion des IFN- β -Gens und initiieren dessen Transkription [203]. Die beiden Signalwege sind jedoch nicht streng getrennt, vielmehr existieren mehrere Quervernetzungen zwischen dem MyD88-Signalweg und dem TRAF3-Signalweg. So kann TRAF6 als Komponente des MyD88-abhängigen Signalweges auch durch die Rezeptoren IFIH1 und DDX58 via MAVS (=IPS1) aktiviert werden sowie durch die Rezeptoren TLR3 und TLR4 via TICAM1 (=TRIF) [82, 192]. Im Gegenzug ist eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF7 durch IRAK1 via CHUK (=IKK α) möglich [81].

Sowohl endogen produziertes, als auch exogen injiziertes IFN- β bindet an den IFN- α/β -Rezeptor (IFNAR). Dieser setzt sich aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 mit den jeweilig gebundenen Kinasen TYK2 und JAK1 zusammen. Sobald dieser IFNAR-Komplex aktiviert wird, phosphoryliert er die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2, welche zusammen mit IRF9 heterotrimerisieren und den ISGF3-Komplex bilden (JAK/STAT-Signalweg). ISGF3 transloziert in den Nukleus und bindet dort an *Interferon-Stimulated Response Element* (ISRE), ein DNA-Motiv, welches in den Promotorregionen zahlreicher ISG gefunden werden kann. Aktivierte STAT-Proteine bilden untereinander auch Homo- und Heterodimere, die unabhängig von IRF9 als Transkriptionsfaktoren fungieren können [81].

Die Komplexität der IFN- β -Regulation wird durch mehrere positive und negative Rückkopplungs-Schleifen erhöht. So wird die Expression zahlreicher Rezeptoren, Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren innerhalb der Signalwege ihrerseits durch IFN- β induziert, wodurch die IFN-Antwort gesteigert wird. Als Beispiele seien IRF7, DDX58 und IFIH1 genannt [126, 187]. Die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase 1 (OAS1), als eines der zahlreichen IFN-stimulierten Gene, führt zur Aktivierung der Ribonuklease L (RNase L), welche zelluläre Einzelstrang-RNA degradiert. Die entstehenden kurzen RNA-Abschnitte können wiederum von den Rezeptoren IFIH1 und DDX58 gebunden werden und die IFN- β -Induktion wird weiter verstärkt [186, 190]. Im Sinne einer negativen Rückkopplung stimuliert der JAK/STAT-Signalweg die Transkription verschiedener SOCS-Gene, welche als Inhibitoren von TLR-Rezeptoren und JAK-Proteinen agieren und zudem den

IFNAR-Komplex für den proteasomalen Abbau markieren [81]. Das IFN-stimulierte Gen IFIT1 wirkt ebenfalls negativ auf die IFN-Antwort, indem es die allgemeine Proteinbiosynthese am Ribosom blockiert und somit die Translation von IFN- β sowie der IFN-stimulierten Gene hemmt [81, 126]. Eine Liste der Gene (Tab. A-6), sowie deren Interaktionen und die entsprechenden Literaturquellen (Tab. A-7) finden sich im Anhang.

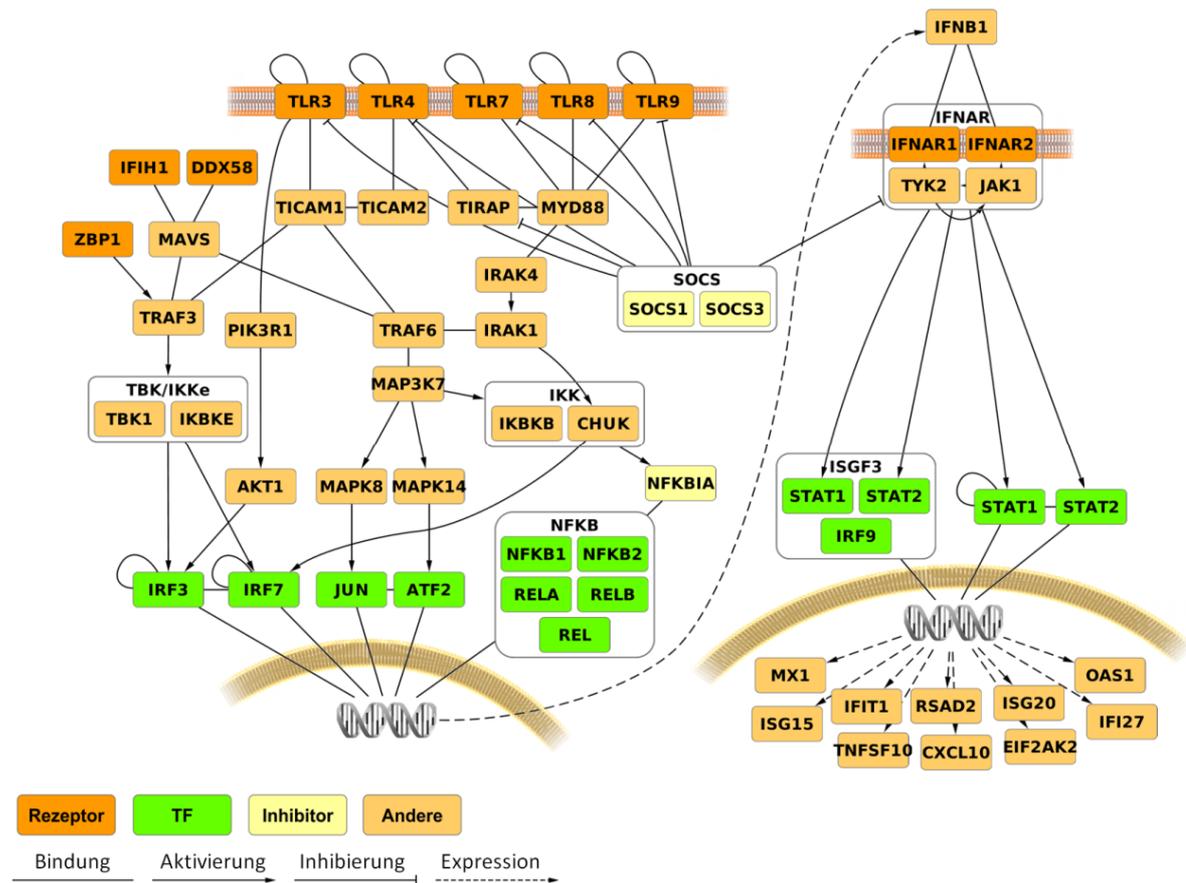


Abb. 14: Interferon- β -induzierende Signalwege (links) und Interferon- β -Effektor-Signalwege (rechts), vereinfachte Darstellung

Eine pathogenvermittelte Stimulation der endosomalen Rezeptoren TLR7, -8 und -9 führt über einen MyD88-abhängigen Signalweg zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren JUN, ATF2 und NF- κ B. Eine Aktivierung der intrazellulären Rezeptoren IFIH1, DDX58 und ZBP1 führt über den TRAF3-Signalweg zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7. Der zellmembrangebundene TLR4-Rezeptor kann beide Signalwege aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren initiieren anschließend im Nucleus die Transkription von IFN- β . IFN- β wiederum bindet den IFNAR-Rezeptorkomplex, wodurch STAT1 und -2 phosphoryliert werden. Diese bilden mit IRF9 den ISGF3-Komplex, welcher im Nucleus die Transkription zahlreicher ISG induziert. Zwischen den Signalwegen existieren mehrere Quervernetzungen. Positive und negative Rückkopplungsschleifen modulieren die IFN- β -Antwort. TF = Transkriptionsfaktor

4.7 Vergleichende Analyse der Expression von Interferon- β -Signalweg-Genen

Vorab konnte für kein analysiertes Gen eine signifikante Korrelation zwischen endogener Expressionshöhe zu Studienbeginn und den klinischen Baseline-Daten der Patienten nachgewiesen werden. Die mittlere prätherapeutische Expression aller 56 Signalweg-Gene wurde anschließend zwischen den Kohorten MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} verglichen. Hierbei waren in MX1_{hoch}-Patienten elf Gene signifikant stärker exprimiert. Höhere Transkriptlevel fanden sich für zytoplasmatische Rezeptoren (IFIH1), Transkriptionsfaktoren (IRF7, IRF9, STAT1) und für die meisten ISG. Andere Rezeptoren wie TLR7 und TLR8, aber auch DDX58 und ZBP1, sowie der Transkriptionsfaktor STAT2 zeigten ebenfalls erhöhte mRNA-Level in der MX1_{hoch}-Kohorte, jedoch mit p-Werten oberhalb des Signifikanzlevels von $\alpha = 0,01$ (Tab. A-8). Es konnte kein Expressionsunterschied für das IFN- β -Gen und seine Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 gefunden werden. Sämtliche Transduktionsproteine unterschieden sich ebenfalls kaum in ihrer Expression zwischen den beiden Kohorten (Abb. 15).

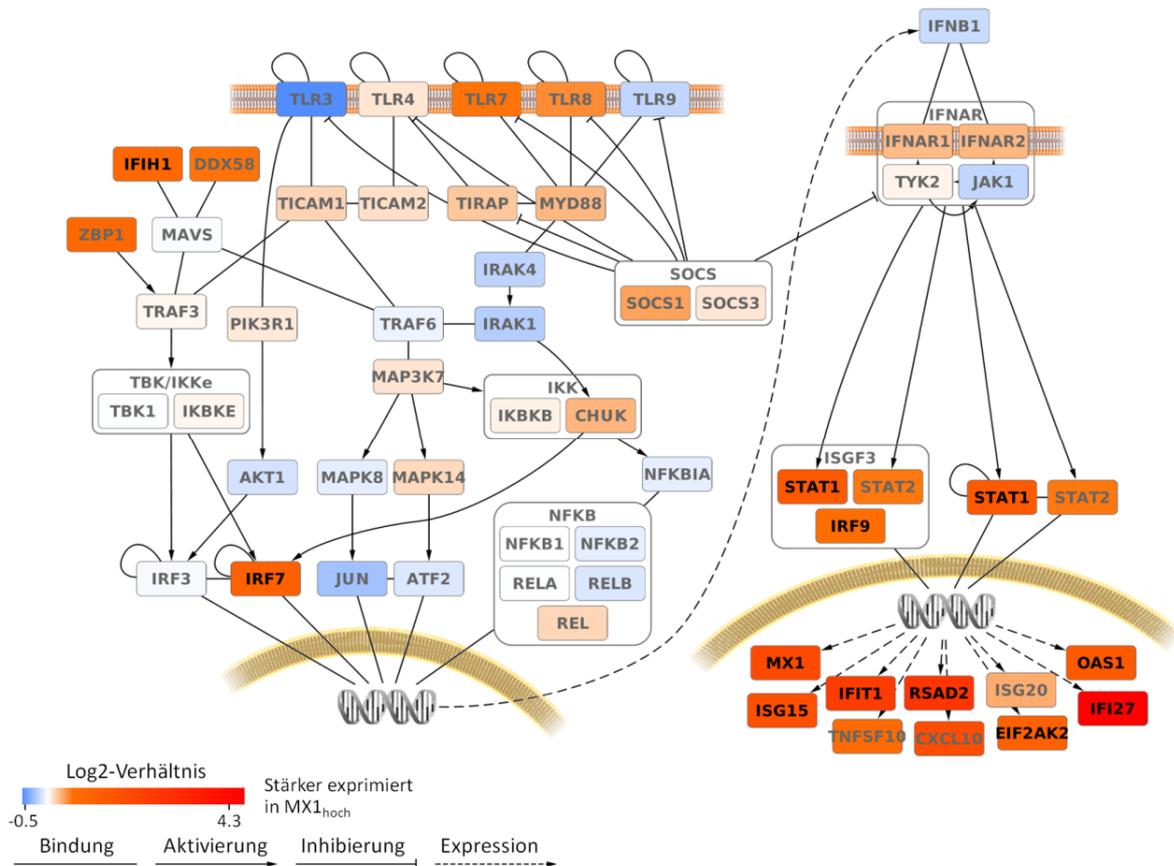


Abb. 15: Vergleich der Expression von Signalweg-Genen zwischen $MX1_{hoch}$ und $MX1_{niedrig}$ vor Therapiebeginn

Die Farbe jedes Gens entspricht dem mittleren Expressionsunterschied zwischen $MX1_{hoch}$ -Patienten ($n=7$) und $MX1_{niedrig}$ -Patienten ($n=30$). Schwarze Genbeschriftungen kennzeichnen signifikante Expressionsunterschiede. Höhere mRNA-Level der $MX1_{hoch}$ -Patienten zeigten sich für Rezeptoren (z.B. IFIH1), Transkriptionsfaktoren (IRF7, IRF9, STAT1) sowie für die meisten ISG. IFN- β selbst war nicht unterschiedlich exprimiert.

Nach einem Monat unter s.c. IFN- β -Therapie zeigte die $MX1_{hoch}$ -Gruppe für kein einziges Gen der Signalwege eine signifikante Änderung der Expressionsstärke (Abb. A-2). Lediglich die Transkription des Rezeptors TLR3, welcher zu Baseline relativ niedrige mRNA-Level aufwies, wurde nach einem Therapiemonat deutlich, jedoch nicht signifikant, induziert.

Im Gegensatz dazu waren in der MX1_{niedrig}-Gruppe nach einem Monat 25 der 56 Gene signifikant in ihrer Expression moduliert. Hiervon wurden unter Therapie 23 Gene hochreguliert und zwei (TLR9 und IRAK4) herabreguliert (Abb. 16). Bei den hochregulierten Genen waren alle diejenigen vertreten, die prätherapeutisch in MX1_{hoch}-Patienten signifikant erhöht waren.

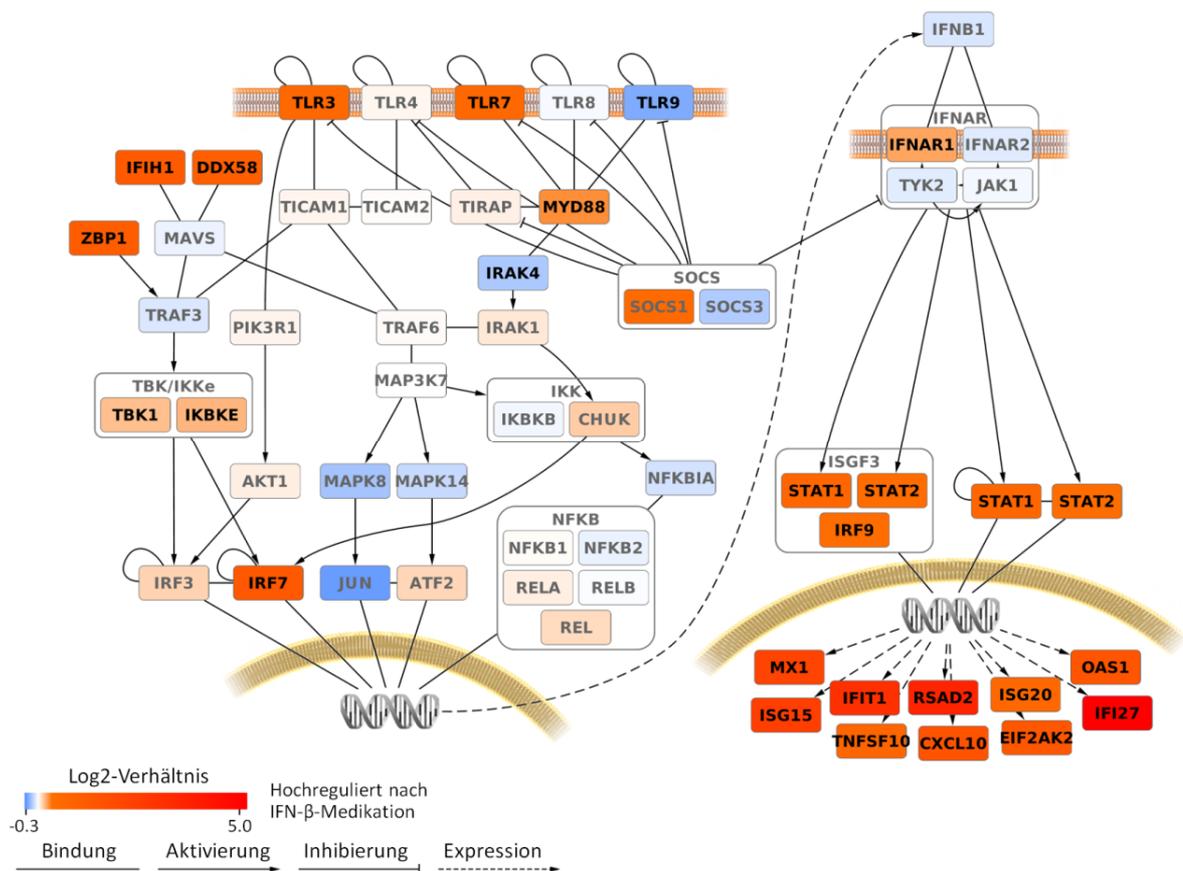


Abb. 16: Veränderungen der Expressionslevel von Signalweg-Genen in der MX1_{niedrig}-Kohorte nach einem Monat subkutaner Interferon-β-Therapie

Die Farbe der Gene zeigt das Log₂-Verhältnis der Expressionslevel vor Therapiebeginn und nach einem Monat Interferon-β-Therapie. Signifikante Expressionsänderungen sind durch schwarze Genbeschriftungen hervorgehoben. Insgesamt 23 Gene wurden als signifikant hochreguliert gefunden. Darunter waren alle Gene, die in MX1_{hoch}-Patienten prätherapeutisch höher exprimiert waren (Abb. 15, Tab. A-8). Die mRNA-Level zweier weiterer Gene (TLR9, IRAK4) waren unter Therapie signifikant reduziert.

Nach einem Monat unter s.c. IFN- β -Therapie bestand zwischen den beiden Kohorten kein Unterschied mehr in der Expression der Signalweg-Gene (Abb. A-3).

Eine Zusammenfassung der Expressionsunterschiede über die Zeit und zwischen den Kohorten zeigt Abb. 17. Eine Aufstellung aller Signalweg-Gene mit deren mittleren Expressionsleveln, sowie aller p-Werte der beschriebenen Vergleiche findet sich in Tab. A-8.

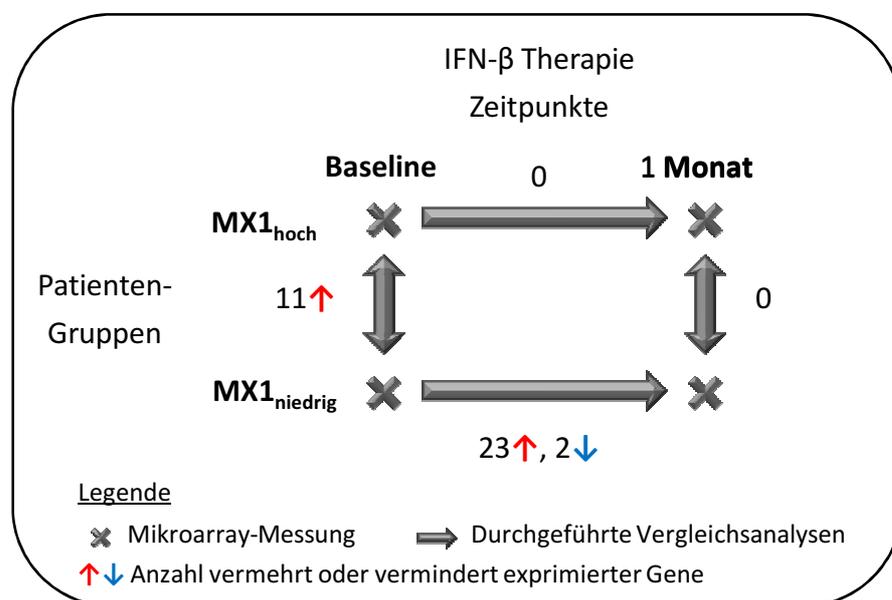


Abb. 17: Zusammenfassung der Expressionsunterschiede zwischen den Kohorten sowie der genregulatorischen Interferon- β -Therapieeffekte

Vor Therapiebeginn waren in MX1_{hoch}-Patienten elf Gene signifikant stärker exprimiert. Das Expressionsprofil dieser Patienten änderte sich unter s.c. IFN- β -Therapie nicht signifikant, wohingegen bei MX1_{niedrig}-Patienten 25 Gene therapeutisch hoch- bzw. herabreguliert wurden. Nach dem ersten Therapiemonat waren zwischen den beiden Patientenkohorten keine signifikanten Expressionsunterschiede mehr nachweisbar.

4.8 Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Für die Transkriptionsfaktoren der IFN- β -Signalwege fanden sich vorhergesagte Bindungsstellen in den regulatorischen DNA-Regionen zahlreicher anderer Signalweg-Gene, was die Komplexität der IFN- β -Regulation unterstreicht. Das Muster der potentiell durch IRF7, JUN, ATF2 und NF κ B regulierten Gene konnte jeweils nicht hinreichend das Muster der zu Baseline zwischen den Patientengruppen differentiell exprimierten Gene erklären. Auffällig hingegen war die TFBS-Analyse für den ISGF3-Komplex (*Transfac-Accession-Number*: M00258; *Transfac-Identifizier*: V\$ISRE_01), welche passende Bindungsstellen in den regulatorischen Bereichen von zehn der 56 Signalweg-Gene vorhersagte. Dabei zeigte sich eine Überlappung der vermutlich durch ISGF3-regulierten Gene, mit den Genen, die zu Baseline in MX1_{hoch}-Patienten überexprimiert waren. So enthielten die Promotoren der Rezeptor-Gene IFIH1, DDX58 und ZBP1 sowie erwartungsgemäß auch der ISG (CXCL10, ISG20) vorhergesagte DNA-Bindungsstellen für ISGF3. Zusätzlich zeigten sich bei Inhibitoren (SOCS1, SOCS3) und Transkriptionsfaktoren (IRF9, STAT2) passende Promotorbereiche, sodass ISGF3 positive und negative Rückkopplungsschleifen bildet. Beispielsweise wurden für den ISGF3-regulierten Transkriptionsfaktor IRF7 wiederum Bindungsstellen in den regulatorischen Bereichen von STAT1 und STAT2 (Komponenten des ISGF3-Komplexes) vorhergesagt. Diese Ergebnisse legen den Rückschluss nahe, dass eine Überexpression und vermehrte Aktivität des ISGF3-Komplexes assoziiert ist mit der erhöhten IFN-Typ-I-ähnlichen Aktivität bei einigen MS-Patienten. Eine Liste der Signalweg-Gene und TFBS zeigt Tab. A-9.

4.9 PCR-Validierung der Expressionsunterschiede

Für 14 der 56 Signalweg-Gene wurden die mRNA-Level zu beiden Zeitpunkten (Baseline, nach einem Monat) mittels qRT-PCR nachgemessen. Die Auswertung der PCR-Daten konnte dabei die Mikroarray-Resultate bestätigen. Trotz der langen, zwischenzeitlichen Probenlagerung, korrelierten die erhobenen Daten beider Messmethoden signifikant für alle Gene außer TLR9 (Tab. A-10).

Die PCR-Messungen wurden bei 44 der 61 MS-Patienten durchgeführt, wobei neun Patienten dem ursprünglichen MX1_{hoch}-Kollektiv entstammten. Wie in den Mikroarray-Daten, zeigten MX1_{hoch}-Patienten zu Baseline höhere MX1-Level (C_T -Mittelwert: 25,27; SE: 0,31) als MX1_{niedrig}-Patienten (C_T -Mittelwert: 27,84; SE: 0,08).

