

Autoimmunität und Infektionsimmunologie in der Pathogenese und

Therapie der Multiplen Sklerose

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Neuroimmunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Klaus-Peter Wandinger

geboren am 30.8.1966 in Schwäbisch Gmünd

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

eingereicht: 6. Juni 2003

Datum der Habilitation: 4. Dezember 2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld

2. Prof. Dr. med. Wolfgang Brück

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig verfaßt. Sie faßt acht von mir als Erstautor, gleichberechtigter Erstautor oder Letztautor erstellte Arbeiten (Wandinger et al. 1997, Hennig et al. 1998, Strunk et al. 2000, Wandinger et al. 2000, Wagner et al. 2000, Wandinger et al. 2001, Muraro & Wandinger et al., 2003, Wandinger et al. 2003), eine in Kollaboration mit Herrn Dr. Suhayl Dhib-Jalbut entstandene Arbeit (Wang et al. 2000), eine in Kollaboration mit Herrn Dr. Takayuki Kondo entstandene Arbeit (Kondo et al. 2001), sowie eine in Kollaboration mit Frau Dr. Silva Markovic-Plese entstandene Arbeit (Markovic-Plese et al. 2001) zusammen. Inhaltlicher Schwerpunkt der Arbeiten sind Untersuchungen zur Bedeutung von Autoimmunität und Infektionsimmunologie in der Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. Einige Daten, die in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. Paolo Muraro und Dr. Ben Segal entstanden und die noch nicht zur Publikation eingereicht sind, werden ebenfalls dargestellt. Aus einer in Kollaboration mit Herrn Professor Roland Martin entstandenen Arbeit (Stürzebecher et al. 2003) sind die gemeinsam gewonnenen Daten besprochen. Diese Ergebnisse sind dann ausführlich dokumentiert, während sich bereits publizierte Daten im Detail in den im Anhang befindlichen Originalarbeiten (Referenzen) nachlesen lassen. Dort findet sich auch die Beschreibung der verwendeten Methoden. Innovative Kernmethoden der Arbeit (quantitative Taqman-PCR sowie globale Genexpressionsanalyse mit cDNA Microarrays) werden exemplarisch dargestellt.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. Holger Kirchner, der mich in meiner Entscheidung bestärkte und kontinuierlich bei meinem Weg unterstützte, vor Eintritt in die Neurologie eine umfangreiche und fundierte immunologische Ausbildung, zunächst in seinem eigenen Institut und anschließend in einer international renommierten Forschungseinrichtung, zu durchlaufen. Mit seiner großzügigen Unterstützung war es mir von Beginn des AIP an möglich, in eigenständigen Projekten immunologische Grundlagenforschung mit klinischer MS-Forschung zu verbinden.

Ich danke Herrn Professor Dr. Roland Martin, Section Chief an der Neuroimmunology Branch, NINDS, NIH, Bethesda, USA für die Möglichkeit, im Rahmen eines DFG-Forschungsstipendiums innovative molekularbiologische Methoden der immunologischen Grundlagenforschung zu erlernen und auf klinische Fragestellungen anzuwenden.

Frau Professor Dr. Frauke Zipp danke ich für die hervorragenden Rahmenbedingungen des wissenschaftlichen Arbeitens in ihrem Labor nach meiner Rückkehr aus den USA an die Charité.

Bei Herrn Dr. Holger Hennig bedanke ich mich für die langjährige konstruktive und erfolgreiche Zusammenarbeit. Für stimulierende Diskussionen und Hilfe in vielfältiger Weise bedanke ich mich bei Herrn Dr. Hans-Joachim Wagner, Herrn Dr. Wolfram Jabs, Herrn Dr. Orhan Aktas und Herrn Dr. Jan Lünemann.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Aja Marxen (geb. Siekhaus), Herrn Dr. Tobias Strunk sowie Herrn Oliver Wengert, die im Rahmen ihrer Dissertationsarbeiten durch ihre Kreativität und Selbständigkeit einen großen Anteil zum Gelingen einzelner Projekte beigetragen haben.

Für ausgezeichnete technische Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Nicole Martens (geb. Heindl), Frau Bibiane Seeger und Frau Susan Pikol.

Mein besonderer Dank gilt den zahlreichen Patienten, die sich im Laufe der Jahre bereit erklärt haben, bei den diversen immunologischen Studien mitzuwirken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Karin für ihren Rückhalt und ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

Autoimmunität und Infektionsimmunologie in der Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung: Aktuelle Konzepte der Immunpathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose	6
2. Stellenwert von Autoimmunität und Infektionsimmunologie in Pathogenese und Therapie der MS	10
2.1. Die Rolle nicht adaptiver Immunprozesse (innate immunity) bei der MS	
2.1.1. Das endogene Interferonsystem (Referenz 1)	11
2.1.2. Dendritische Zellen (Referenz 2)	13
2.2. Untersuchungen zur Bedeutung des Epstein-Barr Virus in der Pathogenese der MS	15
2.2.1. Prävalenz und Antikörperprofil (Referenz 3)	16
2.2.2. Reaktivierung und Krankheitsaktivität (Referenz 4)	17
2.2.3. Abgrenzung zum Marek's Disease Virus (Referenz 5)	18
2.3. Entwicklung immunologischer Marker der Krankheitsaktivität	18
2.3.1. Der Chemokinrezeptor CCR5 (Referenz 6)	19
2.3.2. Die β_2 -Kette des Interleukin-12 Rezeptors	20
2.3.3. Die Rolle CD28 negativer T-Zellen (Referenz 7)	23
2.3.4. Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen (Referenz 8)	25
2.4. Identifizierung therapeutischer Kandidatengene	26
2.4.1. Einfluß von IFN- β auf Interleukin-12 (Referenz 9)	26
2.4.2. Pleiotrope Wirkung von IFN- β (Referenz 10)	27
2.4.3. TRAIL als prognostischer Marker des IFN- β	
Therapieerfolges (Referenz 11)	29
2.4.4. Responderprofile der IFN- β Therapie	31

3. Zusammenfassung und Ausblick	33
4. Verzeichnis der Abkürzungen	36
5. Zitierte Literatur	37
6. Anhang	
Akademische Positionen	46
Stipendien und Preise	46
Wissenschaftlicher Werdegang	47
Publikationsliste	50
7. Referenzen: Ausgewählte Publikationen und Manuskripte	54

1. Aktuelle Konzepte der Immunpathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste Erkrankung in Europa und Nordamerika, die bereits im frühen Erwachsenenalter zu dauerhafter und schwerwiegender neurologischer Behinderung führt. Nach experimentellen und klinischen Daten handelt es sich bei der MS um eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Autoimmunkrankheit des zentralen Nervensystems (ZNS), bei der bereits in der Frühphase neurodegenerative Veränderungen beobachtet werden (Noseworthy et al. 2000; Compston und Coles 2002). Die Ursache der Erkrankung ist unbekannt. Aus dem gehäuften familiären Auftreten der MS sowie der Assoziation mit bestimmten HLA-Antigenen (DR 15/DQ 6) läßt sich jedoch ableiten, daß zur Entstehung der Erkrankung genetische Faktoren beitragen (Dyment et al. 1997). So ist für einen homozygoten Zwilling, dessen Geschwister an einer Multiplen Sklerose erkrankt ist, das relative Risiko, ebenfalls an einer MS zu erkranken, 250-300 fach höher als in der Normalbevölkerung. Die Ergebnisse der Zwillingsstudien zeigen jedoch auch, daß die genetische Prädisposition alleine nicht ausreichend für die Entstehung einer MS ist.

Die geographisch ungleiche Verteilung der MS mit einem deutlichen Nord-Süd-Gefälle, die Ergebnisse von Migrationsstudien die zeigen, daß das relative Risiko des Umfeldes bis zum Erreichen des 15. Lebensjahres angenommen wird, sowie das Auftreten von MS-Epidemien legen nahe, daß Umwelteinflüsse, und hier am ehesten Viren, eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen (Gale und Martyn, 1995). Die Analogie des histopathologischen Befundes von MS-Läsionen mit viralen Tiermodellen (z.B. Coronavirus, Theilervirus) (Stohlmann und Hinton 2001) und humanen Erkrankungen, die durch neurotrope Viren verursacht werden, spricht ebenfalls für eine Beteiligung von Viren an den pathogenetischen Mechanismen der MS (Johnson 1994). Weitere, indirekte Evidenz geben die abnorme Immunantwort bei MS Patienten gegenüber einer Reihe von Viren (Neighbour et al. 1981; Jacobson et al. 1985) sowie die Wirksamkeit von Interferon (IFN)- β , eines Zytokins mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften, in der Therapie der MS.

Gegenwärtige immunpathogenetische Konzepte basieren darauf, daß die Pathologie im ZNS durch autoreaktive T-Zellen im Rahmen einer Autoimmunantwort gegen Bestandteile der Myelinscheiden verursacht wird, die eine Demyelinisierung und Axondegeneration zur Folge hat (Martin et al. 1992). Eine Voraussetzung für die Einwanderung autoreaktiver T-Zellen in das Zielorgan ist ihre vorgehende Aktivierung in der Peripherie mit konsekutiver Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche, die die Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen (Archelos und Hartung 1997; Sellebjerg et al. 2000; Strunk et al 2000). Bei der Aktivierung proinflammatorischer T-Zellen wird hierbei dem Zytokin Interleukin-12 (IL-12) eine besondere Rolle zugeschrieben (Trinchieri 1993). Nach Kontakt mit ihrem Zielantigen im ZNS erfolgt eine Reaktivierung und es wird eine Schadenskaskade in Gang gesetzt, in deren Folge es zur Demyelinisierung und Axondegeneration kommt. Zu den Schadensmechanismen zählen neben direkter, Lymphozyten-vermittelter Zytotoxizität die Sekretion proinflammatorischer, sogenannter TH-1 Zytokine wie dem Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Beck et al. 1988; Selmaj und Raine 1988). Die lokale, inflammatorische Reaktion, in die auch B-Lymphozyten und Makrophagen eingebunden sind, wird durch Chemokin-vermittelte Rekrutierung weiterer Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS aufrecht erhalten. Sowohl bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie, aber auch bei deren Restimulation im ZNS könnten bei diesem immunpathogenetischen Modell Viren eine bedeutende Rolle spielen (Abbildung 1).

Aus der klinischen Beobachtung ist bekannt, daß der Verlauf der Erkrankung von einer breiten Heterogenität gekennzeichnet ist (Weinshenker et al. 1989). So beginnt die Erkrankung bei 90 % der Patienten mit einem schubförmig-remittierendem Verlauf, der nach 10 Jahren bei 50 % der Erkrankten in eine sekundär chronische progrediente Form übergeht. Bei 10 % der Patienten zeigt sich von Anfang der Diagnosestellung an ein primär chronisch progredienter Verlauf. Ein benigner Verlauf mit relativ geringer Behinderung nach einer Krankheitsdauer von 10 Jahren findet sich bei immerhin 30 % der Patienten. Die Schwierigkeit zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt darin, daß es bislang keine prognostischen, immunologischen Marker gibt, die den individuellen Verlauf einzelner Patienten vorhersagen. In den kernspintomographischen Studien der vergangenen Jahre zeigte sich andererseits, daß die MS auch während Phasen vermeintlicher klinischer Stabilität subklinisch

aktiv sein kann (McFarland et al. 1992). Für die Versorgung von MS Patienten sind daher dringend Aktivitätsmarker erforderlich, die frühzeitig die Indikation zu einer Therapie anzeigen und gleichzeitig vor einer ungewollten Behandlung des benignen Verlaufs schützen.

Die immunmodulatorische Behandlung der Multiplen Sklerose hat in den letzten Jahren durch die positiven Ergebnisse mehrerer großer, multizentrisch durchgeführter Therapiestudien einen wichtigen Durchbruch erlebt (Martin et al. 2001; Goodin et al. 2002). Gegenwärtig zählen zu den spezifisch für die Behandlung der MS mit unterschiedlichen Indikationen zugelassenen Substanzen die IFN- β Präparate, das Glatirameracetat sowie das Zytostatikum Mitoxantron. Die Wirksamkeit dieser Substanzen bei der MS wurde in Klasse I Evidenzstudien klinisch durch eine signifikante Reduktion der Schubfrequenz bzw. der Krankheitsprogression oder paraklinisch durch eine Reduktion der Läsionslast in der Kernspintomographie eindeutig belegt. (The IFNB multiple sclerosis study group 1995; Jacobs et al. 1996; Johnson et al. 1998; PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon β -1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group 1998; Hartung et al. 2002). In der individuellen, klinischen Anwendung zeigt sich jedoch, daß die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen noch immer bei einem Großteil der Patienten nicht den gewünschten Erfolg zeigen. Hinweise aus histopathologischen Untersuchungen unterstützen die klinisch beobachtete Heterogenität der MS, die die Etablierung einheitlicher Therapien für alle MS-Patienten in Frage stellen (Lassmann et al. 2001). Eine wichtige Aufgabe neuroimmunologischer Forschung ist es daher, prädiktive Marker des individuellen Therapieerfolges zu entwickeln, um frühzeitig Therapieresponder von Nonrespondern zu unterscheiden. Ein besseres Verständnis der Wirkweise derzeit eingesetzter Therapieverfahren ist ferner erforderlich, um die pathogenetischen Mechanismen der MS weiter zu entschlüsseln und gezielt neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Zusammenfassend ergeben sich somit zahlreiche ungeklärte Fragen mit unmittelbarer klinischer Relevanz an die neuroimmunologische Grundlagenforschung. Die Bearbeitung wesentlicher dieser Fragestellungen ist Gegenstand der vorliegenden Habilitationsarbeit.

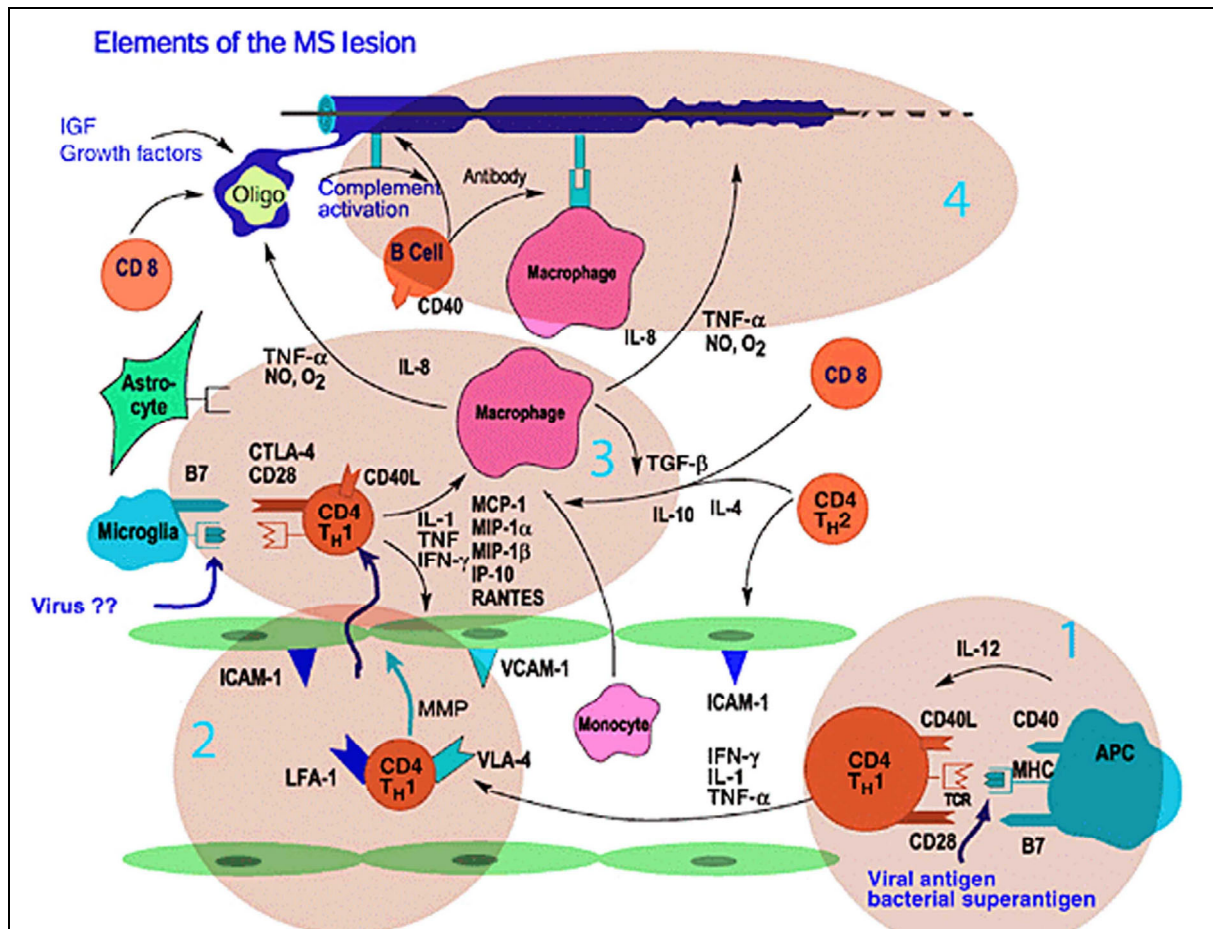


Abbildung 1. Immunpathogenese der Multiplen Sklerose. Die wesentlichen pathogenetischen Schritte beinhalten: (1) die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie; (2) die Migration proinflammatorischer T-Zellen und Monozyten über die Blut-Hirn-Schranke; (3) die Verstärkung der lokalen Entzündungsreaktion und Aktivierung ortsständiger Antigen-präsentierender Zellen, z.B. Microglia; (4) die Effektorphase der Erkrankung mit Zerstörung der Oligodendrozyten, Myelinscheiden und Axone. Modifiziert nach Martin et al., Nat. Immunol. 2001.

