

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DER PEPTIDSPEZIFISCHEN IMMUNANTWORT SOWIE
MÖGLICHER ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN SERUMPARAMETERN
VITAMIN D, CHOLESTERIN, TSH UND FT4 AUF DIE EX-VIVO REAKTIVITÄT VON
T-LYMPHOZYTEN BEI DER MS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Luise Schulze

2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DER PEPTIDSPEZIFISCHEN IMMUNANTWORT SOWIE
MÖGLICHER ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN SERUMPARAMETERN
VITAMIN D, CHOLESTERIN, TSH UND FT4 AUF DIE EX-VIVO REAKTIVITÄT VON
T-LYMPHOZYTEN BEI DER MS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Luise Schulze

2019

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. Robert Weißert

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Martin Fleck

Tag der mündlichen Prüfung:

22.01.2020

Inhalt

1 Abstract	3
2 Einleitung	5
2.1 Genetische Faktoren.....	5
2.2 Umweltfaktoren	7
2.3 Immunpathogenese	10
2.4 Pathologie.....	24
2.5 Klinische Präsentation und Diagnostik.....	26
2.6 Klassifikation der Multiplen Sklerose.....	30
2.7 Therapie der Multiplen Sklerose	34
2.8 Hintergrund der Arbeit und Zielsetzung	42
3 Material und Methodik	44
3.1 Materialliste	44
3.2 Isolierung und Kryokonservierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	47
3.3 Auftauen von PBMC.....	48
3.4 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISpot)	48
3.5 Herkunft der getesteten Peptide	50
3.6 Gewinnung von Studienteilnehmerinnen/Studienteilnehmern	51
3.7 Bestimmung der Serumparameter	51
3.8 Statistische Auswertung	51
4 Ergebnisse	54
4.1 Charakteristika der getesteten MS Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen	54
4.2 Screening der spezifischen Immunreaktivität gegenüber 29 eluierten Peptiden im IFN- γ ELISpot in einer ersten Kohorte.....	60
4.3 Testung der spezifischen Reaktivität der PBMC gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 im IL-17 ELISpot sowie in weiteren IFN- γ ELISpots	65
4.4 Gruppenvergleiche der gemessenen Serumparameter.....	75
4.5 Korrelation der Serumparameter mit der spezifischen Reaktivität der getesteten PBMC im ELISpot.....	76
5 Diskussion	84
5.1 Autoreaktive T-Zellen sind Teil des integren Immunsystems	84
5.2 Beeinflussung der in-vitro Ergebnisse durch eine Vielzahl unterschiedlicher Immunzellen	84
5.3 Peptidspezifische Immunantwort von MS Patientinnen/Patienten gegenüber autologen Peptiden aus dem ZNS.....	86

5.4 Subtypspezifische Einflussfaktoren von Tregs und T_H17-Zellen auf die peptidspezifische Reaktion.....	91
5.5 Exogene Einflüsse auf das T-Zell Repertoire	92
5.6 Molekulares Mimikry und Peptidstrukturelemente als Schalthebel der Enzephalitogenität	94
5.7 Der Effekt von Vitamin D auf die Autoimmunität bei der MS	95
5.8 Die Rolle der Serumparameter fT4, TSH und Cholesterin in der MS	98
5.9 Zusammenfassung und Ausblick.....	101
6 Abkürzungsverzeichnis	103
7 Abbildungsverzeichnis	105
8 Tabellenverzeichnis.....	106
9 Literaturverzeichnis.....	106
10 Danksagung.....	117
11 Erklärung.....	118

1 Abstract

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) (1). Sie führt häufig bereits im jungen Erwachsenenalter zu anhaltender Behinderung und einer vorzeitigen Berentung. Die physischen und psychischen Belastungen für die Betroffenen sowie deren Angehörige sind daher immens (1,2). Ein fundiertes Verständnis der genauen Pathogenese und die Entwicklung sich ableitender Therapieansätze ist daher wichtigstes Ziel der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet. Trotz intensiver Bemühungen können bisher dennoch nicht alle Fragen beantwortet werden. Es wird von einer autoimmunen Genese der Erkrankung ausgegangen. Die genauen Zielstrukturen autoreaktiver Zellen konnten bislang jedoch nicht identifiziert werden (1,3). Wie bereits zahlreiche andere Studien, beispielsweise eine Untersuchung von Riedhammer et al., stellt die vorliegende Arbeit den erneuten Versuch dar, Autoantigene bei der MS zu identifizieren (3). Zu diesem Zweck wurde die IFN- γ - sowie IL-17A-Antwort der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von 61 MS Patientinnen/Patienten sowie 16 Kontrollpersonen nach Stimulation mit verschiedenen Peptiden im ELISpot-Verfahren untersucht. Da IFN- γ sezernierende T_H1-Zellen und IL-17 sezernierende T_H17-Zellen entscheidend an der Immunpathogenese der MS beteiligt sind, wurden diese beiden Zytokine ausgewählt (1). Bei den untersuchten Peptiden handelt es sich um 29 verschiedene Antigene, die im ZNS von MS Patientinnen/Patienten auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Sie wurden aus Gewebeproben eluiert und anschließend identifiziert. Ähnlich wie in Vorarbeiten lässt sich auch aus den vorliegenden Daten auf das Vorhandensein autoreaktiver Zellen als Teil des intakten Immunsystems sowohl bei den Patientinnen/Patienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen schließen (3). So konnte im Anschluss an die Inkubation mit einem Peptid, welches im *Myelin Proteolipid Protein* (PLP) vorkommt, in beiden Gruppen eine erhöhte Anzahl zytokinsezernierender Zellen gemessen werden. Die Inkubation mit einer Peptidstruktur, die in dem neuronalen Membranglykoprotein m6-b zu finden ist, bewirkte darüber hinaus in der Patientengruppe eine verstärkte IL-17-Sekretion. Eine erhöhte IFN- γ -Antwort war in diesem Fall allerdings nicht erkennbar. Eventuell dominiert in diesem Fall eine Reaktion vom T_H17-Typ. Des Weiteren zeigte sich gegenüber einem Antigen, welches in dem epidermalen Wachstumsfaktorsubstrat 15 vorkommt, eine erhöhte Immunreaktivität bei den Patientinnen/Patienten.

Abstract

Außerdem fiel das spezifische Reaktionsmuster im Hinblick auf die Peptiderkennung in der Patientengruppe signifikant breiter aus. So kam es häufiger zu positiven Reaktionen nach Inkubation mit ganz unterschiedlichen Peptiden. Eventuell hat die Aktivität der Erkrankung und/oder die Erkrankungsdauer einen Einfluss auf die Diversität der Peptiderkennung.

Neben der Untersuchung der peptidspezifischen IFN- γ - sowie IL-17- Reaktionen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse verschiedener Serumparameter. Bestimmt wurden die Serumspiegel von Vitamin D, Cholesterin, TSH und fT4. Dabei zeigte sich ein signifikant niedrigerer Vitamin D Spiegel bei Patientinnen/Patienten in einer aktiven Krankheitsphase verglichen mit jenen in einer inaktiven. Darüber hinaus korrelierte ein niedrigerer Vitamin D Wert mit höheren Spitzzahlen im IFN- γ ELISpot. Lediglich in der Gruppe der Patientinnen/Patienten in einer aktiven Krankheitsphase zeigte sich an dieser Stelle eine positive Korrelation. Besonders hervorzuheben ist eine negative Korrelation zwischen der Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen nach Inkubation mit einem eluierten PLP Peptid und dem Vitamin D Spiegel im Serum bei den im Rahmen dieser Arbeit getesteten MS Patientinnen/Patienten. Diese Daten lassen ebenso wie diverse andere Studien einen immunmodulatorischen Effekt von Vitamin D und eine wichtige Rolle bei der MS vermuten (4). Des Weiteren korrelierten niedrige TSH-Spiegel tendenziell mit einer höheren peptidunabhängigen IFN- γ Sekretion der getesteten PBMC. Eine negative Korrelation mit der peptidspezifischen Reaktivität zeigte sich darüber hinaus im IL-17 ELISpot. Passend dazu konnte in einigen Gruppen ein positiver Zusammenhang zwischen den gemessenen fT4-Werten und der Anzahl Zytokin sezernierender Zellen beobachtet werden. Für die Gruppe der Kontrollpersonen ergab sich darüber hinaus eine inverse Korrelation zwischen den Cholesterin-Werten im Serum und der peptidspezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot. Unklar bleibt, ob diese Beobachtungen pathogenetisch relevant oder lediglich eine Folge der Erkrankung sind. In weiteren Studien gilt es herauszufinden, ob die gemessenen Parameter eventuell als Biomarker der Erkrankung fungieren können oder eine therapeutische Konsequenz aus den Erkenntnissen gezogen werden kann.

2 Einleitung

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der es in unterschiedlichem Ausmaß zu Demyelinisierung und axonalem Verlust kommt. Auch wenn ihre genaue Ätiologie bisher nicht bekannt ist, wird von einer autoimmunen Genese ausgegangen (5,6).

Die MS stellt die häufigste chronische neurologische Erkrankung junger Menschen dar, von der weltweit etwa 2,5 Millionen Personen betroffen sind (7). In Deutschland wird von etwa 120.000 Betroffenen ausgegangen (2). Die Prävalenz ist abhängig von der geografischen Region und beträgt in Nordamerika und Europa >100/100.000. Wesentlich niedriger ist sie mit 2/100.000 in Ostasien und der Subsahara (8). Die Inzidenz wird mit 7/100.000/Jahr für Nordamerika und Europa angegeben. Sie ist in den letzten Jahren vor allem unter Frauen gestiegen (7). Damit hat sich von den 1950er Jahren bis 2000 das Verhältnis von MS betroffener Frauen zu erkrankten Männern von 2:1 auf 3:1 gesteigert, wobei dies nur für den schubförmig-remittierenden Verlauf der Erkrankung gilt (8). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 20 und 40 Jahren, wobei die MS immer häufiger auch bei Kindern und bei Personen jenseits des 45. Lebensjahres diagnostiziert wird (2,7).

Nur etwa 25 % der Patientinnen/Patienten erleiden keine anhaltende Behinderung zu irgendeinem Zeitpunkt im Verlauf der Erkrankung (7). Volkswirtschaftlich betrachtet ist die MS daher die häufigste neurologische Erkrankung, die bereits im jungen Erwachsenenalter bleibende Behinderung und vorzeitige Berentung verursacht. Aus diesem Grund kommt ihr eine große sozialmedizinische Bedeutung zu (2,9).

Ätiologisch wird von einer multifaktoriell bedingten Fehlregulation des Immunsystems ausgegangen, die zu Autoimmunprozessen führt. Dabei spielen in einem noch nicht vollständig aufgeklärten Zusammenspiel vor allem genetische Faktoren und Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle (6).

2.1 Genetische Faktoren

Die MS ist keine klassische hereditäre Erkrankung. Dennoch tritt sie bei 15-20 % der Patientinnen/Patienten familiär gehäuft auf. Gemessen an einer vergleichsweise niedrigen Prävalenz in der Bevölkerung lässt das vermuten, dass die Genetik eine entscheidende Rolle dabei spielt, wie anfällig ein Individuum ist, die Krankheit zu entwickeln (10). Diese Vermutung wird durch Studien an Zwillingspaaren unterstützt. Die Konkordanzrate monozygoter Zwillinge beträgt 25-30 %, wohingegen sie bei

Einleitung

dizygoten Zwillingen lediglich mit 3-5 % angegeben wird. Da Zwillinge sich in derselben intrauterinen Umgebung entwickeln und auch postnatal meist ähnlichen Umweltfaktoren ausgesetzt sind, muss die große Differenz der Konkordanzraten zumindest teilweise in genetischen Faktoren begründet liegen. Dennoch scheint eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen bei der Pathogenese der MS relevant zu sein, was die niedrige Penetranz des genetischen Risikos monozygoter Zwillinge erklärt (10).

In genomweiten Assoziationsstudien wurden bislang mehr als 100 Genloci identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für die MS assoziiert sind (11). Allerdings bleibt zu bedenken, dass solche genetischen Varianten nicht unbedingt krankheitsursächlich sein müssen, sondern lediglich Marker darstellen können. Meist handelt es sich um Polymorphismen in regulatorischen Regionen, was ihre Interpretation erschwert. Auffallend viele dieser Varianten befinden sich in oder in der Nähe immunologisch oder neurologisch relevanter Gene (12).

Der stärkste genetische Einfluss geht bei der MS von Variationen in den HLA Klasse II Genen aus. Der Haplotyp HLA-DR2 wurde als wichtigster genetischer Risikofaktor bei Kaukasiern identifiziert. Drei Gene dieses Haplotypen sind besonders eng miteinander verknüpft und werden fast ausnahmslos gemeinsam vererbt. Hierbei handelt es sich um HLA-DRB1*1501 (kodiert HLA-DR2b), HLA-DRB5*0101 (kodiert HLA-DR2a) und um HLA-DQB1*0602 (kodiert HLA-DQ6). Genetische Studien ergaben, dass HLA-DRB1*1501 den bedeutendsten Risikofaktor für die MS darstellt. Dabei kann das Krankheitsrisiko von den HLA-DRB1 Allelen des anderen Chromosoms sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden (12). In einer Studie von Hensiek et al. war der Haplotyp HLA-DR15 mit dem weiblichen Geschlecht und einem jungen Alter bei Diagnosestellung assoziiert, wohingegen sich keine Assoziation hinsichtlich des Verlaufstyps oder der Prognose zeigte (13).

Unabhängig von den HLA Klasse II Genen scheint auch der HLA Klasse I Locus einen Einfluss auf das MS-Risiko auszuüben. Einige HLA-A Allele scheinen sogar einen protektiven Effekt zu vermitteln (10,12,14).

Neben genetischen Variationen innerhalb des HLA Locus gibt es viele andere Gene, die bereits mit der MS in Verbindung gebracht wurden. Interessanterweise kodieren die meisten dieser Gene für Proteine, die bei immunologischen Prozessen und insbesondere bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort relevant sind. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der MS um eine

Einleitung

Autoimmunkrankheit handelt. Verschiedene Allele in den Genen des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R) sowie des Interleukin-7-Rezeptors (IL7R) scheinen ebenso wie Variationen in den Genen kostimulatorischer Moleküle relevant zu sein. Auch Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege und einige Zelladhäsionsmoleküle werden bei der MS wohl genetisch beeinflusst (10,12,15).

2.2 Umweltfaktoren

Die Beobachtung, dass sich das Erkrankungsrisiko bei Migration in ein anderes Land verändern kann, lässt vermuten, dass neben genetischen Einflüssen auch Umweltfaktoren an der Entstehung der MS beteiligt sind. Menschen, die aus einem Land mit einer hohen MS-Prävalenz in ein Land auswandern, in welchem die Erkrankung selten vorkommt, haben anschließend ein geringeres Krankheitsrisiko. Im Gegensatz dazu bleibt das geringe Risiko bei Auswanderung aus einem Land mit niedriger MS-Prävalenz weitgehend bestehen. Das Risiko der nächsten Generation steigt dann entsprechend dem Geburtsland. Interessanterweise scheint das individuelle Erkrankungsrisiko dabei in den ersten zwei Lebensjahrzehnten festgelegt zu werden (16).

Zu den bisher vermuteten Umweltfaktoren, die auf dem Boden einer genetischen Prädisposition das Erkrankungsrisiko weiter erhöhen können, zählen unter anderem bestimmte Infektionen, ein Vitamin D Mangel, eine geringe Sonnenlichtexposition sowie das Rauchen (17).

2.2.1 Infektionen

Schon seit Langem werden Virusinfektionen als wichtige Triggerfaktoren für die spätere Entwicklung einer MS in genetisch anfälligen Individuen vermutet (18). Allerdings ist bislang nicht bekannt, ob ein einzelnes Virus solche Autoimmunprozesse hervorrufen kann, oder ob hierfür das Zusammenspiel unterschiedlicher Infektionen notwendig ist (19). Vor allem einige Herpesviren (Epstein-Barr Virus (EBV), Humanes Herpesvirus (HHV) -6) und möglicherweise auch Varicella Zoster Virus (VZV)) stellen interessante Kandidaten dar. Sie persistieren lebenslang latent in Zellen des infizierten Individuums und können reaktiviert werden (19). Das lange Latenzstadium solcher Viren könnte von entscheidender Bedeutung für die Initiierung autoimmuner Prozesse sein (20,21).

Einleitung

Epidemiologische Daten zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MS und einer vorangegangenen EBV-Infektion (18). Verglichen mit Kontrollpersonen der gleichen Altersgruppe zeigen sich bei Patientinnen/Patienten mit MS sowohl eine erhöhte Seroprävalenz als auch ein höherer Titer EBV-spezifischer Antikörper (19,22). Während die 5 % der Bevölkerung ohne nachweisbare EBV-Infektion ein sehr geringes Risiko besitzen, eine MS zu entwickeln, steigt das Erkrankungsrisiko bei seropositiven Menschen signifikant an (18). Bei einer Infektion im Kindesalter erhöht sich das Risiko der Entwicklung einer MS auf das 15-fache, im Jugend- und Erwachsenenalter sogar auf das 30-fache (23). Diese Beobachtung wird außerdem von der vor einigen Jahren postulierten „Poliomyelitis-Hypothese“ unterstützt, die davon ausgeht, dass einige Virusinfektionen ein größeres MS-Risiko bergen, wenn die Infektion in der Jugend oder im Erwachsenenalter erfolgt. Eine meist asymptomatische Infektion in der Kindheit ist dagegen mit einem geringeren Risiko assoziiert (22). Bei einigen Erregern scheint ein frühzeitiger Kontakt im Leben sogar protektiv zu wirken. Die „Poliomyelitis-Hypothese“ wurde mittlerweile zu der allgemeinen „Hygiene-Hypothese“ ausgeweitet, welche die Zunahme von Allergien und Autoimmunerkrankungen in den letzten Jahren zu erklären versucht. Demnach spielt der in der westlichen Welt nachlassende Kontakt zu vielen unterschiedlichen Pathogenen in der Kindheit eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Autoimmunität (19,22). Diese Überlegung erklärt allerdings nicht das sehr geringe MS-Risiko bei Menschen ohne EBV-Infektion. In diesem Fall ist am ehesten das Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und genetischer Ausstattung des Individuums ausschlaggebend. Manche Menschen könnten demnach genetisch resistent sowohl gegenüber der EBV-Infektion als auch gegenüber der MS sein (18,24).

Bisher gibt es lediglich Vermutungen darüber, durch welche Mechanismen Viren als Triggerfaktoren bei der MS fungieren können. Erstens kann es zu einer direkten Schädigung von Zellen des ZNS kommen. Zweitens könnten immunmodulatorische Prozesse wie beispielsweise eine Verringerung regulatorischer T-Zellen, Molekulares Mimikry, *Bystander activation*, die Ausweitung erkannter Epitope oder die Infektion autoreaktiver B-Zellen zur Ausbildung von Autoimmunität führen (18–22).

2.2.2 Vitamin D

Die Prävalenz der MS ist am Äquator besonders niedrig und steigt zu den Polen hin an. Eine Erklärung hierfür könnte sowohl eine unterschiedliche Sonnenlichtexposition

Einleitung

als auch die damit einhergehende Veränderung des Vitamin D Spiegels sein (6). Viele Studien lassen einen günstigen Effekt von Vitamin D, aber auch von UV-B selbst, auf die MS vermuten. Unter experimentellen autoimmunen Bedingungen wirkt Vitamin D sowohl protektiv als auch therapeutisch (25). Liegt bei Patientinnen/Patienten mit einem ersten demyelinisierenden Ereignis ein Vitamin D Mangel vor, besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer definitiven MS (26). Unklar ist dagegen bislang, ob Vitamin D in hohen Dosen die Progredienz der MS beeinflussen kann (17). Die zugrundeliegenden Mechanismen der Effekte von Vitamin D auf die MS sind bislang nicht verstanden. In den vergangenen Jahren wurde allerdings immer deutlicher, dass Vitamin D nicht nur eine Rolle in der Kalziumhomöostase spielt, sondern auch wichtige extraskelettale Funktionen besitzt. Das fettlösliche Vitamin beeinflusst unter anderem die Entwicklung und Funktionstüchtigkeit des Gehirns, die Zellproliferation, apoptotische Vorgänge, die Insulinsekretion und sogar die Regulation des Blutdrucks. Zusätzlich spielt es auch eine Rolle bei der Differenzierung von Immunzellen und wirkt immunmodulierend. Bei dem Vitamin D Rezeptor (VDR) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von mehr als 500 Genen reguliert (25). Er wird in den meisten Immunzellen und auch in Zellen des ZNS exprimiert. Ebenso besitzen Zellen des Immunsystems ein wichtiges Enzym (CYP27B1) der Vitamin D Synthese. Immunzellen sind damit in der Lage, selbstständig Vitamin D zu produzieren und zu sezernieren (27). Es wird vermutet, dass Vitamin D einen Shift von proinflammatorischen T_H17-Zellen zu regulatorischen T-Zellen bewirkt und eventuell auch direkt T_H1-Zellen oder T_H2-Zellen beeinflusst (17,25,27). Weiterhin könnte die T- und B-Zell-Proliferation sowie die Sekretion von Immunglobulinen gehemmt werden (27). Trotz dieser vielgestaltigen Wirkung stellt ein Vitamin D Mangel wahrscheinlich nur in Verbindung mit der entsprechenden Genetik einen krankheitsfördernden Umweltfaktor dar. Diese Überlegung könnte erklären, weshalb Menschen mit sehr dunkler Hautfarbe zwar häufig einen niedrigen Vitamin D Spiegel haben, die MS aber häufiger bei hellhäutigen Menschen auftritt (25).

2.2.3 Rauchen

Sowohl das aktive als auch das passive Rauchen von Zigaretten gilt als Risikofaktor für die MS. Das Risiko im Vergleich zu Nichtrauchern könnte um mehr als 50 % erhöht sein (28). Insbesondere aktuelles aktives Rauchen ist dabei relevant, wohingegen eine zu einem früheren Zeitpunkt abgeschlossene Raucherkarriere weniger gefährlich

Einleitung

erscheint. Bei bereits Erkrankten kann Zigarettenrauchen die Krankheitssymptome verschlimmern. Außerdem kann eine schubförmig-remittierende Verlaufsform schneller sekundär chronisch progredient werden. Die genauen Mechanismen hinter diesen Beobachtungen sind bisher nicht bekannt. Vermutet werden direkte neurotoxische Effekte verschiedener Bestandteile des Zigarettenrauchs sowie immunmodulatorische Effekte (17,28). Hierbei scheinen Interaktionen der Bestandteile des Rauches mit genetischen Faktoren eine Rolle zu spielen (29). Rauchen führt außerdem gehäuft zu respiratorischen Infekten, welche bereits mit einem erhöhten Risiko für eine MS in Verbindung gebracht wurden (17).

Mögliche Risikofaktoren für die Multiple Sklerose
weibliches Geschlecht
hellhäutiger Typus
Genetik, v.a. HLA-DR2
Infektionen, z.B. EBV (v.a. bei später Infektion)
niedriger Vitamin D Wert
geringe Sonnenlichtexposition
Zigarettenrauch (aktiv und passiv)

Tabelle 1: Mögliche Risikofaktoren für die MS modifiziert nach Garg et al. (6)

2.3 Immunpathogenese

Die genaue Pathogenese der MS ist bislang unklar. Dennoch haben Tiermodelle wie zum Beispiel die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) wesentlich zu einem besseren Verständnis der Erkrankung und ihrer zugrundeliegenden Mechanismen beigetragen (30).

Eine wichtige Beobachtung hierbei war, dass eine entzündliche Demyelinisierung im Rahmen der EAE autoreaktive CD4⁺ T-Zellen erfordert. Ihr T-Zell-Rezeptor (TZR) richtet sich spezifisch gegen Bestandteile der zentralen Myelinscheiden, wie zum Beispiel Myelin Basic Protein (MBP) oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG). Auch CD4⁺ T-Zellen, die sich gegen astrozytäre Proteine richten, wurden beschrieben. Des Weiteren stellen aktivierte autoreaktive CD4⁺ T-Zellen die einzigen Zellen dar, die nach Transfer in immunkompetente Versuchstiere eine EAE

Einleitung

hervorrufen können (30). Trotz dieser herausragenden Rolle der CD4⁺ T-Zellen scheinen zusätzlich auch CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen sowie das angeborene Immunsystem relevant zu sein (5).

Nach wie vor konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die bei der MS auftretende Autoimmunreaktion im ZNS selbst oder in der Peripherie getriggert wird. Hierzu existieren zwei Hypothesen. Zum einen ist es vorstellbar, dass die Erkrankung zunächst in Abwesenheit lymphozytärer Infiltrate beginnt und erst sekundär autoreaktive Lymphozyten einwandern. Nach dieser sogenannten intrinsischen Hypothese kommt es zu einer primären Zerstörung von Oligodendrozyten (z.B. durch genetische Defekte) und einer nachfolgenden Aktivierung von Mikrogliazellen. Diese gewebständigen Makrophagen verursachen ein chronisches inflammatorisches Milieu, welches wie bei der Alzheimererkrankung auch bei der Pathogenese der MS relevant sein könnte. Außerdem ist die Degradation von Oligodendrozyten mit einer Freisetzung von potenziellen Antigenen verbunden. Diese könnten in den tiefen zervikalen Lymphknoten eine sekundäre Aktivierung des adaptiven Immunsystems hervorrufen (1,30).

Die meisten Wissenschaftlerinnen/Wissenschaftler gehen im Gegensatz dazu von einer primären Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten in der Peripherie und einer nachfolgenden Infiltration des bis dahin unbeteiligten ZNS aus. Diese sogenannte extrinsische Hypothese basiert auf Erkenntnissen der EAE. Sie kann durch eine periphere Verabreichung ZNS-spezifischer Antigene zusammen mit Immunstimulanzien hervorgerufen werden. Hierbei kommt es in den drainierenden Lymphknoten zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, welche anschließend über die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die Blut-Liquor-Schranke oder den Subarachnoidalraum ins ZNS gelangen (1,15,30).

Vor der Entdeckung lymphatischer Gefäße innerhalb der Dura mater galt das ZNS als immunprivilegiert. Seither steht dieses Dogma auf dem Prüfstand. Dennoch scheint der Eintritt von Zellen des adaptiven Immunsystems in das ZNS streng reguliert zu sein (31,32). Die Migration von Leukozyten über die BHS wird dabei als Diapedese bezeichnet (1). Nur aktivierte, nicht aber naive T-Zellen sind zu diesem Prozess in der Lage (33). Entscheidend ist die Interaktion zwischen Integrinen auf der Oberfläche der Lymphozyten (z.B. lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) und very late-antigen 4 (VLA-4)) und endothelialen Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) (6,33). Diese ermöglicht vor allem im Bereich von postkapillären Venulen die Auswanderung aus

Einleitung

dem Gefäß (34). Die endotheliale Expression von CAMs, wie z.B. intercellular adhesion molecule (ICAM-1) ist normalerweise sehr gering. Unter inflammatorischen Bedingungen wird sie jedoch hochreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen eines Entzündungsprozesses die Endothelzellen des Gehirns die Transmigration autoreaktiver T-Zellen unterstützen, indem sie als antigenpräsentierende Zellen (APZ) Myelinbestandteile auf HLA II Molekülen präsentieren. Die Migration aktivierter T-Zellen ins ZNS scheint also ein antigenspezifischer Prozess zu sein (6,33). Nach der transendothelialen Migration befinden sich die Leukozyten im perivaskulären Raum. Zur Invasion des Gehirnparenchyms muss in einem weiteren Schritt die Glia limitans überwunden werden. Dies erfordert die Degradation verschiedener Basalmembrankomponenten durch die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 (34).

Nach erfolgreicher Einwanderung der Lymphozyten ins ZNS kommt es durch erneuten Kontakt mit den entsprechenden Autoantigenen, die von APZ präsentiert werden, zu einer Reaktivierung. Hierdurch wird eine inflammatorische Kaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Schädigung der Myelinscheiden steht. Durch die lokale Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wird die Homöostase der Oligodendrozyten und Astrozyten gestört. Darüber hinaus werden weitere Immunzellen, darunter auch Antikörper produzierende Plasmazellen rekrutiert, weil die inflammatorischen Mediatoren die Integrität der BHS herabsetzen (6,30).

Beide beschriebenen Hypothesen erfordern das Vorhandensein autoreaktiver Zellen, welche zentrale und periphere Toleranzmechanismen umgehen und auf verschiedenen Wegen aktiviert werden (15).

2.3.1 Zentrale Toleranz

Ein entscheidender Schritt in der Entwicklung der T-Zellen ist ihre Reifung im Thymus. Während dieser Phase durchläuft der durch zufälliges genetisches Rearrangement entstandene TZR eine positive sowie negative Selektion. Hierbei überleben lediglich Zellen, deren Rezeptoren mit einem Komplex aus einem Selbstpeptid und einem HLA Molekül auf der Oberfläche der Thymusepithelzellen interagieren können (positive Selektion). Hierdurch wird die HLA-Restringenz des TZR sichergestellt. Bindet der TZR ein autologes Peptid mit einer zu großen Affinität, wird die Zelle degradiert (negative Selektion) (35). Thymozyten, deren TZR eine intermediäre Affinität gegenüber Selbstpeptiden aufweisen, werden unter Umständen positiv selektiert, aber

Einleitung

nicht depletiert. Stattdessen gehen sie in einen anergen Zustand über oder entwickeln sich zu anderen Zelllinien, beispielsweise FoxP3⁺ Tregs. Es wird geschätzt, dass ihre Affinität etwa 100-fach niedriger ist als jene von negativ selektierten TZR (36,37).

Eine besondere Herausforderung besteht in der Ausbildung von Toleranz gegenüber Antigenen, welche nicht ubiquitär, sondern lediglich in bestimmten Geweben exprimiert werden. Diese Antigene werden im Englischen „*tissue-restricted antigens*“ (TRA) genannt. Im Thymus werden TRAs unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors AIRE exprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor spielt somit eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunität (35). Thymozyten mit einem TZR dessen Affinität gerade zu gering ist, um negativ selektiert zu werden, könnten ebenso wie posttranslational modifizierte Selbstpeptide bei der Entstehung von Autoimmunprozessen relevant sein (15). Goverman vermutet zudem, dass einige selbstreaktive T-Zellen zentrale Toleranzmechanismen aus stochastischen Gründen umgehen, da sie zufällig nicht auf die begrenzte Anzahl APZ treffen, die das betreffende Peptid präsentieren (37).

2.3.2 Periphere Toleranz

Autoreaktive T-Zellen wurden sowohl bei Patientinnen/Patienten mit Autoimmunerkrankungen als auch bei gesunden Kontrollpersonen beschrieben. Es muss also Mechanismen geben, die außerhalb des Thymus eine Toleranz gegenüber Autoantigenen vermitteln und deren Funktionsfähigkeit entscheidend für die Verhinderung von Autoimmunprozessen ist. Hierzu zählen beispielsweise physikalische Barrieren zwischen autoreaktiven Lymphozyten und ihren Targets, die Depletion sowie Inaktivierung solcher Zellen und deren Suppression durch regulatorische T-Zellen (15,38).

Werden diese peripheren Toleranzmechanismen umgangen, kann es zur peripheren Aktivierung autoreaktiver Zellen und somit zu Autoimmunprozessen kommen. Bisher ist unklar, wie genau ZNS-spezifische Lymphozyten in der Peripherie aktiviert werden. Denkbar ist sowohl eine Präsentation von Myelinbestandteilen in den zervikalen Lymphknoten als auch eine Beteiligung von Infektionen (15).

2.3.3 Die Rolle von Infektionen bei der Pathogenese der MS

Das angeborene Immunsystem scheint eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Selbsttoleranz und Autoimmunität zu spielen. Waldner et al. konnten zeigen, dass dieses Gleichgewicht durch eine Aktivierung APZ über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (z.B. Toll-like Rezeptoren) zugunsten autoimmuner Prozesse verschoben werden kann. Werden APZ im Rahmen von Infektionen aktiviert, könnte dies zur Differenzierung autoreaktiver T-Zellen zu Effektorzellen beitragen. Eventuell lässt sich hierdurch die starke Assoziation zwischen Infektionen und dem Auftreten von klinischen MS Schüben erklären (39).

Eine mögliche Ursache für diesen Zusammenhang könnten strukturelle Ähnlichkeiten zwischen viralen oder bakteriellen T-Zell-Epitopen und immundominanten Selbstpeptiden sein (Molekulares Mimikry), welche eine periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen bedingen (40).

Interessanterweise werden für diesen Mechanismus keine identischen Aminosäuresequenzen benötigt. Entscheidend für die T-Zell-Erkennung ist das Vorhandensein konservierter TZR-bindender Motive innerhalb des Peptids (41). Mehrere Viren wie z.B. EBV, Influenza A Virus oder humanes Papillomavirus (HPV) stehen im Verdacht, durch diesen Mechanismus an der Pathogenese der MS beteiligt sein zu können (15). So konnte ein Peptid von *H. influenzae*, welches strukturelle Ähnlichkeit mit einem Proteolipidprotein (PLP)-Peptid aufweist, autoreaktive PLP-spezifische CD4⁺ T-Zellen aktivieren und eine EAE auslösen (42).

Nicht nur Pathogenstrukturen, auch autologe Epitope können molekulares Mimikry erzeugen. So ist eine Kreuzreaktivität zwischen einem MOG Epitop und autologem Neurofilament (NF)-M als Beispiel für Selbstmimikry bekannt (43), die eventuell für die Ausbildung axonaler Schäden im Rahmen der MS relevant ist (15).

Neben einer solch spezifischen Aktivierung autoreaktiver T-Zellen können diese auch indirekt im Rahmen von Infektionen durch Pathogene ohne strukturelle Ähnlichkeit zu Selbstpeptiden aktiviert werden. Im Englischen wird dieses Phänomen als „*Bystander Activation*“ bezeichnet. Hierbei verursachen mikrobielle Substanzen eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle und Zytokine. Dies kann die Aktivierung autoreaktiver T- und B-Zellen triggern (30).

Zur bestmöglichen Bekämpfung von Pathogenen verfügt der Organismus über verschiedene Mechanismen, um während der Infektion das antigenerkennende T-Zell-Repertoire auszuweiten. Dies könnte das Vorkommen peripherer T-Zellen mit dualen

Einleitung

TZRs erklären. Weil CD8⁺ T-Zellen mit spezifischen Rezeptoren sowohl für MBP als auch für virale Antigene bereits beschrieben wurden, könnte die Aktivierung solcher Zellen im Rahmen von gewöhnlichen viralen Infekten in genetisch anfälligen Individuen die Ausbildung von Autoimmunprozessen triggern (44).

Unabhängig von diesen infektionsassoziierten Möglichkeiten der peripheren Aktivierung autoreaktiver Zellen, scheint auch das Mikrobiom bei der Pathogenese von Autoimmunität relevant zu sein (45,46). In tierexperimentellen Untersuchungen mit transgenem MOG-spezifischen TZR war das Auftreten einer EAE an das Vorhandensein der kommensalen Darmflora geknüpft (45).

Im Verlauf eines viralen Infektes, einer Transplantatabstoßung und auch einer Autoimmunerkrankung wie der MS kann es zum sogenannten „*epitope spreading*“ kommen. Diese Bezeichnung beschreibt eine Ausweitung der Immunantwort auf andere Epitope als jene, welche den inflammatorischen Prozess initiieren und stellt einen physiologischen Mechanismus im Kampf gegen Pathogene dar. Richtet sich die Immunantwort dabei allerdings gegen körpereigene Peptide, unterhält sie eine chronische Entzündung. Sowohl T-Zellen als auch B-Zellen können hieran beteiligt sein (19).

Tierexperimentell konnten zwei verschiedene Arten dieses Mechanismus gezeigt werden. Eine ursprünglich gegen bestimmte Epitope gerichtete Immunantwort kann sich auf andere Epitope desselben Proteins ausweiten (intramolekulares *epitope spreading*). Manche epitoperzeugenden Muster sind beispielsweise im Inneren eines intakten Proteins verborgen und werden erst bei dessen Zerstörung für das Immunsystem zugänglich. Darüber hinaus können sekundär Epitope eines anderen Proteins erkannt werden (intermolekulares *epitope spreading*), wenn sie der primär erkannten Struktur ähneln. Dies erschwert die Suche nach dem ursprünglichen Target und somit auch die Therapie der Erkrankung. Bislang bleibt zudem unklar, ob *epitope spreading* mit klinischen Schüben assoziiert sein kann (15,19).

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass sich die Immunantwort bei der MS primär gegen eine aktive oder chronische Virusinfektion richtet und es sekundär durch Molekulares Mimikry, *bystander activation* und/oder *epitope spreading* zu einer Ausweitung auf körpereigene Peptide innerhalb des ZNS kommt (19).

Ein weiterer möglicher Risikofaktor für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen stellt eine Lymphopenie dar. Infolge einer Verringerung der peripheren Anzahl der T-Zellen kommt es zu einer Proliferation verbleibender T-Zellen. Dieser Prozess wird als

Einleitung

„*lymphopenia-induced proliferation*“ (LIP) bezeichnet und dient der Wiederherstellung einer optimalen T-Zell Anzahl und damit der Auffüllung der Nische (47–51). Es können mindestens zwei verschiedene Formen dieses Mechanismus unterschieden werden. Die meisten in lymphopene Mäuse transferierten CD4⁺ T-Zellen vollführen eine langsame und begrenzte Proliferation, die durch eine höhere Verfügbarkeit von IL-7 bedingt ist (homöostatische Proliferation). Im Gegensatz dazu proliferiert ein kleiner Anteil transferierter CD4⁺ T-Zellen sehr rasch und unabhängig von der Zytokinverfügbarkeit (spontane Proliferation). Interessanterweise erfordert diese Form der LIP im Gegensatz zur homöostatischen Proliferation Interaktionen mit Selbstpeptiden oder Peptiden der kommensalen Bakterien (47,48). Es konnte gezeigt werden, dass dabei T-Zellen mit dualem T-Zell-Rezeptor eine wichtige Rolle spielen. Eine solche Koexpression begünstigt nach Balakrishnan et al. eine positive Selektion im Thymus (52). Durch die spontane Proliferation kann es infolge einer Lymphopenie demzufolge zu einer Veränderung des T-Zell-Repertoires mit einem erhöhten Anteil aktivierter autoreaktiver T-Zellen kommen. In Kombination mit anderen Faktoren, z.B. einer genetischen Prädisposition, könnte dies zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen beitragen (48). Es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen dazu in der Lage sind, selektiv die spontane Proliferation zu supprimieren. Winstead et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass regulatorische T-Zellen durch diesen Mechanismus entscheidend für den Erhalt eines großen TZR-Repertoires während der LIP verantwortlich sind (47). Während des Alterns erlangt die LIP aufgrund der Thymusinvolution zunehmende Bedeutung (47).