Von den 44 Patienten, für die PCR-Messungen erfolgten, wurden 26 Patienten mit s.c. IFN- β therapiert (MX1_{hoch}: n=5, MX1_{niedrig}: n=21). Vor Therapiebeginn wiesen MX1_{hoch}-Patienten signifikant höhere Expressionslevel der Signalweg-Gene MX1, MyD88, RSAD2, STAT1 und STAT2 auf. Unter Therapie änderten sich die Expressionslevel der MX1_{hoch}-Kohorte nicht signifikant, wohingegen bei MX1_{niedrig}-Patienten 10 der 14 nachgemessenen Gene signifikant hochreguliert wurden. Nach einem Monat zeigten die PCR-Daten keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} (Tab. A-11). Trotz der geringeren Kohortengröße bestätigten somit die PCR-Messungen die Expressionsunterschiede und –veränderungen aus der Mikroarray-Analyse.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der physiologischen Bedeutung einer prätherapeutisch erhöhten endogenen IFN-Typ-I-ähnlichen Aktivität und ihrer prognostischen Relevanz bezüglich des klinischen Krankheitsverlaufs. Ferner wurden molekulare Ursachen einer individuell verstärkten endogenen IFN-Typ-I-ähnlichen Aktivität sowie genregulatorische Effekte einer IFN- β -Therapie evaluiert.

Hierfür wurden longitudinale Mikroarray-Transkriptomdaten zu PBMC von 61 RRMS-Patienten zu zwei Zeitpunkten – vor Initiierung einer IFN- β -Therapie sowie nach dem ersten Therapiemonat – analysiert. Dies stellt den aktuell größten publizierten Genexpressionsdatensatz zu RRMS-Patienten dar [139, 151]. Die Transkriptionsdaten wurden mit dem langfristigen klinischen Verlauf unter Therapie korreliert.

Etwa ein fünftel der untersuchten MS-Patienten zeigte vor IFN- β -Therapiebeginn erhöhte mRNA-Level des MX1-Gens. Über den fünf- bzw. siebenjährigen Beobachtungszeitraum ergab sich jedoch kein unterschiedlicher klinischer bzw. paraklinischer Verlauf zwischen Patienten mit niedriger und hoher Baseline-MX1-Expression. Weder die durchschnittliche Anzahl von Schüben, noch die EDSS-Zunahme oder der bildmorphologische Verlauf unter Therapie unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen.

5.1 Patientenkollektiv

Die untersuchte Kohorte von 61 RRMS-Patienten ist sowohl demographisch, als auch klinisch eine repräsentative Patientenpopulation. Die Patienten waren zu Studienbeginn und somit Therapiebeginn im Durchschnitt $37,6 \pm 10,1$ Jahre alt (mittleres Alter bei Diagnosestellung: $36,8 \pm 10,1$ Jahre). Der Anteil weiblicher Patienten betrug 68,9 %. Dies deckt sich mit demographischen Daten des deutschen MS-Registers zu 5445 MS-Patienten [204]. Hier erfolgte die Diagnosestellung durchschnittlich im Alter von $34,8 \pm 10,7$ Jahren und der weibliche Patientenanteil lag bei 72 %.

Während des fünfjährigen klinischen Beobachtungszeitraums der vorliegenden Studie konnten 55 der 61 MS-Patienten regelmäßig an der Klinik für Neurologie der Universität

Rostock nachuntersucht werden. Die Daten dieses außergewöhnlich langen Beobachtungszeitraums sind schwer mit anderen Studien zu vergleichen, da Patienten meist nur über zwei Jahre nachverfolgt wurden. Die mittlere jährliche Schubrate der Rostocker Kohorte betrug über die ersten zwei Jahre unter Therapie 0,38 und war somit niedriger als in den zweijährigen Zulassungsstudien der IFN- β -Präparate (0,61-0,87) [93, 94, 96, 97]. Jedoch lag die Schubrate schon vor Therapiebeginn (0,9) unter den entsprechenden Raten der genannten Studien ($> 1,0$). Der Anteil schubfreier Patienten nach zweijähriger IFN- β -Applikation (58 %) war größer als in den Zulassungsstudien (29-38 %). Der mittlere EDSS-Wert der Rostocker Patienten betrug vor Therapiebeginn 1,8 und stieg binnen zwei Jahren um 0,6 Punkte. Im Vergleich wies eine ab 1995 von Rio *et al.* rekrutierte, große Kohorte Therapie-naiver RRMS-Patienten vor Therapieinitiierung (EDSS_{Baseline}: 2,2) und nach zweijähriger IFN- β -Therapie (EDSS-Anstieg: 1,0 Punkte) höhere Werte auf [121]. Sowohl vor als auch unter IFN- β -Therapie zeigte die MS-Kohorte der vorliegenden Arbeit somit etwas geringere klinische Krankheitsaktivität als die vorgenannten Studienpopulationen. Patienten heutiger Studien befinden sich typischerweise in einem klinisch früheren bzw. milderen Krankheitsstadium als die Studienpopulationen zu Zeiten der Zulassung von IFN- β Mitte der 90er Jahre [205, 206]. Dies erklärt sich möglicherweise durch neue Therapierichtlinien, wonach MS-Patienten in zunehmend früheren Krankheitsstadien immunmodulatorisch therapiert werden [50, 207]. Die Patienten der vorliegenden Arbeit wurden auf Basis der McDonald-Kriterien von 2001 diagnostiziert [38]. Unter Anwendung der aktuellen Kriterien von 2010 wären die Patienten womöglich früher diagnostiziert und rekrutiert worden und würden zum Initiierungszeitpunkt der immunmodulatorischen Therapie eventuell noch geringere EDSS-Werte aufweisen [40].

Die Rate an Therapieabbrechern über fünf Jahre lag in der Rostocker Kohorte bei 32,8 %. Studien mit vergleichbar langen Nachbeobachtungszeiten berichten Abbrecherraten bei RRMS-Patienten von unter 13,5 % bis über 67 % [208-210]. Diese starken Schwankungen lassen sich u.a. durch unterschiedliche Definitionen eines Therapieabbruchs erklären (Beendigung jeglicher DMT *versus* Wechsel der Medikation, wie in vorliegender Studie). Hauptgründe für einen Therapieabbruch oder -wechsel sind Nebenwirkungen und eine

mangelnde, subjektiv empfundene Wirksamkeit [208, 211]. Eine engmaschige Patientenbetreuung und die Qualität des Arzt-Patienten-Verhältnisses kann die Adhärenz entscheidend beeinflussen [212, 213]. Insbesondere sollten realistische Vorstellungen bezüglich zu erwartender Wirkungen und Nebenwirkungen thematisiert werden [214]. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Adhärenz ist die Entwicklung neuer anwendungsfreundlicherer und nebenwirkungsärmerer Medikamente. Mit diesem Ziel werden aktuell pegylierte IFN- β -Präparate erforscht, welche seltenere Injektionen versprechen [215]. Zudem erfolgte kürzlich die Zulassung für zwei peroral applizierbare immunmodulatorische Basistherapeutika bei MS (Dimethylfumarat, Teriflunomid) [216, 217]; langfristige Wirksamkeits- und Verträglichkeitserfahrungen bleiben jedoch abzuwarten.

5.2 Diskussion der angewandten Methodik

5.2.1 Probengewinnung und -untersuchung

Die in diese Studie analysierten Transkriptom-Daten wurden aus der PBMC-Fraktion peripherer Blutproben erhoben. Hierdurch waren *in vivo* Messungen der aktuellen transkriptionellen Vorgänge in Immunzellen von MS-Patienten möglich. Die Untersuchung peripherer Immunzellen erlaubt Rückschlüsse über die kausalen Initiierungs- und Regulationsvorgänge der autoaggressiven Immunreaktion im Rahmen der MS. Alternative Analysen des ZNS-Parenchyms oder des Liquor cerebrospinalis beleuchten hingegen das Ziel und somit die Folgen dieser pathologischen Immunreaktion. Die komplikationsarme und minimalinvasive Zugänglichkeit von Blutproben erlaubte serielle Untersuchungen an einer großen Kohorte, was bei der Analyse zerebralen Materials schwierig und aufgrund der Invasivität kritisch abzuwägen ist.

PBMC stellen einen guten Kompromiss zwischen einer umfassenden, jedoch undifferenzierten Abbildung zirkulierender, pathogenetisch relevanter Zellpopulationen (Vollblut) und der sensitiveren, jedoch lediglich ausschnitthaften Analyse einzelner Akteure des Immunsystems dar. Granulozyten-RNA und erythrozytäre Globin-RNA überlagern bei der Vollblut-Expressionsmessung aufgrund ihres großen Mengenanteils die

Expressionsunterschiede kleinerer Leukozytenpopulationen [218]. Die Analyse einzelner (Sub-) Populationen, beispielsweise T-Lymphozyten (z.B. CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten), erlaubt hingegen sensitive, gezielte Aussagen, ignoriert dafür jedoch pathophysiologische und therapeutische Transkriptionsvorgänge anderer Immunkomponenten. Daher ist die Untersuchung von PBMC insbesondere für Transkriptomanalysen bei Autoimmunerkrankungen gängige Praxis [139]. In nachfolgenden Studien wäre eine Untersuchung einzelner Zellpopulationen sicherlich interessant, da sich die Expression einzelner Gene zum Teil erheblich zwischen den verschiedenen Populationen unterscheidet [219]. In diesem Zusammenhang bieten sich insbesondere Monozyten an, da Comabella *et al.* zeigten, dass sich eine endogene IFN-Typ-I-ähnliche Aktivität womöglich vorwiegend in dieser pathophysiologisch relevanten Zellpopulation manifestiert [164, 166].

Die RNA-Messung mittels etablierter Mikroarray-Technik erlaubte effiziente, reproduzierbare und vergleichbare Expressionsmessungen. Dies gab Auskunft über die Aktivität von mehr als 17.000 Genen zu verschiedenen Zeitpunkten. Als Zwischenprodukt von Genen und Proteinen spiegelt die mRNA Expressionsdynamiken wider und erlaubt zu einem gewissen Grad Rückschlüsse auf die entsprechenden Proteinmengen [138]. Direkte Proteinanalysen könnten weitere Folgerungen zulassen, allerdings sind Protein-Screening-Methoden wie Protein-Arrays aber auch Massenspektrometrie oder 2-D-Gel-elektrophorese bislang in ihrer Sensitivität und Spezifität nicht mit der Mikroarray-Technik vergleichbar. Ein generelles Problem von RNA-basierten Biomarkern ist, dass die individuelle Gentranskription durch zahlreiche exogene und endogene Faktoren beeinflusst wird (z.B. Alter, Geschlecht, Genotyp, Umwelteinflüsse, Ernährungsgewohnheiten), was zu einer erhöhten Varianz der Daten führen kann [131]. Jedoch wurden in der vorliegenden Studie longitudinale Daten mit einmonatigem Intervall ausgewertet, sodass diese Faktoren nur einen geringen Einfluss auf die Expressionsvergleiche über die Zeit hatten, da eine Statistik für verbundene Stichproben berechnet wurde. Eine spezielle Herausforderung der Transkriptomanalyse stellt die Instabilität der Transkripte dar [138]. Um die mRNA-Degradation zu minimieren wurde auf zügige und standardisierte Probengewinnung und -analyse geachtet.

Die hier ausgewerteten Genexpressionsmessungen erfolgten mit der Oligonukleotid-Mikroarray-Technik, welche den Goldstandard zur genomweiten Erfassung von Expressionsmustern darstellte. Die alternative PCR-Methode ist zwar insbesondere bei niedrigexprimierten Genen deutlich sensitiver, jedoch nicht für die Expressions-Messung einer großen Anzahl von Genen geeignet. Aus diesem Grund wurde die qRT-PCR in den vorliegenden Daten gemäß gängiger Empfehlungen zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse eingesetzt [220]. Kürzlich wurde eine neue Affymetrix® Chip-Generation (*Human Transcriptome Array 2.0*) mit aktualisierter Gen-Annotation vorgestellt, welche erheblich mehr Transkripte erfasst und zudem Sonden zur Detektion von Exon-Exon-Übergängen enthält, wodurch die Messung alternativ gespleißter mRNA ermöglicht wird [221]. Darüber hinaus sind in den letzten Jahren aus der rapiden Weiterentwicklung der Genom-Sequenzierungstechnik neue alternative Methoden zur genomweiten Expressionsmessung hervorgegangen, welche jedoch erst nach Erhebung der vorliegenden Daten kommerziell verfügbar wurden [222, 223]. Die verschiedenen Formen der „massiven parallelen Sequenzierung“ basieren nicht auf der Hybridisierung an vorgefertigte Sonden, wodurch prinzipiell eine ergebnisoffene Analyse ohne Vorkenntnis über die zu messende RNA ermöglicht wird. Hierdurch können auch Einzelnukleotid-Polymorphismen, Genmutationen und bislang unbekannte RNA-Signaturen mit erfasst werden [224, 225]. Diese Techniken sind aktuell noch sehr zeit- und kostenintensiv. Die hier verwendete Mikroarray-Technik ist in Bezug auf die methodische Erfahrung und Standardisierung sowie die ausgereifte statistische Datenauswertung den Sequenzierungstechniken noch immer überlegen und bis heute eine qualitativ vergleichbare Standardmethode zur Transkriptomerfassung [226-228]. Zukünftige Studien könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mittels neuerer und verbesserter Techniken verifizieren und insbesondere unterschiedlich gespleißte Varianten der IFN- β -Signalweg-Gene als mögliche Ursache der unterschiedlichen IFN-Typ-I-ähnlichen Aktivität berücksichtigen.

5.2.2 Analyse der Interferon- β -Signalwege

Bei der Analyse der molekularen Ursachen einer individuell unterschiedlichen endogenen MX1-Expression wurde ein Fokus auf die IFN- β -assoziierten Signalwege gelegt. Die

Literatur zu diesen Signalwegen variiert häufig im Kontext unterschiedlicher Pathologien und Datenbanken sind nicht zwangsläufig auf dem aktuellen Stand der rasch voranschreitenden Forschung. Daher wurden diese Signalwege eigens anhand der aktuellen Literatur erstellt. Eine besondere Herausforderung stellt hierbei die Abgrenzung zu anderen Signalwegen dar, da zahlreiche Interaktionen sowie gemeinsame Gene und Teilstrecken bestehen. Um die relevanten und wissenschaftlich gesicherten Hauptakteure zu filtern wurden zur Signalweg-Konstruktion nur Gene berücksichtigt, die mehrfach in Reviews publiziert wurden und in direktem Zusammenhang mit den IFN- β -Signalwegen stehen [170].

Zur Analyse der genregulatorischen Interaktionen innerhalb der IFN- β -Signalwege wurden *in silico* Vorhersagen bezüglich evolutionär konservierter TFBS in den Promotorregionen der beteiligten Signalweg-Gene verwendet. Diese basieren auf einem Vergleich der Basenabfolge des zu untersuchenden Promotorbereichs mit bekannten TF-Bindemotiven. Zur Reduktion falsch positiver Sequenzübereinstimmungen, im Sinne von funktionslosen Bindestellen, wurden nur solche TFBS berücksichtigt, die evolutionär zwischen Mensch, Maus und Ratte konserviert sind und daher mit höherer Wahrscheinlichkeit regulatorische Funktionen besitzen [199]. Limitiert ist die Methode dadurch, dass phylogenetisch „neue“ TFBS nicht erfasst werden [229]. Zudem werden die räumliche Struktur und Zugänglichkeit der DNA-Bereiche nicht berücksichtigt. Daher wären zukünftig TFBS-Vorhersagemethoden nützlich, welche z.B. Nukleosomen-Positionen einbeziehen. Experimentelle Daten zu TFBS sind aufwendig zu erheben und bislang rar, wären jedoch zur Validierung der hier beschriebenen genregulatorischen Wechselwirkungen optimal, da sie auch die zahlreichen *in vivo* Einflüsse auf TF-DNA-Interaktionen abbilden können – beispielsweise die dreidimensionale Struktur von TF und Chromatin sowie Histon-Modifizierungen und Methylierungsstatus der DNA [230-233].

5.2.3 Beurteilung des Krankheitsverlaufs

Zur klinischen und paraklinischen Beurteilung des individuellen Krankheitsverlaufs wurden Schübe, EDSS-Werte und MRT-Befunde als Maß herangezogen [122]. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst eine prospektive Herangehensweise gewählt, indem die Kohorten

zu Baseline entsprechend ihrer endogenen MX1-Expression eingeteilt wurden und der anschließende klinische Verlauf verglichen wurde. Andere Arbeitsgruppen gruppierten ihre Patienten retrospektiv gemäß dem klinischen oder paraklinischen Verlauf in *Therapie-Responder* und *Non-Responder* bzw. Patienten mit gutem oder ungünstigem klinischen Verlauf unter Therapie und verglichen deren prätherapeutische Genexpression [152, 164, 166, 234]. Dies kann jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, da es bislang keine einheitliche Definition für *Therapie-Response* und *Non-Response* gibt. Typischerweise erfolgt die Beurteilung des Therapieansprechens anhand von Schubaktivität und EDSS-Progression, ggf. auch anhand der Veränderungen im MRT – genaue Definitionen sind jedoch Gegenstand einer fortwährenden Kontroverse [121, 235].

Die MS ist eine chronische, äußerst variabel verlaufende Erkrankung und heutige immunmodulatorische Pharmaka vermögen den Krankheitsverlauf meist nicht zu stoppen, sondern lediglich zu verlangsamen. Ein erneuter Schub bedeutet demnach nicht automatisch, dass der Patient nicht auf die Therapie anspricht und sollte nicht zwangsläufig zum Therapieabbruch oder -wechsel führen [207]. Daher ist es eine besondere Herausforderung, für den individuellen Patienten eine gute oder unzureichende Therapiewirkung zu definieren. Dies unterstreicht den großen Bedarf an prognostischen und therapeutischen Biomarkern um den Krankheitsverlauf unter Therapie vorhersagen und kontrollieren zu können.

5.3 Klinischer und paraklinischer Verlauf in Abhängigkeit der endogenen MX1-Expression

Beim Vergleich des klinischen Verlaufs zwischen Patienten mit hoher und niedriger endogener MX1-Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied der kumulativen Schubereignisse. Die Fünf-Jahres-Schubrate betrug 1,6 (SE: 0,7) in der MX1_{hoch}-Gruppe und 1,7 (SE: 0,3) bei MX1_{niedrig}-Patienten. Auch die Zeit bis zum Auftreten eines ersten Schubes unter Therapie war in beiden Kohorten ähnlich. Nach fünf Jahren verblieben 5 von 10 MX1_{hoch}-Patienten und 17 von 45 MX1_{niedrig}-Patienten komplett schubfrei, was keinen signifikanten Unterschied darstellte (p-Wert = 0,42). Im Gegensatz dazu ergab eine Studie von van der Voort *et al.*, dass eine hohe MX1-Expression prädiktiv sei für eine

längere Zeitspanne bis zu einem erneuten Schub [168]. In besagter Studie wurde jedoch nur bei 47 % der initial Therapie-naiven Patienten während des Beobachtungszeitraums eine immunmodulatorische Therapie gestartet. Bei alleiniger Betrachtung der therapierten Patienten zeigten sich keine unterschiedlichen MX1-Level zwischen *Respondern* und *Non-Respondern*. Zudem analysierten van der Voort *et al.* Vollblutproben, was ebenfalls zu abweichenden Ergebnissen geführt haben könnte.

In den letzten Jahren werden Schübe zunehmend differenzierter betrachtet und entsprechend ihrer Dauer, Intensität, Rückbildung, sowie des GCS-Ansprechens weitergehend untergliedert und quantifiziert. Für eine noch detailliertere Analyse sollte dies bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden [207].

Der Vergleich der EDSS-Progression zwischen den beiden Kohorten ergab eine nahezu identische Zunahme des Behinderungsgrades. Nach fünf Jahren waren die EDSS-Werte der MX1_{hoch}-Gruppe und der MX1_{niedrig}-Gruppe um durchschnittlich 0,85 bzw. 0,92 Punkte angestiegen. Trotz großer individueller Schwankungen der EDSS-Werte innerhalb beider Patientengruppen, war die mittlere Progression beider Kohorten vergleichbar. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Hesse *et al.*, die keinen prätherapeutischen Unterschied der MX1-Expression zwischen Patienten mit gutem und schlechtem klinischen Verlauf unter IFN- β -Therapie fanden [236]. Bustamante *et al.* zeigten hingegen eine erhöhte endogene IFN-Typ-I-Gensignatur in Monozyten von klinischen *Non-Respondern* [165]. Dies ist schwer mit den vorliegenden Expressionsmessungen in PBMC zu vergleichen, da unterschiedliche Immunzellpopulationen untersucht wurden.

Limitiert ist die Interpretation der klinischen Verlaufsdaten dadurch, dass die Patienten im Laufe der Langzeitbehandlung nicht systematisch auf NAb getestet wurden, da zum Zeitpunkt der Studie noch kein Konsens über Testmethoden und klinische Relevanz der NAb bestand. Die Expressionsmessungen bleiben hiervon unberührt, da NAb erst nach mehrmonatiger Therapie auftreten, jedoch könnte die therapeutische Wirkung bei einigen Patienten reduziert worden sein [112, 113]. Aktuelle Empfehlungen sehen reproduzierbare NAb-Bestimmung nach circa 12 monatiger IFN- β -Therapie vor [237].

In der vorliegenden Arbeit wurde der klinische Krankheitsverlauf unter Therapie beurteilt. Dieser wird sowohl durch die individuelle, natürliche Krankheitsaktivität, als auch durch das individuelle Therapieansprechen bestimmt. Aus den vorliegenden Daten lassen sich diese zwei Teilaspekte nicht voneinander abgrenzen. Zur Differenzierung des Therapieeffektes und der Krankheitsaktivität müssten Verlaufsparemeter vor Behandlungsbeginn berücksichtigt werden. Da das Patientenkollektiv gemäß aktueller Richtlinien frühzeitig auf eine IFN- β -Therapie eingestellt wurde, stehen jedoch in der Mehrzahl der Fälle keine prätherapeutischen Langzeitbefunde zur Verfügung [50, 69, 97]. Die durchschnittliche Zeit von Diagnosestellung bis zur Einleitung einer Pharmakotherapie betrug etwa 10 Monate.

Man beachte, dass die Zeitspanne seit Diagnosestellung bei MX1_{hoch}-Patienten im Durchschnitt etwas kürzer war ($2,4 \pm 2,4$ Monate) als bei MX1_{niedrig}-Patienten ($11,6 \pm 26,6$ Monate), obgleich nicht signifikant (p -Wert = 0,26). Zudem wiesen MX1_{hoch}-Patienten zu Baseline etwas höhere EDSS-Werte auf (EDSS_{Baseline}: 2,0) als MX1_{niedrig}-Patienten (EDSS_{Baseline}: 1,7). Vor immunmodulatorischer Therapie erreichten MX1_{hoch}-Patienten folglich in durchschnittlich kürzerer Zeit einen etwas stärkeren Behinderungsgrad und auch die Schubrate im Jahr vor Therapie war etwas höher (MX1_{hoch}: 1,2, MX1_{niedrig}: 0,9). Dies könnte womöglich einen aggressiveren natürlichen Krankheitsverlauf der MX1_{hoch}-Patienten andeuten. Im Widerspruch hierzu beschrieben Hesse *et al.* bei unbehandelten MS-Patienten eine indirekte negative Korrelation zwischen der MX1-Expression und der Anzahl aktiver MRT-Läsionen [169]. Jedoch konnten sie keinen Zusammenhang zu klinischen Verlaufsparemetern zeigen. Sicherlich wäre eine zukünftige Untersuchung der prätherapeutischen Krankheitsverläufe in Abhängigkeit der MX1-Expression mit einer längeren therapiefreien Beobachtungszeit aufschlussreich, jedoch aufgrund der Vorenthaltung der Pharmakotherapie aus ethisch-moralischen Gründen nicht durchführbar.

