

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. K. V. Toyka

**Modulation systemischer Chemokinspiegel
durch rekombinantes Interferon- β
bei Patienten mit multipler Sklerose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Cornelia Merzyn

aus Göttingen

Würzburg, April 2008

Referent: Prof. Dr. P. Rieckmann

Koreferent: Prof. Dr. H. Steffen

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2009

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chemokinsystem	1
1.1.1	Liganden und Rezeptoren	1
1.1.2	Physiologische Funktionen	2
1.2	Multiple Sklerose und ihr Tiermodell	4
1.2.1	Pathogenese der multiplen Sklerose	4
1.2.2	Chemokine in der Pathogenese der multiplen Sklerose und im Tiermodell	5
1.2.2.1	CXCL10	6
1.2.2.2	CCL2	7
1.2.2.3	CCL3	8
1.2.2.4	CCL4	9
1.2.2.5	CCL5	9
1.3	Therapie der multiplen Sklerose mit rekombinantem Interferon- β	10
1.3.1	Indikation, Zulassung und Präparate	10
1.3.2	Physiologische Funktionen von Interferon- β	11
1.3.3	Wirkmechanismen von rekombinantem Interferon- β bei MS	13
1.3.4	Einfluss von Interferon- β auf die Chemokinexpression	14
2	Fragestellung	16
3	Studienprotokoll und Teilnehmer	177
3.1	Studienteilnehmer	177
3.2	Probengewinnung	20
3.3	Erfassung grippeartiger Nebenwirkungen	20
3.4	Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Plasma	21
3.5	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse	27
4.1	CXCL10-Induktion durch rekombinantes Interferon- β	27
4.2	CCL2-Induktion durch rekombinantes Interferon- β	28
4.3	IL-6-Induktion durch rekombinantes Interferon- β	33
4.4	Grippeähnliche Nebenwirkungen und Körpertemperatur	35
4.5	Korrelation zwischen grippeähnlichen Symptomen und Zytokin-Konzentrationen	38

5	Diskussion.....	39
6	Zusammenfassung	45
7	Literatur	46
8	Anhänge	60

1 Einleitung

1.1 Chemokinsystem

1.1.1 Liganden und Rezeptoren

Chemokine sind eine Familie kleiner, chemotaktisch wirksamer Zytokine mit einem Molekulargewicht von in der Regel 8-12 kDa. Beim Menschen sind mittlerweile über 40 Chemokine bekannt. Die meisten Vertreter dieser Familie enthalten in Nähe des N-Terminus ein konserviertes Aminosäuremotiv mit vier Cysteinresten, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Die systematische Nomenklatur der Chemokine richtet sich nach dem Abstand zwischen den beiden N-terminalen Cysteinresten und erlaubt eine Einteilung in vier Gruppen: Liegt eine Aminosäure zwischen den beiden Cysteinresten, spricht man von CXC-Chemokinen (auch α -Chemokine), sind die beiden Cysteine unmittelbar benachbart, von CC-Chemokinen (β -Chemokine). Beim Fehlen des ersten Cysteins verwendet man die Bezeichnung XC-Chemokine (γ -Chemokine). Der bislang einzige bekannte Vertreter mit drei Aminosäureresten zwischen den beiden Cysteinen wird als CX3C-Chemokin (δ -Chemokin) benannt. Der Gruppenbezeichnung wird eine Nummer angefügt (s. Tab. 1.1).¹

Unterfamilie	Systematischer Name	Ursprüngliche Bezeichnungen	Rezeptoren
CXC (α)	CXCL10	IP-10	CXCR3
CC (β)	CCL2	MCP-1	CCR2
	CCL3	MIP-1 α , LD78	CCR1,3,5
	CCL4	MIP-1 β , Act-2	CCR1,5
	CCL5	RANTES	CCR5,3,1

Tabelle 1.1 Humane Chemokine (Auswahl)

Chemokine vermitteln ihre Wirkung auf Zielzellen durch G-Proteingekoppelte Oberflächenrezeptoren, die je nach Rezeptor unterschiedlich selektiv durch verschiedene Immunzell-Subpopulationen exprimiert werden. Die Rezeptorexpression ist zudem in vielen Fällen einer zeitlichen Regulation, z.B. im Zellzyklus oder durch externe Stimuli, unterworfen. Die meisten Chemokine können nur an einen Rezeptor binden, einige aber auch an mehrere verschiedene Rezeptoren. Insgesamt handelt es sich um ein hochkomplexes, teilweise spezifisches, teilweise redundantes Signalübertragungssystem.^{1,2} Die systematische Nomenklatur der Rezeptoren richtet sich nach der Gruppe des Hauptliganden (z.B. CXC, CC), der ein *R* für Rezeptor und eine Nummer angefügt wird (s. Tab. 1.1).

1.1.2 Physiologische Funktionen

Eine Hauptaufgabe der Chemokine liegt in der Steuerung der Leukozyten-Extravasation z.B. im Rahmen entzündlicher Prozesse: Zunächst wird durch Selektine auf Endothelseite und korrespondierende Glykoproteinrezeptoren auf der Immunzell-Oberfläche ein erster, relativ lockerer Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel hergestellt („*Tethering*“), dem ein Rollen („*Rolling*“) des Leukozyten auf dem Endothel folgt.³ Chemokine (z.B. CCL21, CXCL12, CXCL8, CXXXCL1) aktivieren dann leukozytäre Integrine, die eine feste Adhäsion vermitteln (s. Abb. 1.1).³ Auch die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel ist abhängig von Chemokinen, einerseits durch chemotaktisch wirksame Konzentrationsgradienten (z.B. CXCL8, CCL2),^{4,5} andererseits durch die Induktion erhöhter Avidität subendothelial gelegener Integrine (z.B. durch CCL5, CCL3, CCL2).⁶ Durch die Spezifität der Rezeptorexpression wird die Zusammensetzung eines Zellinfiltrats bestimmt. α -Chemokine locken vor allem neutrophile Granulozyten an, während Monozyten, Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen (DCs) sowie eosinophile und basophile Granulozyten primär auf β -Chemokine reagieren. Von dieser Grundregel gibt es allerdings zahlreiche Ausnahmen.²

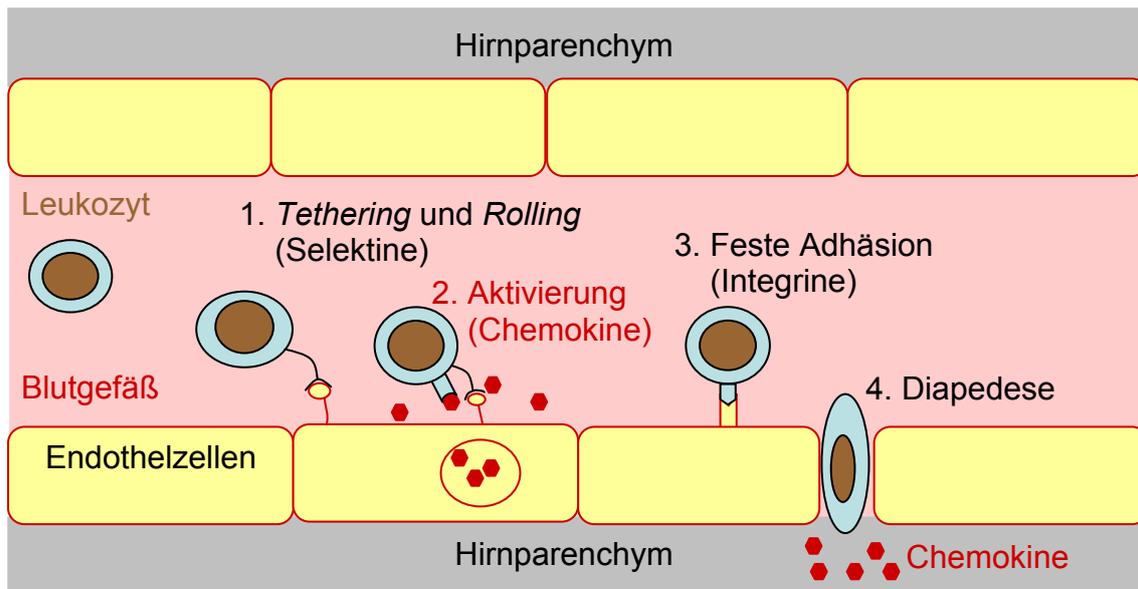


Abb. 1.1: Regulation der Leukozyten-Extravasation

Eine besondere Bedeutung kommt Chemokinen auch im Anschluss an die Extravasation bei der Bewegung von Leukozyten im Gewebe zu. So sind z.B. CXCL13 und sein Rezeptor CXCR5 erforderlich für die Wanderung von B-Lymphozyten an ihre Bestimmungsorte.^{7,8} Auch die Migration von DCs in entzündetes Gewebe bzw. sekundäre Lymphorgane,^{9,10} die gezielte Wanderung von NK-Zellen zur Abwehr von Viren¹¹ und Tumorzellen^{12,13} sowie das Anlocken aktivierter T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen (APZ)¹⁴ sind von Chemokingradienten abhängig.

Versuche mit Chemokin-Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass bestimmte Chemokine für spezielle immunologische Reaktionen erforderlich sind: CCL3-defiziente Tiere zeigen keine Entzündungsreaktion auf eine Coxsackie-Virus-Infektion und eine verlangsamte Viruselimination aus der Lunge bei Influenza.¹⁵ Bei CCL2-Knock-out-Mäusen verläuft die Thioglykolat-induzierte Peritonitis abgeschwächt, und die inflammatorische Reaktion auf Eier von *Schistosoma mansoni* ist deutlich reduziert.¹⁶

Chemokinen wird außerdem eine Rolle bei Hämatopoese, Angiogenese, Ausreifung von dendritischen, B- und T-Zellen, Aktivierung und Regulation von T-Lymphozyten und NK-Zellen sowie beim Tumorwachstum zugeschrieben.^{1,3} Das HI-Virus benötigt Chemokinrezeptoren als Ko-Rezeptoren, um die Lymphozyten zu befallen.^{1,3,17}

1.2 Multiple Sklerose und ihr Tiermodell

1.2.1 Pathogenese der multiplen Sklerose

Die multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die sich meist im Alter zwischen 20 und 40 Jahren klinisch erstmanifestiert.¹⁸ Charakteristisch ist die Entstehung entzündlicher Läsionen im ZNS, die nicht selten schon früh von einem axonalen Verlust begleitet sind und ein breites Spektrum neurologischer Symptome verursachen können. Im Anschluss an Entzündungsschübe kommt es zu Remyelinisierungs-, aber auch zu Sklerosierungsvorgängen. Klinisch entspricht diesem pathophysiologischen Vorgang in der Regel ein schubförmiger Verlauf mit kompletter oder partieller Remission der Symptome.¹⁸ In späteren Erkrankungsstadien kommt es häufig zu einer sekundären chronischen Progression, in etwa 10% der Fälle verläuft die Erkrankung primär chronisch-progredient. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher ungeklärt. Ein komplexes, bisher unvollständig verstandenes Zusammenspiel genetischer und exogener Faktoren beeinflusst Erkrankungswahrscheinlichkeit und -verlauf.^{18,19}

Ein früher Schritt in der Entstehung entzündlicher ZNS-Läsionen ist das Eindringen aktivierter, v.a. CD₄-positiver autoreaktiver T-Lymphozyten in das ZNS.¹⁹ Für die Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Erkennung eines prozessierten Antigens auf dem HLA II (*Human Leukocyte Antigen Class II*)-Molekül einer APZ durch den T-Zell-Rezeptor erforderlich, zusätzlich ein kostimulatorisches Signal durch die Interaktion der Oberflächenmoleküle B7/CD28 oder CD40/CD40L. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, wird die T-Zelle anerg.²⁰

Nach einem gängigen theoretischen Konzept können aktivierte T-Zellen unter anderem zu zwei verschiedenen Arten von T-Helferzellen, Th1- und Th2-Zellen, ausdifferenzieren. Th1-Lymphozyten sezernieren vorwiegend proinflammatorische Zytokine, u.a. Interleukin (IL)-2, IL-12, Interferon (IFN)- γ und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , die eine Makrophagen-Aktivierung bewirken und damit zur Zerstörung der Myelinscheide und der Axone führen können. Th2-Zellen hingegen fördern die Produktion von Antikörpern, sezernieren antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-4, IL-5 und IL-10) und

hemmen die entzündliche Wirkung der Th1-Lymphozyten.²⁰ Man vermutet deshalb, dass bei der MS ein Übergewicht der Th1-Antwort besteht²¹ – eine Hypothese, die unter anderem durch das Expressionsmuster von T-Zell-Oberflächenmolekülen bei MS-Patienten gestützt wird.^{22,23} Auf der anderen Seite mehren sich aber Hinweise, dass dieses Konzept zu einfach ist und z.B. proinflammatorische Zytokine bei der MS im Verlauf auch eine protektive Wirkung entfalten können.²⁴

Wenn aktivierte T-Lymphozyten ein präsentiertes Antigen erkennen und effektive Kostimulation erfolgt, persistieren sie im ZNS und produzieren proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-2 und IFN- γ . Dies führt zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke sowie Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen. Die Blut-Hirn-Schranke wird normalerweise aufrechterhalten durch spezielle Interzellularkontakte der zerebralen Endothelzellen, die sogenannten *Zonulae occludentes* oder *Tight junctions*. Durch die Störung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion können neben Zellen auch weitere entzündliche Serumkomponenten, wie z.B. zytotoxische Zytokine und Antikörper, in das ZNS eindringen. Die Entzündung schädigt zunächst vor allem die Markscheiden und z.T. auch direkt die Oligodendrozyten. Als Folge der Demyelinisierung kommt es zur chronischen Axonopathie, die bereits in frischen entzündlichen Läsionen nachweisbar ist, dann allerdings vorwiegend in der sekundär progredienten Phase der Erkrankung bedeutsam ist, in der Entzündungsvorgänge oft nur noch eine untergeordnete Rolle spielen.^{2,17-19,25}

1.2.2 Chemokine in der Pathogenese der multiplen Sklerose und im Tiermodell

Die vielfältigen Funktionen der Chemokine bei immunologischen Vorgängen legen nahe, dass sie auch eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen im Rahmen der MS-Pathogenese spielen. Mehrere Studien haben Chemokinkonzentrationen und die Expression der entsprechenden Rezeptoren in Blut, Liquor und Gehirngewebe von MS-Patienten untersucht. Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich mit der Bedeutung von Chemokinen im Tiermodell der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Die Ergebnisse dieser Studien weisen auf eine pathogenetische Bedeutung besonders von CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5 hin.

1.2.2.1 CXCL10

Dieses α -Chemokin mit der ursprünglichen Bezeichnung IP-10 (*Interferon- γ -inducible Protein of 10 kDa*) hat eine starke chemotaktische Wirkung auf aktivierte T-Zellen und in geringerem Maße auf Monozyten, die CXCR3, den entsprechenden Rezeptor, exprimieren.^{26,27} Es fördert die Adhäsion aktivierter T-Zellen an Endothelzellen, indem es die Affinität von T-Zell-Integrinen zu den endothelialen Adhäsionsmolekülen steigert. So trägt es wesentlich zur Steuerung der T-Zell-Extravasation bei.^{27,28} Dieser Effekt ist u.a. für die Tumorabwehr bedeutsam.²⁹ CXCL10 hat daneben weitere Effekte, wie z.B. die Hemmung der Angiogenese.³⁰⁻³² Seine Expression lässt sich durch IFN- γ und Lipopolysaccharide in verschiedenen Zelltypen induzieren; es wird jedoch in Milz, Leber, Thymus, Lymphknoten und Niere auch konstitutiv exprimiert.³²

Bei an EAE erkrankten Mäusen wird CXCL10 von perivaskulären Astrozyten exprimiert. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen der Expression von CXCL10 und der Krankheitsaktivität.¹⁷ Auch die Tatsache, dass im Tiermodell eine protektive Wirkung neutralisierender Antikörper gegen CXCL10 zu beobachten ist, legt eine Bedeutung des Chemokins für die Pathogenese der MS nahe.³³

CXCL10 wurde in Autopsiegewebe von MS-Patienten, analog zum EAE-Modell, in perivaskulären Astrozyten nachgewiesen.³⁴ Auffällig ist außerdem eine perivaskuläre Anhäufung CXCR3-positiver T-Lymphozyten in Gewebe aus MS-Läsionen. Eine derartige Anhäufung fand sich nie bei Patienten ohne neurologische Erkrankung und auch nur gelegentlich bei anderen Entzündungen des ZNS.^{17,35} Dagegen ist ein relativ erhöhter Anteil CXCR3-positiver T-Lymphozyten im Liquor verglichen zum Blut nicht spezifisch für MS, was darauf hinweist, dass diese Zellen generell in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, jedoch nur unter inflammatorischen Bedingungen im ZNS verbleiben.^{2,36} Die Konzentration von CXCL10 im Liquor ist bei MS-Patienten im akuten Schub stark erhöht^{22,37} und korreliert mit der Zellzahl im Liquor.³⁵

1.2.2.2 CCL2

CCL2 trug ursprünglich den Namen MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*). Eine chemotaktische Wirkung übt CCL2 neben Monozyten auch auf T-Lymphozyten und NK-Zellen aus.^{5,16,38-42} *In vitro* wurde zudem eine Aktivierung von Monozyten durch CCL2 beobachtet.⁴³ Dass dieser Effekt *in vivo* eine Rolle spielt, ließ sich tierexperimentell jedoch nicht bestätigen.⁴⁴ CCL2 regt auch die Degranulation von basophilen Granulozyten und NK-Zellen an.^{42,45} CCL2 wird von Monozyten, Fibroblasten und zahlreichen anderen Zelltypen induzierbar und teilweise konstitutiv sezerniert und wirkt hauptsächlich über den Rezeptor CCR2.⁴⁶ Dieser Rezeptor wird neben Monozyten schwächer auch von T-Lymphozyten, NK-Zellen und basophilen Granulozyten exprimiert.^{12,47-51} CCL2 beeinflusst die Gewebsinfiltration durch Monozyten und T-Lymphozyten im Rahmen verschiedener Erkrankungen, bei denen Entzündungsvorgänge eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. der Atherosklerose und der rheumatoiden Arthritis.^{38,52,53}

Bei der EAE korreliert die Transkription von CCL2 im ZNS durch Astrozyten mit dem Auftreten und dem Schweregrad von Schüben; sie ist im akuten Schub stark erhöht. Unklar ist, ob dies nur für Rezidive, oder auch für den akuten Beginn der Erkrankung gilt.^{54,55} Die CCL2-Produktion ist allerdings an das Vorhandensein eines entzündlichen Infiltrats gebunden, scheint also den Entzündungsprozess eher zu amplifizieren als zu initiieren.⁵⁵ Bei CCL2-defizienten Mäusen verläuft die EAE stark verzögert und abgemildert. CCL2-defiziente T-Lymphozyten lösen in Wildtyp-Mäusen jedoch eine normal schwere EAE aus, während umgekehrt auch mit aus Wildtyp-Mäusen stammenden T-Lymphozyten nur eine stark abgeschwächte Form der Erkrankung in den Knock-out-Mäusen verursacht werden kann.⁵⁶ Ganz ähnliche Beobachtungen wurden bei CCR2-defizienten Tieren gemacht.⁵⁷ Ebenso schützen anti-CCL2-Antikörper vor der Erkrankung.^{58,59}