Eine Lymphopenie kann beispielsweise infolge diverser Infektionen, einer Chemo- oder Bestrahlungstherapie oder infolge diverser medikamentöser Therapien auftreten. Inwieweit diese Situationen an der Entstehung von autoimmunen Prozessen beteiligt sein könnten, wird derzeit kontrovers diskutiert, erscheint aber sehr plausibel (49,51).

2.3.4 An der Immunpathologie der MS beteiligte Zellen

CD4⁺ T-Zellen

Es wird vermutet, dass CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunpathogenese der MS spielen. CD4⁺ T-Zellen stellen die wichtigsten Effektorzellen bei der EAE dar. Sowohl eine aktive Immunisierung gegen Proteine des ZNS in Kombination mit Immunstimulanzien als auch eine Verabreichung ZNS spezifischer autoreaktiver T-

Einleitung

Zellen konnten eine EAE induzieren. Darüber hinaus wurden CD4⁺ T-Zellen bereits in MS Läsionen nachgewiesen, auch wenn in floriden Läsionen oftmals CD8⁺ T-Zellen dominieren. Außerdem handelt es sich bei den wichtigsten Suszeptibilitätsgenen der MS um HLA Klasse II Gene (53).

Bislang konnte nicht geklärt werden, welcher Typ CD4⁺ T-Helferzellen (T_H-Zelle) für die Pathogenese der MS hauptverantwortlich ist. Bei der EAE spielen insbesondere T_H1 Zellen sowie T_H17 Zellen eine krankheitsfördernde Rolle, während T_H2-Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg) einen protektiven Effekt vermitteln (15,53).

Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Effektor T_H-Zellen bedarf neben der Stimulation des TZR und der Bindung kostimulatorischer Moleküle die Anwesenheit spezifischer Zytokine. Diese werden nach Kontakt mit einem Pathogen von Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert und bestimmen maßgeblich, welcher T_H-Zelltyp dominieren wird. Positive Feedbackschleifen polarisieren die Differenzierung daraufhin zusätzlich (54).

Die Differenzierung zu T_H1-Zellen wird durch IFN- γ sowie IL-12, bestehend aus den beiden Untereinheiten p40 und p35, induziert (54,55). T_H1-Zellen produzieren u.a. die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-2 und Lymphotoxin. Hierdurch interagieren sie vor allem mit CD8⁺ T-Zellen sowie mit Makrophagen und koordinieren maßgeblich die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene. Weil in MS Läsionen zahlreich Makrophagen sowie IFN- γ nachgewiesen werden können, scheinen T_H1-Zellen besonders relevant zu sein. (15,30).

In den vergangenen Jahren sind zunehmend T_H17-Zellen in den Fokus der MS Forschung geraten (55). Ihre Differenzierung wird durch TGF- β in Anwesenheit von IL-6 oder IL-21 induziert. IL-23 fungiert daraufhin als Wachstums- und Stabilisierungsfaktor (54,56). Interessanterweise ist TGF- β auch für die Differenzierung von Tregs verantwortlich. Allerdings bedarf diese Induktion der Abwesenheit von IL-6. T_H17-Zellen zeichnen sich *in-vivo* durch ihre dichotome Natur aus. Einerseits spielen sie eine wichtige proinflammatorische Rolle bei Entzündungen, andererseits haben sie eine bedeutende Funktion bei der Aufrechterhaltung physiologischer Barrieren, insbesondere des Darms (57). Sie produzieren u.a. IL-17, IL-21, IL-22 und sind für die Abwehr von Pilzinfektionen (z.B. *Candida albicans*) und bestimmten extrazellulären Bakterien relevant (15,30,54,58). Dabei erzeugen sie eine massive Gewebeentzündung und locken insbesondere neutrophile Granulozyten an. T_H17 Zellen zerstören außerdem durch ihre Sekretion von IL-17 und IL-22 die Integrität

Einleitung

der BHS. Diese ist anschließend permeabel für lösliche Moleküle sowie CD4⁺ T-Zellen. Außerdem sezernieren sie zahlreiche zytolytische Enzyme, wie zum Beispiel Granzym B und wirken damit enzephalitogen (59). Hauptvertreter der IL-17-Familie stellt IL-17 A dar. IL-17 A wird allerdings nicht nur von TH17 Zellen, sondern beispielsweise auch von $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und Neutrophilen synthetisiert (54). Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass IL-23 im Gegensatz zu IL-12 essentiell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung organspezifischer Entzündung und Autoimmunität ist (56,60). IL-23 besitzt die gleiche p40 Untereinheit wie IL-12, kombiniert mit einer p19 Untereinheit. Alle bisherigen Versuche, die p40 Untereinheit und damit die Aktivität von TH1- und TH17-Zellen therapeutisch zu blockieren, scheiterten bislang (41).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass während des Anfangsstadiums der EAE insbesondere TH1-Zellen im ZNS nachweisbar sind, wohingegen die TH17-Zellen erst später im Krankheitsverlauf einwandern (61). Eine Hypothese dazu lautet, dass zu Beginn der Erkrankung TH1-Zellen ein inflammatorisches Milieu verursachen und die Demyelinisierung durch Myelin spezifische Antikörper zustande kommt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung könnten insbesondere TH17-Zellen durch eine Aktivierung von Mikrogliazellen die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und die Demyelinisierung durch die Induktion zytotoxischer T-Zellen vorantreiben. Dies könnte erklären, weshalb eine Interferon-beta (IFN- β)-Therapie oft nur in der schubförmig-remittierenden Krankheitsphase hilft, wohingegen sie bei chronisch-progredienten Verlaufsformen kaum eine Wirkung zeigt. Es gibt sogar Hinweise darauf, dass IFN- β eine TH17-bedingte Inflammation verschlimmern kann (62). Allerdings scheint es auch patientenspezifische Unterschiede im TH1/TH17 Verhältnis zu geben, was die Therapiewahl zusätzlich erschwert (55). Tzartos et al. konnten eine signifikant erhöhte Anzahl IL-17⁺ T-Zellen in aktiven Läsionen von MS Patientinnen/Patienten nachweisen (63). Interessanterweise konnten TH17 Zellen nachgewiesen werden, die sowohl IFN- γ als auch IL-17 sezernieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Zellen während entzündlicher Prozesse ins ZNS rekrutiert werden. Möglicherweise spielen diese Zellen eine besondere Rolle bei der Immunpathogenese der MS (64). Nicht eindeutig geklärt ist bislang, durch welche Mechanismen proinflammatorische TH17 Zellen reguliert werden. Eine wichtige Rolle hierbei könnte der Dünndarm spielen. Es wurde sowohl ihre Elimination über das Darmlumen als auch ihre Umwandlung in regulatorische TH17 (rTH17) Zellen beschrieben (65). Des Weiteren wurde eine Population CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD39⁺ Tregs beschrieben, die in der Lage ist, TH17

Einleitung

Zellen zu supprimieren. Interessanterweise scheint ihre relative Häufigkeit sowie ihre Funktionalität bei Patientinnen/Patienten mit MS herabgesetzt zu sein (66).

Die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2-Zellen wird durch IL-4 getriggert. T_H2-Zellen produzieren u.a. IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und sind wichtig für die Bekämpfung extrazellulärer Erreger (6,54). Sie vermitteln vermutlich einen krankheitsprotektiven regulatorischen Effekt. So gibt es für die MS wirksame Therapeutika, welche das Zytokinprofil von T_H1-Zellen hin zu T_H2-Zellen verschieben (6).

Ca. 10-15 % der peripheren CD4⁺ T-Zellen bestehen aus CD4⁺CD25⁺ Tregs, die den Transkriptionsfaktor Foxp3⁺ exprimieren. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil peripherer Toleranzmechanismen. Sowohl in Mäusen als auch bei Menschen führen Mutationen oder ein Fehlen des Foxp3-Genes zu schwerer Autoimmunität (38,67).

Tregs stammen entweder aus dem Thymus (tTreg) oder werden durch Antigenkontakt in der Peripherie (pTreg) aus CD4⁺CD25⁻ Zellen gebildet. Als Oberflächenmarker konnte CD25 (IL-2-R, α -Kette) identifiziert werden. Wichtiger Entwicklungs- und Überlebensfaktor sowie essenziell für die Funktionalität der Tregs ist IL-2. Die Induktion von pTregs erfordert zusätzliche Faktoren, wie zum Beispiel TGF- β (in Abwesenheit von IL-6 oder IL-21) und Retinoinsäure, aber auch den Kontakt mit spezialisierten APZ (36,54,67). Im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen, die den Thymus verlassen, sind tTregs bereits ausgereift und „geprimed“. Es wird geschätzt, dass die für die Aktivierung Foxp3⁺ Tregs erforderliche Antigenkonzentration 10- bis 100-fach niedriger ist, als für die Aktivierung naiver selbstreaktiver T-Zellen erforderlich wäre. Dies könnte eine kontinuierliche Suppression selbstreaktiver T-Zellen ermöglichen und darüber hinaus der Entstehung von Autoimmunität durch molekulares Mimikry entgegenwirken. Nach ihrer Aktivierung proliferieren Tregs und führen ihre immunsuppressiven Funktionen aus. Anschließend sterben die meisten dieser Zellen. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob bei diesem Prozess auch Gedächtniszellen entstehen (67).

Aktivierte Tregs supprimieren Effektor-T-Zellen unabhängig von deren Antigenpezifität durch verschiedene Mechanismen (67,68). Neben der Sekretion immunsuppressiver Zytokine, wie z.B. IL-10 oder TGF- β , wurde eine Rekrutierung aktivierter Tregs zu APZ beschrieben. Insbesondere dendritische Zellen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Dort konkurrieren Tregs mit Effektorzellen, indem sie rund um die dendritische Zelle aggregieren. Darüber hinaus modulieren sie die Fähigkeit

Einleitung

der dendritischen Zelle, Effektorzellen zu aktivieren. Einige Tregs sind zudem in der Lage, andere Zellen durch die Sekretion von Granzymen oder Perforinen zu töten (67). Wahrscheinlich ergänzen sich pTregs und tTregs in ihren Funktionen. Interessanterweise haben sie unterschiedliche TZR Repertoires. Dies ermöglicht ihnen die Erkennung eines großen Spektrums an Selbstpeptiden. Es wird vermutet, dass tTregs die allgemeine Immunhomöostase aufrechterhalten und autoimmune Prozesse verhindern, während pTregs insbesondere für die temporäre Kontrolle lokaler Entzündungsprozesse im Bereich von Schleimhäuten verantwortlich sind (36,38).

Bei der MS scheint die Fähigkeit der Tregs, autoreaktive Zellen zu supprimieren, herabgesetzt zu sein, wohingegen ihre Anzahl wahrscheinlich nicht reduziert ist. Die Studienlage zu diesem Punkt ist allerdings kontrovers (15,69,70). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Krankheitsaktivität mit einer herabgesetzten Aktivität der Tregs im peripheren Blut korreliert (71). Insbesondere tTregs scheinen eine verminderte suppressive Funktion zu besitzen (72). Auch ein herabgesetztes TZR-Repertoire der Tregs bei Patientinnen/Patienten mit MS wurde beschrieben (70).

Interessanterweise gibt es Tregs, welche sich in proinflammatorische IL-17-sezernierende Zellen umwandeln können. Eine solche Umwandlung gelang experimentell durch Zugabe von TGF- β plus IL-6 bis zum fünften Tag nach der initialen Differenzierung. Außerdem konnten Korn et al. zeigen, dass Foxp3⁺ T-Zellen während des Krankheitsgipfels einer EAE mit der Expression von IL-17 begannen (54). Ob oder inwieweit dies bei der Immunpathologie der MS relevant ist, konnte bislang nicht geklärt werden (72).

Neben Foxp3⁺ Tregs gibt es auch andere Zellen mit immunsuppressiven Fähigkeiten. Beispielsweise können IL-10 und TGF- β sezernierende Tr1-Zellen oder TGF- β sezernierende T_H3 Zellen aus peripheren naiven T-Zellen differenzieren (67).

CD8⁺ T-Zellen

Auch CD8⁺ T-Zellen wird mittlerweile eine pathogene Rolle bei der MS zugesprochen. Sie können Peptide erkennen, welche auf HLA Klasse I Molekülen gebunden sind. Diese Strukturen werden von allen kernhaltigen Zellen, also auch von Oligodendrozyten und Neuronen, exprimiert (6,15). Es konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ Zellen durch Erkennung dieser HLA I/ Antigen Komplexe eine direkte axonale Schädigung hervorrufen können (73).

Einleitung

B-Zellen

Neben T-Zellen, die weithin als Haupteffektorzellen bei der MS angesehen werden, scheinen auch B-Zellen an der Erkrankung mitzuwirken. Lange wurde davon ausgegangen, dass sie lediglich durch die Produktion von Autoantikörpern an der Pathogenese der MS beteiligt sind. Erste Hinweise, die antikörperunabhängige Mechanismen vermuten ließen, ergaben sich aus einer Studie über die Wirkung des B-Zell-depletierenden Medikamentes Rituximab in der Behandlung der schubförmigen MS. Antikörperproduzierende Plasmazellen werden durch Rituximab nicht depletiert. Dennoch zeigt das Medikament eine positive Wirkung. Autoreaktive B-Zellen scheinen ihre pathogene Wirkung folglich über weitere Mechanismen entfalten zu können: erstens zählen B-Zellen zu den professionell APZ. Neben dem Antigen präsentieren sie zusätzlich kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche und ermöglichen somit eine optimale Aktivierung von T-Zellen. Zweitens erzielen sie über eine Sekretion verschiedener Zytokine eine immunmodulatorische Wirkung. Sie sind in der Lage, sowohl proinflammatorische Zytokine wie z.B. Lymphotoxin- α , TNF- α oder IL-6 als auch regulatorische Zytokine wie z.B. IL-10 oder IL-35 zu sezernieren. Hierdurch werden andere Immunzellen beeinflusst (74). Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen MS erkrankter Patientinnen/ Patienten mehr IL-6 und weniger IL-10 sezernieren, als jene gesunder Kontrollpersonen (7,74). IL-10 produzierende B-Zellen werden auch als Bregs bezeichnet. Sie sind in der Lage, die T_H1 -Differenzierung zu supprimieren und eine TNF- α Produktion durch Monozyten herunterzuregulieren (7). Bregs scheinen bei Patientinnen/Patienten mit MS einen kleineren Anteil der B-Zell-Population auszumachen als bei gesunden Kontrollpersonen (74).

Darüber hinaus bilden B-Zellen in inflammatorischer Umgebung ektople Lymphfollikel, welche die Immunantwort weiter unterhalten. Solche Follikel konnten bei Patientinnen/Patienten mit MS in den Meningen gefunden werden (74).

Auch bei der EAE spielen B-Zellen eine wichtige Rolle. Sie sind zwar nicht essentiell für ihre Induktion, wohl aber für die Ausbildung einer hochpathogenen $CD4^+$ T-Zell-Antwort und die Differenzierung MOG-spezifischer T_H1 - und T_H17 -Zellen (74).

Neben B-Zellen spielen aber auch andere professionelle APZ wie z.B. dendritische Zellen (DC), Makrophagen und Mikrogliazellen eine wichtige Rolle bei der MS.

2.3.5 Autoantigene

Trotz intensiver Forschung konnte/n das/die der MS zugrunde liegende/n Autoantigen/e bislang nicht genau identifiziert werden (75). Grundsätzlich kommen Proteine der Myelinscheiden sowie neuronale und astrozytäre Proteine als immunologische Zielstrukturen in Betracht. Während das Hauptinteresse bislang den Myelinbestandteilen galt, rücken nun zunehmend auch andere Proteine in den Fokus der Aufmerksamkeit (5,15). Im Folgenden sollen die wichtigsten bisher identifizierten potenziellen Autoantigene bei der MS kurz vorgestellt werden.

Myelin Basic Protein (MBP)

Als ein Hauptbestandteil der Myelinscheiden gilt MPB schon lange als ein wichtiges denkbare Autoantigen bei der MS. Interessanterweise kommt es im Gegensatz zu anderen Bestandteilen zentralen Myelins auch in peripheren Nervenscheiden vor, was eine periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen ermöglichen könnte (5,15). Es konnte gezeigt werden, dass MBP-spezifische T-Zellen sowohl bei gesunden Kontrollpersonen als auch bei Patientinnen/Patienten mit MS vorkommen (76). Daher muss vermutet werden, dass das bloße Vorhandensein dieser autoreaktiven T-Zellen allein noch keine MS hervorruft. Vielmehr sind weitere Faktoren, wie z.B. die funktionelle Differenzierung der T-Zellen und immunregulatorische Mechanismen entscheidend (5). Einige Epitope des Proteins, wie beispielsweise die zentrale Region MBP₈₄₋₁₀₂/MBP₈₃₋₉₉, wurden als immunodominante Regionen identifiziert. Interessanterweise können einige von ihnen affin verschiedene HLA-DRB Moleküle binden (15,77).

Myelin Proteolipid Protein (PLP)

PLP gehört der Proteolipidproteinfamilie an und stellt das am häufigsten in den zentralen Myelinscheiden vorkommende integrale Membranprotein dar (ca. 50 % Anteil an der gesamten Myelinproteinmasse des ZNS). Außerdem ist es an zahlreichen Mechanismen, beispielsweise der Entwicklung von Astrozyten, beteiligt (78). Neben PLP in seiner gesamten Länge existiert eine kürzere Spleißvariante, die als DM20 bezeichnet wird. Ihr fehlen 35 Aminosäuren (AS 116-150). Im Gegensatz zu MBP kommt PLP fast ausschließlich im ZNS vor. Die beiden Isoformen bilden weniger als 1 % der Proteinmasse in peripheren Myelinscheiden. Dabei scheint insbesondere DM20 außerhalb des ZNS vorzukommen und für die Negativselektion im Thymus verantwortlich zu sein (37,79). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere das nicht in DM20 vorkommende Epitop PLP₁₃₉₋₁₅₁ als Zielstruktur autoreaktiver T-Zellen

Einleitung

prädisponiert ist (79). Tatsächlich dominiert in SJL/J Mäusen eine frühe Immunantwort gegen ebendieses PLP-Epitop. Diese vermag konsekutiv eine EAE hervorzurufen. Im Gegensatz dazu sind zahlreiche andere Mäusestämme, einschließlich dem Stamm C57BL/6, resistent gegenüber einer PLP-induzierten EAE. Neben genetischen Faktoren sind Unterschiede in der Toleranzentwicklung für diesen Sachverhalt denkbar (79).

Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)

Quantitativ macht MOG nur einen sehr kleinen Anteil an der zentralen Myelinscheide aus. Da es allerdings direkt an ihrer Oberfläche liegt und somit gut zugänglich für T-Zellen und Antikörper ist, stellt es ein wichtiges potenzielles Autoantigen bei der MS dar. Zudem konnte MOG bisher nicht im menschlichen Thymus gefunden werden. Die genaue Funktion des Proteins bleibt bislang unklar, jedoch wird eine Rolle als Adhäsionsmolekül vermutet (15,80).

Es gibt Hinweise darauf, dass neben MOG-spezifischen T-Zellen auch anti-MOG-Antikörper an der Pathogenese der MS beteiligt sein könnten. In der EAE hatten diese Antikörper eine demyelinisierende Wirkung (15,80).

Weitere potenzielle Autoantigene

Neben weiteren Bestandteilen der zentralen Myelinscheide befinden sich z.B. das Protein S100 β oder das Enzym Transaldolase H als mögliche Autoantigene bei der MS in Diskussion (15).

Einige Zeit stand der astrozytäre einwärtsgerichtete Kaliumkanal KIR4.1 als immunologische Zielstruktur bei der MS im Fokus des Interesses. Aufgrund kontroverser Forschungsergebnisse bleibt dessen Rolle allerdings weiter unklar (81,82).

Aktuell befindet sich das Protein Anoctamin 2 (ANO2) als mögliches Autoantigen in der Diskussion. Hierbei handelt es sich um einen kalziumaktivierten Chloridkanal. Ayoglu et al. konnten durch Analysen von Serumproben eine erhöhte autoimmune Reaktivität gegenüber ANO2 bei Patientinnen/Patienten mit MS in Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigen. Außerdem konnten sie nachweisen, dass das Protein vor allem in MS-Läsionen vorkommt und dort auch zu einer Aggregatbildung führen kann (75).

2.4 Pathologie

Das typische pathologische Kennzeichen der MS sind sogenannte Plaques oder Läsionen. Hierbei handelt es sich um multiple fokale demyelinisierte Areale vor allem der weißen, aber auch der grauen Substanz des ZNS. Sie können über das ganze Gehirn und Rückenmark (RM) verteilt auftreten, kommen jedoch besonders häufig am Sehnerv, subpial im RM, im Hirnstamm, im Kleinhirn sowie juxtakortikal und periventrikulär vor. Zusätzlich zur Demyelinisierung liegt in diesen Läsionen ein variables Maß an Gliose, axonaler Schädigung und inflammatorischer Aktivität vor. Inflammation spielt in allen Stadien der MS, besonders aber in akuten Krankheitsphasen, eine wichtige Rolle. Histologisch werden MS Läsionen in aktive, chronische und remyelinisierte eingeteilt (1,6,83).

2.4.1 Akute aktive Läsionen

Akute aktive Läsionen stellen das pathologische Korrelat klinischer Schübe dar. Es handelt sich um hyperzelluläre demyelinisierte Areale mit massenhaft Makrophagen, gefüllt mit Myelindebris. Neben aktivierten Makrophagen/Mikrogliazellen besteht das inflammatorische Infiltrat auch aus CD8⁺ T-Zellen und wenigen CD4⁺ T-Zellen. B-Zellen und Plasmazellen sind vor allem perivaskulär zu finden. Eine beschädigte BHS ermöglicht den Eintritt peripherer Immunzellen in das ZNS und ist ursächlich für eine Gadoliniumaufnahme im Rahmen der MRT-Untersuchung (83).

Frühe aktive Läsionen der weißen Substanz werden in vier verschiedene Muster eingeteilt. Diese deuten darauf hin, dass bei unterschiedlichen Personen verschiedene immunologische Zielstrukturen und Mechanismen der Bildung von Läsionen zugrunde liegen (83).

Typ I Läsionen wurden bei 15 % der biopsierten Patientinnen/Patienten gefunden. Es handelt sich um scharf demarkierte perivaskuläre Areale aktiver Demyelinisierung mit aktivierten Makrophagen/Mikrogliazellen sowie aktivierten T-Zellen. Die Schädigung der Oligodendrozyten geht vermutlich von aktivierten Makrophagen/Mikrogliazellen oder ihren Toxinen aus (1,83).

Auch die bei 58 % der biopsierten Personen gefundenen Typ II Läsionen sind scharf demarkiert. In diesen Läsionen scheinen allerdings vor allem Antikörper und Komplementfaktoren gewebeschädigend zu sein (1,83).

Die krankheitsdefinierenden Typ III Läsionen bei 26 % der biopsierten Patientinnen/Patienten sind gekennzeichnet durch aktive Demyelinisierung mit

Einleitung

Apoptose von Oligodendrozyten, wobei vor allem periaxonale Komponenten des Myelins (*myelin-associated antigen* (MAG) und 2',3'-cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNPase)) angegriffen werden. Im Zentrum der Plaques kommen keine Oligodendrozyten mehr vor. Im Gegensatz zu Typ I und II Läsionen gibt es bei Typ III Läsionen keine remyelinisierten Plaques. Insbesondere distale Anteile der Oligodendrozyten sind betroffen, sodass von einer „*dying-back*“ Oligodendroglieopathie gesprochen wird. Vermutlich wird diese durch reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffspezies und/oder mitochondriale Dysfunktion verursacht (1,83).

Typ IV Läsionen wurden nur bei sehr wenigen Patientinnen/Patienten gefunden und sind gekennzeichnet durch einen nichtapoptotischen Untergang von Oligodendrozyten in der weißen Substanz rund um die eigentliche Läsion. Eventuell liegt dem eine primäre Stoffwechselstörung der Oligodendrozyten zugrunde, welche die Zellen gegenüber den inflammatorischen Mediatoren der Umgebung anfällig macht (1,83).

Vor allem im Rahmen einer aktiven inflammatorischen Demyelinisierung kommt es zusätzlich zu axonalen Schädigungen. Das jeweilige Ausmaß korreliert dabei mit der Anzahl an Lymphozyten und aktivierten Mikrogliazellen. Ursächlich sind vermutlich toxisch wirkende Entzündungsmediatoren und ein daraus folgender mitochondrialer und oxidativer Stress mit Energiedefizit des Neurons (83).

2.4.2 Chronische Läsionen

Entwickelt sich eine akute aktive Läsion zu einer chronischen Plaque, nimmt der Grad der Entzündung ab und Makrophagen/Mikrogliazellen verschwinden nach und nach. Die von Astrozyten gebildeten Fasern bilden eine gliöse Narbe, welche die demyelinisierte Läsion füllt. Die BHS bleibt weitgehend intakt, perivaskuläre inflammatorische Infiltrate und die Ausbildung von Lymphfollikeln sind typisch. Mit Voranschreiten der Erkrankung kommt es zu einer diffusen Reduktion des Myelins sowie zu vermehrten axonalen Schädigungen und Verlusten. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, welche diese diffuse chronische Neurodegeneration erklären sollen. Oxidativer Stress durch aktivierte Mikrogliazellen, Veränderungen in Expression und Funktionstüchtigkeit verschiedener axonaler Ionenkanäle, wiederholte Demyelinisierung und fehlende trophische Unterstützung durch Oligodendrozyten sowie Wallersche Degeneration stellen nur einige mögliche Erklärungstheorien dar. Insgesamt ist im Verlauf der Erkrankung eine zunehmende Atrophie des gesamten Gehirns zu verzeichnen (1,83).

2.4.3 Remyelinisierte Läsionen

In den aktiven Typ I und II Läsionen kann es zu einer partiellen Remyelinisierung kommen. Solche Läsionen sind durch dünn myelinisierte Axone mit kurzen Internodalsegmenten gekennzeichnet. Voraussetzung für diesen Reparaturmechanismus ist, dass Vorläuferzellen der Oligodendrozyten aus dem umliegenden Gewebe rekrutiert werden können. Wichtig ist, dass remyelinisierte Areale gegenüber weiteren demyelinisierenden Ereignissen empfindlicher sind als die ursprüngliche weiße Substanz. Diffus und nahezu vollständig remyelinisierte Läsionen werden als Markschattenherde bezeichnet. Im Verlauf der Erkrankung und mit zunehmenden Lebensalter lässt diese Reparaturfähigkeit allerdings nach, wofür es mehrere Erklärungshypothesen gibt (83).

2.4.4 Kortikale Läsionen

Eine Zerstörung von Myelinscheiden und Axonen kann auch in der grauen Substanz des ZNS vorkommen. Insbesondere in der frühen aktiven Krankheitsphase sind diese hoch inflammatorischen Läsionen häufig und können zu kognitiven Einschränkungen und epileptischen Anfällen führen. Nach ihrer Lokalisation werden ein subpialer, ein intrakortikaler und ein leukokortikaler Läsionstyp unterschieden. Eine frühe kortikale Beteiligung scheint mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein. Allerdings ist es bisher kaum möglich, kortikale Läsionen ausreichend gut in der MRT darzustellen. Dies wäre für die Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufs sowie für die Kontrolle des Therapieerfolgs sehr hilfreich (83).

2.5 Klinische Präsentation und Diagnostik

Aufgrund der individuellen Lokalisation der Läsionen, präsentiert sich die MS sehr variabel. Häufige Frühsymptome sind eine einseitige Optikusneuritis, Sensibilitätsstörungen sowie Gangstörungen mit häufig belastungsabhängiger Schwäche der Beine und Gangunsicherheit (2,84). Die meisten Patientinnen/Patienten zeigen zunächst einen schubförmigen Krankheitsverlauf mit wiederholt auftretenden Episoden neuer oder bekannter Symptome bzw. klinischer Zeichen. Solche Episoden werden als Schub bezeichnet. Definitionsgemäß müssen die subjektiv berichteten und/oder objektivierbaren Beschwerden mindestens 24 h anhalten und mit einem zeitlichen Abstand von mindestens 30 Tagen zu einem vorausgegangenen Schub auftreten. Des Weiteren dürfen sie nicht im Rahmen einer Infektion auftreten oder

Einleitung

durch eine Änderung der Körpertemperatur bedingt sein. In diesem Fall läge lediglich ein Pseudoschub vor (2). Im Folgenden werden die häufigsten Symptome kurz erläutert.

2.5.1 Häufige Symptome

Optikusneuritis

In 20 % der Fälle präsentiert sich die MS initial mit einer Optikusneuritis. Im Verlauf der Erkrankung ist etwa die Hälfte der Patientinnen/Patienten zu irgendeinem Zeitpunkt betroffen. Es handelt sich um eine subakut einsetzende, meist einseitige Sehstörung, die typischerweise mit einem Augenbewegungsschmerz der betroffenen Seite verbunden ist. Insbesondere das Farben- und Kontrastsehen sind beeinträchtigt und es kann zur Wahrnehmung eines zentralen Skotoms bis hin zum vollständigen Visusverlust kommen (84).

Myelitis

Die bei der MS häufig auftretende partielle Myelitis ist durch eine Beeinträchtigung einer oder mehrerer, jedoch nicht aller funktioneller RM-Bahnen gekennzeichnet. So kann es z.B. zu motorischen und/oder sensiblen Störungen sowie zu Beeinträchtigungen der Blasenfunktion kommen (84).

Hirnstammsymptomatik

Doppelbilder, internukleäre Ophthalmoplegie, Nystagmus, Schwindel, Dysphagie, Dysarthrie, Zungenschwäche oder Sensibilitätsstörungen im Gesichtsbereich können Hinweise auf eine Beteiligung entsprechender Hirnstammstrukturen sein (84).

Motorische Symptome

Im Verlauf der Erkrankung sind bis zu 89 % der Patientinnen/Patienten von Muskelschwäche betroffen. Eine fokale Muskelschwäche ist dabei oft von Hyperreflexie, Spastik und positiven Pyramidenbahnzeichen begleitet (84).

Sensibilitätsstörungen

Auch Sensibilitätsstörungen wie Taubheit oder Parästhesien treten häufig bei der MS auf. Gelegentlich kommt es auch zu Schmerzen, die am ehesten als neuropathisch einzustufen sind. Eine besondere Form der Sensibilitätsstörung ist das Lhermitte-Zeichen. Hierbei handelt es sich um eine plötzliche elektrisierende Empfindung, die bei Flexion des Kopfes entlang der oberen Wirbelsäule auftritt (84).

Einleitung

Weitere Symptome

Weitere häufig auftretende Beschwerden bei der MS sind kognitive Einschränkungen, Fatigue, Depressionen sowie Störungen der Blasen- und Sexualfunktion (84).

Viele Patientinnen/Patienten empfinden zudem eine Verschlechterung ihrer Symptome bei erhöhten Temperaturen und Hitze (Uthoff-Phänomen), was durch eine temperaturabhängige Veränderung der Nervenleitgeschwindigkeit zu erklären ist (84). Aufgrund der Vielzahl dieser und weiterer Symptome ist eine genaue Diagnostik und insbesondere der Ausschluss möglicher Differenzialdiagnosen von entscheidender Bedeutung.

2.5.2 Diagnostik

Die detaillierte Anamnese sollte neben den aktuellen Beschwerden auch möglicherweise vorausgegangene Episoden neurologischer Ereignisse umfassen. Die anschließende klinisch-neurologische Untersuchung einschließlich einer differenzierten Visusprüfung und einer neuropsychologischen Testung dient der Objektivierung neurologischer Ausfälle. Der für die Diagnosestellung erforderliche Nachweis einer zeitlichen und räumlichen Dissemination erfolgt nach den aktuellsten Diagnosekriterien (85,86) durch klinische und paraklinische Untersuchungen, wobei der Anfertigung einer kranialen und bei entsprechender Symptomatik auch einer spinalen MRT (Tab. 2 und 3) eine besondere Bedeutung zukommt (2,85). Die Diagnosekriterien nach McDonald werden in regelmäßigen Abständen überarbeitet und wurden zuletzt 2017 revidiert. Wesentliches Ziel ist ein frühzeitiger Therapiebeginn durch eine rasche, jedoch akkurate Diagnosestellung. An diesem Punkt betonen die Autoren, dass die empfohlenen Diagnosekriterien in erster Linie bei Patientinnen/Patienten zur Anwendung kommen sollen, die aufgrund ihrer klinischen Präsentation bereits eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine MS haben (86).

Einleitung

Die räumliche Dissemination kann durch ≥ 1 T2-Läsionen¹ in mind. 2 der 4 ZNS-Areale nachgewiesen werden

periventrikulär

juxtakortikal/ kortikal

infratentoriell

Rückenmark²

¹ eine Gadolinium-Aufnahme der Läsionen ist für die räumliche Dissemination nicht erforderlich

² seit der 2017 revidierten Version der McDonald Kriterien dürfen nun auch symptomatische Läsionen bei Personen mit Hirnstamm- oder Rückenmarkssyndrom berücksichtigt werden.

Tabelle 2: McDonald MRT Kriterien für den Nachweis der räumlichen Dissemination basierend auf Swanton et al., modifiziert durch Polman et al. (85,86)

Die zeitliche Dissemination kann nachgewiesen werden durch

1. eine neue T2-Läsion und/oder Gadolinium aufnehmende Läsion(en) sichtbar in einer Kontroll-MRT im Vergleich zu einer Voraufnahme eines beliebigen Zeitpunktes

2. gleichzeitiges Vorliegen asymptomatischer Gadolinium aufnehmender und nicht aufnehmender Läsionen

Tabelle 3: McDonald MRT Kriterien für den Nachweis der zeitlichen Dissemination basierend auf Montalban et al., modifiziert durch Polman et al. (85)

Neben der Durchführung einer MRT-Untersuchung, spielt die Aufzeichnung evozierter Potenziale bei der Diagnosestellung der MS ebenfalls eine wichtige Rolle. Durch die Analyse visuell evozierter Potenziale (VEP), somatosensibel evozierter Potenziale (SSEP) und motorisch evozierter Potenziale (MEP) können auch subklinische Krankheitserscheinungen detektiert werden (2).

Eine Liquoruntersuchung ist nach den Diagnoseempfehlungen sinnvoll, aber nicht obligat. Sie dient einerseits dem Ausschluss erregerbedingter Erkrankungen, andererseits dem Nachweis des inflammatorischen Krankheitscharakters bei der MS. Im Detail umfasst die Liquordiagnostik eine Zytologie, eine Bestimmung von Albumin, IgG, IgM und IgA, den Nachweis oligoklonaler Banden sowie die Antikörper-Synthese-Indizes für die neurotrophen Viren Masern, Röteln, Zoster (MRZ-Reaktion). Oligoklonale Banden (OKB) zeigen eine intrathekale IgG-Produktion an und sind der spezifischste Liquorparameter bei der Diagnosestellung der MS. Mehr als 95 % der Patientinnen/Patienten mit MS weisen oligoklonale Banden auf. Im Gegensatz zu den

Einleitung

OKB ist ein erhöhter IgG-Index weniger sensitiv. Typisch bei der MS ist des Weiteren eine lymphomonozytäre Pleozytose (2,6,84).

Differenzialdiagnostisch ist u.a. der Ausschluss von infektiösen Erkrankungen, Vaskulitiden, Kollagenosen, Leukodystrophien, einem Vitamin-B12-Mangel und Sonderformen entzündlich-demyelinisierender Erkrankungen wie z.B. der Neuromyelitis optica oder der akuten disseminierten Enzephalomyelitis erforderlich (2,84).

2.6 Klassifikation der Multiplen Sklerose

Auch wenn die genaue Ursache der MS bisher nicht bekannt ist, hat die Forschung in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse erbracht, die zu einem besseren Verständnis der Erkrankung und ihrer Pathogenese beigetragen haben. Um dieses neue Wissen auch in den klinischen Alltag zu integrieren, wurde die Klassifikation der klinischen Verlaufsformen der MS aus dem Jahr 1996 (87) im Jahr 2013 durch eine überarbeitete Version ersetzt (88). Eine einheitliche und akkurate Nomenklatur der unterschiedlichen Verlaufsformen der MS ist sowohl für das Design zukünftiger Studien als auch für den klinischen Alltag, insbesondere die Prognose und Therapiewahl, aber auch für die Kommunikation unter Kolleginnen/Kollegen und mit Patientinnen/Patienten wichtig (89).

Die ursprüngliche Einteilung der MS wurde durch die *US National Multiple Sclerosis Society (NMSS) Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis* definiert und beruhte ausschließlich auf klinischen Aspekten der MS. Die vier beschriebenen klinischen Verlaufsformen waren die schubförmig-remittierende (RR), die schubförmig-progrediente (PR) sowie die primär (PP) und sekundär (SP) chronisch progrediente MS. So ließen sich die beiden Hauptgruppen schubförmiger (RR, SP und PR) und progredienter (PP, SP, PR) Verlauf unterschieden. Weiterhin wurden die Begriffe benigne und maligne MS definiert, um die Krankheitsschwere zu beschreiben (87).