Die klinischen Langzeitverläufe der MX1_{hoch}- und MX1_{niedrig}-Patienten wurden separat für drei verschiedene IFN- β -Präparate analysiert, wobei durch das einheitliche Studienprotokoll eine direkte Vergleichbarkeit ermöglicht wurde. Hierbei wurden erstmals therapiespezifische Unterschiede des klinischen Verlaufs in Abhängigkeit des MX1-Status

gezeigt, insbesondere bezüglich der Schubraten. In den vorliegenden Daten erlitten MX1_{hoch}-Patienten, die einmal wöchentlich mit 30 µg i.m. IFN-β-1a behandelt wurden, keinen einzigen Schub in fünf Jahren, wohingegen MX1_{hoch}-Patienten, welche in hoher Frequenz hohe Dosen s.c. IFN-β-1b erhielten (3-4 x 250 µg / Woche), durchschnittlich 2,7 Schübe erlitten. Über die Ursachen dieser Diskrepanz lässt sich hier lediglich spekulieren. Eine Erklärung wäre, dass eventuell nur moderate IFN-β-Level vorteilhaft sind. Dies würde bedeuten, dass Patienten mit niedriger endogener Signalwegaktivierung eine intensive Therapie benötigen könnten, um die IFN-β-Signalwege effektiv zu aktivieren, wohingegen eine hochdosierte Therapie bei MX1_{hoch}-Patienten möglicherweise nicht den gewünschten Effekt zeigt. Eine alternative Erklärung könnte in der Krankheitsdauer liegen. Patienten, welche mit i.m. IFN-β-1a behandelt wurden, befanden sich, gemessen am EDSS zu Studienbeginn, in einem früheren Krankheitsstadium. Somit wäre vorstellbar, dass der positive Effekt einer hohen körpereigenen IFN-Signatur in Kombination mit einer IFN-β-Therapie bevorzugt im frühen Krankheitsverlauf zum Tragen kommt. Diese Ergebnisse müssen jedoch vorsichtig interpretiert werden, da die Patientenzahl pro MX1-Gruppe, für jede Therapieform einzeln betrachtet, gering war.

Die Analyse der bildmorphologischen Befundprogression im MRT zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den MX1-Kohorten. Über durchschnittlich vier Jahre hatten 30 % der MX1_{hoch}-Patienten und 36 % der MX1_{niedrig}-Patienten keine Zunahme pathologischer MRT-Veränderungen (p-Wert = 1,0). Die Progression der einzelnen analysierten MRT-Parameter (T2-Läsionen, T1-Läsionen, KM-aufnehmende Läsionen, Atrophie) unterschied sich ebenfalls zu keinem Zeitraum signifikant zwischen den Kohorten. Auch van der Voort *et al.* fanden während zweijähriger Verlaufskontrolle keine unterschiedliche Anzahl neuer T2-Läsionen zwischen Patienten mit hoher und niedriger Baseline-MX1-Expression [168]. Es sei jedoch betont, dass die vorliegend ausgewerteten MRT-Untersuchungen lediglich qualitativ beurteilt wurden und im Rahmen von klinischen Verlaufskontrollen durchgeführt wurden. Daher war die Zeitspanne zwischen Baseline- und Verlaufs-MRT individuell sehr unterschiedlich und u.a. abhängig von der klinischen Situation der Patienten. In nachfolgenden Studien könnten serielle MRT-Untersuchungen zu definierten Zeitpunkten durchgeführt werden, wobei auch spinale MRT-Befunde und

weitere, über die konventionellen MRT-Wichtungen hinausgehende Methoden zur Darstellung von kortikalen Läsionen Berücksichtigung finden sollten [238].

In Zusammenschau der klinischen und paraklinischen Verläufe konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte endogene MX1-Expression in PBMC von RRMS-Patienten kein Biomarker für den Krankheitsverlauf unter IFN- β -Therapie ist, womöglich jedoch die Auswahl des IFN- β -Präparates für den individuellen MS-Patienten unterstützen könnte.

5.4 MX1-Expression unter Interferon- β -Therapie und bei Probanden

Die Analyse der Daten gab Einblick in das Verhalten der MX1-Transkription unter IFN- β -Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass die MX1-Expression in PBMC von Patienten mit initial niedrigen MX1-Leveln unter IFN- β -Therapie deutlich gesteigert wird. Bei MX1_{hoch}-Patienten hingegen bewirkt exogen zugeführtes IFN- β keine signifikante Änderung der Transkriptionsstärke, zumindest nicht zum Zeitpunkt der Blutabnahme 2-3 Tage nach IFN- β -Injektion. Eventuell würden für beide Kohorten höhere MX1-mRNA-Mengen detektiert werden, wenn die Messungen innerhalb von zwölf Stunden nach Injektion erfolgten [139, 150]. Bei separater Betrachtung der Medikamente fällt auf, dass nach einem Monat unter Therapie die MX1-Level der MX1_{hoch}-Kohorte und der MX1_{niedrig}-Kohorte innerhalb jeder Präparategruppe etwa auf gleichem Niveau lagen. Jedoch zeigten i.m. IFN- β behandelte Patienten unter Therapie deutlich niedrigere mRNA-Level als Patienten, denen s.c. IFN- β appliziert wurde. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Zeitspannen zwischen letzter Medikamentengabe und Blutabnahme zurückzuführen (s.c. IFN- β : bis zu 2-3 Tage, i.m. IFN- β : bis zu 7 Tage), da die Blut-mRNA-Level des MX1-Gens bereits nach 3-12 Stunden ihr Maximum erreichen und anschließend wieder abfallen [150]. Sieben Tage nach i.m. IFN- β -Applikation liegen die MX1-mRNA-Spiegel nachweislich bereits wieder nahe dem Ausgangswert oder sogar darunter [148, 239]. Bertolotto *et al.* konnten zeigen, dass die drei IFN- β -Präparate zwölf Stunden nach Injektion keine signifikanten Unterschiede bezüglich der induzierten MX1-mRNA-Level in PBMC aufweisen [240]. In den vorliegenden Ergebnissen fiel zudem auf, dass MX1_{hoch}-Patienten, welche mit i.m. IFN- β behandelt wurden, nach einem Therapiemonat verglichen mit ihren prätherapeutischen Ausgangswerten tendenziell eher reduzierte

MX1-Expressionswerte zeigten. Ursächlich lassen sich hier gegenregulatorische Vorgänge auf molekularer Ebene in Reaktion auf die Therapie vermuten. In Zusammenschau mit der fünfjährigen Schubfreiheit dieser Patientengruppe, könnte ein periodisches Expressionsprofil (mit wöchentlicher, kurzfristiger Induktion) für MX1_{hoch}-Patienten klinisch vorteilhaft sein. Dies bedarf jedoch weiterer Analysen in größeren Studienpopulationen.

Eine wichtige Erkenntnis aus den vorgestellten Ergebnissen der Probanden-Analyse ist, dass erhöhte MX1-mRNA-Level nicht MS-spezifisch sind, sondern auch physiologisch, unabhängig vom Krankheitsbild der MS vorkommen und langfristig persistieren. Demnach scheinen einige Menschen konstant die Gensignatur einer aktivierten Immunantwort zu zeigen. Ursachen hierfür könnten beispielsweise äußere Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten, Allergien oder genetische Variationen sein. Die langfristige Konstanz der erhöhten MX1-Expression spricht gegen eine akut-infektiöse Ursache. Dies deutet darauf hin, dass auch bei MS-Patienten eine verstärkte IFN-Typ-I-ähnliche Aktivität nicht durch eine kurzfristige, subklinische Virusinfektion bedingt ist. Comabella *et al.* konnten bei Patienten mit erhöhter endogener IFN-Typ-I-Aktivität keine virale DNA des EBV oder des Humanen Herpesvirus 6 in PBMC feststellen und keine entsprechende IgM-Seropositivität nachweisen [164]. Chronisch-persistierende Viren und insbesondere endogene Retroviren lassen sich als Ursprung der erhöhten MX1-Expression jedoch nicht ausschließen [241].

5.5 Expression der Interferon- β -Signalweg-Gene

Die natürliche Expression von IFN- β kann sowohl durch pathogene als auch körpereigene Nukleinsäuren über zwei Hauptsignalwege, den MyD88-abhängigen und den TRAF3-Signalweg induziert werden. Endogenes sowie pharmakologisches IFN- β aktiviert wiederum den ISGF3-Komplex, bestehend aus den Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT2 und IRF9, und vermittelt hierüber die Induktion zahlreicher ISG. Das komplexe Netzwerk enthält zahlreiche Quervernetzungen sowie positive und negative Rückkopplungsschleifen. Die hier konstruierten Signalwege enthalten die nach aktuellem Wissen

maßgeblichen Hauptakteure und -mechanismen, können jedoch die IFN- β -Regulation nur ausschnittshaft und nicht taxativ beleuchten.

Diverse Arbeitsgruppen vermuteten in der Vergangenheit aufgrund erhöhter ISG-Expression einiger Therapie-naiver Patienten, dass bei diesen Patienten die IFN- β -Signalwege verstärkt aktiviert seien [152, 163, 164]. Dies wurde bislang jedoch nicht systematisch untersucht. Um der molekularen Ursache einer individuell erhöhten MX1-Expression auf den Grund zu gehen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Transkription aller Gene analysiert, die in den IFN- β -assoziierten Signalwegen integriert sind. Die Mikroarray-Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit erhöhter prätherapeutischer IFN-Typ-I-ähnlicher Aktivität nicht nur hohe mRNA-Level des Surrogatparameters MX1 aufweisen, sondern auch eine erhöhte Transkription anderer ISG und zahlreicher Gene der IFN- β -Signalwege. Insbesondere zytoplasmatische und endosomale Rezeptoren (IFIH1, DDX58, ZBP1, TLR7, TLR8) sowie Transkriptionsfaktoren (IRF7, STAT1, IRF9) waren verstärkt exprimiert. Die mRNA-Level der Transduktionsmoleküle, als Bindeglieder zwischen Rezeptoren und TF, waren hingegen nur leicht und nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Kohorten MX1_{hoch} und MX1_{niedrig}. Einige Gene zeigten eine verstärkte Expression in MX1_{hoch}-Patienten, obgleich der Unterschied nicht die stringente Signifikanzschwelle erreichte (p-Wert < 0,01). Dies könnte darin begründet sein, dass für s.c. IFN- β -1a-behandelte Patienten ein anderer Affymetrix®-Chip (U133 Plus 2.0) verwendet wurde, als bei den Patienten der anderen Therapieformen (U133 A und B). Für manche Gene, z.B. TLR7 und TLR8, führten Unterschiede zwischen den entsprechenden *Probesets* der beiden Chip-Typen zu einer stärkeren Varianz der Daten und somit etwas höheren p-Werten (Tab. A-8).

Die vorliegende Arbeit ist methodisch dahingehend limitiert, dass Genexpressionsmessungen auf mRNA-Ebene erfolgten und diese nicht zwangsläufig mit der Menge aktiver Proteine korrelieren muss. Abweichungen könnten durch post-transkriptionelle Genregulationsmechanismen wie mikroRNA-mRNA-Interaktionen oder alternatives Spleißen entstehen [242, 243]. So wurden in den Daten keine signifikanten Unterschiede der Blut-mRNA-Mengen der IFN- α/β -Rezeptoren zwischen den MX1-Kohorten gefunden. Über die entsprechenden Proteinmengen oder zellspezifische

Lokalisation der Rezeptoren lässt sich jedoch nur spekulieren. Comabella *et al.* verwendeten Durchflusszytometrie, um die Expression von IFNAR1 auf Monozyten zu messen [164, 165]. In Patienten mit fortschreitender Krankheitsaktivität trotz IFN- β -Behandlung fanden sie eine höhere Baseline-Expression dieses Rezeptors. Severa *et al.* konnten für dendritischen Zellen schlussfolgern, dass eine Regulation der IFNAR1- und IFNAR2-Oberflächenexpression auf post-transkriptionaler Ebene stattfindet [244]. Genetische Polymorphismen oder alternatives Spleißen dieser Rezeptoren könnten ebenfalls einen Einfluss haben. Unterschiedlich gespleißte Varianten des IFNAR2-Rezeptors zeigen verschiedene biologische Reaktionen auf endogenes und exogenes IFN- β [245].

Auffällig war, dass bei MX1_{hoch}-Patienten keine verstärkte Expression des IFN- β -Gens (IFNB1) selbst gefunden wurde. Eine andere Arbeitsgruppe detektierte mittels PCR eine erhöhte prätherapeutische IFN- β -Expression in PBMC-Zellen von *Non-Respondern* [165], was sie als Ursache einer verstärkten endogenen IFN-Typ-I-Signatur betrachteten [164]. Diese Schlussfolgerung konnte nach den Daten der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, jedoch waren die IFNB1-Transkriptlevel in den Mikroarray-Daten im Bereich der Detektionsgrenze und wurden bisher nicht mittels sensitiverer PCR geprüft.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass die Ursache des verstärkten Expressionsmusters in einer vermehrten Transkription des ISGF3-Komplexes zu vermuten ist. Dieser Komplex ist nicht nur ein Regulator der ISG-Expression, sondern auch ein wichtiger Induktor diverser Gene der IFN- β -Regulations- und -Signalkaskade, wodurch positive Rückkopplungsschleifen entstehen [126, 246]. Der Zusammenhang zwischen ISGF3 und einer IFN-Typ-I-Signatur wird durch die Ergebnisse der TFBS-Analyse bestärkt. Diese zeigte, dass die Liste der ISGF3-Zielgene zu einem gewissen Grad das Muster der überexprimierten Gene in MX1_{hoch}-Patienten widerspiegelt (Tab. A-8). Frühere Studien konnten auf Proteinebene bereits eine Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsstatus der ISGF3-Komponente STAT1 und der ISG-Expression in MS-Patienten nachweisen [167]. Das Ausmaß der IFN- β -bedingten STAT1-Phosphorylierung scheint sich zwischen verschiedenen Leukozytenpopulationen zu unter-

scheiden, mit stärkster Phosphorylierung in Monozyten und geringerer Phosphorylierung in B-Lymphozyten [247].

5.6 Expressionsänderungen der Interferon- β -Signalweg-Gene unter Therapie

Die Analyse der Expressionsänderungen der Signalweg-Gene bei MS-Patienten unter Therapie gab Einblicke in die molekularen Effekte von IFN- β und zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Kohorten auf. Bei Patienten mit initial erhöhter ISG-Expression bewirkte eine s.c. IFN- β -Therapie keine signifikante Modulation der Expression von Genen der IFN- β -assoziierten Signalwege. Im Gegensatz hierzu wurde bei MX1_{niedrig}-Patienten nach einem Therapiemonat eine stark gesteigerte Transkription zahlreicher Signalweg-Gene detektiert. Die therapeutisch bei MX1_{niedrig}-Patienten induzierten Gene zeigten eine deutliche Übereinstimmung mit den Genen, die initial in MX1_{hoch}-Patienten überexprimiert waren. Zudem bestand nach einem Monat unter IFN- β -Therapie zwischen den Kohorten kein signifikanter Unterschied der Signalweg-Expression. Dies spricht dafür, dass MX1_{hoch}-Patienten schon vor Therapiebeginn stark aktivierte bzw. ausgelastete Signalwege haben und folglich appliziertes IFN- β auf molekularer Ebene weniger effektiv ist. Diese Hypothese wurde in der Vergangenheit bereits von anderen Arbeitsgruppen aufgestellt [152, 163, 164]. Die vorliegende Arbeit bestätigt erstmals diesen Zusammenhang für die einzelnen Gene der IFN- β -Signalwege – sowohl mittels Mikroarray als auch PCR. Im Gegensatz zu den genannten Studien führte jedoch in den hier vorgestellten Daten sowie in einer Untersuchung von Hesse *et al.* [169] das geringere molekulare Therapieansprechen der MX1_{hoch}-Patienten nicht zu einem schlechteren klinischen Ergebnis.

Es stellt sich die Frage, weshalb die Expression der Signalweg-Gene bei MX1_{hoch}-Patienten unter Therapie nicht signifikant steigerbar ist. Mögliche Ursachen lassen sich nicht scharf voneinander trennen und aus den Daten dieser Arbeit nicht abschließend eruieren. Möglicherweise stellt der eigentliche Transkriptionsvorgang der Signalweg-Gene oder die ribosomale Biosynthese der entsprechenden Proteine einen limitierenden Faktor dar und ist nicht weiter steigerbar. Alternativ könnte durch koinduzierte, gegenregulatorische ISG eine zunehmende Hemmung der Transkriptions- bzw. Signalweg-Aktivität bewirkt

werden. Für die zweite Theorie spricht, dass ein bekanntes inhibitorisches ISG, namentlich das Proteinbiosynthese-hemmende Gen IFIT1 [248], in MX1_{hoch}-Patiente zu Baseline überexprimiert war und bei beiden Kohorten unter Therapie transkriptionell induziert wurde, wenngleich nur bei MX1_{niedrig}-Patienten signifikant. Ebenfalls wurde das Signalweg-hemmende Gen SOCS1 [249] in MX1_{niedrig}-Patienten therapeutisch hochreguliert (p-Wert = 0,017). Die pathophysiologische Relevanz dieses Gens wird dadurch untermauert, dass ein Einzelnukleotidpolymorphismus in der 5'-regulatorischen Region des SOCS1-Gens als Risikofaktor für MS beschrieben wurde [250].

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass bei MX1_{niedrig}-Patienten unter Therapie die Expression des TLR7-Rezeptors gesteigert wurde. TLR7 ist an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt, welche ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen [251]. Es konnte gezeigt werden, dass eine IFN- β -bedingte Hochregulation des TLR7-Rezeptors auf dendritischen Zellen die Differenzierung von Th17-Lymphozyten hemmt, welche als proinflammatorische Lymphozytensubpopulation an der MS-Pathogenese beteiligt sind [252, 253].

5.7 Fazit und Ausblick

Dank der Kombination aus sehr großem Mikroarray-Datensatz und langer Patientenbeobachtung konnte belegt werden, dass eine veränderte endogene MX1-Expression in PBMC von RRMS-Patienten keine Prognose des klinischen oder paraklinischen Verlaufs unter IFN- β -Therapie erlaubt. Es ergaben sich jedoch erstmals Hinweise auf Unterschiede des MX1-abhängigen Krankheitsverlaufs zwischen den drei IFN- β -Präparaten. Um der Frage auf den Grund zu gehen, ob MX1 das Potential hat, Kliniker bei der Wahl des individuell effektivsten IFN- β -Präparates zu unterstützen, bedarf es prospektiver, therapiespezifischer Studien mit deutlich größeren Kohorten. Diese Untersuchungen müssen Dosierung und Frequenz der IFN- β -Applikation sehr genau berücksichtigen und die NAb-Bildung kontrollieren. Mit zunehmender Zahl von Mikroarray-Daten bieten sich hierfür datensatzübergreifende Analysen an, sofern ein einheitliches Studiendesign berücksichtigt wird.

Auf molekularer Ebene ergab die vorliegende Studie ein unterschiedliches Therapieansprechen zwischen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig}. Die geringere medikamentöse Modulation der Expression von Signalweg-Genen in MX1_{hoch}-Patienten in Zusammenschau mit dem vergleichbaren klinischen Verlauf der beiden Kohorten, wirft die Frage auf, ob MS-Patienten mit ohnehin erhöhter IFN-Typ-I-Signatur von einer anderen Pharmakotherapie mehr profitieren könnten. Der Therapiebenefit des endogenen MX1-Levels (Baseline) für den Therapieerfolg unter IFN- β sollte im *Head-to-Head* Studiendesign mit dem therapeutischen Benefit des MX1-Levels für die Therapie mit einem neuen DMD (z.B. Dimethylfumarat) verglichen werden, um eine individuell möglichst effektive Therapie zu gewährleisten. Zahlreiche weitere Pharmaka befinden sich aktuell in klinischer Erprobung [25, 74, 254].

Die systembiologischen Analysen der IFN- β -Signalwege konnten das Verständnis der molekularen IFN- β -Therapiemechanismen erweitern und zeigen, dass ISGF3 maßgeblich an einer erhöhten endogenen IFN-Typ-I-Aktivität beteiligt ist. Die hierfür gemessenen mRNA-Level müssen jedoch nicht zwangsläufig mit der Menge aktiver Proteine korrelieren, da die Gentranskription zusätzlichen regulatorischen Mechanismen unterliegt. Daher sollte die individuell unterschiedliche molekulare IFN- β -Wirkung auf weiteren molekularbiologischen Ebenen untersucht werden. Hierfür bieten sich z.B. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*- (ELISA) und Durchflusszytometrie-Analysen auf Proteinebene an, aber auch die Beeinflussung der Genexpression durch mikroRNA und alternatives Spleißen sollte weiter erforscht werden.

Biomarker werden dringend benötigt, um den Therapieerfolg oder -misserfolg frühzeitig vorhersagen zu können. In Anbetracht neuer Therapiealternativen, ist es umso bedeutender eine Entscheidungsgrundlage für die optimale Wahl der Pharmakotherapie zu schaffen. Ein verbesserte Kenntnis der molekularen Wirkung verfügbarer Immuntherapeutika bildet die Basis, um potentielle prozessspezifische Biomarker zu finden, die eine frühzeitige Prognose des individuellen Therapieerfolgs erlauben. Anschließend bedarf es der gründlichen Validierung der prognostischen Wertigkeit. Erste Schritte sind in dieser Arbeit unternommen und publiziert worden [170].

6. Zusammenfassung

MS ist die häufigste zu persistierender Behinderung führende neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter. Zur pharmakologischen Behandlung hat sich IFN- β international als immunmodulatorische Basistherapie etabliert. Ein Teil von MS-Patienten ist bereits vor Einleitung einer IFN- β -Therapie durch eine verstärkte endogene Expression des IFN-stimulierten MX1-Gens gekennzeichnet. Die MX1-mRNA-Menge im Blut gilt als Surrogatparameter für die Aktivität des IFN- β - bzw. IFN-Typ-I-Signalwegs. Die Relevanz dieses Phänomens für das individuelle Therapieansprechen wird kontrovers diskutiert und die molekularen Ursachen sind unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potential einer endogen erhöhten MX1-Expression als prognostischen Marker für den individuellen, klinischen und paraklinischen Krankheitsverlauf unter IFN- β -Therapie bei MS-Patienten zu evaluieren. Ferner sollten molekulare Ursache einer verstärkten endogenen IFN-Typ-I-Aktivität sowie genregulatorische Effekte der IFN- β -Therapie eruiert werden.