Bei der MS ist die Bedeutung dieses Chemokins weniger eindeutig: CCL2 wird von Astrozyten in MS-Läsionen exprimiert.^{60,61} CCR2 findet man auf infiltrierenden Lymphozyten sowie Makrophagen und Mikroglia in den Herden.⁶² Andererseits ist bei MS-Patienten in aktiven Phasen der Erkrankung die Konzentration von CCL2 im Liquor signifikant *niedriger* als bei gesunden

Kontrollen oder stabilen Patienten.^{1,17,37,59,63} Möglicherweise trägt CCL2, das zu den Th2-Chemokinen gezählt wird,³⁷ dazu bei, ein Th1-Übergewicht zu reduzieren.²² Gerade aber auch im Hinblick auf den ambivalenten Einfluss der Entzündungsvorgänge auf den Krankheitsverlauf – z.B. tragen die Hauptzielzellen von CCL2, die Makrophagen, durch Entfernung von Myelinüberresten und Sekretion von TNF- α auch zur Remyelinisierung bei – bleibt die genaue Rolle dieses Chemokins bei der MS noch zu klären.²⁴

1.2.2.3 CCL3

CCL3 wird auch MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein 1 α*) genannt. Es bindet an die Chemokinrezeptoren CCR1, 3 und 5.⁶⁴ Es wirkt chemotaktisch unter anderem auf T-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen.^{40,42,65} Darüber hinaus kann es z.B. bei T-Lymphozyten die Sekretion von IFN- γ fördern und bei Monozyten die Freisetzung von N-acetyl- β -D-Glucosaminidase.^{40,41} NK-Zellen werden durch CCL3 aktiviert, was sich in einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration und Degranulation äußert.⁴² CCL3 wird nach Stimulation von zahlreichen Zelltypen sezerniert, u.a. von T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie Astrozyten und Mikroglia.⁶⁶⁻⁷⁰ In Monozyten und Makrophagen findet man eine geringfügige konstitutive Expression, die jedoch durch Stimulation z.B. mit Lipopolysaccharid oder IL-1 sowie bei Interaktion mit dem Endothel deutlich verstärkt, durch IL-10 aber inhibiert wird.⁷¹⁻⁷³ In Mäusen ist CCL3 erforderlich für die inflammatorische Antwort auf Virusinfektionen.¹⁰ Es hemmt außerdem die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen.⁷⁴

Im ZNS an EAE erkrankter Tiere ist die CCL3-Konzentration stark erhöht, es wird von Leukozyten innerhalb der Läsionen exprimiert. Die Gabe von anti-CCL3-Antikörpern kann die Entwicklung der akuten EAE bei Mäusen verhindern.^{1,54,58,59}

CCL3 lässt sich in hoher Konzentration auch in MS-Herden nachweisen, hier wird es vor allem von Astrozyten und Makrophagen exprimiert.⁶¹ Die Konzentration von CCL3 im Liquor ist bei MS-Patienten erhöht, insbesondere in aktiven Phasen der Erkrankung.^{22,75}

Ein wichtiger Rezeptor für CCL3 ist CCR5. Man findet ihn in MS-Läsionen auf Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia.^{2,35} Seine Expression

auf zirkulierenden T-Lymphozyten ist bei MS-Patienten stark erhöht, vor allem im akuten Schub. Dies führt möglicherweise zu einer verstärkten chemotaktischen Wirkung von CCL3 und CCL5 (s.u.), die in MS-Läsionen freigesetzt werden, auf zirkulierende Immunzellen.⁷⁶ Wie bei CXCR3 findet man eine Anreicherung CCR5-positiver Zellen im Liquor verglichen mit dem peripheren Blut.³⁵

1.2.2.4 CCL4

Eng verwandt mit CCL3 ist CCL4, das auch MIP-1 β (*Makrophage Inflammatory Protein 1 β*) heißt. CCL4 ist ebenfalls ein Ligand des Rezeptors CCR5 und vermittelt seine Wirkung ausschließlich durch diesen Rezeptor. Es wird u.a. von aktivierten Monozyten, T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen produziert.^{68-70,77} Auch CCL4 wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten.^{40,69} Es verstärkt außerdem die Adhäsion von T-Lymphozyten an Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1).⁷⁸ Auf Monozyten und NK-Zellen wirkt es ähnlich wie CCL3, auf Monozyten allerdings deutlich schwächer als jenes.^{40,42} In MS-Läsionen wird es vor allem von Makrophagen und Mikroglia exprimiert; zudem lässt es sich in Mikroglia der umgebenden weißen Substanz nachweisen.⁶¹

1.2.2.5 CCL5

Ein weiteres Chemokin, das an CCR5 bindet, ist CCL5. Sein ursprünglicher Name lautet RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*). Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten und T-Lymphozyten;^{40,65} aber auch NK-Zellen, basophile und eosinophile Granulozyten zählen zu seinen Zielzellen. Es ist in der Lage, T-Zellen antigenunabhängig zu aktivieren.⁷⁹ Zudem spielt es eine Rolle bei der Leukozytenreifung und der Entwicklung von Lymphgewebe. Es ist auch für die Kontrolle einer HIV-Infektion bedeutsam, da es um den Rezeptor CCR5 konkurriert, der dem HIV als Korezeptor dient.^{80,81} CCL5 wird von Lymphozyten konstitutiv exprimiert und nach Stimulation zunächst herunterreguliert, bevor nach drei bis vier Tagen eine Induktion beobachtet werden kann.⁶⁶ NK-Zellen exprimieren CCL5 ebenfalls konstitutiv, während man in anderen Zelltypen nur eine induzierbare Expression findet.^{66,70}

CCL5 wird in MS- und EAE-Herden exprimiert, vorwiegend von perivaskulären Astrozyten und T-Lymphozyten.^{61,82,83} Auch die CCL5-Expression korreliert bei der EAE, wie die von CXCL10 und CCL2, mit dem Entzündungsgeschehen.¹⁷ Seine Konzentration im Liquor von MS-Patienten ist signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen.^{22,35} Zur Serumkonzentration bei MS-Patienten gibt es widersprüchliche Ergebnisse.^{22,79}

1.3 Therapie der multiplen Sklerose mit rekombinantem Interferon-β

1.3.1 Indikation, Zulassung und Präparate

Rekombinantes Interferon-β (IFN-β) war einer der ersten Wirkstoffe, die für die prophylaktische Behandlung der schubförmigen MS zugelassen wurden. In mehreren multizentrischen, plazebokontrollierten, doppelblinden Studien wurde nachgewiesen, dass es die Frequenz der Krankheitsschübe um ca. 30 Prozent reduziert, die Krankheitsprogression im Sinne einer bleibenden Behinderung verzögert und die kernspintomographische Krankheitsaktivität als wichtigstem Surrogatmarker dämpft.^{19,84}

Zur Zeit sind drei verschiedene Präparate auf dem Markt erhältlich: Avonex[®], das einmal wöchentlich intramuskulär (i.m.) injiziert wird und 30 µg IFN-β1a als Wirkstoff enthält; Rebif[®], das dreimal wöchentlich subkutan (s.c.) injiziert wird und 22 bzw. 44 µg IFN-β1a enthält; und Betaferon[®], das jeden zweiten Tag s.c. injiziert wird und 250 µg IFN-β1b enthält. IFN-β1a wird in chinesischen Hamsterovar-Zelllinien hergestellt und entspricht durch die Produktion in eukaryotischen Zellen hinsichtlich Aminosäuresequenz und Glykosylierung dem physiologisch im menschlichen Körper produzierten IFN-β. IFN-β1b, das in *Escherichia coli* hergestellt wird, unterscheidet sich durch fehlende Glykosylierung und den Austausch einer Aminosäure. Die biologischen Effekte sind sehr ähnlich, aber IFN-β1b benötigt eine höhere Dosierung. In Deutschland sind Betaferon[®] und Rebif[®] zugelassen zur Behandlung der MS mit Schüben, das heißt nicht nur für rein schubförmige Verläufe, sondern auch für chronisch-progrediente Verläufe mit überlagerten Schüben, während Avonex[®] bislang nur für rein schubförmige Verläufe zugelassen ist. Bei rein chronisch-progredienten Krankheitsverläufen wurde bisher für kein IFN-β-

Präparat die Wirksamkeit überzeugend belegt. Entsprechend besteht für diese Verlaufsform keine Zulassung.

Die Therapie der MS mit rekombinantem IFN- β kann verschiedene unerwünschte Effekte mit sich bringen:

Eine sehr häufige Nebenwirkung der Therapie sind grippeähnliche Symptome wie Kopfschmerzen, Myalgien und allgemeines Krankheitsgefühl, die vor allem zu Beginn der Behandlung auftreten. Bei einigen Patienten kommt es vorübergehend zu einer Verschlechterung vorbestehender neurologischer Symptome, vorwiegend im Rahmen der grippeähnlichen Beschwerden – dies gilt insbesondere für eine Spastik. Die Verschlechterung ist jedoch meist nur an die Injektionszeitpunkte gebunden. Eine Häufung von Schüben nach Beginn der Therapie wurde nicht beobachtet.⁸⁵

Es kann zu Entzündungen an der s.c. Injektionsstelle kommen, die sehr selten zu einer aseptischen Nekrose führen können. Sie werden bei intramuskulärer Injektion praktisch nicht beobachtet. Laborchemische Veränderungen wie Lymphopenie, Neutropenie, Leukopenie und Erhöhung der Lebertransaminasen sind oft zu beobachten, jedoch in der Regel milde und – bei stärkerer Ausprägung – nach Absetzen der Therapie meist reversibel. Auch Störungen der Menstruation treten gehäuft auf.

Depressive Symptome und Suizid sind bei MS-Patienten deutlich häufiger als in der Allgemeinbevölkerung. Die Vermutung, dass Interferon- β eine weitere Zunahme der Depressivität verursache, hat sich jedoch in verschiedenen Studien nicht bestätigt.⁸⁶ Unklar ist, wie sich die Therapie in Schwangerschaft und Stillzeit auswirkt. Es gibt keine Hinweise auf eine teratogene Wirkung des Interferons, aber eine erhöhte Abortrate kann wegen der antiproliferativen Wirkung nicht ausgeschlossen werden, weshalb Schwangeren und Stillenden von der Therapie abgeraten wird.^{87,88}

Andere unerwünschte Wirkungen wurden nur selten beobachtet.^{19,85}

1.3.2 Physiologische Funktionen von Interferon- β

IFN- β gehört zu den Typ I-Interferonen. Physiologischerweise wird es, als Teil der Reaktion auf eine Virusinfektion, vor allem von Fibroblasten, aber auch von

den meisten anderen Zelltypen sezerniert. Es löst eine Reihe antiviraler Abwehrmechanismen aus. Seine Wirkung wird über einen heterodimeren Rezeptor vermittelt, den es mit den anderen Typ-I-Interferonen teilt.⁸⁹ Die auf die Bindung folgende intrazelluläre Signalkaskade führt zur Expression verschiedener Genprodukte mit immunmodulatorischer, antiviraler und antiproliferativer Wirkung.⁹⁰ IFN- β hemmt – abhängig vom Zelltyp auf verschiedene Weisen – die Zellproliferation. Es kann außerdem sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkung entfalten. Wie alle Interferone ist es in der Lage, die HLA I-Expression zu induzieren und damit die Immunantwort durch CD₈-positive T-Zellen zu verstärken. Ein weiterer Effekt ist die Aktivierung natürlicher Killerzellen mit der Folge einer Proliferation und einer vermehrten Perforin-Produktion.⁹⁰

Die Aktivierung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene durch IFN- β beginnt mit der Assoziation der beiden Untereinheiten des Rezeptors, IFNAR1 und IFNAR2 (Interferon-alpha-Rezeptor, Untereinheit 1 und 2), der die Phosphorylierung und Aktivierung zweier an die Rezeptoruntereinheiten gekoppelter Janus-Kinasen, JAK1 und TYK2, folgt.²³ Auch die Erk (Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase)- und die p38-MAP-Kinase-Signalkaskade können durch Typ I-Interferone aktiviert werden.^{91,92} TYK2 phosphoryliert nach seiner Aktivierung einen Tyrosinrest von IFNAR1. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung von sogenannten STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Typ I-Interferone aktivieren vor allem STAT1 und STAT2, aber auch STAT3. Aktiviertes STAT1 und STAT2 bilden Heterodimere, die nukleär transloziert werden. In Assoziation mit einem weiteren Faktor, p48/IRF-9 (*Interferon Regulatory Factor-9*), formen sie ISGF3 (*IFN-Stimulated Gene Factor 3*), einen Transkriptionsfaktoren-Komplex, der an ISRE (*IFN-Stimulated Response Element*)-Promotorelemente bindet. Ebenfalls durch IFN- β induzierbare STAT1-Homodimere können ebenso wie STAT1/2-Heterodimere an GAS (*γ -Activated Site*)-Promotorelemente binden und diese aktivieren. Darüber hinaus können andere IFN- β -stimulierbare Transkriptionsfaktoren, v.a. Mitglieder der IRF-Familie, z.T. an die genannten Promotor-Elemente binden, teilweise mit aktivierender, teilweise mit hemmender Wirkung.^{90,93}

Neben dieser transkriptionellen Aktivierung greifen Typ I-Interferone auf dem Insulin-Rezeptor-Substrat-Weg aber auch auf translationaler Ebene in die Expression IFN- β -regulierter Gene ein.⁹⁴

1.3.3 Wirkmechanismen von rekombinantem Interferon- β bei MS

Eine direkte Wirkung von rekombinantem IFN- β im Hirnparenchym wird nicht angenommen, und es gibt bisher keinen eindeutigen Beleg für einen Übertritt der Substanz ins ZNS.^{21,25} Allerdings kann es auf vielfältige Weise Immunzellen vor ihrem Übertritt ins Hirnparenchym modulieren. So hemmt z.B. IFN- β die T-Zell-Aktivierung und -Expansion. Es verhindert die Hochregulierung von HLA II-Molekülen durch IFN- γ und die Expression und Interaktion kostimulatorischer Moleküle wie B7/CD28 und CD40/CD40L, die für die T-Zell-Aktivierung erforderlich sind.⁹⁵⁻⁹⁷ Auf der anderen Seite bewirkt es auch vermehrte Apoptose der T-Zellen, indem es die Expression antiapoptotischer Moleküle hemmt.⁹⁸ Außerdem stimuliert es *in vitro* die Aktivität unspezifischer Suppressorzellen, die bei MS-Patienten möglicherweise reduziert ist.⁹⁹

Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei MS-Patienten die Balance der Immunantwort gestört ist zugunsten der T1-Helferzellen, die inflammatorische Zytokine sezernieren und dadurch Makrophagen aktivieren. IFN- β induziert *in vitro* und *in vivo* die Sekretion von IL-10, welches die zelluläre Immunantwort hemmt.^{100,101} Gleichzeitig werden IFN- γ und IL-12 herunterreguliert,^{21,101-103} auch die IL-1 β - sowie die TNF- α -Produktion in mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) werden gehemmt.¹⁰⁴ Zudem reduziert es einige der proinflammatorischen Effekte von IFN- γ , möglicherweise, indem es zum Teil um die gleichen Signaltransduktionswege kompetitiert.^{25,105-108} Auf diese Weise könnte IFN- β die Th2-Antwort stärken, wobei es hierzu widersprüchliche Befunde gibt: Beispielsweise wurde eine vorübergehende Zunahme IFN- γ -sezernierender Zellen zu Beginn einer IFN- β -Behandlung gefunden.¹⁰⁹

IFN- β führt zur raschen Schließung einer geöffneten Blut-Hirn-Schranke, was sich unter anderem aus der Abnahme Gadolinium-anreichernder Läsionen im kranialen Kernspintomogramm ableiten lässt.^{84,110} Für den Effekt auf die Blut-Hirn-Schranke sind wahrscheinlich mehrere Mechanismen verantwortlich:

Die Interaktion zwischen aktivierten T-Zellen und Endothel könnte gestört werden, indem membranständiges VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) zu löslichem VCAM (sVCAM) prozessiert wird und dann um die Bindungsstellen der T-Lymphozyten konkurriert, so dass diese nicht mehr an das Endothel adhären können. Dabei hat IFN- β allein *in vitro* keinen Effekt auf die Freisetzung von löslichem VCAM. Es verstärkt aber die durch TNF- α vermehrte Freisetzung von sVCAM aus zerebralen Endothelzellen, die vermutlich einen physiologischen Mechanismus zur Beendigung der Entzündungsreaktion darstellt.¹¹¹ Zudem hemmt IFN- β die Produktion von Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 durch aktivierte T-Zellen und vermindert so möglicherweise deren Migration in das Hirnparenchym.^{112,113}

Auch durch eine Beeinflussung des Chemokinsystems könnte IFN- β einen therapeutischen Effekt entfalten, wobei bisher in erster Linie davon ausgegangen wurde, dass IFN- β die Chemokinexpression in MS-Patienten hemmt.²¹

1.3.4 Einfluss von Interferon- β auf die Chemokinexpression

Verschiedene Studien haben sich mit der Frage beschäftigt, ob und wie IFN- β die Chemokinexpression beeinflusst. PBMC von MS-Patienten im akuten Schub produzieren weniger CCL2 als in stabilen Phasen der Erkrankung.¹¹⁴ Interessanterweise wurde aber auch beschrieben, dass PBMC IFN- β -behandelter Patienten auf Stimulation mit aktivierten T-Lymphozyten hin zu einem geringeren Prozentsatz CCL2 und CXCL8 exprimierten als PBMC unbehandelter Patienten und gesunder Kontrollen.¹¹⁵ Bisher konnte eine Veränderung der CCL2- und CXCL10-Konzentration durch die Behandlung mit IFN- β weder im Serum noch im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden.³⁷ Auch der Serumspiegel von CCL3 unterscheidet sich langfristig nicht von dem unbehandelter Patienten.¹¹⁶ Allerdings wurde beschrieben, dass PBMC mit IFN- β behandelte Patienten *ex vivo* so viel CCL3 wie PBMC gesunder Kontrollen produzieren, während die Expression bei unbehandelten MS-Patienten geringer ist.¹¹⁵

In vitro-Behandlung von Zellen mit IFN- β führt je nach Zelltyp zu unterschiedlichen Ergebnissen: In Mikroglia wurde eine Induktion von CCL2,