2. Stellenwert von Autoimmunität und Infektionsimmunologie in Pathogenese und Therapie der MS

Bevor autoreaktive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und zur Zerstörung der Markscheiden im ZNS beitragen können ist ihre Aktivierung in der Peripherie erforderlich (Abbildung 1). Aus der klinischen Beobachtung ist bekannt, daß virale Infektionen des oberen Respirationstraktes bei MS-Patienten häufig Schübe hervorrufen (Sibley et al. 1985; Panitch et al. 1994; Edwards et al. 1998). Es ist daher ein logischer, infektionsimmunologischer Forschungsansatz, nach viralen Mustern zu suchen, die autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu aktivieren vermögen (Hunter und Hafler 2000). Als Mechanismus einer Aktivierung potentiell enzephalitogener T-Zellen während einer viral ausgelösten Immunantwort kommt einerseits das Prinzip der *molecular mimicry* in Betracht (Fujinami und Oldstone 1995). Dabei handelt es sich um ein Phänomen, bei dem auf Grund von Sequenzhomologien zwischen einem Fremdartigen und einem Autoantigen durch Kreuzaktivierung eine Immunantwort gegen körpereigene Bestandteile initiiert wird (Abbildung 2A). Eine genetische Prädisposition einzelner Individuen durch die Expression bestimmter HLA-Moleküle ist mit diesem Konzept vereinbar. In den letzten Jahren ist deutlich geworden, daß eine spezifische T-Zelle viele verschiedene Antigene erkennen kann (Hemmer et al., 1998). Auf Grund dieser weitgehend degenerierten Antigenerkennung erweitern sich noch die Möglichkeiten einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch virale Erreger (Hemmer et al. 1997). Im Rahmen der spezifischen Auseinandersetzung des Organismus mit einem Virus wäre alternativ eine indirekte Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im Sinne einer *bystander activation* denkbar. Diesem Prinzip liegt eine unspezifische Aktivierung enzephalitogener Zellen durch die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine mit konsekutiver Induktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auch auf autoreaktiven T-Zellen im Rahmen der antiviralen Immunantwort zugrunde (Abbildung 2B). Denkbar ist auch eine Stimulation zirkulierender autoreaktiver T-Lymphozyten durch *Superantigene*. Hierbei handelt es sich um mikrobielle Proteine, die den HLA-Komplex antigen-präsentierender Zellen mit einer Untereinheit des T-Zell-Rezeptors, der sogenannten V_{β} -Kette, verknüpfen. Somit aktiviert ein Superantigen alle T-Zellen (auch autoreaktive Lymphozyten), die ein bestimmtes V_{β} -Gen exprimieren (Abbildung 2C). Da ihre Bindungsstellen

außerhalb der Antigenbindungsstelle liegen, ist die Bindung eines Superantigens unabhängig von der Antigenpezifität der Zelle (oligoklonale Aktivierung). Die resultierende T-Zell-Aktivierung ist allerdings abhängig von der genetisch determinierten Expression bestimmter HLA-Moleküle. Im ZNS selbst läßt sich der Prozeß der Demyelinisierung ebenfalls als Folge einer Immunantwort gegen ein persistierendes, latentes Virus verstehen, die durch kurzzeitige Expression viraler Antigene determiniert wird (Rodriguez et al., 1996).

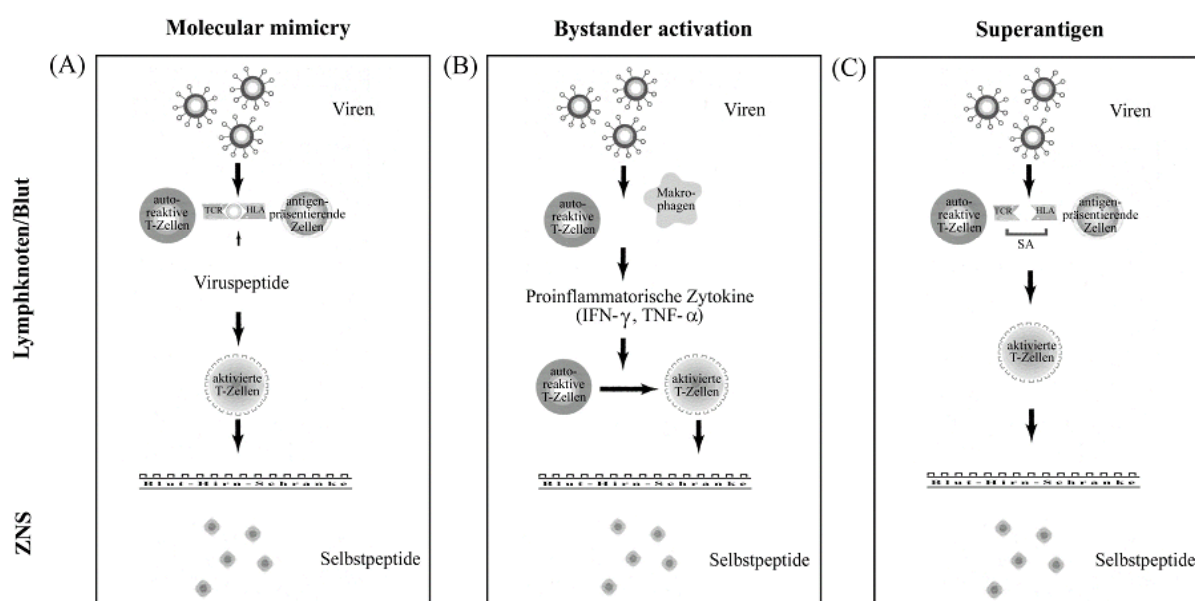


Abbildung 2. Mögliche Mechanismen der peripheren Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im Rahmen einer antiviralen Immunantwort. TCR: T-Zell-Rezeptor; HLA: Humane Leukozytenantigene; SA: Superantigen. Modifiziert nach Zipp und Wandinger, Nervenarzt 2001.

2.1. Die Rolle nicht-adaptiver Immunprozesse (innate immunity) bei der MS

2.1.1. Das endogene Interferonsystem (Referenz 1)

Das Interferon-System stellt einen integralen Bestandteil der Körperabwehr gegen Virusinfektionen dar (Belardelli und Gresser 1996). Die antiviralen Effekte der Interferone (IFN) sind hauptsächlich auf die Typ-I $\text{IFN-}\alpha$ und $\text{-}\beta$ zurückzuführen. Im Frühstadium einer Infektion, d.h. wenn noch keine spezifische Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten oder durch Antikörper nachweisbar ist, sind sie maßgeblich an der Viruselimination beteiligt. Eine fehlende oder inkomplette Virusclearance kann zu chronischen Infektionsverläufen führen. Der Infektionsverlauf

wird daher maßgeblich durch die körpereigene Interferonsekretion als wesentlichem Bestandteil der unspezifischen, nicht-adaptiven Immunantwort bestimmt. Durch ihre antiproliferativen und immunregulatorischen Eigenschaften wirken IFN andererseits gleichzeitig einer Überreaktion oder einer fehlgesteuerten Immunantwort entgegen. Es wäre daher denkbar, daß Alterationen im endogenen IFN-System bei MS Patienten eine Prädisposition für eine unkontrollierte und chronifizierte Immunantwort im Rahmen viraler Infekte darstellen, die mit einer erhöhter Gefahr des Auftretens von Autoimmunprozessen bzw. der Zerstörung körpereigener Strukturen einhergeht. Es gibt wenige Arbeiten, die die Fähigkeit zur Produktion von körpereigenen Typ-I IFN in Antwort auf virale Induktion bei MS-Patienten untersuchen, und die Ergebnisse sind widersprüchlich (Übersichtsarbeit von Arnason und Reder, 1994). Neighbour und Mitarbeiter (1981) fanden eine allgemein verminderte IFN-Antwort bei MS-Patienten, während andere Autoren über normale IFN-Produktion berichten (Tovell et al., 1983; Haahr et al., 1986). In eigenen Arbeiten zur Untersuchung des körpereigenen IFN-Systems bei Patienten mit MS konnten wir zeigen, daß das Zytokinsystem bei MS Patienten zahlreichen funktionellen Einschränkungen unterliegt (Wandinger et al. 1997, **Referenz 1**). Bei der Untersuchung von Blutleukozyten von MS Patienten zeigte sich, daß die IFN- α Synthesekapazität nach Stimulation mit Newcastle Disease Virus (NDV), einem potenten Induktor von Typ-I IFN, bei Patienten mit klinisch stabiler MS im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt war. Der Grund für die verminderte IFN-Produktion ist unklar, insbesondere da keine Unterschiede in Anzahl und Verteilung der peripheren Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen vorlagen. Von besonderem Interesse ist jedoch unsere Beobachtung, daß Blutleukozyten von einer Patientensubpopulation, die im Rahmen eines Krankheitsschubes untersucht wurden, eine normale Interferonproduktion zeigten, die mit der des Kontrollkollektives vergleichbar war. Es läßt sich daraus schließen, daß die Fähigkeit zur Produktion von Typ-I IFN in einer engen Beziehung zum Ausmaß der Krankheitsaktivität steht. In späteren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die Fähigkeit zur IFN- β Synthese in Antwort auf virale Stimulation in Blutleukozyten von MS Patienten ebenfalls eingeschränkt ist (Wandinger et al., 1998a). Die Befunde legen nahe, daß bei MS Patienten eine primäre Beeinträchtigung der Typ-I IFN Genexpression vorliegt. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen aber auch, daß im Rahmen der Entzündungsaktivität bei Krankheitsschüben, primär oder reaktiv, eine Aktivierung

des endogenen IFN-Systems stattfindet. Es wäre denkbar, daß Typ-I IFN hierbei durch ihre immunregulatorischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei den Prozessen spielen, die zur Einleitung einer Remission führen (Traugott und Lebon, 1988).

2.1.2. Dendritische Zellen (Referenz 2)

Dendritische Zellen (DC) stellen die potentesten APC innerhalb des Immunsystems dar (Delon et al. 1998). An ihrer Zelloberfläche weisen sie eine hohe Expressionsdichte an HLA- und costimulatorischen Molekülen auf und sind durch eine hohe IL-12 Synthesekapazität gekennzeichnet. Eine mögliche Rolle DC in der Pathogenese der MS wurde daher mehrfach diskutiert. (Link et al. 1999; Drake-Smith et al. 2000). Tatsächlich wurde bei MS Patienten eine erhöhte Anzahl zirkulierender DC beschrieben (Huang et al. 1999).

In Zusammenarbeit mit Dr. T. Kondo untersuchten wir die Interaktion zwischen humanen, myeloischen DC und T-Zellklonen (Kondo et al. 2001, **Referenz 2**). Hierbei gelang uns die Identifizierung eines selektiv durch DC mediierten Aktivierungsmusters allo- und autoantigen spezifischer T Zellen, das mit einer verlängerten Überlebensdauer der T-Zellen *in vitro* korrelierte. Wir konnten ferner zeigen, daß diese durch DC vermittelte Aktivierung mit einer Antigen unabhängigen Geninduktion proinflammatorischer Zytokine (insbesondere von IFN- γ sowie der funktionell relevanten β_2 -Untereinheit des IL-12 Rezeptors) einhergeht und somit das lokale Zytokinmilieu im Rahmen der T-Zell Aktivierung beeinflusst. Auf Grund dieser Antigen-unabhängigen Aktivierung von T-Zellen spielen DC eine bedeutende Rolle bei der Wahrung der Homöostase und somit auch der Kontrolle allo- und autoantigen spezifischer T-Zellen. DC könnten somit bei der Initiierung und Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen, wie sie im Rahmen der MS diskutiert werden, eine zentrale Rolle spielen.

Die Bestimmung der quantitativen Genexpression der DC erfolgte mit Hilfe der realtime-PCR (Taqman-PCR). Das Prinzip der Methode ist exemplarisch auch für die nachfolgenden Arbeiten in Abbildung 3 dargestellt. Im Mittelpunkt der Methode steht eine zweifach fluoreszenzmarkierte Sonde, die im Bereich zwischen dem Forward und Reverse Primer an das Amplikon bindet. Im intakten Zustand wird das Fluoreszenzsignal des Reportes am 5'Ende durch das Emissionsspektrum des Quenchers am 3'Ende der Sonde auf Grund der räumlichen Nähe unterdrückt. Im

Falle einer Amplifikation wird der Reporter im Rahmen der hydrolytischen Degradation der Sonde freigesetzt (siehe Abbildung 3A). Die durch Ablösen des Reporters erzeugte Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes der Sonde wird während des gesamten Reaktionsablaufes aufgezeichnet. Die Ausgangsmenge an DNA/RNA korreliert dabei mit der Zeit (gemessen in PCR-Zyklen), bei der die Fluoreszenzemission einen bestimmten Schwellenwert überschreitet (siehe Abbildung 3B). Durch den direkten Nachweis des Amplifikationsproduktes über den gesamten Verlauf der PCR wird bei der Taqman-PCR erstmals eine objektive Quantifizierung ermöglicht. Die hohe Sensitivität und Reliabilität des Nachweisverfahrens gewährleistet zudem optimale Voraussetzungen für die quantitative Untersuchung von Genexpression. Gleichzeitig ist durch den Einsatz einer zusätzlichen DNA-Sonde eine hohe Spezifität der Reaktion gegeben. (Heid et al. 1996).

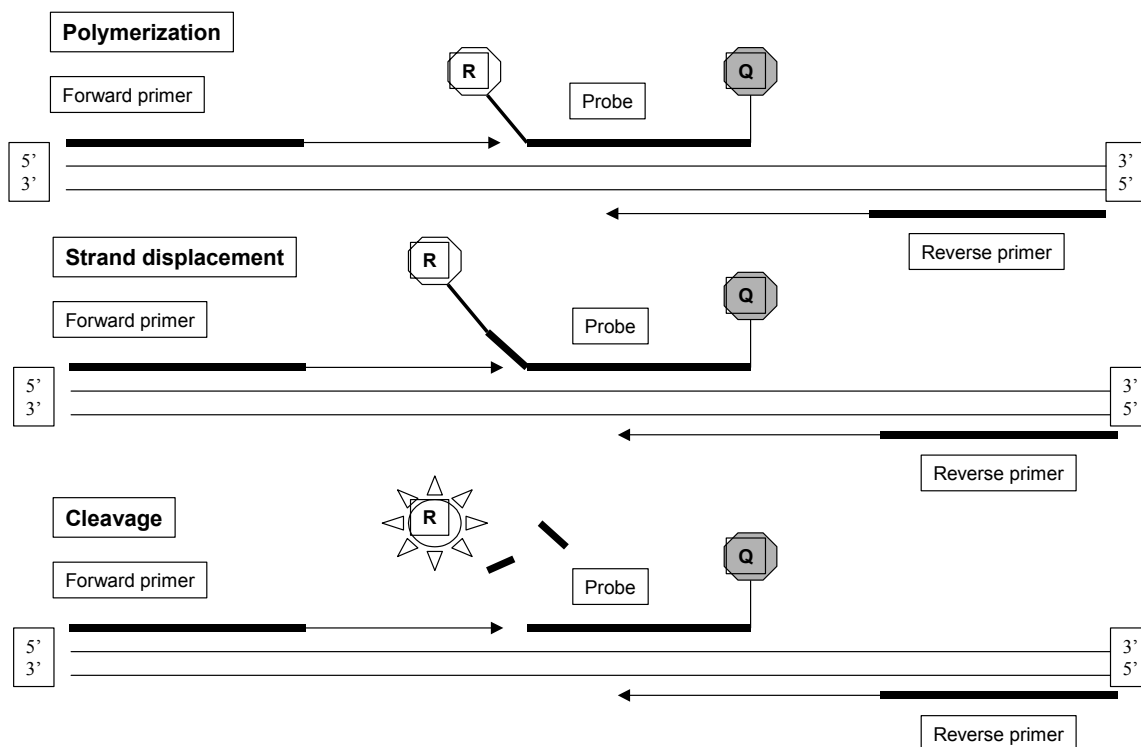


Abbildung 3A: Schematische Darstellung des Prinzips der Taqman-PCR. Der Einsatz einer fluoreszierenden Taqman-Sonde erlaubt einen direkten Nachweis der PCR-Produkte noch während der laufenden Reaktion. Voraussetzung ist die Aktivierung der 5'→3'-Exonuklease, welche die Taqman-Sonde spaltet, wodurch der Fluoreszenz-Energie-Transfer vom Rezeptor (R)-Farbstoff zum sog. Quencher (Q) unterbrochen wird. Dadurch wird ein Anstieg der Reporterfluoreszenz messbar, welcher sich direkt proportional zur Anreicherung der PCR-Produkte verhält.