Analysiert wurden Mikroarray-Transkriptomdaten zu PBMC von 61 RRMS-Patienten, longitudinal erhoben unmittelbar vor Initiierung einer IFN- β -Therapie sowie nach dem ersten Therapiemonat. Eine Gruppierung der Patienten erfolgte entsprechend ihrer prätherapeutischen MX1-mRNA-Expression in zwei Kohorten (MX1_{hoch} und MX1_{niedrig}) und die anschließende, fünfjährige klinische und siebenjährige paraklinische Verlaufsbeobachtung wurde vergleichend ausgewertet bezüglich aufgetretener Schübe, der EDSS-Progression und MRT-Befunde. Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Dynamik der MX1-Transkription unter IFN- β -Therapie für beide Patientengruppen, sowie die Untersuchung des physiologischen Langzeitverlaufs der MX1-Expression in gesunden Personen. Zur weiteren molekularen Analyse wurden auf Basis der aktuellen Literatur die Signalwege konstruiert, welche IFN- β induzieren oder durch IFN- β aktiviert werden. Die Expression der darin enthaltenen Gene wurde zwischen MX1_{hoch}-Patienten und MX1_{niedrig}-Patienten verglichen und die Expressionsänderungen im ersten Therapiemonat für jede Kohorte separat analysiert.

Vor Therapiebeginn fanden sich bei 11 von 61 MS-Patienten erhöhte Expressionswerte des MX1-Gens. Klinisch ergab sich über fünf bzw. sieben Jahre kein Unterschied im Krankheitsverlauf zwischen MX1_{hoch}- und MX1_{niedrig}-Patienten, weder gemessen an der Schubfrequenz, noch an der EDSS-Progression oder der bildmorphologischen Befundentwicklung im MRT. Bezogen auf die Schubraten konnten jedoch therapiespezifische Unterschiede zwischen drei verschiedenen IFN- β -Präparaten in Abhängigkeit des MX1-Status festgestellt werden. So waren MX1_{hoch}-Patienten unter i.m. IFN- β -1a-Therapie über fünf Jahre komplett schubfrei. Die geringste Schubrate der MX1_{niedrig}-Patienten ergab sich hingegen bei Medikation mit s.c. IFN- β -1b und lag hier niedriger als die Schubrate der s.c. therapierten MX1_{hoch}-Patienten. Diese Daten bedürfen jedoch der Validierung durch weitere prospektive Studien mit größeren Kohorten.

Auf molekularer Ebene bewirkte die eingeleitete IFN- β -Behandlung bei MX1_{niedrig}-Patienten eine starke Induktion der MX1-Transkription, wohingegen MX1_{hoch}-Patienten keine signifikante Expressionssteigerung erfuhren. Nach dem ersten Therapiemonat lagen die mRNA-Werte beider Gruppen auf vergleichbarem Niveau. Ein Teil der Probanden wies ebenfalls erhöhte MX1-Werte auf, und diese Gensignatur war über sechs Monate stabil. Somit scheint eine erhöhte endogene IFN-Typ-I-Aktivität eine physiologische, individuelle, erworbene oder angeborene Charakteristik des Immunsystems zu repräsentieren, welche beispielsweise durch äußere Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten oder genetische Variationen bedingt sein könnte.

Insgesamt 46 Signalweg-Gene sowie 10 ISG konnten als Hauptakteure der IFN- β -assoziierten Signalkaskaden eruiert werden. Die Expressionsanalysen dieser Gene ergaben, dass Patienten mit verstärkter IFN-Typ-I-ähnlicher Aktivität vor Initiierung einer IFN- β -Therapie nicht nur MX1 und andere ISG vermehrt exprimierten, sondern auch Pathogen-Rezeptoren (z.B. IFIH1) und Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT1, IRF9, IRF7). Während natürliches IFN- β und dessen Rezeptoren in beiden Kohorten auf ähnlichem Niveau exprimiert wurden, zeigten Patienten mit verstärkter IFN-Typ-I-Signatur eine signifikant höhere Expression der Gene des ISGF3-Transkriptionsfaktor-Komplexes. Eine TFBS-Analyse führte zu der Hypothese, dass die Aktivität des ISGF3-Komplexes entscheidend ist für einen unterschiedlichen Aktivitätsstatus der IFN- β -Signalwege.

Die einmonatige IFN- β -Therapie bewirkte bei MX1_{hoch}-Patienten nur eine schwache, nicht signifikante Modulation der Expressionsstärke von Signalweg-Genen. Im Gegensatz dazu erfolgte bei Patienten mit niedriger initialer MX1-Expression unter Therapie eine starke Induktion der Transkription zahlreicher Gene der IFN- β -Signalkaskade. Das Muster basal überexprimierter Gene in MX1_{hoch}-Patienten entsprach dem Muster der therapeutisch hochregulierten Gene bei MX1_{niedrig}-Patienten. Folglich waren nach dem ersten Therapiemonat keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den beiden Kohorten erkennbar.

Es konnte gezeigt werden, dass die physiologische, individuell unterschiedliche MX1-Expression vor Initiierung einer IFN- β -Therapie im Allgemeinen keine prognostische Wertigkeit als Marker für den weiteren klinischen und paraklinischen Krankheitsverlauf bei RRMS-Patienten besitzt. Jedoch ergaben sich erste Hinweise auf den möglichen Nutzen der MX1-Messung für die Wahl des IFN- β -Präparates. Therapeutisch appliziertes IFN- β induziert über Rückkopplungsmechanismen zahlreiche Gene der IFN- β -assoziierten Signalwege. In MX1_{hoch}-Patienten ist die Expression dieser Gene bereits vor Therapiebeginn gesteigert, vermutlich angetrieben durch eine Überexpression von ISGF3. Die pharmakologische Modifikation der Transkriptionsstärke von Signalweg-Genen fällt bei MX1_{hoch}-Patienten geringer aus, als bei Patienten mit niedriger endogener MX1-Expression.

Die in dieser Studie gezeigten individuellen Expressionsunterschiede der IFN-Typ-I-Signalweg-Gene und die pharmakologischen Wirkungen von IFN- β auf die mRNA-Transkription erweitern das Verständnis über die molekularen Mechanismen der IFN- β -Therapie. Die mRNA unterliegt jedoch noch weiteren Regulationsschritten (z.B. durch mikroRNA) bis zur Translation in die entsprechenden Proteine als Effektoren der Medikamentenwirkung. Auf dieser Grundlage sollte in neuen Studien untersucht werden, ob die jeweiligen transkriptionellen Unterschiede und Modulationen auch auf Proteinebene nachweisbar sind. Nachfolgende Studien könnten zudem MX1-abhängig den klinischen Erfolg verschiedener IFN- β -Präparate und Therapiealternativen vergleichen.

7. Literaturverzeichnis

1. Multiple Sclerosis International Federation (MSIF) (2013). *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World*. [PDF]. Verfügbar unter: http://www.msif.org/includes/documents/cm_docs/2013/m/msif-atlas-of-ms-2013-report.pdf?f=1; Abgerufen: 21.10.2013.
2. World Health Organization (WHO) (2008). *Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008*. ISBN:9789241563758.
3. Simpson S Jr., Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B (2011). *Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 82(10):1132-41.
4. Milo R, Kahana E (2010). *Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment*. Autoimmun Rev, 9(5):A387-94.
5. Kampman MT, Aarseth JH, Grytten N, Benjaminsen E, Celius EG, Dahl OP, Holmoy T, Loken-Amsrud K, Midgard R, Myhr KM, Risberg G, Vatne A, Torkildsen O (2013). *Sex ratio of multiple sclerosis in persons born from 1930 to 1979 and its relation to latitude in Norway*. J Neurol, 260(6):1481-8.
6. Koch-Henriksen N, Sorensen PS (2010). *The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology*. Lancet Neurol, 9(5):520-32.
7. Atlas of MS Online Database. Verfügbar unter: <http://www.atlasofms.org>; Abgerufen: 06.10.2013.
8. Compston A, Coles A (2008). *Multiple sclerosis*. Lancet, 372(9648):1502-17.
9. Hawkes CH, Macgregor AJ (2009). *Twin studies and the heritability of MS: a conclusion*. Mult Scler, 15(6):661-7.
10. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Bush WS, Sawcer SJ, de Jager PL, Oksenberg JR, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL (2010). *Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis--the shape of things to come*. Am J Hum Genet, 86(4):621-5.
11. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, et al. (2011). *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 476(7359):214-9.
12. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, et al. (2013). *Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis*. Nat Genet, 45(11):1353-60.
13. Sospedra M, Martin R (2005). *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 23:683-747.
14. Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW (2013). *Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 324(1-2):10-6.
15. O'Gorman C, Lucas R, Taylor B (2012). *Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms*. Int J Mol Sci, 13(9):11718-52.
16. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnetthi L, Handel AE, Disanto G, Orton SM, Watson CT, Morahan JM, Giovannoni G, Ponting CP, Ebers GC, et al. (2010). *A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution*. Genome Res, 20(10):1352-60.
17. Ruprecht K (2013). *Multiple Sklerose und Epstein-Barr-Virus: Eine aktuelle Übersicht*. Akt Neurol, 40:400-407.

18. Rosati G, Aiello I, Granieri E, Pirastru MI, Becciu S, Demontis G, Mannu L, Zoccheddu A (1986). *Incidence of multiple sclerosis in Macomer, Sardinia, 1912-1981: onset of the disease after 1950*. Neurology, 36(1):14-9.
19. Joensen P (2011). *Multiple sclerosis: variation of incidence of onset over time in the Faroe Islands*. Mult Scler, 17(2):241-4.
20. Ascherio A, Munger KL (2007). *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors*. Ann Neurol, 61(6):504-13.
21. Meinl E, Derfuss T, Krumbholz M, Probstel AK, Hohlfeld R (2011). *Humoral autoimmunity in multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 306(1-2):180-2.
22. Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, Rothhammer V, Chan A, Gold R, Berthele A, Bennett JL, Korn T, Hemmer B (2012). *Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis*. N Engl J Med, 367(2):115-23.
23. Weissert R (2013). *The Immune Pathogenesis of Multiple Sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 8(4):857-66.
24. Miljkovic D, Spasojevic I (2013). *Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities*. Antioxid Redox Signal, 19(18):2286-334.
25. Luessi F, Siffrin V, Zipp F (2012). *Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies*. Expert Rev Neurother, 12(9):1061-77.
26. Barnett MH, Prineas JW (2004). *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion*. Ann Neurol, 55(4):458-68.
27. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK (2010). *Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations*. Prog Neurobiol, 92(3):386-404.
28. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005). *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 201(2):233-40.
29. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, Yu Q, Zhang J, Chen S, Liu Z, Chen X, Zhou T, Zhang D (2012). *Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS*. Front Biosci, 17:1648-58.
30. Sa MJ (2012). *Physiopathology of symptoms and signs in multiple sclerosis*. Arq Neuropsiquiatr, 70(9):733-40.
31. Geurts JJ, Calabrese M, Fisher E, Rudick RA (2012). *Measurement and clinical effect of grey matter pathology in multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 11(12):1082-92.
32. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Bruck W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM (2011). *Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis*. N Engl J Med, 365(23):2188-97.
33. Popescu BF, Lucchinetti CF (2012). *Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis*. BMC Neurol, 12:11.
34. Stuke K, Flachenecker P, Zettl UK, Elias WG, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Rieckmann P (2009). *Symptomatology of MS: results from the German MS Registry*. J Neurol, 256(11):1932-5.
35. Amato MP, Langdon D, Montalban X, Benedict RH, DeLuca J, Krupp LB, Thompson AJ, Comi G (2013). *Treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis: position paper*. J Neurol, 260(6):1452-68.
36. Amato MP, Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Hakiki B, Giannini M, Pasto L, Razzolini L (2010). *Cognitive impairment in early stages of multiple sclerosis*. Neurol Sci, 31(Suppl 2):S211-4.

37. D'Alessandro R, Vignatelli L, Lugaresi A, Baldin E, Granella F, Tola MR, Malagu S, Motti L, Neri W, Galeotti M, Santangelo M, Fiorani L, Montanari E, Scandellari C, Benedetti MD, *et al.* (2013). *Risk of multiple sclerosis following clinically isolated syndrome: a 4-year prospective study.* J Neurol, 260(6):1583-93.
38. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, *et al.* (2001). *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.* Ann Neurol, 50(1):121-7.
39. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS (2005). *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria".* Ann Neurol, 58(6):840-6.
40. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, *et al.* (2011). *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria.* Ann Neurol, 69(2):292-302.
41. Zettl UK, Mix E (2004). *Bildgebung in der klinischen Neuroimmunologie.* Thieme. ISBN:313132631X.
42. Tumani H, Deisenhammer F, Giovannoni G, Gold R, Hartung HP, Hemmer B, Hohlfeld R, Otto M, Stangel M, Wildemann B, Zettl UK (2011). *Revised McDonald criteria: the persisting importance of cerebrospinal fluid analysis.* Ann Neurol, 70(3):520; author reply 521.
43. Sandberg-Wollheim M, Olsson T (2013). *Cerebrospinal fluid oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Yes.* Mult Scler, 19(6):714-6.
44. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G (2013). *Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 84(8):909-14.
45. Link H, Huang YM (2006). *Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness.* J Neuroimmunol, 180(1-2):17-28.
46. Zettl UK, Tumani H (2005). *Multiple Sclerosis and Cerebrospinal Fluid.* Blackwell Publishing. ISBN:1405140402.
47. Weiner HL, Stankiewicz JM (2012). *Multiple Sclerosis: Diagnosis and Therapy.* John Wiley & Sons Ltd. ISBN:0470654635.
48. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, Hutchinson M, Johnson RT, Kappos L, Kira J, Lublin FD, McFarland HF, Montalban X, Panitch H, *et al.* (2008). *Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach.* Mult Scler, 14(9):1157-74.
49. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009). *The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains.* Brain, 132(5):1175-89.
50. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) (2012). *Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose.* [PDF]. Verfügbar unter: http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/LL_2012/pdf/ll_31_2012_diagnose_und_therapie_der_multiplen_sklerose.pdf; Abgerufen: 10.06.2013.
51. Frohman TC, Davis SL, Beh S, Greenberg BM, Remington G, Frohman EM (2013). *Uhthoff's phenomena in MS--clinical features and pathophysiology.* Nat Rev Neurol, 9(9):535-40.
52. Lublin FD, Reingold SC (1996). *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis.* Neurology, 46(4):907-11.

53. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, Ebers GC (2010). *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability*. Brain, 133(7):1914-29.
54. Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, Devonshire V, Neurologists UC (2008). *Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 79(12):1368-74.
55. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M (2006). *Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges*. Lancet Neurol, 5(4):343-54.
56. Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H (2010). *The natural history of secondary progressive multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 81(9):1039-43.
57. Kurtzke JF (1983). *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. Neurology, 33(11):1444-52.
58. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC (1999). *The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment*. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. Mult Scler, 5(4):244-50.
59. Rudick RA, Lee JC, Nakamura K, Fisher E (2009). *Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS*. J Neurol Sci, 282(1-2):106-11.
60. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989). *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability*. Brain, 112(1):133-46.
61. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC (2013). *Mortality in patients with multiple sclerosis*. Neurology, 81(2):184-92.
62. Goodin DS, Ebers GC, Cutter G, Cook SD, O'Donnell T, Reder AT, Kremenchutzky M, Oger J, Rametta M, Beckmann K, Knappertz V (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).
63. Degenhardt A, Ramagopalan SV, Scalfari A, Ebers GC (2009). *Clinical prognostic factors in multiple sclerosis: a natural history review*. Nat Rev Neurol, 5(12):672-82.
64. Langer-Gould A, Popat RA, Huang SM, Cobb K, Fontoura P, Gould MK, Nelson LM (2006). *Clinical and demographic predictors of long-term disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review*. Arch Neurol, 63(12):1686-91.
65. Eriksson M, Andersen O, Runmarker B (2003). *Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis*. Mult Scler, 9(3):260-74.
66. Skoog B, Runmarker B, Winblad S, Ekholm S, Andersen O (2012). *A representative cohort of patients with non-progressive multiple sclerosis at the age of normal life expectancy*. Brain, 135(3):900-11.
67. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, Edan G (2010). *Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis*. Brain, 133(7):1900-13.
68. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P (2003). *Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process*. Brain, 126(4):770-82.
69. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, Montalban X, Barkhof F, Radu EW, Bauer L, Dahms S, Lanius V, Pohl C, Sandbrink R, Group BS (2007). *Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study*. Lancet, 370(9585):389-97.
70. Mendes A, Sa MJ (2011). *Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works*. Arq Neuropsiquiatr, 69(3):536-43.
71. Applebee A, Panitch H (2009). *Early stage and long term treatment of multiple sclerosis with interferon-beta*. Biologics, 3:257-71.

72. Mikol DD, Barkhof F, Chang P, Coyle PK, Jeffery DR, Schwid SR, Stubinski B, Uitdehaag B, REGARD study group (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):903-14.
73. O'Connor P, Filippi M, Arnason B, Comi G, Cook S, Goodin D, Hartung HP, Jeffery D, Kappos L, Boatseng F, Filippov V, Groth M, Knappertz V, Kraus C, Sandbrink R, 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):889-97.
74. Cross AH, Naismith RT (2014). *Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis*. J Intern Med.
75. Henze T, Rieckmann P, Toyka KV, Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG) of the German Multiple Sclerosis Society (2006). *Symptomatic treatment of multiple sclerosis*. Eur Neurol, 56(2):78-105.
76. Apel A, Klauer T, Zettl UK (2006). *[Stress and progression in multiple sclerosis]*. Fortschr Neurol Psychiatr, 74(10):567-74.
77. Klauer T, Schneider W, Zettl UK (2007). *Coping with neuroimmunological diseases*. J Neurol, 254 Suppl 2:II107-11.
78. Köhler W, Deppe R, Faiss J, Fischer M, Hoffmann F, Möller H, Klauer T, Kunkel A, Sühnel A, Voigt K, Zettl UK (2012). *Das PTMS-Programm: Psycho-Edukatives Training für Patienten mit Multipler Sklerose*. ISBN:9783000369131.
79. Isaacs A, Lindenmann J (1957). *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 147(927):258-67.
80. Jacobs L, Johnson KP (1994). *A brief history of the use of interferons as treatment of multiple sclerosis*. Arch Neurol, 51(12):1245-52.
81. Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG (2009). *Interferons: signaling, antiviral and viral evasion*. Immunol Lett, 122(1):1-11.
82. Fensterl V, Sen GC (2009). *Interferons and viral infections*. Biofactors, 35(1):14-20.
83. Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS, Merigan TC (1976). *Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis*. N Engl J Med, 295(10):517-22.
84. Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, Wallach D, Perricaudet M, Tiollais P, Revel M (1980). *Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(12):7152-6.
85. Taniguchi T, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M (1980). *Molecular cloning of human interferon cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(7):4003-6.
86. FachInfo Online Datenbank - Fachinformationsverzeichnis Deutschland. Verfügbar unter: <http://www.fachinfo.de>; Abgerufen: 27.10.2013.
87. Rote Liste Online Datenbank. Verfügbar unter: <http://www.rote-liste.de/Online>; Abgerufen: 27.10.2013.
88. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP (1987). *Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon*. Lancet, 1(8538):893-5.
89. Camenga DL, Johnson KP, Alter M, Engelhardt CD, Fishman PS, Greenstein JI, Haley AS, Hirsch RL, Kleiner JE, Kofie VY (1986). *Systemic recombinant alpha-2 interferon therapy in relapsing multiple sclerosis*. Arch Neurol, 43(12):1239-46.
90. Jacobs L, O'Malley J, Freeman A, Ekes R (1981). *Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis*. Science, 214(4524):1026-8.

91. Jacobs L, Salazar AM, Herndon R, Reese PA, Freeman A, Jozefowicz R, Cuetter A, Husain F, Smith WA, Ekes R (1987). *Intrathetically administered natural human fibroblast interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. Results of a multicenter, double-blind study.* Arch Neurol, 44(6):589-95.
92. Knobler RL, Greenstein JI, Johnson KP, Lublin FD, Panitch HS, Conway K, Grant-Gorsen SV, Muldoon J, Marcus SG, Wallenberg JC (1993). *Systemic recombinant human interferon-beta treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: pilot study analysis and six-year follow-up.* J Interferon Res, 13(5):333-40.
93. IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993). *Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Neurology, 43(4):655-61.
94. Paty DW, Li DK, UBC MS/MRI Study Group, 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.* Neurology, 43(4):662-7.
95. Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, Brickelmaier M, Muldowney C, Jones W, Goelz SE (1998). *Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta).* Pharm Res, 15(4):641-9.
96. Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis Study Group (PRISMS) (1998). *Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis.* Lancet, 352(9139):1498-504.
97. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownscheidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW (2000). *Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group.* N Engl J Med, 343(13):898-904.
98. Shirani A, Zhao Y, Karim ME, Evans C, Kingwell E, van der Kop ML, Oger J, Gustafson P, Petkau J, Tremlett H (2012). *Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.* JAMA, 308(3):247-56.
99. Goodin DS, Jones J, Li D, Traboulsee A, Reder AT, Beckmann K, Konieczny A, Knappertz V, 16-Year Long-Term Follow-Up Study Investigators (2011). *Establishing long-term efficacy in chronic disease: use of recursive partitioning and propensity score adjustment to estimate outcome in MS.* PLoS One, 6(11):e22444.
100. Filippini G, Del Giovane C, Vacchi L, D'Amico R, Di Pietrantonj C, Beecher D, Salanti G (2013). *Immunomodulators and immunosuppressants for multiple sclerosis: a network meta-analysis.* Cochrane Database Syst Rev, 6:CD008933.
101. Comi G, De Stefano N, Freedman MS, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, Casset-Semanaz F, Hennessy B, Moraga MS, Rocak S, Stubinski B, Kappos L (2012). *Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta-1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): a phase 3 randomised controlled trial.* Lancet Neurol, 11(1):33-41.
102. La Mantia L, Vacchi L, Di Pietrantonj C, Ebers G, Rovaris M, Fredrikson S, Filippini G (2012). *Interferon beta for secondary progressive multiple sclerosis.* Cochrane Database Syst Rev, 1:CD005181.
103. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH (1995). *A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-remitting multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG).* Mult Scler, 1(2):118-35.
104. Clanet M, Radue EW, Kappos L, Hartung HP, Hohlfeld R, Sandberg-Wollheim M, Kooijmans-Coutinho MF, Tsao EC, Sandrock AW, European I-aD-CSI (2002). *A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS.* Neurology, 59(10):1507-17.