In der überarbeiteten Klassifikation der MS findet sich noch immer die Unterscheidung zwischen schubförmigem und progredientem Verlauf, wenn auch mit mehreren Modifikationen. So gehen nun auch die Krankheitsaktivität und die Zunahme des Behinderungsgrades, bezogen auf einen bestimmten Zeitraum, mit in die Beurteilung ein. Des Weiteren ist die schubförmig-progrediente MS als eigene Verlaufsform aus der Klassifikation ausgenommen. In diesem Fall wird nun von einer primär

Einleitung

progredienten MS mit Aktivität gesprochen. Das klinisch isolierte Syndrom wird als weiterer Phänotyp der MS aufgeführt. Dies trifft nicht auf das radiologisch isolierte Syndrom (RIS) zu, bei welchem die Patientinnen/Patienten trotz radiologisch nachweisbarer Läsionen keine klinischen Symptome zeigen. Zusätzlich werden Vorschläge für eine einheitliche und präzise Terminologie kommuniziert. So wird empfohlen, bei Patientinnen/Patienten mit zunehmenden neurologischen Funktionseinschränkungen aufgrund vieler Schübe und/oder inkompletter Erholung von diesen Schüben von einer „Krankheitsverschlechterung“ zu sprechen. Das Ausmaß dieser Verschlechterung kann mit Hilfe verschiedener klinischer Skalen, zum Beispiel der *Expanded Disability Status Scale (EDSS)*, gemessen werden. In Abgrenzung dazu sollte der Begriff „Fortschreiten“ der Krankheit lediglich bei Patientinnen/Patienten mit einer progredienten Verlaufsform angewandt werden. Diese Situation ist dann gleichzeitig auch durch eine Krankheitsverschlechterung gekennzeichnet. Die Bezeichnung „anhaltende Verschlechterung“ soll nicht mehr verwendet werden. Besser ist es, bei Patientinnen/Patienten mit zunehmenden neurologischen Funktionsstörungen über einen bestimmten Zeitraum von einer „bestätigten Verschlechterung“ zu sprechen. Die Begriffe „maligne“ und „benigne“ MS sollen wenn möglich nicht mehr verwendet werden, da sie ungenau sind und zu Missverständnissen führen können (88). Unter Berücksichtigung dieser Änderungen wird die MS aktuell wie folgt eingeteilt:

2.6.1 Schubförmig-remittierende MS

Etwa 85 % der Patientinnen/Patienten mit MS zeigen zu Beginn der Erkrankung einen schubförmig-remittierenden Verlauf (1,6). Dieser kann weiter in zwei Syndromkomplexe eingeteilt werden:

Klinisch isoliertes Syndrom

Das klinisch isolierte Syndrom (KIS)/ *Clinically isolated syndrome (CIS)* äußert sich durch eine subakut auftretende neurologische Funktionsstörung. So kann es zum Beispiel zu Sehstörungen im Rahmen einer Sehnervenentzündung, zu motorischen oder sensiblen Ausfallserscheinungen oder zu Hirnnervenstörungen kommen. Wie bei einem MS-Schub dauern die Symptome mindestens 24 Stunden an und erreichen ihre maximale Ausprägung meist innerhalb von zwei bis drei Wochen. Das KIS tritt definitionsgemäß zeitlich und in der Regel auch räumlich isoliert auf (90).

Einleitung

Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass es sich beim KIS um die erste klinische Präsentation einer demyelinisierenden Erkrankung wie z.B. der MS handelt und ordnet es der Gruppe der schubförmig-remittierenden MS zu. Kommt es zu einem erneuten klinischen Schub, handelt es sich um eine klinisch definitive MS (CDMS). Unter Verwendung der 2017 revidierten Diagnosekriterien nach McDonald ist es möglich, bei einigen Patientinnen/Patienten mit einem typischen KIS die Diagnose einer MS zu stellen, ohne auf einen erneuten klinischen Schub oder eine neue Läsion in der MRT warten zu müssen. Voraussetzungen sind der klinische oder bildmorphologische Nachweis einer räumlichen Dissemination sowie das Vorhandensein oligoklonaler Banden im Liquor. Des Weiteren dürfen keine anderen Liquorbefunde vorliegen, die untypisch für die MS wären. Andere Gründe, die die klinische Präsentation besser erklären können als eine MS dürfen ebenfalls nicht vorliegen (86).

Auch beim KIS spielt die Krankheitsaktivität eine entscheidende Rolle. Folgt dem KIS ein klinisches oder radiologisches Event, wird von einem aktiven KIS gesprochen. In der Regel werden in diesem Fall die Diagnosekriterien für eine RRMS erfüllt. Kommt es weder zu einem weiteren Schub noch zu Veränderungen in der MRT, handelt es sich um ein nicht aktives KIS (88,89).

Schubförmig-remittierende MS

Auch die schubförmig-remittierende MS im engeren Sinne wird in eine aktive und in eine inaktive Form unterteilt. Der Beurteilungszeitraum kann dabei individuell festgelegt werden, muss aber angegeben werden und sollte den Zeitraum von einem Jahr nicht überschreiten (88,89).

1996		2013			
Schubförmig-remittierende MS		Klinisch isoliertes Syndrom (KIS)		Schubförmig-remittierende MS (RRMS)	
vollständige Erholung von klinischen Schüben	unvollständige Erholung von klinischen Schüben mit bleibendem Defizit	nicht aktiv	aktiv*	nicht aktiv	aktiv*
*aktiv = klinische Schübe und/oder MRT-Aktivität (kontrastmittelaufnehmende Läsionen; neue bzw. eindeutig in der Größe zunehmende Läsionen in der T2-Wichtung)					

Tabelle 4: ursprüngliche und überarbeitete Unterteilung der schubförmig-remittierenden MS modifiziert nach Lublin et al. (88,89)

2.6.2 Progrediente MS

Sekundär progrediente MS

Häufig geht die schubförmig-remittierende MS nach einiger Zeit in ein chronisches Stadium mit schleichender Symptomzunahme über. Dann spricht man von einer sekundär progredienten MS (SPMS). In diesem Stadium können noch klinische Schübe auftreten. Da der Übergang schleichend verläuft, wird die SPMS meist retrospektiv nach einer Phase kontinuierlicher Verschlechterung nach anfänglich schubförmigem Verlauf diagnostiziert. Auch sind bisher keine Kriterien oder Biomarker bekannt, die den Konversionszeitpunkt vorhersagen können (88). Mögliche Risikofaktoren, die zu einem frühzeitigen Eintritt in die SPMS führen können, sind ein männliches Geschlecht und ein höheres Alter bei Diagnose der RRMS (91).

Primär progrediente MS

Bei 10-15 % der Patientinnen/Patienten beginnt die MS mit einer schleichenden Zunahme neurologischer Symptome ohne klar abgrenzbaren Schübe. In diesem Fall spricht man von einer primär progredienten MS (PPMS). Patientinnen/Patienten mit PPMS sind bei Krankheitsbeginn im Durchschnitt etwa 10 Jahre älter als jene mit Erstdiagnose einer RRMS, aber etwa gleich alt wie Patientinnen/Patienten mit Beginn einer SPMS. So beträgt das durchschnittliche Eintrittsalter bei der RRMS 30 Jahre und bei der PPMS 40 Jahre. Außerdem tritt die PPMS im Vergleich zur RRMS häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Insgesamt sind allerdings Frauen und Männer gleich häufig betroffen. 80% der Patientinnen/Patienten mit PPMS entwickeln eine spastische Paraparese der Beine. Die zweithäufigste klinische Präsentation stellt ein progredientes ataktisches Syndrom dar (92).

1996			2013			
Progrediente MS			Progrediente MS (primär progredient (PP) oder sekundär progredient (SP))			
primär progredient (PP)	sekundär progredient (SP)	schubförmig progredient (PR)	aktiv* + fortschreitend**	aktiv* + nicht fortschreitend**	nicht aktiv* + fortschreitend**	nicht aktiv* + nicht fortschreitend** (stabil)
*aktiv = klinische Schübe und/oder MRT-Aktivität (kontrastmittelaufnehmende Läsionen; neue bzw. eindeutig in der Größe zunehmende Läsionen in der T2-Wichtung)						
**fortschreitend: eingeschätzt durch eine mindestens einmal jährlich stattfindende klinische Beurteilung						

Tabelle 5: ursprüngliche und überarbeitete Unterteilung der progredienten MS modifiziert nach Lublin et al. (88,89)

2.6.3 Krankheitsaktivität und -fortschritt

Um die Krankheitsaktivität einschätzen zu können, sollten Patientinnen/Patienten mit einer schubförmigen MS mindestens einmal jährlich klinisch untersucht werden und eine zerebrale MRT erhalten. Patientinnen/Patienten mit progredienter Verlaufsform sollten ebenfalls jährlich mindestens eine klinische Untersuchung erfahren. Uneinigkeit besteht darin, in welchen Abständen die Anfertigung einer zerebralen Bildgebung sinnvoll ist.

Krankheitsaktivität liegt definitionsgemäß vor, wenn es zu klinischen Schüben und/oder nachgewiesener Aktivität in der MRT innerhalb eines definierten Zeitraumes kommt. Liegen keine ausreichenden Untersuchungsergebnisse vor, spricht man von einer „unbestimmten“ Krankheitsaktivität. Die Beurteilung der Krankheitsaktivität ist insbesondere hinsichtlich des Ansprechens auf eine verlaufsmodifizierende Therapie relevant und wurde aus diesem Grund in die aktuelle Klassifikation eingearbeitet (88,89).

Bei Patientinnen/Patienten mit progredienter MS wird zudem der allgemeine und schubunabhängige Krankheitsfortschritt innerhalb eines bestimmten Zeitraumes, beispielsweise jährlich, beurteilt (2,3).

2.7 Therapie der Multiplen Sklerose

In der Behandlung der MS kann eine immunmodulatorische von einer symptomatischen Therapie unterschieden werden. Insbesondere die Zahl verfügbarer Immuntherapien ist in den letzten Jahren stetig gestiegen, wohingegen viele der symptomatischen Therapeutika bereits seit den 1970er und 1980er Jahren angewandt werden (2,6). Im Folgenden werden allgemeine Therapieprinzipien beleuchtet und wichtige immunmodulatorische Substanzen vorgestellt.

Immunmodulatorische Therapeutika sollen helfen, den Krankheitsverlauf zu modifizieren und werden deshalb auch verlaufsmodifizierende Therapeutika genannt. Wesentliche Ziele bei der Gabe dieser Medikamente sind eine Reduktion der Schubrate, der Zahl neu auftretender Läsionen in der MRT sowie der daraus folgenden neurologischen Behinderung. Ein weiteres wichtiges Ziel ist es, den Eintritt in eine chronisch-progrediente Krankheitsphase nach anfänglich schubförmig-remittierendem Verlauf zeitlich hinauszuzögern (93).

Die aktuell angewandten immunmodulatorischen Therapeutika bewirken eine Suppression der durch autoreaktive Lymphozyten verursachten Immunreaktion. Somit

Einleitung

wird Einfluss auf die entzündliche Komponente der MS genommen. Die meisten dieser Medikamente zeigen eine gute Wirkung bei schubförmigen Verläufen der MS und dem KIS. Im Gegensatz dazu ist die Wirkung bei progredienten Verlaufsformen fraglich (6,93). Allerdings ist bereits bekannt, dass die individuelle Krankheitsaktivität eine entscheidende Rolle für das Ansprechen auf verlaufsmodifizierende Medikamente spielt. Aus diesem Grund wurde sie neu in die aktuelle Klassifikation der MS eingearbeitet (88,89).

Aus biochemischer Sicht werden bei den verlaufsmodifizierenden Medikamenten pharmazeutische Produkte von biopharmazeutischen Produkten unterschieden. Erstere werden im Englischen als „*new chemical entities*“ (NCE) bezeichnet. Die biopharmazeutischen Produkte tragen den Namen „*new biological entities*“ (NBE). Bei den NCEs handelt es sich um kleine chemische Verbindungen, die chemisch synthetisiert werden. Sie können meist oral verabreicht werden, wohingegen NBEs parenteral appliziert werden. Da NCEs hinsichtlich ihres Zielmoleküls eine geringere Selektivität als NBEs aufweisen, besteht eine höhere Gefahr für Nebenwirkungen durch Aktivität an anderen Molekülen im Körper als dem Zielmolekül. NBEs hingegen wirken hoch spezifisch. Sie haben ein Molekulargewicht von mehr als 1000 Dalton und umfassen sowohl monoklonale Antikörper als auch therapeutische Proteine (93).

In der immunmodulatorischen Behandlung werden nach einem Stufenschema eine Therapie des akuten MS-Schubes, eine Basistherapie sowie eine Eskalationstherapie unterschieden. Das erweiterte Stufenschema aus dem Jahr 2014 umfasst neben den neu zur Verfügung stehenden Substanzen auch eine Berücksichtigung der Krankheitsaktivität (2).

Bei einer Basistherapie steht die Langzeitwirkung im Vordergrund, denn das Voranschreiten der Erkrankung soll verlangsamt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, kann es nötig sein, das Basistherapeutikum zu wechseln oder bei fehlender beziehungsweise unzureichender Wirkung eine Eskalationstherapie durchzuführen. Nach einiger Zeit muss meist wieder auf ein Medikament der Basistherapie umgestellt werden. Ein wichtiger Grund hierfür sind schwere Nebenwirkungen bei langfristiger Anwendung bestimmter Medikamente. Zur individuellen Abschätzung der Sicherheit der Therapeutika ist es wichtig, anamnestisch auch die zuvor verabreichten Substanzen, vor allem Mitoxantron, Natalizumab und Alemtuzumab zu kennen. Die sequenzielle, langfristige aber auch die kombinierte Gabe einiger immunmodulatorischer Therapeutika birgt ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende

Einleitung

Nebenwirkungen. Derzeit gibt es weder ausreichend Daten aus Langzeitstudien noch etablierte Modelle, mit deren Hilfe das individuelle Nebenwirkungsrisiko für Patientinnen/Patienten abgeschätzt werden könnte (2,93).

2.7.1 Therapie des akuten MS-Schubes

Therapie der ersten Wahl bei einem akuten MS-Schub stellt die intravenöse Gabe von Glukokortikosteroiden (GKS) dar. Allerdings gibt es bisher keine verbindlichen Vorgaben hinsichtlich der erforderlichen Dosis, Therapiedauer und Häufigkeit der Anwendung. Im klinischen Alltag wird oftmals 500-1000 mg/d Methylprednisolon über drei bis fünf Tage verabreicht. Bei weiterbestehender Schubsymptomatik kann die Dosis erhöht und die Verabreichung verlängert werden (2). Klinisch bewirken GKS in vielen Fällen eine rasche Symptomrückbildung, wohingegen sich bisher keine nachweisbaren Effekte auf die Langzeitprognose der MS zeigten (2,94). Zugrundeliegend sind eine antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkung bekannt. GKS erhöhen beispielsweise die Zahl regulatorischer T-Zellen und fördern die Foxp3-Expression (55).

Bei Versagen der GKS-Pulstherapie oder bei Vorliegen von Kontraindikationen kann eine therapeutische Plasmapherese (PE) oder eine Immunadsorption (IA) mit dem Ziel der Antikörper- und Komplementfaktorextraktion durchgeführt werden. Während bei der PE Plasma durch eine albuminhaltige Substitutionslösung ersetzt wird, werden bei der Immunadsorption Antikörper herausgefiltert und das gereinigte Plasma anschließend wieder dem Kreislauf zugeführt (2,74).

2.7.2 Basistherapie

Zur Verhinderung weiterer Schübe wird eine Basistherapie durchgeführt. Bewährte Medikamente sind Interferon-Beta-Präparate sowie Glatirameracetat. Seit Ende 2013/Anfang 2014 stehen zusätzlich die beiden NCEs Teriflunomid und Dimethylfumarat zur Behandlung der schubförmigen MS zur Verfügung.

Interferon-Beta-Präparate

Therapie der ersten Wahl zur Verlaufsmodifikation der milden und der moderaten MS stellen rekombinant hergestellte Beta-Interferone dar. Sie kamen 1993 als erste immunmodulierende Therapeutika auf den Markt und sind aktuell zur Behandlung der schubförmig-remittierenden MS sowie beim KIS und bei sekundär progredienten

Einleitung

Verläufen mit Krankheitsaktivität zugelassen. Zur Anwendung bei der primär progredienten MS gibt es bisher keine ausreichende Evidenz (2).

Therapeutische Beta-Interferone leiten sich vom körpereigenen Fibroblasteninterferon ab. Es handelt sich um relativ große und hydrophile Moleküle, sodass auch bei diesem NBE eine parenterale Gabe erforderlich ist.

Beta-Interferone wirken auf vielfältige Art und Weise auf das Immunsystem. Sie zeigen eine antivirale, eine antiproliferative und eine immunmodulierende Wirkung. Letztere scheint bei der Behandlung der MS eine besonders wichtige Rolle zu spielen. Im Laufe der Behandlung kann es allerdings zur Bildung neutralisierender Antikörper kommen, die eine Wirkabschwächung verursachen (2,5,6). Beta-Interferone verursachen auch bei langer Anwendungsdauer keine schwerwiegenden Nebenwirkungen, müssen aber in Abständen von wenigen Tagen parenteral verabreicht werden. Zur Sicherung der Compliance und Minderung lokaler Hautbeschwerden stehen zusätzlich retardierte Varianten zur Verfügung. Beispielsweise bewirkt eine Konjugation mit Polyethylenglykol (PEGylierung) eine längere Halbwertszeit (95).

Glatirameracetat

Als zweites immunmodulatorisches Therapeutikum kam Glatirameracetat auf den Markt (5). Es wird zur Behandlung der milden oder moderaten schubförmig-remittierenden MS und beim KIS angewandt, besitzt aber keine Zulassung zur Behandlung der primär progredienten MS (2).

Wie die Beta-Interferone gehört auch Glatirameracetat zu den NBEs, denn strukturell handelt es sich um ein etwa 50 Aminosäuren großes Polypeptid bestehend aus Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Tyrosin (5). Aufgrund dieser Zusammensetzung besteht eine Ähnlichkeit zu MBP (6). Die immunmodulatorische Wirkung äußert sich unter anderem in einer Beeinflussung der Antigenpräsentation und des Zytokinhaushaltes (5).

Teriflunomid

Teriflunomid stellt einen aktiven Metaboliten des Medikamentes Leflunomid dar, welches seit vielen Jahren in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis bekannt ist. Der Wirkmechanismus besteht in einer reversiblen Inhibition des mitochondrialen Enzyms Dihydroorotat-Dehydrogenase und somit einer Reduktion der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese (93,96). Da Pyrimidin ein wichtiges Substrat bei der DNA- und RNA-Synthese ist, wirkt das Medikament insbesondere auf sich schnell teilende Zellen wie B- und T-Lymphozyten zytostatisch (6,93,96).

Einleitung

Dimethylfumarat

Abgeleitet von einem Medikament aus der Psoriasis-Therapie steht Dimethylfumarat seit Anfang 2014 zur oralen Therapie der schubförmigen MS zur Verfügung. Vermutet wird, dass das Medikament eine Reduktion von Neuroinflammation und Neurodegeneration durch Aktivierung des endogenen zellprotektiven antioxidativen *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* (Nrf-2) Signalweges bewirkt (6,93,96).

2.7.3 Eskalationstherapie

Zur Behandlung einer (hoch)aktiven schubförmig-remittierenden MS sind die Medikamente Natalizumab, Fingolimod, orales Cladribin und Mitoxantron zugelassen. Sie kommen bei Therapieversagen unter einem Basistherapeutikum oder als Primärtherapie bei einem sehr aktiven und fortschreitenden Krankheitsverlauf zum Einsatz (2,5).

Natalizumab

Als humanisierter monoklonaler Antikörper (mAb) gehört Natalizumab zu den NBEs und wird parenteral verabreicht (5). Dieser therapeutische Antikörper richtet sich gegen das Glykoprotein VLA-4 ($\alpha 4$ -Untereinheit des $\alpha 4\beta 1$ - und $\alpha 4\beta 7$ -Integrins) auf Leukozyten (97). Hierdurch wird die Interaktion mit VCAM-1 auf Endothelzellen verhindert und die Diapedese der T_H1 -Zellen über die Blut-Hirn-Schranke blockiert (5,6,96,97). Des Weiteren verhindert eine Blockade der $\alpha 4$ -Untereinheit des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen in das ZNS (97).

Eine gefürchtete Komplikation unter einer Therapie mit Natalizumab ist die Entwicklung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML). Diese opportunistische Infektion kommt durch eine Reaktivierung des John Cunningham (JC) Polyomavirus zustande. Nachweisbare Antikörper gegen das JC-Virus im Serum, eine vorangegangene immunsuppressive Therapie und eine längere Therapiedauer (mehr als 24 Monate) erhöhen das Risiko, eine PML zu entwickeln (2,5,6,96).

Entwickeln Patientinnen/Patienten eine PML, muss die Gabe von Natalizumab sofort beendet werden. Zur schnelleren Elimination des Medikamentes aus dem Körper wird häufig eine PE durchgeführt. Daraufhin kommt zu einer raschen Wiederherstellung der zellulären Immunität und einem Übertritt von Entzündungszellen über die BHS. Im Falle einer hieraus resultierenden Entzündung des ZNS wird von einem inflammatorischen Immunrekonstruktionssyndrom (IRIS) gesprochen. Hierbei handelt

Einleitung

es sich um ein potenziell letales Krankheitsbild, welches eine intensivmedizinische Behandlung erforderlich macht (2,98).

Fingolimod

Das NCE Fingolimod kam als erstes oral verfügbares Medikament zur Behandlung der MS auf den Markt (5,96). Der Wirkmechanismus besteht in einer nichtselektiven Modulation des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors (S1P-Rezeptor) auf der Zelloberfläche von Lymphozyten. Dieser Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Zirkulation von T-Zellen sowie ihrem Austritt aus Lymphknoten. Der aktive Metabolit des Medikamentes, Fingolimod-Phosphat, bewirkt eine Degradation des S1P-Rezeptors. Hierdurch werden aktivierte T-Zellen an der Emigration aus den Lymphknoten gehindert. Darüber hinaus wird ein direkter Effekt auf das zentrale Nervensystem vermutet, da das Medikament die BHS überqueren kann und sich S1P-Rezeptoren auch auf Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen befinden (5,6,96).

Orales Cladribin

2017 wurde Cladribin als weiteres oral verfügbares Medikament zur Behandlung der schubförmigen MS mit hoher Krankheitsaktivität zugelassen. Hierunter konnte in Studien eine signifikante Verringerung der jährlichen Schubrate sowie einer EDSS-Progression gezeigt werden. Cladribin ist ein synthetisch modifiziertes Analogon des Desoxyadenosins und bewirkt als Antimetabolit u.a. eine gestörte Zellteilung (99).

Mitoxantron

Bei dem Zytostatikum Mitoxantron handelt es sich um ein synthetisches Anthrazyklin mit antineoplastischen, antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften. Dieser Typ II Topoisomerasehemmer stört die DNA-Synthese und DNA-Reparaturmechanismen. Auf diese Weise wird unter anderem die Aktivität von Lymphozyten und Makrophagen sowie die Antikörperproduktion gehemmt (100).

Mitoxantron kann als Eskalationstherapeutikum und bei der Behandlung der SPMS eingesetzt werden. Die Zulassung wurde auf einen EDSS von 3-6 begrenzt. Darüber hinaus kann allerdings bei rascher Krankheitsprogredienz ein individueller Heilversuch auch jenseits eines EDSS von 6 unternommen werden. Auch die Behandlung einer PPMS mit Mitoxantron stellt einen individuellen Heilversuch dar, da es hierfür bislang keine ausreichenden Daten hinsichtlich des Nutzens und der Sicherheit gibt (2,100).

Einleitung

Alemtuzumab

Seit Anfang 2014 ist das Medikament Alemtuzumab zur Behandlung aktiver Formen der MS in Europa zugelassen. Es handelt sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen CD52 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Alemtuzumab bewirkt eine rasche und langanhaltende Depletion dieser Zellpopulationen. Nachfolgend kommt es zu einer Repopulation mit einem verstärkten Anteil regulatorischer T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Trotz seiner guten Wirkung wird Alemtuzumab aufgrund der langanhaltenden Lymphopenie und eines ungünstigen Nebenwirkungsprofils bisher lediglich bei Patienten angewandt, bei denen mindestens zwei andere Medikamente keine ausreichende Wirkung zeigten. Die genaue Indikation zur Anwendung von Alemtuzumab bei der MS wird sich erst in den nächsten Jahren zeigen (93,96,97).

2.7.4 Therapie der Zukunft

Die Behandlung mit unselektiven Immunsuppressiva wie Mitoxantron oder Cyclophosphamid geht mit starken Nebenwirkungen und Sicherheitsrisiken einher. Behandlungsziel muss daher eine hochspezifische Modulation der Pathomechanismen bei der MS sein. Neben Natalizumab und Alemtuzumab erfüllen bereits einige neu auf den Markt gekommene Substanzen diese Anforderung (96).

So wurde im Mai 2016 der humanisierte mAb Daclizumab zur Behandlung der schubförmig-remittierenden MS zugelassen (101). Er richtete sich gegen CD25, eine Untereinheit des Interleukin-2 (IL-2) -Rezeptors auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Zellen. Aufgrund der Beobachtung schwerer Leberschäden und Meningoenzephalitiden unter einer Therapie mit Daclizumab wurde der Wirkstoff Anfang März 2018 allerdings wieder vom Markt genommen (2).

Die ebenfalls hoch spezifischen therapeutischen Antikörper Rituximab, Ocrelizumab, Ofatumumab und Ublituximab richten sich gegen CD20 auf der Zelloberfläche von B-Zellen und bewirken eine Depletion sowohl von Prä-B-Zellen als auch von reifen B-Zellen. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark sowie Plasmazellen werden nicht beeinflusst (96).

Rituximab ist ebenso wie Ublituximab ein chimersierter mAb mit einem humanen Anteil von etwa 60 %. Die variablen Domänen des Antikörpers stammen von der Maus. Bisher besitzt Rituximab keine Zulassung für die Behandlung der MS (2,96,102). Ublituximab befindet sich derzeit in klinischen Phase-III-Studien (102).

Einleitung

Der humanisierte mAb Ocrelizumab besitzt lediglich murine Antigenbindungsstellen. Durch seinen vorwiegend humanen Anteil soll die Verträglichkeit des Medikamentes verbessert werden. Dieses Ziel wird auch durch eine vollständige Humanisierung therapeutischer Antikörper, beispielsweise bei Ofatumumab, verfolgt (96). Ocrelizumab wurde im März 2017 zur Behandlung nicht nur der RRMS sondern erstmals auch der PPMS zugelassen. Ofatumumab wird zur Zeit noch in klinischen Phase-III-Studien getestet (102,103).

Neben einer immer spezifischeren und somit nebenwirkungsärmeren immunmodulatorischen Therapie gibt es noch weitere, bisher allerdings noch ferne Forschungsziele.

So existierten bisher keine wirksamen Medikamente zur Verlaufsmodifikation progredienter MS-Formen. Die individuelle Feststellung der Krankheitsaktivität ermöglicht allerdings eine weitere Unterteilung dieser Verlaufsform sowie eine vage Abschätzung der Erfolgsrate einer immunmodulatorischen Therapie. Erstmals wurde auf dieser Grundlage nun in den USA ein Medikament auch für die SPMS mit Krankheitsaktivität zugelassen. Hierbei handelt es sich um den selektiven S1P-Rezeptor-Modulator Siponimod, eine Weiterentwicklung von Fingolimod. Darüber hinaus kommt Siponimod bei der RRMS und dem KIS zum Einsatz (104).

Letztlich wird aber nur die Erforschung der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen Klarheit und gezielte Therapieoptionen hervorbringen. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass das angeborene Immunsystem bei progredienten Verlaufsformen eine entscheidende Rolle spielt. Eventuell ergeben sich hieraus neue therapeutische Ansätze (55).

Ein sehr spezifischer Therapieansatz könnte sich auch aus der genauen Identifikation MS-relevanter Autoantigene ergeben. Denkbar sind in diesem Zusammenhang Nanopartikel, die mit an MHC Klasse II gebundenen krankheitsrelevanten Peptide beladen sind (103,105,106).

Aktuelle Forschungsarbeiten verfolgen zum anderen das Ziel, remyelinisierende Prozesse durch Therapeutika zu initiieren bzw. zu unterstützen (96). Dies wird mithilfe des vollständig humanisierten mAb Opicinumab verfolgt. Durch eine Blockade von LINGO-1 kommt es zu einer Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Opicinumab wird derzeit in einer Phase-II-Studie reevaluiert (102). Darüber hinaus gibt es Überlegungen, Schwann-Zellen zu transplantieren, da in Tierversuchen gezeigt werden konnte, dass transplantierte Schwann-Zellen gezielt in demyelinisierte Areale

Einleitung

einwandern und eine Remyelinisierung bewirken können. Eine entsprechende klinische Studie wurde allerdings aufgrund fehlender Wirkung abgebrochen (107).

Nicht nur in demyelinisierten Gehirnarealen, sondern auch im angrenzenden Parenchym und in der makroskopisch intakten weißen Substanz kommt es im Laufe der Erkrankung zu axonalen Schädigungen. Es wird vermutet, dass eine möglichst frühzeitige Behandlung während der Entstehung neuer Läsionen die Degeneration von Axonen verhindern könnte (108). Hierfür stehen allerdings noch keine Therapeutika zur Verfügung.

Außerdem werden dringend aussagekräftige Biomarker benötigt, um den individuellen Krankheitsverlauf von Patientinnen/Patienten vorhersagen und auf dieser Grundlage eine bestmögliche Therapie durchführen zu können. Dabei spielen sowohl die Modifikation des Krankheitsverlaufes als auch das langfristige Sicherheitsprofil eine entscheidende Rolle (93). Auch reagieren nicht alle Menschen gleich auf die unterschiedlichen Medikamente. Es spielt beispielsweise eine entscheidende Rolle, welche Untergruppe der T-Zellen maßgeblich an der Pathogenese der MS beteiligt sind. Patientinnen/Patienten mit vielen T_H17 -Zellen und einem hohem Serumwert an IL-17 sprechen nicht so gut auf IFN- β an wie jene mit vorwiegend T_H1 -Zellen (55).

2.8 Hintergrund der Arbeit und Zielsetzung

Trotz intensiver Forschung konnte die genaue Pathogenese der MS bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Insbesondere die Targetstrukturen krankheitsrelevanter myelinreaktiver $CD4^+$ T-Zellen sind bislang unklar (1,6). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die peptidspezifische zelluläre Immunantwort einiger MS Patientinnen/Patienten genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Lymphozyten von Patientinnen/Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen der MS sowie von gesunden Kontrollpersonen mit einer Reihe Peptide stimuliert und die Reaktivität der Zellen mit Hilfe von IFN- γ - sowie IL-17-ELISpots bestimmt (Abb. 4). Dabei wurden 29 verschiedene Peptide als mögliche neue Autoantigene untersucht. Die ursprünglich HLA-gebundenen Strukturen wurden aus den Gehirnen von HLA-DR15 $^+$ MS Patientinnen/Patienten eluiert und nach Identifikation ihrer Aminosäuresequenz synthetisiert. Dieser Vorgang erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Sabrina Haag sowie Herrn Prof. Dr. Wiesmüller (Kap. 3.5).

Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen den Serumparametern Vitamin D, Cholesterin, TSH und fT4 und der *ex-vivo* Reaktivität der

Einleitung

T-Lymphozyten. Dies diente der Untersuchung möglicher pathogenetischer Einflussfaktoren sowie der Suche nach geeigneten Biomarkern (Abb. 1).

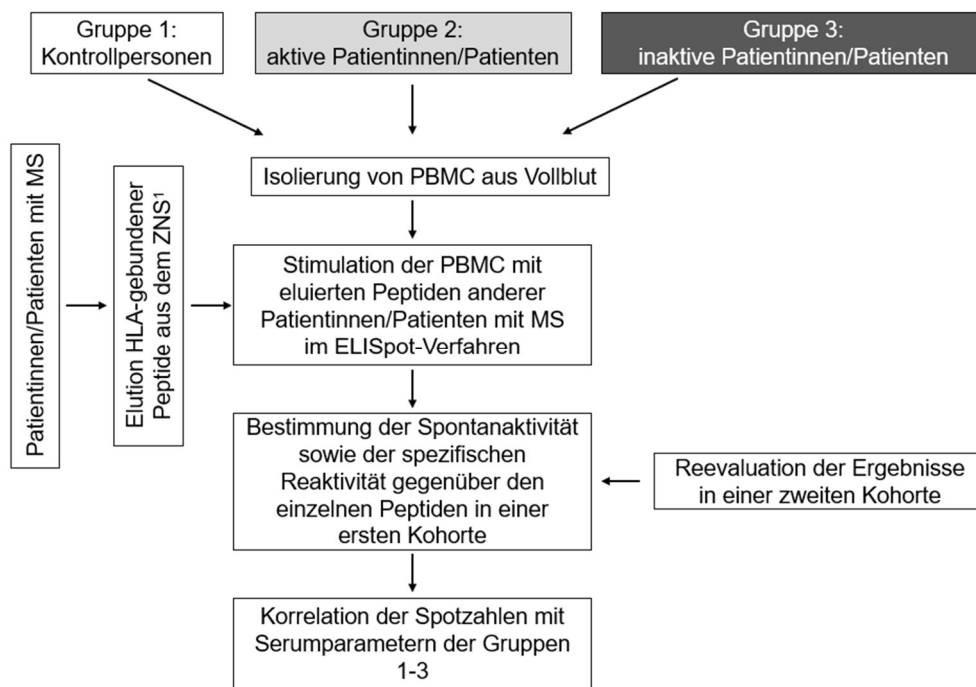


Abbildung 1: **Flowchart des Vorgehens bei diesem Projekt**

Die Flowchart zeigt schematisch die einzelnen Vorgehensschritte bei diesem Projekt. ¹Herkunft der Peptide s. Kap. 3.5

3 Material und Methodik

3.1 Materialliste

3.1.1 Laborgeräte

Material	Artikelnummer	Firmenhauptsitz
Centrifuge 5810R	5811000622	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Centrifuge 5418R	5401000013	Eppendorf AG, Hamburg, DE
CO ₂ -Inkubator HERAcell® 150	5536022	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Herasafe™ KS biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	51022482	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
LCD Kaltlichtquelle KL 1500	150.200	Schott AG, Mainz; DE
Leica MS5 Stereomikroskop	nicht bekannt	Leica, Wetzlar, DE
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	727201	Vacubrand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
ImmunoSpot® Analyzer	nicht bekannt	Cellular Technology Limited (CTL), Shaker Heights, US
Laborkühlschrank	9005382168356	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, DE
Laborgefrierschrank	LH-G5216	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, DE
Forma™ -86°C Ultratiefkühlschrank	88400V	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Lichtmikroskop Olympus CK30	73640-5	Marshall Scientific, Hampton, US
Pipetboy acu 2	155 019	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, DE
Mehrkanalpipette Transferpette®-12	703732	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, DE
Mehrkanalpipette Research® plus, 8-Kanal, 10-100µl	3122000035	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Einkanalpipetten Research® plus 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	3120000011, 3120000020, 3120000046, 3120000062	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Multipette® M4	4982000012	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortex-Reagenzglas mixer	7-2020	neoLab, Heidelberg, DE
Vertikaler Standautoklav	Systec V-150	Systec GmbH, Linden, DE
Eismaschine Scotsman AF 100	AF100	Scotsman®, Vernon Hills, US
Wasserbad	WB07	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE
Stickstofftank Espace 331 Air	152441	Air Liquide Medical GmbH, Paris, FR
Stickstofflagerbehälter Cryotherm Apollo®	78400571	Kryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen, DE

3.1.2 Verbrauchsgüter

CELLSTAR® Serologische Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	604107, 710107, 606107, 607107, 760107	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
CELLSTAR® Röhrchen 50 ml und 15 ml, PP, konischer Boden, steril	227261, 188271	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
CRYO.S™, PP, steril	121261	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Nalgene™ Kryoröhrchen	5000-0020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

Material und Methodik

DNA LoBind Tube 1,5 ml	0030108051	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Transferpipette 3,5 ml	86.1171	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Zellkulturplatten 96 well, Rundboden, Nunclon™ Delta Oberfläche	163320	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zellkulturplatten 96 well, Flacchboden	92096	TPP®, Trasadingen, CH
SafeSeal SurPhob Spitzen, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl, steril	VT0200, VT0220, VT0230, VT0240, VT0270	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Zellkulturflaschen, Nunc™ unbehandelte Kolben	156800	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
sterile Spritzenfilter 0,22 µm, 0,45 µm mit PVDF Membran	SLGV013SL, SLHV013SL	Merck Millipore, Billerica, US
sterile Spritzenfilter 0,2 µm	83.1826.001	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Combitips advanced® 0,2 ml, 1 ml, 5 ml	0030089626, 0030089642, 0030089669	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Peha-soft® nitrile FINO, puderfreie Einmal-Untersuchungshandschuhe	9421974	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, DE
Kleenex® Kosmetiktücher	21400	Kimberley-Clark Professional® Roswell, US
sterile Kanülen 27 G, 22G, 18G	302200, 300900, 304622	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, US
epT.I.P.S. Pipettenspitzen 2-200 µl, 20-300 µl, 50-1000 µl	0030000870, 0030000900, 0030000919	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 20 µl, farblos	70.1116	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, DE
Haemocytometer-Deckgläser	L189.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Cellstar® Zellkulturschalen, PS, 145/20 mm, steril	639160	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT
Zählkammer Neubauer improved 0,1 mm	0640010	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
BD Plastipak™ Spritze, 20 ml, luer lock-Ansatz	300629	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
Spritze, 50 ml, luer lock-Ansatz mit Kanüle	9000701	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Phosphatgepufferte Salzlösung	D8537	SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, US
Lymphoprep™	07851	Stemcell Technologies, Vancouver, CA
Ultra pure water, steril	L0015	Merck Millipore, Billerica, US
Dimethyl sulfoxide, steril filtriert	D2438	SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, US
Trypanblau (C.I.23850)	CN76.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Türks Lösung	1092770100	Merck Millipore, Billerica, US
Ethanol, ≥99,8 %	SZBE0350V	SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, US
Phytohaemagglutinin	L8754	SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, US

Material und Methodik

3.1.4 Kits

Human IFN- γ ELISpot ^{PRO}	3420-2APW-10	Mabtech AB, Nacka Strand, SE
Human Interleukin-17A ELISpot ^{PLUS}	3520-2HW-Plus	Mabtech AB, Nacka Strand, SE
innuPREP Blood DNA Mini Kit	845-KS-1020250	Analytikjena, Jena, DE

3.1.5 Peptide

1	MEVEDNRSQVETD	Herkunft der Peptide s. Kap. 3.5
2	DFDPLPPVTSPVKAPTPSG	
3	YIIDNKGIDSDA	
4	RISPDQGGQFAQML	
5	YSIITPNILRL	
6	SVSNVVITK	
7	TTYNYAVLK	
8	HGSKYLATASTMD	
9	KNIVTPRTPPPSQ	
10	ATYNFAVLK	
11	DLSQVAAISNDLK	
12	SVNGKVLSK	
13	GGSVYKYASFQVENDQ	
14	AVVEPYNSILTHTT	
15	LERIQIQEAAKKPG	
16	YAVAVVKKDSG	
17	EQVFSKYGQISE	
18	VISLEGKPL	
20	AVNAHSNILK	
22	LRVAPEEHPVL	
23	MNNREVLEQVEHGY	
24	RVAPPEHPVLLTEAPLNPK	
25	SNTPILVDGKDVMPEVN	
26	ASAIKSmFSGE	
27	KNIIDAFNGGISLV	
28	DVIDNDSWRIW	
29	VVNrLLTPTHSF	
30	KNIVTP-CIT-TPPPSQ	
31	VVN-Cit-LLTPTHSF	

3.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze

Fötales Bovines Serum (FBS)	S 0115	Merck Millipore, Billerica, US
L-Glutamine (200mM)	25030081	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	15140122	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
RPMI 1640 Medium	21875-034	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

3.1.7 Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel Pursept®-A Xpress	230131	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Mucasept®-A Händedesinfektion	230063	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Manisoft® Handseife	3087070	Ecolab® Healthcare, St. Paul, US

3.1.8 Software

ImmunoSpot® SOFTWARE	nicht bekannt	Cellular Technology Limited (CTL), Shaker Heights, US
GraphPad Prism 7	nicht bekannt	GraphPad Software, Inc., La Jolla, US
IBM® SPSS® Statistics Version 23	nicht bekannt	IBM, Armonk, US
Office 365 ProPlus	nicht bekannt	Microsoft Corporation, Redmont, US
UniProt Datenbanken	nicht bekannt	UniProt Consortium

3.2 Isolierung und Kryokonservierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Zur Isolierung der PBMC wurde Patientinnen/Patienten der *Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg am Bezirksklinikum Regensburg* sowie gesunden Kontrollpersonen periphervenöses Blut entnommen. In der Patientengruppe befanden sich Personen mit unterschiedlichen Verlaufsformen einer MS.