CCL3, CCL4 und CCL5 gezeigt, in PBMC eine Induktion von CCL2, CCL3 und CCL4.^{66,117} Bei Monozyten hingegen wurde nur eine vermehrte CCL2-Synthese beobachtet; erst differenzierte Makrophagen reagierten auch mit einer Hochregulierung von CCL3 und CCL4.¹¹⁸ In Osteosarkomzellen ließ sich durch parallele IFN- β - und IL-1 β -Stimulation eine synergistische Induktion von CCL2 und IL-6 beobachten.¹¹⁹ Tebo et al. wiesen eine Induktion von CXCL10 in Makrophagen durch IFN- β nach.¹²⁰ Im Gegensatz dazu beobachteten Comabella et al. bei PBMC gesunder Kontrollen eine Suppression der CCL2- und CXCL10-Expression durch IFN- β .¹¹⁵ In primären humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen und primären humanen Keratinozyten fand sich eine Induktion der CXCL10-Expression durch IFN- β , während sich auf die Expression von CCL2, CCL5 und CXCL8 kein Einfluss zeigte.¹²¹ Widersprüchlich sind die Befunde für CCL5: Iarlori et al. wiesen in MS-Patienten eine reduzierte Expression *in vitro* und *in vivo* durch Behandlung mit IFN- β nach,⁷⁹ und auch andere Arbeitsgruppen berichteten eine reduzierte Serumkonzentration und *in vitro* eine Suppression der CCL5-Produktion in peripheren adhärennten Blutmonozyten von MS-Patienten.^{79,122} In virologischem Kontext wurde hingegen eine Induktion der CCL5-Produktion in Mikroglia durch IFN- β in einem ähnlichen Ausmaß wie durch IL-1 und TNF- α gezeigt; auch CCL3 und CCL4 wurden vermehrt gebildet.¹²³ Transduktion von Makrophagen mit dem IFN- β -Gen führte zu einer vermehrten Synthese von CCL3, CCL4 und CCL5.¹²⁴

Für den Chemokinrezeptor CCR5 wurde eine Reduktion der Transkription und Oberflächenexpression in Makrophagen durch Behandlung mit IFN- β gezeigt.¹²⁴ Auch Zang et al. berichteten eine Hemmung der Transkription in T-Lymphozyten *in vitro* sowie eine verminderte Expression auf den T-Lymphozyten von MS-Patienten, die mit IFN- β behandelt wurden. CCL3 und CCL5 hatten demzufolge eine geringere chemotaktische Wirkung auf diese Zellen.¹²² Wanderinger et al. hingegen beobachteten eine Induktion von CCR5 *in vitro* und *ex vivo*,¹²⁵ während die Arbeitsgruppe um Sørensen nach drei Monaten einer IFN- β -Behandlung keine Veränderung der CCR5-Expression auf PBMC nachweisen konnte.¹²⁶ Demgegenüber wurde die CXCR3-Expression auf T-Lymphozyten und die CCR2-Expression auf Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant reduziert.¹²⁶

2 Fragestellung

Rekombinantes Interferon- β wird derzeit als Basistherapie der ersten Wahl bei multipler Sklerose mit Schüben angesehen, die in mehreren großen, gut kontrollierten Studien zu einer Reduktion der Häufigkeit und Schwere von Exazerbationen, einer Verzögerung der Krankheitsprogression und einer Reduktion der kernspintomographischen Krankheitsaktivität führte.¹²⁷ Zahlreiche mögliche Wirkmechanismen werden diskutiert, unter anderem wurde eine Suppression der Expression bestimmter Pathogenese-relevanter chemotaktisch wirksamer Zytokine, der Chemokine, postuliert. Andererseits deuten zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen darauf hin, dass Interferon- β die Chemokinexpression in Immunzellen des Blutes stimulieren kann. Eine Modulation systemischer Chemokinspiegel unter Therapie mit Interferon- β konnte bislang nicht demonstriert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die kurzfristigen Effekte einer seit mindestens drei Monaten durchgeführten Behandlung mit rekombinatem IFN- β auf die systemischen Spiegel der Chemokine CCL2 und CXCL10 in MS-Patienten zu untersuchen. Da mehrere Chemokine als starke endogene Pyrogene beschrieben sind, sollte zudem untersucht werden, ob eine Modulation systemischer Chemokinspiegel mit dem Auftreten grippeartiger Nebenwirkungen korreliert. Hierzu wurden jeweils zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen von den Studienteilnehmern Fragebögen hinsichtlich subjektiver grippeartiger Nebenwirkungen ausgefüllt, außerdem wurde die Körperkerntemperatur gemessen. Diese Ergebnisse wurden mit den gemessenen Chemokinspiegeln korreliert. Als Kontrollgruppen wurden Gesunde, MS-Patienten ohne Behandlung und MS-Patienten, die mit Glatirameracetat behandelt werden, untersucht.

3 Studienprotokoll und Teilnehmer

3.1 Studienteilnehmer

In die Studie eingeschlossen wurden insgesamt 62 Patienten mit schubförmiger MS entsprechend den Kriterien nach McDonald et al.¹²⁸ sowie 15 gesunde Kontrollpersonen (siehe Tabelle 3.1). Die MS-Patienten befinden sich in regelmäßiger Betreuung der neuroimmunologischen Spezialsprechstunde der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg. Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt und für unbedenklich befunden. Alle Teilnehmer gaben vor der Studienteilnahme nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung über Inhalte und Ziele der Studie ihr schriftliches Einverständnis (siehe Anhang 1).

Die MS-Patienten waren entweder mit einem IFN- β -Präparat, mit Glatirameracetat (Copaxone[®]) oder nicht immunmodulatorisch vorbehandelt. Die Behandlung mit IFN- β erfolgte mit Avonex[®] (IFN- β 1a) einmal wöchentlich i.m., Betaferon[®] (IFN- β 1b) alle zwei Tage s.c. oder Rebif[®] (IFN- β 1a) 22 bzw. 44 μ g dreimal wöchentlich s.c. Eine mindestens dreimonatige Behandlungsdauer vor Studienbeginn war Einschlusskriterium für die IFN-Gruppe.

Für alle Studienteilnehmer galten folgende Ausschlusskriterien:

- Behandlung mit Glukokortikoiden innerhalb von 30 Tagen vor der Studienteilnahme
- Behandlung mit nichtsteroidalen Antipyretika innerhalb von 48 Stunden vor der Studienteilnahme
- Verdacht auf einen Erkrankungsschub 30 Tage vor, während oder 30 Tage nach der Studienteilnahme
- Behandlung mit immunmodulatorischen (außer den in der jeweiligen Gruppe vorgesehenen) oder immunsuppressiven Substanzen (IFN- β , Glatirameracetat, Mitoxantron, Cyclophosphamid) innerhalb von 60 Tagen vor der Studienteilnahme
- klinische Zeichen einer Infektion innerhalb von 48 Stunden vor Studienteilnahme

- Antibiotika-Therapie innerhalb von 7 Tagen vor oder während der Studienteilnahme
- mehr als 10000 Leukozyten/ μ l oder C-reaktives Protein (CRP) > 2,0 mg/dl zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme
- klinische Zeichen einer Allergie 7 Tage vor oder während der Studienteilnahme
- andere chronische Autoimmunerkrankung als MS
- andere chronisch-entzündliche Erkrankungen
- periphere arterielle Verschlusskrankheit
- koronare Herzkrankheit
- Nieren- oder Lebererkrankung
- Diabetes mellitus
- neoplastische Erkrankung
- Schwangerschaft

Mit diesen Kriterien sollten die wichtigsten Faktoren ausgeschlossen werden, von denen man weiß oder vermutet, dass sie systemische Chemokinspiegel beeinflussen könnten. Sowohl für Glukokortikoide¹²⁹ als auch für nichtsteroidale Antipyretika^{130,131} ist gezeigt worden, dass sie in die Regulation der Chemokinexpression eingreifen können. Maligne Tumoren können durch Sekretion inhibitorischer und stimulatorischer Signale die Chemokinexpression in vielfältiger Weise beeinflussen, z.B. reduzieren Karzinome der Haut die CXCL10-Synthese durch Ausschüttung von Prostaglandin E₂.¹³¹ Auf die Veränderung der Chemokinspiegel während eines Erkrankungsschubes wurde bereits in der Einleitung ausführlich eingegangen.³⁷ Dass die Expression von Chemokinen durch infektiöse oder entzündliche Erkrankungen beeinflusst werden kann, ist evident. Ebenso muss eine mögliche Beeinflussung durch Funktionsstörungen der Ausscheidungsorgane Niere und Leber angenommen werden.

Während der Studienteilnahme wurden drei Patienten aufgrund erhöhter Leukozytenzahl oder CRP-Konzentration ausgeschlossen. Im Anschluss an die Blutentnahmen, aber vor Auswertung bzw. Entblindung der Chemokinkonzentrationen wurden alle Patienten erneut angerufen. Daraufhin schieden zehn Patienten aus der Studie aus: Drei Patienten hatten innerhalb

von 30 Tagen nach der Studienteilnahme einen Krankheitsschub gehabt, und sieben erfüllten andere Ausschlusskriterien, wie z.B. einen nach erneuter sorgfältiger Prüfung als sekundär chronisch progredient einzustufenden Krankheitsverlauf. Eine nachträgliche Analyse ergab, dass hierdurch die Hauptergebnisse der Studie nicht beeinflusst wurden. Die genaue Charakterisierung der einzelnen Gruppen zeigt Tab. 3.1.

Gruppe	Durchschnitts- alter [Jahre]	Anteil Frauen	durchschnittl. Erkrankungs- dauer [Jahre]	durchschnittl. EDSS	durchschnittl. Behandlungsdauer [Monate]
gesunde Kontrollen (n=15)	40 (14,0; 19-59)	73% (11/15)	NA	NA	NA
unbehandelte MS-Patienten (n=16)	41,6 (9,3; 28-60)	75% (12/16)	11,4 (6,9; 2-25)	2,0 (0,9; 1,0-3,5)	NA
MS Glatirameracetat (n=9)	41,0 (11,7; 22-55)	44% (4/9)	10,6 (7,3; 1-23)	2,3 (1,2; 1,0-4,5)	11,9 (4,9; 5-22)
MS IFN-β gesamt (n=37)	36,5 (9,6; 20-57)	62% (23/37)	7,7 (6,3; 1-23)	2,1 (1,3; 0-5,0)	26,4 (19,2; 4-71)
MS Avonex® (n=10)	37,2 (9,4; 26-55)	80% (8/10)	9,4 (6,5; 2-21)	2,4 (1,7; 0-5,0)	34,9 (21,7; 12-71)
MS Betaferon® (n=7)	38,7 (11,9; 21-57)	57% (4/7)	8,4 (5,1; 3-18)	2,1 (0,8; 1,5-4,0)	37,1 (20,4; 4-67)
MS Rebif 22® (n=14)	33,6 (9,1; 20-51)	50% (7/14)	5,6 (5,7; 1-22)	1,8 (1,3; 0-5,0)	14,7 (10,0; 4-31)
MS Rebif 44® (n=6)	39,3 (5,5; 31-48)	67% (4/6)	5,6 (7,1; 2-23)	2,3 (0,3; 2,0-2,5)	27,2 (13,5; 4-34)

Tab. 3.1: Gruppenzusammensetzung
(in Klammern Standardabweichung und Spannweite)

3.2 Probengewinnung

Den Studienteilnehmern wurde zu drei Zeitpunkten Blut entnommen: Die erste Blutentnahme erfolgte um 13.30 Uhr, direkt anschließend wurde gegebenenfalls das jeweilige Medikament injiziert. Die Injektion fand dabei, abgesehen von der Uhrzeit, immer gemäß dem normalen Rhythmus der Patienten statt. Sechs und 24 Stunden nach der Injektion wurde erneut Blut abgenommen. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen wurden so gewählt, dass der Aufwand für die Studienteilnehmer bei gleichzeitig hoher Aussagekraft möglichst gering gehalten wurde.

Bei jeder Blutentnahme wurden zwei 7,5 ml-EDTA-Monovetten vollständig mit Blut gefüllt, um eine einheitliche Verdünnung zu gewährleisten. Diese wurden anschließend bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 3850 x g und Raumtemperatur fünf Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde sodann in Portionen von 200-250 µl aufgeteilt und innerhalb von 30 min. nach der Blutentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Bestimmung der Chemokinkonzentrationen wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Zum Ausschluss einer akuten Infektion wurden bei der ersten Blutentnahme außerdem C-reaktives Protein und Blutbild aus separaten Serum- bzw. EDTA-Monovetten bestimmt.

3.3 Erfassung grippeartiger Nebenwirkungen

Alle Studienteilnehmer stufen unmittelbar nach jeder Blutentnahme auf einem selbstentwickelten Fragebogen das Auftreten von Muskelschmerzen, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Antriebslosigkeit, Frieren/Schüttelfrost, Schwitzen, Verschlechterung neurologischer Symptome im Vergleich zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme T_0 und Einschränkung der Alltagsaktivitäten im Vergleich zu T_0 mit Werten auf einer Skala von 0 (gar nicht) bis 5 (sehr stark) ein (s. Anhang 2). Als objektiver Surrogatmarker grippeartiger Nebenwirkungen wurde außerdem unmittelbar vor jeder Blutentnahme mit einem digitalen Thermometer die Körpertemperatur der Studienteilnehmer rektal gemessen.

3.4 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Plasma

Die Plasmakonzentrationen von CXCL10, CCL2 und IL-6 wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)-Sets der Firma R&D-Systems (Minneapolis, MN, USA) entsprechend den Protokollen des Herstellers bestimmt. Beim ELISA werden Näpfe mit monoklonalen Antikörpern gegen die gesuchte Substanz fest beschichtet. Anschließend werden die zu untersuchenden Proben in die Näpfe gegeben, so dass das Antigen an die Antikörper gebunden werden kann. Nach dem Entfernen der anderen Probenbestandteile wird das Antigen mit einem zweiten monoklonalen Antikörper markiert, der sich gegen ein anderes Epitop richtet. An diesen Sekundärantikörper ist ein Enzym gekoppelt, das einen Farbstoff aktiviert. Der Farbstoff absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge und lässt sich so nachweisen. Über eine Standardreihe kann die Konzentration des Stoffes quantifiziert werden (s. Abb. 3.1). Die durch die verwendeten ELISAs minimale nachweisbare Konzentration der Zytokine lag bei 1,67 pg/ml für CXCL10, 5,0 pg/ml für CCL2 und 0,70 pg/ml für IL-6.

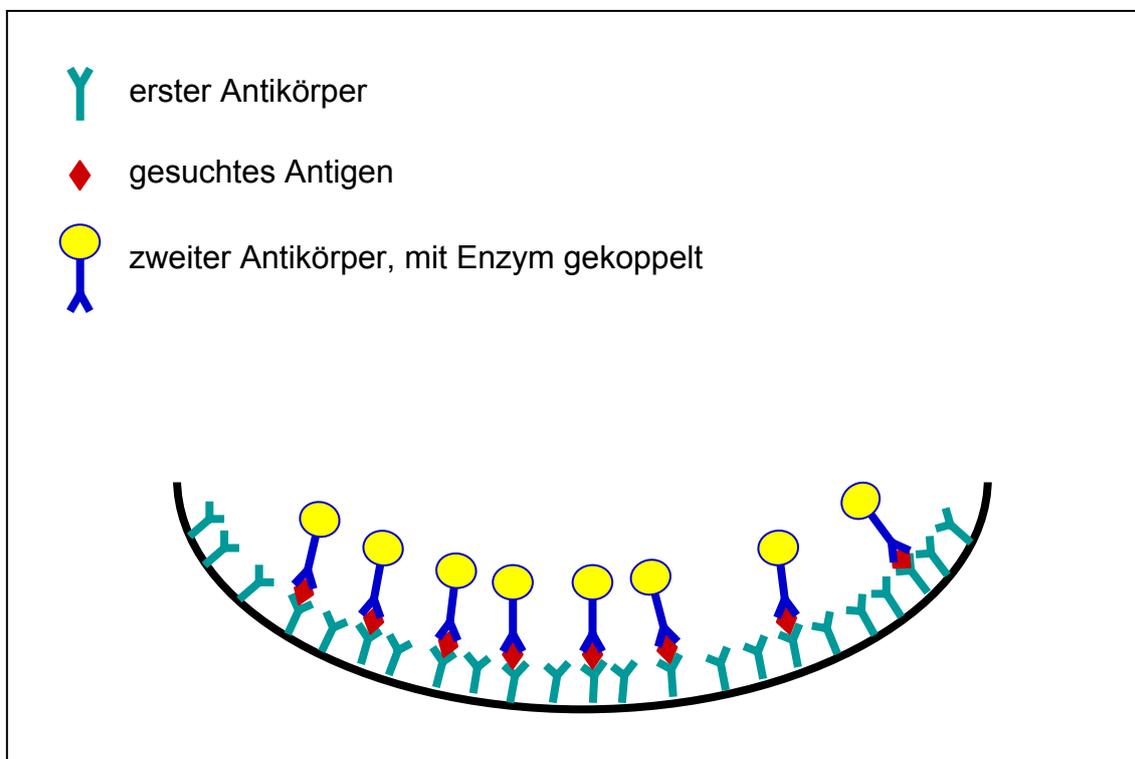


Abb. 3.1: Prinzip eines ELISA

Beispielhaftes Versuchsprotokoll für IL-6:

1. Es wird eine Platte mit 96 Näpfen, bedeckt mit einem murinen monoklonalen Antikörper gegen IL-6, verwendet.
2. Vorbereitung der Reagenzien und einer Standardreihe mit rekombinantem humanem IL-6 in Konzentrationen von 300 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12,5 pg/mL, 6,25 pg/mL und 3,12 pg/mL.
3. Vorlage von 100 µL Assay-Lösungsmittel (RD1A) in jeden Napf.
4. Zugabe von 100 µL Probe bzw. Standardlösung.
5. 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur.
6. Viermaliges Waschen der Näpfe mit je 400 µL Waschpuffer.
7. Zugabe von 200 µL IL-6-Konjugat (polyklonale Antikörper gegen IL-6, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) in jeden Napf.
8. Erneut viermaliges Waschen.
9. Zugabe von 200 µL Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jeden Napf.
10. 20 Minuten Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.
11. Zugabe von 50 µL Stopplösung (2N Schwefelsäure), welche die weitere Umsetzung des Substrats verhindert.
12. Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Alle Proben eines Patienten wurden auf einer Platte jeweils doppelt vermessen. Auf allen Platten wurden zur Kontrolle der Interassayvarianz jeweils Aliquots derselben Proben mitvermessen, einer hoch und einer niedrig konzentrierten. Die Inter- und Intraassayvarianzen sind den Tabellen 3.2 bis 3.5 zu entnehmen.

Die Proben für die CXCL10-Bestimmung wurden fünffach verdünnt. Bei Patienten, bei denen eine Probe außerhalb des Messbereiches lag, wurden alle Proben des betreffenden Patienten nochmals unverdünnt bzw. mit einer Verdünnung von 1:25 vermessen. Die CCL-2- und IL-6-Konzentrationen wurden aus unverdünnten Proben bestimmt.