105. Goodin DS, Reder AT, Ebers GC, Cutter G, Kremenchutzky M, Oger J, Langdon D, Rametta M, Beckmann K, DeSimone TM, Knappertz V (2012). *Survival in MS: a randomized cohort study 21 years after the start of the pivotal IFNbeta-1b trial*. *Neurology*, 78(17):1315-22.
106. Mazdeh M, Afzali S, Jaafari MR (2010). *The therapeutic effect of Avonex, Rebif and Betaferon on EDSS and relapse in multiple sclerosis: a comparative study*. *Acta Med Iran*, 48(2):83-8.
107. Koch-Henriksen N, Sorensen PS, Christensen T, Frederiksen J, Ravnborg M, Jensen K, Heltberg A, Kristensen O, Stenager E, Petersen T, Hansen T, Danish Multiple Sclerosis Group (2006). *A randomized study of two interferon-beta treatments in relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Neurology*, 66(7):1056-60.
108. Patti F, Pappalardo A, Florio C, Politi G, Fiorilla T, Reggio E, Reggio A (2006). *Effects of interferon beta-1a and -1b over time: 6-year results of an observational head-to-head study*. *Acta Neurol Scand*, 113(4):241-7.
109. Galetta SL, Markowitz C, Lee AG (2002). *Immunomodulatory agents for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a systematic review*. *Arch Intern Med*, 162(19):2161-9.
110. Oliver BJ, Kohli E, Kasper LH (2011). *Interferon therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of the comparative trials*. *J Neurol Sci*, 302(1-2):96-105.
111. Pachner AR, Warth JD, Pace A, Goelz S, Insight investigators (2009). *Effect of neutralizing antibodies on biomarker responses to interferon beta: the INSIGHT study*. *Neurology*, 73(18):1493-500.
112. Soelberg Sorensen P, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, Polman C, Pozzilli C, Ross C, *Multiple Sclerosis: EFNS Guidelines on the use of anti-interferon beta antibody measurements in multiple sclerosis*, in *European Handbook of Neurological Management*, Gilhus NE, Barnes MP, and Brainin M, Editors. 2011, Blackwell Publishing Ltd. p. 63-74.
113. Rudick RA, Polman CH (2009). *Current approaches to the identification and management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis*. *Lancet Neurol*, 8(6):545-59.
114. Hegen H, Schleiser M, Gneiss C, Di Pauli F, Ehling R, Kuenz B, Lutterotti A, Berger T, Deisenhammer F (2012). *Persistency of neutralizing antibodies depends on titer and interferon-beta preparation*. *Mult Scler*, 18(5):610-5.
115. Farrell RA, Giovannoni G (2007). *Measuring and management of anti-interferon beta antibodies in subjects with multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 13(5):567-77.
116. van Beers MM, Jiskoot W, Schellekens H (2010). *On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis*. *J Interferon Cytokine Res*, 30(10):767-75.
117. Nikfar S, Rahimi R, Abdollahi M (2010). *A meta-analysis of the efficacy and tolerability of interferon-beta in multiple sclerosis, overall and by drug and disease type*. *Clin Ther*, 32(11):1871-88.
118. Rommer PS, Zettl UK, Kieseier B, Hartung HP, Menge T, Frohman E, Greenberg BM, Hemmer B, Stüve O (2013). *Requirement for safety monitoring for approved MS therapies - An overview*. *Clin Exp Immunol*, DOI:10.1111/cei.12206.
119. Reder AT, Ebers GC, Traboulsee A, Li D, Langdon D, Goodin DS, Bogumil T, Beckmann K, Konieczny A, 16-Year Long-Term Follow-Up Study Investigators (2010). *Cross-sectional study assessing long-term safety of interferon-beta-1b for relapsing-remitting MS*. *Neurology*, 74(23):1877-85.
120. Rio J, Nos C, Tintore M, Borrás C, Galán I, Comabella M, Montalban X (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):400-6.
121. Rio J, Nos C, Tintore M, Tellez N, Galán I, Pelayo R, Comabella M, Montalban X (2006). *Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. *Ann Neurol*, 59(2):344-52.

122. Rio J, Comabella M, Montalban X (2009). *Predicting responders to therapies for multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol, 5(10):553-60.
123. Rudick RA, Lee JC, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E (2004). *Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients*. Ann Neurol, 56(4):548-55.
124. Waubant E, Vukusic S, Gignoux L, Dubief FD, Achiti I, Blanc S, Renoux C, Confavreux C (2003). *Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS*. Neurology, 61(2):184-9.
125. Derynck R, Content J, DeClercq E, Volckaert G, Tavernier J, Devos R, Fiers W (1980). *Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene*. Nature, 285(5766):542-7.
126. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR (2007). *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat Rev Drug Discov, 6(12):975-90.
127. Dhib-Jalbut S, Marks S (2010). *Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis*. Neurology, 74(Suppl 1):S17-24.
128. Vallittu AM, Saraste M, Airas L (2007). *CCR7 expression on peripheral blood lymphocytes is up-regulated following treatment of multiple sclerosis with interferon-beta*. Neurol Res, 29(8):763-6.
129. Graber JJ, Dhib-Jalbut S (2009). *Protective autoimmunity in the nervous system*. Pharmacol Ther, 121(2):147-59.
130. Bielekova B, Martin R (2004). *Development of biomarkers in multiple sclerosis*. Brain, 127(7):1463-78.
131. Goertsches R, Zettl UK (2007). *MS therapy research applying genome-wide RNA profiling of peripheral blood*. Int MS J, 14(3):98-107.
132. Paolicelli D, D'Onghia M, Pellegrini F, Dorenzo V, Iaffaldano P, Lavalpe V, Trojano M (2013). *The impact of neutralizing antibodies on the risk of disease worsening in interferon beta-treated relapsing multiple sclerosis: a 5 year post-marketing study*. J Neurol, 260(6):1562-8.
133. Farrell RA, Marta M, Gaeguta AJ, Souslova V, Giovannoni G, Creeke PI (2012). *Development of resistance to biologic therapies with reference to IFN-beta*. Rheumatology (Oxford), 51(4):590-9.
134. Killestein J, Polman CH (2011). *Determinants of interferon beta efficacy in patients with multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol, 7(4):221-8.
135. Rio J, Castillo J, Rovira A, Tintore M, Sastre-Garriga J, Horga A, Nos C, Comabella M, Aymerich X, Montalban X (2009). *Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS*. Mult Scler, 15(7):848-53.
136. Sormani M, Rio J, Tintore M, Signori A, Li D, Cornelisse P, Stubinski B, Stromillo M, Montalban X, De Stefano N (2013). *Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis*. Mult Scler, 19(5):605-12.
137. Rio J, Tintore M, Sastre-Garriga J, Nos C, Castillo J, Tur C, Comabella M, Montalban X (2012). *Change in the clinical activity of multiple sclerosis after treatment switch for suboptimal response*. Eur J Neurol, 19(6):899-904.
138. Paap BK, Hecker M, Koczan D, Zettl UK (2013). *Molecular Biomarkers in Multiple Sclerosis*. J Clin Cell Immunol, S10:009. DOI:10.4172/2155-9899.S10-009.
139. Goertsches R, Zettl U, Hecker M (2011). *Sieving treatment biomarkers from blood gene-expression profiles: a pharmacogenomic update on two types of multiple sclerosis therapy*. Pharmacogenomics, 12(3):423-32.
140. Barrett JC, Kawasaki ES (2003). *Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression*. Drug Discov Today, 8(3):134-41.
141. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG (2006). *The affymetrix GeneChip platform: an overview*. Methods Enzymol, 410:3-28.

142. Affymetrix *Data Sheet - GeneChip® Human Genome Arrays*. [PDF]. Verfügbar unter: http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/human_datasheet.pdf; Abgerufen: 12.02.2014.
143. Affymetrix *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*. [PDF]. Verfügbar unter: http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_technical_manual.pdf; Abgerufen: 07.11.2013.
144. Paap BK, Hundeshagen A, Hecker M, Zettl UK (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):4475-84.
145. Hecker M, Hartmann C, Kandulski O, Paap BK, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK (2013). *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):737-56.
146. Hecker M, Goertsches RH, Fatum C, Koczan D, Thiesen HJ, Guthke R, Zettl UK (2012). *Network analysis of transcriptional regulation in response to intramuscular interferon-beta-1a multiple sclerosis treatment*. *Pharmacogenomics J*, 12(4):360.
147. Goertsches RH, Hecker M, Koczan D, Serrano-Fernandez P, Moeller S, Thiesen HJ, Zettl UK (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):147-61.
148. Weinstock-Guttman B, Bhasi K, Badgett D, Tamano-Blanco M, Minhas M, Feichter J, Patrick K, Munschauer F, Bakshi R, Ramanathan M (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):113-25.
149. Reder AT, Velichko S, Yamaguchi KD, Hamamcioglu K, Ku K, Beekman J, Wagner TC, Perez HD, Salamon H, Croze E (2008). *IFN-beta1b induces transient and variable gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients independent of neutralizing antibodies or changes in IFN receptor RNA expression*. *J Interferon Cytokine Res*, 28(5):317-31.
150. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A, Capobianco M, Bertolotto A (2005). *Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 158(1-2):195-203.
151. Hecker M, Paap BK, Goertsches RH, Kandulski O, Fatum C, Koczan D, Hartung HP, Thiesen HJ, Zettl UK (2011). *Reassessment of blood gene expression markers for the prognosis of relapsing-remitting multiple sclerosis*. *PLoS One*, 6(12):e29648.
152. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, Naves R, Han M, Zhong F, Castellanos JG, Mair R, Christakos A, Kolkowitz I, Katz L, Killestein J, 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):406-12.
153. Bushnell SE, Zhao Z, Stebbins CC, Cadavid D, Buko AM, Whalley ET, Davis JA, Versage EM, Richert JR, Axtell RC, Steinman L, Medori R (2012). *Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFNbeta-1a in relapsing-remitting MS*. *Neurology*, 79(6):531-7.
154. Gao S, von der Malsburg A, Dick A, Faelber K, Schroder GF, Haller O, Kochs G, Daumke O (2011). *Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function*. *Immunity*, 35(4):514-25.
155. Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D (2003). *MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity*. *Mol Diagn*, 7(1):17-25.
156. Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS (2009). *Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity*. *Neurology*, 73(5):372-7.

157. Pungor E, Jr., Files JG, Gabe JD, Do LT, Foley WP, Gray JL, Nelson JW, Nestaas E, Taylor JL, Grossberg SE (1998). *A novel bioassay for the determination of neutralizing antibodies to IFN-beta1b*. J Interferon Cytokine Res, 18(12):1025-30.
158. Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Killestein J, McFarland HF, Oger J, Pachner AR, Petkau J, Reder AT, Reingold SC, Schellekens H, Sorensen PS (2010). *Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 9(7):740-50.
159. Malucchi S, Gilli F, Caldano M, Marnetto F, Valentino P, Granieri L, Sala A, Capobianco M, Bertolotto A (2008). *Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis*. Neurology, 70(13/2):1119-27.
160. Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A (2004). *Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis*. J Neurol, 251(Suppl 2):II/31-9.
161. Pachner AR, Bertolotto A, Deisenhammer F (2003). *Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of IFNbeta bioactivity: detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB)*. Neurology, 61(9 Suppl 5):S24-6.
162. van Baarsen LG, van der Pouw Kraan TC, Kragt JJ, Baggen JM, Rustenburg F, Hooper T, Meilof JF, Fero MJ, Dijkstra CD, Polman CH, Verweij CL (2006). *A subtype of multiple sclerosis defined by an activated immune defense program*. Genes Immun, 7(6):522-31.
163. van Baarsen LG, Vosslamber S, Tijssen M, Baggen JM, van der Voort LF, Killestein J, van der Pouw Kraan TC, Polman CH, Verweij CL (2008). *Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients*. PLoS One, 3(4):e1927.
164. Comabella M, Lunemann JD, Rio J, Sanchez A, Lopez C, Julia E, Fernandez M, Nonell L, Camina-Tato M, Deisenhammer F, Caballero E, Tortola MT, Prinz M, Montalban X, Martin R (2009). *A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis*. Brain, 132(12):3353-65.
165. Bustamante MF, Fissolo N, Rio J, Espejo C, Costa C, Mansilla MJ, Lizasoain I, Angeles Moro M, Carmen Edo M, Montalban X, Comabella M (2011). *Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 70(4):634-45.
166. Bustamante MF, Nurtdinov RN, Rio J, Montalban X, Comabella M (2013). *Baseline gene expression signatures in monocytes from multiple sclerosis patients treated with interferon-beta*. PLoS One, 8(4):e60994.
167. Feng X, Petraglia AL, Chen M, Byskosh PV, Boos MD, Reder AT (2002). *Low expression of interferon-stimulated genes in active multiple sclerosis is linked to subnormal phosphorylation of STAT1*. J Neuroimmunol, 129(1-2):205-15.
168. van der Voort LF, Vennegoor A, Visser A, Knol DL, Uitdehaag BM, Barkhof F, Oudejans CB, Polman CH, Killestein J (2010). *Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS*. Neurology, 75(14):1228-33.
169. Hesse D, Krakauer M, Lund H, Sondergaard HB, Limborg SJ, Soelberg Sorensen P, Sellebjerg F (2010). *Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon-beta in multiple sclerosis? Eur J Neurol, 18(2):266-72.*
170. Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Angerstein C, Kandulski O, Fatum C, Hartmann C, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK (2012). *Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance*. J Neuroinflammation, 9(140):1-13.
171. CPR UNIMORE Center for Genome Research. Verfügbar unter: http://www.xlab.unimo.it/GA_CDF; Abgerufen: 02.02.2012.

172. Ferrari F, Bortoluzzi S, Coppe A, Sirota A, Safran M, Shmoish M, Ferrari S, Lancet D, Danieli GA, Biciato S (2007). *Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot*. BMC Bioinformatics, 8:446.
173. *GeneAnnot Database*. Verfügbar unter: <http://genecards.weizmann.ac.il/geneannot>; Abgerufen: 14.03.2012.
174. Chalifa-Caspi V, Yanai I, Ophir R, Rosen N, Shmoish M, Benjamin-Rodrig H, Shklar M, Stein TI, Shmueli O, Safran M, Lancet D (2004). *GeneAnnot: comprehensive two-way linking between oligonucleotide array probesets and GeneCards genes*. Bioinformatics, 20(9):1457-8.
175. *GeneCards Database*. Verfügbar unter: <http://www.genecards.org>; Abgerufen: 14.03.2012.
176. Stelzer G, Dalah I, Stein TI, Satanower Y, Rosen N, Nativ N, Oz-Levi D, Olender T, Belinky F, Bahir I, Krug H, Perco P, Mayer B, Kolker E, Safran M, et al. (2011). *In-silico human genomics with GeneCards*. Hum Genomics, 5(6):709-17.
177. *Gene Expression Omnibus (GEO) Database*. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Abgerufen: 07.02.2013.
178. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, et al. (2013). *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update*. Nucleic Acids Res, 41(Database issue):D991-5.
179. Langsrud Y (2003). *ANOVA for unbalanced data: Use Type II instead of Type III sums of squares*. Statistics and Computing, 13(2):163-7.
180. Engelmann R, Hecker M (2013). *Engelmann-Hecker-Plot - EH-Plot*. In: Lemon J., et al. *Package 'plotrix'*. [PDF]. Verfügbar unter: <http://cran.r-project.org/web/packages/plotrix/plotrix.pdf>; Abgerufen: 10.12.2013.
181. Lemon J (2006). *Plotrix: a package in the red light district of R*. R-News, 6(4):8-12.
182. Karlovich C, Duchateau-Nguyen G, Johnson A, McLoughlin P, Navarro M, Fleurbaey C, Steiner L, Tessier M, Nguyen T, Wilhelm-Seiler M, Caulfield JP (2009). *A longitudinal study of gene expression in healthy individuals*. BMC Med Genomics, 2:33.
183. Fox J, Weisberg S (2013). *Package 'car'*. In: *An R Companion to Applied Regression*. [PDF]. Sage Publications. Verfügbar unter: <http://cran.r-project.org/web/packages/car/car.pdf>; Abgerufen: 21.10.2013.
184. *PubMed Datenbank*. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; Abgerufen: 04.01.2011.
185. Blasius AL, Beutler B (2010). *Intracellular toll-like receptors*. Immunity, 32(3):305-15.
186. Boo KH, Yang JS (2010). *Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon*. Yonsei Med J, 51(1):9-17.
187. Hall JC, Rosen A (2010). *Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity*. Nat Rev Rheumatol, 6(1):40-9.
188. Haller O, Kochs G, Weber F (2007). *Interferon, Mx, and viral countermeasures*. Cytokine Growth Factor Rev, 18(5-6):425-33.
189. Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S (2008). *Innate immune response to viral infection*. Cytokine, 43(3):336-41.
190. Sadler AJ, Williams BR (2008). *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat Rev Immunol, 8(7):559-68.
191. Takaoka A, Yanai H (2006). *Interferon signalling network in innate defence*. Cell Microbiol, 8(6):907-22.

192. Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, von Bernuth H, Yang K, Abel L, Picard C, Puel A, Casanova JL (2007). *Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses*. Immunol Rev, 220:225-36.
193. *Cytoscape Computerprogramm*. Verfügbar unter: <http://www.cytoscape.org>; Abgerufen: 15.03.2011.
194. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcoyne S, Lotia S, et al. (2007). *Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape*. Nat Protoc, 2(10):2366-82.
195. Encode Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, et al. (2007). *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. Nature, 447(7146):799-816.
196. *HMR Conserved Transcription Factor Binding Sites - tfbsConsSites track*. Verfügbar unter: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTrackUi?g=tfbsConsSites>; Abgerufen: 23.04.2012.
197. Meyer LR, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Kuhn RM, Wong M, Sloan CA, Rosenbloom KR, Roe G, Rhead B, Raney BJ, Pohl A, Malladi VS, Li CH, Lee BT, et al. (2013). *The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013*. Nucleic Acids Res, 41(Database issue):D64-9.
198. Wingender E (2008). *The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation*. Brief Bioinform, 9(4):326-32.
199. Levy S, Hannenhalli S (2002). *Identification of transcription factor binding sites in the human genome sequence*. Mamm Genome, 13(9):510-4.
200. Hornung V, Latz E (2010). *Intracellular DNA recognition*. Nat Rev Immunol, 10(2):123-30.
201. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T (2008). *Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(14):5477-82.
202. Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN (2009). *SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity*. Trends Immunol, 30(8):392-400.
203. Panne D, Maniatis T, Harrison SC (2007). *An atomic model of the interferon-beta enhanceosome*. Cell, 129(6):1111-23.
204. Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl UK, Rieckmann P (2008). *Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006*. Dtsch Arztebl Int, 105(7):113-9.
205. Kieseier BC, Stuve O (2011). *A critical appraisal of treatment decisions in multiple sclerosis--old versus new*. Nat Rev Neurol, 7(5):255-62.
206. Inusah S, Sormani MP, Cofield SS, Aban IB, Musani SK, Srinivasasainagendra V, Cutter GR (2010). *Assessing changes in relapse rates in multiple sclerosis*. Mult Scler, 16(12):1414-21.
207. Freedman MS, Selchen D, Arnold DL, Prat A, Banwell B, Yeung M, Morgenthau D, Lapierre Y, Canadian Multiple Sclerosis Working G (2013). *Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations*. Can J Neurol Sci, 40(3):307-23.
208. Rio J, Porcel J, Tellez N, Sanchez-Betancourt A, Tintore M, Arevalo MJ, Nos C, Montalban X (2005). *Factors related with treatment adherence to interferon beta and glatiramer acetate therapy in multiple sclerosis*. Mult Scler, 11(3):306-9.
209. Ruggieri RM, Settipani N, Viviano L, Attanasio M, Giglia L, Almasio P, La Bella V, Piccoli F (2003). *Long-term interferon-beta treatment for multiple sclerosis*. Neurol Sci, 24(5):361-4.
210. Portaccio E, Zipoli V, Siracusa G, Sorbi S, Amato MP (2008). *Long-term adherence to interferon beta therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Eur Neurol, 59(3-4):131-5.

211. Bussfeld P, Czekalla J (2010). *Therapieadhärenz bei Multipler Sklerose und Schizophrenie*. Fortschr Neurol Psychiatr, 78(3):139-46.
212. Devonshire V, Lapierre Y, Macdonell R, Ramo-Tello C, Patti F, Fontoura P, Suchet L, Hyde R, Balla I, Frohman EM, Kieseier BC, Group GAPS (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.
213. Koudriavtseva T, Onesti E, Pestalozza IF, Sperduti I, Jandolo B (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):575-84.
214. Cunningham A, Gottberg K, von Koch L, Hillert J (2010). *Non-adherence to interferon-beta therapy in Swedish patients with multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 121(3):154-60.
215. Reuss R (2013). *PEGylated interferon beta-1a in the treatment of multiple sclerosis - an update*. Biologics, 7:131-8.
216. Brunetti L, Wagner ML, Maroney M, Ryan M (2013). *Teriflunomide for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a review of clinical data*. Ann Pharmacother, 47(9):1153-60.
217. Fox RJ, Kita M, Cohan SL, Henson LJ, Zambrano J, Scannevin RH, O'Gorman J, Novas M, Dawson KT, Phillips JT (2014). *BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety*. Curr Med Res Opin, 30(2):251-62.
218. Gohlmann H, Talloen W (2009). *Gene Expression Studies Using Affymetrix Microarrays*. Taylor & Francis. ISBN:9781420065169.
219. Watkins NA, Gusnanto A, de Bono B, De S, Miranda-Saavedra D, Hardie DL, Angenent WG, Attwood AP, Ellis PD, Erber W, Foad NS, Garner SF, Isacke CM, Jolley J, Koch K, et al. (2009). *A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells*. Blood, 113(19):e1-9.
220. Provenzano M, Mocellin S (2007). *Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR*. Adv Exp Med Biol, 593:66-73.
221. Affymetrix Data Sheet - GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0. [PDF]. Verfügbar unter: http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/hta_array_2_0_datasheet.pdf; Abgerufen: 24.01.2014.
222. Mardis ER (2011). *A decade's perspective on DNA sequencing technology*. Nature, 470(7333):198-203.
223. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG, Stahl F (2013). *Transcriptome analysis using next-generation sequencing*. Curr Opin Biotechnol, 24(1):22-30.
224. Roy NC, Altermann E, Park ZA, McNabb WC (2011). *A comparison of analog and Next-Generation transcriptomic tools for mammalian studies*. Brief Funct Genomics, 10(3):135-50.
225. Sanchez-Pla A, Reverter F, Ruiz de Villa MC, Comabella M (2012). *Transcriptomics: mRNA and alternative splicing*. J Neuroimmunol, 248(1-2):23-31.
226. Auer PL, Srivastava S, Doerge RW (2012). *Differential expression--the next generation and beyond*. Brief Funct Genomics, 11(1):57-62.
227. Pascual V, Chaussabel D, Banchereau J (2010). *A genomic approach to human autoimmune diseases*. Annu Rev Immunol, 28:535-71.
228. Malone JH, Oliver B (2011). *Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome*. BMC Biol, 9:34.
229. Hannenhalli S (2008). *Eukaryotic transcription factor binding sites--modeling and integrative search methods*. Bioinformatics, 24(11):1325-31.
230. Elnitski L, Jin VX, Farnham PJ, Jones SJ (2006). *Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques*. Genome Res, 16(12):1455-64.