Eine Koagulation der Proben wurde durch Heparinisierung verhindert. Die Isolierung erfolgte nach dem Prinzip einer Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wurde nach dem Protokoll von Riedhammer et al. (109) vorgegangen. Zunächst wurde das Blut im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt und anschließend vorsichtig je 30 ml verdünntes Blut auf 15 ml des Dichtegradientenmediums Lymphoprep™ aufgetragen. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 800 g und 18 °C für 25 Minuten. Zur Erhaltung des Gradienten lief die Zentrifuge ungebremst aus. Nach der Zentrifugation hatten sich die Erythrozyten und Granulozyten auf dem Boden des Gefäßes abgesetzt. Die PBMC bildeten aufgrund ihrer spezifischen Dichte eine Interphase zwischen Lymphoprep™ und dem Blutplasma. Mit einer Transferpipette wurden die PBMC abgenommen und in reichlich PBS gewaschen. Danach wurde bei 150 g und 4 °C für 10 Minuten bei abgeschalteter Bremse zentrifugiert und der gleiche Waschschrift mit RPMI 1640 Medium wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS, 1% 200 mM L-Glutamin sowie 1 % Penicillin/ Streptomycin resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Färbung mit Trypanblau ergab die Zahl der vitalen Zellen. Zur spezifischen Bestimmung der Anzahl der PBMC wurde zusätzlich mit Türkscher Lösung gefärbt. Da nicht immer mit frisch isolierten PBMC gearbeitet werden konnte und auch zu einem späteren Zeitpunkt Zellen zur Verfügung stehen sollten, wurden die PBMC in Aliquots zu je 5×10^6 Zellen/ml kryokonserviert. Als Einfriermedium diente 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FBS. Das Endverhältnis von Zellmedium zu Einfriermedium betrug 1:1. Durch die schrittweise Zugabe und das Einfrieren der

Material und Methodik

Zellen bei -80 °C innerhalb von zehn Minuten nach Kontakt mit DMSO wurde der Anteil überlebender Zellen erhöht. Die endgültige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zusätzlich wurden jeder/m Spender/in mehrere Serum-Monovetten sowie eine EDTA-Monovette Blut entnommen. Die Serum-Monovetten wurden bei 21 °C mit 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots zu je 500 µl bei -80 °C eingefroren und später ebenfalls in flüssigen Stickstoff überführt. Die EDTA-Monovetten wurden bei -20 °C eingefroren. Des Weiteren wurde aus den isolierten PBMC jeweils ein RNA-Lysat hergestellt. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen zweimal bei 21 °C und 300 rpm für 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden 350 µl lysierender RLT Puffer hinzugegeben und das entstandene Lysat bei -80 °C eingefroren. Insgesamt konnte so die umfangreiche Probensammlung der Arbeitsgruppe erweitert werden.

3.3 Auftauen von PBMC

Die aufgetaute Zellsuspension wurde zügig in ein äquivalentes Volumen Zellmedium überführt, um das für die Zellen toxische DMSO zu verdünnen. Im Abstand von jeweils etwa drei Minuten wurde zweimal das gleiche Volumen Zellmedium hinzugegeben und anschließend bei Raumtemperatur mit 1000 rpm für 10 Minuten bei abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit RPMI 1640 Medium ohne Zusätze wiederholt. Danach wurden die PBMC in Zellmedium resuspendiert und die Zellzahl nach der Färbung mit Trypanblau lichtmikroskopisch ermittelt.

3.4 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISpot)

Die ELISpot-Methode wurde erstmals 1983 von Czerkinsky et al. (110) beschrieben und ermöglicht den spezifischen Nachweis sezernierter Zytokine. Darüber hinaus kann die Anzahl zytokinsezernierender Zellen bestimmt werden (110,111).

Bei dieser Methode werden in einer Kokultur Zellen und mögliche Stimuli auf einer Polyvinylidenfluorid-Membran inkubiert. An diese Membran wurde zuvor ein Antikörper immobilisiert, der den nachzuweisenden Analyten binden kann. Je nach Antikörper können unterschiedliche Proteine wie z.B. verschiedene Zytokine nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden der mAb 1-D1K (Mabtech, Nacka Strand, SE) zum Nachweis von humanem Interferon- γ (IFN- γ) sowie der mAb MT44.6 (10

Material und Methodik

$\mu\text{g/ml}$, Mabtech, Nacka Strand, SE) zum Nachweis von humanem Interleukin (IL) -17A verwendet.

Der Erstantikörper bindet das von den Zellen sezernierte Zytokin. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen verworfen und ein enzymgekoppelter Zweitantikörper hinzugefügt, welcher den nachzuweisenden Analyten ebenfalls bindet. Das humane IFN- γ wurde durch den biotinylierten mAb 7-B6-1 ($1 \mu\text{g/ml}$, Mabtech, Nacka Strand, SE) gebunden. Für den Nachweis von humanem IL-17A kam der biotinylierte mAb MT504 ($0,5 \mu\text{g/ml}$, Mabtech, Nacka Strand, SE) zum Einsatz. Biotin bindet mit einer sehr hohen Affinität an Streptavidin, welches beim IFN- γ -ELISpot mit dem Enzym alkalische Phosphatase (ALP), beim IL-17A-ELISpot mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert wurde.

Die abschließende Zugabe einer Substratlösung führt zu einer enzymatischen Farbreaktion und der Bildung eines präzipitierenden Produktes. Dieses ist anschließend als Punkt, im Englischen „Spot“, auf dem Boden der Platte sichtbar. Bei den verwendeten Substratlösungen handelte es sich beim IFN- γ -ELISpot um BCIP/NBT-plus, beim IL-17A-ELISpot um 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

Jeder dieser Spots repräsentiert genau eine zytokinsezernierende Zelle. Die Auszählung der Spots pro well kann sowohl maschinell als auch manuell unter dem Lichtmikroskop erfolgen. Grundlage sämtlicher statistischer Auswertungen dieser Arbeit bildeten die manuell ausgezählten Werte. Das Einlesen der ELISpot-Platten mit Hilfe des ImmunoSpot[®] Analyzers von C.T.L. diente der Digitalisierung und Archivierung der Ergebnisse. Abb. 2 zeigt exemplarisch das mit Hilfe der ImmunoSpot[®] Software erstellte Abbild einer ELISpot-Platte nach Koinkubation von PBMC der Patientin MS_01 und verschiedenen Peptiden.

Material und Methodik

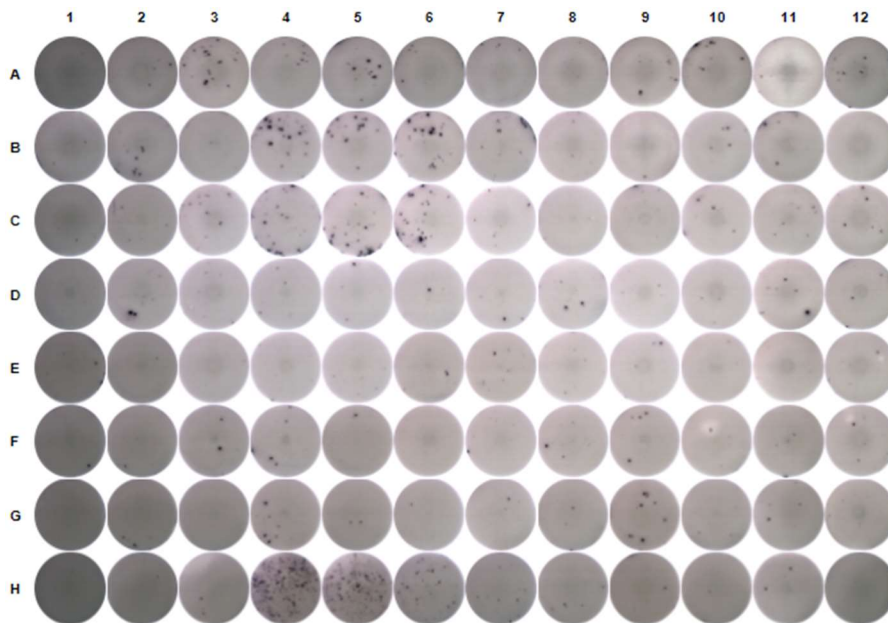


Abbildung 2: exemplarisches Bild einer ELISpot-Platte

Abgebildet ist die IFN- γ -ELISpot-Platte nach Inkubation von PBMC der Patientin MS_01 in Anwesenheit von verschiedenen Peptiden.

Die Inkubationszeit aller im Rahmen dieses Projektes durchgeführten ELISpots betrug 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

In jedes well wurden 200.000 Zellen ausgesät. Die eluierten Peptide sowie Phytohämagglutinin (PHA) als Positivkontrolle wurden mit einer Konzentration von 3 μ g/ml hinzugegeben. Zur Erkennung eines möglichen direkten Effektes des DMSO, in welchem die Peptide gelöst waren, wurde auch die Aktivität gegenüber der entsprechenden Konzentration an DMSO in RPMI Medium gemessen. Zusätzlich wurde in einer Negativkontrolle die Spontanaktivität gemessen.

Bei sämtlichen IFN- γ -ELISpots wurden Dreifachbestimmungen, bei den IL-17A-ELISpots Zweifachbestimmungen durchgeführt.

Es wurde nach den Herstellerprotokollen *ELISpot^{PRO} for Human IFN- γ* und *ELISpot^{PLUS} for Human IL-17A* von der Firma Mabtech (Nacka Strand, SE) vorgegangen.

3.5 Herkunft der getesteten Peptide

Die Elution der HLA-gebundenen Peptide aus den Gewebeproben verstorbener HLA-DR15⁺ MS Patientinnen/Patienten erfolgte durch Frau Dr. Sabrina Haag. Die anschließende Synthese der bei diesem Projekt verwendeten Peptide wurde von Prof. Dr. Wiesmüller der EMC microcollections GmbH in Tübingen durchgeführt. Die Peptide

mit den Nummern 19 und 21 kamen bei dem durchgeführten Syntheseverfahren nicht zustande. Dies erklärt die lückenhafte Peptidnummerierung.

3.6 Gewinnung von Studienteilnehmerinnen/Studienteilnehmern

Die getesteten MS Patientinnen/Patienten befanden sich in Beratung und/oder Behandlung an der *Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg am Bezirksklinikum Regensburg*. Sie willigten schriftlich in ihre Teilnahme an dieser Studie ein. Die Prüfung und Zulassung der Studie auf den Arbeitsgruppenleiter Herrn Professor Dr. med. Dr. Robert Weißert erfolgte durch die Ethikkommission der Universität Regensburg (Zulassungsnummer: 12-101-0004). Darüber hinaus wurden sämtliche ethische Standards der Deklaration von Helsinki und ihren revidierten Fassungen eingehalten. Die Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen/Studienteilnehmer erfolgte zwischen 2012 und 2016.

3.7 Bestimmung der Serumparameter

Die Messung der Serumparameter erfolgte freundlicherweise durch Frau Tanja Weinfurter vom Klinisch Chemischen Labor der Medbo am Bezirksklinikum Regensburg.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen der gewonnenen Daten wurden mit der Software *SPSS® Statistics Version 23* sowie *GraphPad Prism 7* durchgeführt. Letztere diente des Weiteren der Erstellung der Grafiken. P-Werte kleiner als $p=0.05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Zur Testung einer Normalverteilung wurde stets der D'Agostino und Pearson Test verwendet.

Zwei Kontrollpersonen mussten von den Auswertungen exkludiert werden. Dies kann begründet werden durch einen anderen genetischen Hintergrund einer der beiden Personen und eine ausgeprägte unspezifische IFN- γ -Sekretion bei der anderen Person. Diese kam eventuell durch eine Verunreinigung bei der PBMC-Isolierung zustande. Des Weiteren wurde bei der Analyse der TSH-Werte der Patient MS_04 aus der aktiven Gruppe ausgenommen. Sein TSH-Wert lag bei 33,01 $\mu\text{IU/ml}$ und damit deutlich über dem Normwert. Eine Schilddrüsenerkrankung war allerdings nicht vorbekannt.

Material und Methodik

Zunächst erfolgte die Berechnung der Mittelwerte der im ELISpot pro Peptid gewonnenen Zweifach- bzw. Dreifachbestimmungen. Diese Mittelwerte wurden anschließend zunächst für jede Person separat ohne und nach Abzug des DMSO-Mittelwertes von allen Mittelwerten gemeinsam mit dem *standard error of the mean* (SEM) grafisch dargestellt. Anschließend wurden pro Peptid die gepoolten Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Kontrollpersonen, alle MS-Patientinnen/Patienten, aktive und inaktive Patientinnen/Patienten) sowie der SEM grafisch aufgetragen. Die für zwei getrennte Kohorten durchgeführten IFN- γ -ELISpots wurden dabei separat analysiert. Des Weiteren erfolgte eine grafische Gegenüberstellung der nach Gruppen gepoolten Mittelwerte der Anzahl der IFN- γ - bzw. IL-17-Spots/200.000 PBMC nach Inkubation in Anwesenheit der Peptide 6, 7 und 10.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Verhältnisse der berechneten Mittelwerte gegenüber der jeweils individuellen Hintergrundaktivität (Mittelwert der Spots in den DMSO wells = DMSO-Mittelwert) farbcodiert im Sinne einer *heat map* dargestellt. Einer zweifach, dreifach, vierfach oder mindestens fünffach höheren Spotzahl nach Inkubation mit einem Peptid als dem DMSO-Mittelwert wurde jeweils ein Farbton zugeordnet. Eine positive Reaktion wurde bei einer mindestens zweifach höheren Spotzahl im Vergleich zum DMSO-Mittelwert angenommen. In Einzelfällen war es aus mathematischen Gründen notwendig, einen DMSO-Mittelwert von null durch den Zahlenwert 0,001 zu ersetzen.

Bei der rechnerischen Auswertung der *heat maps* wurde die Anzahl der positiven Reaktionen (=farbige Kästchen) bezogen auf die Gesamtkästchenzahl (Anzahl der Personen x 29) betrachtet. Anschließend wurden mögliche Unterschiede in diesem Verhältnis zwischen den einzelnen Gruppen getestet. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney U Test angewandt. Zur mathematischen Darstellung der unterschiedlichen Diversität in der Reaktivität gegenüber den einzelnen Peptiden zwischen den Gruppen wurde diese Berechnung zusätzlich nach Abzug der Peptide 6, 7 und 10 durchgeführt.

Ein direkter Gruppenvergleich der Mittelwerte diente der grafischen Darstellung und statistischen Testung möglicher Unterschiede in der Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 und der Spontanaktivität zwischen den einzelnen Gruppen. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte die Durchführung des Mann-Whitney U-Test bei zwei Gruppen, bzw. des Kruskal-Wallis-Tests bei drei Gruppen. Zeigten sich hierbei

Material und Methodik

signifikante Unterschiede wurde als Post-hoc-Test der Dunn`s Test für eine paarweise Vergleichstestung angewandt.

Bei der statistischen Analyse der Serumparameter wurden die Ergebnisse der IFN- γ -ELISpots beider Kohorten separat sowie gepoolt betrachtet.

Es erfolgte eine nach Gruppen getrennte Korrelation jeweils eines der vier gemessenen Serumparameters mit der spezifischen Reaktivität der PBMC gegenüber jeweils einem der Peptide 6, 7 und 10 sowie der Spontanaktivität. Anschließend wurde diese Korrelation mit der Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 gleichzeitig durchgeführt. Die Anzahl der spezifischen Zytokin sezernierenden Zellen wurde hierzu durch Abzug der Spotzahl in der Negativkontrolle (DMSO) von jener nach Peptidinkubation ermittelt. Negative Werte wurden aus logischen Gründen durch null ersetzt.

In einem direkten Gruppenvergleich wurden mögliche Unterschiede der gemessenen Serumparameter zwischen den einzelnen Gruppen grafisch dargestellt und statistisch getestet. Je nach Vorliegen einer Normalverteilung wurde der Mann-Whitney U Test oder der ungepaarte T-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der getesteten MS Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen

Unter den im Rahmen dieser Arbeit getesteten MS Patientinnen/Patienten befanden sich 52 Personen mit einer RRMS, 3 Personen mit einer SPMS sowie 6 Fälle eines KIS.

Insgesamt zeigten 32 dieser Patientinnen/Patienten keine aktuelle klinische oder bildmorphologische Krankheitsaktivität und wurden im Folgenden als inaktiv bezeichnet. Im Gegensatz dazu konnten bei 29 Personen klinische Schübe und/oder MRT-Aktivität als Zeichen einer floriden Krankheitsaktivität ausgemacht werden. Sie wurden daher als aktiv klassifiziert. Die Blutentnahme erfolgte bei diesen Probanden zumeist vor der Verabreichung von Steroiden. Tab. 6 führt wichtige Charakteristika der einzelnen Subgruppen der gesamten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Population auf.

	MS Patientinnen/Patienten			Kontrollpersonen (n=16)
	gesamt (n=61)	aktiv (n=29)	inaktiv (n=32)	
Alter (Jahre)	39,26 ± 13,75 SD (18-75)	40,28 ± 15,01 SD (18-75)	38,34 ± 12,67 SD (19-65)	27,75 ± 9,35 SD (18-50)
weiblich:männlich	48:13	22:7	26:6	8:8
Krankheitsdauer (Jahre)	7,22 ± 9,6 SD (1 Woche – 37 Jahre)	5,47 ± 10,24 SD (1 Woche – 34 Jahre)	8,45 ± 9,08 SD (1 Monat – 37 Jahre)	
EDSS*	1,91 ± 1,86 SD (0-6,5)	2,26 ± 2,19 SD (0-6,5)	1,58 ± 1,46 SD (0-6,5)	

Tabelle 6: **Ausgewählte Charakteristika der gesamten getesteten Population (Kohorten 1 und 2)**

In der Tabelle sind Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer und der *EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme der einzelnen Subgruppen der gesamten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Population (Kohorten 1 und 2) dargestellt. EDSS steht für *Expanded Disability Status Scale*, SD für die Standardabweichung.

In einer ersten Kohorte wurden Proben von 16 aktiven, 15 inaktiven und 16 Kontrollpersonen für die Durchführung von IFN- γ - und IL-17-ELISpots verwendet. Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeit wurden zusätzlich IFN- γ -ELISpots mit den PBMC von 13 aktiven und 17 inaktiven Personen durchgeführt (zweite Kohorte). Somit erklärt sich die nicht durchgehende Nummerierung der Patientinnen/Patienten. Die meisten Patientinnen/Patienten hatten neben der MS keine weiteren bekannten Erkrankungen. Die Tabellen 7 und 8 zeigen die für beide Kohorten getrennt

Ergebnisse

durchgeführte deskriptive Statistik. Nähere Informationen zu den einzelnen Probanden sind der Tab. 9 zu entnehmen.

	MS Patientinnen/Patienten			Kontrollpersonen (n=16)
	gesamt (n=31)	aktiv (n=16)	inaktiv (n=15)	
Alter (Jahre)	39,74 ± 15,36 SD (19-75)	44,5 ± 16,66 SD (19-75)	34,67 ± 12,43 SD (19-60)	27,75 ± 9,35 SD (18-50)
weiblich:männlich	21:10	11:5	10:5	8:8
Krankheitsdauer (Jahre)	5,89 ± 9,3 SD (2 Wochen – 34 Jahre)	7,88 ± 12,62 SD (2 Wochen – 34 Jahre)	4,04 ± 4,25 SD (1 Monat – 14 Jahre)	
EDSS*	2,28 ± 2,29 SD (0-7,5)	2,81 ± 2,55 SD (0-7,5)	1,68 ± 1,86 SD (0-6,5)	

Tabelle 7: **Ausgewählte Charakteristika der ersten Kohorte**

In der Tabelle sind Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer und der *EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme der einzelnen Subgruppen der ersten Kohorte dargestellt. EDSS steht für *Expanded Disability Status Scale*, SD für die Standardabweichung.

	MS Patientinnen/Patienten		
	gesamt (n=30)	aktiv (n=13)	inaktiv (n=17)
Alter (Jahre)	38,77 ± 12,10 SD (18-65)	35,08 ± 11,21 SD (18-54)	41,59 ± 12,32 SD (25-65)
weiblich:männlich	27:3	11:2	16:1
Krankheitsdauer (Jahre)	8,59 ± 9,89 SD (1 Woche – 37 Jahre)	1,98 ± 3,61 SD (1 Woche – 11 Jahre)	12,09 ± 10,44 SD (10 Monate – 37 Jahre)
EDSS*	1,53 ± 1,23 SD (0-5,5)	2,58 ± 1,46 SD (0-5,5)	1,5 ± 1,08 SD (0-3,5)

Tabelle 8: **Ausgewählte Charakteristika der zweiten Kohorte**

In der Tabelle sind Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer und der *EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme der einzelnen Subgruppen der zweiten Kohorte dargestellt. EDSS steht für *Expanded Disability Status Scale*, SD für die Standardabweichung.

	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheitstyp	Krankheitsaktivität	Krankheitsdauer	OKB ¹	EDSS ²	Immunmodulatorische Behandlung	Begleiterkrankungen	Besonderheit	Durchgeführte Analyse
Patientinnen/Patienten											
MS_01	27	weiblich	RRMS	aktiv	1,5 Jahre	positiv	1	keine	keine bekannt	Probenentnahme nach Beginn einer Kortisonstoßtherapie	A, C, D
MS_02	46	weiblich	KIS	aktiv	-	positiv	1	keine	Hypothyreose		A, C, D
MS_03 ^{a)}	36	männlich	RRMS	aktiv	0,5 Jahre	positiv	2	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_04	59	männlich	RRMS	aktiv	0,5 Jahre	negativ	2,5	keine	keine bekannt		A, C, ³
MS_05	66	männlich	SPMS	aktiv	n.b.	n.b.	7,5	IFN-β-1b (Betaferon)	Trigeminusneuralgie, Z.n. zerebralem Ponsinfarkt, Z.n. typischem Vorhofflattern		A, C, D
MS_06 ^{a)}	37	männlich	RRMS	aktiv	1 Jahr	positiv	1,5	Dimethylfumarat	keine bekannt		A, C, D
MS_07	19	weiblich	RRMS	aktiv	4 Jahre	positiv	0	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_08	23	weiblich	RRMS	aktiv	2 Wochen	positiv	1	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_09	45	männlich	KIS	aktiv	-	positiv	1	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_10	23	weiblich	RRMS	aktiv	10 Monate	positiv	1,5	Dimethylfumarat	keine bekannt		A, C, D
MS_11 ^{b)}	59	weiblich	SPMS	aktiv	34 Jahre	positiv	6,5	Kortison-Intervalltherapie	keine bekannt		A, C, D
MS_12 ^{b)}	59	weiblich	SPMS	aktiv	34 Jahre	positiv	6,5	Kortison-Intervalltherapie	keine bekannt	Probenentnahme nach Beginn einer Kortisonstoßtherapie	A, C, D
MS_13	37	weiblich	RRMS	aktiv	1 Monat	positiv	1	keine	mittelgradige Trikuspidalinsuffizienz, Z.n. peripherer Pulmonalembolie		A, C, D
MS_14	51	weiblich	RRMS	aktiv	18 Jahre	negativ	4,5	Glatirameracetat	NMDA-R-Enzephalitis		A, C, D
MS_15	75	weiblich	RRMS	aktiv	2 Wochen	negativ	6,5	keine	arterielle Hypertonie, Z.n.	MOG-AK +	A, C, D

									TIA, Z.n. PTA Nierenarterie rechts		
MS_16	50	weiblich	RRMS	aktiv	ca. 8 Jahre	positiv	1	keine	Z.n. mehreren Bandscheibenvorfällen in der HWS		A, C, D
MS_32	23	weiblich	RRMS	aktiv	1,5 Jahre	positiv	0	IFN-β-1b (Betaferon)	keine bekannt		B, D
MS_33	51	weiblich	KIS	aktiv	-	negativ	1	keine	keine bekannt		B, D
MS_34	37	weiblich	RRMS	aktiv	3 Wochen	positiv	3	keine	Borderline, rez. depr. Verstimmungen, V.a. PCO-Syndrom		B, D
MS_35	42	weiblich	RRMS	aktiv	3 Monate	positiv	2,5	keine	keine bekannt		B, D
MS_36	22	männlich	KIS	aktiv		positiv	1	keine	Psoriasis		B, D
MS_37	47	weiblich	RRMS	aktiv	1 Woche	positiv	1	keine	keine bekannt	Probenentnahme nach Beginn einer Kortisonstoßtherapie	B, D
MS_38	54	weiblich	RRMS	aktiv	4 Jahre	positiv	5,5	Dimethylfumarat	WPW-Syndrom, latente Tbc		B, D
MS_39	28	männlich	KIS	aktiv		positiv	2	keine	keine bekannt		B, D
MS_40	29	weiblich	KIS	aktiv	-	positiv	1	keine	Z.n. Erythema migrans bei Lyme- Borreliose		B, D
MS_41	18	weiblich	RRMS	aktiv	1 Woche	positiv	1	keine	keine bekannt		B, D
MS_42 ^{c)}	36	weiblich	RRMS	aktiv	11 Jahre	positiv	1,5	keine	Anpassungsstörung		B, D
MS_43	33	weiblich	RRMS	aktiv	0,5 Jahre	positiv	0	Dimethylfumarat			B, D
MS_44	36	weiblich	RRMS	aktiv	0,5 Jahre	positiv	1	keine			B, D
MS_17	33	weiblich	RRMS	inaktiv	4 Jahre	n.b.	1	n.b.	keine bekannt		A, C, D
MS_18 ^{d)}	19	weiblich	RRMS	inaktiv	4 Jahre	positiv	0	Glatirameracetat	keine bekannt		A, C, D
MS_19 ^{d)}	24	weiblich	RRMS	inaktiv	9 Monate	positiv	1	Interferon-β 1a (Plegridy)	keine bekannt		A, C, D
MS_20	23	weiblich	RRMS	inaktiv	1 Monat	positiv	0	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_21	26	männlich	RRMS	inaktiv	8 Monate	negativ	0	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_22	60	weiblich	RRMS	inaktiv	10 Jahre	positiv	6,5	Natalizumab	bipolar-affektive Störung, symptomatische Epilepsie		A, C, D
MS_23	28	männlich	RRMS	inaktiv	2 Jahre	positiv	1,5	Natalizumab	keine bekannt		A, C, D
MS_24	26	männlich	RRMS	inaktiv	3 Jahre	positiv	0	Interferon-β 1b (Extavia)	keine bekannt		A, C, D

MS_25	44	weiblich	RRMS	inaktiv	9 Jahre	positiv	2,5	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_26	44	männlich	RRMS	inaktiv	2 Jahre	positiv	3,5	Interferon-β 1b (Extavia)	keine bekannt		A, C, D
MS_27	30	weiblich	RRMS	inaktiv	14 Jahre	negativ	0	keine	keine bekannt		A, C, D
MS_28	45	männlich	RRMS	inaktiv	6 Jahre	positiv	3	Dimethylfumarat	keine bekannt		A, C, D
MS_29	23	weiblich	RRMS	inaktiv	10 Monate	positiv	2,5	Interferon-β 1a (Avonex)	keine bekannt		A, C, D
MS_30	53	weiblich	RRMS	inaktiv	3 Monate	n.b.	2	Interferon-β 1a (Plegridy)	Vorhofflimmern, arterielle Hypertonie		A, C, D
MS_31	42	weiblich	RRMS	inaktiv	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	keine bekannt		A, C, D
MS_45	55	weiblich	RRMS	inaktiv	17 Jahre	positiv	0	keine	keine bekannt		B, D
MS_46 ^{e)}	25	weiblich	RRMS	inaktiv	2 Jahre	positiv	2	Natalizumab	Hypothyreose		B, D
MS_47	47	weiblich	RRMS	inaktiv	19 Jahre	n.b.	1,5	Glatirameracetat	arterielle Hypertonie, Migräne		B, D
MS_48	60	weiblich	RRMS	inaktiv	37 Jahre	n.b.	1,5	keine	keine bekannt		B, D
MS_49	34	weiblich	RRMS	inaktiv	16 Jahre	negativ	2	Dimethylfumarat	keine bekannt		B, D
MS_50	45	weiblich	RRMS	inaktiv	4 Jahre	n.b.	2	Dimethylfumarat	keine bekannt		B, D
MS_51	48	weiblich	RRMS	inaktiv	10 Monate	positiv	1,5	keine	Hypothyreose		B, D
MS_52	44	weiblich	RRMS	inaktiv	20 Jahre	n.b.	1,5	Interferon-β 1a (Rebif)	keine bekannt		B, D
MS_53	45	weiblich	RRMS	inaktiv	23 Jahre	n.b.	1	keine	keine bekannt		B, D
MS_54	31	weiblich	RRMS	inaktiv	15 Jahre	positiv	3,5	Dimethylfumarat	keine bekannt		B, D
MS_55	43	weiblich	RRMS	inaktiv	1,5 Jahre	positiv	0	Interferon-β 1 a (Plegridy)	keine bekannt		B, D
MS_56	46	weiblich	RRMS	inaktiv	17 Jahre	n.b.	2	Interferon-β 1b (Extavia)	keine bekannt		B, D
MS_57	25	weiblich	RRMS	inaktiv	10 Monate	positiv	0	Interferon-β 1 a (Plegridy)	keine bekannt		B, D
MS_58	65	weiblich	RRMS	inaktiv	19 Jahre	positiv	3,5	keine	T1DM, KHK		B, D
MS_59 ^{c)}	26	weiblich	RRMS	inaktiv	11 Jahre	n.b.	1,5	keine	Anpassungsstörung		B, D
MS_60	43	männlich	RRMS	inaktiv	10 Monate	positiv	0	Interferon-β 1 a (Plegridy)	keine bekannt		B, D
MS_61 ^{e)}	25	weiblich	RRMS	inaktiv	1,5 Jahre	positiv	2	Natalizumab	Hypothyreose		B, D
Kontrollpersonen											
K_01	22	weiblich									A, D
K_02	25	weiblich									A, D
K_03	32	männlich									A, D
K_04	22	weiblich									A, D
K_05	22	männlich									A, D
K_06	20	männlich									A, D
K_07	38	männlich									A, D

K_08	18	weiblich		A, D
K_09	46	weiblich		A, D
K_10	50	weiblich		A, D
K_11	24	männlich		A, D
K_12	29	männlich		A, D
K_13	21	weiblich		A, D
K_14	23	weiblich		A, D
K_15	28	männlich		A, D
K_16	24	männlich		A, D

Tabelle 9: **Charakteristika der getesteten MS Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen**

Aufgelistet sind ausgewählte Charakteristika der im Rahmen dieser Arbeit getesteten MS Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen. KIS = Klinisch isoliertes Syndrom, RRMS = schubförmig remittierende MS, SPMS = sekundär chronisch progrediente MS, n.b. = nicht bekannt, A = Peptidscreening (erste Kohorte), B/C = spezifische Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 in B) IFN- γ ELISpots in einer zweiten Kohorte, C) IL-17 A ELISpots, D = Serumanalysen, ¹oligoklonale Banden, ²EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme, ³aufgrund eines massiv erhöhten TSH-Wertes von entsprechender Analyse ausgeschlossen, kleingeschriebene Buchstaben ^{a)-e)} markieren Patientinnen/Patienten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurden, wobei jeweils ein Buchstabe dieselbe Person kennzeichnet.

4.2 Screening der spezifischen Immunreaktivität gegenüber 29 eluierten Peptiden im IFN- γ ELISpot in einer ersten Kohorte

Basierend auf der derzeitigen Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass insbesondere T_H1 Zellen entscheidend an den autoimmunen Prozessen der MS beteiligt sind (1,61). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen als quantitatives Maß der spezifischen Immunantwort ermittelt. In einer ersten Kohorte wurden die PBMC von 16 aktiven und 15 inaktiven Patientinnen/Patienten sowie von 16 Kontrollpersonen mit jeweils einem der 29 eluierten Peptide inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Anzahl der IFN- γ Spots/200.000 PBMC ermittelt. Dieses Vorgehen sollte einen ersten Überblick über die spezifische Reaktivität der Zellen gegenüber den einzelnen Peptiden geben. Zur Messung der individuellen Hintergrundaktivität wurde zusätzlich die Anzahl der IFN- γ Spots/200.000 PBMC nach Inkubation der Zellen mit einer der Peptidkonzentration entsprechenden DMSO-Menge bestimmt. Die spontane IFN- γ Sekretion wurde durch Inkubation der Zellen in Zellmedium ohne jegliche Stimuli ermittelt. Als Positivkontrolle diente die Substanz Phytohaemagglutinin (PHA).

Die grafische Auftragung der gepoolten Mittelwerte der jeweils durchgeführten Dreifachbestimmungen samt *standard error of the mean* (SEM) zeigte sowohl in der Gruppe der Kontrollpersonen als auch bei den MS Patientinnen/Patienten höhere Spotzahlen nach einer Inkubation der PBMC mit den Peptiden 6 und 10. Gleiches ließ sich, wenn auch weniger eindeutig, für das Peptid 7 vermuten (Abb. 3).

Ergebnisse

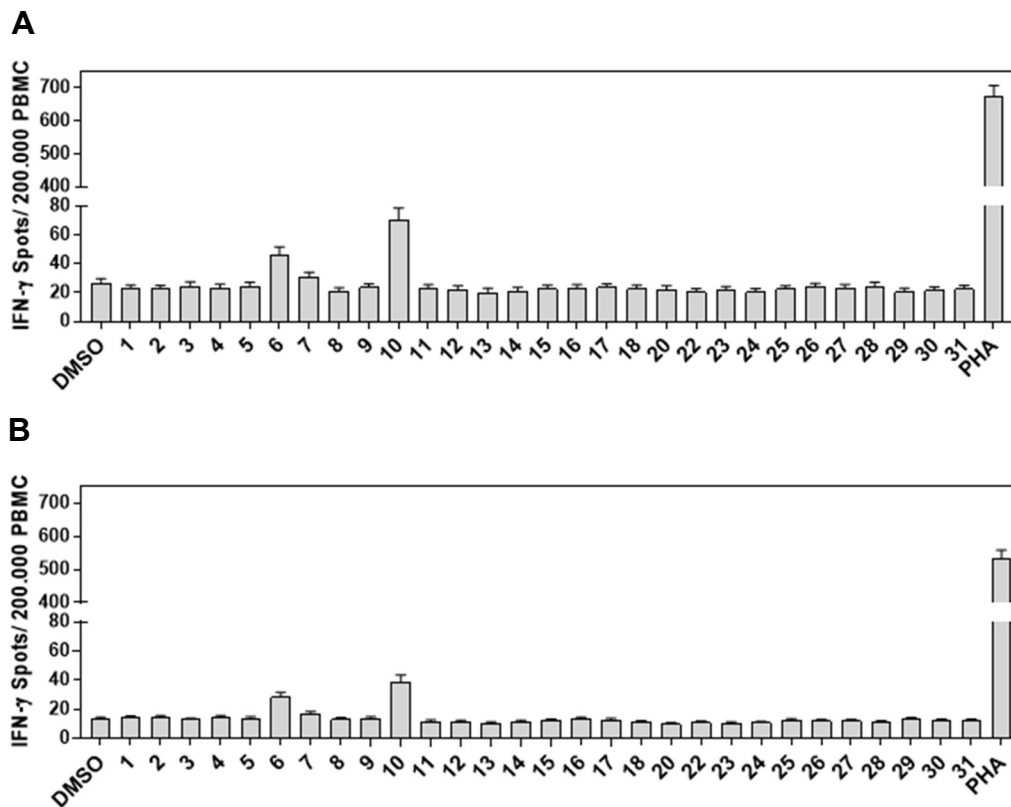


Abbildung 3: **Spezifische Reaktivität der in einer ersten Kohorte getesteten PBMC gegenüber den 29 eluierten Peptiden**

Die spezifische Reaktivität der PBMC der ersten Kohorte wurde im IFN- γ ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der 29 eluierten Peptide getestet. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit einer der Peptidkonzentration entsprechenden DMSO-Menge ermöglichte die Messung der individuellen Hintergrundaktivität. Als Positivkontrolle diente PHA. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte der IFN- γ Spots/200.000 PBMC für (A) die Gruppe der 16 Kontrollpersonen sowie für (B) 31 MS Patientinnen/Patienten jeweils mit Auftragung des SEM. Auf der x-Achse sind die Nummern der Peptide angezeigt.

Die farbkodierte Darstellung der Verhältnisse zwischen dem berechneten Mittelwert und der individuellen Hintergrundaktivität einer jeden Person gibt einen anschaulichen Überblick über das Auftreten positiver Reaktionen im ELISpot. Von einer solchen positiven Reaktion wurde bei einem mindestens zweifach höheren Mittelwert nach Inkubation mit einem Peptid als dem DMSO-Mittelwert ausgegangen. Einer zweifach-, dreifach-, vierfach- oder mindestens fünffach höheren Spotzahl wurde dabei jeweils ein anderer Farbton zugeordnet. Durch Auftragung des Reaktionsmusters jeder einzelnen getesteten Person entstand für jede Gruppe eine sogenannte *heat map*.