	CCL2	CXCL10	IL-6
1. ELISA [%]	---	11.376	10.274
2. ELISA [%]	3.392	11.157	7.159
3. ELISA [%]	4.608	8.035	12.132
4. ELISA [%]	4.857	6.375	6.225
5. ELISA [%]	4.356	10.107	10.548
6. ELISA [%]	5.176	12.682	15.809
7. ELISA [%]	6.817	7.58	32.293
8. ELISA [%]	5.378	3.514	
<i>Mittelwert [%]</i>	4.632	8.668	11.685
Gesamtdurchschnitt	8.054		
[%]			

Tab. 3.2 Intraassayvarianzen (Durchschnitt der Variationskoeffizienten)

	Probe „21/1“	Probe „32/2A“	Probe „32/1A“
1. ELISA [pg/mL]	81,3	456,9	34,5
2. ELISA [pg/mL]		486,6	80,6
3. ELISA [pg/mL]	70,7	431,6	
4. ELISA [pg/mL]	71,0	472,7	
5. ELISA [pg/mL]	67,2	488,6	
6. ELISA [pg/mL]	76,9	426,2	
7. ELISA [pg/mL]	83,2	456,1	
8. ELISA [pg/mL]	80,1	478,0	
Mittelwert [pg/mL]	75,8	462,1	57,6
Standardabweichung [pg/mL]	5,7	22,2	23,0
Variationskoeffizient [%]	1,5	4,8	40,0

Tab. 3.3 Interassayvarianz CCL2

(Probenbenennung: Patientenkenziffer/ Entnahmezeitpunkt und Aliquot)

	Probe "20/2A"	Probe "24/3A"	Probe "16/2"	Probe "2/1"
1. ELISA [pg/mL]	437,4	60,5	590,1	31,4
2. ELISA [pg/mL]			683,9	69,1
3. ELISA [pg/mL]	458,3	83,6		
4. ELISA [pg/mL]	484,0	96,6		
5. ELISA [pg/mL]	475,5	106,0		
6. ELISA [pg/mL]	485,7	100,6		
7. ELISA [pg/mL]	482,3	101,7		
8. ELISA [pg/mL]	525,4	131,6		
Mittelwert [pg/mL]	478,4	97,2	637,0	50,3
Standardabweichung [pg/mL]	25,1	20,1	46,9	18,8
Variationskoeffizient [%]	5,2	20,7	7,4	37,5

Tab. 3.4: Interassayvarianz CXCL10

	Probe "83/1A"	Probe "84/2A"
1. ELISA [pg/mL]	1,57	12,92
2. ELISA [pg/mL]	2,28	14,35
3. ELISA [pg/mL]	1,97	14,73
4. ELISA [pg/mL]	2,01	13,49
5. ELISA [pg/mL]	1,68	14,12
6. ELISA [pg/mL]	1,48	13,53
7. ELISA [pg/mL]	1,87	14,26
Mittelwert [pg/mL]	1,84	13,90
Standardabweichung [pg/mL]	0,26	0,60
Variationskoeffizient [%]	14,11	4,34

Tab. 3.5: Interassayvarianz IL-6

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von SPSS 11.0 (Chicago, IL, USA). Die Daten sind in den Diagrammen dargestellt als Einzelwerte in einer Punktwolke und als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung. Die relative Chemokininduktion wurde berechnet durch eine Quotientenbildung aus ChemokinKonzentration zum Zeitpunkt der zweiten bzw. dritten Blutentnahme und Ausgangswert. Bei den subjektiven Angaben zu grippeähnlichen Nebenwirkungen wurde für jeden Zeitpunkt das arithmetische Mittel aller Angaben eines Patienten gebildet und mit den Mittelwerten der anderen Zeitpunkte durch Subtraktion verglichen.

Für den Vergleich aller Gruppen untereinander wurde der Kruskal-Wallis-H-Test herangezogen, der nicht-parametrisch ist und keine Normalverteilung der Daten voraussetzt. Zum Vergleich zwischen zwei Gruppen diente der ebenfalls nicht-parametrische, zweiseitige, ungepaarte Mann-Whitney-U-Test. Die Korrelation zwischen den Variablen wurde durch eine zweiseitige Spearman-Analyse bestimmt, die Ränge vergleicht und für Ordinalskalen geeignet ist. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 CXCL10-Induktion durch rekombinantes Interferon- β

Die Plasmakonzentration von CXCL10 wurde bei den Patienten der IFN- β -Gruppe direkt vor sowie 6 und 24 Stunden nach der Applikation von IFN- β bestimmt. Zum Vergleich dienten die Plasmakonzentrationen von CXCL10 bei mit Glatirameracetat bzw. nicht immunmodulatorisch behandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen, die zur gleichen Tageszeit gemessen wurden. Die Ausgangskonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Nach 6 Stunden war in der IFN- β -Gruppe ein Anstieg auf das im arithmetischen Mittel 8,6-fache (Spannweite 0,7-42,5; $p < 0,0001$) der Ausgangskonzentration von CXCL10 zu beobachten, während sich die

Konzentration bei den Kontrollgruppen nicht statistisch signifikant änderte. Nach 24 Stunden hatte die CXCL10-Konzentration in der IFN-Gruppe wieder nahezu das Ausgangsniveau erreicht (s. Abb. 4.1 und 4.2).

In der Gruppe der mit Avonex[®] behandelten Patienten (n=10) war der Anstieg der CXCL10-Konzentration (20,2 [6,8–42,5]-facher Anstieg) signifikant (p=0,001) größer als in den mit Betaferon[®] (n=7) bzw. Rebif[®] (22 µg: n=14, 44 µg: n=6) behandelten Gruppen (4,3 [0,7–16,8]-fach). Zudem war in der Avonex[®]-Gruppe im Gegensatz zu den anderen Gruppen bei *allen* Patienten eine Chemokininduktion zu beobachten. Zwischen den Betaferon[®]- und Rebif[®]-Behandelten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Chemokininduktion. (s. Abb. 4.3 und 4.4)

4.2 CCL2-Induktion durch rekombinantes Interferon-β

Der Vergleich der CCL2-Plasmakonzentration erfolgte analog zu CXCL10. Auch hier war in der IFN-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration auf das 2,2-fache (Spannweite 1,1-8,1; p<0,0001) des Ausgangswertes zu beobachten, während sich die Konzentration in den Kontrollgruppen nicht änderte (s. Abb. 4.5 und 4. 6).

Ebenso wie in Bezug auf CXCL10 reagierte die Avonex[®]-Gruppe (3,5 [1,9–8,1]-facher Anstieg) signifikant (p=0,001) stärker als die Betaferon[®]- und Rebif[®]-Patienten (1.7 [1.1–5.4]-facher Anstieg), die sich bezüglich der CCL2-Induktion nicht voneinander unterschieden.

CXCL10 [pg/ml]

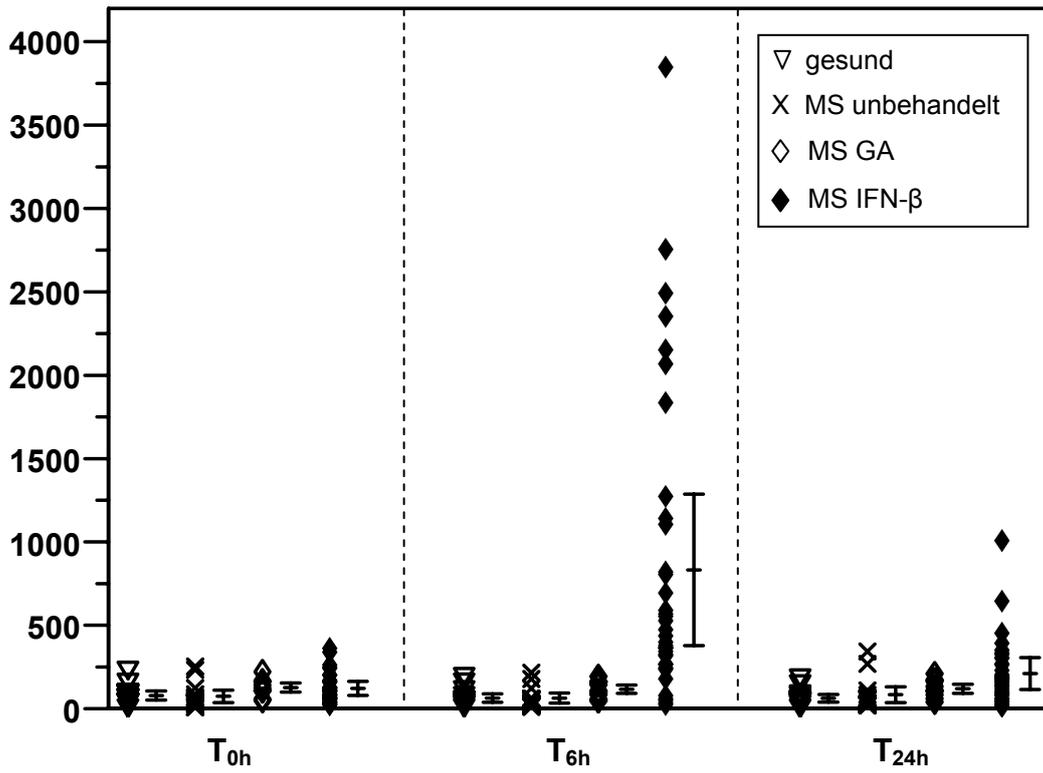


Abb. 4.1 Plasmakonzentration von CXCL10

Relative Induktion

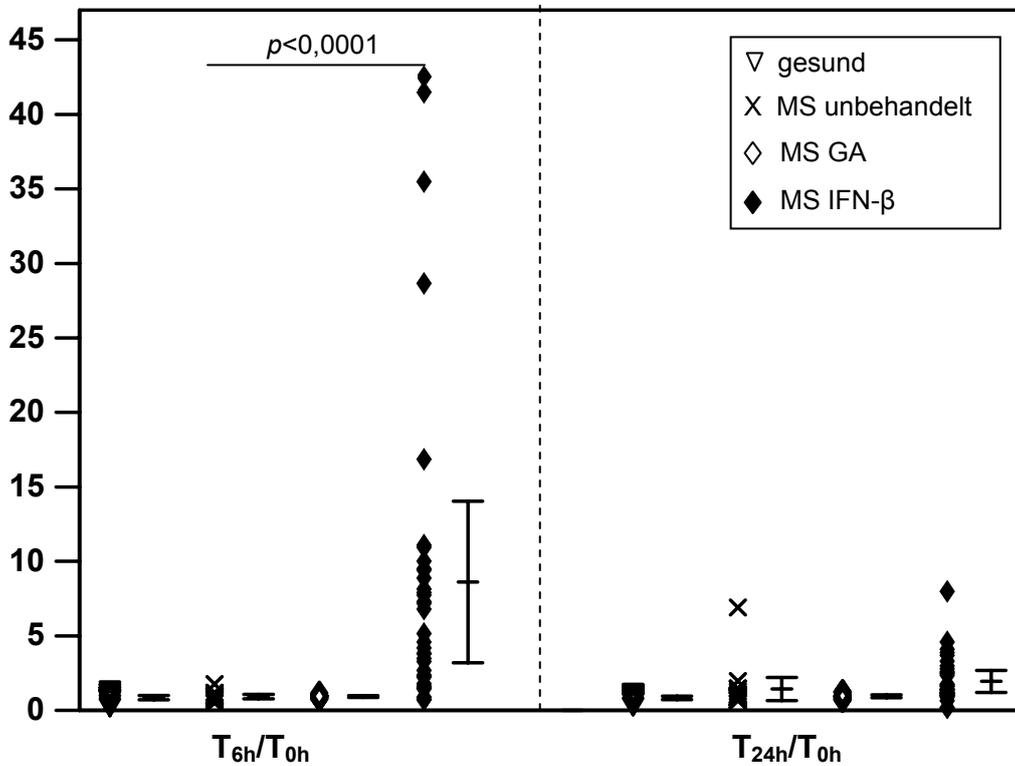


Abb. 4.2 Relative Induktion von CXCL10 nach 6 bzw. 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert

CXCL10 [pg/ml]

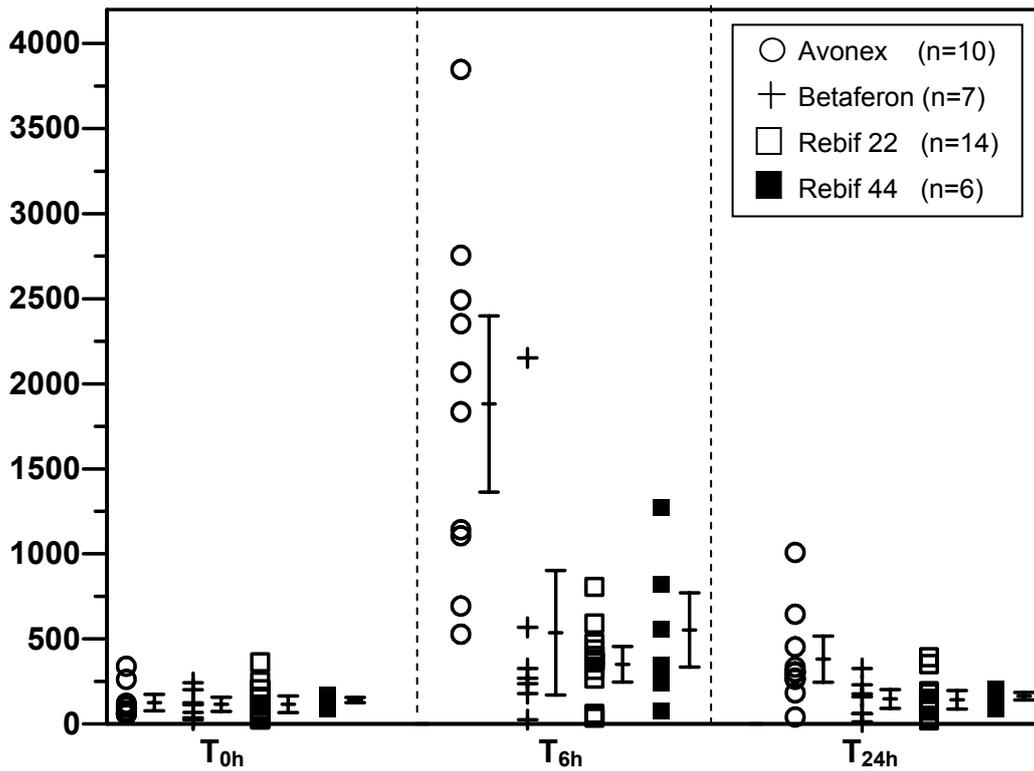


Abb. 4.3 Plasmakonzentration von CXCL10 in den IFN-β-Subgruppen

Relative Induktion

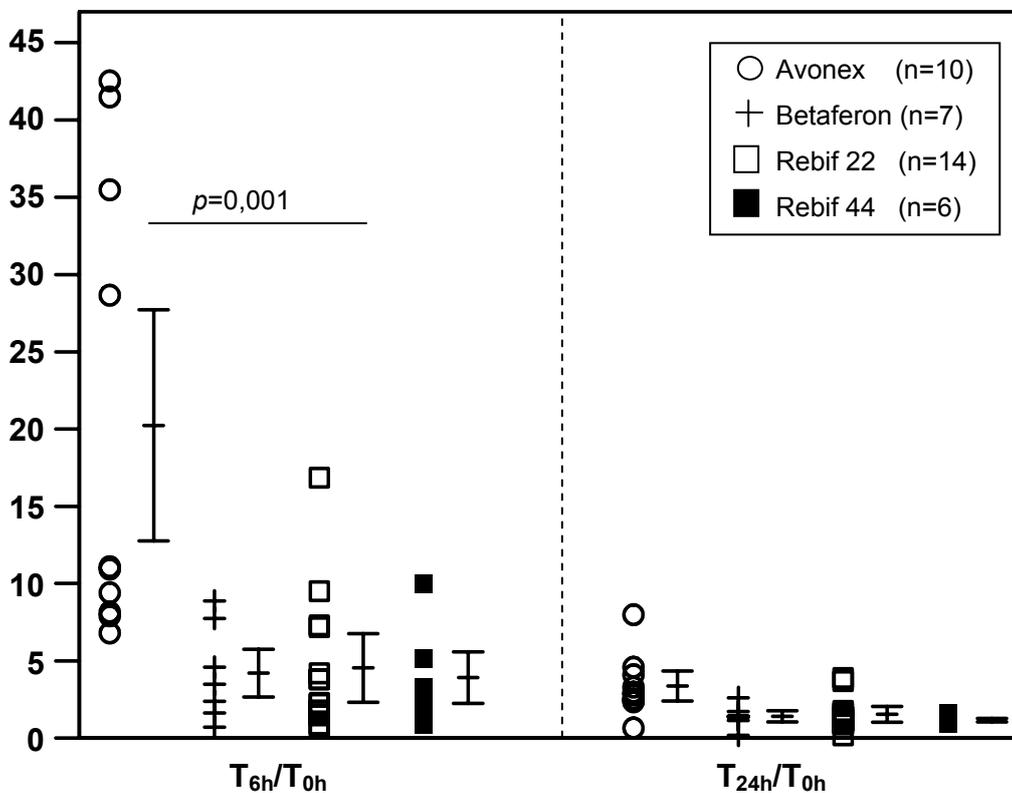


Abb. 4.4 Relative Induktion von CXCL10 nach 6 bzw. 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert in den IFN-β-Subgruppen

CCL2 [pg/ml]