231. Kolchanov NA, Merkulova TI, Ignatieva EV, Ananko EA, Oshchepkov DY, Levitsky VG, Vasiliev GV, Klimova NV, Merkulov VM, Charles Hodgman T (2007). *Combined experimental and computational approaches to study the regulatory elements in eukaryotic genes*. *Brief Bioinform*, 8(4):266-74.
232. Yavartanoo M, Choi JK (2013). *ENCODE: A Sourcebook of Epigenomes and Chromatin Language*. *Genomics Inform*, 11(1):2-6.
233. Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, Sheffield NC, Stergachis AB, Wang H, Vernot B, Garg K, John S, Sandstrom R, Bates D, Boatman L, *et al.* (2012). *The accessible chromatin landscape of the human genome*. *Nature*, 489(7414):75-82.
234. Rudick RA, Rani MR, Xu Y, Lee JC, Na J, Shrock J, Josyula A, Fisher E, Ransohoff RM (2011). *Excessive biologic response to IFNbeta is associated with poor treatment response in patients with multiple sclerosis*. *PLoS One*, 6(5):e19262.
235. Rio J, Rovira A, Tintore M, Huerga E, Nos C, Tellez N, Tur C, Comabella M, Montalban X (2008). *Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. *Mult Scler*, 14(4):479-84.
236. Hesse D, Krakauer M, Lund H, Sondergaard HB, Langkilde A, Ryder LP, Sorensen PS, Sellebjerg F (2010). *Breakthrough disease during interferon-[beta] therapy in MS: No signs of impaired biologic response*. *Neurology*, 74(18):1455-62.
237. Creeke PI, Farrell RA (2013). *Clinical testing for neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis*. *Ther Adv Neurol Disord*, 6(1):3-17.
238. Hulst HE, Geurts JJ (2011). *Gray matter imaging in multiple sclerosis: what have we learned?* *BMC Neurol*, 11:153.
239. Williams GJ, Witt PL (1998). *Comparative study of the pharmacodynamic and pharmacologic effects of Betaseron and AVONEX*. *J Interferon Cytokine Res*, 18(11):967-75.
240. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Audano L, Castello A, Magliola U, Melis F, Giordana MT (2001). *Evaluation of bioavailability of three types of IFNbeta in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification*. *J Immunol Methods*, 256(1-2): 141-52.
241. Nissen KK, Laska MJ, Hansen B, Terkelsen T, Villesen P, Bahrami S, Petersen T, Pedersen FS, Nexø BA (2013). *Endogenous retroviruses and multiple sclerosis-new pieces to the puzzle*. *BMC Neurol*, 13:111.
242. Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK (2011). *MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Autoimmun Rev*, 11(3):174-9.
243. Witwer KW, Sisk JM, Gama L, Clements JE (2010). *MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response*. *J Immunol*, 184(5):2369-76.
244. Severa M, Remoli ME, Giacomini E, Ragimbeau J, Lande R, Uze G, Pellegrini S, Coccia EM (2006). *Differential responsiveness to IFN-alpha and IFN-beta of human mature DC through modulation of IFNAR1 expression*. *J Leukoc Biol*, 79(6):1286-94.
245. Serana F, Sottini A, Ghidini C, Zanotti C, Capra R, Cordioli C, Caimi L, Imberti L (2008). *Modulation of IFNAR1 mRNA expression in multiple sclerosis patients*. *J Neuroimmunol*, 197(1):54-62.
246. Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N (1998). *Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7*. *FEBS Lett*, 441(1):106-10.
247. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, Stark GR (2010). *Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta*. *J Immunol*, 185(10):5888-99.
248. Guo J, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC (2000). *A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3*. *EMBO J*, 19(24):6891-9.

249. Alexander WS, Hilton DJ (2004). *The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response*. Annu Rev Immunol, 22:503-29.
250. Vandebroek K, Alvarez J, Swaminathan B, Alloza I, Matesanz F, Urcelay E, Comabella M, Alcina A, Fedetz M, Ortiz MA, Izquierdo G, Fernandez O, Rodriguez-Ezpeleta N, Matute C, Caillier S, *et al.* (2011). *A cytokine gene screen uncovers SOCS1 as genetic risk factor for multiple sclerosis*. Genes Immun, 13(1):21-8.
251. Larange A, Antonios D, Pallardy M, Kerdine-Romer S (2009). *TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation*. J Leukoc Biol, 85(4):673-83.
252. Zhang X, Markovic-Plese S (2010). *Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 112(7):641-5.
253. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A (2011). *Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis*. Scand J Immunol, 74(1):1-13.
254. Deiss A, Brecht I, Haarmann A, Buttmann M (2013). *Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies: a 2013 update*. Expert Rev Neurother, 13(3):313-35.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb. A	Abbildung im Anhang
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
cMRT	kraniale Magnet-Resonanz-Tomographie
CPM	Cyclophosphamid
CRP	C-reaktives Protein
DMD	<i>Disease-Modifying Drugs</i> (= verlaufsmifizierende Pharmaka)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FS	Funktionssystem
Gd	Gadolinium
GEO	<i>Gene-Expression-Omnibus</i> (Datenbank)
GCS	Glukokortikosteroide
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HR	<i>Hazard-Ratio</i>
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IFNAR	IFN- α/β -Rezeptor
IgG	Immunglobulin-G
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IRG	Interferon-regulierte Gene

IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
IVIg	Intravenös applizierte Immunglobuline
KM	Kontrastmittel
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MX1	<i>Myxovirus Resistance Protein 1</i>
NAb	Neutralisierende Antikörper
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPMS	Primär chronisch-progrediente MS
PRMS	Progressiv-schubförmige MS
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RRMS	Schubförmig-remittierende MS
s.c.	subkutan
SE	<i>Standard Error</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SPMS	Sekundär chronisch-progrediente MS
Tab. A	Tabelle im Anhang
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstellen
TLR	<i>Toll-like-Receptor</i>
ZBP1	<i>Z-DNA-Binding Protein 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (2010)	6
Tab. 2	Interferon- β -Wirkstoffe: Herstellung und Anwendungscharakteristika .	14
Tab. 3	Vergleich der Kohorten bezüglich demographischer und klinischer Baseline-Parameter	42
Tab. A-1	Häufige Symptome der Multiplen Sklerose	100
Tab. A-2	Expanded Disability Status Scale (EDSS)	101
Tab. A-3	Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (2001)	102
Tab. A-4	MRT-Untersuchungen der MS-Patienten mit Befunden in T2-Wichtung	103
Tab. A-5	Vergleich der MRT-Befunde zwischen $MX1_{\text{hoch}}$ und $MX1_{\text{niedrig}}$	104
Tab. A-6	Gene der Interferon- β -Signalwege	105
Tab. A-7	Interaktionen der Interferon- β -Signalweg-Gene mit Literaturquellen ..	106
Tab. A-8	Interferon- β -Signalweg-Gene: Mikroarray-Daten und Expressionsvergleiche	108
Tab. A-9	Transkriptionsfaktorbindungsstellen des Interferon- β -Netzwerks	109
Tab. A-10	Korrelation PCR-Daten mit Mikroarray-Daten	110
Tab. A-11	Interferon- β -Signalweg-Gene: PCR-Daten und Expressionsvergleiche ..	111

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	8
Abb. 2	Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose	11
Abb. 3	Funktionsweise eines Affymetrix® Mikroarray-Chips, vereinfachte Darstellung	21
Abb. 4	Übersicht der Datenerhebung, Kohortenbildung und Therapieschemata	28
Abb. 5	Übersicht der Genexpressions-Vergleiche	29
Abb. 6	Kohorteneinteilung der Studienpopulation	41
Abb. 7	Mittlere kumulative Schubanzahl der beiden Kohorten	43
Abb. 8	Schubfreies Überleben beider Patientengruppen	44
Abb. 9	EDSS-Mittelwerte im Zeitverlauf für beide Patientenkohorten	45
Abb. 10	Schubraten und EDSS-Veränderungen dargestellt für beide MX1-Kohorten und die drei Interferon- β -Präparate	47
Abb. 11	Wirkung der Interferon- β -Therapie auf die MX1-Genexpression	48
Abb. 12	MX1-Genexpression vor und nach einem Monat Interferon- β -Therapie dargestellt für beide MX1-Kohorten und die drei Interferon- β -Präparate	49
Abb. 13	Physiologischer Verlauf der MX1-Transkriptmengen bei Probanden ...	50
Abb. 14	Interferon- β -induzierende Signalwege und Interferon- β -Effektor- Signalwege, vereinfachte Darstellung	53

Abb. 15	Vergleich der Expression von Signalweg-Genen zwischen MX1 _{hoch} und MX1 _{niedrig} vor Therapiebeginn	55
Abb. 16	Veränderungen der Expressionslevel von Signalweg-Genen in der MX1 _{niedrig} -Kohorte nach einem Monat subkutaner Interferon-β-Therapie	56
Abb. 17	Zusammenfassung der Expressionsunterschiede zwischen den Kohorten sowie der genregulatorischen Interferon-β-Therapieeffekte	57
Abb. A-1	Schubfreies Überleben der MX1 _{hoch} - und MX1 _{niedrig} -Patienten unter Therapie mit drei verschiedenen Interferon-β-Präparaten	112
Abb. A-2	Expressionsänderungen von Signalweg-Genen in der MX1 _{hoch} -Kohorte nach einem Monat subkutaner Interferon-β-Therapie	113
Abb. A-3	Vergleich der Expression von Signalweg-Genen zwischen MX1 _{hoch} und MX1 _{niedrig} nach einem Monat subkutaner Interferon-β-Therapie	114

8.4 Supplementäre Tabellen und Abbildungen

Tab. A-1: Häufige Symptome der Multiplen Sklerose

Funktionelles System	Häufige Symptome und Befunde
Pyramidenbahn	Zentrale Paresen und Spastik, Hyper- und Hyporeflexie, Kloni, Kontrakturen
Kleinhirn	Tremor, Ataxie, Dysmetrie, Schwindel, Nystagmus
Hirnstamm	Dysarthrie, Dysphagie, Augenmotilitätsstörungen, Funktionsstörungen der Nervi Facialis und Trigemini
Sensibilität/Schmerz	Hypästhesie, Parästhesie, gestörte Propriozeption (beinbetont), Neuropathische Schmerzen
Blase/Mastdarm	Blasen- und Mastdarmleerungsstörungen, Inkontinenz, sexuelle Funktionsstörungen
Visuell	Visusminderung, Gesichtsfeldausfälle, Optikusneuritis, Dyschromatopsie
Psychisch/Kognitiv	Depression, Euphorie, Fatigue, kognitive Defizite
Andere	Epileptische Anfälle

Tab. A-2: Expanded Disability Status Scale (EDSS) (nach [57])

EDSS	Beschreibung
0,0	Neurologische Untersuchung ohne pathologische Befunde.
1,0	Keine Behinderung. Minimale Abnormität in einem Funktionssystem (FS).
1,5	Keine Behinderung. Minimale Abnormität in mehr als einem FS.
2,0	Minimale Behinderung in einem FS.
2,5	Minimale Behinderung in zwei FS.
3,0	Uneingeschränkt gehfähig. Mässiggradige Behinderung in einem FS oder minimale Behinderung in drei bis vier FS.
3,5	Uneingeschränkt gehfähig. Mässiggradige Behinderung in zwei FS oder mässiggradige Behinderung in einem FS und minimale Behinderung in maximal zwei FS oder minimale Behinderung in fünf FS.
4,0	Gehstrecke mindestens 500 m ohne Hilfe und Pause. Aktiv während ca. zwölf Stunden pro Tag. Relativ schwere Behinderung.
4,5	Gehstrecke mindestens 300 m ohne Hilfe und Pause. Ganztägig arbeitsfähig, jedoch mit gewissen Einschränkungen. Relativ schwere Behinderung.
5,0	Gehstrecke etwa 200 m ohne Hilfe und Pause. Tägliche Aktivität beeinträchtigt. Starke Behinderung.
5,5	Gehstrecke etwa 100 m ohne Hilfe und Pause. Normale tägliche Aktivität unmöglich. Starke Behinderung.
6,0	Gehhilfe intermittierend oder einseitig konstant nötig, um etwa 100 m ohne Pause zu gehen.
6,5	Gehhilfe beidseits konstant nötig, um 20 m ohne Pause zu gehen.
7,0	Gehstrecke trotz Hilfsmitteln maximal 5 m. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Transfer und Fortbewegung im Rollstuhl selbständig.
7,5	Gehstrecke trotz Hilfsmitteln nur ein paar Schritte. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl.
8,0	Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden. Pfllegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme.
8,5	Überwiegend bettlägerig. Partiell nützlicher Gebrauch der Arme. Selbstpflege teilweise möglich.
9,0	Bettlägerig und hilflos. Essen und Kommunizieren möglich.
9,5	Bettlägerig und vollkommen hilflos. Nahrungsaufnahme und Kommunikation gestört. Schluckstörungen.
10,0	Tod durch Multiple Sklerose.

Tab. A-3: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (2001) (nach [38])

Klinische Präsentation		Erfüllte Kriterien (✓) und erforderliche Nachweise	
Schub-Anzahl	Läsions-orte ¹	Zeitliche Dissemination	Räumliche Dissemination
≥ 2	≥ 2	✓	✓
≥ 2	1	✓	Eines der Folgenden: - positives MRT ² - positiver Liquorbefund ⁴ und ≥ 2 MS-typische MRT-Läsionen - weiterer klinischer Schub (entsprechend einer anderen Läsionslokalisation)
1	≥ 2	Eines der Folgenden: - positives MRT ³ - zweiter klinischer Schub	✓
1	1 Klinisch isoliertes Syndrom	Eines der Folgenden: - positives MRT ³ - zweiter klinischer Schub	Eines der Folgenden: - positives MRT ² - positiver Liquorbefund ⁴ und ≥ 2 MS-typische MRT-Läsionen - weiterer klinischer Schub (entsprechend einer anderen Läsionslokalisation)
0	0 PPMS-verdächtige, chronische Progression	Positiver Liquorbefund ⁴ und Eines der Folgenden: - klinische Progression über 1 Jahr (pro- oder retrospektiv) - positives MRT ³	Positiver Liquorbefund ⁴ und Eines der Folgenden: - positives MRT (≥ 9 zerebrale T2-Läsionen oder ≥ 2 spinale Läsionen oder 4-8 zerebrale + 1 spinale Läsion) - positive visuell evozierte Potenziale und 4-8 zerebrale MRT-Läsionen oder < 4 zerebrale + 1 spinale Läsion

PPMS = Primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose

¹ Objektivierbare, klinisch manifestierte ZNS-Läsionen an verschiedener anatomischer Lokalisation

² Nachweis der räumlichen Dissemination im MRT durch drei der vier folgenden Kriterien:

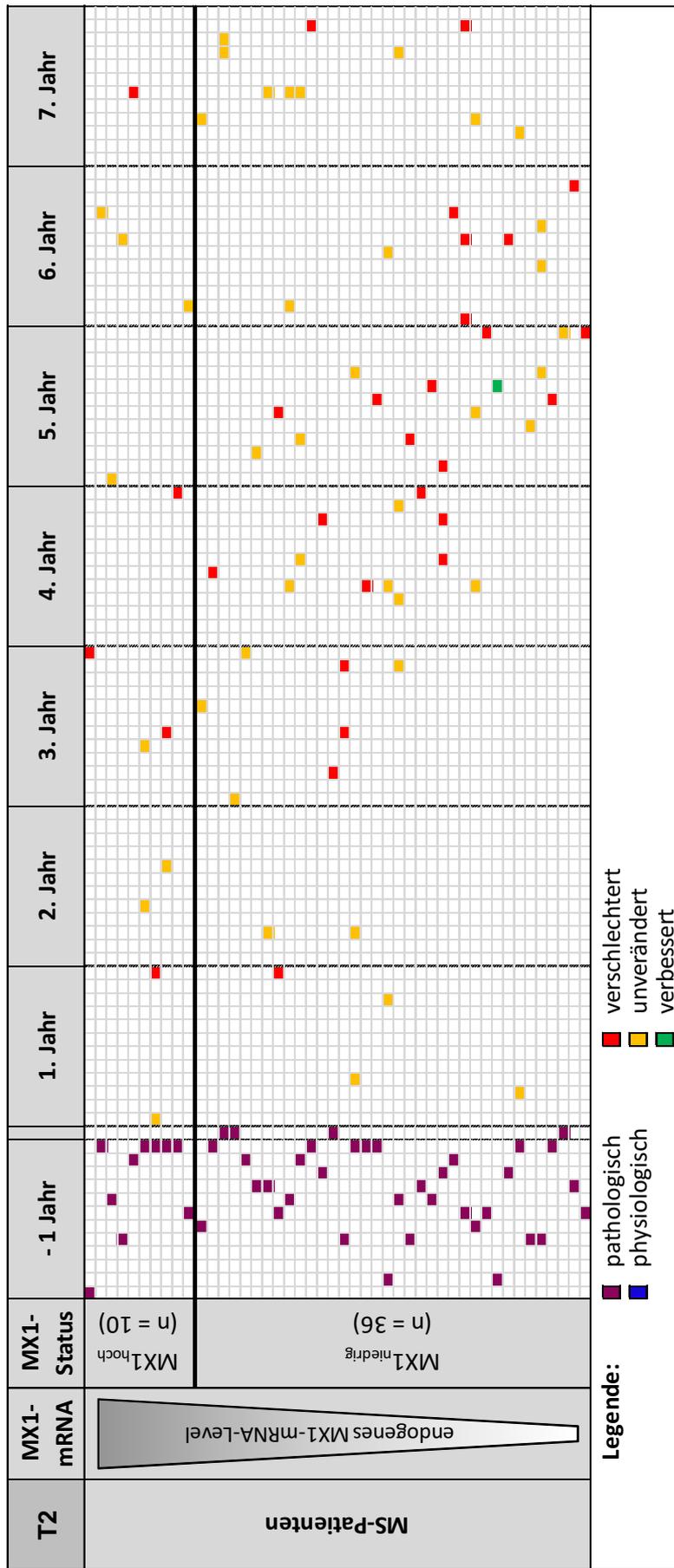
- Eine Gadolinium (Gd)-anreichernde Läsion oder neun T2-hyperintense Läsionen.
- Mindestens eine infratentorielle Läsion.
- Mindestens eine juxtakortikale Läsion.
- Mindestens drei periventrikuläre Läsionen.

³ Nachweis der zeitlichen Dissemination im MRT durch:

- Eine Gd-anreichernde Läsion mindestens drei Monate nach einem klinischen Schub, welche nicht dem Schubereignis entspricht. Falls dies nicht zutrifft:
- Verlaufs-MRT nach weiteren drei Monaten mit Nachweis einer neuen Gd-anreichernden oder T2-hyperintensiven Läsion.

⁴ Nachweis der intrazerebralen IgG-Synthese durch Detektion oligoklonaler Banden im Liquor zerebrospinalis oder eines erhöhten IgG-Index.

Tab. A-4: MRT-Untersuchungen der MS-Patienten mit Befunden in T2-Wichtung



Dargestellt sind die Zeitpunkte der kranialen MRT-Untersuchungen der einzelnen MS-Patienten im prätherapeutischen Baseline-Zeitraum (-1 Jahr) und anschließend im Verlauf unter Interferon- β -Therapie. Die qualitativen Befunde der T2-gewichteten Aufnahmen zu Baseline und die Befundentwicklung im Verlauf sind farblich kodiert. Die Patienten sind absteigend nach ihrer endogenen MX1-Expression sortiert (oben: Kohorte MX1^{hoch}, n=10; unten: Kohorte MX1^{niedrig}, n=36). Die Zeitspanne bis zur Durchführung eines Verlaufs-MRT zeigt sich sehr variabel und war tendenziell etwas länger bei Patienten mit besonders niedriger endogener MX1-Expression. Die meisten Verlaufs-Untersuchungen fielen in den Zeitraum 4. + 5. Jahr.

Tab. A-5: Vergleich der MRT-Befunde zwischen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig}

T2-Läsionen		Anzahl Patienten mit MRT-Untersuchung im Zeitraum									
		Baseline		2.-3. Jahr		4.-5. Jahr		6.-7. Jahr		1.-7. Jahr	
MX1-Status		MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}
MRT-Befund	physiologisch	0	0								
	pathologisch	10	36								
	verbessert			0	0	0	1	0	0	0	1
	unverändert			1	6	1	10	3	10	5	16
	verschlechtert			2	2	1	12	1	5	5	19
	gesamt	10	36	3	8	2	23	4	15	10	36
p-Wert		1,00		0,49		1,00		1,00		1,00	

T1-Läsionen		Anzahl Patienten mit MRT-Untersuchung im Zeitraum									
		Baseline		2.-3. Jahr		4.-5. Jahr		6.-7. Jahr		1.-7. Jahr	
MX1-Status		MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}
MRT-Befund	physiologisch	5	25								
	pathologisch	5	11								
	verbessert			0	0	0	0	0	1	0	1
	unverändert			3	8	0	18	4	8	8	25
	verschlechtert			0	0	2	5	0	6	2	10
	gesamt	10	36	3	8	2	23	4	15	10	36
p-Wert		0,28		1,00		0,07		0,40		0,77	

T1 mit KM		Anzahl Patienten mit MRT-Untersuchung im Zeitraum									
		Baseline		2.-3. Jahr		4.-5. Jahr		6.-7. Jahr		1.-7. Jahr	
MX1-Status		MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}
MRT-Befund	physiologisch	6	25								
	pathologisch	4	11								
	verbessert			1	2	0	4	0	1	2	5
	unverändert			1	6	2	13	4	11	7	22
	verschlechtert			1	0	0	6	0	3	1	9
	gesamt	10	36	3	8	2	23	4	15	10	36
p-Wert		0,71		0,41		1,00		1,00		0,67	

Atrophie		Anzahl Patienten mit MRT-Untersuchung im Zeitraum									
		Baseline		2.-3. Jahr		4.-5. Jahr		6.-7. Jahr		1.-7. Jahr	
MX1-Status		MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}	MX1 _{hoch}	MX1 _{niedrig}
MRT-Befund	physiologisch	7	30								
	pathologisch	3	6								
	verbessert			0	0	0	0	0	0	0	0
	unverändert			3	8	1	17	2	14	7	30
	verschlechtert			0	0	1	6	2	1	3	6
	gesamt	10	36	3	8	2	23	4	15	10	36
p-Wert		0,38		1,00		0,49		0,10		0,38	

Dargestellt sind die absoluten Zahlen der MRT-Befunde während verschiedener Untersuchungszeiträume, gruppiert nach den Patientengruppen MX1_{hoch} (n=10) und MX1_{niedrig} (n=36). Die vier Tabellen zeigen die Auswertung jeweils eines analysierten MRT-Parameters (T2-Läsionen, T1-Läsionen, T1 mit KM und Atrophie). Die berechneten p-Werte entstammen den jeweiligen Kohortenvergleichen mittels exakten Fisher-Tests. Für keinen untersuchten Parameter ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Befunden der beiden Kohorten – weder prätherapeutisch (Baseline) noch während eines der Verlaufszeiträume unter Interferon- β -Therapie.