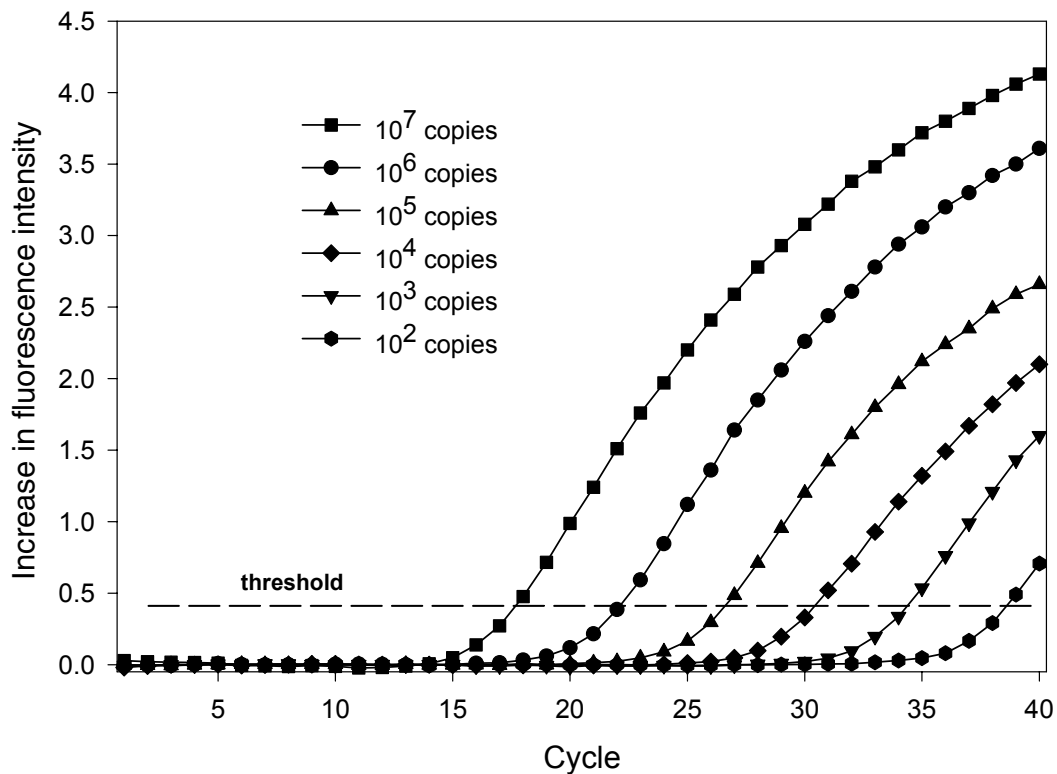


Abbildung 3B: Darstellung der dynamischen Breite und Präzision bei der Quantifizierung von Genexpression mittels Taqman RT-PCR. Dargestellt sind eigene Daten aus Messungen einer Verdünnungsreihe der IL-12R β_2 -Kette.

2.2. Untersuchungen zur Bedeutung des Epstein-Barr Virus in der Pathogenese der MS

Das Epstein-Barr Virus (EBV), ein weitverbreitetes Virus aus der Familie der humanen Herpesviren, wurde wiederholt mit der Ätiopathogenese der MS in Verbindung gebracht. So zeigten seroepidemiologische Studien in geographisch unterschiedlichen und unabhängigen Populationen stets eine Seropositivität von 99-100% bei MS Patienten im Vergleich zu 85-95% in der Normalbevölkerung (Bray et al. 1983; Sumaya et al. 1985; Larsen et al. 1985; Rickinson und Kieff 1996; Lycke et al. 1996). Es wurde ferner postuliert, daß die Pathogenese der MS eine altersabhängige Auseinandersetzung des Immunsystems mit EBV beinhaltet, da ein Zusammenhang zwischen einer späten Erstinfektion und MS beschrieben wurde (Operskalski et al., 1989; Martyn et al., 1993; Haahr et al., 1997). Schließlich wurden bei MS Patienten bereits Jahre vor Manifestation der Erkrankung erhöhte Antikörpertiter gegen bestimmte Antigene des EBV beschrieben (Levin et al. 2003).

Einen konkreten Hinweis auf einen möglichen pathogenetischen Mechanismus von EBV bei der MS lieferten Wucherpfennig und Strominger indem sie zeigten, daß die virale DNA Polymerase, die während der lytischen, d.h. replikativen Phase von EBV exprimiert wird, autoreaktive, MBP-spezifische T-Zellen zu aktivieren vermag (Wucherpfennig und Strominger 1995). Durch die periphere Aktivierung autoreaktiver T-Zellen ist eine Rolle für EBV auch ohne einen direkten Erregernachweis in MS-Läsionen denkbar. Auf Ebene der B-Zell Immunantwort wurden ebenfalls kreuzreaktive Antikörper zwischen EBV-Antigenen und Myelinpeptiden bei MS Patienten beschrieben (Bray et al. 1992; Vaughan et al., 1996). Weitere potentiell pathogenetische Mechanismen von EBV bei der MS stellen die oligoklonale Stimulation zirkulierender autoreaktiver T-Lymphozyten durch ein EBV assoziiertes *Superantigen* sowie die Transaktivierung eines Retrovirus dar (Haahr et al., 1994; Sutkowski et al., 1996). Vor dem Hintergrund dieser epidemiologischen Auffälligkeiten und laborchemischen Befunde beschäftigten wir uns in eigenen Arbeiten gezielt mit einer möglichen Rolle des EBV in der Pathogenese der MS.

2.2.1. Prävalenz und Antikörperprofil (Referenz 3)

Zunächst untersuchten wir 107 MS Patienten und 163 Blutspender auf Antikörper gegen Herpes simplex-Virus Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2), Zytomegalievirus (CMV) und EBV (Wagner et al. 2000, **Referenz 3**). Als bedeutsame Auffälligkeit fanden wir eine 100%ige EBV-Seropositivität der MS-Patienten, wohingegen sich bei Blutspendern nur in 90,1% EBNA-1-Antikörper fanden. Die EBV-Serologie wurde daraufhin genauer untersucht, um zwischen Primärinfektion, Latenz und Reaktivierung unterscheiden zu können. Dabei galt eine Primärinfektion als nachgewiesen, wenn bei Abwesenheit von EBNA-1 Antikörpern Anti-EA-IgG und/oder Anti-EA-IgM positiv waren. Latenz wurde durch den alleinigen Nachweis von Anti-EBNA-1 definiert. Wenn zusätzlich zu EBNA-1 Antikörpern Anti-EA-IgM in hohem Titer ($OD \geq 0,5$) oder Anti-EA-IgG und Anti-EA-IgM nachweisbar waren, sind wir von einer Reaktivierung ausgegangen. Positive Nachweise von Anti-EA-IgA erhärteten den Befund einer Primärinfektion bzw. einer Reaktivierung. Die Interpretation dieser Befunde ergab die serologischen Zeichen einer EBV-Primärinfektion bei 3,7% der Blutspender, aber bei keinem der MS-Patienten. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die 100%ige Seropositivität der MS-Patienten eine Folge der MS darstellt. Da ein gleiches Ergebnis auch international in mehreren

unabhängigen Patientenkollektiven gefunden wurde liegt vielmehr die Vermutung nahe, daß eine EBV Infektion eine notwendige aber nicht hinreichende Voraussetzung für die Entstehung einer MS darstellt (Bray et al. 1983; Sumaya et al. 1985; Larsen et al. 1985; Lycke et al. 1996; Ascherio et al. 2001, Levin et al. 2003). In diesem Zusammenhang ist besonders hervorzuheben, daß Typ-I IFN eine spezifische antivirale Wirkung in der Frühphase einer EBV-Infektion durch Hemmung der Internalisierung der Virus-Rezeptor Komplexe in infizierte B-Lymphozyten ausübt (Delcayre et al. 1991; Delcayre et al. 1993). Die oben beschriebene Verminderung der endogenen IFN-Sekretion im Rahmen viraler Infektionen stellt somit eine Erklärung für die 100%ige EBV-Seropositivität der MS Patienten dar (Wandinger et al. 1997, **Referenz 1**). Zeichen einer Reaktivierung fanden sich sowohl bei 13,9% der Patienten als auch bei 17,2% der Blutspender. Interessanterweise zeigten MS Patienten insgesamt signifikant niedrigere Anti-EBNA-1-IgG Titer, was als Zeichen einer gestörten Kontrolle der latenten EBV Infektion (sog. „carrier state“) gewertet werden kann (Henle et al. 1987).

2.2.2. Reaktivierung und Krankheitsaktivität (Referenz 4)

Das Kernergebnis der eigenen Arbeiten zu EBV liegt jedoch im Nachweis einer zeitlichen Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und einer serologisch wie molekularbiologisch nachgewiesenen EBV-Reaktivierung bei longitudinal untersuchten MS Patienten (Wandinger et al. 2000, **Referenz 4**, siehe auch Editorial von Hunter und Hafler). An 19 Patienten führten wir eine Verlaufsuntersuchung in monatlichen Abständen über ein Jahr durch, wobei die Patienten über diesen Beobachtungszeitraum in Bezug auf Schubhäufigkeit und Progression als stabil (n=8) oder aktiv (n=11) klassifiziert wurden. Neben einer ausführlichen EBV-Serologie führten wir eine neuentwickelte Taqman-PCR zum Nachweis von EBV-DNA durch, um DNA-Befunde im Serum mit der Serologie zu korrelieren. Serologische Zeichen für eine EBV-Reaktivierung fanden sich bei allen klinisch aktiven Patienten während des Beobachtungszeitraumes, aber auch bei der Hälfte der Patienten mit stabiler MS. Der Nachweis von EBV-DNA im Serum war hinsichtlich der Krankheitsaktivität deutlich spezifischer. Bei 8 von 11 (72,7%) Patienten mit aktiver MS fand sich EBV-DNA in jeweils einer bis vier Serumproben pro Patient. Alle diese Patienten waren auch positiv für Anti-EA-IgA, 2 von ihnen zusätzlich für Anti-EA-IgM. Alle 8 Patienten, die über den Beobachtungszeitraum

klinisch stabil blieben, waren negativ sowohl für diese beiden serologischen Marker als auch für freie EBV-DNA. Diese Beobachtung impliziert, daß im Rahmen einer Immunantwort gegen EBV eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen bei MS Patienten erfolgt. Tatsächlich konnte vor kurzem erneut eine Strukturhomologie zwischen einem EBV-Peptid und einer Sequenz aus dem basischen Myelinprotein (MBP) im Kontext der Antigen-Bindungsgrube der MS-assoziierten HLA-Moleküle gezeigt werden, die eine funktionelle immunbiologische Grundlage für eine Kreuzaktivierung autoreaktiver T-Zellen darstellt (Lang et al. 2002).

2.2.3. Abgrenzung zum Marek's Disease Virus (Referenz 5)

Nach Berichten über ein gehäuftes Auftreten von MS Fällen auf Key West, Florida, wurde der Verdacht geäußert, daß das Marek's Disease Virus (MDV), ein vogelpathogenes „Geschwister“ Virus des EBV aus der gleichen Familie der γ -Herpesviren, eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen könnte (Helmick et al. 1989; McHatters et al. 1995). Auf Grund unklarer serologischer Ergebnisse aus den bisherigen Studien war das Ziel eigener Arbeiten, Leukozyten von MS Patienten in Bezug auf MDV-DNA-Sequenzen zu untersuchen (Hennig et al. 1998, **Referenz 5**). 107 MS Patienten, die alle klinischen Subtypen der MS einschlossen, wurden in die Studie aufgenommen. DNA aus Leukozyten wurde mittels der Taqman-PCR auf MDV-Sequenzen untersucht. Als Positivkontrolle diente MDV-DNA aus infizierten Hühnerembryofibroblasten. Es konnten bei keinem der 107 MS Patienten MDV-Sequenzen nachgewiesen werden. In späteren Untersuchungen bestätigte sich unser Ergebnis eines fehlenden Nachweises des vogelpathogenen MDV aus humanen Plasma- und Zellproben (Hennig et al. 2003).

2.3. Entwicklung immunologischer Marker der Krankheitsaktivität

Eine absolute Notwendigkeit für die klinische Versorgung von MS-Patienten stellt die Entwicklung paraklinischer Marker der Krankheitsaktivität dar. Als „CRP der MS“ sollen diese frühzeitig die Indikation zur Therapie anzeigen und gleichzeitig vor einer ungewollten Behandlung des benignen Verlaufes schützen. Indikatoren für eine frühzeitige Therapie sind insofern von großer klinischer Bedeutung, als die Ergebnisse jüngerer Therapiestudien nahe legen, dass immunmodulatorische

Therapien ihre maximalen Effekte zu Beginn, d.h. während der überwiegend inflammatorischen Phase der Erkrankung zeigen, und in späteren Erkrankungsstadien nur noch begrenzt oder gar nicht mehr wirksam sind (Goodin DE et al. 2002). Verlässliche Biomarker werden außerdem zur Verlaufsbeurteilung therapeutischer Studien sowie zur prognostischen Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufes benötigt. Die Notwendigkeit paraklinischer Aktivitätsmarker wird weiterhin durch die kernspintomographischen Erkenntnisse der letzten Jahre verdeutlicht die uns gezeigt haben, dass die MS auch während Zeiten klinischer Stabilität durchaus subklinisch aktiv sein kann (McFarland et al. 1992). Für die engmaschige Überwachung von MS Patienten stellt jedoch die Entwicklung immunologischer Aktivitätsmarker eine unerlässliche Voraussetzung dar, da kernspintomographische Verlaufsuntersuchungen einen großen apparativen Aufwand erfordern und zudem bekannt ist, dass klinische Schübe auch ohne jegliche begleitende MRT-Veränderungen auftreten können (The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group 1999).

2.3.1. Der Chemokinrezeptor CCR5 (Referenz 6)

In eigenen Arbeiten zur Identifizierung von Aktivitätsmarkern der MS untersuchten wir in einem hypothesengestützten Ansatz die Wertigkeit von Molekülen, die bei der Aktivierung und Migration proinflammatorischer T-Zellen eine zentrale Rolle spielen (siehe auch Abbildung 1). Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die die Migration von Leukozyten in Gewebe vermitteln. Die Expression entsprechender Chemokinrezeptoren ist daher ausschlaggebend für die selektive Invasion von T-Zellen in ihre Zielorgane (Ward et al. 1998). Experimentelle Daten implizieren ferner, dass unterschiedliche T-Zellsubpopulationen auf Grund ihres Chemokinrezeptorprofiles charakterisiert werden können. Der Chemokinrezeptor CCR5 wird so vornehmlich auf aktivierten, proinflammatorischen TH-1 Lymphozyten exprimiert (Bonecchi et al. 1998). Eine mögliche pathogenetische Bedeutung CCR5+ T-Zellen bei der MS leitet sich aus der Tatsache ab, daß die entsprechenden Chemokinliganden RANTES und MIP-1 α während akuter Schübe im Liquor erhöht sind bzw. in demyelinisierenden ZNS-Läsionen exprimiert werden (Sorensen et al. 1999; Balashov et al. 1999). Ferner wurden CCR5+ T-Zellen in aktiven Läsionen nachgewiesen (Sorensen et al. 1999). In einer Querschnittsuntersuchung an 9 Patienten mit klinisch aktiver MS konnten wir in durchflußzytometrischen

Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl CCR5+ T-Zellen auch im peripheren Blut gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist (Strunk et al. 2000, **Referenz 6**). Mit Hilfe der gleichzeitig durchgeführten intrazellulären Zytokinfärbung wiesen wir zudem nach, dass innerhalb der CCR5+ Subpopulation bei MS Patienten ein höherer Prozentsatz spontan die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α sezernierte. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von CCR5 einen Marker zur Identifizierung von Effektorzellen der MS darstellt. Weiterführende Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv zur Evaluierung dieses Chemokinrezeptors als Aktivitätsmarker sind daher Gegenstand aktueller Verlaufsstudien.