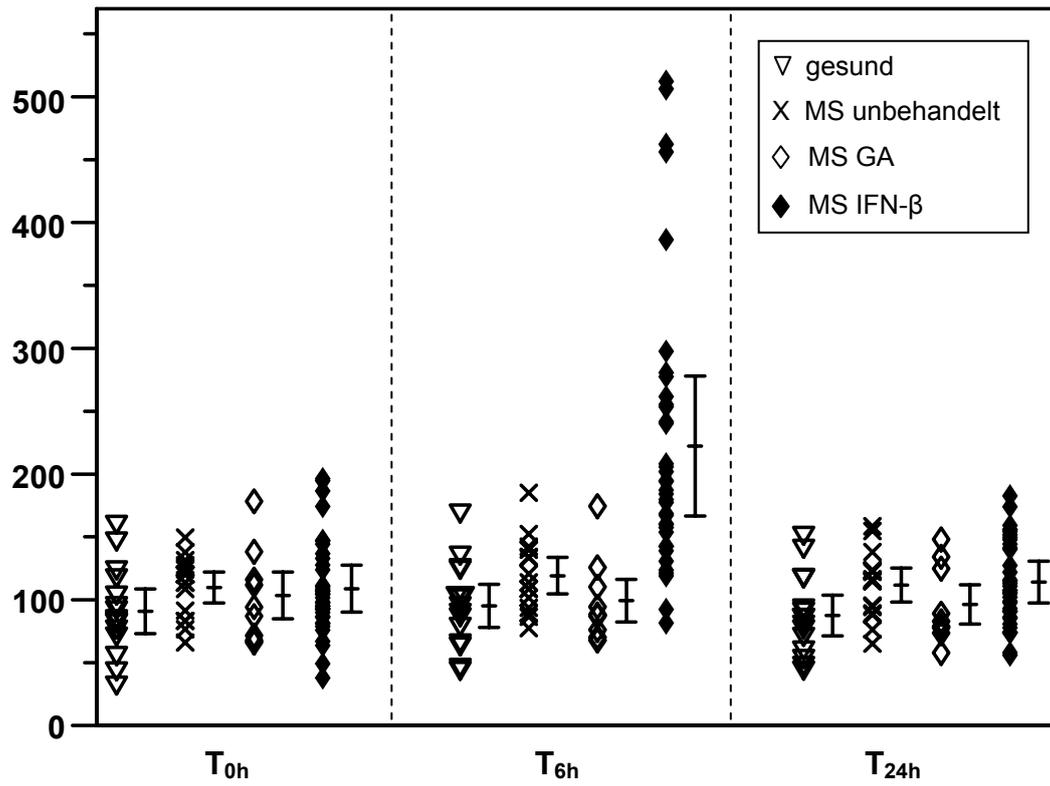


Abb. 4.5: Plasmakonzentrationen CCL2

Relative Induktion

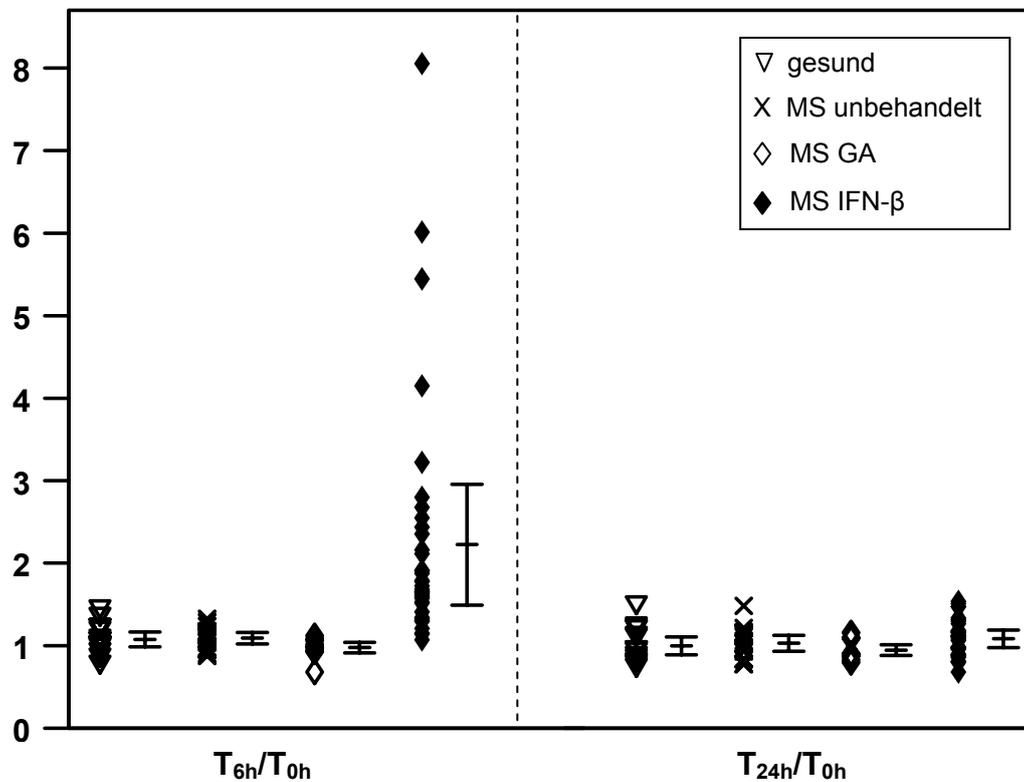


Abb. 4.6: Relative Induktion von CCL2 nach 6 bzw. 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert

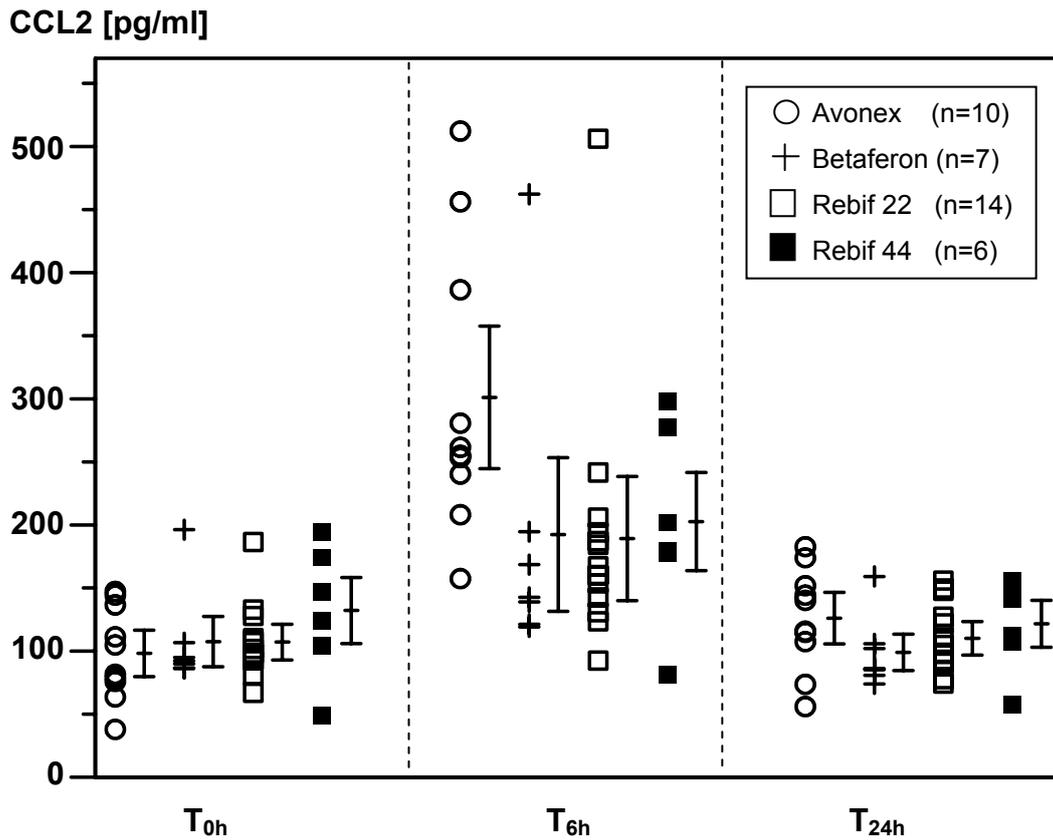


Abb. 4.7: Plasmakonzentrationen CCL2 in den IFN-β-Subgruppen

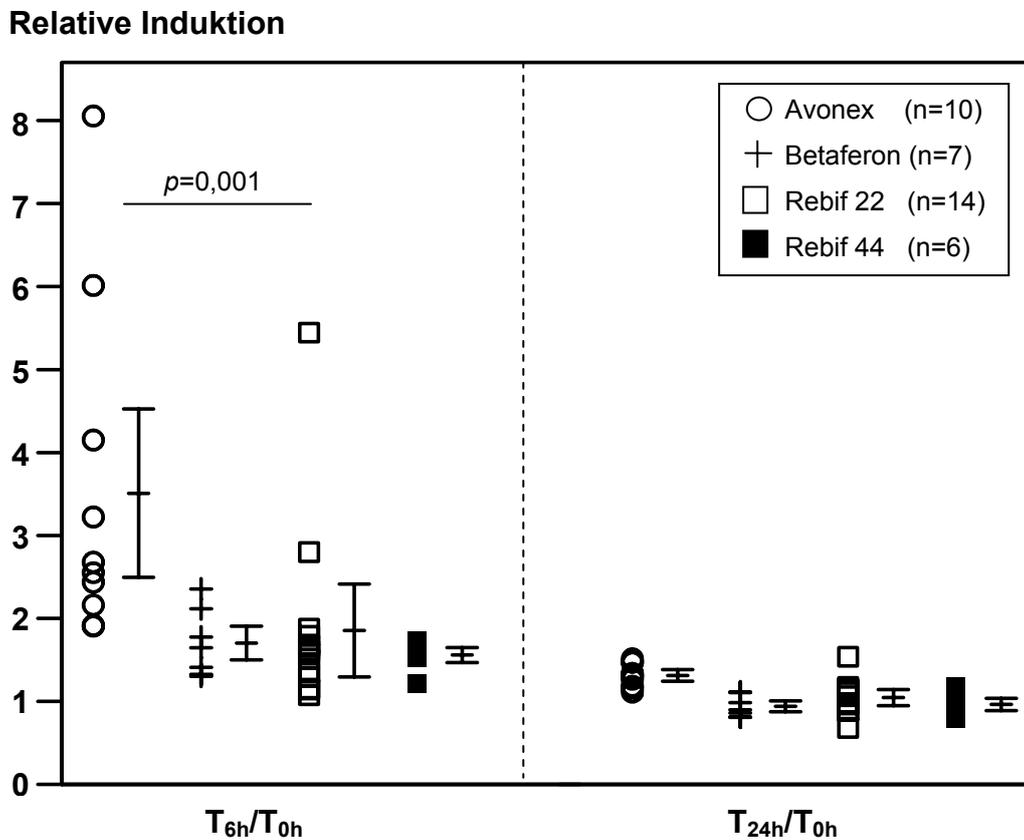


Abb. 4.8: Relative Induktion von CCL2 nach 6 bzw. 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert in den IFN-β-Subgruppen

4.3 IL-6-Induktion durch rekombinantes Interferon- β

Entsprechend früheren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^{132,133} beobachteten wir einen signifikanten Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration 6 Stunden nach Applikation von IFN- β (2,9 [0,9–21,6]-facher Anstieg; $p < 0,001$). In den Kontrollgruppen zeigte sich kein Anstieg der IL-6-Konzentration, mit Ausnahme einer gesunden Kontrollperson, die jedoch keinen Anstieg der Chemokinkonzentrationen oder der Körpertemperatur und keine subjektiven grippeähnlichen Symptome hatte. Hierbei handelt es sich um einen Ausreißer. Nach 24 Stunden hatte der IL-6-Spiegel bei fast allen IFN-behandelten Patienten wieder das Ausgangsniveau erreicht (s. Abb. 4.9 und 4.10).

Ebenso wie bei den Chemokinen war die Induktion von IL-6 in der Avonex[®]-Gruppe (5,3 [1,2–21,6]-facher Anstieg) stärker als bei den anderen IFN- β -behandelten Patienten (Rebif[®] 44: 2,3 [1,7–3,0]-facher Anstieg; $p = 0,001$).

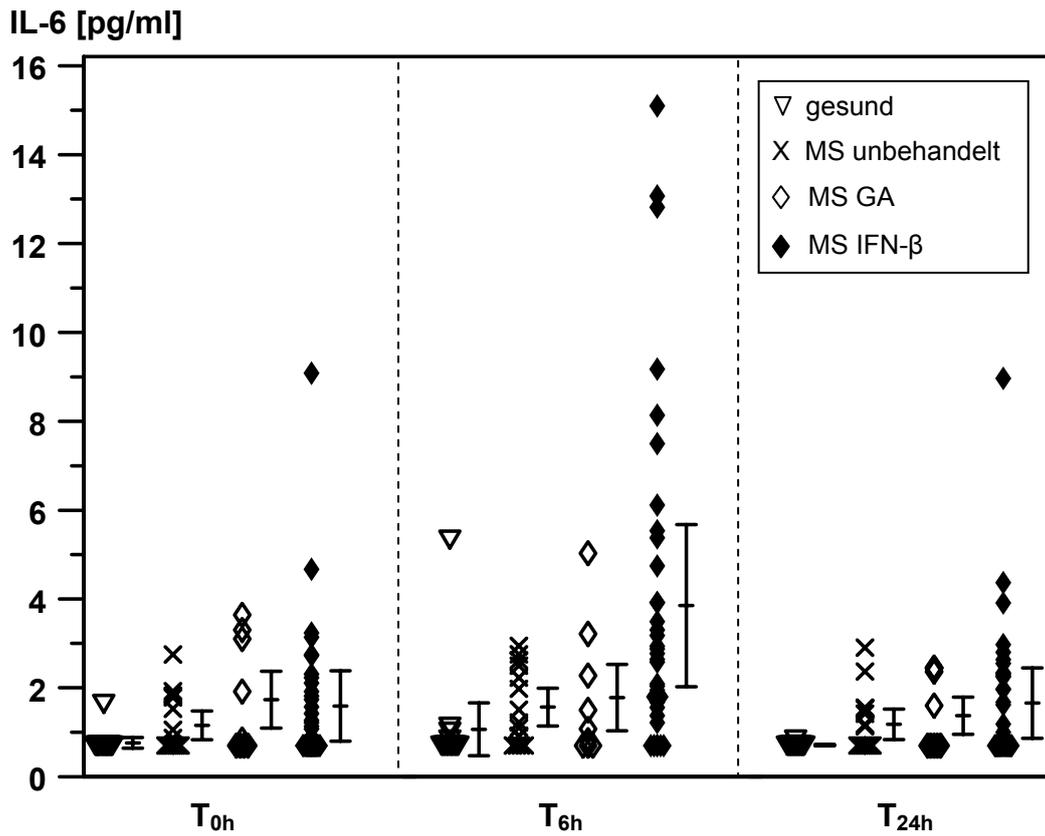


Abb. 4.9: Plasmakonzentrationen von IL-6

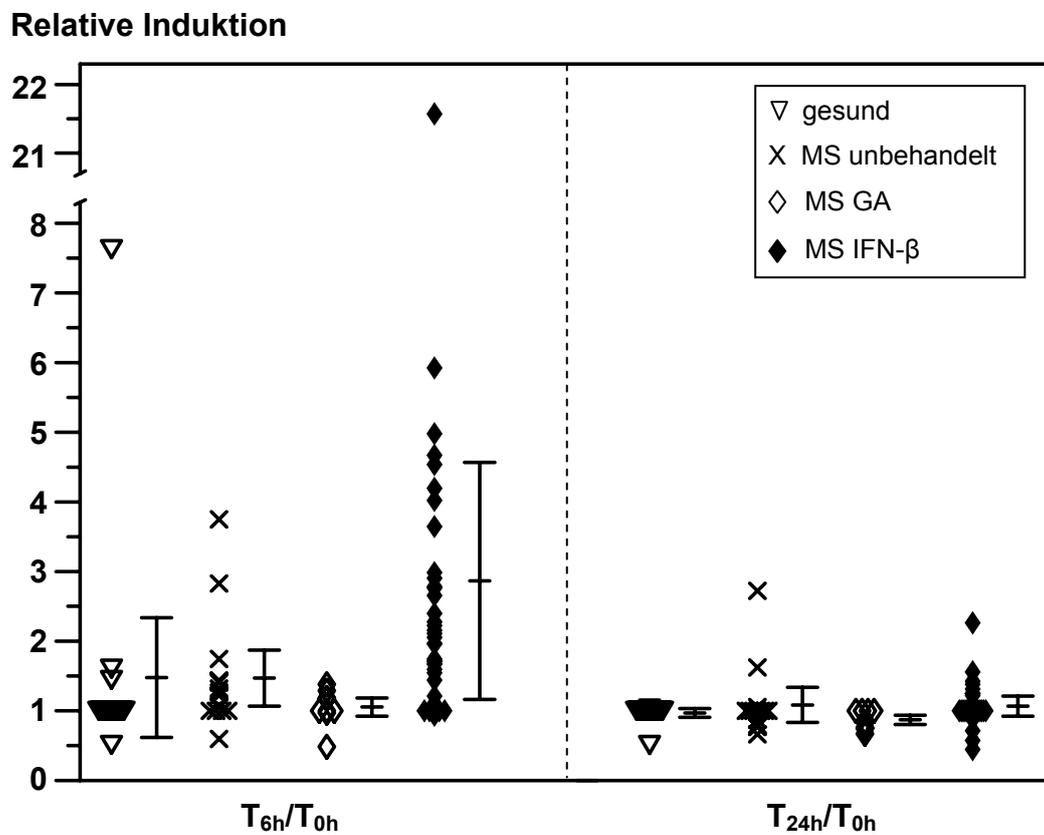


Abb. 4.10: Relative Induktion von IL-6 nach 6 und 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert

4.4 Grippeähnliche Nebenwirkungen und Körpertemperatur

Subjektive grippeähnliche Symptome und Körpertemperatur als objektiver Surrogatmarker wurden parallel zu den Blutentnahmen erhoben (s. 3.3). Verschiedene Symptome wurden hierbei von den Studienteilnehmern mit einem Zahlenwert von 0 (überhaupt nicht) bis 5 (sehr stark) eingestuft. Aus diesen Angaben wurde für jeden Zeitpunkt ein arithmetischer Mittelwert gebildet. Ein Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte erfolgte durch Subtraktion des Wertes nach sechs bzw. 24 Stunden vom Ausgangswert.

Nur in der IFN- β -Gruppe fand sich nach sechs Stunden eine Zunahme subjektiver grippeähnlicher Symptome (Differenz 0,61 [-0,56–3,06]; $p=0,001$, s. Abb. 4.11 und 4.12). In den Kontrollgruppen war keine statistisch signifikante Zunahme zu beobachten. Innerhalb der IFN-Gruppe war der Effekt am stärksten in der Avonex[®]-Gruppe ausgeprägt (Differenz 1,32 [-0,56–1,78]).

Die Körpertemperatur war nach sechs Stunden sowohl bei den mit IFN- β (Differenz 0,32 [-0,2–1,3]°C) als auch den mit Glatirameracetat (Differenz 0,25 [0,0–0,5]°C) behandelten Patienten im Vergleich zum Ausgangswert erhöht. Dieser Unterschied war im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten MS-Patienten in der IFN- β -Gruppe statistisch signifikant ($p=0,005$), nicht jedoch in der Glatirameracetat-Gruppe ($p=0,055$). Nach 24 Stunden hatte die Körpertemperatur in beiden Gruppen wieder das Ausgangsniveau erreicht. In der unbehandelten und der gesunden Kontrollgruppe war kein signifikanter Anstieg der Körpertemperatur zu beobachten (s. Abb. 4.13 und 4.14).