Tab. A-6: Gene der Interferon- β -Signalwege

Gen-Symbol	GeneCards ID	Entrez ID	Chromosomen-Position	Offizieller Name
AKT1	GC14M104361	207	chr14:104306731-104333125 (-)	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ATF2	GC02M175645	1386	chr2:175645224-175741180 (-)	activating transcription factor 2
CHUK	GC10M101938	1147	chr10:101938114-101979334 (-)	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CXCL10	GC04M077132	3627	chr4:77161295-77163674 (-)	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DDX58	GC09M032447	23586	chr9:32445300-32516322 (-)	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
EIF2AK2	GC02M037246	5610	chr2:37179857-37405184 (-)	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
IFI27	GC14P093646	3429	chr14:93646832-93652786 (+)	interferon, alpha-inducible protein 27
IFIH1	GC02M162831	64135	chr2:162831835-162883285 (-)	interferon induced with helicase C domain 1
IFIT1	GC10P091142	3434	chr10:91142302-91153725 (+)	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFNAR1	GC21P033619	3454	chr21:33619084-33653999 (+)	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
IFNAR2	GC21P033524	3455	chr21:33524101-33558700 (+)	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
IFNB1	GC09M021067	3456	chr9:21067104-21067962 (-)	interferon, beta 1, fibroblast
IKKBK	GC08P042247	3551	chr8:42247986-42309122 (+)	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
IKBKE	GC01P204710	9641	chr1:204710419-204736845 (+)	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
IRAK1	GC0XM152929	3654	chrX:152929151-152938536 (-)	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK4	GC12P042439	51135	chr12:42439047-42468166 (+)	interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF3	GC19M054854	3661	chr19:54854641-54860936 (-)	interferon regulatory factor 3
IRF7	GC11M000602	3665	chr11:602555-605999 (-)	interferon regulatory factor 7
IRF9	GC14P023690	10379	chr14:23690267-23706451 (+)	interferon regulatory factor 9
ISG15	GC01P000938	9636	chr1:938742-939782 (+)	ISG15 ubiquitin-like modifier
ISG20	GC15P086983	3669	chr15:86982978-87000718 (+)	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
JAK1	GC01M065010	3716	chr1:65071494-65204775 (-)	Janus kinase 1
JUN	GC01M058958	3725	chr1:59019048-59022587 (-)	jun oncogene
MAP3K7	GC06M091282	6885	chr6:91282074-91353628 (-)	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MAPK14	GC06P036103	1432	chr6:36103551-36186513 (+)	mitogen-activated protein kinase 14
MAPK8	GC10P049279	5599	chr10:49184739-49317409 (+)	mitogen-activated protein kinase 8
MAVS	GC20P003783	57506	chr20:3775484-3795973 (+)	mitochondrial antiviral signaling protein
MX1	GC21P041720	4599	chr21:41714312-41753011 (+)	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
MYD88	GC03P038155	4615	chr3:38155009-38159517 (+)	myeloid differentiation primary response gene (88)
NFKB1	GC04P103641	4790	chr4:103641518-103757507 (+)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKB2	GC10P104144	4791	chr10:104144219-104152271 (+)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
NFKBIA	GC14M034940	4792	chr14:34940468-34943703 (-)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
OAS1	GC12P111807	4938	chr12:111829122-111854177 (+)	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
PIK3R1	GC05P067558	5295	chr5:67558218-67633405 (+)	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
REL	GC02P061020	5966	chr2:60962256-61003682 (+)	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
RELA	GC11M065178	5970	chr11:65177649-65186959 (-)	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
RELB	GC19P050196	5971	chr19:50196539-50233292 (+)	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
RSAD2	GC02P006969	91543	chr2:6935247-6955814 (+)	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
SOCS1	GC16M011255	8651	chr16:11255775-11257540 (-)	suppressor of cytokine signaling 1
SOCS3	GC17M073864	9021	chr17:73864454-73867753 (-)	suppressor of cytokine signaling 3
STAT1	GC02M191542	6772	chr2:191542121-191587181 (-)	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
STAT2	GC12M055021	6773	chr12:55021648-55040176 (-)	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa
TBK1	GC12P063132	29110	chr12:63132204-63182158 (+)	TANK-binding kinase 1
TICAM1	GC19M004767	148022	chr19:4766944-4782716 (-)	toll-like receptor adaptor molecule 1
TICAM2	GC05M114942	353376	chr5:114942238-114989757 (-)	toll-like receptor adaptor molecule 2
TIRAP	GC11P125658	114609	chr11:125658192-125670038 (+)	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR3	GC04P187227	7098	chr4:187227303-187243246 (+)	toll-like receptor 3
TLR4	GC09P119506	7099	chr9:119506291-119519589 (+)	toll-like receptor 4
TLR7	GC0XP012795	51284	chrX:12795123-12818401 (+)	toll-like receptor 7
TLR8	GC0XP012834	51311	chrX:12834679-12851209 (+)	toll-like receptor 8
TLR9	GC03M052230	54106	chr3:52230138-52235219 (-)	toll-like receptor 9
TNFSF10	GC03M173706	8743	chr3:173706158-173723963 (-)	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TRAF3	GC14P102313	7187	chr14:102313569-102442381 (+)	TNF receptor-associated factor 3
TRAF6	GC11M036467	7189	chr11:36467299-36488398 (-)	TNF receptor-associated factor 6
TYK2	GC19M010322	7297	chr19:10322209-10352211 (-)	tyrosine kinase 2
ZBP1	GC20M055602	81030	chr20:55612308-55629038 (-)	Z-DNA binding protein 1

Tab. A-7: Interaktionen der Interferon- β -Signalweg-Gene mit Literaturquellen

Gen 1	Interaktion	Gen 2	Literaturquellen										
			Blasius AL, et al. (2010). [185]	Bonjardim CA, et al. (2009). [81]	Boo KH, et al. (2010). [186]	Borden EC, et al. (2009). [82]	Fensterl V, et al. (2007). [126]	Hall JC, et al. (2010). [82]	Haller O, et al. (2009). [187]	Koyama S, et al. (2008). [188]	Sadler AJ, et al. (2008). [189]	Takaoka A, et al. (2006). [190]	Zhang SY, et al. (2007). [192]
AKT1	Aktivierung	IRF3	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-
ATF2	Bindung	DNA	o	o	-	X	X	-	X	o	-	X	o
ATF2	Bindung	JUN	o	o	-	X	X	-	X	o	-	-	o
CHUK	Phosphorylierung	IRF7	X	X	-	-	-	-	-	X	-	o	-
DDX58	Bindung	MAVS	-	X	-	X	X	-	X	X	-	X	-
DNA	Transkription	IFNB1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IFIH1	Bindung	MAVS	-	X	-	X	X	-	X	X	-	X	-
IFNAR	Phosphorylierung	STAT1	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
IFNAR	Phosphorylierung	STAT2	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
IFNAR1	Bindung	TYK2	-	X	o	X	X	X	o	-	X	X	-
IFNAR2	Bindung	JAK1	-	X	o	X	X	X	o	-	X	X	-
IFNB1	Bindung	IFNAR1	-	X	X	X	X	X	o	-	X	X	-
IFNB1	Bindung	IFNAR2	-	X	X	X	X	X	o	-	X	X	-
IKK	Phosphorylierung	NFKBIA	X	X	X	X	X	-	o	o	X	-	X
IRAK1	Phosphorylierung	CHUK	X	o	-	-	-	-	-	X	-	o	-
IRAK1	Bindung	TRAF6	X	o	X	-	-	-	-	X	-	-	X
IRAK4	Phosphorylierung	IRAK1	X	o	-	-	-	-	-	X	-	o	X
IRF3	Bindung	DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X
IRF3	Bindung	IRF3	-	X	-	X	-	X	X	-	-	-	o
IRF3	Bindung	IRF7	-	X	-	o	-	-	o	-	-	-	-
IRF7	Bindung	DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X
IRF7	Bindung	IRF7	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	o
IRF9	Bindung	STAT1+2	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
ISGF3	Bindung	ISRE	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
ISRE	Transkription	CXCL10	-	X	-	X	X	-	-	-	-	X	X
ISRE	Transkription	EIF2AK2	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
ISRE	Transkription	IFI27	-	-	o	X	-	o	-	-	-	-	-
ISRE	Transkription	IFIT1	-	X	o	X	X	o	X	-	X	-	-
ISRE	Transkription	ISG15	-	X	X	X	X	o	-	-	X	X	-
ISRE	Transkription	ISG20	-	-	X	X	X	o	X	-	X	-	-
ISRE	Transkription	MX1	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
ISRE	Transkription	OAS1	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	-
ISRE	Transkription	RSAD2	-	-	-	X	X	-	-	-	X	-	-
ISRE	Transkription	TNFSF10	-	-	-	X	o	-	X	-	-	-	-
JAK1	Phosphorylierung	TYK2	-	-	-	X	X	o	-	-	-	X	-
JUN	Bindung	DNA	o	o	-	X	X	-	X	o	-	X	o
MAP3K7	Phosphorylierung	IKK	X	X	o	X	o	-	o	X	-	-	o
MAP3K7	Phosphorylierung	MAPK14	o	o	-	X	o	-	-	o	-	-	o
MAP3K7	Phosphorylierung	MAPK8	o	o	-	X	o	-	-	o	-	-	o
MAPK14	Phosphorylierung	ATF2	o	o	-	X	X	-	-	o	-	-	o
MAPK8	Phosphorylierung	JUN	o	o	-	X	X	-	-	o	-	-	o

(Tab. A-7, Fortsetzung)

Gen 1	Interaktion	Gen 2	Bibliographische Referenzen											
			Blasius AL, et al. (2010). [185]	Bonjardim CA, et al. (2009). [81]	Boo KH, et al. (2010). [186]	Borden EC, et al. (2009). [81]	Fensterl V, et al. (2007). [126]	Hall JC, et al. (2010). [82]	Haller O, et al. (2009). [126]	Koyama S, et al. (2007). [187]	Sadler AJ, et al. (2008). [188]	Takaoka A, et al. (2008). [189]	Zhang SY, et al. (2006). [190]	Zhang SY, et al. (2007). [192]
MAVS	Bindung	TRAF3	-	X	-	X	X	-	o	X	-	o	-	
MAVS	Bindung	TRAF6	-	-	-	X	X	-	o	-	-	-	-	
MYD88	Bindung	IRAK4	X	o	-	-	-	-	-	X	-	o	X	
NFKB	Bindung	DNA	X	X	X	X	X	-	X	X	-	X	X	
NFKBIA	Inhibierung	NFKB	X	X	X	X	X	-	o	o	X	-	X	
PIK3R1	Phosphorylierung	AKT1	-	X	-	X	-	-	-	X	-	X	-	
SOCS	Inhibierung	IFNAR	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	
SOCS	Inhibierung	TIRAP	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SOCS	Inhibierung	TLR3	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SOCS	Inhibierung	TLR4	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SOCS	Inhibierung	TLR7	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SOCS	Inhibierung	TLR8	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SOCS	Inhibierung	TLR9	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
STAT1	Bindung	STAT1	-	X	-	o	X	X	-	-	X	X	-	
STAT1	Bindung	STAT2	-	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-	
STAT1+1	Bindung	DNA	-	X	-	-	X	X	-	-	X	X	-	
TBK/IKKe	Phosphorylierung	IRF3	X	X	X	X	X	-	X	X	-	X	X	
TBK/IKKe	Phosphorylierung	IRF7	-	X	X	X	X	-	X	X	-	X	X	
TICAM1	Bindung	TRAF3	X	X	o	X	X	-	-	X	-	o	X	
TICAM1	Bindung	TRAF6	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-	X	
TICAM2	Bindung	TICAM1	X	X	X	o	-	-	-	-	-	X	X	
TIRAP	Bindung	MYD88	o	X	X	-	-	-	-	-	-	X	X	
TLR3	Aktivierung	PIK3R1	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	
TLR3	Bindung	TICAM1	X	X	X	X	X	-	-	X	-	X	X	
TLR3	Bindung	TLR3	o	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	
TLR4	Bindung	TICAM2	X	X	X	o	-	-	-	-	-	X	X	
TLR4	Bindung	TIRAP	o	X	X	-	-	-	-	-	-	X	X	
TLR4	Bindung	TLR4	o	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
TLR7	Bindung	MYD88	X	X	X	-	-	-	-	X	-	X	X	
TLR7	Bindung	TLR7	o	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
TLR8	Bindung	MYD88	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	X	
TLR8	Bindung	TLR8	o	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
TLR9	Bindung	MYD88	X	X	X	-	-	-	-	X	-	X	X	
TLR9	Bindung	TLR9	o	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
TRAF3	Aktivierung	TBK/IKKe	X	X	X	X	X	-	o	X	-	o	X	
TRAF6	Bindung	MAP3K7	X	X	o	X	o	-	o	X	-	-	o	
TYK2	Phosphorylierung	JAK1	-	-	-	X	X	o	-	-	-	X	-	
ZBP1	Aktivierung	TRAF3	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legende:



Eine Interaktion der beiden Proteine ist genannt.



Eine Interaktion der beiden Proteine ist mit Art der Interaktion beschrieben.

Tab. A-8: Interferon- β -Signalweg-Gene: Mikroarray-Daten und Expressionsvergleiche

Gen-Symbol	Baseline: MX1 _{hoch} S.C. (Mittelwert)	Baseline: MX1 _{niedrig} S.C. (Mittelwert)	1 Monat: MX1 _{hoch} S.C. (Mittelwert)	1 Monat: MX1 _{niedrig} S.C. (Mittelwert)	Baseline: MX1 _{hoch} S.C. vs. MX1 _{niedrig} S.C.	1 Monat: MX1 _{hoch} S.C. vs. MX1 _{niedrig} S.C.	MX1 _{hoch} S.C.: 1 Monat vs. Baseline	MX1 _{niedrig} S.C.: 1 Monat vs. Baseline	ISGF3-Bindungsstelle (V\$ISRE_01)
AKT1	959	1056	1046	1087	0,138	0,330	0,469	0,299	-
ATF2	305	329	315	349	0,531	0,199	0,688	0,114	-
CHUK	475	390	544	429	0,635	0,482	0,031	0,043	-
CXCL10	989	309	1152	998	0,021	0,040	1,000	0,000	✓
DDX58	939	644	1171	1323	0,370	0,172	0,375	0,000	✓
EIF2AK2	1738	874	2422	2265	0,008	0,925	0,078	0,000	-
IFI27	974	50	1649	1555	0,001	0,925	0,297	0,000	-
IFIH1	592	345	675	832	0,000	0,128	0,469	0,000	✓
IFIT1	2986	630	5303	5745	0,000	0,330	0,109	0,000	-
IFNAR1	401	333	384	366	0,556	0,747	0,469	0,002	-
IFNAR2	982	809	954	778	0,312	0,138	0,813	0,245	-
IFNB1	10	11	8	9	0,925	0,312	0,469	0,641	✓
IKBKB	537	517	547	509	0,894	0,506	0,813	0,685	-
IKBKE	446	435	512	491	0,413	0,556	0,016	0,000	-
IRAK1	1592	1881	1570	1904	0,482	0,227	0,938	0,393	-
IRAK4	459	531	441	470	0,149	0,391	0,578	0,005	-
IRF3	1444	1472	1543	1573	0,985	0,955	0,375	0,070	-
IRF7	2787	1357	3203	3435	0,000	0,330	0,469	0,000	✓
IRF9	3744	2467	3538	3392	0,001	0,719	0,688	0,000	-
ISG15	4676	1553	7196	8729	0,000	0,138	0,156	0,000	-
ISG20	2290	1836	2495	2827	0,227	0,227	0,578	0,000	✓
JAK1	4336	4976	4554	4896	0,370	0,835	0,688	0,440	-
JUN	197	242	213	185	0,835	0,391	0,469	0,339	-
MAP3K7	803	749	767	741	0,413	0,556	0,578	0,641	-
MAPK14	1079	976	962	902	0,805	0,719	0,578	0,016	-
MAPK8	187	199	201	184	0,835	0,747	0,813	0,213	-
MAVS	370	374	369	361	0,865	0,805	1,000	0,253	-
MX1	5894	1668	8019	8110	0,000	0,776	0,156	0,000	-
MYD88	8034	6627	8741	8035	0,608	0,608	0,297	0,000	-
NFKB1	2119	2122	2134	2129	0,925	0,925	0,469	0,887	-
NFKB2	403	426	392	418	0,391	0,690	0,813	0,404	-
NFKBIA	5164	5461	4964	4963	0,985	0,776	0,938	0,570	-
OAS1	2976	1219	3497	3498	0,005	0,556	0,469	0,000	-
PIK3R1	1016	959	1298	954	0,582	0,172	0,078	0,952	-
REL	1147	1029	1135	1064	0,662	0,865	1,000	0,318	-
RELA	912	919	895	949	0,925	0,582	0,813	0,584	-
RELB	458	497	444	491	0,435	0,391	0,578	1,000	-
RSAD2	1908	335	3584	4300	0,000	0,243	0,078	0,000	-
SOCS1	90	71	92	101	0,662	0,747	1,000	0,017	✓
SOCS3	206	193	170	172	0,662	0,985	0,047	0,109	✓
STAT1	5600	2294	4034	3826	0,002	0,955	0,375	0,000	-
STAT2	616	427	501	594	0,071	0,259	0,219	0,000	✓
TBK1	776	781	765	879	0,835	0,531	0,688	0,005	-
TICAM1	296	264	278	269	0,719	0,865	0,938	0,529	-
TICAM2	1154	1059	1006	1068	0,199	0,458	0,031	0,952	-
TIRAP	180	155	154	165	0,227	0,776	0,219	0,140	-
TLR3	54	79	125	126	0,059	0,719	0,016	0,000	-
TLR4	1599	1494	1571	1510	0,719	0,608	0,813	0,871	-
TLR7	524	360	517	542	0,458	0,582	0,938	0,000	-
TLR8	2363	1738	2017	1653	0,662	0,556	0,469	0,070	-
TLR9	293	336	239	273	0,582	0,662	0,219	0,002	-
TNFSF10	5474	3462	5732	5823	0,118	0,531	0,688	0,000	-
TRAF3	470	460	464	437	0,635	0,312	0,688	0,025	-
TRAF6	519	540	539	540	0,719	0,925	0,469	0,903	-
TYK2	1830	1774	1767	1709	0,776	1,000	0,297	0,092	-
ZBP1	210	125	258	268	0,026	0,435	0,469	0,000	✓

Legende:

 Expression auf signifikant höherem Level (p-Wert < 0,01)	<input checked="" type="checkbox"/> ja
 Expression auf signifikant niedrigerem Level (p-Wert < 0,01)	<input type="checkbox"/> nein

Für die Gene der IFN- β -Signalwege sind die mittleren Mikroarray-Signalintensitäten der Kohorten (MX1_{hoch}, MX1_{niedrig}) zu Baseline und nach einem Monat Therapie dargelegt. Zudem finden sich die berechneten p-Werte (Wilcoxon-Test, gerundet) der Expressionsvergleiche (Spalte 6-9), sowie Informationen über vorhergesagte ISGF3-Bindungsstellen.

Tab. A-9: Transkriptionsfaktorbindungsstellen des Interferon- β -Netzwerks

Gen-Symbol	Transkriptionsfaktorbindungsstellen für						Analysierte Transkriptionsfaktoren		
	IRF7	JUN	ATF2	NFkB	STAT1/2	ISGF3	TF-Gene	Transfac-Accession	Transfac-Identifizier
AKT1	-	-	-	-	-	-			
ATF2	-	x	x	-	-	-	IRF3	-	-
CHUK	-	x	x	-	-	-			
CXCL10	-	x	-	x	-	x	IRF7	M00453	V\$IRF7_01
DDX58	x	-	-	x	-	x			
EIF2AK2	-	-	-	-	x	-	JUN	M00037	V\$NFE2_01
IFI27	-	-	-	-	-	-		M00172	V\$AP1FJ_Q2
IFIH1	-	-	-	-	-	x		M00173	V\$AP1_Q2
IFIT1	-	-	-	-	-	-		M00188	V\$AP1_Q4
IFNAR1	-	-	-	-	-	-		M00174	V\$AP1_Q6
IFNAR2	-	-	-	-	-	-		M00199	V\$AP1_C
IFNB1	x	-	-	x	-	x		M00517	V\$AP1_01
IKBKB	-	-	x	-	-	-		M00490	V\$BACH2_01
IKBKE	-	-	-	x	-	-		M00495	V\$BACH1_01
IRAK1	-	x	x	-	-	-			
IRAK4	-	-	-	-	-	-			
IRF3	-	-	-	x	x	-	ATF2	M00039	V\$CREB_01
IRF7	-	-	-	-	-	x		M00177	V\$CREB_Q2
IRF9	-	x	-	x	-	-		M00178	V\$CREB_Q4
ISG15	-	-	-	-	-	-		M00179	V\$CREBP1_Q2
ISG20	x	x	-	-	-	x		M00041	V\$CREBP1CJUN_01
JAK1	-	-	x	-	-	-		M00113	V\$CREB_02
JUN	-	x	x	-	x	-		M00114	V\$TAXCREB_01
MAP3K7	-	-	x	-	-	-		M00115	V\$TAXCREB_02
MAPK14	-	-	-	x	x	-		M00040	V\$CREBP1_01
MAPK8	-	x	x	-	-	-		M00017	V\$ATF_01
MAVS	-	-	-	-	-	-	NFkB	M00051	V\$NFKAPPAB50_01
MX1	-	-	-	-	-	-		M00052	V\$NFKAPPAB65_01
MYD88	-	x	-	-	-	-		M00054	V\$NFKAPPAB_01
NFKB1	-	-	x	x	-	-		M00053	V\$CREL_01
NFKB2	-	x	x	x	-	-		M00194	V\$NFKB_Q6
NFKBIA	-	x	x	x	x	-		M00208	V\$NFKB_C
OAS1	-	-	-	-	-	-	STAT1/2	M00223	V\$STAT_01
PIK3R1	-	x	-	x	x	-		M00224	V\$STAT1_01
REL	-	-	x	x	x	-		M00225	V\$STAT3_01
RELA	-	x	x	-	-	-		M00457	V\$STAT5A_01
RELB	-	-	x	x	-	-		M00459	V\$STAT5B_01
RSAD2	-	-	-	-	-	-		M00460	V\$STAT5A_02
SOCS1	x	-	x	x	x	x	ISGF3	M00258	V\$ISRE_01
SOCS3	-	-	x	x	x	x			
STAT1	x	-	-	-	-	-			
STAT2	x	-	-	-	-	x			
TBK1	-	x	-	-	-	-			
TICAM1	-	-	-	-	-	-			
TICAM2	-	-	-	-	-	-			
TIRAP	-	-	-	-	-	-			
TLR3	-	-	-	-	-	-			
TLR4	-	-	-	-	-	-			
TLR7	-	-	-	x	-	-			
TLR8	-	-	-	-	-	-			
TLR9	-	-	-	-	-	-			
TNFSF10	-	-	-	-	-	-			
TRAF3	-	x	-	-	-	-			
TRAF6	-	-	-	x	x	-			
TYK2	-	-	-	-	-	-			
ZBP1	-	-	-	-	-	x			

Legende:

- keine Bindestelle vorhergesagt
- x Bindestelle innerhalb von 1000 Basenpaaren um den Transkriptionsstart vorhergesagt

Die regulatorischen DNA-Regionen der IFN- β -Signalweg-Gene wurden auf Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren der Signalwege untersucht (links). Die für die Vorhersage verwendeten Bindemotive der acht Transkriptionsfaktoren entstammen der Transfac-Datenbank (rechts).

Tab. A-10: Korrelation PCR-Daten mit Mikroarray-Daten

Gen-Symbol	TaqMan Assay	Spearman Rang-korrelationskoeffizient	p-Wert
CXCL10	Hs00171042_m1	- 0,83	$< 2,2 \times 10^{-16}$
MX1	Hs00895608_m1	- 0,92	$< 2,2 \times 10^{-16}$
MYD88	Hs00182082_m1	- 0,63	$< 2,2 \times 10^{-16}$
RSAD2	Hs00369813_m1	- 0,88	$< 2,2 \times 10^{-16}$
SOCS1	Hs00705164_s1	- 0,26	$1,6 \times 10^{-02}$
SOCS3	Hs02330328_s1	- 0,50	$1,0 \times 10^{-06}$
STAT1	Hs01013996_m1	- 0,81	$< 2,2 \times 10^{-16}$
STAT2	Hs01013123_m1	- 0,38	$2,6 \times 10^{-04}$
TLR3	Hs01551078_m1	- 0,49	$1,4 \times 10^{-06}$
TLR4	Hs00152939_m1	- 0,43	$3,5 \times 10^{-05}$
TLR7	Hs00152971_m1	- 0,72	$< 2,2 \times 10^{-16}$
TLR8	Hs00607866_mH	- 0,41	$7,4 \times 10^{-05}$
TLR9	Hs00152973_m1	0,08	$4,3 \times 10^{-01}$
TNFSF10	Hs00921974_m1	- 0,80	$< 2,2 \times 10^{-16}$

Zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse wurden die mRNA-Level für 14 der 56 IFN- β -Signalweg-Gene mittels qRT-PCR nachbestimmt. Die Korrelation der Ergebnisse beider Messmethoden wurde geprüft. Dargestellt sind die hierfür berechneten Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman) und p-Werte. Der Wert $2,2 \times 10^{-16}$ ist die maximale Rechengenauigkeit der Programmierumgebung „R“. Zudem sind die zur PCR-Messung verwendeten TaqMan Assays der Gene gelistet.