Bei den IFN- γ ELISpots der ersten Kohorte zeigten die getesteten Kontrollpersonen mit einer Ausnahme ausschließlich positive Reaktionen bei den Peptiden 6, 7 und 10. Mit 11 von 16 positiven Reaktionen, von denen drei mindestens fünffach höher als die individuelle Hintergrundaktivität waren, zeigte sich die größte spezifische Reaktivität gegenüber dem Peptid 10 (Abb. 4).

Ergebnisse

Person (n=16)	Peptidnummer																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	PHA							
K_01																																					
K_02																																					
K_03																																					
K_04																																					
K_05																																					
K_06																																					
K_07																																					
K_08																																					
K_09																																					
K_10																																					
K_11																																					
K_12																																					
K_13																																					
K_14																																					
K_15																																					
K_16																																					

Abbildung 4: Positive Reaktionen im IFN- γ ELISpot der Kontrollpersonen

Die pro Peptid errechneten Mittelwerte der Spotzahlen wurden ins Verhältnis zur individuellen Hintergrundaktivität einer jeden Person im IFN- γ ELISpot gesetzt. Von einer positiven Reaktion wurde bei einem mindestens zweifach höheren Mittelwert nach Inkubation mit einem Peptid als dem DMSO-Mittelwert ausgegangen. Farbkodiert ist eine zweifach (blassrot), dreifach (hellrot), vierfach (sattrot) oder eine mindestens fünffach (dunkelrot) höhere Spotzahl als die individuelle Hintergrundaktivität dargestellt. Die Abbildung zeigt das Muster positiver Reaktionen aller 16 getesteten Kontrollpersonen.

Im Gegensatz zu den Kontrollpersonen zeigte sich in der Gruppe der aktiven Patientinnen/Patienten, unabhängig vom betrachteten Peptid die Tendenz, dass es häufiger zu einer positiven Reaktion im IFN- γ ELISpot kam (Mann-Whitney U Test, $p=0,052$). Nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 kam es, wie auch in der Kontrollgruppe, besonders oft zu einer positiven Reaktion. Dennoch ließ sich eine größere Diversität der Reaktionen bei den aktiven Patientinnen/Patienten erkennen. Sie zeigten signifikant häufiger eine positive Reaktion auf ein anderes Peptid als jene mit den Nummern 6, 7 und 10 als die Kontrollpersonen (Mann-Whitney U Test, $p=0,001$) (Abb. 5).

Ergebnisse

Patient (n=16)	Peptidnummer																															PHA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31			
MS_01	■	■	■	■	■	■				■																						
MS_02																																
MS_03																																
MS_04							■			■																						
MS_05																																
MS_06																																
MS_07																					■											
MS_08						■																■										
MS_09						■				■																						
MS_10						■		■																								
MS_11										■																						
MS_12	■				■	■			■	■					■	■											■					
MS_13						■	■			■																						
MS_14						■	■			■																						
MS_15										■																						
MS_16																																

Abbildung 5: Positive Reaktionen im IFN- γ ELISpot der aktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte

Die pro Peptid errechneten Mittelwerte der Spotzahlen wurden ins Verhältnis zur individuellen Hintergrundaktivität einer jeden Person im IFN- γ ELISpot gesetzt. Von einer positiven Reaktion wurde bei einem mindestens zweifach höheren Mittelwert nach Inkubation mit einem Peptid als dem DMSO-Mittelwert ausgegangen. Farbkodiert ist eine zweifach (blassrot), dreifach (hellrot), vierfach (sattrot) oder eine mindestens fünffach (dunkelrot) höhere Spotzahl als die individuelle Hintergrundaktivität dargestellt. Die Abbildung zeigt das Muster positiver Reaktionen aller in der ersten Kohorte getesteten aktiven Patientinnen/Patienten (n=16).

Das Bild der inaktiven Patientinnen/Patienten gestaltete sich ähnlich dem der Kontrollpersonen mit den meisten positiven Reaktionen bei den Peptiden 6 und 10. Nach einer Inkubation mit dem Peptid 10 kam es bei 10 von 15 getesteten inaktiven Personen zu einer positiven Reaktion, bei drei sogar zu einer mindestens fünffach höheren Spotzahl als die der individuellen Hintergrundaktivität. Bei 5 der 15 getesteten Personen konnte nach Inkubation in Anwesenheit von Peptid 6 eine vierfach höhere Spotzahl als dem DMSO-Mittelwert gemessen werden. Doch ähnlich wie in der Gruppe der aktiven Patientinnen/Patienten war auch bei den inaktiven Patientinnen/Patienten eine positive Reaktion gegenüber anderen Peptiden als jene mit den Nummern 6, 7 und 10 signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe zu beobachten (Mann-Whitney U Test, $p=0,047$) (Abb. 6).

Ergebnisse

Patient (n=15)	Peptidnummer																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	PHA												
MS_17																																										
MS_18																																										
MS_19																																										
MS_20																																										
MS_21																																										
MS_22																																										
MS_23																																										
MS_24																																										
MS_25																																										
MS_26																																										
MS_27																																										
MS_28																																										
MS_29																																										
MS_30																																										
MS_31																																										

Abbildung 6: Positive Reaktionen im IFN- γ ELISpot der inaktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte

Die pro Peptid errechneten Mittelwerte der Spotzahlen wurden ins Verhältnis zur individuellen Hintergrundaktivität einer jeden Person im IFN- γ ELISpot gesetzt. Von einer positiven Reaktion wurde bei einem mindestens zweifach höheren Mittelwert nach Inkubation mit einem Peptid als dem DMSO-Mittelwert ausgegangen. Farbkodiert ist eine zweifach (blassrot), dreifach (hellrot), vierfach (sattrot) oder eine mindestens fünffach (dunkelrot) höhere Spotzahl als die individuelle Hintergrundaktivität dargestellt. Die Abbildung zeigt das Muster positiver Reaktionen aller in der ersten Kohorte getesteten inaktiven Patientinnen/Patienten (n=15).

Die Anzahl sowie der prozentuale Anteil positiver Reaktionen der PBMC gegenüber den getesteten Peptiden sind der Tab. 13, Kap. 4.3 zu entnehmen.

Zusammenfassend lassen sich in allen drei getesteten Gruppen die meisten positiven Reaktionen im IFN- γ ELISpot nach einer Inkubation der Zellen in Anwesenheit von Peptid 10 erkennen. Am zweithäufigsten kam es, ebenfalls bei allen drei Gruppen, zu positiven Reaktionen gegenüber Peptid 6. Eine Inkubation mit Peptid 7 führte jeweils an dritter Stelle zu positiven Reaktionen. Darüber hinaus zeigten an MS erkrankte Patientinnen/Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant häufiger positive Reaktionen nach Kontakt mit anderen Peptiden als den genannten drei Peptiden (Mann-Whitney U Test, $p=0,004$).

Nachdem sich in diesem ersten Screening insbesondere die Peptide mit den Nummern 6, 7 und 10 als interessant herausgestellt hatten, rückten diese drei Peptide in den Fokus der weiteren Arbeit.

4.3 Testung der spezifischen Reaktivität der PBMC gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 im IL-17 ELISpot sowie in weiteren IFN- γ ELISpots

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass neben IFN- γ sezernierenden Zellen auch IL-17 sezernierende Zellen an der Immunpathogenese der MS/EAE beteiligt sein könnten. So wurden tierexperimentell erhöhte IL-17 Spiegel in entzündlichen ZNS-Arealen sowie eine Assoziation zur Krankheitsschwere und -progression beschrieben (112). Aus diesem Grund wurde für die erste Kohorte getesteter Personen zusätzlich zur Anzahl peptidspezifischer IFN- γ sezernierender Zellen auch die Anzahl spezifischer IL-17 sezernierender Zellen ermittelt. Hierfür wurde die Anzahl IL-17 sezernierender PBMC nach deren Inkubation in Anwesenheit der Peptide 6, 7 bzw. 10 mithilfe des IL-17 ELISpots ermittelt. Dabei wurden Zellen von Personen der ersten Kohorte, also von 16 aktiven, 15 inaktiven sowie 16 Kontrollpersonen, verwendet. Außerdem wurden in einer zweiten Kohorte (13 aktive und 17 inaktive MS Patientinnen/Patienten) weitere IFN- γ ELISpots durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl IFN- γ sezernierender PBMC nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 gemessen. Die Untersuchung einer zweiten Patientenkohorte diente im Rahmen dieser Arbeit der Reevaluation erworbener Erkenntnisse einerseits sowie einer Erhöhung der Probandenzahlen für zusätzlich durchgeführte gepoolte Analysen andererseits. Analog zum Vorgehen im ersten Arbeitsabschnitt (s. Kap. 4.2) wurde auch die individuelle Hintergrundaktivität sowie die Spontanaktivität gemessen. PHA diente als Positivkontrolle. Im IL-17 ELISpot wurden Zweifachbestimmungen, im IFN- γ ELISpot Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die grafische Auftragung und Gegenüberstellung der gepoolten Mittelwerte ermöglichte einen direkten Vergleich der Reaktivitäten gegenüber den getesteten Peptiden zwischen den einzelnen Gruppen sowie Kohorten einerseits und der Anzahl IL-17 sowie IFN- γ sezernierenden Zellen andererseits.

Die Gruppe der Kontrollpersonen zeigte im IFN- γ ELISpot signifikant mehr Spots/200.000 PBMC nach einer Inkubation mit dem Peptid 10 als nach bloßer Anwesenheit von DMSO ($p < 0,0001$). Außerdem lag die Spotzahl nach Inkubation mit diesem Peptid signifikant höher als nach Inkubation mit Peptid 7 ($p = 0,002$) (Abb. 7 A). Im IL-17 ELISpot zeigten die Kontrollpersonen ein ähnliches Verhalten. Die Spotzahl nach Inkubation mit Peptid 10 lag signifikant höher als nach DMSO ($p = 0,044$) oder

Ergebnisse

einer Inkubation mit Peptid 7 ($p=0,011$) (Abb. 7 B). Andere Vergleichstestungen erbrachten für diese Gruppe keine signifikanten Ergebnisse.

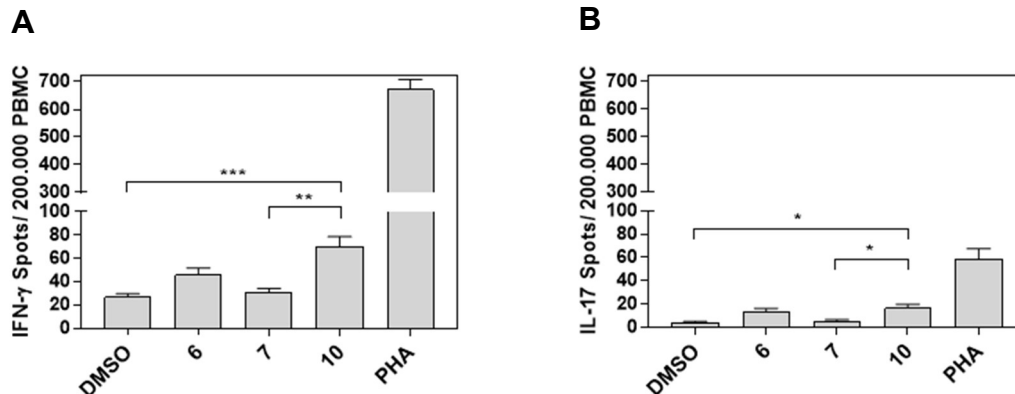


Abbildung 7: Spezifische Reaktivität der getesteten PBMC der Kontrollpersonen gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit einer der Peptidkonzentration entsprechenden DMSO-Menge ermöglichte die Messung der individuellen Hintergrundaktivität. Als Positivkontrolle diente PHA. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte der Spots/200.000 PBMC für die Gruppe der 16 Kontrollpersonen (A) im IFN- γ ELISpot sowie (B) im IL-17 ELISpot jeweils mit Auftragung des SEM. Auf der x-Achse sind die Nummern der Peptide angezeigt. Die Sterne markieren signifikante Ergebnisse der durchgeführten Vergleichstestungen (Dunn's Test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p\leq 0,001$).

Bei der Betrachtung der gepoolten Daten aller der in der ersten Kohorte getesteten MS Patientinnen/Patienten zeigte sich, wie auch bei den Kontrollpersonen, eine signifikant höhere Spotzahl nach Inkubation mit dem Peptid 10 als mit DMSO ($p<0,0001$) bzw. mit dem Peptid 7 ($p<0,0001$). Darüber hinaus führte eine Inkubation in Anwesenheit des Peptids 6 zu signifikant mehr Spots als mit DMSO ($p<0,0001$) bzw. mit dem Peptid 7 ($p=0,004$) (Abb. 8 A).

Auch in den IFN- γ ELISpots der zweiten Kohorte waren in der Gruppe der MS Patientinnen/Patienten nach Inkubation der Zellen mit Peptid 10 signifikant mehr Spots als mit DMSO ($p=0,0004$) oder dem Peptid 7 ($p=0,011$) zu sehen. Auch in dieser Gruppe kam es nach Zugabe des Peptids 6 zu einer signifikanten Erhöhung der Spotzahlen ($p=0,022$) (Abb. 8 B). Diese Beobachtungen im IFN- γ ELISpot konnten folglich in zwei voneinander unabhängig durchgeführten Patientenkohorten gemacht werden.

Im IL-17 ELISpot bewirkte die Inkubation mit Peptid 6 ($p=0,0001$), Peptid 7 ($p=0,008$) sowie Peptid 10 ($p<0,0001$) jeweils eine signifikante Erhöhung der Spotzahlen gegenüber einer Zugabe von DMSO ohne Peptid (Abb. 8 C).

Ergebnisse

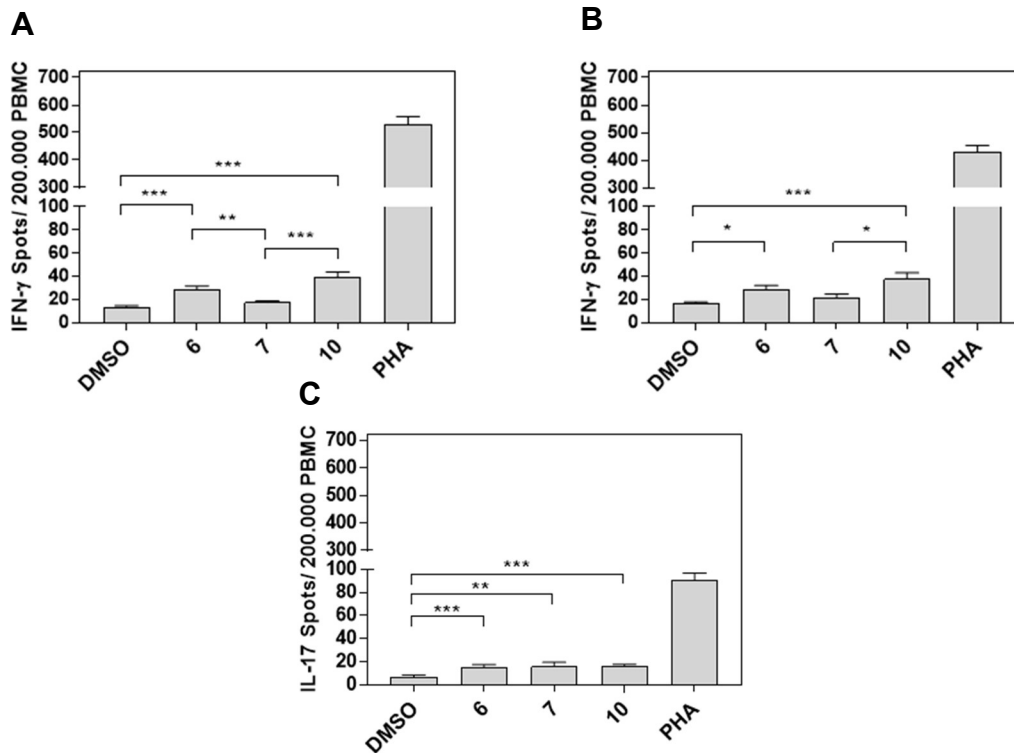


Abbildung 8: Spezifische Reaktivität der getesteten PBMC der MS Patientinnen/Patienten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit einer der Peptidkonzentration entsprechenden DMSO-Menge ermöglichte die Messung der individuellen Hintergrundaktivität. Als Positivkontrolle diente PHA. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte der Spots/200.000 PBMC für (A) die erste IFN- γ Kohorte mit 31 MS Patientinnen/Patienten, (B) die zweite IFN- γ Kohorte mit 30 MS Patientinnen/Patienten sowie (C) für die Daten der IL-17 ELISpots mit 31 MS Patientinnen/Patienten jeweils mit Auftragung des SEM. Auf der x-Achse sind die Nummern der Peptide angezeigt. Die Sterne markieren signifikante Ergebnisse der durchgeführten Vergleichstestungen (Dunn's Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Bei den aktiven Patientinnen/Patienten zeigten sich in der ersten IFN- γ ELISpot Kohorte nach Inkubation der Zellen in Anwesenheit der Peptide 6 ($p = 0,001$) sowie 10 ($p = 0,001$) signifikant mehr Spots als nach Inkubation mit DMSO ohne Peptid (Abb. 9 A).

In den IFN- γ ELISpots der zweiten Kohorte ergaben die Vergleichstestungen für die aktiven Patientinnen/Patienten keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich lediglich die Tendenz einer erhöhten Spotzahl nach Inkubation mit dem Peptid 10 ($p = 0,065$) (Abb. 9 B).

Im IL-17 ELISpot bewirkte, passend zu den Ergebnissen im IFN- γ ELISpot, die Inkubation mit den Peptiden 6 ($p = 0,045$) und 10 ($p = 0,005$) eine Erhöhung der Spotzahlen (Abb. 9 C). Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Vergleichstestungen.

Ergebnisse

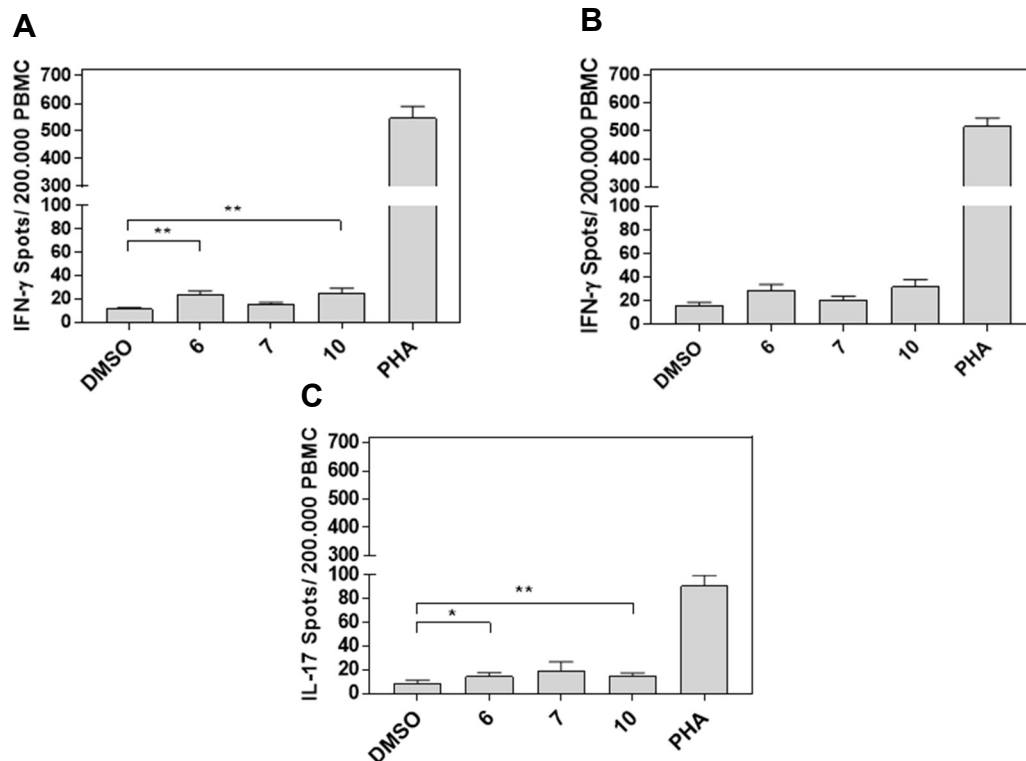


Abbildung 9: Spezifische Reaktivität der getesteten PBMC der aktiven Patientinnen/Patienten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit einer der Peptidkonzentration entsprechenden DMSO-Menge ermöglichte die Messung der individuellen Hintergrundaktivität. Als Positivkontrolle diente PHA. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte der Spots/200.000 PBMC für (A) die erste IFN- γ Kohorte mit 16 aktiven Patientinnen/Patienten, (B) die zweite IFN- γ Kohorte mit 13 aktiven Patientinnen/Patienten sowie (C) für die Daten der IL-17 ELISpots mit 16 aktiven Patientinnen/Patienten jeweils mit Auftragung des SEM. Auf der x-Achse sind die Nummern der Peptide angezeigt. Die Sterne markieren signifikante Ergebnisse der durchgeführten Vergleichstestungen (Dunn`s Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Bei der Gruppe der inaktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte bewirkte die Zugabe von Peptid 10 eine signifikante Erhöhung der Spotzahlen gegenüber der Zugabe von DMSO ($p < 0,0001$) oder des Peptid 7 ($p < 0,0001$). Weiterhin führte eine Inkubation mit dem Peptid 6 zu erhöhten Spotzahlen im Vergleich zu einer Zugabe von DMSO ($p = 0,001$) oder dem Peptid 7 ($p = 0,018$) (Abb. 10 A).

Auch bei der zweiten IFN- γ ELISpot Kohorte bewirkte bei den inaktiven Patientinnen/Patienten die Zugabe des Peptids 10 erhöhten Spotzahlen gegenüber einer Inkubation mit DMSO ($p = 0,008$) oder dem Peptid 7 ($p = 0,041$) (Abb. 10 B).

Die Anzahl an IL-17 Spots war nach Inkubation mit den Peptiden 6 ($p = 0,004$), 7 ($p = 0,025$) sowie 10 ($p = 0,0004$) signifikant erhöht (Abb. 10 C). Weitere Vergleichstestungen ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

Ergebnisse

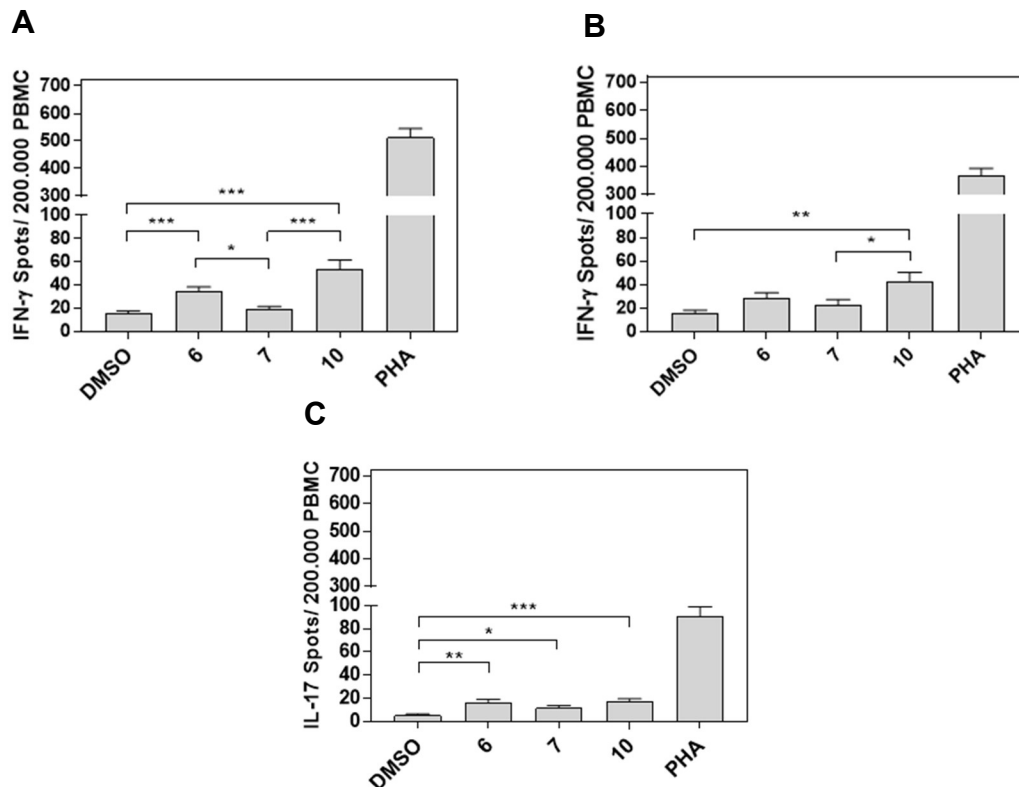


Abbildung 10: **Spezifische Reaktivität der PBMC der inaktiven Patientinnen/Patienten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10**

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit einer der Peptidkonzentration entsprechenden DMSO-Menge ermöglichte die Messung der individuellen Hintergrundaktivität. Als Positivkontrolle diente PHA. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte der Spots/200.000 PBMC für (A) die erste IFN- γ Kohorte mit 15 inaktiven Patientinnen/Patienten, (B) die zweite IFN- γ Kohorte mit 17 inaktiven Patientinnen/Patienten sowie (C) für die Daten der IL-17 ELISpots mit 15 inaktiven Patientinnen/Patienten jeweils mit Auftragung des SEM. Auf der x-Achse sind die Nummern der Peptide angezeigt. Die Sterne markieren signifikante Ergebnisse der durchgeführten Vergleichstestungen (Dunn`s Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass bei den Kontrollpersonen lediglich eine Inkubation der getesteten PBMC in Anwesenheit des Peptids 10 zu einer signifikanten Erhöhung der Spotzahlen im Vergleich zu DMSO führte. Bei den Patientinnen/Patienten mit MS traf dies im IFN- γ ELISpot zusätzlich auf das Peptid 6, im IL-17 ELISpot zusätzlich auf die Peptide 6 und 7 zu. Durch die Durchführung weiterer IFN- γ ELISpots in einer zweiten Kohorte konnten die Erkenntnisse aus der ersten Kohorte teilweise reproduziert werden.

Außerdem ließen sich im IFN- γ ELISpot insgesamt höhere Spotzahlen in der Kontrollgruppe als bei den MS Patientinnen/Patienten feststellen. Innerhalb der Patientengruppe waren die Spotzahlen bei den Personen mit einem inaktiven Krankheitsverlauf höher als bei jenen in einer aktiven Krankheitsphase. Im IL-17 ELISpot zeigte sich dieser Effekt hingegen nicht. Insgesamt fanden sich hier geringere Spotzahlen als im IFN- γ ELISpot. Die Spotzahlen/200.000 PBMC nach Inkubation mit den drei genannten Peptiden sind den Tab. 10-12 zu entnehmen.

Ergebnisse

Gruppe	IFN- γ Spots/200.000 PBMC		
	Peptid 6	Peptid 7	Peptid 10
Kontrollpersonen	46,1 \pm 5,52	31,08 \pm 2,97	70,38 \pm 8,10
alle MS Patientinnen/Patienten	28,85 \pm 2,52	17,38 \pm 1,22	39,2 \pm 4,42
aktive Patientinnen/Patienten	23,94 \pm 2,92	15,63 \pm 1,4	25,55 \pm 3,4
inaktive Patientinnen/Patienten	34,09 \pm 4,06	19,24 \pm 2,01	53,44 \pm 7,80

Tabelle 10: Mittelwerte der Spotzahlen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 im IFN- γ ELISpot der ersten Kohorte

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im IFN- γ ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte \pm SEM der Spots/200.000 PBMC für die in einer ersten Kohorte getesteten Gruppen (16 Kontrollpersonen, 31 MS Patientinnen/Patienten, davon 16 aktiv, 15 inaktiv) nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10. Spotzahlen, die signifikant höher als die individuelle Hintergrundaktivität waren, wurden grau hinterlegt.

Gruppe	IFN- γ Spots/200.000 PBMC		
	Peptid 6	Peptid 7	Peptid 10
alle MS Patientinnen/Patienten	28,83 \pm 3,16	21,56 \pm 3,13	37,78 \pm 5,26
aktive Patientinnen/Patienten	28,79 \pm 4,95	20,62 \pm 3,02	31,95 \pm 6,09
inaktive Patientinnen/Patienten	28,86 \pm 4,13	22,27 \pm 5,04	42,24 \pm 8,03

Tabelle 11: Mittelwerte der Spotzahlen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 im IFN- γ ELISpot der zweiten Kohorte

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im IFN- γ ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte \pm SEM der Spots/200.000 PBMC für die in einer zweiten Kohorte getesteten Gruppen (30 MS Patientinnen/Patienten, davon 13 aktiv, 17 inaktiv) nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10. Spotzahlen, die signifikant höher als die individuelle Hintergrundaktivität waren, wurden grau hinterlegt.

Ergebnisse

Gruppe	IL-17 Spots/200.000 PBMC		
	Peptid 6	Peptid 7	Peptid 10
Kontrollpersonen	13,28±2,9	5,13±1,44	16,63±3,08
alle MS Patientinnen/Patienten	15,35±2,12	15,85±3,75	16±1,69
aktive Patientinnen/Patienten	14,5±3,04	19,65±7,01	15±2,35
inaktive Patientinnen/Patienten	16,27±2,98	11,79±1,94	17,07±2,46

Tabelle 12: Spotzahlen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 im IL-17 ELISpot

Die spezifische Reaktivität der PBMC wurde im IL-17 ELISpot durch eine 48 stündige Inkubation der Zellen in Anwesenheit jeweils eines der drei verschiedenen Peptide getestet. Gezeigt sind die gepoolten Mittelwerte \pm SEM der Spots/200.000 PBMC für die getesteten Gruppen (16 Kontrollpersonen, 31 MS Patientinnen/Patienten, davon 16 aktiv, 15 inaktiv) nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10. Spotzahlen, die signifikant höher als die individuelle Hintergrundaktivität waren, wurden grau hinterlegt.

Analog zum Vorgehen in Kap. 4.2 wurden die positiven Reaktionen in den IL-17 ELISpots sowie in den IFN- γ ELISpots der zweiten Kohorte in einer *heat map* veranschaulicht (nicht dargestellt). Wie bereits in den IFN- γ ELISpots der ersten Kohorte kam es in allen Gruppen nach Inkubation mit Peptid 10, gefolgt von Peptid 6, zu den meisten positiven Reaktionen. Die statistische Analyse der IL-17 ELISpots sowie der IFN- γ ELISpots der zweiten Kohorte erbrachte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Auftretenswahrscheinlichkeit positiver Reaktionen gegenüber den getesteten Peptiden zwischen den Gruppen.

Die Anzahl sowie der prozentuale Anteil positiver Reaktionen im ELISpot gegenüber den getesteten Peptiden sind in den Tab. 13 und 14 dargestellt.

Peptid	Kontrollpersonen	aktiv	inaktiv
1	0/16 (0%)	2/16 (12,5%)	0/15 (0%)
2	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	1/15 (6,67%)
3	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)
4	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)
5	0/16 (0%)	2/16 (12,5%)	1/15 (6,67%)
6*	3/16 (18,75%)	5/16 (31,25%) 3/13 (23,08%)	5/15 (33,33%) 6/17 (35,29%)
7*	2/16 (12,5%)	4/16 (25%) 0/13 (0%)	2/15 (13,33%) 2/17 (11,76%)
8	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
9	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)

Ergebnisse

10*	11/16 (68,75%)	7/16 (43,75%) 4/10 (40%)	10/15 (66,67%) 8/17 (47,06%)
11	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/15 (6,67%)
12	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
13	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
14	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/15 (6,67%)
15	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	1/15 (6,67%)
16	1/16 (6,25%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)
17	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
18	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
20	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
22	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)
23	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
24	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
25	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
26	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
27	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)
28	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)
29	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)
30	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/15 (6,67%)
31	0/16 (0%)	1/16 (6,25%)	0/15 (0%)

Tabelle 13: **Positive Reaktionen im IFN- γ ELISpot**

Gezeigt sind für jedes getestete Peptid die Anzahl sowie der prozentuale Anteil positiver Reaktionen im IFN- γ ELISpot jeder Patientengruppe. *Die spezifische Reaktivität gegenüber diesen Peptiden wurde in zwei IFN- γ ELISpot Kohorten mit unterschiedlichen Patientinnen/Patienten analysiert (zwei Werte).

Peptid	Kontrollpersonen	aktiv	inaktiv
6	8/16 (50%)	7/16 (43,75%)	10/15 (66,67%)
7	3/16 (18,75%)	6/16 (37,5%)	9/15 (60%)
10	12/16 (75%)	10/16 (62,5%)	12/15 (80%)

Tabelle 14: **Positive Reaktionen im IL-17 ELISpot**

Gezeigt sind pro getestetem Peptid die Anzahl sowie der prozentuale Anteil positiver Reaktionen im IL-17 ELISpot für jede Gruppe.

Unabhängig von der Analyse positiver Reaktionen wurde für jedes Peptid separat geprüft, ob ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Spots/200.000 PBMC nach Inkubation mit dem jeweiligen Peptid zwischen den getesteten Gruppen vorlag. Die individuelle Hintergrundaktivität wurde dabei nicht einbezogen. Es wurde lediglich die absolute Anzahl der IFN- γ bzw. IL-17 Spots betrachtet.

Bei dem Vergleich der nach Gruppen gepoolten Mittelwerte der Spotzahlen nach Inkubation der Zellen ohne Peptid, aber in Anwesenheit von DMSO, ergab sich im IFN- γ ELISpot ein signifikant höherer Wert für die Gruppe der Kontrollpersonen verglichen mit den MS Patientinnen/Patienten ($p < 0,0001$) (Abb. 11). Im IL-17 ELISpot zeigte sich

Ergebnisse

hingegen kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Hintergrundaktivität zwischen den Gruppen (nicht dargestellt).

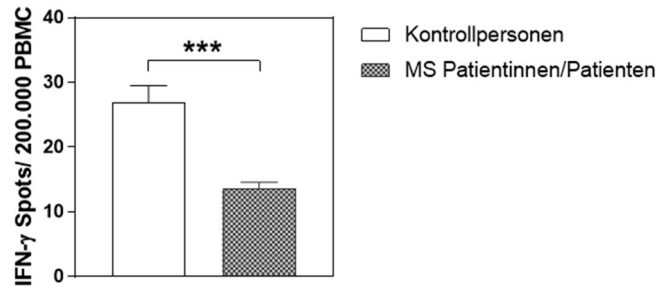
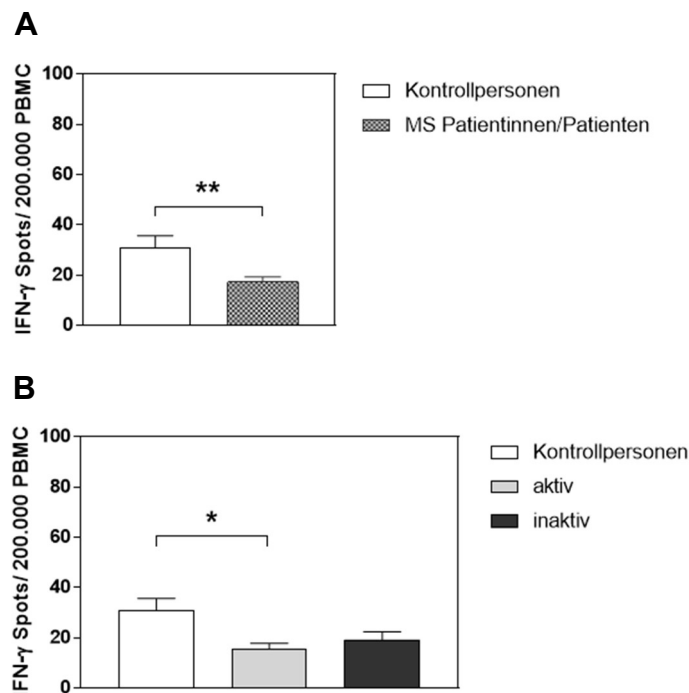


Abbildung 11: Hintergrundaktivität im IFN- γ ELISpot

Gezeigt sind die nach Gruppen gepoolten Mittelwerte der Spotzahlen nach 48 stündiger Inkubation der PBMC in Anwesenheit von DMSO im IFN- γ ELISpot der ersten Kohorte jeweils mit Auftragung des SEM. Getestet wurden die PBMC von 16 Kontrollpersonen und 31 MS Patientinnen/Patienten. Die Sterne markieren das signifikante Ergebnis der durchgeführten Vergleichstestung (Mann-Whitney Test, *** $p \leq 0,001$).

In den IFN- γ ELISpots der ersten Kohorte zeigte die Gruppe der Kontrollpersonen signifikant höhere Spotzahlen nach Inkubation mit Peptid 7 verglichen mit den MS Patientinnen/Patienten ($p=0,007$) (Abb. 12 A) sowie den aktiven Patientinnen/Patienten ($p=0,023$) (Abb. 12 B). Im IL-17 ELISpot hingegen war nach Inkubation in Anwesenheit dieses Peptids die Spotzahl in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als bei den MS Patientinnen/Patienten ($p=0,011$) (Abb. 12 C) bzw. den inaktiven Patientinnen/Patienten ($p=0,028$) (Abb. 12 D). Nach Abzug des individuellen Hintergrundes zeigten sich allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (nicht dargestellt).