Grippeähnliche Symptome [0-5]

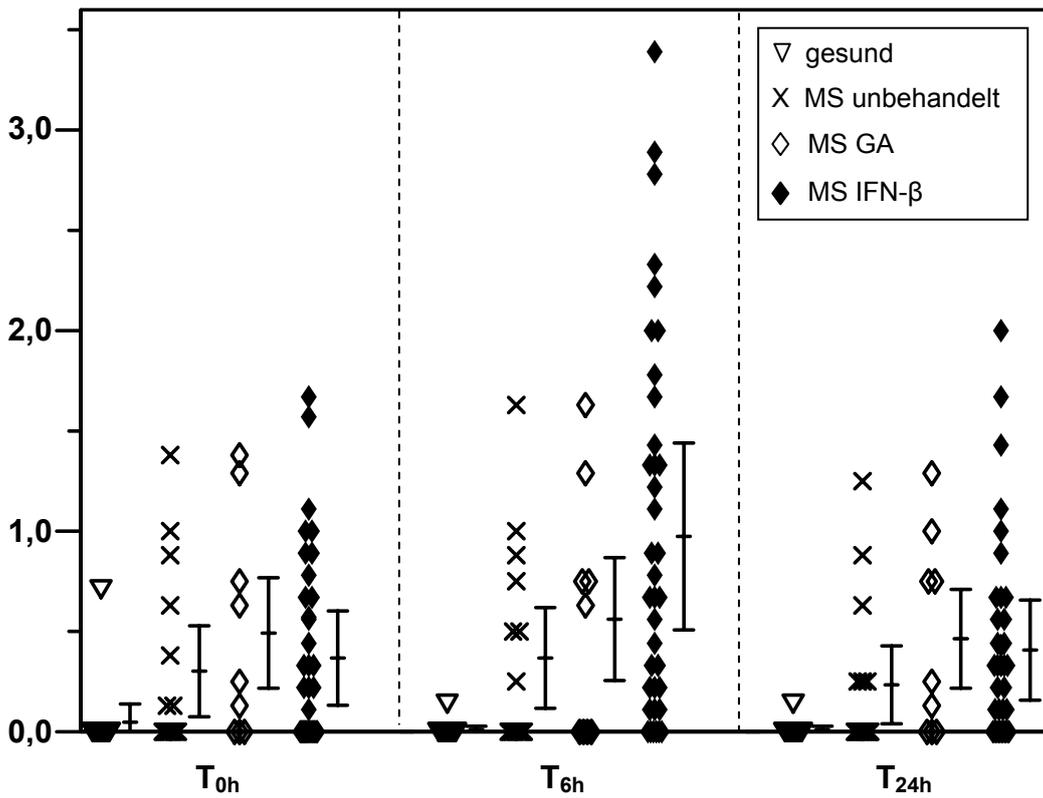


Abb. 4.11: Grippeähnliche Symptome nach subjektiver Bewertung

Differenz

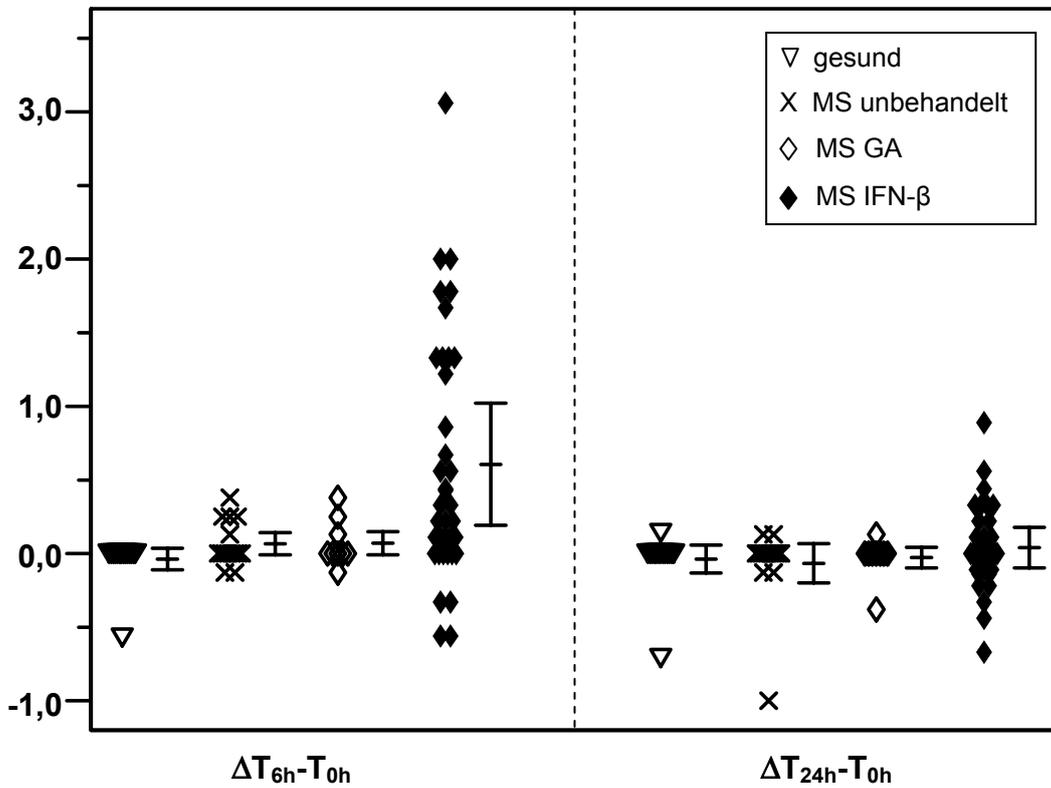


Abb. 4.12: Änderung der subjektiven grippeähnlichen Symptome

Körpertemperatur [°C]

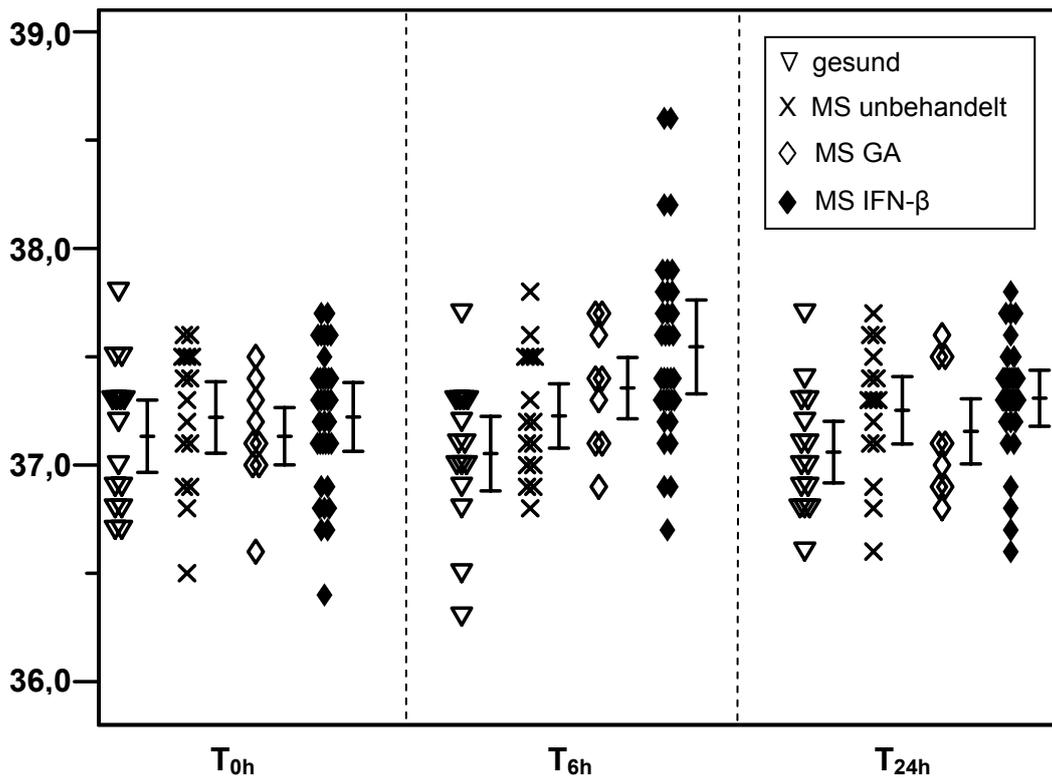


Abb. 4.13: Körperkerntemperatur

Differenz [°C]

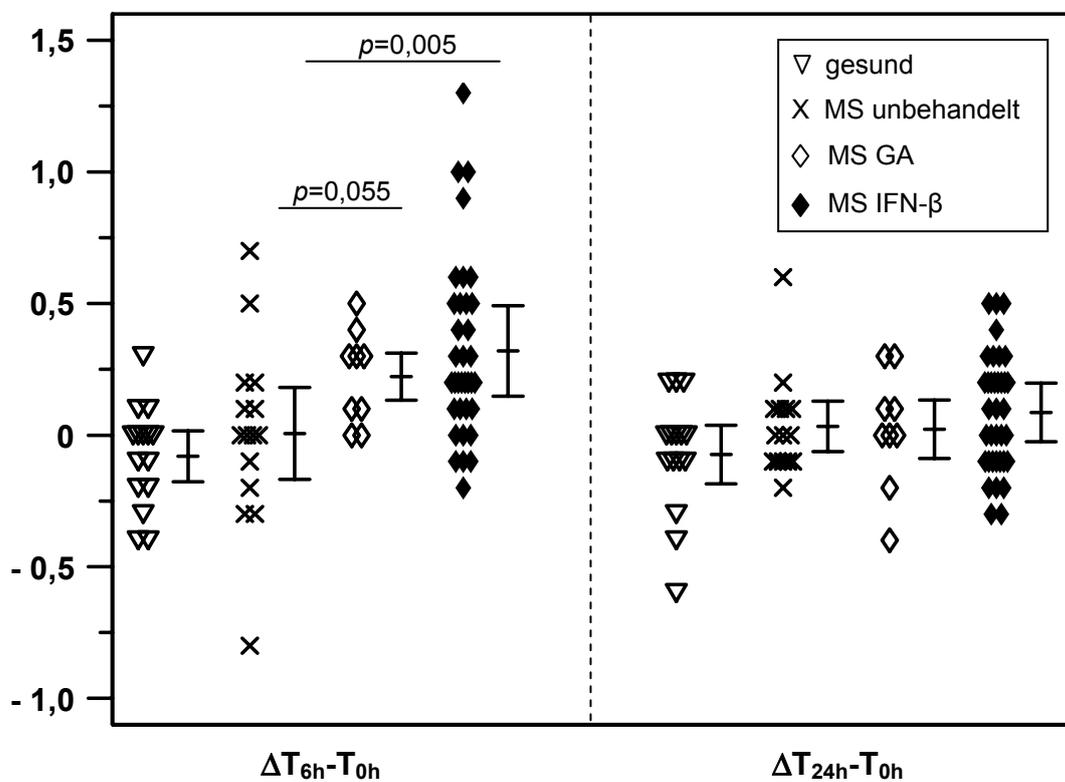


Abb. 4.14: Änderung der Körperkerntemperatur

4.5 Korrelation zwischen grippeähnlichen Symptomen und Zytokin-Konzentrationen

Eine zweiseitige Spearman-Analyse zeigte eine deutliche Korrelation zwischen subjektiven Grippe-symptomen und IL-6- und CXCL10-Konzentrationen. Auch zwischen der CCL2-Konzentration und den grippeähnlichen Symptomen fand sich ein, wenn auch schwächerer, Zusammenhang. Die Zytokin-Konzentrationen korrelierten außerdem untereinander. Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der Körpertemperatur und der Zunahme subjektiver grippeähnlicher Symptome (s. Tab. 4.1).

	grippeartige Symptome	Körper-temperatur	IL-6 T ₆ /T ₀	CXCL10 T ₆ /T ₀	CCL2 T ₆ /T ₀
grippeartige Symptome	---	0,314 0,066	0,505** 0,001	0,558** <0,0005	0,382* 0,020
Körper-temperatur	0,314 0,066	---	0,203 0,243	0,181 0,299	0,112 0,521
IL-6 T ₆ /T ₀	0,505** 0,001	0,203 0,243	---	0,510** 0,001	0,649** <0,0005
CXCL10 T ₆ /T ₀	0,558** <0,0005	0,181 0,299	0,510** 0,001	---	0,676** <0,0005
CCL2 T ₆ /T ₀	0,382* 0,020	0,112 0,521	0,649** <0,0005	0,676** <0,0005	---
oberer Wert:	Korrelationskoeffizient			** p<0,01	
unterer Wert:	P-Wert			* p<0,05	

Tab. 4.1: Spearman-Korrelationskoeffizienten

5 Diskussion

Rekombinantes IFN- β wird erfolgreich zur Behandlung der MS mit Schüben eingesetzt; die Wirkmechanismen sind jedoch noch unvollständig verstanden. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Injektionen von rekombinantem IFN- β in klinisch stabilen MS-Patienten unter fortlaufender Behandlung einen frühen transienten systemischen Anstieg einiger in der Pathogenese der Erkrankung relevanter Chemokine induzieren. Sechs Stunden nach Injektion des Medikaments fand sich ein stark erhöhter CXCL10- und ein weniger deutlich angestiegener CCL2-Plasmaspiegel. 24 Stunden nach der Injektion hatten die Chemokinspiegel wieder nahezu das Ausgangsniveau erreicht. Dies erklärt auch, warum eine andere Studie, in der die Konzentrationen von CXCL10 und CCL2 72 Stunden nach Injektion von IFN- β gemessen wurden, keine Veränderung der Chemokinspiegel beobachtete.³⁷ Da alle Patienten in der IFN-Gruppe vor Studienteilnahme seit mindestens drei Monaten mit IFN- β behandelt worden waren, ist davon auszugehen, dass die transiente Chemokin-Induktion unter einer längerfristigen Behandlung mit IFN- β persistiert.

Der Anstieg der Chemokinkonzentrationen war bei Patienten, die einmal wöchentlich IFN- β 1a i.m. injizieren, stärker ausgeprägt als bei Patienten, die mit IFN- β 1a dreimal wöchentlich s.c. bzw. mit IFN- β 1b jeden zweiten Tag s.c. behandelt werden. Der beobachtete Unterschied ist vermutlich nicht auf eine vom Applikationsort (Muskel versus Haut) abhängige unterschiedliche Resorption von IFN- β mit unterschiedlichen Serum-Kinetiken und Spitzen-Serumspiegeln zurückzuführen, da pharmakokinetische Untersuchungen eine ähnliche Kinetik der IFN- β -Serumkonzentrationen nach i.m. und s.c. Injektion fanden.¹³⁴ Sollte ein relevanter Teil der systemisch freigesetzten Chemokine aus der Nähe des Applikationsortes stammen, wäre eher zu erwarten, dass nach s.c. Injektion mehr Chemokine freigesetzt werden als nach i.m. Injektion, da von der Haut als ständig mit der Außenwelt in Kontakt stehendem Gewebe eine stärkere Immunreaktion zu erwarten ist als vom Muskel. Das Gegenteil ließ sich beobachten. Die wahrscheinlichste Erklärung für niedrigere systemische Chemokinspiegel nach s.c. Injektion liegt in der hiermit verbundenen höheren Applikationsfrequenz im Sinne eines Tachyphylaxie-ähnlichen Effekts, der im

Vergleich zur selteneren i.m. Applikation zu einer geringeren Ausschüttung von Chemokinen nach jeder einzelnen Injektion führt.

Die Beeinflussung systemischer Spiegel von in der MS-Pathogenese relevanten Chemokinen durch IFN- β wirft die Frage auf, ob dies bedeutsam für den therapeutischen Effekt von IFN- β ist, ein hinsichtlich der Wirkung irrelevantes Epiphänomen darstellt, oder sogar den therapeutischen Effekt partiell antagonisiert. Noch vor wenigen Jahren wurde überwiegend davon ausgegangen, dass IFN- β den Verlauf der MS durch direkte antiinflammatorische Effekte günstig beeinflusst, entweder durch eine Dämpfung von Immunzellen oder durch eine Modulation von Molekülen der Blut-Hirn-Schranke, die für die Transmigration von Immunzellen erforderlich sind.²¹ In letzter Zeit wich diese Einschätzung einem komplexeren Bild. Wandinger et al. fanden in einer Mikroarray-Studie nicht nur die Induktion von CXCL10-mRNA durch IFN- β , sondern auch eine vermehrte Genexpression der β -Kette des IL-12-Rezeptors und des Chemokinrezeptors CCR5.¹²⁵ IL-12 wird zu den Th1-Markern gezählt und ist mit der Krankheitsaktivität der MS assoziiert.¹³⁵⁻¹³⁸ Auch CCR5, der Rezeptor für CCL3, CCL4 und CCL5, wird vorrangig auf aktivierten Th1-Zellen exprimiert. Im Kontext von Therapiestudien mit neueren antiinflammatorischen Substanzen wird zunehmend deutlich, dass Entzündungsvorgänge bei der MS einer engen Regulation unterworfen sind und sich unter Umständen auch günstig auf den Erkrankungsverlauf auswirken können.²⁴

Nimmt man an, dass IFN- β seinen therapeutischen Effekt teilweise durch den transienten Anstieg systemischer Chemokinspiegel erzielt, wären folgende Wirkmechanismen vorstellbar:

1. Reduktion lokaler Chemokinkonzentrationsgradienten in MS-Läsionen durch systemische Chemokinspiegel-Anstiege: Für die Wirkung von Chemokinen sind lokale Konzentrationsgradienten von entscheidender Bedeutung. Es wurde postuliert, dass diese Konzentrationsgradienten durch eine lokale Reduktion der Chemokin-Sekretion im ZNS bzw. an der Blut-Hirn-Schranke durch IFN- β vermindert werden könnten.¹²² Den vorliegenden Beobachtungen zu Folge könnte aber auch der temporäre Anstieg von systemischen Chemokinspiegeln dazu beitragen, relative lokale Konzentrations-

gradienten in MS-Läsionen zu reduzieren und damit die Wirkung von in MS-Läsionen freigesetzten Chemokinen abschwächen.

2. *Herabregulation von Chemokinrezeptoren auf Blut-Immunzellen durch systemisch freigesetzte Chemokine*: Durch den repetitiven Anstieg der Chemokinkonzentrationen im Blut könnte die Reaktivität der Rezeptor-tragenden Zielzellen auf Chemokine abnehmen. Hierfür kommen zwei verschiedene Mechanismen in Betracht:

Die Bindung eines Chemokins führt zur kurzfristigen *Desensitivierung des Rezeptors*, an den es gebunden hat (homologe Desensitivierung), und unter Umständen auch anderer Rezeptoren (heterologe Desensitivierung). Diesem Vorgang liegt eine Phosphorylierung des Rezeptors mit anschließender Bindung sogenannter Arrestine zugrunde, die eine funktionelle Blockierung des Rezeptors zur Folge hat. Der Rezeptor wird dann endozytiert und dephosphoryliert, um anschließend wieder zur Verfügung zu stehen.¹³⁹

Bei andauernder Stimulation der Zelle durch ein Chemokin wird der Rezeptor längerfristig herunterreguliert. Dies geschieht zum einen durch Endozytose und proteolytischen Abbau des Rezeptors, zum anderen durch verminderte Expression auf transkriptioneller Ebene. Die verminderte Dichte von Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt zu einer länger anhaltenden reduzierten Ansprechbarkeit auf die Liganden.^{139,140} Entsprechende Beobachtungen wurden z.B. für den CCL5-Rezeptor CCR3 und den CXCL10-Rezeptor CXCR3 gemacht. Die intrazellulären Signalwege, die für die Rezeptor-Internalisierung verantwortlich sind, sind offensichtlich teilweise unabhängig von denen, die die chemotaktische Wirkung vermitteln.^{141,142}

Befunde aus Tierexperimenten stützen die beiden vorgestellten Hypothesen: In transgenen Mäusen, die konstitutiv CCL2 in mehreren Organen exprimierten, wurde trotz hoher Chemokinkonzentrationen kein monozytäres Infiltrat in diesen Organen gefunden. Die Tiere waren vielmehr sogar empfindlicher gegenüber intrazellulären Krankheitserregern wie *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis*. Dieser Effekt wurde auf eine Desensitivierung der Monozyten und eine Neutralisierung von Chemokingradienten zurückgeführt, da auch die CCL2-Konzentration im Blut bei diesen Tieren stark erhöht war.¹⁴³ Transgene Mäuse, deren Pankreas-Inselzellen konstitutiv CCL2 exprimierten, entwickelten eine persistente

monozytäre Insulinitis; diese blieb jedoch aus, wenn zusätzlich in anderen Organen CCL2 produziert wurde.⁴⁴

In Bezug auf die MS passt zur Hypothese der Rezeptor-Desensitivierung und -Herunterregulation, dass verschiedene Studien eine reduzierte Expression von CXCR3 (dem Rezeptor für CXCL10) und CCR5 (dem Rezeptor für CCL3, CCL4 und CCL5) auf der Zelloberfläche von PBMC mit IFN- β behandelter MS-Patienten beobachteten.^{36,122,126,144} Auch *in vitro*-Behandlung von Makrophagen mit IFN- β führte zu einer Reduktion der CCR5-Expression.¹²⁴ Bei einer anderen Studie, die keine Reduktion der CCR5- und CXCR3-Expression auf zirkulierenden T-Zellen fand, war das Blut erst 48 Stunden nach der Injektion von IFN- β 1a entnommen worden.¹⁴⁵ Den hier vorliegenden Ergebnissen zu Folge ist zu diesem Zeitpunkt die CXCL10- und CCL2-Konzentration bereits seit 24 Stunden wieder normal, während Sauty und Kollegen eine Normalisierung der CXCR3-Dichte auf T-Zellen schon drei Stunden nach Entfernung des Liganden beobachteten.¹⁴² Die Autoren einer weiteren Studie, bei der keine Veränderung der Chemokin-Rezeptorexpression durch Behandlung mit IFN- β beobachtet wurde, gaben den Zeitabstand zwischen IFN- β -Injektion und Blutentnahme nicht an.¹⁴⁶ Insofern kann die Frequenz der IFN- β -Injektion durchaus Auswirkungen auf dieses Phänomen haben.