2.3.2. Die β_2 -Kette des Interleukin-12 Rezeptors

Wie in der Einleitung bereits erwähnt ist Interleukin-12 (IL-12) ein Zytokin, das T Zellen während ihrer Differenzierungsphase in die Richtung proinflammatorischer TH1 Zellen polarisiert. Bei MS Patienten wurde eine erhöhte Expression von IL-12 in aktiv demyelinisierenden ZNS-Läsionen sowie während aktiver Krankheitsphasen in peripherem Blut beschrieben (Windhagen et al., 1995; Balashov et al., 1997; v. Boxel-Dezaire, 1999). Von besonderer Bedeutung innerhalb des IL-12 Systems ist die β_2 -Untereinheit des IL-12 Rezeptors, die die Affinität des Rezeptors für seinen Liganden determiniert und die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung an den Rezeptor vermittelt (Presky et al., 1996). Dieses Molekül ist ursächlich in die ersten Schritte der TH1 Differenzierung von naiven T Zellen eingebunden und wird nachfolgend selektiv auf TH1 Zellen exprimiert (Rogge et al., 1997). Für die EAE konnte gezeigt werden, daß die Expression der IL-12 Rezeptor β_2 (IL-12R β_2)-Kette auf autoreaktiven T Zellen mit Spezifität für das basische Myelinprotein (MBP) die Enzephalitogenität und Pathogenität dieser Zellen determiniert (Chang et al. 1999). In Kooperation mit Dr. Ben Segal (Laboratory of Immunology, NIAID, NIH) und in enger Zusammenarbeit Dr. Paolo Muraro (Neuroimmunology Branch, NINDS, NIH) untersuchten wir daher die Bedeutung der 12R β_2 Kette für die Autoimmunpathogenese der MS. Im Rahmen erster Untersuchungen zur Rolle der IL-12R β_2 -Kette als potentiell immunpathogenetischen Mechanismus der MS analysierten wir im Northernblot die 12R β_2 Expression in humanen Autoantigen-spezifischen T-Zell-Klonen. MBP-spezifische T-Zellen (10^6) wurden mit und ohne Antigen (10 μ g/ml) in Gegenwart autologer PBMC (5×10^6) als Antigen-

präsentierenden Zellen in einem Volumen von 2 ml kultiviert. In ausgewählten Konditionen wurde den Kulturen ein neutralisierender Antikörper gegen IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN) in einer Konzentration von 20 µg/ml oder rekombinantes IL-12 (Peprotech, Rocky Hill, NJ; 20 ng/ml) zugeführt. Nach 6 und 24 Stunden (jeweils für die Bestimmung von CD40L und 12Rβ₂ wurde RNA isoliert und im Northernblot untersucht (methodische Details siehe Chang et al. 1999). Es zeigte sich in diesen Experimenten, daß im Rahmen der Autoantigen spezifischen Aktivierung ein Signal für die IL-12Rβ₂-Kette und den CD40 Liganden selektiv in TH1 Klonen von MS Patienten und nicht von gesunden Kontrollen exprimiert wurde (Abbildung 4). Es zeigte sich ferner, daß die Expression der IL-12Rβ₂-Kette durch IL-12 reguliert wird und durch neutralisierende Antikörper gegen IL-12 während der Restimulation unterdrückt werden kann. Die gleichzeitige frühe Expression des CD40 Liganden in TH1 Klonen von MS Patienten nach Aktivierung ist von besonderer Bedeutung, da über die Interaktion des CD 40L mit CD 40 auf Antigen präsentierenden Zellen durch die T Zellen selbst die Sekretion von IL-12 induziert wird. Interessanterweise war das Genexpressionsmuster eines TH1 Klonen, der von einem eineiigen, gesunden Zwilling eines MS Patienten generiert wurde, identisch mit dem Profil des TH1 Klonen des erkrankten Geschwisters.

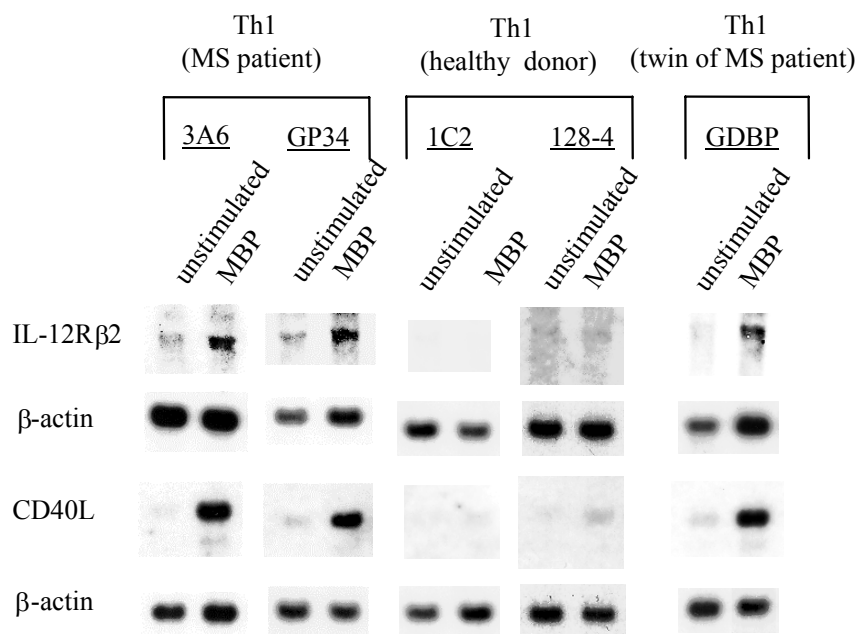


Abbildung 4: Selektive Expression von IL-12Rβ₂ und CD40L in MBP-reaktiven TH1 Klonen von MS Patienten und einem identischen Zwilling eines MS Patienten. Die T-Zellklone wurden mit und ohne Autoantigen in der Gegenwart autologer PBMC kultiviert. Nach 6 und 24 Stunden (jeweils für die Bestimmung von CD40L und IL-12Rβ₂) wurde RNA isoliert und im Northernblot untersucht.

In weiterführenden durchflußzytometrischen Untersuchungen ließ sich diese erste Beobachtung einer selektiven Expression der IL-12R β_2 -Kette auf autoreaktiven T-Zellen bei MS Patienten auf Proteinebene jedoch nicht bestätigen. Im Gegensatz zum Tiermodell wurde die IL-12R β_2 -Kette in human T-Zellklonen sowohl bei MS Patienten als auch bei gesunden Kontrollen reguliert (unpublizierte Daten). Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Befunde zwischen Northernblot und durchflußzytometrischen Bestimmungen wäre eine starke posttranskriptionale Regulierung der IL-12R β_2 -Kette. Nach unseren Daten scheint, anders als bei der EAE, bei der MS die Expression der IL-12R β_2 -Kette nicht die Pathogenität autoreaktiver T-Zellen zu determinieren. Dennoch zeigen unsere Ergebnisse gleichzeitig auch, dass die Expression der IL-12R β_2 -Kette einen frühen Aktivierungsmarker proinflammatorischer T-Zellen darstellt. Wir überprüften daher in weiterführenden Untersuchungen, inwieweit die Genexpression der IL-12R β_2 -Kette mit frühen Phasen der Krankheitsaktivität korreliert. Zu diesem Zwecke untersuchten wir einen Patienten, der in Bezug auf die zeitliche Entwicklung einer akuten Exazerbation besonders gut charakterisiert war, da er im Rahmen einer Therapiestudie mit einem „altered peptide ligand“ (APL; modifizierte Sequenz des MBP₈₃₋₉₉ Peptids) fünf Wochen nach Behandlungsbeginn eine Schubsymptomatik mit akuter klinischer Verschlechterung entwickelte (Bielekova et al. 2000). Die Quantifizierung der mRNA-Spiegel erfolgte mit Hilfe der quantitativen Taqman-Methode (detaillierte Beschreibung der Methode und verwendeten Primer siehe Wandinger et al. 2001, **Referenz 10**). Für die Bestimmung von CD40L Transkripten wurden darüber hinaus die folgenden Oligonucleotidsequenzen verwendet: Forward Primer 5'- GAAAGAAAACAGCTTTGAAATGCAA -3', Reverse Primer 5'- TGCTGGCCTCACTTATGACATG - 3', Taqman-Sonde: 5'FAM – CCGCAATTTGAGGATTCTGATCACCTT – TAMRA 3'. Es zeigte sich, daß die APL Behandlung von einer Induktion der IL-12R β_2 -Ketten Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen des Patienten begleitet war, deren höchste Werte wenige Tage vor der klinischen Manifestation erreicht wurden (Abb. 5). Die Expression der IL-12R β_2 -Kette, die eng mit der Expression des CD40L korrelierte, spiegelte somit die Aktivierungsphase der enzephalitogenen Zellen *in vivo* engmaschig wider. Während der Remissionsphase zeigte sich kompensatorisch ein Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. In der Abbildung ist ferner die Expansion eines

MBP₈₃₋₉₉ spezifischen T-Zellklones über den zeitlichen Verlauf des Schubes dargestellt (siehe auch Muraro&Wandinger et al. 2003).

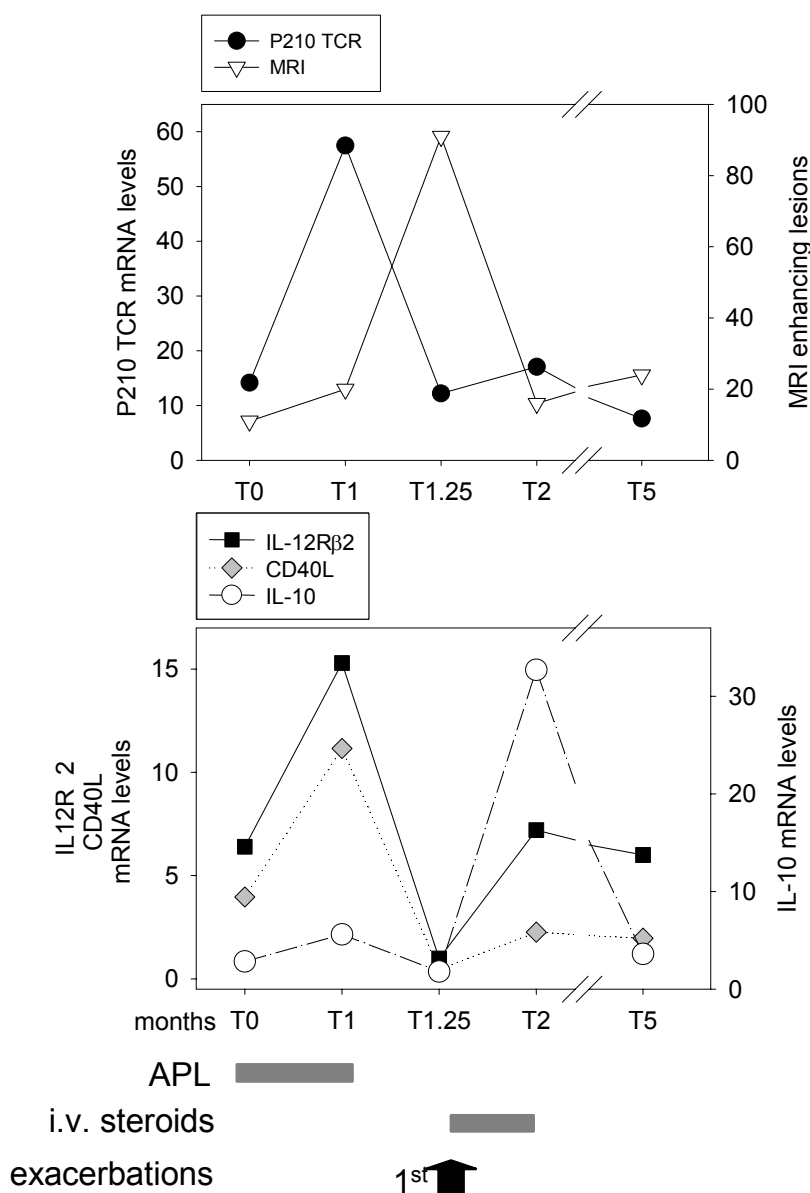


Abbildung 5: Die Expression der IL-12R β_2 Kette in peripheren Blutzellen korreliert mit klinischer und para klinischer Krankheitsaktivität bei MS. Longitudinale Untersuchung eines Patienten, der im Rahmen einer Therapiestudie mit einem „altered peptide ligand“ (APL) eine Schubsymptomatik mit akuter klinischer und para klinischer Verschlechterung (MRI) entwickelte.

2.3.3. Die Rolle CD28 negativer T-Zellen (Referenz 7)

Da Myelin-spezifische T-Zellen bei MS Patienten in gleicher Frequenz wie bei gesunden Kontrollen gefunden werden, stellt die Aktivierung dieser autoreaktiver

Zellen ein zentrales Ereignis in der Pathogenese der Erkrankung dar (Pette et al. 1990). Tatsächlich wurde bei MS Patienten eine vermehrte Anzahl aktivierter Myelin-spezifischer T-Zellen beschrieben (Zhang et al 1994). Es wäre daher denkbar, daß in bestimmten Lymphozytensubpopulationen von MS Patienten eine niedrigere Aktivierungsschwelle vorliegt. Um ein vollständiges Aktivierungsmuster in T-Zellen auszulösen sind im allgemeinen zwei Signale notwendig. Das erste Signal wird vom T-Zellrezeptor induziert und determiniert die Antigen-Spezifität der Aktivierung. Das zweite Signal wird über costimulatorische Moleküle vermittelt und moduliert die Aktivierungsschwelle der Zelle. Das CD80/CD86-CD28/CTLA-4 System stellt den wichtigsten und am besten untersuchten Signalweg costimulatorischer Aktivierung dar. CD80 und CD86 werden auf aktivierten APCs exprimiert und binden an ihre Liganden CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen. CD28 wird konstitutiv an der Oberfläche von über 95% der CD4+ T-Lymphozyten exprimiert und wird nur kurzzeitig nach Bindung an CD80 oder CD86 herunterreguliert. Nach Aktivierung und Herunterregulation von CD28 wird die Expression von CTLA-4 an der T-Zelloberfläche induziert. CTLA-4, das Strukturhomologie zu CD28 aufweist, bindet die gleichen Liganden mit höherer Affinität und löst intrazellulär ein negativ-regulatorisches Signal auf die T-Zellaktivierung aus (negative Rückkopplung). In Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit Dr. S. Markovic-Plese entstanden, identifizierten und charakterisierten wir eine T-Zellsubpopulation, die sich phänotypisch durch eine dauerhaft fehlende CD28 Expression auszeichnet (Markovic-Plese et al. 2001, **Referenz 7**). Wir konnten zeigen, daß diese Lymphozyten bereits nach Stimulation über den T-Zellrezeptor ohne Costimulation ein vollständiges Aktivierungsmuster aufweisen. Diese Lymphozytensubpopulation war funktionell neben der Costimulation-unabhängigen Aktivierung durch eine verlängerte Überlebensdauer gekennzeichnet, die wahrscheinlich auf die ebenfalls fehlende Expression von CTLA-4 zurückzuführen ist. Es handelt sich bei CD28- T-Zellen somit um eine Lymphozytensubpopulation, die eine mögliche Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen spielen könnte. Tatsächlich fanden wir eine Subpopulation von MS Patienten, bei denen diese CD28-Population signifikant expandiert war. Innerhalb dieser Zellpopulation fanden sich MBP-spezifische T-Zellen, die zudem durch eine maximale Expression der IL-12R β_2 -Kette gekennzeichnet waren. Die Bestimmung der Frequenz CD28- T-Zellen bei MS Patienten könnte somit einen Hinweis auf die zugrundeliegende Krankheitsaktivität

liefern. Die Wertigkeit dieses Markers muß nun ebenfalls in prospektiven Studien an einem großen Patientenkollektiv überprüft werden.