Ergebnisse

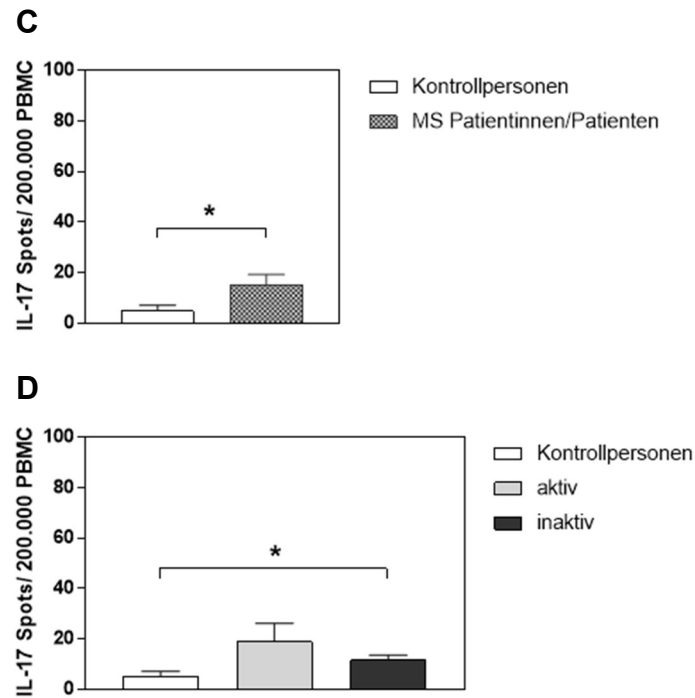


Abbildung 12: spezifische Reaktivität gegenüber Peptid 7

Gezeigt sind die nach Gruppen gepoolten Mittelwerte der Spotzahlen nach 48 stündiger Inkubation der PBMC in Anwesenheit des Peptids 7 im IFN- γ ELISpot der ersten Kohorte (A), (B) sowie im IL-17 ELISpot (C), (D) jeweils mit Auftragung des SEM. Getestet wurden die PBMC von 16 Kontrollpersonen sowie von 31 MS Patientinnen/Patienten, davon 16 Aktiven und 15 Inaktiven. Die Sterne markieren signifikante Ergebnisse der durchgeführten Vergleichstestungen (Mann-Whitney Test bzw. Dunn's Test, * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Für Peptid 10 ergab sich im IFN- γ ELISpot der ersten Kohorte eine signifikant höhere Spotzahl in der Gruppe der Kontrollpersonen verglichen mit den getesteten MS Patientinnen/Patienten ($p = 0,034$) (Abb. 13 A) sowie den aktiven Patientinnen/Patienten ($p = 0,012$) (Abb. 13 B). Nach Abzug der individuellen Hintergrundaktivität konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden (nicht dargestellt).

Ergebnisse

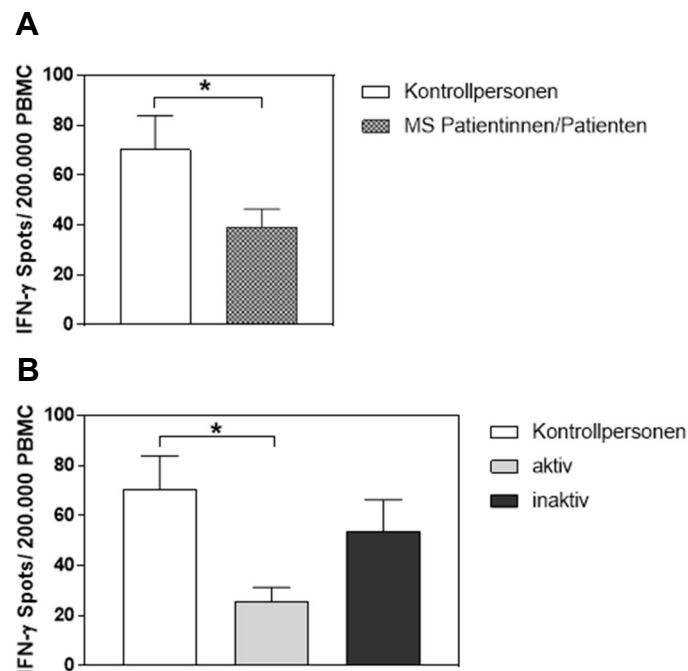


Abbildung 13: spezifische Reaktivität gegenüber Peptid 10

Gezeigt sind die nach Gruppen gepoolten Mittelwerte der Spotzahlen nach 48 stündiger Inkubation der PBMC in Anwesenheit des Peptids 10 im IFN- γ ELISpot der ersten Kohorte mit Auftragung des SEM. Getestet wurden die PBMC von 16 Kontrollpersonen sowie von 31 MS Patientinnen/Patienten, davon 16 Aktiven und 15 Inaktiven. Der Stern markiert signifikante Ergebnisse der durchgeführten Vergleichstestungen (Mann-Whitney Test bzw. Dunn's Test, * $p < 0,05$).

Die Anzahl der IFN- γ bzw. IL-17 Spots unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nach Inkubation der getesteten Zellen in Anwesenheit von Peptid 6 nicht (nicht dargestellt). Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied in der Spontanaktivität der Zellen nach deren Inkubation in Zellmedium ohne weitere Stimuli (nicht dargestellt).

4.4 Gruppenvergleiche der gemessenen Serumparameter

Zusätzlich zur Analyse der spezifischen Reaktivitäten gegenüber den getesteten eluierten Peptiden erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Bestimmung der vier Serumparameter Cholesterin, Vitamin D, TSH und fT4 bei den getesteten Personen. Die Testung möglicher Unterschiede in den Serumspiegeln der analysierten Parameter zwischen den einzelnen Gruppen zeigte für die zweite Kohorte einen signifikant niedrigeren Vitamin D Spiegel bei den aktiven Patientinnen/Patienten als bei den inaktiven Patientinnen/Patienten ($p = 0,044$) (Abb. 14).

Ergebnisse

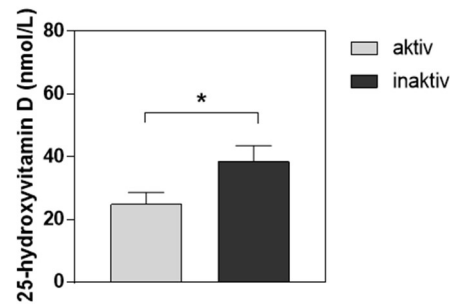


Abbildung 14: Serum Vitamin D Spiegel der aktiven und inaktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte

Gezeigt sind die gepoolten Serum Vitamin D Werte der 13 aktiven sowie 17 inaktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte mit Auftragung des SEM. Der Stern markiert das signifikante Ergebnis der durchgeführten Vergleichstestung (ungepaarter T-Test, * $p < 0,05$).

Darüber hinaus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

4.5 Korrelation der Serumparameter mit der spezifischen Reaktivität der getesteten PBMC im ELISpot

Zur Testung möglicher Zusammenhänge zwischen den vier Serumparametern Vitamin D, Cholesterin, TSH sowie fT4 und der spezifischen Reaktivität der PBMC im ELISpot erfolgten nach Gruppen getrennte Korrelationsanalysen für die Peptide 6, 7 und 10 sowie für die Spontanaktivität.

Für die gepoolten Daten der IFN- γ ELISpots der ersten und zweiten Kohorte zeigte sich in der Gruppe der inaktiven Patientinnen/Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vitamin D Spiegel im Serum und der Spotzahl nach Inkubation mit den Peptiden 6 ($p=0,031$) (Abb. 15 A) und 10 ($p=0,028$) (Abb. 15 B). Ein niedriger Vitamin D Spiegel im Serum korrelierte dabei mit einer höheren Spotzahl im ELISpot. Dieser Zusammenhang zeigte sich auch bei der Analyse der gepoolten Daten sämtlicher im IFN- γ ELISpot getesteten MS Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit dem Peptid 10 ($p=0,044$) (Abb. 15 C).

Ergebnisse

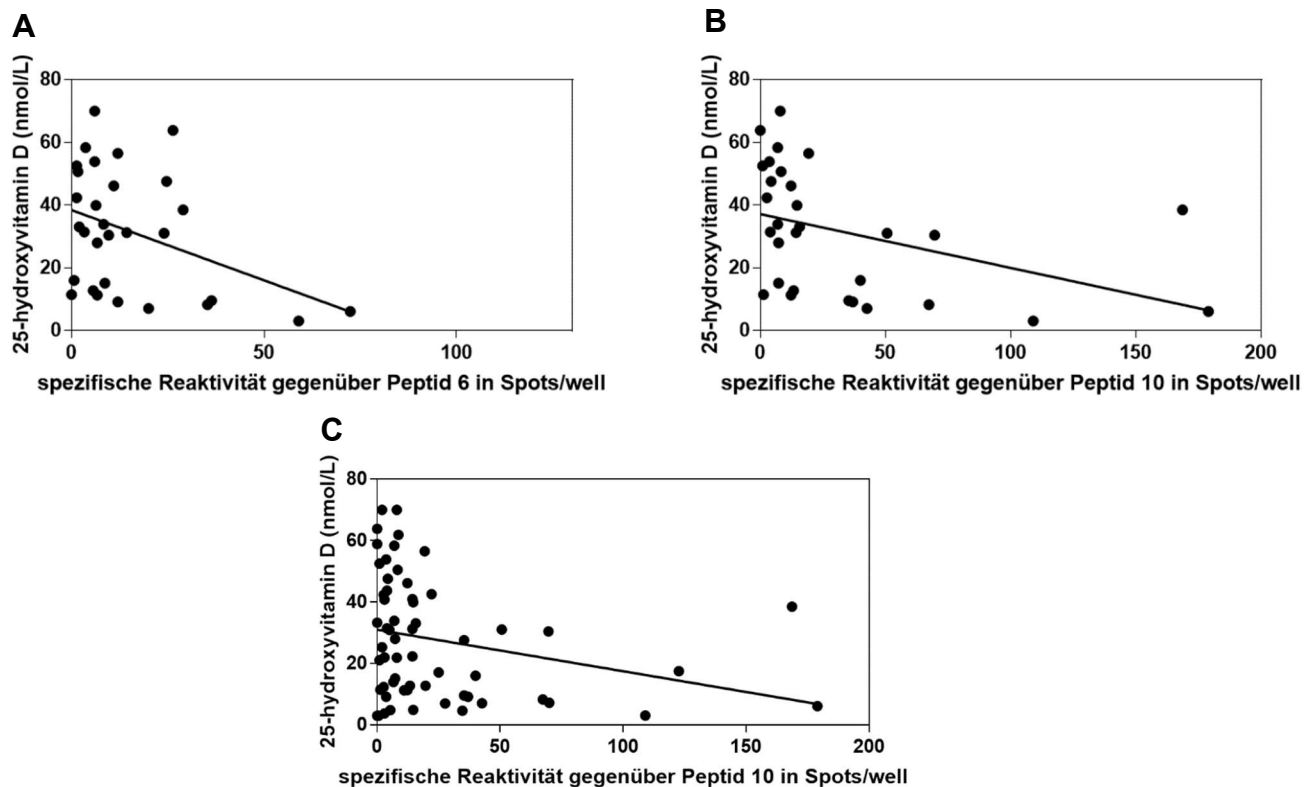


Abbildung 15: **Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit der spezifischen Reaktivität im IFN- γ ELISpot**

Gezeigt ist die Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit den korrigierten Mittelwerten der IFN- γ Spots für die Gruppe der 32 inaktiven Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit (A) Peptid 6 ($p=0,031$), (B) Peptid 10 ($p=0,028$), sowie (C) für alle 61 getesteten MS Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit Peptid 10 ($p=0,044$).

Darüber hinaus korrelierte ein niedriger Vitamin D Wert im Serum bei den in der ersten IFN- γ ELISpot Kohorte getesteten MS Patientinnen/Patienten mit einer höheren Spotzahl nach Inkubation der Zellen ohne Zugabe von DMSO oder einem Peptid (Spontanaktivität) ($p=0,035$) (Abb. 16 A). Dieser Zusammenhang ergab sich auch für alle im IFN- γ ELISpot getesteten inaktiven Patientinnen/Patienten ($p=0,04$) (Abb. 16 B).

Im Gegensatz dazu ließ sich in den IFN- γ ELISpots der zweiten Kohorte bei den aktiven Patientinnen/Patienten eine höhere Spontanaktivität bei hohen Serum Vitamin D Werten ausmachen ($p=0,048$) (Abb. 16 C).

Ergebnisse

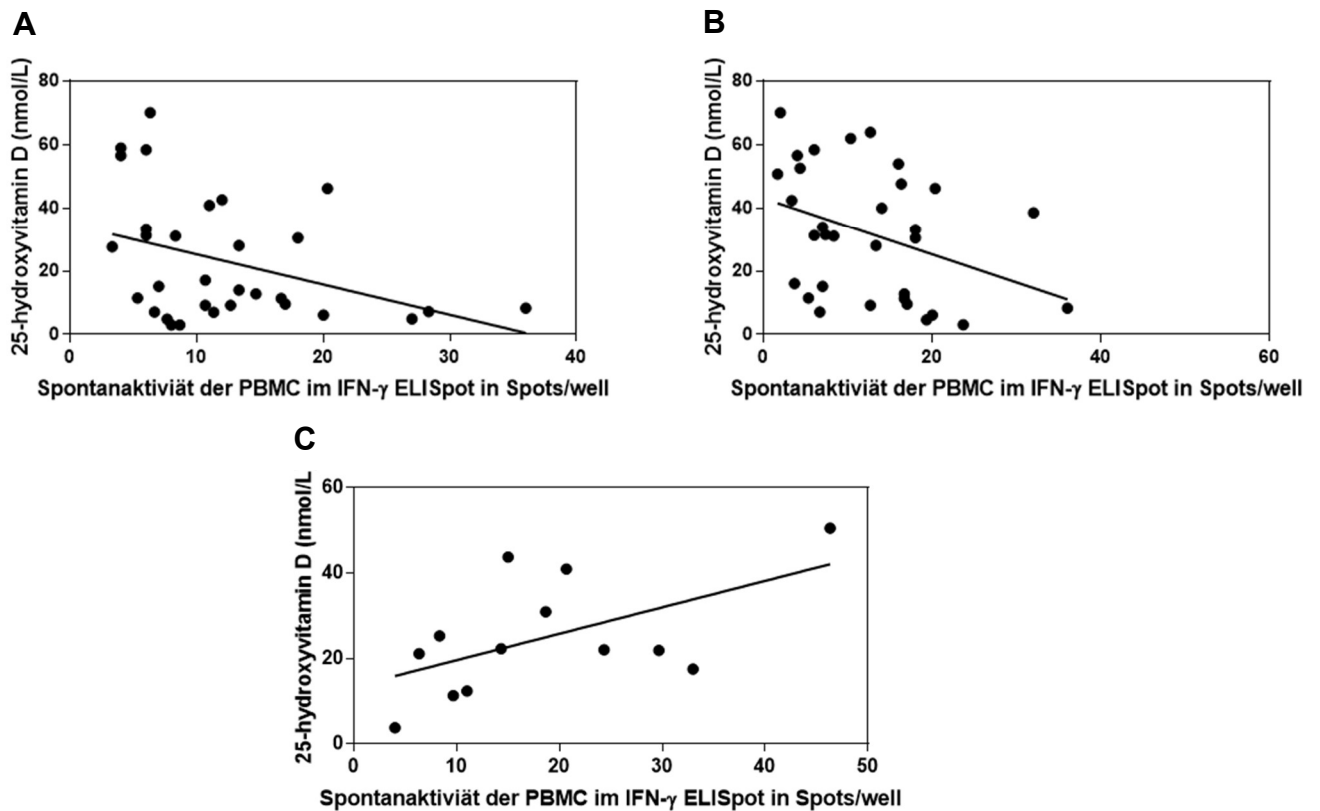


Abbildung 16: **Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit der Spontanaktivität im IFN- γ ELISpot**

Nach 48 stündiger Inkubation der Zellen in Zellmedium ohne Stimuli wurde die Anzahl der IFN- γ Spots/200.000 PBMC ermittelt (Spontanaktivität). Gezeigt ist die Korrelation des Serum Vitamin D Wertes mit der Spontanaktivität (A) für alle 31 MS Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte ($p=0,035$), (B) für alle 32 getesteten inaktiven Patientinnen/Patienten ($p=0,04$) sowie (C) für die 13 aktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte (C) ($p=0,048$).

Des Weiteren zeigte sich in den IFN- γ ELISpots der ersten Kohorte die Tendenz einer erhöhten Spontanaktivität der Zellen von aktiven Patientinnen/Patienten bei niedrigen TSH-Werten im Serum ($p=0,053$) (Abb. 17 A). Dieser tendenzielle Zusammenhang konnte auch für die MS Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte ($p=0,067$) (Abb. 17 B) sowie für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit im IFN- γ ELISpot getesteten MS-Patientinnen/Patienten gezeigt werden ($p=0,058$) (Abb. 17 C). Im IL-17 ELISpot zeigte sich darüber hinaus eine negative Korrelation zwischen TSH-Werten und der peptidspezifischen Reaktivität nach Inkubation mit Peptid 6 in der aktiven Patientengruppe ($p=0,03$) (Abb. 17 D).

Ergebnisse

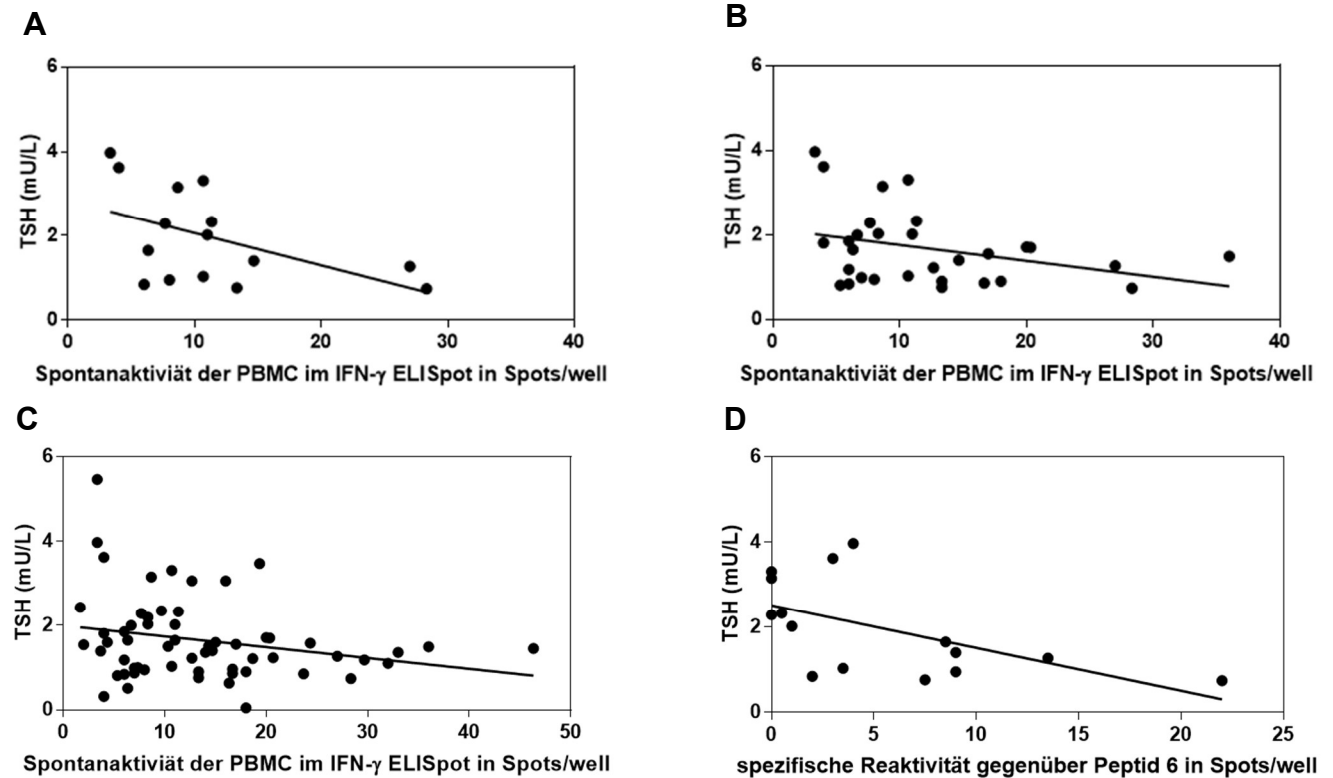


Abbildung 17: Korrelation des Serum TSH Wertes mit der Spontanaktivität im IFN- γ ELISpot sowie der spezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot

Nach 48 stündiger Inkubation der Zellen in Zellmedium ohne Stimuli wurde die Anzahl der IFN- γ Spots/200.000 PBMC ermittelt (Spontanaktivität). Gezeigt ist die Korrelation des Serum TSH Wertes mit (A) der Spontanaktivität für die 16 aktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte ($p=0,053$), (B) für alle 31 MS Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte ($p=0,067$) sowie (C) für alle 61 im Rahmen der Arbeit getesteten MS Patientinnen/Patienten ($p=0,058$). Es ergaben sich lediglich Tendenzen. Im (D) IL-17 ELISpot zeigte sich für die Gruppe der aktiven Patientinnen/Patienten eine negative Korrelation zwischen dem Serum TSH Spiegel und der spezifischen Reaktivität gegenüber Peptid 6 ($p=0,03$).

Die Korrelationsanalysen zeigten darüber hinaus für die Gruppe der aktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte einen positiven Zusammenhang zwischen dem fT4 Spiegel im Serum und der Spontanaktivität im IFN- γ ELISpot ($p=0,049$) (Abb. 18 A). Eine entsprechende Tendenz konnte für die Daten der MS Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte nach Inkubation mit dem Peptid 6 im IFN- γ ELISpot gezeigt werden ($p=0,061$) (Abb. 18 B).

Ergebnisse

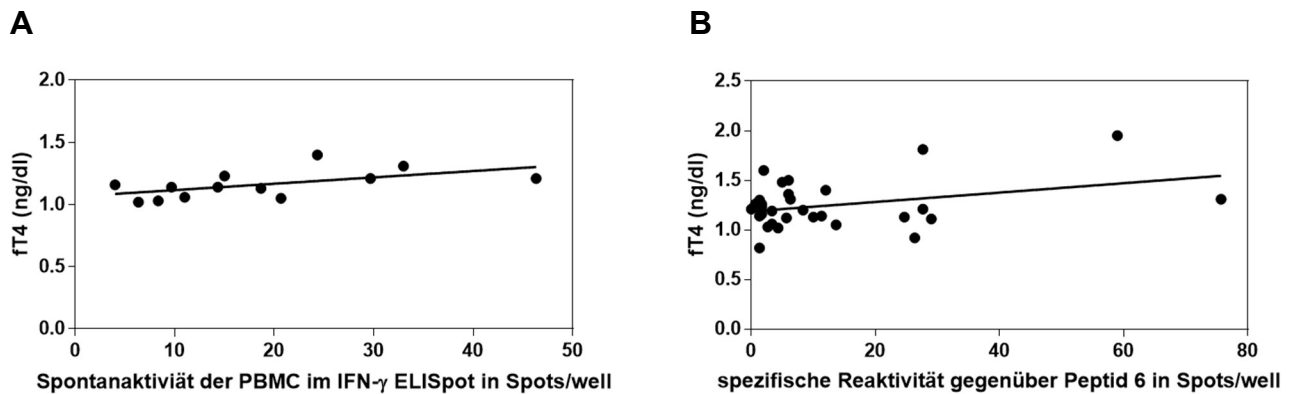


Abbildung 18: **Korrelation des Serum fT4 Wertes mit der Spontanaktivität sowie der spezifischen Reaktivität im IFN- γ ELISpot**

Gezeigt ist die Korrelation des Serum fT4 Spiegels mit der Spontanaktivität im IFN- γ ELISpot für die Gruppe der 13 aktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte (A) ($p=0,049$). Darüber hinaus ist die Korrelation des Serum fT4 Spiegels mit den korrigierten Mittelwerten der IFN- γ Spots nach Inkubation mit dem Peptid 6 für alle 30 MS Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte dargestellt (B). Hierbei ergab sich lediglich eine Tendenz ($p=0,061$).

In den IL-17 ELISpots konnte für die Gruppe der Kontrollpersonen die Tendenz einer negativen Korrelation zwischen dem Serum Cholesterin Spiegel und der peptidspezifischen Reaktivität festgestellt werden. Bei niedrigen Cholesterin Werten zeigten sich tendenziell höhere Reaktivitäten gegenüber den Peptiden 6 ($p=0,057$) (Abb. 19 A) und 10 ($p=0,058$) (Abb. 19 B).

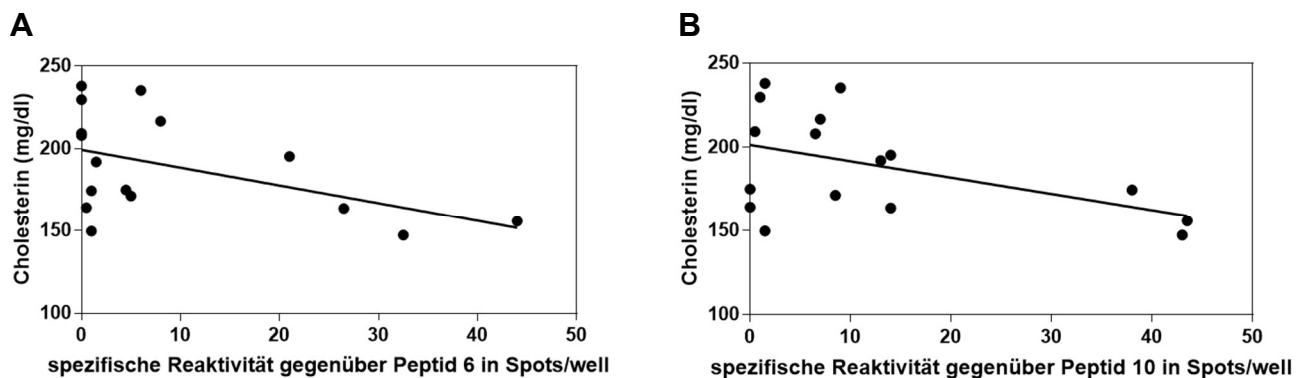


Abbildung 19: **Korrelation des Serum Cholesterin Wertes mit der spezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot**

Gezeigt ist die Korrelation des Serum Cholesterin Spiegels mit den korrigierten Mittelwerten der IL-17 Spots nach Inkubation mit den Peptiden (A) 6 ($p=0,057$) und (B) 10 ($p=0,058$) für die Gruppe der 16 Kontrollpersonen. Es ergaben sich lediglich Tendenzen.

In einem weiteren Analyseschritt wurde zusätzlich geprüft, ob die verschiedenen Serumparameter mit der gepoolten spezifischen Reaktivität der PBMC gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 korrelieren.

Für die Gruppe aller im IFN- γ ELISpot getesteten inaktiven Patientinnen/Patienten zeigte sich bei niedrigen Serum Vitamin D Werten eine höhere Spotzahl nach Inkubation der Zellen in Anwesenheit der Peptide 6, 7 und 10 ($p=0,036$) (Abb. 20).

Ergebnisse

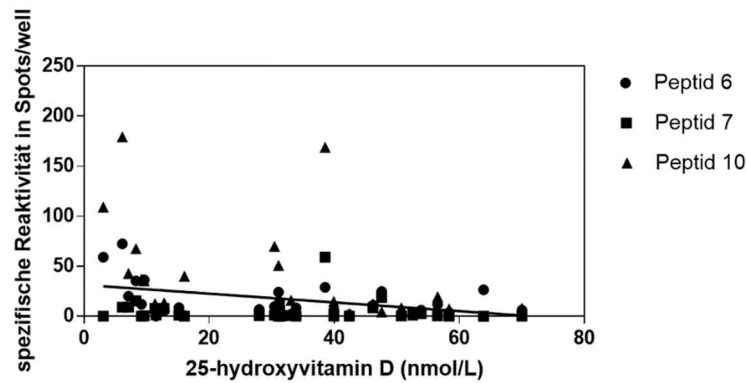


Abbildung 20: **Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit der spezifischen Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 im IFN- γ ELISpot**

Gezeigt ist die Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit den korrigierten Mittelwerten der IFN- γ Spots für alle 32 im IFN- γ ELISpot getesteten inaktiven Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 ($p=0,036$).

Außerdem konnte für die Gruppe der Kontrollpersonen eine negative Korrelation zwischen dem Serum Cholesterin Spiegel und der IL-17 Spotzahl nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 festgestellt werden ($p=0,041$) (Abb. 21).

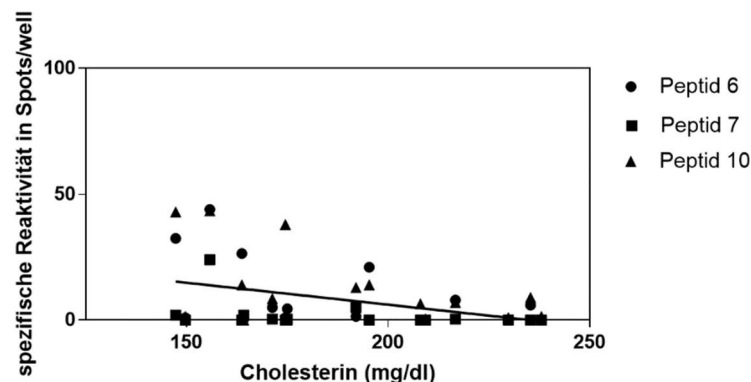


Abbildung 21: **Korrelation des Serum Cholesterin Spiegels mit der spezifischen Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 im IL-17 ELISpot**

Gezeigt ist die Korrelation des Serum Cholesterin Spiegels mit den korrigierten Mittelwerten der IL-17 Spots für alle 16 getesteten Kontrollpersonen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 ($p=0,041$).

Tab. 15 gibt einen Überblick über die beobachteten Zusammenhänge zwischen der Höhe der Serumparameter und den Spotzahlen im IFN- γ sowie IL-17 ELISpot.

Ergebnisse

Peptid	Serumparameter		Kontrollpersonen	alle Patientinnen/Patienten	aktive Patientinnen/Patienten	inaktive Patientinnen/Patienten
Ø	Vitamin D	↑		↓ ¹⁾	↑ ²⁾	↓ ³⁾
		↓		↑ ¹⁾	↓ ²⁾	↑ ³⁾
	TSH	↑		tend. ↓ ¹⁾³⁾	tend. ↓ ¹⁾	
		↓		tend. ↑ ¹⁾³⁾	tend. ↑ ¹⁾	
	fT4	↑			↑ ²⁾	
		↓			↓ ²⁾	
	Cholesterin	↑				
		↓				
6	Vitamin D	↑				↓ ³⁾
		↓				↑ ³⁾
	TSH	↑			↓ ⁴⁾	
		↓			↑ ⁴⁾	
	fT4	↑		tend. ↑ ²⁾		
		↓		tend. ↓ ²⁾		
Cholesterin	↑	tend. ↓ ⁴⁾				
	↓	tend. ↑ ⁴⁾				
7	Vitamin D	↑				
		↓				
	TSH	↑				
		↓				
	fT4	↑				
		↓				
Cholesterin	↑					
	↓					
10	Vitamin D	↑		↓ ³⁾		↓ ³⁾
		↓		↑ ³⁾		↑ ³⁾
	TSH	↑				
		↓				
	fT4	↑				
		↓				
Cholesterin	↑	tend. ↓ ⁴⁾				
	↓	tend. ↑ ⁴⁾				
6, 7 und 10	Vitamin D	↑				↓ ³⁾
		↓				↑ ³⁾
	TSH	↑				
		↓				
	fT4	↑				
		↓				
Cholesterin	↑	↓ ⁴⁾				
	↓	↑ ⁴⁾				

Ergebnisse

Tabelle 15: **Beobachtete Zusammenhänge zwischen der Höhe der Serumparameter und den Spotzahlen im IFN- γ und IL-17 ELISpot**

Gezeigt sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Zusammenhänge zwischen der Höhe der gemessenen Serumparameter und den Spotzahlen im IFN- γ und IL-17 ELISpot. ¹⁾ Daten der ersten Kohorte (IFN- γ), ²⁾ Daten der zweiten Kohorte (IFN- γ), ³⁾ gepoolte Daten der ersten und zweiten Kohorte (IFN- γ), ⁴⁾ Daten der IL-17 ELISpots, tend. bezeichnet eine Tendenz mit $0,067 > p > 0,05$. \uparrow steht für eine Erhöhung, \downarrow für eine Erniedrigung des Parameters/ der Spotzahl.

5 Diskussion

Die genaue Pathogenese der MS, insbesondere die Zielstrukturen krankheitsrelevanter myelinreaktiver CD4+ T-Zellen, konnte bislang trotz intensiver Forschung nicht vollständig aufgeklärt werden (1,6). Ziel dieses Projektes war es, potenzielle Antigene, die bei der Immunpathogenese der MS eine Rolle spielen, zu identifizieren. Dafür wurde die spezifische Immunreaktion gegenüber verschiedenen Antigenen, die im ZNS von MS Patientinnen/Patienten präsentiert werden, näher charakterisiert. Die zusätzlich durchgeführte Betrachtung der vier Serumparameter Vitamin D, Cholesterin, TSH und fT4 diente der Untersuchung möglicher weiterer pathogenetischer Einflussfaktoren und der Suche nach eventuell geeigneten Biomarkern.

5.1 Autoreaktive T-Zellen sind Teil des integren Immunsystems

Die Beobachtung der IFN- γ Sekretion als Zeichen der spezifischen Immunantwort nach Inkubation mit autologen Peptiden sowohl bei MS Patientinnen/Patienten als auch bei Kontrollpersonen stimmt mit den Ergebnissen verschiedener Vorarbeiten dieser und anderer Arbeitsgruppen überein (3,113). T-Zellen, deren TZR spezifisch autologe Peptide erkennen, scheinen Bestandteile des normalen T-Zell Repertoires und nicht allein krankheitsursächlich zu sein (1,113). Um autoimmunen Prozessen vorzubeugen, erfordert ihr Vorhandensein periphere Toleranzmechanismen, wie zum Beispiel die Induktion von Tregs (37). Cao et al. konnten zudem zeigen, dass sich myelinreaktive CD4+ T-Zellen von Patientinnen/Patienten mit MS funktionell und in ihrem Transkriptionsprofil von denen der Kontrollpersonen unterscheiden. T-Zellen der Patientinnen/Patienten sezernierten beispielsweise mehr proinflammatorische Zytokine (114). Für die Beurteilung der klinischen Relevanz autoreaktiver T-Zellen spielt die Integrität der BHS eine entscheidende Rolle (5). In den genannten Punkten sind demnach Unterschiede zwischen den getesteten Patientinnen/Patienten und den Kontrollpersonen wahrscheinlich.

5.2 Beeinflussung der in-vitro Ergebnisse durch eine Vielzahl unterschiedlicher Immunzellen

Gründe für die beobachtete signifikant höhere IFN- γ -Sekretion in Abwesenheit von Peptiden bei den getesteten Kontrollpersonen gegenüber den MS Patientinnen/Patienten bleiben spekulativ. Besonders relevant scheinen dabei

Diskussion

unterschiedliche T-Zell Subtypen zu sein. IFN- γ wird nicht nur von T_H1 Zellen, sondern u.a. auch von NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen sezerniert. Diese Zellen können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen haben (115). Daher wird ihnen eine immunmodulatorische Funktion zugesprochen, die eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielt (116,117). Es konnte eine erhöhte Prävalenz von Autoimmunerkrankungen bei Verminderung der Anzahl oder Funktionalität von NKT-Zellen festgestellt werden (116,118). Dies kann die beobachteten Unterschiede der peptidunabhängigen IFN- γ Sekretion zwischen Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen erklären. Darüber hinaus können $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einer spontanen Zytokinsekretion auf Stress reagieren (117,119). Derartigen Stress könnte auch das experimentelle Vorgehen erzeugt und dadurch das *in-vitro* Zytokinmilieu verändert haben.

Zusätzlich sind in der Literatur auch IFN- γ sezernierende Tregs beschrieben, die derzeit intensiv untersucht werden (120). Ihre Funktion ist von vielen Faktoren, beispielsweise ihrer Herkunft und dem vorherrschenden Zytokinmilieu abhängig. Bei Patientinnen/Patienten mit RRMS wurde eine höhere Frequenz IFN- γ sezernierender Tregs als bei Kontrollpersonen beschrieben wurde. Dennoch konnten Feng et al. im Tiermodell für die Kolitis zeigen, dass Foxp3⁺ IFN- γ sezernierende Zellen eine inhibitorische Funktion ausübten (120,121). IFN- γ ⁺ Tregs sind im Blut gesunder Kontrollpersonen vorhanden. Daniel et al. postulierten, dass diese Zellen durch den Körper patrouillieren und beginnende inflammatorische Prozesse supprimieren (122,123).

Auch der Vitamin D Status im Serum der getesteten Personen kann einen Einfluss auf die peptidunabhängige IFN- γ Produktion der PBMC gehabt haben (124). Der genaue Mechanismus wird in Kap. 5.7 erläutert.

Experimentell konnte eine niedrigere Anzahl IL-17 sezernierender Lymphozyten im Vergleich zu IFN- γ sezernierenden Zellen nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.3). Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass der Anteil der T_H17 Zellen an PBMC wesentlich geringer ist als der Anteil der T_H1 Zellen (71,125). Nichtsdestotrotz kommen nicht ausschließlich T_H17 Zellen als Produzenten von IL-17 infrage. Auch $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und neutrophile Granulozyten sind zur IL-17-Sekretion in der Lage (54).

5.3 Peptidspezifische Immunantwort von MS Patientinnen/Patienten gegenüber autologen Peptiden aus dem ZNS

Die in diesem Projekt hinsichtlich einer spezifischen Immunantwort untersuchten Peptide entstammen unterschiedlichen humanen Proteinen. Dabei bilden die Peptide weder den Beginn noch das Ende der jeweiligen Primärstruktur, sondern sind mit unterschiedlichen Abständen von den C- und N-terminalen Regionen entfernt lokalisiert. Da die Peptide 6 und 7 in mehreren Isoformen vorliegen, wurde bei ihnen auf die Angabe der genauen Aminosäurepositionen verzichtet. Die 29 verschiedenen Peptide weisen Längen von 9-19 Aminosäuren auf. Einige dieser Peptide könnten demnach sowohl von HLA-Klasse I als auch von HLA-Klasse II gebunden werden (126). Die Herkunft wurde mit Hilfe der Proteindatenbanken von UniProt und NCBI recherchiert (Tab. 16, Stand: 10.07.2019) (78,127).