Eine wichtige Frage in der Behandlung der MS mit IFN- β ist, warum bestimmte Patienten nicht von dem Medikament profitieren, während bei anderen die Therapie zu einer langfristigen Stabilisierung führt. Es würde einen entscheidenden Fortschritt bedeuten, primäre Therapieversager möglichst noch vor Beginn einer längerfristigen Behandlung identifizieren zu können, um sie dann frühzeitig mit einem anderen Basistherapeutikum zu behandeln. Bisher stehen keine etablierten Biomarker zur Verfügung, die eine solche Prognose sicher ermöglichen, auch wenn viel versprechende Ansätze bereits gemacht wurden.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Wenn der Anstieg der Chemokinkonzentrationen, der ebenfalls nicht bei allen Patienten auftritt, für den klinischen Effekt von IFN- β eine entscheidende Bedeutung hat, ließe sich hierdurch prognostizieren, welche Patienten von der Therapie profitieren werden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt lässt sich noch nicht sagen, ob die Chemokininduktion tatsächlich bedeutsam für die therapeutische Wirkung von IFN- β ist. Dass ein derartiger Zusammenhang zumindest möglich ist, zeigt eine

Studie, die nachwies, dass bei der Behandlung von chronischer Virushepatitis mit IFN- α oder IFN- β eine signifikante positive Korrelation zwischen der Induktion von CCL20 durch die Medikamente und dem therapeutischen Erfolg besteht.¹⁵⁰

Es wurde bereits früher demonstriert, dass bei MS-Patienten die Serumspiegel des endogenen Pyrogens IL-6 nach Injektion von IFN- β ansteigen und mit dem Auftreten grippeartiger Nebenwirkungen positiv korrelieren.^{132,133,151,152} Einige Chemokine sind ebenso wie IL-6 starke endogene Pyrogene.¹⁵³⁻¹⁵⁵ In der untersuchten Patientengruppe war zu beobachten, dass die Zunahme grippeartiger Symptome nach der Injektion von IFN- β ebenso stark mit dem Konzentrationsanstieg von CXCL10 korreliert wie mit dem von IL-6. Möglicherweise trägt also auch der vorübergehende Chemokinanstieg zu dieser häufigen unerwünschten Wirkung von IFN- β bei, zumal *in vitro* eine Induktion von IL-6 durch CCL2 gezeigt wurde.¹⁵⁶

Im Gegensatz zu den subjektiven grippeartigen Symptomen, die die Patienten auf Fragebögen angaben, zeigte der Anstieg der Körperkerntemperatur als objektivierbarer Surrogatmarker grippeartiger Nebenwirkungen keine Abhängigkeit von den gemessenen Zytokinspiegeln, weder von IL-6 noch von CXCL10. Auch fand sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Temperatur und subjektiven grippeartigen Nebenwirkungen. Möglicherweise wurden solche Zusammenhänge durch weitere Einflussfaktoren überdeckt, welche die Körpertemperatur nachhaltig beeinflussen können, z.B. körperliche Aktivität.

Bisher wurde überwiegend angenommen, dass rekombinantes IFN- β seine therapeutische Wirkung vor allem durch direkte antiinflammatorische Effekte erzielt. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen es jedoch möglich erscheinen, dass auch die zeitlich und räumlich restringierte Freisetzung proinflammatorischer Chemokine zu einem in Bezug auf das Krankheitsgeschehen im ZNS antiinflammatorischen Effekt beitragen könnte, indem das Entzündungsgeschehen vom ZNS „abgelenkt“ wird und die Reaktivität von Immunzellen im Blut reduziert wird. In einer Folgestudie, die Effekte von IFN- β an der Einstichstelle untersucht, konnte gezeigt werden, dass es zur CXCL10- und CCL2-vermittelten Infiltration von T-Zellen und Monozyten

in die Haut bei s.c. Injektion kommt.¹²¹ Die systemische Freisetzung pyrogener Chemokine könnte gleichzeitig zur Entstehung grippeartiger Nebenwirkungen beitragen. Der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Chemokinausschüttung und der klinischen Wirkung erfordert weitere Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems mit deutlich ausgeprägten Autoimmunphänomenen. Das derzeit meistverwendete Therapeutikum zur Sekundärprophylaxe von Krankheitsschüben ist rekombinantes Interferon- β (IFN- β). Wirk- und Nebenwirkungsmechanismen des Medikaments werden bisher nur partiell verstanden. In der Pathogenese der MS spielt eine Familie chemotaktisch wirksamer Zytokine, der Chemokine, eine entscheidende Rolle. Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob IFN- β die systemischen Konzentrationen der Pathogenese-relevanten Chemokine CXCL10, CCL2 und außerdem des endogenen Pyrogens IL-6 verändert, und ob diese Veränderungen mit dem Auftreten grippeartiger Nebenwirkungen korrelieren.

Zu diesem Zweck wurden bei 37 Patienten mit schubförmiger MS zu drei Zeitpunkten – vor sowie 6 und 24 Stunden nach der Applikation von IFN- β – die genannten Botenstoffe im Blut bestimmt. Parallel wurden subjektiv empfundene grippeartige Nebenwirkungen mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens abgefragt, und die Körperkerntemperatur wurde gemessen. Als Kontrollen dienten gesunde Probanden, derzeit nicht immunmodulatorisch behandelte MS-Patienten und MS-Patienten unter Therapie mit Glatirameracetat.

Nur bei den mit IFN- β behandelten Patienten zeigte sich nach 6 Stunden ein signifikanter transients Anstieg der Konzentrationen von CXCL10, CCL2. Der Anstieg der Chemokinkonzentrationen korrelierte mit einem transienten IL-6-Anstieg und dem Auftreten grippeartiger Nebenwirkungen.

Chemokine, unter denen sich zahlreiche starke endogene Pyrogene befinden, könnten somit für die häufig zu beobachtenden grippeartigen Nebenwirkungen mit verantwortlich sein. Die Ergebnisse werfen die weiterführende Frage auf, ob die beobachtete Chemokininduktion auch relevant für den therapeutischen Effekt von IFN- β ist. Ob Chemokine sich erfolgreich als Biomarker zur Prädiktion des Therapieerfolgs einsetzen lassen, wird derzeit in einem weiterführenden Projekt untersucht.

7 Literatur

1. Trebst C, Ransohoff RM, Windhagen A, Stangel M. Chemokine. Neue Therapieansätze für die Multiple Sklerose. *Nervenarzt* 2003;74:850-857.
2. Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis* 2002;186 Suppl 2:S152-S156.
3. Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 1999;112:1-23.
4. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, III, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;254:99-102.
5. Randolph GJ, Furie MB. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol* 1995;155:3610-3618.
6. Weber C, Alon R, Moser B, Springer TA. Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol* 1996;134:1063-1073.
7. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996;87:1037-1047.
8. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998;391:799-803.
9. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188:373-386.
10. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999;189:451-460.
11. Sørensen LN, Paludan SR. Blocking CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 during herpes simplex virus type 2 infection in vivo impairs host defence and perturbs the cytokine response. *Scand J Immunol* 2004;59:321-333.
12. Metelitsa LS, Wu HW, Wang H, Yang Y, Warsi Z, Asgharzadeh S, Groshen S, Wilson SB, Seeger RC. Natural killer T cells infiltrate

- neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J Exp Med* 2004;199:1213-1221.
13. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Cosby JM, Griffiths R, Bautch VL, Patel DD, Coffman TM. The chemokine CX3CL1 regulates NK cell activity in vivo. *Cell Immunol* 2003;225:122-130.
 14. Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:504-514.
 15. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995;269:1583-1585.
 16. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998;187:601-608.
 17. Huang D, Han Y, Rani MR, Glabinski A, Trebst C, Sørensen T, Tani M, Wang J, Chien P, O'Bryan S, Bielecki B, Zhou ZL, Majumder S, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunol Rev* 2000;177:52-67.
 18. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002;359:1221-1231.
 19. Gold RRP. Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. Bremen: UNI-MED; 2000.
 20. Janeway CA, Travers P., Walport M, Shlomchik M. Immunologie. Heidelberg: 2002.
 21. Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 2002;59:802-808.
 22. Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2004;52:162-168.
 23. Misu T, Onodera H, Fujihara K, Matsushima K, Yoshie O, Okita N, Takase S, Itoyama Y. Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. *J Neuroimmunol* 2001;114:207-212.
 24. Martino G, Adorini L, Rieckmann P, Hillert J, Kallmann B, Comi G, Filippi M. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol* 2002;1:499-509.

25. Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58:S3-S9.
26. Taub DD, Longo DL, Murphy WJ. Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. *Blood* 1996;87:1423-1431.
27. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993;177:1809-1814.
28. Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, Taub DD. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol* 1996;156:932-938.
29. Luster AD, Leder P. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993;178:1057-1065.
30. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, . The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-27357.
31. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995;182:155-162.
32. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:207-219.
33. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, Karpus WJ. CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001;166:7617-7624.
34. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6873-6878.
35. Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999;103:807-815.

36. Teleshova N, Pashenkov M, Huang YM, Söderström M, Kivisäkk P, Kostulas V, Haglund M, Link H. Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. *J Neurol* 2002;249:723-729.
37. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V. Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol* 2001;115:192-198.
38. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1996;2:198-204.
39. Fuentes ME, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, Lira SA. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* 1995;155:5769-5776.
40. Roth SJ, Carr MW, Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995;25:3482-3488.
41. Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol* 1997;158:4129-4136.
42. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 1996;156:322-327.
43. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 1991;78:1112-1116.
44. Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rollins BJ. Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J Immunol* 1997;159:401-408.
45. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* 1992;175:1271-1275.
46. Izikson L, Klein RS, Luster AD, Weiner HL. Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clin Immunol* 2002;103:125-131.

47. Frade JM, Mellado M, del Real G, Gutierrez-Ramos JC, Lind P, Martinez A. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol* 1997;159:5576-5584.
48. Tylaska LA, Boring L, Weng W, Aiello R, Charo IF, Rollins BJ, Gladue RP. Ccr2 regulates the level of MCP-1/CCL2 in vitro and at inflammatory sites and controls T cell activation in response to alloantigen. *Cytokine* 2002;18:184-190.
49. Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, Nasorri F, Bianchi G, Traidl C, Sozzani S, Girolomoni G, Cavani A. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 2001;166:996-1002.
50. Iikura M, Miyamasu M, Yamaguchi M, Kawasaki H, Matsushima K, Kitaura M, Morita Y, Yoshie O, Yamamoto K, Hirai K. Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J Leukoc Biol* 2001;70:113-120.
51. Ochensberger B, Tassera L, Bifrare D, Rihs S, Dahinden CA. Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists. *Eur J Immunol* 1999;29:11-22.
52. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-1127.
53. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992;90:772-779.
54. Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol* 1998;92:98-108.
55. Glabinski AR, Tani M, Tuohy VK, Tuthill RJ, Ransohoff RM. Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 1995;9:315-330.
56. Huang DR, Wang J, Kivisäkk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001;193:713-726.

57. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000;192:899-905.
58. Youssef S, Wildbaum G, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by MIP-1alpha and MCP-1 naked DNA vaccines. *J Autoimmun* 1999;13:21-29.
59. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol* 2003;15:23-32.
60. Van D, V, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van D, V, De Groot CJ. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 1999;154:45-51.
61. Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 1998;84:238-249.
62. Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 2000;108:192-200.
63. Trebst C, Ransohoff RM. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. *Arch Neurol* 2001;58:1975-1980.
64. Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Put W, D'Haese A, De Clercq E, Schols D, Proost P, Van Damme J. Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils. *Eur J Immunol* 2001;31:2170-2178.
65. Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 1995;25:64-68.
66. McManus CM, Liu JS, Hahn MT, Hua LL, Brosnan CF, Berman JW, Lee SC. Differential induction of chemokines in human microglia by type I and II interferons. *Glia* 2000;29:273-280.
67. Miyamoto Y, Kim SU. Cytokine-induced production of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in cultured human astrocytes. *J Neurosci Res* 1999;55:245-251.
68. Kim JJ, Tsai A, Nottingham LK, Morrison L, Cunning DM, Oh J, Lee DJ, Dang K, Dentchev T, Chalian AA, Agadjanyan MG, Weiner DB.

- Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells in vivo. *J Clin Invest* 1999;103:869-877.
69. Krzysiek R, Lefevre EA, Zou W, Foussat A, Bernard J, Portier A, Galanaud P, Richard Y. Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells. *J Immunol* 1999;162:4455-4463.
 70. Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, Monaco J, Ehler L, Mizell S, Jackson R, Li Y, Romano JW, Fauci AS. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest* 1998;102:223-231.
 71. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:455-481.
 72. Lukacs NW, Strieter RM, Elnor VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood* 1994;83:1174-1178.
 73. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1995;155:4412-4418.
 74. Su S, Mukaida N, Wang J, Zhang Y, Takami A, Nakao S, Matsushima K. Inhibition of immature erythroid progenitor cell proliferation by macrophage inflammatory protein-1alpha by interacting mainly with a C-C chemokine receptor, CCR1. *Blood* 1997;90:605-611.
 75. Miyagishi R, Kikuchi S, Fukazawa T, Tashiro K. Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *J Neurol Sci* 1995;129:223-227.
 76. Zang YC, Samanta AK, Halder JB, Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zhang JZ. Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Overexpression of chemokine receptor CCR5. *Brain* 2000;123 (Pt 9):1874-1882.
 77. Ziegler SF, Tough TW, Franklin TL, Armitage RJ, Alderson MR. Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7. *J Immunol* 1991;147:2234-2239.
 78. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 1993;361:79-82.

79. Iarlori C, Reale M, Lugaresi A, De Luca G, Bonanni L, Di Iorio A, Feliciani C, Conti P, Gambi D. RANTES production and expression is reduced in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1b. *J Neuroimmunol* 2000;107:100-107.
80. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001;22:83-87.
81. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-1815.
82. Boven LA, Montagne L, Nottet HS, De Groot CJ. Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol* 2000;122:257-263.
83. Miyagishi R, Kikuchi S, Takayama C, Inoue Y, Tashiro K. Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization. *J Neuroimmunol* 1997;77:17-26.
84. Grigoriadis N. Interferon beta treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. A review. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:251-258.
85. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 1999;53:1622-1627.
86. Goeb JL, Even C, Nicolas G, Gohier B, Dubas F, Garre JB. Psychiatric side effects of interferon-beta in multiple sclerosis. *Eur Psychiatry* 2006;21:186-193.
87. Boskovic R, Wide R, Wolpin J, Bauer DJ, Koren G. The reproductive effects of beta interferon therapy in pregnancy: a longitudinal cohort. *Neurology* 2005;65:807-811.
88. Sandberg-Wollheim M, Frank D, Goodwin TM, Giesser B, Lopez-Bresnahan M, Stam-Moraga M, Chang P, Francis GS. Pregnancy outcomes during treatment with interferon beta-1a in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2005;65:802-806.
89. Parmar S, Plataniias LC. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* 2003;15:431-439.
90. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000;81:2341-2364.
91. David M, Petricoin E, III, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Lerner AC. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and

- interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 1995;269:1721-1723.
92. Uddin S, Majchrzak B, Woodson J, Arunkumar P, Alsayed Y, Pine R, Young PR, Fish EN, Platanius LC. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem* 1999;274:30127-30131.
 93. Rani MR, Gauzzi C, Pellegrini S, Fish EN, Wei T, Ransohoff RM. Induction of beta-R1/I-TAC by interferon-beta requires catalytically active TYK2. *J Biol Chem* 1999;274:1891-1897.
 94. Lekmine F, Uddin S, Sassano A, Parmar S, Brachmann SM, Majchrzak B, Sonenberg N, Hay N, Fish EN, Platanius LC. Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons. *J Biol Chem* 2003;278:27772-27780.
 95. Jiang H, Milo R, Swoveland P, Johnson KP, Panitch H, Dhib-Jalbut S. Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J Neuroimmunol* 1995;61:17-25.
 96. Genç K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest* 1997;99:2664-2671.
 97. Teleshova N, Bao W, Kivisäkk P, Özenci V, Mustafa M, Link H. Elevated CD40 ligand expressing blood T-cell levels in multiple sclerosis are reversed by interferon-beta treatment. *Scand J Immunol* 2000;51:312-320.
 98. Sharief MK, Semra YK, Seidi OA, Zoukos Y. Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;120:199-207.
 99. Noronha A, Toscas A, Jensen MA. Interferon beta augments suppressor cell function in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990;27:207-210.
 100. Rudick RA, Ransohoff RM, Pepler R, VanderBrug MS, Lehmann P, Alam J. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;40:618-627.
 101. Byrnes AA, McArthur JC, Karp CL. Interferon-beta therapy for multiple sclerosis induces reciprocal changes in interleukin-12 and interleukin-10 production. *Ann Neurol* 2002;51:165-174.
 102. Noronha A, Toscas A, Jensen MA. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1993;46:145-153.
 103. Hussien Y, Sanna A, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;121:102-110.