Tab. A-11: Interferon- β -Signalweg-Gene: PCR-Daten und Expressionsvergleiche

Gen-Symbol	Baseline: MX1 _{hoch} S.C. (Mittelwert)	Baseline: MX1 _{niedrig} S.C. (Mittelwert)	1 Monat: MX1 _{hoch} S.C. (Mittelwert)	1 Monat: MX1 _{niedrig} S.C. (Mittelwert)	Baseline: MX1 _{hoch} S.C. vs. MX1 _{niedrig} S.C.	1 Monat: MX1 _{hoch} S.C. vs. MX1 _{niedrig} S.C.	MX1 _{hoch} S.C.: 1 Monat vs. Baseline	MX1 _{niedrig} S.C.: 1 Monat vs. Baseline
CXCL10	30,73	32,88	30,53	30,29	0,028	0,613	1,000	0,000
MX1	25,24	27,72	24,88	24,88	0,000	0,659	0,813	0,000
MYD88	25,70	26,61	26,03	25,97	0,008	0,527	0,313	0,000
RSAD2	27,88	30,79	26,82	26,71	0,000	0,900	0,188	0,000
SOCS1	27,75	28,70	27,97	28,15	0,178	0,659	0,625	0,003
SOCS3	26,73	27,51	27,21	27,45	0,079	0,447	0,188	0,946
STAT1	23,76	25,29	24,31	24,18	0,010	0,659	0,313	0,000
STAT2	25,26	26,87	25,90	25,87	0,001	0,900	0,188	0,000
TLR3	33,77	33,92	33,20	32,95	0,950	0,659	0,438	0,000
TLR4	26,56	27,54	27,09	27,30	0,019	0,569	0,188	0,026
TLR7	29,43	30,15	29,91	29,46	0,250	0,447	0,188	0,000
TLR8	26,44	27,94	27,20	27,68	0,015	0,308	0,125	0,076
TLR9	31,80	32,37	32,57	32,61	0,447	0,569	0,313	0,014
TNFSF10	26,28	27,41	26,51	26,17	0,023	0,278	0,813	0,000

Legende:

- Expression auf signifikant höherem Level (p-Wert < 0,01)
- Expression auf signifikant niedrigerem Level (p-Wert < 0,01)

Für 14 der 56 IFN- β -Signalweg-Gene wurden die mRNA-Level mittels qRT-PCR nachbestimmt. Dargestellt sind die mittleren C_T -Werte der MX1_{hoch}-Patienten (n=5) und MX1_{niedrig}-Patienten (n=21) zu Baseline und nach dem ersten Therapiemonat. Zudem sind die p-Werte (Wilcoxon-Test, gerundet) der Expressionsvergleiche zwischen den Kohorten sowie zwischen beiden Zeitpunkten angegeben (Spalte 6-9).

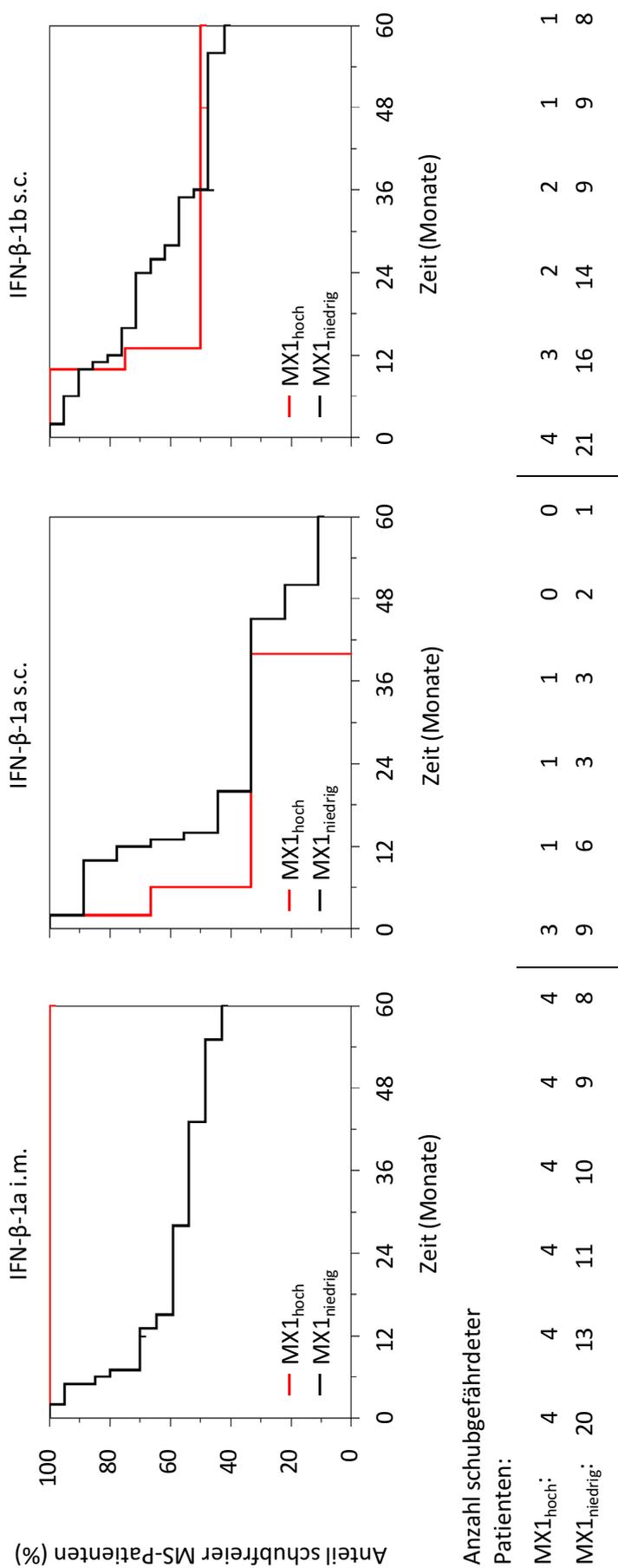


Abb. A-1: Schubfreies Überleben der MX1^{hoch}- und MX1^{niedrig}-Patienten unter Therapie mit drei verschiedenen Interferon-β-Präparaten

Die dargestellten Kaplan-Meier-Kurven repräsentieren den Anteil an Patienten, die seit Studienbeginn keinen Schub erlitten. Absolute Patientenzahlen gibt untenstehende Tabelle wider. Vertikale Striche entsprechen rechts-zensierten Studienabbrüchern (n=3). Die Kurvenverläufe der MX1^{hoch}-Patienten (rot) und MX1^{niedrig}-Patienten (schwarz) wurden mittels Log-Rank-Test verglichen. Unter s.c. IFN-β-Therapie war die Zeit bis zum Auftreten eines ersten Schubes bei beiden Patientengruppen ähnlich. Bei Therapie mit i.m. IFN-β divergierten die Kurven, mit früheren Schüben bei MX1^{niedrig}-Patienten. Dieser Unterschied lag jedoch knapp oberhalb des Signifikanzlevels (p-Wert = 0,072).

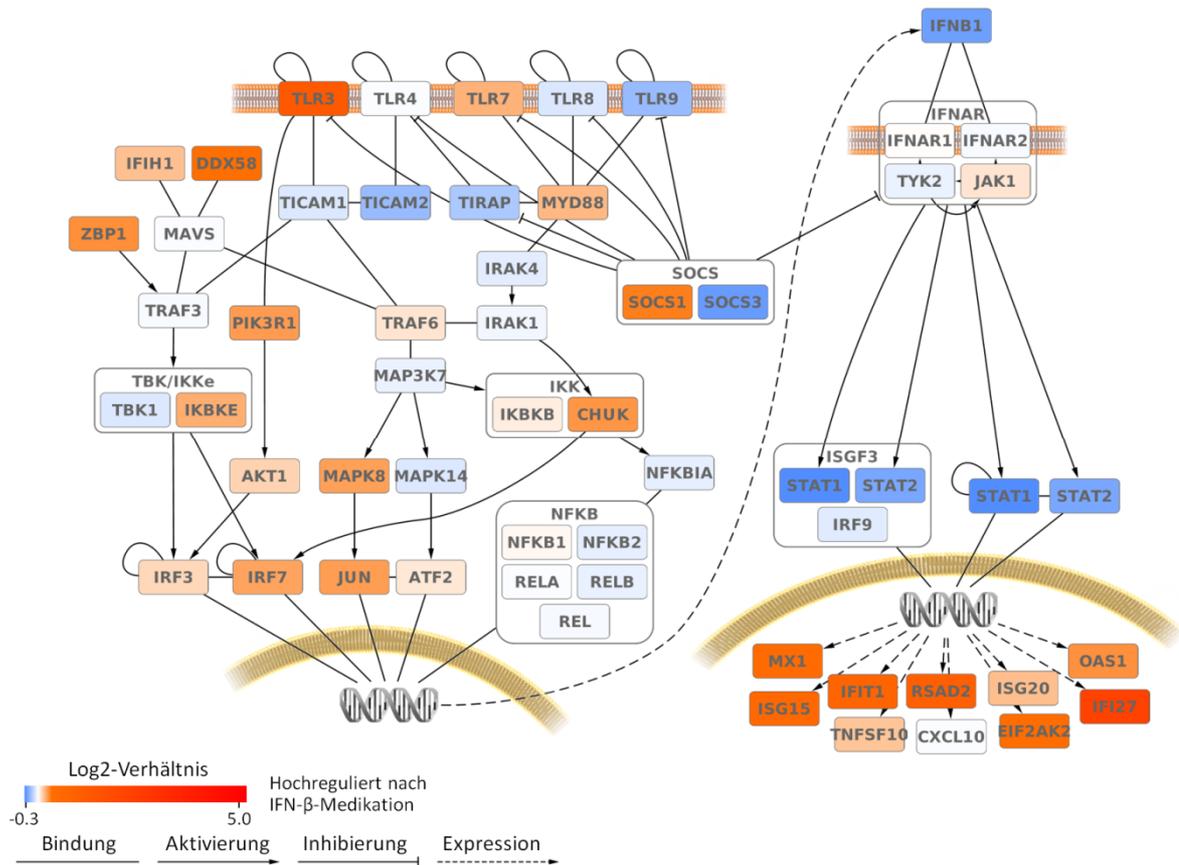


Abb. A-2: Expressionsänderungen von Signalweg-Genen in der MX1_{hoch}-Kohorte nach einem Monat subkutaner Interferon-β-Therapie

Die Farbe jedes Gens entspricht dem Log₂-Verhältnis der Expressionslevel vor Therapieinitiierung und nach dem ersten Therapiemonat. Keines der Gene zeigte nach einmonatiger Interferon-β-Therapie eine signifikante Änderung der Expressionsstärke. Dennoch war die Transkription einiger Gene im Vergleich zu Baseline tendenziell moduliert. So waren beispielsweise IFI27 (p-Wert = 0,078) und der Rezeptor TLR3 (p-Wert = 0,016) moderat hochreguliert, wohingegen der Transkriptionsfaktor STAT1 (p-Wert = 0,375) tendenziell herabreguliert war.

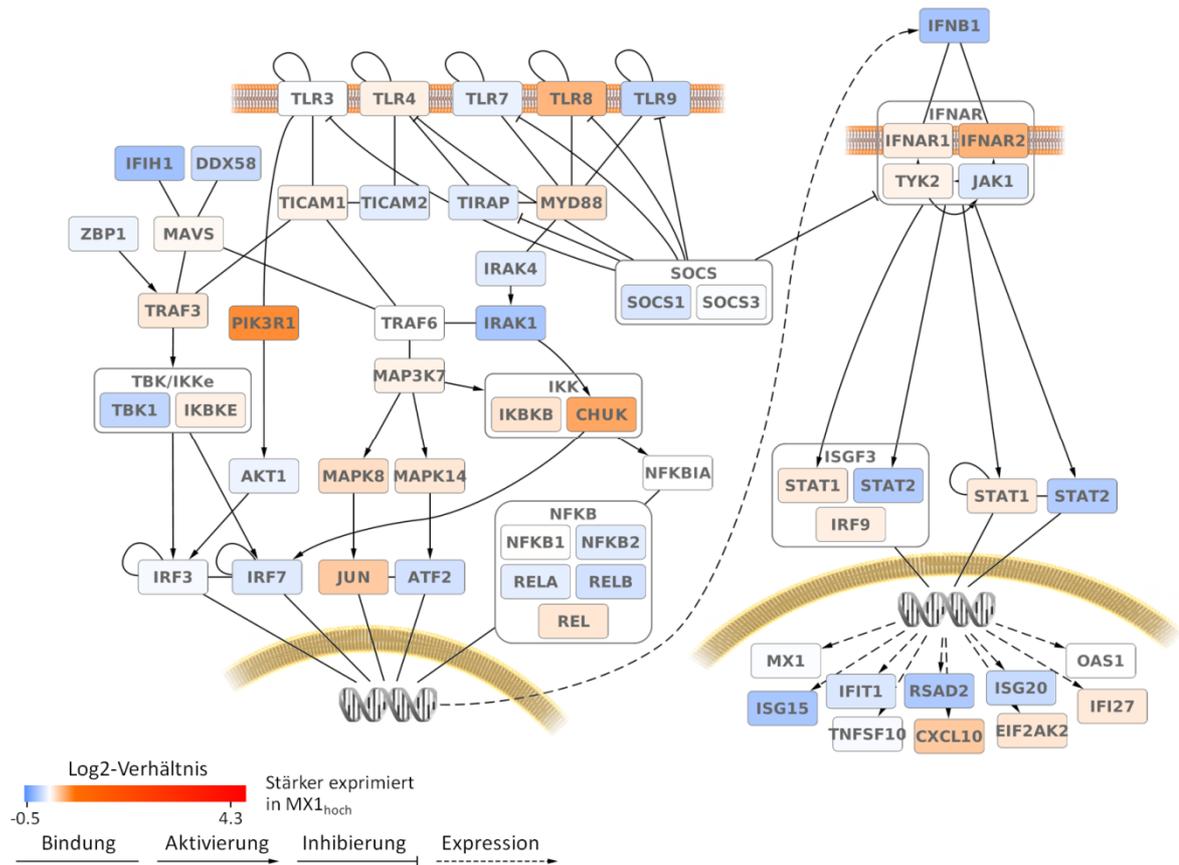


Abb. A-3: Vergleich der Expression von Signalweg-Genen zwischen MX1_{hoch} und MX1_{niedrig} nach einem Monat subkutaner Interferon- β -Therapie

Die Größenordnung des mittleren Expressionsunterschiedes zwischen MX1_{hoch}-Patienten (n=7) und MX1_{niedrig}-Patienten (n=30) ist durch die Farbe jedes Gens dargestellt. Nach einem Monat unter Interferon- β -Therapie waren die Expressionslevel der Signalweg-Gene in beiden Kohorten ähnlich. Auch die elf prätherapeutisch in MX1_{hoch}-Patienten überexprimierten Gene zeigten unter Therapie keinen signifikanten Unterschied der Transkriptionsstärke (Abb. 15).

8.5 Thesen

1. Eine international etablierte Basistherapie der schubförmigen Multiplen Sklerose (RRMS) stellt das immunmodulatorisch wirksame Interferon- β (IFN- β) dar. Das individuelle Therapieansprechen ist sehr heterogen und bislang kaum prognostizierbar. Auch die molekularen Wirkmechanismen der Pharmakotherapie sind noch unzureichend erforscht.
2. Einige Therapie-naive MS-Patienten zeigen eine verstärkte endogene IFN-Typ-I-Aktivität gemessen an einer erhöhten Expression des IFN-stimulierten Gens MX1 vor Therapie. Die prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf unter IFN- β -Therapie und die molekularen Ursachen dieses Phänomens sind bislang nicht geklärt.
3. In dieser Arbeit wurde die prognostische Wertigkeit einer prätherapeutisch erhöhten MX1-Expression für den langfristigen Krankheitsverlauf bei RRMS-Patienten untersucht. Ferner sollte eine systembiologische Analyse der IFN- β -Signalwege Aufschluss über mögliche Ursachen einer individuell verstärkten endogenen MX1-Expression geben und das Wissen über molekulare Wirkmechanismen von IFN- β erweitern.
4. Grundlage der Analysen bildeten Mikroarray-Transkriptomdaten aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von 61 RRMS-Patienten zu zwei Zeitpunkten – unmittelbar vor Initiierung einer IFN- β -Therapie (i.m. IFN- β -1a, s.c. IFN- β -1a oder s.c. IFN- β -1b) sowie nach dem ersten Therapiemonat. Die Beurteilung des Krankheitsverlaufs basierte auf fünfjährigen, prospektiven Daten zu klinischen Schüben und Progression der Symptomatik sowie siebenjährigen Daten zu paraklinischen MRT-Befunden. Patienten mit starker (Kohorte MX1_{hoch}, n=11) und schwacher (Kohorte MX1_{niedrig}, n=50) prätherapeutischer MX1-Expression wurden bezüglich des Krankheitsverlaufs und der Genexpression verglichen.

5. Nach den vorliegenden Daten zeigt die Ausprägung der endogenen MX1-Expression im Blut von RRMS-Patienten keine signifikante Assoziation zum langfristigen klinischen und MRT-morphologischen Krankheitsverlauf unter IFN- β -Therapie und erlaubt diesbezüglich keine Prognose. Jedoch ergeben sich Hinweise auf Unterschiede des MX1-abhängigen Krankheitsverlaufs zwischen den drei IFN- β -Präparaten.
6. Therapeutisches IFN- β bewirkt bei Patienten mit niedrigen endogenen MX1-mRNA-Leveln eine starke Induktion dieses Gens; bei MX1_{hoch}-Patienten erfolgt nur eine geringe Transkriptionssteigerung. Die MX1-mRNA-Level unter Therapie sind in beiden Patientengruppen auf ähnlichem Niveau und somit unabhängig von der prätherapeutischen Expression.
7. Analysen der MX1-Expression in einer gesunden Kohorte erlaubten Rückschlüsse auf die physiologische Aktivität dieses Gens. Eine verstärkte endogene MX1-Transkription ist nicht MS-spezifisch und vermutlich kein transientes Phänomen, sondern vielmehr eine individuelle Konstitution des Immunsystems, die auch bei etwa 20 % gesunder Menschen beobachtet werden kann.
8. Die IFN- β -Signalwege wurden literaturbasiert konstruiert, um die Expression der beteiligten Gene zwischen den Kohorten und über die Zeit zu vergleichen. Patienten mit erhöhter endogener MX1-Expression zeichnen sich auch durch vermehrte Transkriptmengen anderer ISG (z.B. IFI27, RSAD2), zellulärer Rezeptoren (z.B. IFIH1) und Transkriptionsfaktoren (z.B. IRF7, STAT1, IRF9) aus.
9. Auf molekularer Ebene bewirkt appliziertes IFN- β bei MX1_{niedrig}-Patienten eine starke transkriptionelle Induktion zahlreicher IFN- β -Signalweg-Gene. Bei Patienten mit endogen bereits aktivierten Signalwegen erfolgt nur eine geringgradige Modulation der Expressionsstärke dieser Gene. Nach einmonatiger Therapie sind die mRNA-Level der Signalweg-Gene in beiden Kohorten auf ähnlichem Niveau.

10. Das Muster prätherapeutisch überexprimierter Signalweg-Gene in MX1_{hoch}-Patienten zeigt starke Ähnlichkeit mit dem Muster pharmakologisch induzierter Gene bei MX1_{niedrig}-Patienten. Somit spiegelt die MX1-Überexpression einiger MS-Patienten eine endogene IFN- β -ähnliche Aktivität wider.
11. Eine Transkriptionsfaktorbindungsstellen-Analyse zeigte, dass der Transkriptionsfaktor-Komplex ISGF3 – bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF9 – maßgeblich an einer verstärkten IFN-Typ-I-Gensignatur beteiligt ist. Bindestellen für ISGF3 finden sich in den Promotorbereichen zahlreicher endogen überexprimierter Signalweg-Gene.
12. Die gewonnen Erkenntnisse konnten das Wissen über die prognostische Bedeutung sowie die Ursachen einer erhöhten endogenen MX1-Expression erweitern und den Einblick in molekulare IFN- β -Therapiemechanismen vertiefen. Obgleich die individuelle MX1-Expression keinen Einfluss auf den Benefit einer IFN- β -Therapie hatte, sollte dies mit dem MX1-abhängigen Therapiebenefit neuer immunmodulatorischer Pharmaka im *Head-to-Head* Studiendesign weiter verglichen werden, um eine individuell möglichst effektive Therapie zu gewährleisten.

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Alexander Hundeshagen, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Wörtlich oder inhaltlich anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät oder Hochschule als Dissertation eingereicht.

Rostock, 25.02.2012

Alexander Hundeshagen

8.7 Danksagung

Hiermit möchte ich all jenen danken, die durch ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. U.K. Zettl aus der Klinik für Neurologie der Universität Rostock für die Überlassung des Themas, das in mich gesetzte Vertrauen und die hervorragende Betreuung. Trotz seines vollen Terminkalenders nahm er sich stets die Zeit, offene Fragen in aller Ruhe gründlich zu erörtern. Seine klar strukturierten Anregungen und Erläuterungen waren eine große Inspiration und Motivation. Führungen durch die „Katakomben“ und das stete Angebot, die zerebrale Leistung durch einen Schluck aus der Espresso-Minibar zu verbessern, bleiben unvergessen.

In besonderem Maße danke ich Dr. Michael Hecker für die herausragende Betreuung und seinen unermüdlichen Einsatz, mir die komplexen Bereiche der Genexpressionsanalytik, der Statistik und Informationstechnik näher zu bringen. Zu jeder Zeit war er Ansprechpartner bei allen Fragen, immer für konstruktive Diskussionen offen und hat mir so manche Verzögerung nachgesehen. Seine exakte und transparente wissenschaftliche Arbeitsweise werden mich über diese Arbeit hinaus beeinflussen.

Darüber hinaus danke ich Dr. Dirk Koczan für die Durchführung der Mikrochipanalysen am Institut für Immunologie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Thiesen). Dr. Robert Goertsches sei gedankt für die Aufbereitung der Mikroarray-Daten.

Dr. Christiane Hartmann, Dr. Christian Fatum, Dr. Ole Kandulski danke ich für die Erfassung der klinischen Daten und Frau Christa Tiffert für die Patientenbetreuung.

Abschließend gilt mein Dank meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin Sabrina für die unermüdliche mentale Unterstützung und die stete Motivation, diese Arbeit voranzutreiben und abzuschließen.