Peptidnummer	Sequenz	Vorkommen im Menschen
1	MEVEDNRSQVETD	Aquaporin 4
2	DFDPLPPVTSPVKAPTPSG	Myc box-dependent-interacting protein 1
3	YIIDNKGIDSDA	Cathepsin S
4	RISPDQGGQFAQML	Clathrin, schwere Kette
5	YSIITPNILRL	Complement C3, Epididymis secretory sperm binding protein Li 62p
6	SVSNVVITK	Epidermales Wachstumsfaktorsubstrat 15
7	TTYNYAVLK	neuronales Membranglykoprotein M6-b
8	HGSKYLATASTMD	Myelin Basic Protein
9	KNIVTPRTPPPSQ	Myelin Basic Protein
10	ATYNFAVLK	Myelin Proteolipid Protein (PLP ₂₆₁₋₂₆₉)
11	DLSQVAAISNDLK	Neurofilament light polypeptide
12	SVNGKVLSK	nicht bekannt
13	GGSVYKYASFQVENDQ	Protein transport protein Sec24C
14	AVVEPYNSILTTHTT	Tubulin alpha-Kette
15	LERIQIQEAAKKKPG	Testican-2
16	YAVAVVKKDSG	Transferrin
17	EQVFSKYGQISE	Cold-inducible RNA-binding protein
18	VISLEGKPL	Cofilin-1, Proteinende
20	AVNAHSNILK	MICOS Komplex Untereinheit MIC60

Diskussion

22	LRVAPEEHPVL	Actin-like protein
23	MNNREVLEQVEHGY	Tyrosine-protein kinase Fyn
24	RVAPEEHPVLLTEAPLNPK	Actin-like protein
25	SNTPILVDGKDVMPEVN	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
26	ASAIKSmFSGE	nicht bekannt
27	KNIIDAFNGGISLV	nicht bekannt
28	DVIDNDSWRIW	multifunctional protein ADE2
29	VVNrLLTPTHSF	Enscosin
30	KNIVTP-Cit-TPPPSQ	nicht bekannt, 92,3% Ähnlichkeit zu Myelin Basic Protein
31	VVN-Cit-LLTPTHSF	nicht bekannt, 91,7% Ähnlichkeit zu Encosin und microtubule-associated protein 7 (MAP7), mRNA

Tabelle 16: Sequenzen und Vorkommen der eluierten Peptide in humanen Proteinen

Aufgelistet sind die Sequenzen der eluierten Peptide sowie ihr jeweiliges Vorkommen in bekannten humanen Proteinen (Proteindatenbanken von Uniprot und NCBI (78,127), Stand: 10.07.2019). Grau markiert sind die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersuchten Peptide.

Riedhammer et al. hatten in Vorarbeiten mit anderen aus dem ZNS eluierten Peptiden gezeigt, dass es im IFN- γ ELISpot nach einer ähnlich wie in diesem Projekt durchgeführten Peptidinkubation zu signifikant mehr positiven Reaktionen bei aktiven MS Patientinnen/Patienten als bei inaktiven oder Kontrollpersonen kam (3). Dieses Ergebnis konnte mit den in diesem Projekt generierten Daten für die aktiven Patientinnen/Patienten gegenüber den Kontrollpersonen nur als deutliche Tendenz nachvollzogen werden ($p=0,052$).

Wie in Kap. 4.2 beschrieben, kam es bei den MS Patientinnen/Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen häufiger zu positiven Reaktionen gegenüber vielen verschiedenen getesteten Peptiden. Diese größere Diversität im Erkennungsmuster deutet darauf hin, dass sich im T-Zell Repertoire der erkrankten Personen zusätzlich Zellen mit einer Spezifität gegenüber anderen autologen Peptiden befinden. Hierfür gibt es hauptsächlich zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits könnte eine generelle Hyperreaktivität des Immunsystems bei MS Patientinnen/Patienten vorliegen, die zu einer verstärkten IFN- γ Sekretion nach Inkubation mit ganz unterschiedlichen Peptiden führt (3). Andererseits könnte es im Rahmen der Erkrankung zu einem *epitope spreading* gekommen sein, welches bereits tierexperimentell mit klinischen Schüben assoziiert werden konnte (128). Beide Theorien wären mit der Beobachtung vereinbar, dass insbesondere die aktiven MS Patientinnen/Patienten zahlreiche positive Reaktionen gegenüber verschiedenen Peptiden zeigten.

Diskussion

Nach einem ersten Screening standen die Peptide mit den Nummern 6, 7 und 10 im Fokus der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden detaillierte Informationen, die die Grundlage für die Interpretation der erhobenen Daten boten, dargelegt.

Peptid 10

Das Peptid 10 (PLP₂₆₁₋₂₆₉) kommt in beiden bekannten PLP-Isoformen (s. Kap. 2.3) vor. PLP₂₆₁₋₂₆₉ liegt allerdings nicht innerhalb der bisher bekannten immunodominanten Epitope von PLP (129,130). Daher fanden sich trotz intensiver Literaturrecherche keine gezielten Informationen zu dieser eluierten Sequenz. Interessanterweise ist sie jedoch innerhalb der Tertiärstruktur von PLP membrannah und teilweise intrazellulär lokalisiert. Genau diese Region wurde bei MOG verglichen mit dem extrazellulären Anteil als besonders immunogen beschrieben (131). Vorarbeiten konnten sowohl bei MS Patientinnen/Patienten als auch bei Kontrollpersonen sehr heterogene T-Zell Antworten auf andere getestete PLP-Epitope zeigen (130). In einigen Arbeiten zeigte sich eine erhöhte Immunoreaktivität gegenüber PLP bei MS Patientinnen/Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen (129,132). Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Reaktivitäten feststellen (113,133). Die im Rahmen dieses Projekts gezeigte signifikant höhere Anzahl peripherer IFN- γ sezernierender Zellen bei den Kontrollpersonen verglichen mit den MS Patientinnen/Patienten bzw. den aktiven Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit dem Peptid 10 wird vermutlich durch die hohe Hintergrundaktivität der Kontrollpersonen vorgetäuscht. Nach ihrem Abzug konnte kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen gezeigt werden. Dennoch zeigten alle Gruppen nach Inkubation mit dem Peptid 10 signifikant höhere Spotzahlen als die individuelle Hintergrundaktivität. T-Zellen, deren TZR dieses Peptid erkennen, scheinen bei allen Gruppen im Repertoire zu sein. Außerdem zeigte sich in beiden IFN- γ Gruppen die meisten positiven Reaktionen gegenüber dem Peptid 10 bei den Kontrollpersonen, gefolgt von den inaktiven Patientinnen/Patienten. Ähnliche Ergebnisse der IL-17 ELISpots lassen zudem eine Beteiligung IL-17 sezernierender Zellen vermuten. Für die Experimente wurden den Personen periphere Lymphozyten entnommen. Es ist somit vorstellbar, dass die getesteten Patientinnen/Patienten, im IL-17 ELISpot lediglich jene in einer aktiven Krankheitsphase, eine geringere Reaktivität im ELISpot zeigten, da sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme vermehrt Zellen außerhalb der Zirkulation befanden. Diese könnten sich z.B. in entzündlichen Läsionen des ZNS oder in Lymphknoten aufgehalten haben. Gestützt wird diese These

Diskussion

dadurch, dass Fabrik et al. zeigen konnten, dass sich insbesondere bei MS Patientinnen/Patienten PLP-beladene Makrophagen in zervikalen Lymphknoten aufhalten (134). Hierzu passt auch die Beobachtung, dass die spezifische Reaktivität bei den aktiven Patientinnen/Patienten der zweiten IFN- γ Gruppe nicht signifikant höher als die Hintergrundaktivität war. T-Zellen mit einer spezifischen Reaktivität gegenüber Peptid 10 befinden sich möglicherweise in aktiven Krankheitsphasen vermehrt außerhalb der Zirkulation und wurden durch das hier angewandte experimentelle Verfahren nicht erfasst. Im Gegensatz dazu hatten Riedhammer et al. in ähnlichen Vorarbeiten mit anderen eluierten Peptiden eine signifikant erhöhte Anzahl spezifischer IFN- γ sezernierender Zellen bei Patientinnen/Patienten mit einer aktiven im Vergleich zu einer inaktiven MS gezeigt (3).

Zirkadiane Schwankungen in der Anzahl zirkulierender Lymphozyten, wie sie von Druzd et al. beschrieben wurden, können die Beobachtung dagegen nicht erklären (135). Die Blutentnahme erfolgte in allen Gruppen ausschließlich am Tag.

Pender et al. haben zeitliche Fluktuationen in der Frequenz PLP-spezifischer T-Zellen v.a. bei MS Patientinnen/Patienten, aber auch bei Kontrollpersonen beobachtet. Die von ihnen beschriebene Assoziation zur Krankheitsaktivität bei einigen Patientinnen/Patienten konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (136). Allerdings wäre hierfür die sequenzielle Analyse einzelner Personen in Phasen unterschiedlicher Krankheitsaktivität notwendig gewesen, da nur so die interindividuellen Unterschiede in der Anzahl Epitop-spezifischer Zellen berücksichtigt worden wären.

Peptid 7

Ebenfalls zur Proteolipidprotein-Familie gehört das Peptid 7. Es kommt in dem neuronalen Membranglykoprotein M6-b (M6-b) vor und besitzt vier Transmembrandomänen. Interessanterweise ähnelt das eluierte Peptid 7 in seiner Primärstruktur auffallend Peptid 10, PLP₂₆₁₋₂₆₉. Peptid 7 wird u.a. von Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert (137). Werner et al. konnten jedoch zeigen, dass M6-b in geringem Ausmaß von nahezu allen Zellen exprimiert wird (138). M6-b besitzt vielfältige Funktionen. Es scheint beispielsweise an der Neurogenese und Osteogenese beteiligt zu sein, sowie eine Rolle beim Transport von Proteinen zu spielen (137,139). Beachtenswert ist, dass M6-b zu 51 % (Primärstruktur) identisch zu DM20 ist. Dabei handelt es sich um eine Spleißvariante von PLP, der 35 Aminosäuren fehlen (s. Kap. 2.3) (139). Von M6-b gibt es wiederum mindestens vier unterschiedliche Spleißvarianten. Das eluierte Peptid kommt lediglich in den Isoformen 1-3 vor,

Diskussion

während Isoform 4 die entsprechende Sequenz nicht beinhaltet (78). Analog zur Expression der PLP-Isoformen (s. Kap. 2.3) ist es daher vorstellbar, dass bei einer vorrangigen Expression der Isoform 4 im Thymus die Ausbildung zentraler Toleranzmechanismen beeinflusst werden könnten. T-Zellen, deren TZR das eluierte Peptid erkennen, könnten so der Negativselektion entgehen. Trotz intensiver Recherche konnte für M6-b bisher keine beobachtete Assoziation zur MS oder anderen Autoimmunerkrankungen gefunden werden. Im Gegensatz zu Peptid 10 lagen die IFN- γ Spotzahlen nach einer Inkubation mit Peptid 7 in keiner der getesteten Gruppen signifikant über der individuellen Hintergrundaktivität. Außerdem kam es wesentlich seltener zu einer positiven Reaktion im IFN- γ ELISpot. M6-b scheint daher keine spezifische Reaktivität im IFN- γ ELISpot herbeigeführt zu haben. Die höhere Anzahl peripherer IFN- γ sezernierender Zellen nach der Inkubation mit dem Peptid 7 bei den Kontrollpersonen verglichen mit den MS Patientinnen/Patienten bzw. den aktiven Patientinnen/Patienten scheint ebenfalls durch die signifikant höhere Hintergrundaktivität der Kontrollpersonen vorgetäuscht zu werden.

Im Gegensatz dazu kam es im IL-17 ELISpot zu deutlich mehr positiven Reaktionen, insbesondere bei den inaktiven, aber auch bei den aktiven Patientinnen/Patienten. Außerdem zeigten MS Patientinnen/Patienten und inaktive Patientinnen/Patienten eine signifikant höhere Anzahl spezifischer IL-17 sezernierender Zellen als die Kontrollpersonen und eine signifikant über der Hintergrundaktivität liegende Reaktivität. Patientenspezifische Unterschiede im T_H1/ T_H17-Verhältnis wurden bereits beschrieben (55). Es ist denkbar, dass im Hinblick auf die spezifische Erkennung des Peptids 7 bei den getesteten Patientinnen/Patienten eine Reaktion vom T_H17-Typ dominiert. Weitere Erklärungsmöglichkeiten werden in Kap. 5.4 erläutert.

Peptid 6

Das Peptid mit der Nummer 6 kommt im humanen epidermalen Wachstumsfaktorsubstrat 15 vor, welches ubiquitär exprimiert wird (78). Es besitzt viele unterschiedliche Funktionen, scheint aber v.a. an der Regulation des Zellwachstums sowie der Zusammenlagerung von *clathrin coated pits* beteiligt zu sein (140,141). Die eluierte Peptidsequenz kommt in beiden bekannten Spleißvarianten vor (78). Eine bereits beobachtete Assoziation des humanen epidermalen Wachstumsfaktorsubstrats 15 mit der MS oder anderen Autoimmunerkrankungen konnte trotz intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. Die vorliegenden Daten zeigen, dass es bei MS Patientinnen/Patienten im Gegensatz zu den getesteten

Diskussion

Kontrollpersonen nach einer Inkubation mit dem Peptid 6 zu einer vermehrten IFN- γ - sowie IL-17-Sekretion kommt. Allerdings bestand zwischen beiden Gruppen kein Unterschied in der bloßen Anzahl IFN- γ - bzw. IL-17 sezernierender Zellen. Selbst nach Abzug des hohen Hintergrundwertes im IFN- γ ELISpot der Kontrollpersonen zeigte sich keine entsprechende Tendenz oder gar ein signifikanter Zusammenhang. Zwischen den Kontrollpersonen und den MS Patientinnen/Patienten könnte es demnach Unterschiede in der funktionellen Differenzierung dieser Lymphozyten geben (114). Denkbar sind auch Unterschiede in den immunregulatorischen Mechanismen sowie der Zusammensetzung ihres T-Zell-Repertoires (Kap. 5.5) (48,69).

5.4 Subtypspezifische Einflussfaktoren von Tregs und T_H17-Zellen auf die peptidspezifische Reaktion

Matusevicius et al. konnten zeigen, dass die Anzahl IL-17 mRNA exprimierender mononukleärer Zellen im Blut bei MS Patientinnen/Patienten höher war als bei gesunden Kontrollpersonen (142). Zudem zeigten Experimente, dass die Anzahl peripherer T_H17 Zellen mit der Krankheitsaktivität bei der MS assoziiert war (71,142). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte, abgesehen von einer Ausnahme, kein signifikanter Unterschied in der Anzahl IL-17 sezernierender Zellen zwischen den Gruppen festgestellt werden. Lediglich nach der Inkubation mit dem Peptid 7 konnte eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Anzahl IL-17 sezernierender Zellen bei den MS Patientinnen/Patienten sowie den inaktiven Patientinnen/Patienten beobachtet werden. Eine Subpopulation Foxp3⁺ T-Zellen weist eine Foxp3⁺-Instabilität auf. Nach Verlust ihres Transkriptionsfaktors sind diese Zellen in der Lage, IL-17 zu sezernieren und damit proinflammatorisch zu wirken (72). Es ist denkbar, dass bei den getesteten MS Patientinnen/Patienten eine solche Population mit einem TZR existiert, der spezifisch das Peptid 7 erkennt. Dies könnte die beobachtete Reaktion im IL-17 ELISpot im Vergleich zum IFN- γ ELISpot erklären.

Tregs und T_H17 Zellen stellen nach dem momentanen Verständnis „funktionelle Antagonisten“ dar. Solange keine entzündlichen Prozesse ablaufen, induziert TGF- β die Bildung Foxp3⁺ Tregs, welche die Selbsttoleranz aufrechterhalten. Im Rahmen inflammatorischer Vorgänge wird die Bildung von Tregs durch das vom angeborenen Immunsystem produzierte IL-6 supprimiert und stattdessen die Differenzierung von proinflammatorischen T_H17 Zellen induziert (143). IL-6 erhöhende Prozesse bei den getesteten Patientinnen/Patienten könnten damit ebenfalls zu der im Vergleich zum

Diskussion

IFN- γ ELISpot erhöhten spezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot nach Inkubation mit dem Peptid 7 beigetragen haben. Auch in Abwesenheit von IL-6 könnte eine erhöhte Verfügbarkeit von IL-21 zu der erhöhten Anzahl Peptid 7 spezifischer IL-17 sezernierender Zellen bei den Patientinnen/Patienten geführt haben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-21 die inflammatorische T_H17-Antwort bei entzündlichen Darmerkrankungen reguliert (144).

Darüber hinaus scheint es eine Überschneidung der T-Zell Repertoires von koexistierenden regulatorischen und nicht-regulatorischen T-Zellen zu geben. Ihre TZR waren im Thymus nicht in der Lage, eine suffiziente Negativselektion zu triggern (145). Es ist demnach möglich, dass solche gemeinsamen TZR-Pools die getestete Peptide 6 bzw. 7 erkennen und so die Gratwanderung zwischen Autoreaktivität und Toleranz gestört wird. Während bei den Kontrollpersonen die Aktivität der Tregs überwiegt, könnte es durch unterschiedliche Mechanismen bei den MS Patientinnen/Patienten zu einer verstärkten IL-6-Sekretion und damit einer Induktion proinflammatorischer T_H17 Zellen gekommen sein. Denkbar ist auch eine im Vergleich zu den Kontrollpersonen herabgesetzte suppressive Aktivität CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD39⁺ Tregs bei den getesteten Patientinnen/Patienten. Eine herabgesetzte Funktionalität sowie die verminderte Anzahl dieser Zellen bei Patientinnen/Patienten mit MS wurde bereits von Fletcher et al. beschrieben (66).

Kebir et al. konnten T_H17 Zellen nachweisen, die sowohl IFN- γ als auch IL-17 sezernieren und bei MS Patientinnen/Patienten während eines Schubes signifikant erhöht waren. Diese Zellen scheinen die BHS besonders gut überwinden zu können und während entzündlicher Prozesse im ZNS zu akkumulieren (64). Es besteht die Möglichkeit, dass solche Zellen mit TZR, die die Peptide 6 bzw. 10 erkennen, existieren und sowohl im IFN- γ als auch im IL-17 ELISpot messbar waren. Die beschriebene Akkumulation dieser Zellen im ZNS während einer aktiven Krankheitsphase könnte die geringere Rate positiver Reaktionen bei den aktiven Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit dem Peptid 10 erklären. Alternativ oder zusätzlich dazu könnten für die spezifische Reaktivität gegenüber den Peptiden 6 und 10 sowohl T_H17 als auch T_H1 Zellen beteiligt sein.

5.5 Exogene Einflüsse auf das T-Zell Repertoire

Casiraghi et al. konnten tierexperimentell zeigen, dass es während des Latenzstadiums einer γ -Herpesvirus-Infektion durch eine gesteigerte CD40-

Diskussion

Expression zu einer verstärkten T_H1 -Reaktion und einer reduzierten Anzahl an Tregs und infolge dessen zu einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf kommen kann. Sie stellten die Hypothese auf, dass eine γ -Herpesvirusinfektion durch diese Mechanismen auch beim Menschen einen prädisponierender Faktor für die Entstehung von Autoimmunität darstellen kann (21). Zu abgelaufenen viralen Infekten der untersuchten Patientenpopulation sind keine spezifischen Untersuchungen durchgeführt worden. Unter Umständen könnten diese aber Einfluss auf die im IFN- γ ELISpot gemessenen Zellzahlen gehabt haben.

Ein wichtiger Aspekt von Infektionen ist zudem die Möglichkeit einer mit ihnen einhergehenden Lymphopenie. Viele unterschiedliche Infektionen gehen mit einer, zumindest transienten, Verringerung der Lymphozytenanzahl einher. Ursächlich können Viren, z.B. HIV oder Masernvirus, aber auch bakterielle Erreger sein (51,146). Auch die Verabreichung verschiedener Medikamente (z.B. Alemtuzumab) kann die Gesamtzahl der Lymphozyten stark senken (50). Zudem konnte eine frühe Thymusinvolution bei Patientinnen/Patienten mit einer RRMS festgestellt werden (147,148). Wie in Kap. 2.3.3 beschrieben, stellt eine solche Lymphopenie einen Risikofaktor für autoimmune Prozesse dar (48,49).

Während der der Lymphopenie folgenden spontanen Proliferation verbleibender T-Zellen liefern Tregs die Grundlage für den Erhalt eines breiten TZR-Repertoires (47). Es ist möglich, dass bei den getesteten Patientinnen/Patienten eine solche spontane Proliferation, evtl. in Abwesenheit ausreichender und/oder funktionstüchtiger Tregs, stattgefunden hat. Dies kann die Beobachtungen nach Inkubation mit dem Peptid 6 erklären. Die Anzahl IFN- γ bzw. IL-17 sezernierender Zellen unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Dennoch lagen die Spotzahlen bei den Patientinnen/Patienten im Gegensatz zu denen der Kontrollpersonen signifikant über dem Hintergrund. Diese Beobachtung könnte durch ein breiteres T-Zell-Repertoire bei den Kontrollpersonen bzw. ein nach spontaner Proliferation eingeengtes T-Zell-Repertoire bei den Patientinnen/Patienten erklärt werden. Bei Letzteren würden Peptid 6-spezifische T-Zellen demnach einen größeren Anteil am Repertoire ausmachen als bei den Kontrollpersonen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Teil der in lymphopene Versuchstiere transferierten naiven $CD4^+$ T-Zellen durch den Prozess der spontanen Proliferation die Fähigkeit zur IFN- γ Sekretion nach Stimulation erhalten haben (146). Auch solche

Diskussion

Zellen, könnten bei den getesteten Patientinnen/Patienten im IFN- γ ELISpot erfasst worden sein.

5.6 Molekulares Mimikry und Peptidstrukturelemente als Schalthebel der Enzephalitogenität

Mindestens fünf Mimikry-Strukturen konnten bislang für PLP₁₃₉₋₁₅₁ identifiziert werden. Diese Strukturen kommen in verschiedenen Pathogenen, u.a. dem Protease IV Protein von *H. influenzae*, vor (42,149). Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Peptide konnten keine relevanten Ähnlichkeiten zu bekannten Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten gefunden werden (78). Dennoch ist es möglich, dass Strukturähnlichkeiten oder relevante Spezies noch nicht bekannt und demnach in der Datenbank verfügbar sind.

Vanderlugt et al. konnten in Mäusen zeigen, dass klinische Krankheitsschübe mit *epitope spreading* assoziiert waren. Sie beobachteten dabei u.a. das intramolekulare *epitope spreading* zu verschiedenen PLP-Epitopen und eine Hierarchie in der Enzephalitogenität dieser Epitope (PLP₁₃₉₋₁₅₁ > PLP₁₇₈₋₁₉₁) (128). Das getestete PLP-Epitop wurde dabei nicht erwähnt, könnte aber durch einen ähnlichen Mechanismus im Verlauf der Erkrankung immunologische Zielstruktur geworden sein.

Wichtig ist zudem die Differenzierung zwischen dem reinen Potenzial eines Peptids, eine spezifische Immunreaktion hervorzurufen und seiner Enzephalitogenität. Herrmann et al. konnten Gen-Netzwerke identifizieren, die dabei eine herausragende Rolle spielen (150). Über die Gen-Expressionsprofile der im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Lymphozyten und damit die Enzephalitogenität der einzelnen Peptide kann keine Aussage getroffen werden. Auch die Hierarchie der spezifisch erkannten Peptide bleibt offen. Ob ein Peptid krankheitsursächlich war oder im Verlauf der Erkrankung, z.B. durch *epitope spreading* Relevanz erhalten hat, kann den Daten nicht entnommen werden.

Bei der Betrachtung des enzephalitogenen Potenzials eines Peptids, spielt auch dessen Konformation eine wichtige Rolle (151). Konformationsänderungen können beispielsweise durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen und die Freilegung von Neoepitopen bewirken (152,153). Kovalente Modifikationen eines Proteins könnten auch die Affinität/Avidität beeinflussen, mit der ein TZR einen Komplex aus HLA-Molekül und einem Autoantigen bindet. Wird diese durch periphere posttranslationale Modifikationen erhöht, könnte das dazu führen, dass autoreaktive

Diskussion

Zellen aktiviert werden, die zentrale Toleranzmechanismen umgehen konnten (15,152). Hierfür konnte bereits gezeigt werden, dass eine Thiopalmitoylierung von PLP dessen Enzephalitogenität erhöht (15,154). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass insbesondere citrullinierte Autoantigene eine Rolle bei der Pathogenese der MS spielen könnten (15,153). Gegen die beiden im Rahmen dieser Arbeit getesteten citrullinierten Peptide konnte keine spezifische Reaktivität festgestellt werden.

5.7 Der Effekt von Vitamin D auf die Autoimmunität bei der MS

Die Ergebnisse unterschiedlicher Studien lassen einen immunmodulatorischen Effekt von Vitamin D vermuten (4). Beispielsweise sank in einer großen prospektiven Studie von Munger et al. das Risiko einer MS in der kaukasischen Bevölkerung mit steigendem Serum 25(OH)D-Spiegel (155). Darüber hinaus konnten Soilu-Hänninen et al. sowie Correale et al. zeigen, dass die Serum 25(OH)D-Spiegel bei MS Patientinnen/Patienten während klinischer Schübe niedriger waren als in Phasen der Remission. Daraus folgerten sie, dass Vitamin D eine wichtige Rolle in der T-Zell Homöostase spielt und an der Regulation der klinischen Krankheitsaktivität beteiligt ist (4,156,157). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen berichteten Embry et al. von einer inversen Beziehung zwischen der Aktivität von MS-Läsionen im MRT und dem Serum 25(OH)D-Spiegel (158). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte, zumindest in der zweiten IFN- γ Gruppe, ein signifikant niedrigerer Serum 25(OH)D-Wert bei aktiven Patientinnen/Patienten im Vergleich zu Inaktiven festgestellt werden (Kap. 4.4).

Durch welche Mechanismen Vitamin D seinen immunmodulatorischen Effekt erzielt, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Es wird vermutet, dass die Induktion von Tregs von entscheidender Bedeutung sein könnte. So war der prozentuale Anteil CD4⁺CD25⁺ Tregs nach Kultur von PBMC in Anwesenheit von 1,25(OH)₂ Vitamin D in einer Studie von Correale et al. signifikant erhöht (4,17). Darüber hinaus konnte eine inverse Korrelation zwischen dem Serum 25(OH)D-Spiegel und dem prozentualen Anteil der Tregs bei Patientinnen/Patienten mit MS gezeigt werden (159). Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Anzahl funktionstüchtiger peripherer CD4⁺ Tregs in gesunden Kontrollpersonen nach der Gabe von hohen Dosen an Cholecalciferol (160).

Vitamin D scheint zudem die Proliferation von T-Zellen zu supprimieren und Effektorzellen für apoptotische Signale zu sensibilisieren. Darüber hinaus konnte eine Beeinflussung des Zytokinhaushaltes gezeigt werden. Es wird vermutet, dass die

Diskussion

Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF- α , IFN- γ und IL-17A herunterreguliert wird, wohingegen die Expression von antiinflammatorischem IL-10 und IL-4 steigt. Sowohl eine verminderte Expression als auch eine verringerte Anzahl IL-6/IFN- γ /IL-17A sezernierender Zellen wurde beschrieben. Es scheint daher, dass T_H1 und T_H17 Antworten supprimiert und immunregulatorische/immunsuppressive Mechanismen durch Vitamin D induziert werden (4,27,161–164). Mrad et al. untersuchten den Effekt einer Vitamin D Gabe auf immunologische Biomarker bei Patientinnen/Patienten mit RRMS. Sie konnten zeigen, dass höhere Vitamin D Spiegel mit einer geringeren IFN- γ Sekretion CD4⁺ Zellen assoziiert waren (124). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zwar kein signifikanter Unterschied der Vitamin D Spiegel zwischen Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen festgestellt werden, doch ist anzumerken, dass viele der getesteten Patientinnen/Patienten vor der Blutentnahme eine Vitamin D Supplementierung erhielten. Über die Einnahme von Vitamin D Präparaten bei den Kontrollpersonen ist nichts bekannt. Eventuell bewirkte eine iatrogene Anhebung des Vitamin D Spiegels bei den Patientinnen/Patienten eine gegenüber den Kontrollpersonen verringerte IFN- γ Sekretion. Dies kann ein Grund für die beobachtete signifikant höhere IFN- γ -Sekretion in Abwesenheit von Peptiden bei den getesteten Kontrollpersonen gegenüber den MS Patientinnen/Patienten gewesen sein.

Auch eine positive Beeinflussung der Negativselektion im Thymus durch Vitamin D wird diskutiert (163). *In vitro Studien* zeigten darüber hinaus, dass Vitamin D die IL-12-Sekretion sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle supprimiert (4).

Diese theoretischen Überlegungen können in Einklang mit einer Arbeit von Koch et al. im pathogenetisch relevanten Kontext betrachtet werden. Darin wird vermutet, dass ein Vitamin D Mangel durch seinen Einfluss auf die Immunhomöostase und eine verstärkte Präsentation von Selbstantigenen dazu führen kann, dass sich die Immunantwort ausweitet und einen diffusen Charakter annimmt (165). Dies kann eine Erklärung für die beobachtete Diversität positiver Reaktionen insbesondere der aktiven Patientinnen/Patienten im IFN- γ ELISpot sein.

Kokic et al. konnten eine negative Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von IFN- γ und 25(OH) Vitamin D bei Patientinnen mit systemischen Lupus erythematoses zeigen (166). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit für einige Gruppen eine negative Korrelation zwischen der Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen nach Peptidinkubation und dem

Diskussion

Serum 25(OH) Vitamin D Spiegel. Dieser Zusammenhang traf für die Gruppe der inaktiven Patientinnen/Patienten nach Inkubation mit den Peptiden 6 und 10 sowie für deren Spontanaktivität und die gepoolten spezifischen Reaktivitäten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 zu. Auch für die spezifische Reaktivität gegenüber Peptid 10 und die Spontanaktivität der Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte konnte dieser Sachverhalt nachvollzogen werden. Dass die Beobachtung nicht bei allen Gruppen gleichermaßen gemacht werden konnte, könnte unter anderem an der recht kleinen Fallzahl liegen. Mechanistisch betrachtet kann sowohl eine Modulation der T_H1 Antwort als auch der Anzahl und Aktivität der Tregs die gemessene Anzahl $IFN-\gamma$ sezernierender Zellen beeinflusst haben. Dies kann Auswirkungen auf die Spontanaktivität und auf die spezifische Reaktivität gegenüber den Peptiden 6 und 10 gehabt haben.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass über eventuelle Einflussfaktoren auf den gemessenen 25(OH) Vitamin D Wert keine Aussage getroffen werden kann. Beispielsweise wurden weder jahreszeitliche Schwankungen noch die Sonnenlichtexposition der untersuchten Personen berücksichtigt. Die Existenz UV-sensitiver T-Zellen lässt jedoch Vitamin D unabhängige Mechanismen als Einflussfaktoren auf das Immunsystem vermuten (167). Außerdem geben Ascherio et al. zu bedenken, dass die Serumkonzentration von 25(OH) Vitamin D nach Ausbruch einer MS sinkt. Ihrer Meinung nach lässt dieser Parameter daher keine Aussage darüber zu, ob sich Vitamin D protektiv auf das MS Risiko auswirkt (25). Es bleibt daher ungewiss, ob die beobachteten Zusammenhänge zur Immunpathogenese der MS beigetragen haben, oder morphologisches Phänomen der Erkrankung sind und deren Verlauf eventuell modulieren.

Beachtenswert ist die positive Korrelation zwischen dem Serum 25(OH) Vitamin D Spiegel und der Anzahl spontan $IFN-\gamma$ sezernierender Zellen bei den aktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte. Ursachen hierfür bleiben spekulativ. Cantorna et al. äußerten, dass viele Erkenntnisse über die Wirkung von Vitamin D auf T-Zellen im Mausmodell abhängig von dem Gewebe sind, aus welchem die Zellen entnommen wurden (162). Der beobachtete Zusammenhang sagt daher unter Umständen wenig über die Verhältnisse im ZNS aus, zumal Lymphozyten in der Lage sind, autokrin und parakrin Vitamin D zu sezernieren (27). Auch die individuelle Wirkung, die durch genetische Veränderungen etwa im VDR-Gen verändert wird, kann den Effekt von Vitamin D auf das Immunsystem beeinflussen (25). Die Beachtung

Diskussion

epigenetischer Veränderungen ist hierfür auch von Bedeutung (168). Die vorliegende Arbeit lässt vermuten, dass die Krankheitsaktivität der MS die spezifische Wirkung modulieren kann. Eventuell stellt eine Subpopulation der spontan IFN- γ sezernierenden Zellen bei aktiven MS Patientinnen/Patienten eine Population dar, die im peripheren Blut paradox auf Vitamin D reagiert und durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Krankheitsaktivität beiträgt.

5.8 Die Rolle der Serumparameter fT4, TSH und Cholesterin in der MS

Neben den Serumspiegeln von Vitamin D wurden weitere Parameter bestimmt, die potenziell bei Patientinnen/Patienten mit MS verändert vorliegen oder möglicherweise einen Einfluss auf die Krankheitspathogenese haben könnten.

Im Jahr 1980 führten Kiessling et al. die erste Studie durch, in der systematisch Schilddrüsenparameter bei Patientinnen/Patienten mit MS untersucht wurden. Es zeigten sich signifikant erhöhte T4-Spiegel und, im Gegensatz dazu, signifikant erniedrigte T3- und TSH-Spiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (169). Eine andere Studie konnte ebenfalls erniedrigte T3-Spiegel aber unveränderte T4- und TSH-Spiegel zeigen. Vermutet wurde eine veränderte periphere Konversion von T4 zu T3 bei Patientinnen/Patienten mit MS (170). In den hier vorliegenden Daten zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumspiegeln von fT4 und TSH zwischen den getesteten Gruppen. Eine Ursache könnte neben einer zu kleinen Fallzahl darin bestehen, dass viele getestete Patientinnen/Patienten in den Monaten vor der Blutentnahme eine immunmodulatorische Therapie erhalten haben. Insbesondere die Verabreichung von IFN- β 1a oder 1b konnte mit dem Auftreten von Schilddrüsenfunktionsstörungen im ersten Therapiejahr in Verbindung gebracht werden. Diese sind meist subklinisch und transient, können aber zu veränderten Hormonwerten im Blut geführt haben (171,172).

Es zeigte sich jedoch eine positive Korrelation zwischen dem fT4-Spiegel im Serum und der Anzahl spontan IFN- γ sezernierender Zellen in der Gruppe der aktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte. Zusätzlich ließ sich eine ebensolche Tendenz für die Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen nach Inkubation mit dem Peptid 6 für die MS Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte feststellen. Zu diesen Beobachtungen passend zeigte sich die Tendenz einer inversen Korrelation zwischen

Diskussion

dem Serum-TSH-Spiegel und der Anzahl spontan IFN- γ sezernierender Zellen für die aktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte sowie für alle im Rahmen der ersten Kohorte und der gesamten Arbeit getesteten Patientinnen/Patienten. Darüber hinaus korrelierte die Anzahl IL-17 sezernierender Zellen nach Inkubation mit Peptid 6 in der Gruppe der aktiven Patientinnen/Patienten invers mit dem TSH-Spiegel im Serum. Ungeklärt bleibt, ob diese Zusammenhänge eine Konsequenz der Erkrankung sind oder eventuell an der Pathogenese der MS beteiligt sein könnten. Experimente zu diesen Überlegungen führten Wang et al. durch, die zeigen konnten, dass Patientinnen/Patienten mit akuter transverser Myelitis (ATM) niedrigere TSH und fT3 sowie höhere fT4 und fT4/fT3 Werte hatten. Darüber hinaus stellten sie dar, dass niedrige TSH und fT3 Werte mit einer höheren Krankheitsschwere assoziiert waren (173). Ähnliche Beobachtungen wurden für das Gullain-Barré Syndrom (GBS) beschrieben (174). Beide Arbeitsgruppen interpretierten ihre Daten als Ausdruck eines erhöhten Levels an oxidativem Stress (OS) (173,174). OS wird mit der Pathogenese und Progredienz diverser Autoimmunerkrankungen, u.a. der MS, in Verbindung gebracht (173,175,176). OS kann durch endogene und exogene Mechanismen erzeugt werden (175). Aufgrund seines hohen Sauerstoffumsatzes, seines geringen Gehaltes an Antioxidantien und seines hohen Anteils an Phospholipiden als mögliche Zielstrukturen reagiert das Gehirn besonders sensibel auf freie Radikale (175,176). Dabei führt OS u.a. zum Absterben von Oligodendrozyten, zu Myelinbeschädigungen und über diverse Mechanismen schließlich zur Demyelinisierung (173). Darüber hinaus wird vermutet, dass es durch OS zur Freilegung neuer Epitope und damit einer Ausweitung autoimmuner Prozesse kommen kann (177). Es ist daher möglich, die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Korrelationen zwischen Schilddrüsenparametern und der Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen durch den individuellen Status an OS und Antioxidantien bei den getesteten Patientinnen/Patienten zu erklären. Eine Intensivierung des OS und seiner Wirkung während aktiver Krankheitsphasen passt zu der Tatsache, dass eine positive Korrelation insbesondere für aktive Patientinnen/Patienten gezeigt werden konnte (176). Neben ihrer Rolle als Surrogatparameter für OS zeigen neueste Forschungsergebnisse, dass Schilddrüsenhormone im Tiermodell an der Differenzierung oligodendroglialer Vorläuferzellen beteiligt sind und Remyelinisierungsprozesse vorantreiben (178,179).

Diskussion

Mehrere wissenschaftliche Arbeiten der vergangenen Jahre lassen vermuten, dass bei der MS eine Störung in der Cholesterinhomöostase vorliegt (180,181). Aus immunologisch-mechanistischer Perspektive werden in der Literatur zwei verschiedene Theorien diskutiert, inwieweit Cholesterin in der Lage ist, die Immunantwort zu modulieren.