104. Coclet-Ninin J, Dayer JM, Burger D. Interferon-beta not only inhibits interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but stimulates interleukin-1 receptor antagonist production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw* 1997;8:345-349.
105. Stewart VC, Land JM, Clark JB, Heales SJ. Pretreatment of astrocytes with interferon-alpha/beta prevents neuronal mitochondrial respiratory chain damage. *J Neurochem* 1998;70:432-434.
106. Minagar A, Long A, Ma T, Jackson TH, Kelley RE, Ostanin DV, Sasaki M, Warren AC, Jawahar A, Cappell B, Alexander JS. Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium* 2003;10:299-307.
107. Revel M, Chebath J, Mangelus M, Harroch S, Moviglia GA. Antagonism of interferon beta on interferon gamma: inhibition of signal transduction in vitro and reduction of serum levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 1995;1 Suppl 1:S5-11.
108. Crespo A, Filla MB, Murphy WJ. Low responsiveness to IFN-gamma, after pretreatment of mouse macrophages with lipopolysaccharides, develops via diverse regulatory pathways. *Eur J Immunol* 2002;32:710-719.
109. Dayal AS, Jensen MA, Lledo A, Arnason BG. Interferon-gamma-secreting cells in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *Neurology* 1995;45:2173-2177.
110. Runge VM, Clanton JA, Price AC, Wehr CJ, Herzer WA, Partain CL, James AE, Jr. The use of Gd DTPA as a perfusion agent and marker of blood-brain barrier disruption. *Magn Reson Imaging* 1985;3:43-55.
111. Kallmann BA, Hummel V, Lindenlaub T, Ruprecht K, Toyka KV, Rieckmann P. Cytokine-induced modulation of cellular adhesion to human cerebral endothelial cells is mediated by soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Brain* 2000;123 (Pt 4):687-697.
112. Boz C, Ozmenoglu M, Velioglu S, Kilinc K, Orem A, Alioglu Z, Altunayoglu V. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta. *Clin Neurol Neurosurg* 2006;108:124-128.
113. Stuve O, Dooley NP, Uhm JH, Antel JP, Francis GS, Williams G, Yong VW. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996;40:853-863.
114. Iarlori C, Reale M, De Luca G, Di Iorio A, Feliciani C, Tulli A, Conti P, Gambi D, Lugaresi A. Interferon beta-1b modulates MCP-1 expression and production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;123:170-179.

115. Comabella M, Imitola J, Weiner HL, Khoury SJ. Interferon-beta treatment alters peripheral blood monocytes chemokine production in MS patients. *J Neuroimmunol* 2002;126:205-212.
116. Losy J, Michalowska-Wender G, Wender M. [Chemokines MIP-1 and MCP-1 and patients with multiple sclerosis treated with interferon beta-1a]. *Neurol Neurochir Pol* 2001;35:583-588.
117. Menten P, Proost P, Struyf S, Van Coillie E, Put W, Lenaerts JP, Conings R, Jaspar JM, De Groote D, Billiau A, Opdenakker G, Van Damme J. Differential induction of monocyte chemotactic protein-3 in mononuclear leukocytes and fibroblasts by interferon-alpha/beta and interferon-gamma reveals MCP-3 heterogeneity. *Eur J Immunol* 1999;29:678-685.
118. Fantuzzi L, Canini I, Belardelli F, Gessani S. IFN-beta stimulates the production of beta-chemokines in human peripheral blood monocytes. Importance of macrophage differentiation. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:597-603.
119. Struyf S, Van Collie E, Paemen L, Put W, Lenaerts JP, Proost P, Opdenakker G, Van Damme J. Synergistic induction of MCP-1 and -2 by IL-1beta and interferons in fibroblasts and epithelial cells. *J Leukoc Biol* 1998;63:364-372.
120. Tebo JM, Kim HS, Gao J, Armstrong DA, Hamilton TA. Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon. *Blood* 1998;92:4742-4749.
121. Buttmann M, Goebeler M, Toksoy A, Schmid S, Graf W, Berberich-Siebelt F, Rieckmann P. Subcutaneous interferon-beta injections in patients with multiple sclerosis initiate inflammatory skin reactions by local chemokine induction. *J Neuroimmunol* 2005;168:175-182.
122. Zang YC, Halder JB, Samanta AK, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1alpha by interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2001;112:174-180.
123. Kitai R, Zhao ML, Zhang N, Hua LL, Lee SC. Role of MIP-1beta and RANTES in HIV-1 infection of microglia: inhibition of infection and induction by IFNbeta. *J Neuroimmunol* 2000;110:230-239.
124. Cremer I, Vieillard V, De Maeyer E. Retrovirally mediated IFN-beta transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J Immunol* 2000;164:1582-1587.
125. Wandinger KP, Sturzebecher CS, Bielekova B, Detore G, Rosenwald A, Staudt LM, McFarland HF, Martin R. Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 2001;50:349-357.

126. Sørensen TL, Sellebjerg F. Selective suppression of chemokine receptor CXCR3 expression by interferon-beta1a in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002;8:104-107.
127. Rieckmann P. [Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis : Update (September 2006)]. *Nervenarzt* 2006;77:1506-1518.
128. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den NS, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
129. Wang H, Gao X, Fukumoto S, Tademoto S, Sato K, Hirai K. Differential expression and regulation of chemokines JE, KC, and IP-10 gene in primary cultured murine hepatocytes. *J Cell Physiol* 1999;181:361-370.
130. Efsen E, Bonacchi A, Pastacaldi S, Valente AJ, Wenzel UO, Tosti-Guerra C, Pinzani M, Laffi G, Abboud HE, Gentilini P, Marra F. Agonist-specific regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by cyclooxygenase metabolites in hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:713-721.
131. Kanda N, Watanabe S. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances whereas prostaglandin E2 inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in epidermoid carcinoma A431. *J Invest Dermatol* 2002;119:1080-1089.
132. Brod SA, Marshall GD, Jr., Henninger EM, Sriram S, Khan M, Wolinsky JS. Interferon-beta 1b treatment decreases tumor necrosis factor-alpha and increases interleukin-6 production in multiple sclerosis. *Neurology* 1996;46:1633-1638.
133. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, Zaccone P, L'Episcopo MR, Reggio E, Xiang M, Nicoletti A, Reggio A. Short-term treatment of relapsing remitting multiple sclerosis patients with interferon (IFN)-beta1B transiently increases the blood levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and IFN-gamma without significantly modifying those of IL-1beta, IL-2, IL-4 and tumour necrosis factor-alpha. *Cytokine* 2000;12:682-687.
134. Munafo A, Trinchard-Lugan I I, Nguyen TX, Buraglio M. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human interferon beta-1a after intramuscular and subcutaneous administration. *Eur J Neurol* 1998;5(2):187-193.
135. Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest* 1998;102:671-678.

136. Fassbender K, Ragoschke A, Rossol S, Schwartz A, Mielke O, Paulig A, Hennerici M. Increased release of interleukin-12p40 in MS: association with intracerebral inflammation. *Neurology* 1998;51:753-758.
137. Makhlof K, Weiner HL, Khoury SJ. Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuroimmunol* 2001;119:145-149.
138. Rohowsky-Kochan C, Molinaro D, Choudhry A, Kahn M, Cook SD. Impaired interleukin-12 production in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 1999;5:327-334.
139. Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:416-421.
140. Mueller A, Strange PG. The chemokine receptor, CCR5. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:35-38.
141. Zimmermann N, Conkright JJ, Rothenberg ME. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *J Biol Chem* 1999;274:12611-12618.
142. Sauty A, Colvin RA, Wagner L, Rochat S, Spertini F, Luster AD. CXCR3 internalization following T cell-endothelial cell contact: preferential role of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11). *J Immunol* 2001;167:7084-7093.
143. Rutledge BJ, Rayburn H, Rosenberg R, North RJ, Gladue RP, Corless CL, Rollins BJ. High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J Immunol* 1995;155:4838-4843.
144. Sørensen TL, Roed H, Sellebjerg F. Chemokine receptor expression on B cells and effect of interferon-beta in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;122:125-131.
145. Kivisäkk P, Cotleur AC, Lee JC, Rudick RA, Ransohoff RM. Interferon-beta 1a does not reduce expression of CCR5 and CXCR3 on circulating T cells. *J Neuroimmunol* 2003;141:150-154.
146. Sørensen TL, Sellebjerg F. Distinct chemokine receptor and cytokine expression profile in secondary progressive MS. *Neurology* 2001;57:1371-1376.
147. Rieckmann P, Altenhofen B, Riegel A, Kallmann B, Felgenhauer K. Correlation of soluble adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid with magnetic resonance imaging activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998;4:178-182.
148. Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundstrom E, Ehrlich S, Wernecke KD, Volk HD, Zipp F. TNF-

related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 2003;361:2036-2043.

149. Petereit HF, Nolden S, Schoppe S, Bamborschke S, Pukrop R, Heiss WD. Low interferon gamma producers are better treatment responders: a two-year follow-up of interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2002;8:492-494.
150. Yamauchi K, Akbar SM, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3alpha in chronic viral hepatitis: prognostic importance of macrophage inflammatory protein-3alpha during interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2002;9:213-220.
151. Lesnikov VA, Efremov OM, Korneva EA, Van Damme J, Billiau A. Fever produced by intrahypothalamic injection of interleukin-1 and interleukin-6. *Cytokine* 1991;3:195-198.
152. Martínez-Cáceres EM, Río J, Barrau M, Durán I, Borrás C, Tintoré M, Montalban X. Amelioration of flulike symptoms at the onset of interferon beta-1b therapy in multiple sclerosis by low-dose oral steroids is related to a decrease in interleukin-6 induction. *Ann Neurol* 1998;44:682-685.
153. Tavares E, Miñano F. RANTES: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. *Neuropharmacology* 2000;39:2505-2513.
154. LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol* 1990;258:R798-R803.
155. Davatelis G, Wolpe SD, Sherry B, Dayer JM, Chicheportiche R, Cerami A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* 1989;243:1066-1068.
156. Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992;148:2423-2428.

8 Anhänge

Anhang 1: Schriftlicher Aufklärungsbogen

Bayerische Julius-Maximilians-Universität

Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität

Josef-Schneider-Str. 11 • 97080 Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Klaus Toyka



Information für die teilnehmenden MS-Patienten und Einverständniserklärung

Untersuchung systemischer Wirkungen von Interferon beta und Glatirameracetat bei Patienten mit multipler Sklerose

Sehr geehrte Studienteilnehmerin,
sehr geehrter Studienteilnehmer!

Interferon beta ist das erste Medikament, für das ein eindeutiger positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf der multiplen Sklerose (MS) in mehreren großen Studien nachgewiesen werden konnte. Der Hauptwirkmechanismus dieses Medikaments ist bis heute unbekannt. Ein näheres Verständnis des Prinzips, das bei einer Behandlung mit Interferon beta für die Dämpfung der Krankheitsaktivität verantwortlich ist, kann uns zu einem tieferen Krankheitsverständnis führen. Hieraus können sich Erkenntnisse für

eine neue, noch wirksamere Therapie ergeben. Darauf sind all unsere Anstrengungen ausgerichtet, und wir würden uns sehr freuen, wenn Sie uns darin unterstützen.

Aufgrund verschiedener bereits durchgeführter Untersuchungen wissen wir, daß bei der Entstehung entzündlicher Herde im Gehirn bei multipler Sklerose die Ausschüttung einer bestimmten Gruppe von Botenstoffen, der sogenannten Chemokine, eine ganz entscheidende Rolle spielt. Wir wissen außerdem, daß Interferon beta die Produktion dieser Botenstoffe erheblich beeinflussen kann. Ziel unserer Studie ist es, die Auswirkungen von Interferon beta auf die Blutspiegel dieser Botenstoffe zu untersuchen. Wir hoffen und sind zuversichtlich, daß sich hieraus neue Erkenntnisse ergeben, die uns zu einem tieferen Verständnis von Wirkungen und Nebenwirkungen führen. Nach Abschluß der Studie werden wir Sie in allgemeinverständlicher Form über die Ergebnisse informieren.

Geplanter Ablauf

Sieben Tage vor Ihrer Studienteilnahme sollten Sie, wenn möglich, auf die Einnahme von Schmerzmitteln und fiebersenkenden Medikamenten verzichten, da diese die Spiegel der zu messenden Botenstoffe beeinflussen könnten. Am Tag vor der Studienteilnahme sollten Sie sich kein Medikament injizieren. Ein entsprechender Termin, der ein Verbleiben in Ihrem gewohnten Rhythmus garantiert, wird mit Ihnen vereinbart. Am ersten Tag der Studie treffen wir uns dann um 13 Uhr an der Pforte der Neurologischen Klinik. Nach einer Klärung evtl. noch offener Fragen folgt eine Blutentnahme (25 ml; ein Teil der Probe dient dem Ausschluß einer akuten Infektion, die die Botenstoffspiegel beeinflussen könnte). Anschließend injizieren Sie sich Ihr gewohntes Medikament (bitte mitbringen). Durch ein eventuelles Vorziehen der Injektion um einige Stunden im Vergleich zu Ihrer gewohnten Injektionszeit ist kein nachteiliger Effekt auf die Wirkung des Medikaments zu befürchten. 6 Stunden nach der Injektion (ca. 19.30 Uhr) wird dann eine zweite Blutprobe (15 ml) entnommen. Am nächsten Tag erfolgt 24 Stunden nach der Injektion gegen 13.30 Uhr eine weitere Blutentnahme (15 ml). Vor den Blutentnahmen erfolgt jeweils eine rektale Temperaturmessung. Diese garantiert eine höhere Genauigkeit als eine Temperaturmessung unter der Zunge oder der Achsel. Außerdem bitten wir Sie, evtl. auftretende grippeartige Nebenwirkungen sorgfältig auf dem zusammen mit dieser Patientenaufklärung ausgehändigten Bogen jeweils zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen zu notieren. Die Ergebnisse der Temperaturmessungen und Ihre Angaben sollen später mit den gemessenen Blutspiegeln der Botenstoffe verglichen werden.

Verschiedene Medikamente, die im Falle grippeartiger Nebenwirkungen häufig zur Anwendung kommen (z.B. Paracetamol, Aspirin, Ibuprofen, Voltaren u.a.), können die untersuchten Botenstoffe z.T. erheblich beeinflussen. Achtung: Sollte aufgrund von Nebenwirkungen eine Einnahme von Medikamenten, auch in der Woche vor der Studienteilnahme, nötig sein, informieren Sie uns bitte darüber! Dies müßte in der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden; Ihnen würden daraus aber keinerlei Nachteile entstehen. Sollte in der Woche vor der Studienteilnahme eine Einnahme eines der oben erwähnten Präparate notwendig sein, kontaktieren Sie uns bitte (Dr. Buttman, Tel. 0931 / 201 2 47 19, anrufen lassen). Wir würden dann einen neuen Termin für die Studienteilnahme mit Ihnen vereinbaren.

Datenschutz

Alle im Rahmen dieser Studie anfallenden Daten werden selbstverständlich nur in anonymisierter Form, d. h. ohne Name und Adresse des Patienten und ohne Angaben, die eine Identifikation des teilnehmenden Patienten ermöglichen könnten, in der Neurologischen Klinik von den Studienärzten wissenschaftlich ausgewertet und in einem medizinischen Fachblatt veröffentlicht. Die Belange der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes werden voll gewahrt.

Rücktrittsrecht

Ihre Entscheidung zur Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Falls Sie nicht an dieser Studie teilnehmen möchten, werden Ihnen keine Nachteile entstehen. Sie sollten die Einverständniserklärung nur unterzeichnen, wenn Sie ausreichend Gelegenheit hatten, Fragen zu stellen und diese zufriedenstellend und klar beantwortet wurden. Sie haben jederzeit das Recht, auch nach Studienbeginn ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme zu widerrufen, ohne daß Ihnen hierdurch für Ihre weitere medizinische Betreuung irgendwelche Nachteile entstehen. Aufgrund des vernachlässigbaren Risikos venöser Blutentnahmen wurde keine Probandenversicherung abgeschlossen.

Fahrtkosten

Für Ihre An- und Abreisen an den beiden Studientagen können wir Ihnen die Kosten einer Bahnfahrt zweiter Klasse oder bei An- und Abreise mit dem Auto eine Kilometerpauschale erstatten. Bitte teilen Sie uns hierzu am zweiten Studientag die Kosten Ihrer Bahnfahrkarten oder die Anzahl der gefahrenen Kilometer mit.

**Untersuchung systemischer Wirkungen von Interferon beta
und Glatirameracetat bei Patienten mit multipler Sklerose**

Einverständniserklärung

Ich habe die vorliegende Patienteninformation aufmerksam gelesen und verstanden. Meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet. Weitere Fragen hierzu habe ich nicht. Durch meine Unterschrift erkläre ich mein Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Mit der oben bezeichneten Speicherung und Nutzung meiner persönlichen Daten in anonymisierter Form bin ich einverstanden.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift der Patientin/des Patienten

Anhang 2: Fragebogen zur Erhebung subjektiver Grippe-Symptome

**Nebenwirkungs-Fragebogen zur Studie
„Systemische Wirkungen von Interferon beta“**

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Pat.-Nr.:



Bitte bewerten Sie die einzelnen Symptome zu den angegebenen Zeitpunkten mit Zahlen von 0 bis 5. Die Zahlen bedeuten:

0 = überhaupt nicht

1 = sehr schwach

2 = schwach

3 = mittel

4 = stark

5 = sehr stark

	direkt vor Injektion	6 Stunden nach Inj.	24 Stunden nach Inj.
Muskel-/Gliederschmerzen			
Kopfschmerzen			
Körperliche Abgeschlagenheit/ Schwäche/körperliches Unwohlsein			
Lustlosigkeit/Antriebslosigkeit			
Frieren/Schüttelfrost			
Schwitzen			
Übelkeit			
Zunahme neurologischer Symptome (z.B. Schwäche, Spastik, Gefühls- störung, Sehstörung, Blasenstörung)	0	(Vergleich: vor Injektion)	(Vergleich: vor Injektion)
Einschränkung der Alltagsaktivitäten durch Interferon-Nebenwirkungen	0	(Vergleich: vor Injektion)	(Vergleich: vor Injektion)

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter Rieckmann, bedanken, der mir die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und mit großer Freundlichkeit begleitet hat. Besonderen Dank verdient Herr Dr. Mathias Buttman, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Vera Hummel, die mich in verschiedenen Krisen der Forschungstätigkeit wieder aufgemuntert hat, und Frau Bettina Meyer, die mich in die ELISA-Technik eingeführt hat. Darüber hinaus möchte ich der ganzen Klinischen Forschungsgruppe für Multiple Sklerose der Universität Würzburg danken, in der ich mich sehr wohl gefühlt und viel gelernt habe.

Danken möchte ich außerdem meinen Eltern und Geschwistern, die mein ganzes Leben mit ihrer Liebe begleiten.

Lebenslauf

Persönliches geboren am 26.08.1980 in Göttingen, ledig

Berufliche Tätigkeit

seit 01/08 Assistenzärztin, Juliusspital Würzburg, Abteilung für Gastroenterologie und Rheumatologie

Ausbildung

12/07 Approbation

11/07 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

08/06 – 07/07 Praktisches Jahr in der Kinderklinik der Universität Würzburg, der internistischen Abteilung des Klinikums Aschaffenburg und der chirurgischen Abteilung des Policlinico Universitario A. Gemelli, Rom

08/02 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,6)

10/00 – 12/08 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Stipendiatin der „Studienstiftung des deutschen Volkes“

09/99 – 06/00 Freiwilliges Soziales Jahr bei Cork Simon Community, Irland
Betreutes Wohnen für Obdachlose

08/96 – 12/96 Austauschschülerin Katedralskole Bergen, Norwegen

08/86 – 06/99 Schulbesuch in Göttingen
Abitur am Max-Planck-Gymnasium (Note 1,0)

Würzburg, den 1. April 2009