2.3.4. Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen (Referenz 8)

Es wird angenommen, dass die Initiierung Organ-spezifischer Entzündungs-erkrankungen durch die Aktivierung und Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen vermittelt wird. Die Bestimmung der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen im Verlauf, und insbesondere in Organkompartimenten, gestaltete sich bislang jedoch als methodisch schwierig. Auf dem Boden der TaqmanPCR entwickelten wir zusammen mit Dr. P. Muraro ein sensitives und spezifisches Verfahren zur *in vivo* Bestimmung von CD4+ und CD8+ T-Zellklonen. (Muraro&Wandinger et al. 2003, **Referenz 8**, siehe auch Editorial von Hohlfeld). Unsere Methode beruht auf dem Nachweis und der Quantifizierung von Transkripten aus der CDR3 (complementarity-determining region 3) Sequenz der α - oder β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR). Unser Ziel war es, individuelle, potentiell pathogene T-Zellklone, die von Patienten mit immunvermittelten Erkrankungen des ZNS generiert und ausgiebig charakterisiert waren, in peripherem Blut und im Liquor der Patienten über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu verfolgen. Zu den untersuchten Erkrankungen gehörten neben der MS die HTLV-1 assoziierte Myelopathie/ tropische spastische Paraparese (HAM/TSP) sowie die chronische Lyme Neuroborreliose. Es gelang uns mit dieser Methode, Veränderungen in der Frequenz der autoreaktiven T-Zellklone nachzuweisen, die mit dem klinischen Verlauf und/oder einer Anreicherung im Liquor korrelierten. Bei einem Patienten, der im Rahmen einer Therapiestudie mit einem „altered peptide ligand“ (APL; modifizierte Sequenz des MBP₈₃₋₉₉ Peptids) fünf Wochen nach Behandlungsbeginn eine Schubsymptomatik mit akuter klinischer Exazerbation entwickelte, korrelierte die klinische und paraklinische Verschlechterung im MRT eng mit der Expansion eines MBP₈₃₋₉₉ -spezifischen T-Zellklones (Bielekova et al. 2000). Diese Korrelation stellt gleichzeitig einen ersten, direkten Beweis für eine Rolle MBP-spezifischer T-Zellen in der Pathogenese der MS dar. Unsere Methode erlaubt somit den zuverlässigen Nachweis einer Expansion autoreaktiver T-Zellen in einzelnen Patienten über den zeitlichen Verlauf und ermöglicht es, Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Krankheitsaktivität zu ziehen. Eine Einschränkung dieses individuellen Ansatzes liegt jedoch darin, daß eine

vorherige Identifizierung autoreaktiver T-Zellklonotypen in den jeweiligen Patienten erforderlich ist.

2.4. Identifizierung therapeutischer Kandidatengene

Während bei der Therapie akuter MS-Schübe mit hochdosierten Glukokortikosteroiden eine rasche Rückbildung der Symptome in erster Linie durch kurzanhaltende immunsupprimierende Effekte vermittelt wird, ist die Wirkweise der in der immunmodulatorischen Intervalltherapie eingesetzten Substanzen weitgehend unverstanden (Wandinger et al. 1998b). Um die pathogenetischen Mechanismen, die an der Initiierung und Aufrechterhaltung der MS beteiligt sind, weiter zu entschlüsseln, ist es jedoch dringend erforderlich, die Wirkweise derzeit eingesetzter Therapieverfahren zu verstehen. Nur durch die Kenntnis dieser therapeutischen Kandidatengene wird es möglich sein, frühzeitig Therapieresponder von Nonrespondern zu unterscheiden und gezielt neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. Die Entwicklung prognostischer Marker des individuellen Therapieerfolges ist insofern von unmittelbarer klinischer Bedeutung, da in Studien zum frühen Einsatz von IFN- β signifikante Effekte bezüglich der Krankheitsverzögerung nachgewiesen wurden und seit der Zulassung der IFN- β Präparate und des Glatiramacetat gleichwertige Alternativen für die Behandlung der MS zur Verfügung stehen (Übersichtsarbeit von Goodin et al. 2002).

2.4.1. Einfluß von IFN- β auf Interleukin-12 (Referenz 9)

In eigenen Untersuchungen beschäftigten wir uns mit der Wirkweise von IFN- β bei der MS. IFN- β war die erste zur Behandlung der MS zugelassene Substanz. Die klinische Wirksamkeit wurde durch eine Verminderung der Anzahl und des Schweregrades von Schüben in Klasse-1 Evidenzstudien mehrfach dokumentiert (Goodin et al. 2002). Ursprünglich wurden Typ-I Interferone auf Grund ihrer antiviralen Eigenschaften und der Annahme einer viralen Ätiopathogenese der Erkrankung in die Behandlung der MS eingeführt. Die genauen Wirkmechanismen von IFN- β bei der MS sind jedoch weitgehend unverstanden. Wie bereits an vorgehender Stelle dargestellt kommt dem Zytokin IL-12 eine zentrale Bedeutung in der Aktivierungsphase proinflammatorischer T-Zellen zu. Bei MS Patienten wurde

eine erhöhte Expression von IL-12 in aktiv demyelinisierenden ZNS-Läsionen sowie während aktiver Krankheitsphasen in peripherem Blut beschrieben (Windhagen et al., 1995; Balashov et al., 1997; v. Boxel-Dezaire, 1999). In Kooperation mit Dr. S. Dhib-Jalbut untersuchten wir daher hypothesengestützt gezielt die Effekte von IFN- β auf das IL-12 System (Wang et al. 2000, **Referenz 9**). Der Einfluß von IFN- β auf die mitogen-induzierte Produktion von IL-12 wurde in peripheren Blutzellen sowie MBP-spezifischen T-Zellklonen von gesunden Kontrollen und MS Patienten *in vitro* auf Proteinebene sowie molekularbiologisch analysiert. Es zeigte sich, dass IFN- β die Induktion von biologisch aktivem IL-12 signifikant inhibierte. Die Suppression der IL-12 Transkription konnte durch neutralisierende Antikörper gegen das Zytokin IL-10 aufgehoben werden und weist darauf hin, dass die inhibitorischen Effekte von IFN- β auf IL-12 durch Induktion des antiinflammatorischen IL-10 vermittelt werden. Im Einklang mit unseren Befunden ist eine Induktion von IL-10 im Rahmen einer IFN- β Therapie bei MS Patienten beschrieben (Rudick et al., 1996). Eine mögliche Bedeutung der Hemmung von IL-12 durch IFN- β bei der MS könnte im Schutz vor einer überschießenden zellulären Immunantwort mit Zerstörung körpereigener Strukturen liegen (Gazzinelli 1996). Vor diesem Hintergrund gewinnt auch der oben beschriebene IFN-Defekt bei MS-Patienten an weiterer, funktioneller Bedeutung (Wandinger et al. 1997, **Referenz 1**).

2.4.2. Pleiotrope Wirkung von IFN- β (Referenz 10)

Um die pleiotropen Effekte von IFN- β offen und unvoreingenommen zu erfassen, untersuchten wir in einem innovativem methodischen Ansatz mit Hilfe von cDNA Microarrays das Genexpressionsmuster in IFN- β behandelten PBMC von MS Patienten und gesunden Kontrollen (Wandinger et al. 2001, **Referenz 10**). Bei dieser Methode kann das Expressionsverhalten von mehreren tausend bekannten und auch unbekannt Genen, sogenannten expressed sequence tags (EST), in einem einzigen Hybridisationsansatz gleichzeitig bestimmt werden (Alizadeh et al., 2000). Die in unseren Experimenten verwendeten Microarrays wurden im Labor von Dr. L. Staudt an der Metabolism Branch des National Cancer Institute, NIH, Bethesda, hergestellt und uns im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Arrays bestanden aus 6432 cDNA Elementen, die für 3035 bekannte Gene und 3397 ESTs codierten. Um in möglichst umfassender Weise IFN- β regulierte Gene zu identifizieren, generierten wir cDNAs aus PBMC, die für 6 oder 24 Stunden mit IFN- β

Konzentrationen von 100 und 1000 IU/ml inkubiert waren. Diese wurden mit entsprechender cDNA aus Kontrollkulturen ohne IFN- β , die während der reversen Transkription mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzmarker gekennzeichnet waren, auf einem Microarray hybridisiert.

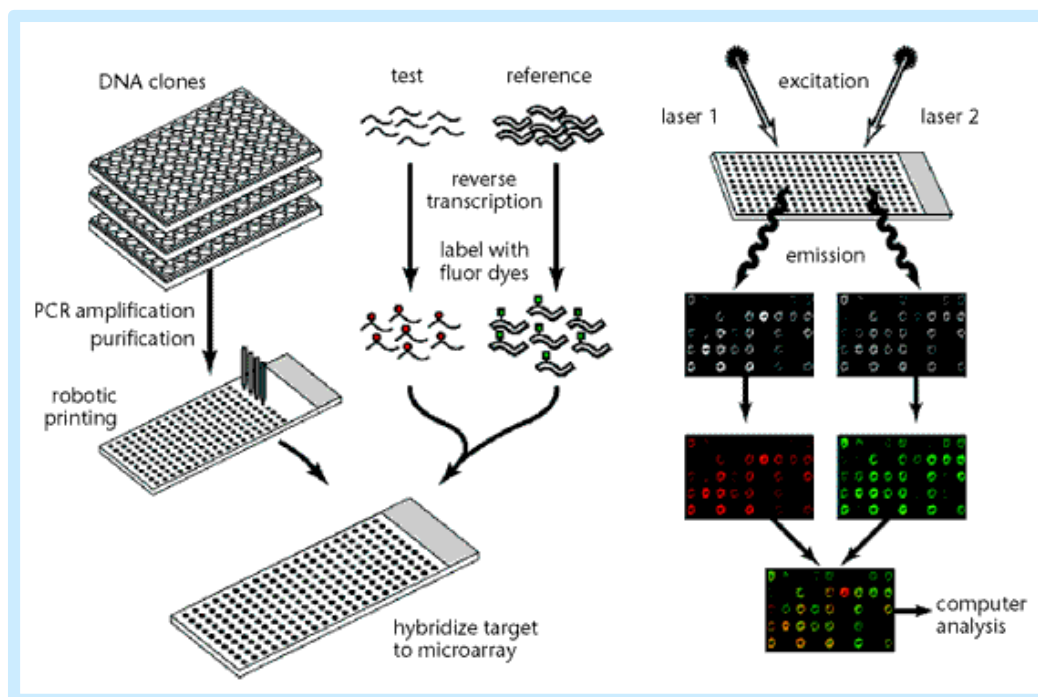


Abbildung 6: Prinzip der Microarrayanalyse. Nach RNA-Extraktion wird die RNA der einzelnen Proben reverse transkribiert und dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach Hybridisierung auf dem Microarray wird die Fluoreszenz mittels eines konfokalen Lasers gemessen. Modifiziert nach Duggan et al., Nat. Genet. 1999.

Unter dem Einfluß von IFN- β wurde in den Kulturen die Expression von ca. 200 Genen induziert und von ca. 300 Genen supprimiert. Es zeigten sich Effekte von IFN- β auf unterschiedliche funktionelle Systeme, z.B. Moleküle, die für die humorale und zelluläre Immunantwort von Bedeutung sind, Adhäsionsmoleküle, Apoptosegene etc. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass IFN- β die pathogenetischen Mechanismen der MS auf mehreren verschiedenen Ebenen gleichzeitig beeinflusst. Interessanterweise beinhaltete die Transkriptionsantwort nach *in vitro* Inkubation mit IFN- β auch die Induktion proinflammatorischer Gene (z.B. α -Kette des IL-15 Rezeptors) sowie krankheitsassoziiertes Moleküle (IP-10; s. Balasov et al. 1999). Insgesamt stellt sich die immunmodulatorische Wirkung von IFN- β also wesentlich komplexer dar, als

bislang angenommen. Gleichzeitig ließen sich über 50 verschiedene ESTs identifizieren, die signifikant durch IFN- β reguliert wurden. Zusammenfassend identifizierten wir eine Vielzahl durch IFN- β *in vitro* regulierter Gene mit potentieller Bedeutung für die Pathogenese der MS.

2.4.3. TRAIL als prognostischer Marker des IFN- β Therapieerfolges (Referenz 11)

In zwei weiterführenden Arbeiten unternahmen wir an Hand des *in vivo* Genexpressionsprofiles bei MS Patienten vor und während einer Behandlung mit IFN- β den Versuch, die funktionell relevanten Gene durch eine Korrelation mit dem Therapieerfolg zu identifizieren. TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), auch APO-2 ligand genannt, gehörte zu den Genen, die in der oben beschriebenen Studie *in vitro* beständig durch IFN- β reguliert wurden. TRAIL ist ein Todesligand aus der Familie der Tumornekrosefaktoren und als solcher in der Lage, über Aktivierung von Caspasen Apoptose in transformierten und nicht transformierten Zellen zu vermitteln (Wiley et al. 1995; Walczak et al. 1999; Jo et al. 2000, Nitsch et al. 2000). Es gibt darüber hinaus jedoch zahlreiche Belege dafür, dass TRAIL insbesondere auch im lymphozytären System bedeutsame immunregulatorische Eigenschaften ausübt (Song et al. 2000; Lünemann et al. 2002). Eine mögliche Bedeutung von TRAIL bei der MS liegt somit in der Hemmung der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie. Diese Annahme wird durch Berichte über eine erhöhte TRAIL Expression in peripheren Blutzellen von MS Patienten während des natürlichen Verlaufes vornehmlich in Zeiten der klinischen Remission unterstützt (Huang et al. 2000). In der Experimentell Autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, führte die Neutralisation von TRAIL ebenfalls zu einem schwerwiegenderem Verlauf (Hilliard et al. 2001). Dieser Befund bestätigte sich auch in TRAIL knock-out Mäusen und legt eine bedeutende Rolle von TRAIL in der Kontrolle autoreaktiver T-Zellen nahe (Lamhamedi-Cherradi et al. 2003).

In der ersten der beiden Arbeiten untersuchten wir mit der quantitativen Taqman-PCR gezielt die potentielle Bedeutung von TRAIL in IFN- β -1a therapierten Patienten (Wandinger et al. 2003, **Referenz 11**). Ziel unserer Arbeit war es zunächst zu überprüfen, ob eine Therapie mit IFN- β bei MS Patienten auch *in vivo* zu einer Induktion von TRAIL führt. Wir untersuchten 62 Patienten mit klinisch sicherer, schubförmig-remittierender MS, die an einer Therapiestudie mit IFN- β -1a (Rebif®) teilgenommen hatten. Periphere Blutzellen dieser 62 Patienten wurden vor Therapie

sowie 1, 6 und 12 Monate während IFN- β Therapie in Bezug auf die Genexpression untersucht. Als Beweis der biologischen Wirksamkeit zeigte sich eine signifikante Hochregulation des MxA Genes zu allen Zeitpunkten unter Therapie. Parallel dazu zeigte sich eine signifikante Induktion des TRAIL Genes unter Therapie auch *in vivo*. Vergleicht man nun klinische Therapieresponder, d.h. Patienten die während der Behandlung keine weiteren Schübe erlitten und keinen Progress im EDSS aufwiesen, mit Nonrespondern, d.h. Patienten die unter Therapie einen oder mehrere Schübe aufwiesen, so zeigte sich interessanterweise ein signifikant unterschiedliches TRAIL Expressionsprofil (MANOVA, $p < 0,0001$). Therapieresponder unterschieden sich von Therapieversagern durch eine frühe und anhaltende Hochregulation von TRAIL. Die Ergebnisse legen nahe, dass Nonrespondern von Respondern auf Grund ihres TRAIL Genexpressionsverhaltens unter Therapie unterschieden werden können. Wir untersuchten daher im nächsten Schritt, ob sich Responder von Nonrespondern auch in Bezug auf die TRAIL Proteinexpression unterscheiden. Zu diesem Zwecke bestimmten wir lösliches TRAIL (sTRAIL) im Serum der Patienten. Tatsächlich zeigten sich auch auf Proteinebene bei Therapierespondern unter Therapie höhere sTRAIL Werte als bei Nonrespondern (MANOVA, $p = 0,0011$). Von besonderer Bedeutung ist jedoch unsere Entdeckung, dass sich Therapieresponder von Therapieversagern bereits vor Therapiebeginn durch ein signifikant höheres sTRAIL Expressionsniveau unterscheiden (Mann-Whitney-U test, $p = 0,004$). Als prädiktiver Marker könnte daher die Bestimmung von sTRAIL vor Therapie eine prognostische Aussage in Bezug auf den individuellen Therapieerfolg erlauben. In einer zweiten, unabhängigen Kohorte von IFN- β -1a behandelten Patienten ($n = 19$), die in Bezug auf den Therapieerfolg zusätzlich kernspintomographisch untersucht wurden, betätigte sich unser Ergebnis einer differentiellen TRAIL Genexpression unter Therapie in Respondern und Nonrespondern (MANOVA, $p < 0,0001$). Da auch in dieser zweiten Patientenkohorte Responder bereits vor Therapie höhere sTRAIL Proteinwerte als Nonresponder aufwiesen, führten wir eine ROC-Analyse zur Überprüfung des prädiktiven Wertes von sTRAIL für einen Therapieerfolg durch. Insgesamt berücksichtigten wir 49 Patienten (29 Responder und 20 Nonresponder), von denen Seren vor Therapiebeginn zur Verfügung standen. Bei einem Cut-off von 584,1 pg/ml konnte der Therapieerfolg anhand der sTRAIL Werte vor Therapie mit einer Spezifität von 90,5% und einer Sensitivität von 71,4% vorhergesagt werden. Mit TRAIL gelang uns somit die Identifizierung des ersten prognostischen Markers einer

IFN- β Therapie bei MS. Auf Grund seiner immunregulatorischen Eigenschaften und seiner funktionellen Bedeutung für die klinische Wirksamkeit bei der IFN- β Therapie stellt TRAIL ferner ein vielversprechendes Zielmolekül für neue therapeutische Strategien bei der MS dar.