Einerseits konnten Swamy et al. zeigen, dass Cholesterin als negativer allosterischer Regulator die TZR-Aktivität moduliert und dadurch das Auftreten spontaner Signalübertragungen verhindert (182). Andererseits zeigten Surls et al., dass ein erhöhter Gehalt von Cholesterin in der Plasmamembran von Lymphozyten die inflammatorische T_H1-Antwort verstärkt (183). Somit fungiert Cholesterin auch als positiver Regulator, indem es ein sog. „*nanoclustering*“ der TZR in der Zellmembran ermöglicht. Hierbei handelt es sich um eine Zusammenlagerung von ca. 2-30 TZR, für welche Cholesterin essenziell ist. Dadurch wird die Avidität gegenüber pMHC Tetrameren erhöht. Auch wenn lediglich zwei TZR eine Antigenbindung eingehen, werden alle TZR eines Clusters aktiviert. Dieser Mechanismus führt auch bei niedrigen Antigenkonzentrationen zu einem starken Signal (182,184,185). Unklar ist bislang, unter welchen Umständen diese gegensätzlichen Funktionen dominieren und inwieweit eventuell andere Membranlipide an dieser Regulation beteiligt sind (186). Einige Wissenschaftlerinnen/Wissenschaftler vermuten, dass *in vivo* der Effekt des *nanoclusterings* überwiegen könnte (182). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war somit sowohl eine positive als auch eine negative Korrelation zwischen den gemessenen Cholesterin-Werten im Serum und der Anzahl Zytokin sezernierender Zellen im ELISpot denkbar. Letztendlich zeigte sich in der Gruppe der Kontrollpersonen eine inverse Korrelation zwischen den Cholesterin-Spiegeln und der peptidspezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot. Erklärungsmöglichkeiten für diesen Zusammenhang bleiben spekulativ. Vorstellbar ist die negative allosterische Regulation durch Cholesterin, wie sie von Swamy et al. beschrieben wurde (182). Darüber hinaus muss diese Beobachtung nicht zwangsläufig im Gegensatz zu der Theorie des *nanoclusterings* stehen. Lymphozyten sind in der Lage, über die Konzentration von Cholesterin in der Plasmamembran die Größe und Anzahl der *Nanocluster* zu kontrollieren (185). Über den intrazellulären Gehalt an Cholesterin beziehungsweise dessen Anteil an der Plasmamembran kann allerdings keine Aussage getroffen werden, da lediglich Serumwerte gemessen wurden und somit die anderen Kompartimente außer Acht gelassen wurden. In der Gruppe der

Diskussion

Patientinnen/Patienten zeigten sich hingegen keine Zusammenhänge. Neben der kleinen Studienpopulation könnte eine weitere Ursache darin begründet sein, dass die Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht nüchtern waren. Außerdem muss im Hinblick auf die pathogenetische Relevanz der Ergebnisse bedacht werden, dass bei Erwachsenen Cholesterin im ZNS überwiegend der *de novo* Synthese durch Astrozyten und Oligodendrozyten entstammt, im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings lediglich Serumwerte gemessen wurden (187).

5.9 Zusammenfassung und Ausblick

Die MS ist eine chronische neurologische Erkrankung, deren Pathogenese bislang nicht vollständig aufgeklärt wurde. Insbesondere die genauen immunologischen Zielstrukturen autoreaktiver Lymphozyten sind bisher unklar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Immunantwort gegen 29 verschiedene Peptidstrukturen untersucht, die lokal im ZNS von MS Patientinnen/Patienten präsentiert werden. Drei dieser Antigene standen dabei besonders im Fokus. Ein Peptid, welches im humanen epidermalen Wachstumsfaktorsubstrat 15 vorkommt, führte zu einer erhöhten Immunreaktivität in der Patientengruppe. In dieser zeigte sich des Weiteren eine verstärkte IL-17 Antwort auf ein Peptid, welches im neuronalen Membranglykoprotein m6-b zu finden ist. Außerdem zeigen die Daten, dass T-Zellen, deren TZR spezifisch ein Peptid von PLP erkennen, sowohl bei Patientinnen/Patienten als auch bei Kontrollpersonen Teil des Immunrepertoires sind.

Zudem erfolgte eine Analyse der vier Serumparameter Vitamin D, Cholesterin, TSH und fT4. Die vorliegenden Daten lassen in Übereinstimmung mit der Literatur vermuten, dass Vitamin D eine wichtige Rolle bei der MS spielt (4). Die Schilddrüsenparameter TSH und fT4 könnten als Surrogatparameter für oxidativen Stress dienen, der bereits mit der Pathogenese und Progredienz diverser Autoimmunerkrankungen, u.a. der MS, in Verbindung gebracht wurde (173,175,176). Darüber hinaus ergaben sich Hinweise auf einen Einfluss von Cholesterin auf die peptidspezifische Reaktivität der Lymphozyten. Unklar bleibt, ob die Beobachtungen bei der Analyse der Serumparameter pathogenetisch relevant oder Folge der Erkrankung bzw. deren Behandlung sind. Daher sind größere Studien unter Einschluss einer Kontrollgruppe nötig. Dabei sollte auch die Erkrankungsdauer und eine eventuelle immunmodulatorische Therapie einbezogen werden. Eventuell lassen sich

Diskussion

aus weiteren Studien dann therapeutische Konsequenzen ziehen. Denkbar ist auch, dass Serumparameter in Zukunft aussagekräftige Biomarker bei der MS darstellen. Im Hinblick auf die drei Peptide sollte im Anschluss an diese Arbeit eine genaue Charakterisierung der Zellen erfolgen, welche für die Peptiderkennung verantwortlich sind. Dabei muss untersucht werden, ob es sich um CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen handelt. Ungeklärt bleibt die Frage nach der pathogenetischen Relevanz der untersuchten Antigene. Mit Hilfe quantitativer Analysemethoden könnte die Expression verschiedener Signalmoleküle in Abhängigkeit von der Inkubation mit einzelnen Peptiden bestimmt werden. Eventuell lassen Kenntnisse über veränderte Expressionsmuster Rückschlüsse darüber zu, welche Eigenschaften ein Peptid enzephalitogen machen. Außerdem wäre es sinnvoll, dabei die Krankheitsdauer und den HLA-Typ der Patientinnen/Patienten einzubeziehen. Die Kenntnis über pathogenetisch relevante Antigene bei der MS und deren enzephalitogene Eigenschaften wäre ein bedeutender Fortschritt der MS-Forschung und würde neue therapeutische Ansätze ermöglichen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
ANO2	Anoctamin 2
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAMs	Adhesion molecules
CD	Cluster of differentiation
CDMS	Klinisch definitive MS
CNPase	2',3'-cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISpot	Enzyme-linked immunospot assay
FBS	Fötale Bovines Serum
GBS	Gullain-Barré Syndrom
GKS	Glukokortikosteroide
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	Human leukocyte antigen
HPV	Humanes Papillomvirus
IA	Immunadsorbtion
ICAM-1	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILR	Interleukin-Rezeptor
IRIS	inflammatorischen Immunrekonstruktionssyndrom
JC	John Cunningham
Kap.	Kapitel
KIS/CIS	klinisch isoliertes Syndrom/ Clinically isolated syndrome
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LINGO-1	<i>leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing neurite outgrowth inhibitor receptor-interacting protein</i>
LIP	lymphopenia-induced proliferation
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAG	myelin-associated antigen
MBP	Myelin Basic Protein
MEP	Motorisch evozierte Potenziale
MMP	Matrixmetalloproteinase

Verzeichnisse

MOG	Myelin Oligodendrocyte Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
n.b.	Nicht bekannt
NBE	new biological entities
NCE	new chemical entities
NF	Neurofilament
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NMSS	US National Multiple Sclerosis Society
Nrf-2	nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
OKB	Oligoklonale Banden
OS	Oxidativer Stress
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Plasmapherese
PHA	Phytohämagglutinin
PLP	Proteolipidprotein
PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
PP	Primär chronisch progredient
PPMS	Primär chronisch progrediente MS
PR	Schubförmig-progredient
pTreg	Regulatorische T-Zelle aus der Peripherie
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom
RM	Rückenmark
Rpm	Rounds per minute
RR	Schubförmig-remittierend
RRMS	Schubförmig-remittierende MS
r _{TH} 17	Regulatorische T _H 17 Zellen
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SEM	Standard error of the mean
SP	Sekundär chronisch progredient
SPMS	Sekundär chronisch progrediente MS
SSEP	Somatosensibel evozierte Potenziale
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRA	Tissue-restricted antigens
Treg	Regulatorische T-Zelle
tTreg	Regulatorische T-Zelle aus dem Thymus
TZR	T-Zell Rezeptor
VDR	Vitamin D Rezeptor
VEP	Visuell evozierte Potenziale
VLA-4	very late-antigen 4
VZV	Varizella Zoster Virus

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flowchart des Vorgehens bei diesem Projekt	43
Abbildung 2: exemplarisches Bild einer ELISpot-Platte	50
Abbildung 3: Spezifische Reaktivität der in einer ersten Kohorte getesteten PBMC gegenüber den 29 eluierten Peptiden	61
Abbildung 4: Positive Reaktionen im IFN-γ ELISpot der Kontrollpersonen	62
Abbildung 5: Positive Reaktionen im IFN-γ ELISpot der aktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte	63
Abbildung 6: Positive Reaktionen im IFN-γ ELISpot der inaktiven Patientinnen/Patienten der ersten Kohorte	64
Abbildung 7: Spezifische Reaktivität der getesteten PBMC der Kontrollpersonen gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10	66
Abbildung 8: Spezifische Reaktivität der getesteten PBMC der MS Patientinnen/Patienten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10	67
Abbildung 9: Spezifische Reaktivität der getesteten PBMC der aktiven Patientinnen/Patienten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10	68
Abbildung 10: Spezifische Reaktivität der PBMC der inaktiven Patientinnen/Patienten gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10	69
Abbildung 11: Hintergrundaktivität im IFN-γ ELISpot	73
Abbildung 12: spezifische Reaktivität gegenüber Peptid 7	74
Abbildung 13: spezifische Reaktivität gegenüber Peptid 10	75
Abbildung 14: Serum Vitamin D Spiegel der aktiven und inaktiven Patientinnen/Patienten der zweiten Kohorte	76
Abbildung 15: Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit der spezifischen Reaktivität im IFN-γ ELISpot	77
Abbildung 16: Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit der Spontanaktivität im IFN-γ ELISpot	78
Abbildung 17: Korrelation des Serum TSH Wertes mit der Spontanaktivität im IFN-γ ELISpot sowie der spezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot	79
Abbildung 18: Korrelation des Serum fT4 Wertes mit der Spontanaktivität sowie der spezifischen Reaktivität im IFN-γ ELISpot	80
Abbildung 19: Korrelation des Serum Cholesterin Wertes mit der spezifischen Reaktivität im IL-17 ELISpot	80
Abbildung 20: Korrelation des Serum Vitamin D Spiegels mit der spezifischen Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 im IFN-γ ELISpot	81
Abbildung 21: Korrelation des Serum Cholesterin Spiegels mit der spezifischen Reaktivität gegenüber den Peptiden 6, 7 und 10 im IL-17 ELISpot	81

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mögliche Risikofaktoren für die MS modifiziert nach Garg et al. (6).	10
Tabelle 2: McDonald MRT Kriterien für den Nachweis der räumlichen Dissemination basierend auf Swanton et al., modifiziert durch Polman et al. (85,86)	29
Tabelle 3: McDonald MRT Kriterien für den Nachweis der zeitlichen Dissemination basierend auf Montalban et al., modifiziert durch Polman et al. (85)	29
Tabelle 4: ursprüngliche und überarbeitete Unterteilung der schubförmig-remittierenden MS modifiziert nach Lublin et al. (88,89)	32
Tabelle 5: ursprüngliche und überarbeitete Unterteilung der progredienten MS modifiziert nach Lublin et al. (88,89)	33
Tabelle 6: Ausgewählte Charakteristika der gesamten getesteten Population (Kohorten 1 und 2)	54
Tabelle 7: Ausgewählte Charakteristika der ersten Kohorte	55
Tabelle 8: Ausgewählte Charakteristika der zweiten Kohorte	55
Tabelle 9: Charakteristika der getesteten MS Patientinnen/Patienten und Kontrollpersonen	59
Tabelle 10: Mittelwerte der Spotzahlen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 im IFN-γ ELISpot der ersten Kohorte	70
Tabelle 11: Mittelwerte der Spotzahlen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 im IFN-γ ELISpot der zweiten Kohorte	70
Tabelle 12: Spotzahlen nach Inkubation mit den Peptiden 6, 7 und 10 im IL-17 ELISpot	71
Tabelle 13: Positive Reaktionen im IFN-γ ELISpot	72
Tabelle 14: Positive Reaktionen im IL-17 ELISpot	72
Tabelle 15: Beobachtete Zusammenhänge zwischen der Höhe der Serumparameter und den Spotzahlen im IFN-γ und IL-17 ELISpot	83
Tabelle 16: Sequenzen und Vorkommen der eluierten Peptide in humanen Proteinen	87

9 Literaturverzeichnis

1. Dendrou C a., Fugger L, Friese M a. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:545–558.
2. Gold PDR. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. 2014.
3. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Increased Immune Reactivity to Central Nervous System Derived Naturally Presented Peptides in Patients with Active Multiple Sclerosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:194–197.
4. Correale J, Ysrraelit MC, Gaitn MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132:1146–60.
5. Weissert R. The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8:857–66.
6. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2015;5:1–13.
7. Von Büdingen HC, Palanichamy A, Lehmann-Horn K, Michel BA, Zamvil SS. Update on the autoimmune pathology of multiple sclerosis: B-cells as disease-drivers and therapeutic targets. *Eur Neurol.* 2015;73:238–46.

Verzeichnisse

8. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol.* 2016, 172:3–13.
9. Flachenecker P, Kobelt G, Berg J, Capsa D, Gannedahl M. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe : Results for Germany. *Mult Scler J.* 2017;23:78–90.
10. Cree BAC. Multiple sclerosis genetics. In: *Handbook of Clinical Neurology.* 2014. p. 193–209.
11. 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, Martin C, Zipp F, D'Alfonso S, Martine MJ. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45:1353–60.
12. Fugger L, Friese M a, Bell JI. From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:408–17.
13. Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, et al. HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;72:184–7.
14. Friese M a, Jakobsen KB, Friis L, Etzensperger R, Craner MJ, McMahon RM, et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med.* 2008;14:1227–35.
15. Riedhammer C, Weissert R. Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2015;6:322.
16. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 1995;47:425–48.
17. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol.* 2007;61:504–13.
18. Owens GP, Bennett JL. Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein- Barr virus and multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2012;18:1204–8.
19. Virtanen JO, Jacobson S. Viruses and multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012;11:528–44.
20. Márquez AC, Horwitz MS. The Role of Latently Infected B Cells in CNS Autoimmunity. *Front Immunol.* 2015;6:1–8.
21. Casiraghi C, Márquez AC, Shanina I, Horwitz MS. Latent virus infection upregulates CD40 expression facilitating enhanced autoimmunity in a model of multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2015;5
22. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol.* 2007;61:288–99.
23. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2013;13:3–9.
24. Xiao D, Ye X, Zhang N, Ou M, Guo C, Zhang B, et al. A meta-analysis of interaction between Epstein-Barr virus and HLA-DRB1*1501 on risk of multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2015;5
25. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9:599–612.
26. Martinelli V, Dalla Costa G, Colombo B, Dalla Libera D, Rubinacci A, Filippi M, et al. Vitamin D levels and risk of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Mult Scler J.* 2014;20:147–55.
27. Alharbi FM. Update in vitamin D and multiple sclerosis. *Neurosciences.* 2015;20:329–35.

Verzeichnisse

28. Zhang P, Wang R, Li Z, Wang Y, Gao C, Lv X, et al. The risk of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis based on 20,626 cases from case-control and cohort studies. *PeerJ*. 2016;4:1–19.
29. Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, et al. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain A J Neurol*. 2011;134:653–64.
30. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14:406–19.
31. Negi N, Das BK. CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *Int Rev Immunol*. 2017 29;1–12.
32. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol*. 2015;36:569–77.
33. Lopes Pinheiro MA, Kamermans A, Garcia-Vallejo JJ, van het Hof B, Wierts L, O'Toole T, et al. Internalization and presentation of myelin antigens by the brain endothelium guides antigen-specific T cell migration. *Elife*. 2016 23:13149.
34. Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2017;60:1–12.
35. Reza J, Ritter M. Positive and negative selection in the thymus and the thymic paradox. *Dev Immunol*. 1998;5:161–8.
36. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced Tregs-role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol*. 2013;4:1–12.
37. Goverman JM. Immune Tolerance in Multiple Sclerosis. *Immunol Rev*. 2012;241:228–40.
38. Kalekar LA, Mueller DL. Relationship between CD4 Regulatory T Cells and Anergy In Vivo. *J Immunol*. 2017;198:2527–33.
39. Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest*. 2004;113:990–7.
40. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 1995;80:695–705.
41. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J, et al. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*. 2014;157:1073–87.
42. Croxford JL, Olson JK, Anger HA, Miller SD. Initiation and Exacerbation of Autoimmune Demyelination of the Central Nervous System via Virus-Induced Molecular Mimicry: Implications for the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J Virol*. 2005;79:8581–90.
43. Krishnamoorthy G, Saxena A, Mars LT, Domingues HS, Mentele R, Ben-Nun A, et al. Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med*. 2009 15:626–32.
44. Ji Q, Perchellet A, Goverman JM. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol*. 2010 11:628–34.
45. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi Z Al, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*. 2011;479:538–41.
46. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, et al. Role of Gut Commensal Microflora in the Development

- of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009;183:6041–50.
47. Winstead CJ, Reilly CS, Moon JJ, Jenkins MK, Hamilton SE, Jameson SC, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia. *J Immunol.* 2010;184:1–26.
 48. Champion A Le, Gagnerault M, Auffray C, Bécourt C, Lallemand E, Bienvenu B, et al. Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood.* 2009;114:1784–93.
 49. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell.* 2004;117:265–77.
 50. Jones JL, Thompson SAJ, Loh P, Davies JL, Tuohy OC, Curry AJ, et al. Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:20200–5.
 51. Khoruts A, Fraser JM. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. *Immunol Lett.* 2005;98:23–31.
 52. Balakrishnan A, Jama B, Morris GP. Endogenous co-expression of two T cell receptors promotes lymphopenia-induced proliferation via increased affinity for self-antigen. *J Leukoc Biol.* 2018;1–8.
 53. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: Autoreactive CD4⁺ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol.* 2016;15:198–209.
 54. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517.
 55. Constantinescu C, Gran B. The essential role of t cells in multiple sclerosis: A reappraisal. *Biomed J.* 2014;37:34–40.
 56. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201:233–40.
 57. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:535–44.
 58. Acosta-Rodriguez E V, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8:639–46.
 59. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007;13:1173–5.
 60. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy C a, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421:744–8.
 61. Lowther DE, Chong DL, Ascough S, Ettore A, Ingram RJ, Boyton RJ, et al. Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta Neuropathol.* 2013;126:501–15.
 62. Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: Imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med.* 2011;17:119–25.
 63. Tzartos JS, Friese M a, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172:146–55.

Verzeichnisse

64. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009;66:390–402.
65. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature.* 2011;475:514–8.
66. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009;183:7602–10.
67. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133:775–87.
68. Shevach EM. Regulatory T Cells In Autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:423–49.
69. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199:971–9.
70. Severin ME, Lee PW, Liu Y, Selhorst AJ, Gormley MG, Pei W, et al. MicroRNAs targeting TGF β signalling underlie the regulatory T cell defect in multiple sclerosis. *Brain.* 2016;139:1747–61.
71. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol.* 2009;65:499–509.
72. Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, Ashley CW, Beriou G, Dominguez-Villar M, et al. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* 2011;186:3317–26.
73. Sauer BM, Schmalstieg WF, Howe CL. Axons are injured by antigen-specific CD8+ T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiol Dis.* 2013;59:194–205.
74. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol.* 2015;6:1–14.
75. Ayoglu Mitsios, N., Kockum, I., Khademi, M., Zandian, A., Sjöberg, R., Forsström, B., Bredenberg, J., Lima Bomfim, I., Holmgren, E., Grönlund, H., Ortlieb Guerreiro-Cacais, A., Abdelmagid, N., Uhlen, M., Waterboer, T., Alfredsson, L., Mulder, J., Schwenk B. Anoctamin 2 identified as autoimmune target in multiple sclerosis. *PNAS Press.* 2016;113:2188–93.
76. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature.* 1990;346:183–7.
77. Valli A, Sette A, Kappos L, Oseroff C, Sidney J, Miescher G, et al. Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1993;91:616–28.
78. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016;45:D158–69.
79. Klein L, Klugmann M, Nave K a, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med.* 2000;6:56–61.
80. Mirshafiey A, Kianiaslani M. Autoantigens and autoantibodies in multiple sclerosis. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2013;12:292–303.
81. Chastre A, Hafler DA, O'Connor KC. Evaluation of KIR4.1 as an Immune

- Target in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2016;374:1495–6.
82. Anne-Katrin Pröbstel, M.D. Jens Kuhle, M.D. Anne-Catherine Lecourt, M.Sc. Isabelle Vock Nicholas S.R. Sanderson, Ph.D. Ludwig Kappos MD, Tobias Derfuss MD. Multiple Sclerosis and Antibodies against KIR4.1. *N Engl J Med.* 2016;374:1496–8.
 83. Popescu BFG, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: Where do we stand? *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2013;19:901–21.
 84. Gelfand JM. Multiple sclerosis: Diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. In: *Handbook of Clinical Neurology.* 1st ed. Elsevier B.V.; 2014. p. 269–90.
 85. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69:292–302.
 86. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2017;17.
 87. Lublin FD, Reingold SC. 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.* 1996;46:907–11.
 88. Lublin FD, Reingold SC, Cohen J a, Cutter GR, Thompson AJ, Wolinsky JS, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis : The 2013 revisions Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83:278–86.
 89. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol.* 2014 72:1–5.
 90. Platten M, Lanz T, Bendszus M, Diem R. Klinisch isoliertes Syndrom. *Nervenarzt.* 2013;84:1247–59.
 91. Tremlett H, Zhao Y, Devonshire V. Natural History of secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2008;14:314–24.
 92. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007;6:903–12.
 93. Weissert R. Multiple Sklerose - Risiken und Nutzen der neuen antiinflammatorischen Substanzen. *J für Neurol Neurochir und Psychiatr.* 2015;16:95–101.
 94. Beck RW, Cleary PA, Trobe JD, Kaufman DI, Kupersmith MJ, Paty DW, et al. The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med.* 1993;329:1764–9.
 95. Cocco E, Marrosu MG. Profile of PEGylated interferon beta in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:759–66.
 96. Straus Farber R, Harel A, Lublin F. Novel Agents for Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Med.* 2016;67:309–21.
 97. Lycke J. Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes. *Ther Adv Neurol Disord.* 2015;8:274–93.
 98. N'gbo N'gbo Ikazabo R, Mostosi C, Quivron B, Delberghe X, El Hafsi K, Lysandropoulos AP. Immune-reconstitution Inflammatory Syndrome in Multiple Sclerosis Patients Treated With Natalizumab: A Series of 4 Cases. *Clin Ther.* 2016;38:670–5.
 99. Sorensen PS, Sellebjerg F. Pulsed immune reconstitution therapy in multiple

- sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2019;12:1–16.
100. Pastuszek Ż, Stępień A, Tomczykiewicz K, Piusińska-Macoch R D-KM. Mitoxantrone role in treatment of primary progressive multiple sclerosis. *Pol Med J*. 2016;40:66–9.
 101. FDA. FDA approves Zinbryta to treat multiple sclerosis. 2016. p. 11–3.
 102. Voge N, Alvarez E. Monoclonal Antibodies in Multiple Sclerosis: Present and Future. *Biomedicines*. 2019;7:20.
 103. Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou M-E, De Courten M, Matsoukas J, et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci*. 2017;7:E78.
 104. Al-Salama ZT. Siponimod: First Global Approval. *Drugs*. 2019;79:1009–15.
 105. Clemente-Casares X, Blanco J, Ambalavanan P, Yamanouchi J, Singha S, Fandos C, et al. Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. *Nature*. 2016;530:434–40.
 106. Singha S, Shao K, Yang Y, Clemente-Casares X, Solé P, Clemente A, et al. Peptide-MHC-based nanomedicines for autoimmunity function as T-cell receptor microclustering devices. *Nat Nanotechnol*. 2017;12:701–10.
 107. Zujovic V, Doucerain C, Hidalgo A, Bachelin C, Lachapelle F, Weissert R, et al. Exogenous schwann cells migrate, remyelinate and promote clinical recovery in experimental auto-immune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2012;7:e42667.
 108. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, et al. Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 2000;157:267–76.
 109. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol*. 2016;1304:53–61.
 110. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983;65:109–21.
 111. Navarrete MA. ELISpot and DC-ELISpot Assay to Measure Frequency of Antigen-Specific IFN γ -Secreting Cells. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:79–86.
 112. Waisman A, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol*. 2015;129:625–37.
 113. Hellings N, Bare M, Verhoeven C, D'Hooghe MB, Medaer R, Bernard CCA, et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res*. 2001;63:290–302.
 114. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med*. 2015;7.
 115. T C, Dong C, Martinez GJ. T cells : the usual subsets. *Nat Rev Immunol*. 2010;7:7030–77030.
 116. Chen J, Yang J, Qiao Y, Li X. Understanding the regulatory roles of natural killer T cells in rheumatoid arthritis: T helper cell differentiation dependent or independent? *Scand J Immunol*. 2016;84:197–203.
 117. Wu M, Yang J, Li X, Chen J. The Role of $\gamma\delta$ T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res*. 2016;2016:1–8.
 118. Roozbeh M, Mohammadpour H, Azizi G, Ghobadzadeh S MA. The potential role of iNKT cells in experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014;36:105–13.
 119. Paul S, Lal G. Regulatory and effector functions of gamma-delta T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *Int J Cancer*. 2016;139:976–85.

Verzeichnisse

120. Pandiyana P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3⁺ regulatory T cells. *Cytokine*. 2015;76:13–24.
121. Ting Feng, Anthony T. Cao, Casey T. Weaver, Charles O. Elson and YC. IL-12 Converts Foxp3⁺ Regulatory T Cells to Foxp3⁺ IFN- γ ⁺ T Cells with Inhibitory Functions During Induction of Colitis. *Gastroenterology*. 2011;140:2031–43.
122. Daniel V, Trojan K, Adamek M, Opelz G. IFN γ ⁺ Treg in-vivo and in-vitro represent both activated nTreg and peripherally induced aTreg and remain phenotypically stable in-vitro after removal of the stimulus. *BMC Immunol*. 2015;16:2–13.
123. Daniel V, Wang H, Sadeghi M OG. Interferon-gamma producing regulatory T cells as a diagnostic and therapeutic tool in organ transplantation. *Int Rev Immunol*. 2014;33:195–211.
124. Mrad MF, El Ayoubi NK, Esmerian MO, Kazan JM, Khoury SJ. Effect of vitamin D replacement on immunological biomarkers in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2017;181:9–15.
125. Restorick SM, Durant L, Kalra S, Hassan-Smith G, Rathbone E, Douglas MR, et al. CCR6⁺ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells. *Brain Behav Immun*. 2017;64:71–9.
126. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994;76:287–99.
127. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):5–9.
128. Vanderlugt CL, Neville KL, Nikcevich KM, Eagar TN, Bluestone J a, Miller SD. Pathologic Role and Temporal Appearance of Newly Emerging Autoepitopes in Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000;164:670–8.
129. Greer JM1, Csurhes PA, Cameron KD, McCombe PA, Good MF PM. Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120:1447–60.
130. CM Pelfrey, LR Tranquill AV and HM. T cell response to two immunodominant proteolipid protein (PLP) peptides in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Mult Scler J*. 1996;1:270–8.
131. Weissert R, Kuhle J, de Graaf KL, Wienhold W, Herrmann MM, Muller C, et al. High Immunogenicity of Intracellular Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Epitopes. *J Immunol*. 2002;169:548–56.
132. Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4⁺ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2004;172:3893–904.
133. Zhang BJ, Markovic-plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hailer D a. Increased Frequency of Interleukin 2-responsive T Cells Specific for Myelin Basic Protein and Proteolipid Protein in Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Med*. 1994;179:973–84.
134. Fabriek BO, Zwemmer JNP, Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH, Laman JD, et al. In vivo detection of myelin proteins in cervical lymph nodes of MS patients using ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology. *J Neuroimmunol*. 2005;161:190–4.
135. Druz D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C, et al. Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity*. 2017;46:120–32.

Verzeichnisse

136. Pender MP, Csurhes P a, Greer JM, Mowat PD, Henderson RD, Cameron KD, et al. Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *J Immunol.* 2000;165:5322–31.
137. Drabek K, Van De Peppel J, Eijken M, Van Leeuwen JPTM. GPM6B regulates osteoblast function and induction of mineralization by controlling cytoskeleton and matrix vesicle release. *J Bone Miner Res.* 2011;26:2045–51.
138. Werner H, Dimou L, Klugmann M, Pfeiffer S, Nave K a. Multiple splice isoforms of proteolipid M6B in neurons and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 2001;18:593–605.
139. Yan Y, Narayanan V, Lagenaur C. Expression of members of the proteolipid protein gene family in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 1996;370:465–78.
140. Morgan JR, Prasad K, Jin S, Augustine GJ, Lafer EM. Eps15 homology domain-NPF motif interactions regulate clathrin coat assembly during synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem.* 2003;278:33583–92.
141. Wong WT1, Kraus MH, Carlomagno F, Zelano A, Druck T, Croce CM, Huebner K DFP. The human eps15 gene, encoding a tyrosine kinase substrate, is conserved in evolution and maps to 1p31-p32. *Oncogene.* 1994;9:1591–7.
142. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999;5:101–4.
143. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:iii87-90.
144. Fina D, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Caruso R, Caprioli F, et al. Regulation of Gut Inflammation and Th17 Cell Response by Interleukin-21. *Gastroenterology.* 2008;134:1038–48.
145. Hsieh C-S, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol.* 2006;7:401–10.
146. Min B, Paul WE. Endogenous proliferation: Burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Semin Immunol.* 2005;17:201–7.
147. Duszczyszyn DA, Williams JL, Mason H, Lapierre Y, Antel J, Haegert DG. Thymic involution and proliferative T-cell responses in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;221:73–80.
148. Mohme M, Hotz C, Stevanovic S, Binder T, Lee JH, Okoniewski M, et al. HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. *Brain.* 2013;136:1783–98.
149. Ercolini AM, Ludovic Croxford J, Degutes M, Miller SD. Cross-reactivity between peptide mimics of the immunodominant myelin proteolipid protein epitope PLP139-151: Comparison of peptide priming in CFA vs. viral delivery. *J Neuroimmunol.* 2007;186:5–18.
150. Herrmann MM, Barth S, Greve B, Schumann KM. Identification of gene expression patterns crucially involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Dis Model Mech.* 2016;9:1211–20.
151. de Graaf KL, Albert M, Weissert R. Autoantigen conformation influences both B- and T-cell responses and encephalitogenicity. *J Biol Chem.* 2012;287:17206–13.
152. Zavala-Cerna MG, Martínez-García EA, Torres-Bugarín O, Rubio-Jurado B, Riebeling C, Nava A. The clinical significance of posttranslational modification of autoantigens. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;47:73–90.

Verzeichnisse

153. Bradford CM, Ramos I, Cross AK, Haddock G, McQuaid S, Nicholas AP, et al. Localisation of citrullinated proteins in normal appearing white matter and lesions in the central nervous system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2014;273:85–95.
154. Greer JM, Denis B, Sobel R a, Trifilieff E. Thiopalmitoylation of myelin proteolipid protein epitopes enhances immunogenicity and encephalitogenicity. *J Immunol.* 2001;166:6907–13.
155. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Page P. Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA.* 2006;296:2832–8.
156. Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, Heikkila A, Viljanen M, Hanninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *MultScler.* 2005;11:266–71.
157. Soilu-Hänninen M, Laaksonen M, Laitinen I, Eralinna J-P, Lilius E-M, Mononen I. A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79:152–7.
158. Embry a F, Snowdon LR, Vieth R. Vitamin D and seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2000;48:271–2.
159. Royal W, Mia Y, Li H, Naunton K. Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;213:135–41.
160. Prietl B, Treiber G, Mader JK, Hoeller E, Wolf M, Pilz S, et al. High-dose cholecalciferol supplementation significantly increases peripheral CD4+ Tregs in healthy adults without negatively affecting the frequency of other immune cells. *Eur J Nutr.* 2014;53:751–9.
161. Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubberts E. Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2017;7.
162. Cantorna MT, Snyder L, Lin Y-D, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH) 2 D Regulation of T cells. *Nutrients.* 2015;7:3011–21.
163. Hayes CE, Hubler SL, Moore JR, Barta LE, Praska CE, Nashold FE. Vitamin D Actions on CD4(+) T Cells in Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2015;6:1–22.
164. McCann JC, Ames BN. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction? *FASEB J.* 2008;22:982–1001.
165. Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW. Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013;324:10–6.
166. Kokic V, Martinovic Kaliterna D, Radic M, Perkovic D, Cvek M, Capkun V. Relationship between vitamin D, IFN- , and E2 levels in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2015;25:282–8.
167. Phan TX, Jaruga B, Pingle SC, Bandyopadhyay BC, Ahern GP. Intrinsic Photosensitivity Enhances Motility of T Lymphocytes. *Sci Rep.* 2016;6:39479.
168. Huynh JL, Casaccia P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: Implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol.* 2013;12:195–206.
169. Kiessling WR, Pflughaupt KW, Haubitz MH. Thyroid function in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1980;62:255–8.
170. Zych-twardowska E, Wajgt A. Blood levels of selected hormones in patients with multiple sclerosis. *Med Sci Monit.* 2001;7:1005–12.
171. Caraccio N, Dardano A, Manfredonia F, Manca L, Pasquali L, Iudice A, et al.

- Long-term follow-up of 106 multiple sclerosis patients undergoing interferon-beta 1a or 1b therapy: Predictive factors of thyroid disease development and duration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4133–7.
172. Durelli L, Oggero A, Verdun E, Isoardo GL, Barbero P, Bergamasco B, et al. Thyroid function and anti-thyroid antibodies in MS patients screened for interferon treatment. A multicenter study. *J Neurol Sci.* 2001;193:17–22.
 173. Weng Y, Lin H, Ye X, Xie D, Chen Z, Zheng J, Su Z, Xie H, Zhang X LX. Thyroid hormone level is associated with the frequency and severity of acute transverse myelitis. *Neuroreport.* 2017;28:292–7.
 174. Huang 1, Ying Z, Chen 1, Xiang W, Su Z, Quan W, Weng Y ZX. Thyroid hormone level is associated with the frequency and severity of Guillain–Barré syndrome. *Int J Neurosci.* 2017;127:893–9.
 175. Rajda C, Pukoli D, Bende Z, Majláth Z, Vécsei L. Excitotoxins, Mitochondrial and Redox Disturbances in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18:E353.
 176. Adamczyk B, Adamczyk-Sowa M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016.
 177. Di Dalmazi G, Hirshberg J, Lyle D, Freij JB, Caturegli P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. *Autoimmun Highlights.* 2016;7:1–11.
 178. Zhang M, Ma Z, Qin H, Yao Z. Thyroid Hormone Potentially Benefits Multiple Sclerosis via Facilitating Remyelination. *Mol Neurobiol.* 2016;53:4406–16.
 179. Calza L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *PNAS.* 2002;99:3258–63.
 180. Lavrnja I, Lavrnja I, Smiljanic K, Savic D, Mladenovic-Djordjevic A, Tesovic K, et al. Expression profiles of cholesterol metabolism-related genes are altered during development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat spinal cord. *Sci Rep.* 2017;7:1–14.
 181. van de Kraats C, Killestein J, Popescu V, Rijkers E, Vrenken H, Lutjohann D, et al. Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2014;20:412–7.
 182. Swamy M, Beck-Garcia K, Beck-Garcia E, Hartl FA, Morath A, Yousefi OS, et al. A Cholesterol-Based Allosteric Model of T Cell Receptor Phosphorylation. *Immunity.* 2016;44:1091–101.
 183. Surls J, Nazarov-Stoica C, Kehl M, Olsen C, Casares S, Brumeanu TD. Increased membrane cholesterol in lymphocytes diverts T-cells toward an inflammatory response. *PLoS One.* 2012;7:e38733.
 184. Molnár E, Swamy M, Holzer M, Beck-García K, Worch R, Thiele C, et al. Cholesterol and sphingomyelin drive ligand-independent T-cell antigen receptor nanoclustering. *J Biol Chem.* 2012;287:42664–74.
 185. Beck-García K, Beck-García E, Bohler S, Zorzín C, Sezgin E, Levental I, et al. Nanoclusters of the resting T cell antigen receptor (TCR) localize to non-raft domains. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853:802–9.
 186. Schamel WWA, Alarcon B, Höfer T, Minguet S. The Allosteric Model of TCR Regulation. *J Immunol.* 2017;198:47–52.
 187. Jurewicz A, Domowicz M, Galazka G, Raine CS, Selmaj K. Multiple sclerosis: Presence of serum antibodies to lipids and predominance of cholesterol recognition. *J Neurosci Res.* 2017;95:1984–92.

10 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. Robert Weißert für die Vergabe der Doktorarbeit sowie die engagierte Betreuung. Er war stets am Fortschritt meines Projektes interessiert und an allen Wochentagen unabhängig von der Tageszeit für mich erreichbar. Zahlreiche Fachdiskussionen und seine Korrektur trugen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei. Sein mir entgegengebrachtes Vertrauen ermöglichte es mir, dass ich von Beginn an sehr selbstständig im Labor arbeiten und den Kurs meiner experimentellen Arbeit aktiv mitlenken konnte.

Bei Frau PD Dr. med. Simone Thomas bedanke ich mich dafür, dass ich den ELISpot-Reader zur Auswertung meiner Versuche nutzen durfte.

Frau Tanja Weinfurter danke ich für die laborchemische Bestimmung der Serumparameter.

Für die methodische Einarbeitung in die PBMC-Isolierung sowie das ELISpot-Verfahren danke ich Frau Dagmar Halbritter. Im Rahmen dieser Arbeit wurden teilweise auch von ihr aufgereinigte Zellen verwendet.

Ebenso danke ich Frau Dr. Christine Riedhammer für die Etablierung der umfangreichen Zelldatenbank der AG. Hieraus wurden für die vorliegende Arbeit einige Proben entnommen.

Des Weiteren danke ich Frau Franziska Bartschmid für unsere konstruktiven Treffen, an denen wir die Ergebnisse unserer eng verknüpften Arbeiten diskutierten. Dies erleichterte mir den Blick über den Tellerrand meiner eigenen Daten hinaus und verhalf mir zu neuen Denkansätzen.

Meinen lieben Eltern, die immer ein offenes Ohr für mich haben, danke ich nicht nur für die Unterstützung während der vergangenen Jahre. Ihr habt immer an mich geglaubt und mir Mut zugesprochen. Dank Euch hatte ich die Möglichkeit, mein Traumfach zu studieren und diese Arbeit zu absolvieren.

Ein herzlicher Dank gilt zudem meinem langjährigen Partner. Lieber Michael, Du hast mich während meines gesamten Studiums und auch während dieser Arbeit unterstützt, wo Du nur konntest. In den vielen schweren Phasen hast Du zu mir gehalten und mich ermutigt, immer weiterzugehen. Ich kann nicht in Worte ausdrücken, wie dankbar ich Dir dafür bin. Auch durch unsere fachlichen Diskussionen und Deine gewissenhafte Korrektur hast Du wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

11 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Luise Schulze