2.4.4. Responderprofile der IFN- β Therapie

In der zweiten Arbeit untersuchten wir mit cDNA Microarrays die *in vivo* Genexpressionsprofile in peripheren Blutzellen von IFN- β therapierten Patienten im Sinne einer globalen Analyse mit dem Ziel, spezifische Muster von Respondern und Nonrespondern zu identifizieren (Stürzebecher et al. 2003). Wir untersuchten 10 Patienten mit klinisch sicherer, schubförmig-remittierender MS, die an einer Therapiestudie mit IFN- β -1b (Betaseron®) teilgenommen hatten und durch monatliche kernspintomographische Untersuchungen auch in Bezug auf die subklinische Krankheitsaktivität charakterisiert waren. Auf Grund klinischer Stabilität und einer mindestens 60%igen Reduktion in der Anzahl Gadolinium (Gd) aufnehmender Läsionen unter IFN- β Behandlung klassifizierten wir 6 Patienten als Therapieresponder. Zwei Patienten sprachen initial auf die Therapie an und wurden zu sekundären Nonrespondern (Zunahme Gd anreichernder Läsionen unter Therapie), nachdem sie neutralisierende Antikörper gegen Betaseron® entwickelt hatten. Bei 2 Patienten zeigte sich von Beginn der Therapie kein Effekt auf kernspintomographische oder klinische Parameter (primäre Nonresponder). Die Veränderungen des Genexpressionsprofils unter Therapie *in vivo* wurden innerhalb der einzelnen Patienten bestimmt und miteinander verglichen. Außerdem wurden Zellen, die vor Therapiebeginn asserviert worden waren, *in vitro* mit IFN- β -1b (100 IU/ml) für 24h inkubiert und analysiert, um das generelle Ansprechen der Patienten auf IFN- β zu überprüfen und um Gene zu identifizieren, die *in vivo* möglicherweise nicht stark genug reguliert werden und dem Nachweis entgehen könnten. Für methodische Details siehe auch Wandinger et al. 2001, **Referenz 11**. Unsere Untersuchungen zeigen, dass sich Responder und Nonresponderphänotypen bezüglich ihres Expressionsmusters durch eine Vielzahl differentiell regulierter Gene unterscheiden (Abbildung 7). Die deutliche Reduktion der IL-8 Expression durch IFN- β bei Therapierespondern *in vivo*, die sich in der quantitativen Taqman-PCR mit einem Faktor von bis zu 1/20 des Ausgangswertes vor Therapiebeginn bestätigte, ist ein neuer Befund, der für die IFN- β Therapie der MS bislang nicht gezeigt wurde.

Interessanterweise fanden wir eine Induktion von TRAIL auf den cDNA Microarrays nur nach *in-vitro* Inkubation mit IFN- β , was die Grenzen dieser Methode für die Untersuchungen *in-vivo* aufzeigt und den Vorteil der Taqman-PCR für diese Fragestellung durch eine höhere Sensitivität belegt. Gleichzeitig wird dadurch der Stellenwert hypothesengestützter Untersuchungen unterstrichen.

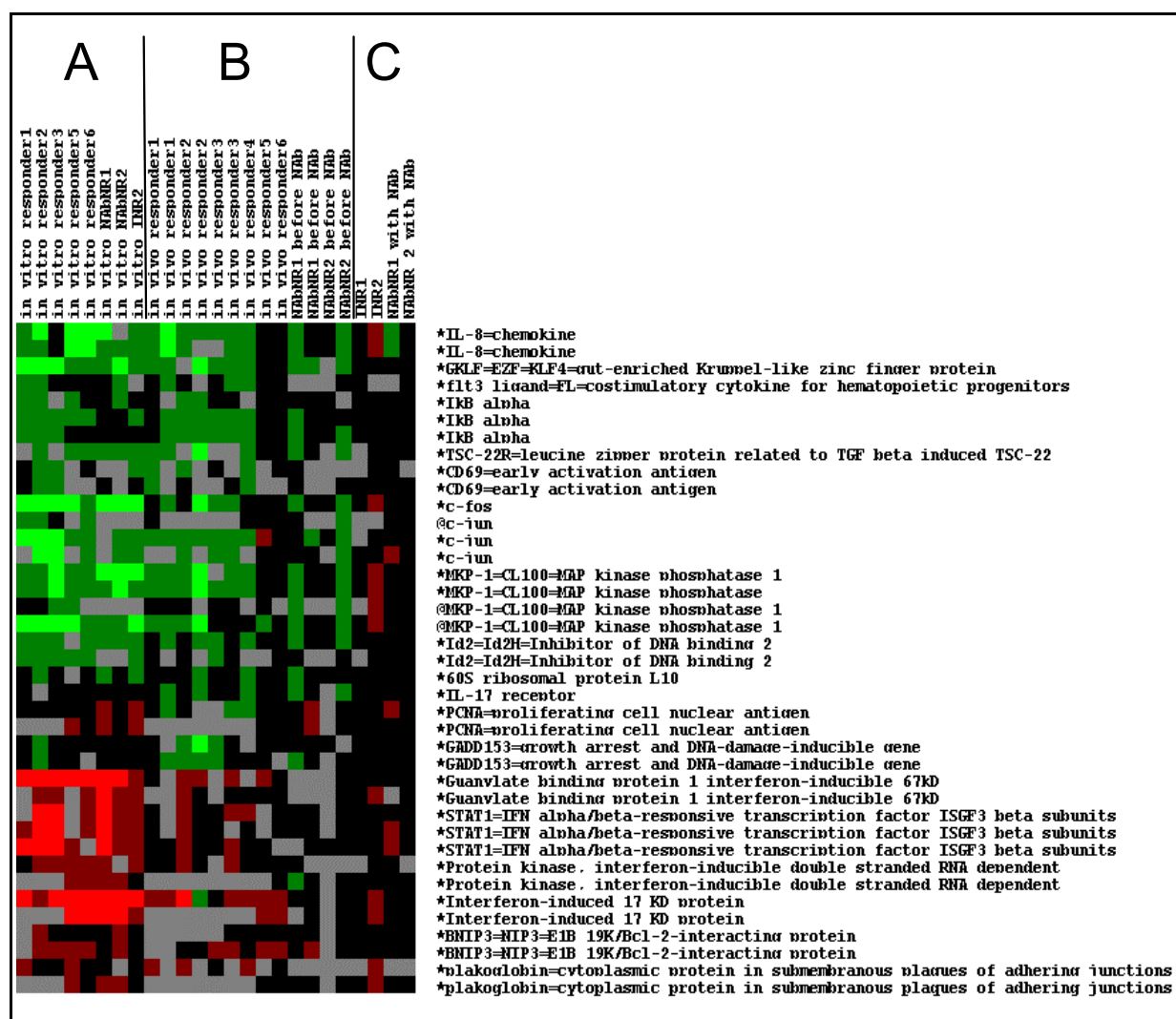


Abbildung 7. Clusteranalyse der Genexpressionsdaten nach *in vitro* Inkubation mit IFN- β sowie unter Therapie *in vivo* bei Respondern und primären und sekundären Nonrespondern. Vertikal: selektierte Gene; horizontal: Patientenproben; rot: induzierte Gene; grün: supprimierte Gene. A) 8 *in vitro* Experimente. B) *Ex vivo* Daten von 6 Respondern (9 Experimente) und 2 Patienten, die im weiteren Verlauf neutralisierende Antikörper entwickelten (4 Experimente). C) *Ex vivo* Ergebnisse von Nonrespondern. Daten von 2 primären Nonrespondern (INR), und 2 sekundären Nonrespondern auf Grund von neutralisierenden Antikörpern (NAbNR) (4 Experimente).

3. Zusammenfassung und Ausblick

Die Multiple Sklerose ist die häufigste neurologische Erkrankung in Europa und Nordamerika, die bereits im frühen Erwachsenenalter zu dauerhafter Behinderung führt. Es handelt sich um eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems ungeklärter Ätiologie, deren klinischer Verlauf von einer breiten Heterogenität gekennzeichnet ist (Weinshenker et al. 1989). Nach gegenwärtigen immunpathogenetischen Vorstellungen wird der Entzündungsprozeß im ZNS durch autoreaktive, Myelin-spezifische T-Zellen aufrechterhalten, wobei virale Infektionen bekannte Auslöser klinischer Schübe darstellen (Sibley et al. 1985; Martin et al. 1992). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung infektionsimmunologischer Prozesse in der Pathogenese der MS sowie die Entwicklung immunologischer Marker der Krankheitsaktivität. Ein dritter Schwerpunkt lag auf der Identifizierung funktionell relevanter Gene der IFN- β Therapie bei MS.

In Untersuchungen zur unspezifischen, nicht-adaptiven Immunabwehr konnten wir zeigen, daß bei MS Patienten eine primäre Beeinträchtigung im endogenen Interferonsystem vorliegt, die, unter anderem bedingt durch die fehlende Inhibition des proinflammatorischen Zytokins IL-12, eine Prädisposition für eine unkontrollierte und chronifizierte zelluläre Immunantwort im Rahmen viraler Infekte darstellen könnte **(2.1.1., Referenz 1; 2.4.1., Referenz 9)**. Gleichzeitig identifizierten wir einen Mechanismus, wie autoreaktive T-Zellen im Rahmen viraler Infektionen unspezifisch durch dendritische Zellen, einer bei MS Patienten in erhöhter Anzahl im peripheren Blut nachgewiesenen Zellpopulation, aktiviert werden **(2.1.2., Referenz 2)**.

In gezielten Arbeiten zur Rolle des Epstein-Barr Virus fanden wir im Einklang mit Ergebnissen aus international unabhängigen Patientenkollektiven eine spezifische 100%ige Seropositivität in der eigenen Kohorte von 107 MS Patienten **(2.2.1., Referenz 3; 2.2.3., Referenz 5)**. Da Typ-I IFN spezifisch die Internalisierung des EBV/CD21-Rezeptorkomplexes in B-Zellen verhindert, könnte die Verminderung der endogenen IFN-Sekretion bei MS Patienten eine Ursache für diesen Befund darstellen (Delcayre et al. 1993). Die mögliche Bedeutung einer EBV Infektion für die Pathogenese der MS ergibt sich aus unseren weiterführenden Arbeiten, in denen wir erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen einer EBV-Reaktivierung und Krankheitsaktivität bei longitudinal untersuchten Patienten zeigten **(2.2.2., Referenz**

4). Diese Beobachtung legt eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort gegen EBV nahe.

Eine absolute Notwendigkeit für die klinische Versorgung von MS Patienten ist die Entwicklung immunologischer Marker der Krankheitsaktivität, die frühzeitig eine Behandlungsindikation anzeigen und gleichzeitig vor der Therapie des benignen Verlaufes schützen. In der vorliegenden Arbeit zeigten wir, daß die Expression der Aktivierungs- und Migrationsmarker CCR5 und IL-12 Rezeptor β_2 -Kette die Aktivierungsphase enzephalitogener T-Zellen im peripheren Blut von MS Patienten engmaschig widerspiegelt. (2.3.1., Referenz 6; 2.3.2.). Gleichzeitig fanden wir in einer Subpopulation von MS Patienten eine signifikante Expansion Costimulation-unabhängiger, autoreaktiver T-Zellen, die sich durch eine maximale Expression der IL-12 Rezeptor β_2 -Kette auszeichneten (2.3.3., Referenz 7). Unsere Ergebnisse deuten auf eine Rolle der IL-12R β_2 -Kette und des Chemokinrezeptors CCR5 im Rahmen der immunpathogenetischen Prozesse bei der MS hin. Weiterführende Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv zur Evaluierung dieser Moleküle als Biomarker der Krankheitsaktivität sind daher Gegenstand aktueller Verlaufsstudien. In einem mehr individuellen Ansatz gelang es uns, mit Hilfe einer neu entwickelten Methode zur *in vivo* Quantifizierung von T-Zellklonen Veränderungen in der Frequenz autoreaktiver T-Zellen mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren (2.3.4., Referenz 8). Die Expansion eines MBP-spezifischen T-Zellklones in enger zeitlicher Korrelation mit einer klinisch und paraklinisch manifesten Exazerbation belegt erstmals direkt die Rolle Myelin-spezifischer T-Zellen in der Pathogenese der MS.

Die genauen Wirkmechanismen von IFN- β , der ersten zur immunmodulatorischen Therapie der MS zugelassenen Substanz, sind weitgehend unverstanden. Auch ist unklar, warum die Behandlung bei vielen Patienten nicht den gewünschten Erfolg zeigt. In eigenen hypothesengestützten Studien konnten wir zunächst zeigen, dass IFN- β durch die Suppression des proinflammatorischen Zytokins IL-12 einen hemmenden Einfluß auf zentrale Prozesse der T-Zell Differenzierung und Aktivierung ausübt (2.4.1., Referenz 9). In Untersuchungen zur pleiotropen Wirkweise der Substanz identifizierten wir mit Hilfe von cDNA-Microarrays eine Vielzahl *in vitro* regulierter, potentieller therapeutischer Kandidatengene (2.4.2., Referenz 10). Durch die Korrelation des *in vivo* Genexpressionsverhaltens mit dem klinischen Therapieerfolg von Patienten überprüften wir in anschließenden Arbeiten die

funktionelle Relevanz für die Therapie der MS. Hier gelang uns mit dem u.a. immunregulatorisch wirksamen Zytokin TRAIL die Entdeckung eines prognostischen Markers einer IFN- β Therapie bei MS, der bereits vor Therapiebeginn eine Aussage über das Ansprechen auf eine Behandlung erlaubt (**2.4.3., Referenz 11**). Neben der unmittelbaren klinischen Relevanz für die individuelle Versorgung von Patienten kommt diesem Befund eine nicht unerhebliche sozioökonomische Bedeutung zu. Auf Grund seiner funktionellen Bedeutung für die klinische Wirksamkeit stellt TRAIL gleichzeitig ein vielversprechendes Zielmolekül für neue therapeutische Strategien bei der MS dar. Schließlich konnten wir zeigen, dass sich das Expressionsprofil von Respondern und Nonrespondern durch eine Vielzahl differentiell regulierter Gene unterscheidet (**2.4.4.**). Die Kenntnis dieser Responderprofile wird es uns ermöglichen, die pathogenetischen Zusammenhänge besser zu verstehen und effizientere Behandlungsmethoden zu entwickeln

Es ist unsere Hoffnung, mit unseren hier vorgestellten Befunden sowie unseren zukünftigen Arbeiten zum besseren Verständnis der Ursachen und Erscheinungsformen der MS beizutragen, vor allem aber durch die Übertragung unserer Ergebnisse in die Klinik einen Beitrag zur besseren Versorgung der Patienten zu leisten.

4. Verzeichnis der Abkürzungen

APC:	Antigen-präsentierende Zellen
APL:	Altered Peptide Ligand
B7-1/B7-2:	CD80/CD86; costimulatorische Moleküle
CCR5:	Chemokinrezeptor 5
CD:	Cluster of Differentiation
CTLA-4:	Ligand von B7; induziert negative Rückkopplung
DC:	Dendritische Zellen
EAE:	Experimentell Autoimmune Encephalomyelitis
EBV:	Epstein-Barr Virus
EDSS:	Expanded Disability Status Scale
EST:	Expressed Sequence Tag; cDNA Sequenz unbekannter Funktion
HLA:	Humane Leukozytenantigene
IFN:	Interferon
IL-12:	Interleukin-12
MBP:	Basisches Myelinprotein
MDV:	Marek's Disease Virus
MS:	Multiple Sklerose
NAB:	Neutralizing Antibodies
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
SA:	Superantigen
TCR:	T-Zell-Rezeptor
TH-1:	T-Helfer-1; proinflammatorische T-Zellen
TNF:	Tumornekrosefaktor
TRAIL:	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
ZNS:	Zentralnervensystem

5. Zitierte Literatur

Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., et al. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-511.

Archelos, J.J., Hartung, H.P. 1997 The role of adhesion molecules in multiple sclerosis: biology, pathogenesis and therapeutic implications. *Mol. Med. Today* 3:310-321.

Arnason, B.G.W., Reder, A.T. 1994. Interferons and multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 17:495-547.

Ascherio, A., Munger, K.L., Lennette, E.T., Spiegelman, D., Hernán, M.A., Olek, M.J., Hankinson, S.E., Hunter, D.J. 2001. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis. A prospective study. *JAMA* 286:3083-3088.

Balashov, K.E., Smith, D.R., Khoury, S.J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. 1997. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:599-603.

Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., and Hancock, W.W. 1999. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6873-6878.

Beck, J., Rondot, P., Catinot, L., Falcoff, F., Kirchner, H., and Wietzerbien, J. 1988. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol. Scand.* 78:318-323.

Belardelli, F., Gresser, I. 1996. The neglected role of type I interferons in the T-cell response: Implications for its clinical use. *Immunol. Today* 17:369-372.

Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Gran, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J.A., McFarland, H.F., Martin, R. 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat. Med.* 6:1167-1175.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type-1 T-helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187:129-134.

Bray, P.F., Bloomer, L.C., Salmon, V.C., Bagley, M.H., Larsen, P.D. 1983. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 37:94-96.

Bray, P.F., Luka, J., Bray, P.F., Culp, K.W., Schlight, J.P. 1992. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* 42:1798-1804.

Chang, J.T., Shevach, E.M., and Segal, B.M. 1999. Regulation of interleukin (IL)-12 receptor β_2 subunit expression by endogenous IL-12: a critical step in the differentiation of pathogenic autoreactive T cells. *J. Exp. Med.* 189:969-978.

Compston, A., Coles, A. 2002. Multiple Sclerosis. *Lancet* 359:1221-1231.

Delcayre, A.X., Salas, F., Mathur, S., Kovats, K., Lotz, M., Lernhardt, W. 1991. Epstein Barr virus/complement C3d receptor is an interferon alpha receptor. *EMBO J* 10:919-926.

Delcayre, A.X., Lotz, M., Lernhardt, W. 1993. Inhibition of Epstein-Barr virus-mediated capping of CD21/CR2 by alpha interferon (IFN-alpha): immediate antiviral activity of IFN-alpha during the early phase of infection. *J. Virol.* 67:2918-2921.

Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R., Trautmann, A. 1998. Antigen-dependent and - independent Ca^{2+} responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J. Exp. Med.* 188:1473-1484.

Drakesmith, H., Chain, B., Beverley, P. 2000. How can dendritic cells cause autoimmune disease? *Immunol. Today* 21:214-217.

Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21:10-14.

Dyment, D.A., Dessa Sadovnich, A., Ebers, G.C. 1997. Genetics of multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 6:1693-1698.

Edwards, S., Zvartau, M., Clarke, H., Irving, W., Blumhardt, L.D. 1998. Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64:736-741.

Fujinami, R.S., Oldstone, M.B. 1985 Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043-1045.

Gale, C.R., Martyn CN. 1995. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.* 47:425-448.

Gazzinelli, R.T. 1996. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. *Mol. Med. Today*

Goodin, D.S., Frohman, E.M., Garmany, G.P. Jr, Halper, J., Likosky, W.H., Lublin, F.D., Silberberg, D.H., Stuart, W.H., van den Noort, S. 2002. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58:169-178.

Haahr, S., Moller-Larsen, A., Justesen, J., Pedersen, E. 1986. Interferon induction, 2'-5' oligo A synthetase and lymphocyte subpopulations in out-patients with multiple sclerosis in a longitudinal study. *Acta Neurol. Scand.* 73:345-351.

Haahr, S., Sommerlund, M., Christensen, T., Jensen, A.W., Hansen, H.J., Moller-Larsen, A. 1994. A putative new retrovirus associated with multiple sclerosis and the possible involvement of Epstein-Barr virus in this disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 724:148-156.

Haahr, S., Koch-Henriksen, N., Moller-Larsen, A., Eriksen, L.S., Andersen, H.M.K. 1997. Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 169:70-75.

Hartung, H.P., Gonsette R., König, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., and the Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS). 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360:2018-2025.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.

Helmick, C.G., Wrigley, J.M., Zack, M.M., Bigler, W.J., Lehman, J.I., Janssen, R.S., Hartwig, E.C., Witte, J.J. 1989. Multiple sclerosis in Key West, Florida. *Am. J. Epidemiol.* 130:935-945.

Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., et al. 1997. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J. Exp. Med.* 185:1651-1659.

Hemmer, B., Vergelli, M., Pinilla, C., Houghten, R., Martin, R. 1998. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol. Today* 19:163-168.

Henle, W., Henle, G., Andersson, J., Ernberg, I., Klein, G., Horwitz, C.A., Marklund, G., Rymo, L., Wellinger, C., Straus, S.E. 1987. Antibody response to Epstein Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:570-574.

Hennig, H., Wessel, K., Sondermeijer, P., Kirchner, H., Wandinger, K.P. 1998 Lack of evidence for Marek's disease virus genomic sequences in leukocyte DNA from multiple sclerosis patients in Germany. *Neurosci. Lett.* 250, 138-140.

Hennig, H., Osterrieder, N., Müller-Steinhardt, M., Teichert, H.M., Kirchner, H., Wandinger, K.P. 2003. Detection of Marek's disease virus DNA in chicken but not in human plasma. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2428-2432.

Hilliard, B., Wilmen, A., Seidel, C., Liu, T.S., Goke, R., Chen, Y. 2001. Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166:1314-1319.

Hohlfeld, R. 2003. Hunting (auto)immune T cells in neuroimmunological diseases. *Brain* 126:2-4.

Huang, Y.M., Xiao, B.G., Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Fredrikson, S., Link, H. 1999. Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *J. Neuroimmunol.* 99:82-90.

Huang, W.X., Huang, P., Gomes, A., Hillert, J. 2000. Apoptosis mediators FasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. *Neurology* 55:928-934.

Hunter, S.F., Hafler, D.A. 2000. Ubiquitous pathogens. Links between infection and autoimmunity in MS? *Neurology* 55:164-165.

Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., et al. 1996. Intramuscular interferon β -1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39:285-294.

Jacobson, S., Flerlage, M.L., McFarland, H.F. 1985. Impaired measles virus specific cytotoxic T cell responses in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 162:839-850.

Jo, M., Kim, T.H., Seol, D.W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R., Strom, S.C. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* 6: 564-567.

Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S. 1998. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 50:701-708.

Johnson, R.T. 1994. The virology of demyelinating diseases. *Ann. Neurol.* 36 (Suppl.):54-60.

Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K.P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S., Martin, R. 2001. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nature Immunol.* 2:932-938.

Lamhamedi-Cherradi, S.E., Zheng, S.J., Maguschak, K.A., Peschon, J., Chen, Y.H. 2003. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL (-/-) mice. *Nat. Immunol.* 4:255-260.

Lang, H.L.E., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y., Fugger, L. 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 3:940-843.

Larsen, P.D., Bloomer, L.C., Bray, P.F. 1985. Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 35:435-438.

Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C. 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 7:115-121.

- Levin, L.I., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelmann, D., Ascherio, A. 2003. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA* 289:1533-1536.
- Link, H., Huang, Y.M., Xiao, B.G. 1999. Dendritic cells in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 100:102-110.
- Lünemann, J.D., Waiczies, S., Ehrlich, S., Wendling, U., Seeger, B., Kamradt, T., Zipp, F. 2002. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *J Immunol* 168:4881-4888.
- Lycke, J., Svennerholm, B., Hjelmquist, E., Frisen, L., Badr, G., Anderson, B., Vahlne, A., Anderson, O. 1996. Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis – a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *J. Neurol.* 243:214-224.
- Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., McFarland, H.F., Martin, R. 2001 CD4(+)CD28(-) costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 108:1185-1194.
- Martin, R., McFarland, H.F., and McFarlin, D.E. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10:153-187.
- Martin, R., Ruddle, H.R., Reingold, S., Hafler, D.A. 1998. T helper cell differentiation in multiple sclerosis and autoimmunity. *Immunol. Today* 11:495-498.
- Martyn, C.N., Cruddas, M., Compston, D.A.S. 1993. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 56:167-168.
- McFarland, H.F., Frank, J.A., Albert, P.S., Smith, M.E., Martin, R., Harris, J.O., Patronas, N., Maloni, H., McFarlin, D.E. 1992. Using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging lesions to monitor disease activity in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 32:758-66.
- McHatters, G.R., Scham, R.G. 1995. Bird viruses in multiple sclerosis: combination of viruses or Marek's alone. *Neurosci. Lett.* 188:75-76.
- Muraro, P.A., Wandinger, K.P., Bielekova, B., Gran, B., Marques, A., Utz, U., McFarland, H.F., Jacobson, S., Martin, R. 2003. Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders. *Brain* 126:20-31.
- Neighbour, P.A., Miller, A.E., Bloom, B.R. 1981. Interferon responses of leukocytes in multiple sclerosis. *Neurology* 31:561-566.
- Nitsch, R., Bechmann, I., Deisz, R.A., Haas, D., Lehmann, T.N., Wendling, U., Zipp, F. 2000. Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 356:827-828.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G. 2000. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343:938-952.

Operskalski, E.A., Visscher, B.R., Malmgren, R.M., Detels, R. 1989. A case-control study of multiple sclerosis. *Neurology* 39:825-829.

Panitch, H.S. 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 36:25-28.

Pette, M., Fujita, K., Kitze, B., Whitaker, J.N., Albert, E., Kappos, L., Wekerle, H. 1990. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 40:1770-1776.

Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K., and Gubler, U. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14002-14007.

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

Rickinson, A.B., Kieff, E. 1996. Epstein-Barr Virus. In Fields, B.N., Knipe, D.M., P.M. Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, Philadelphia, Raven Press, 2397-2446.

Rodriguez, M., Pavelko, K.D., Njemga, M.K., Logan, W.C., Wettstein, P.J. 1996. The balance between persistent virus infection and immune cells determines demyelination. *J. Immunol.* 157:5699-5709.

Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D.H., Gubler, U., and Sinigaglia, F. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 185:825-832.

Rudick, R.A., Ransohoff, R.M., Pepler, R., VanderBrug Medendorp, S., Lehmann, P., Alam, J. 1996. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 40:618-627.

Sellebjerg, F., Madsen, H.O., Jensen, C.V., Jensen, J., Garred, P. 2000. CCR5 delta 32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 102:98-106.

Selmaj, K.W., Raine, C.S. 1988 Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* 23:339-346.

Sibley, W.A., Bamford, C.R., Clark, K. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1:1313-1315.

Song, K., Chen, Y., Goke, R., Wilmen, A., Seidel, C., Goke, A., Hilliard, B., Chen, Y. 2000. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 191:1095-1104.

Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., et al. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin Invest.* 103:807-815.

Stohlmann, S.A., Hinton, D.R. 2001. Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* 11:92-106.

Strunk, T., Bubel, S., Mascher, B., Schlenke, P., Kirchner, H., Wandinger, K.P. 2000. Increased numbers of CCR5+ interferon- γ and tumor necrosis factor- α secreting T-lymphocytes in MS patients. *Ann. Neurol.* 47:269-273.

Stürzebecher, C.S., Wandinger, K.P., Rosenwald, A., Sathyamorthy, M., Tzou, A., Mattar, P., Frank, J.A., Staudt, L., Martin, R., McFarland, H.F. 2003. Expression profiling identifies responder- and non-responder phenotypes to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* 126:1419-1429.

Sumaya, C.V., Myers, L.W., Ellison, G.W., Ench, Y. 1985. Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 17:371-377.

Sutkowski, N., Palkama, T., Ciurli, C., Sekaly, R.P., Thorley-Lawson, D.A., Huber, B.T. 1996. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J. Exp. Med.* 184:971-980.

The IFNB multiple sclerosis study group and the University of British Columbia MS/MRI analysis group. 1995. Interferon β -1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 45:1277-1285.

The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI analysis group. 1999. TNF neutralization in MS: results of a placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 53:457-465.

Tovell, D.R., McRobbie, I.A., Warren, K.G., Tyrrell, D.L.J. 1983. Interferon production by lymphocytes from multiple sclerosis and non-MS patients. *Neurology* 33: 640-643.

Traugott, U., Lebon, P. 1988. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann. Neurol.* 24:243-251.

Trinchieri, G. 1993. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells, *Immunology Today* 14:335-338.

van Boxel-Dezaire, A.H., Hoff, S.C., van Oosten, B.W., Verweij, C.L., Drager, A.M., Ader, H.J., van Houwelingen, J.C., Barkhof, F., Polman, C.H., and Nagelkerken, L. 1999. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 45:695-703.

Vaughan, J.H., Riise, T., Rhodes, G.H., Nguyen, M.D., Barrett-Connor, E., Nyland, H. 1996. An Epstein Barr virus -related cross reactive autoimmune response in multiple sclerosis in Norway. *J. Neuroimmunol.* 69:95-102.

Wagner, H.J., Hennig, H., Jabs, W.J., Siekhaus, A., Wessel, K., Wandinger, K.P. 2000. Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Viral. Immunol.* 13, 497-502.

Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., et al. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5:157-163.

Wandinger, K.P., Wessel, K., Neustock, P., Siekhaus, A., Kirchner, H. 1997 Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 149:87-93.

Wandinger, K.P., Wessel, K., Otto, M., Reissland, P., Kirchner, H. 1998a Production of endogenous interferon- α and β in patients suffering from multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64:277-278.

Wandinger, K.P., Wessel, K., Trillenber, P., Heindl, N. Kirchner, H. 1998b. Effect of high-dose methylprednisolone administration on immune functions in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* 97, 359-365.

Wandinger, K.P., Jabs, W., Siekhaus, A., Bubel, S., Trillenber, P., Wagner, H.J., Wessel, K., Kirchner, H., Hennig, H. 2000. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 55, 178-184.

Wandinger, K.P., Stürzebecher, C.S., Bielekova, B., Detore, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., McFarland, H.F., Martin, R. 2001 The complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann. Neurol.* 50:349-357.

Wandinger, K.P., Lünemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundström, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.D., Volk, H.D., Zipp, F. 2003. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for IFN-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361:2036-2043.

Wang, X., Chen, M., Wandinger, K.P., Williams, G., Dhib-Jalbut, S. 2000. Interferon beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10 dependent mechanism: relevance to interferon beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 165, 548-557.

Ward, S.G., Bacon, K., Westwick, J. 1998. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 9:1-11.

Weinshenker, B.G., Bass, B., Rice, G.P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C. 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain.* 112:133-146.

Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-682.

Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., and Hafler, D.A. 1995. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 182:1985-1996.

Wucherpfennig, K.W., Strominger, J.L. 1995. Molecular mimicry in T cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705.

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., Hafler, D.A. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179:973-84.

Zipp, F., Wandinger, K.P. 2001. Aktuelle Empfehlungen zu Impfungen bei Multipler Sklerose. *Nervenarzt* 72:802-806.

6. Anhang

Akademische Positionen

Von März 1995 bis August 1996 Arzt im Praktikum, von September 1996 bis Juli 1998 wissenschaftlicher Assistent am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck bei Herrn Prof. Kirchner.

Von August 1998 bis Juli 2000 Forschungsaufenthalt an der Neuroimmunology Branch des National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), NIH, Bethesda, USA in der Arbeitsgruppe von Prof. Roland Martin.

Seit 1. August 2000 wissenschaftlicher Assistent an der Klinik für Neurologie der Charité bei Herrn Prof. Einhäupl.

Stipendien und Preise

Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes (1992-1994).

Junior-Forschungsstipendium der Medizinischen Universität zu Lübeck zur Förderung des Projektes „Neuroimmunologie der Multiplen Sklerose“ (1996).

DFG-Forschungsstipendium zum Thema „Die Rolle des endogenen Interferonsystems in der Pathogenese der Multiplen Sklerose“ (1998-2000).

Universitäre Forschungsförderung der Charité für das Projekt „Biomarker bei MS“ (2000).

Langheinrich-Preis für MS-Forschung (2001).

Vortrag in der Endrunde des Berufungsverfahrens zur Besetzung der ersten 5 Juniorprofessuren der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität (2001).

Universitäre Forschungsförderung der Charité für das Projekt „Infektionsimmunologie der MS“ (2002).

Wissenschaftlicher Werdegang

Meinen ersten Kontakt zum wissenschaftlichen Arbeiten hatte ich nach dem 1. Staatsexamen 1991 in der Klinik für Neurologie der Medizinischen Universität zu Lübeck in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Wessel. Dort beschäftigte ich mich im Rahmen einer experimentell-neurophysiologischen Dissertationsarbeit mit ***Okulomotorikstörungen bei Patienten mit spät beginnenden Kleinhirntaxien und Friedreichscher Ataxie***. Ich erlernte die Methode der Elektronystagmographie und arbeitete mich in die neurologische Topographie der in die Kontrolle der Okulomotorik eingebundenen zentralnervösen Systeme ein. Im Rahmen meiner Promotionsarbeit identifizierte ich sensitive, klinische Marker, die bereits frühzeitig den Übergang einer rein zerebellären Degeneration in eine System übergreifende Erkrankung mit Hirnstammeteiligung erlauben. Die Dissertationsschrift schloß ich im Jahre 1996 mit dem Prädikat *magna cum laude* ab. Wesentliche Ergebnisse der Arbeit sind in den *Archives of Neurology* veröffentlicht.

Nach Abschluß des Studiums begann ich 1995 meine Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck bei Herrn Professor Kirchner, bei dem ich nach Beendigung der AIP-Zeit 1996 weiter als Assistenzarzt arbeitete und eine umfangreiche und fundierte immunologische Ausbildung durchlief. Neben der klinischen Tätigkeit auf dem Gebiet der Blutspende, der Immunhämatologie, der Transplantationsimmunologie sowie der klinischen Immunologie und Allergologie beschäftigte ich mich in Kooperation mit Herrn Professor Wessel, der die MS-Ambulanz der Neurologischen Klinik leitete, wissenschaftlich mit der Multiplen Sklerose. Schwerpunkt meiner ersten neuroimmunologischen Untersuchungen waren Arbeiten zum ***endogenen Interferon- und Zytokinsystem bei MS-Patienten***. Bei der Bearbeitung dieser Fragestellung profitierte ich außerordentlich von der langjährigen, ausgezeichneten Expertise von Herrn Prof. Kirchner auf diesem Gebiet. Vor diesem Hintergrund begannen meine Arbeiten zur ***Wirkweise des Interferon- β bei der MS***, das zu diesem Zeitpunkt in den USA als erstes Medikament zur Behandlung der Erkrankung zugelassen worden war. Diese Arbeiten setzte ich später während meines von der DFG geförderten Forschungsaufenthaltes am NIH fort. Ein zweiter Schwerpunkt lag auf der Entwicklung ***paraklinischer, immunologischer Biomarker der Krankheitsaktivität der MS***. Hier gelang es, bei MS Patienten im Schub eine erhöhte Frequenz proinflammatorischer T-Zellen anhand der Expression des

Chemokinrezeptors CCR5 zu identifizieren (Strunk et al., Ann. Neurol. 2000). Im Rahmen meiner klinischen Tätigkeit auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie und der Beobachtung, daß durch die Reaktivierung endogener Viren, wie z.B. des Epstein-Barr Virus (EBV), durch eine sekundäre T-Zellaktivierung Transplantatabstoßungen getriggert werden können, entstand mein Interesse, eine mögliche **Rolle des EBV bei der Kreuzaktivierung autoreaktiver T-Zellen in der MS** zu untersuchen. Mit den im Labor etablierten zellulären und molekularbiologischen Methoden gelang der Nachweis einer Assoziation zwischen klinischer MS-Aktivität und einer EBV-Reaktivierung in longitudinal untersuchten Patienten (Wandinger et al., Neurology 2000; siehe auch Editorial). Ein weiterer Schwerpunkt meines wissenschaftlichen Arbeitens bei Herrn Prof. Kirchner lag auf der Untersuchung **(auto-) immunologischer Phänomene bei psychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen (M.Parkinson)**.

Im Rahmen eines DFG-Forschungsstipendiums arbeitete ich von 1998-2000 an der Neuroimmunology Branch (Direktor: Prof. McFarland) der National Institutes of Health (NIH) im Labor von Prof. Roland Martin. Von Prof. McFarland lernte ich während dieser Zeit insbesondere die praktischen Aspekte der Organisation und Durchführung klinisch-therapeutischer Studien. Im Labor von Prof. Martin arbeitete ich mich in die T-Zell immunologischen Techniken und die Verfahren zur Klonierung und weiteren Charakterisierung autoimmuner, humaner Lymphozyten ein. Inhaltlich führte ich weitere Untersuchungen zur Etablierung von **Biomarkern für die MS** durch. Hierbei gelang es, die β_2 -Untereinheit des IL-12 Rezeptors als potentiellen Marker aktivierter, autoreaktiver T-Zellen zu identifizieren. In Zusammenarbeit mit Dr. P. Muraro entwickelten wir hier ein sensibles und spezifisches Verfahren zur **in vivo Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellklone** (Muraro&Wandinger et al., Brain 2003: siehe auch Editorial). Durch die Anwendung innovativer molekularbiologischer Methoden wie der quantitativen PCR und der cDNA Microarray Technologie gelang es mir außerdem, einen weiteren Beitrag zum Verständnis der **Wirkmechanismen von IFN- β bei der MS** zu liefern (Wandinger et al., Ann. Neurol. 2001). In diesen Arbeiten, die mit dem Langheinrich-Preis für MS-Forschung ausgezeichnet wurden, zeigte sich, daß Ansätze, die allein auf die gezielte Untersuchung eines oder mehrerer Zytokine oder anderer Zielkandidaten ausgerichtet sind, nur fragmentarische Beiträge zum Verständnis der Wirkweise eines pleiotropen Zytokins wie des Interferon- β liefern. Vielmehr müssen Methoden angewendet werden, die,

wie die oben genannten, in einer offenen und unvoreingenommenen Art und Weise die komplexen immunmodulatorischen Eigenschaften der Substanz berücksichtigen. In weiterführenden Studien gelang es uns, durch die Korrelation mit klinischen Markern die bei der Therapie der MS **funktionell relevanten Gencluster** zu identifizieren (Stürzebecher et al., Brain 2003). Diese Ergebnisse werden zu einem besseren Verständnis nicht nur der Wirkweise von Interferon- β sondern auch der Pathogenese der MS führen.

Nach meinem Forschungsaufenthalt am NIH kehrte ich im August 2000 an die Neurologische Klinik der Charité zu Herrn Prof. Einhäupl zurück. Im Rahmen der Facharztausbildung arbeitete ich zunächst als Stationsarzt auf einer vorwiegend neuroimmunologisch ausgerichteten Station sowie in der Spezialsprechstunde für MS der Poliklinik, gefolgt von einer umfangreichen Ausbildung auf der neurologischen Intensivtherapiestation. Gegenwärtig bin ich klinisch als Privatassistent von Herrn Prof. Einhäupl tätig. Wissenschaftlich brachte ich meine selbständigen Forschungsprojekte in die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Zipp am Institut für Neuroimmunologie ein. In zielgerichteter Fortsetzung der Arbeiten aus den USA zur differentiellen **Wirkweise von Interferon- β** gelang uns mit dem Molekül TRAIL die Identifizierung eines prognostischen Markers einer IFN- β Therapie bei MS Patienten (Wandinger et al., Lancet 2003). Auf Grund seiner Bedeutung für die klinische Wirksamkeit von IFN- β stellt TRAIL gleichzeitig ein vielversprechendes Zielmolekül für weitere therapeutische Strategien bei der MS dar. Auf dem Gebiet weiterführender infektionsimmunologischer Arbeiten zur Rolle des EBV bei MS etablierte ich eine Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H.D. Volk, Medizinische Immunologie der Charité, und knüpfte wissenschaftliche Kontakte zum Robert Koch-Institut.

Publikationsliste

1. Wandinger, K.P., Wessel, K., Neustock, P., Siekhaus, A., Kirchner, H. (1997) Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.** 149:87-93. (IF:1,986)

2. Missler, U., Wandinger, K.P., Wiesmann, M., Kaps, M., Wessel, K. (1997) Acute exacerbation of multiple sclerosis increases plasma levels of S-100 protein. **Acta Neurol. Scand.** 96:142-144. (IF:1,064)

3. Wandinger, K.P., Wessel, K., Otto, M., Reissland, P., Kirchner, H. (1998) Production of endogenous interferon- α and β in patients suffering from multiple sclerosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 64:277-278. (IF:3,024)

4. Wessel, K., Moschner, C., Wandinger, K.P., Kömpf, D., Heide, W. (1998) Significance of oculomotor testing for the differential diagnosis of degenerative ataxic disorders. **Arch. Neurol.** 55:949-956. (IF:4,053)

5. Wandinger, K.P., Wessel, K., Trillenber, P., Heindl, N. Kirchner, H. (1998) Effect of high-dose methylprednisolone administration on immune functions in multiple sclerosis patients. **Acta Neurol. Scand.** 97:359-365. (IF:1,064)

6. Hennig, H., Wessel, K., Sondermeijer, P., Kirchner, H., Wandinger, K.P. (1998) Lack of evidence for Marek's disease virus genomic sequences in leukocyte DNA from multiple sclerosis patients in Germany. **Neurosci. Lett.** 250:138-140. (IF:2,021)

7. Wiesmann, M., Wandinger, K.P., Missler, U., Eckhoff, D., Rothermundt, M., Arolt, V., Kirchner, H. (1999) Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. **Biol. Psychiatry** 45:1508-1511. (IF:5,505)

8. Reissland, P., Wandinger, K.P. (1999) Increased cortisol levels in human umbilical cord blood inhibit interferon alpha production of neonates. **Immunobiol.** 200:227-233. (IF:1,648)

9. Wandinger, K.P., Trillenber, P., Klüter, H., Wessel, K., Kirchner, H. (1999) Clinical and molecular findings in multiple sclerosis patients with type I diabetes mellitus. **J. Clin. Neuroscience** 6:373-374. (IF:0,392)

10. Sieberer, M.G., Klein, C., Wandinger, K.P., Ozelius, L.J., Vieregge, P. (1999) Concordant late onset of craniocervical dystonia in a pair of monozygotic twins. **Mov. Disord.** 14:1040-1043. (IF:2,561)

11. Wandinger, K.P., Hagenah, J.M., Klüter, H., Rothermundt, M., Peters, M., Vieregge, P. (1999) Effects of amantadine treatment on in-vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. **J. Neuroimmunol.** 98:214-220. (IF:3,342)

12. Arolt, V., Rothermundt, M., Wandinger, K.P., Kirchner, H. (2000) Decreased in vitro production of interferon-gamma and interleukin-2 in blood lymphocytes of patients with schizophrenia during treatment. **Mol. Psychiatr.** 5:150-158. (IF:6,250)

13. Strunk, T., Bubel, S., Mascher, B., Schlenke, P., Kirchner, H., Wandinger, K.P. (2000) Increased numbers of CCR5+ interferon- γ and tumor necrosis factor- α secreting T-lymphocytes in MS patients. **Ann. Neurol.** 47:269-273. (IF:8,481)

14. Wandinger, K.P., Jabs, W., Siekhaus, A., Bubel, S., Trillenber, P., Wagner, H.J., Wessel, K., Kirchner, H., Hennig, H. (2000) Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. **Neurology** 55:178-184. (IF:5,212)

15. Wang, X., Chen, M., Wandinger, K.P., Williams, G., Dhib-Jalbut, S. (2000) Interferon beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10 dependent mechanism: relevance to interferon beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. **J. Immunol.** 165:548-557. (IF:7,065)

16. Wagner, H.J., Hennig, H., Jabs, W.J., Siekhaus, A., Wessel, K., Wandinger, K.P. (2000) Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. **Viral Immunol.** 13:497-502. (IF:1,190)

17. Rothermundt, M., Wiesmann, M., Arolt, V., Peters, M., Leadbetter, J., Missler, U., Rudolf, S., Wandinger, K.P., Kirchner, H. (2001) Increased S100B plasma levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. **Mol. Psychiatr.** 6:445-449. (IF:6,250)

18. Wandinger, K.P., Stürzebecher, C.S., Bielekova, B., Detore, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., McFarland, H.F., Martin, R. (2001) The complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. **Ann. Neurol.** 50:349-357. (IF:8,481)

19. Zipp, F., Wandinger, K.P. (2001) Recent aspects on the safety of vaccinations in MS. **Nervenarzt** 72:802-806. (IF:0,916)

20. Zipp, F., Wandinger, K.P. (2001) Aktuelle Nachrichten aus dem Impfkapitel der Multiplen Sklerose. **Ärztliche Praxis Neurologie Psychiatrie** 4:39-40.

21. Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K.P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S., Martin, R. (2001) Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. **Nature Immunol.** 2:932-938. (IF:17,431)
22. Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., McFarland, H.F., Martin, R. (2001) CD4(+)CD28(-) costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** 108:1185-1194. (IF:14,118)
23. Wandinger, K.P., Klingebiel, R., Lünemann, J.D., Zimmer, C., Ziemer, S., Zschenderlein, R. (2002) Thalamo-mesencephalic infarction as single manifestation of combined factor V Leiden and antiphospholipid syndrome. **J. Neurol.** 249:1477-1479. (IF:2,653)
24. Zipp, F., Wandinger, K.P. (2002) Current recommendations for vaccination in multiple sclerosis. **Nervenarzt** 73:384. (IF:0,916)
25. Wandinger, K.P., Zipp, F. (2002) Die Rolle von Schutzimpfungen bei der Multiplen Sklerose. **Nervenheilkunde** 21:517-521. (IF:0,247)
26. Muraro, P.A.* , Wandinger, K.P.*, Bielekova, B., Gran, B., Marqués, A., Utz, U., McFarland, H.F., Jacobson, S., Martin, R. (2003) Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders. **Brain** 126:20-31. (IF:7,407)
*gleichberechtigte Erstautorenschaft
27. Gniadek, P., Aktas, O., Wandinger, K.P., Bellmann-Strobl, J., Wengert, O., Weber, A., von Wussow, P., Obert, H.J., Zipp, F. (2003) Systemic IFN- β treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. **J. Neuroimmunol.** 137:187-196. (IF:3,342)
28. Stürzebecher, C.S., Wandinger, K.P., Rosenwald, A., Sathyamorthy, M., Tzou, A., Mattar, P., Frank, J.A., Staudt, L., Martin, R., McFarland, H.F. (2003) Expression profiling identifies responder- and non-responder phenotypes to interferon- β in multiple sclerosis. **Brain** 126:1419-1429. (IF:7,407)
29. Hennig, H., Osterrieder, N., Müller-Steinhardt, M., Teichert, H.M., Kirchner, H., Wandinger, K.P. (2003) Detection of Marek's disease virus DANN in chicken but not in human plasma. **J. Clin. Microbiol.** 41:2428-2432. (IF:3,965)
30. Aktas, O., Wandinger, K.P., Zipp, F. (2003) Ausblick: Therapeutisch relevante MS-Forschung. **Nervenheilkunde**, im Druck. (IF:0,247)

31. Wandinger, K.P., Lünemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.D., Volk, H.D., Zipp, F. (2003) TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for IFN-beta treatment in multiple sclerosis. **Lancet** 361:2036-2043. (IF:13,251)

Summe der Impact Factor-Punkte: 141,489.

7. Referenzen: Ausgewählte Publikationen und Manuskripte

1. Wandinger, K.P., Wessel, K., Neustock, P., Siekhaus, A., Kirchner, H. (1997) Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.** 149:87-93. (IF:1,986)
2. Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K.P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S., Martin, R. (2001) Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. **Nature Immunol.** 2:932-938. (IF:17,431)
3. Wagner, H.J., Hennig, H., Jabs, W.J., Siekhaus, A., Wessel, K., Wandinger, K.P. (2000) Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. **Viral Immunol.** 13:497-502. (IF:1,190)
4. Wandinger, K.P., Jabs, W., Siekhaus, A., Bubel, S., Trillenberger, P., Wagner, H.J., Wessel, K., Kirchner, H., Hennig, H. (2000) Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. **Neurology** 55:178-184. (IF:5,212)
5. Hennig, H., Wessel, K., Sondermeijer, P., Kirchner, H., Wandinger, K.P. (1998) Lack of evidence for Marek's disease virus genomic sequences in leukocyte DNA from multiple sclerosis patients in Germany. **Neurosci. Lett.** 250:138-140. (IF:2,021)
6. Strunk, T., Bubel, S., Mascher, B., Schlenke, P., Kirchner, H., Wandinger, K.P. (2000) Increased numbers of CCR5+ interferon- γ and tumor necrosis factor- α secreting T-lymphocytes in MS patients. **Ann. Neurol.** 47:269-273. (IF:8,481)
7. Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., McFarland, H.F., Martin, R. (2001) CD4(+)CD28(-) costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** 108:1185-1194. (IF:14,118)
8. Muraro, P.A.* , Wandinger, K.P.*, Bielekova, B., Gran, B., Marqués, A., Utz, U., McFarland, H.F., Jacobson, S., Martin, R. (2003) Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders. **Brain** 126:20-31. (IF:7,407) *gleichberechtigte Erstautorenschaft
9. Wang, X., Chen, M., Wandinger, K.P., Williams, G., Dhib-Jalbut, S. (2000) Interferon beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10 dependent mechanism: relevance to interferon beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. **J. Immunol.** 165:548-557. (IF:7,065)
10. Wandinger, K.P., Stürzebecher, C.S., Bielekova, B., Detore, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., McFarland, H.F., Martin, R. (2001) The complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. **Ann. Neurol.** 50:349-357. (IF:8,481)
11. Wandinger, K.P., Lünemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.D., Volk, H.D., Zipp, F. (2003) TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for IFN-beta treatment in multiple sclerosis. **Lancet** 361:2036-2043. (IF:13,251)