

Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Modulation der Chemokine IP-10 und MCP-1
und ihrer Rezeptoren CXCR3 bzw. CCR2
durch Interferon- β 1a *in vitro* und *in vivo***

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2006

vorgelegt von

Anne Sabelhaus
geboren am 23.09.1978
in Haselünne

Tag der Promotion :

Dekan :

1. Berichterstatter :

2. Berichterstatter :

Für meine Eltern und Geschwister

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 MULTIPLE SKLEROSE	5
3.2 CHEMOKINE	7
3.3 INTERFERON-B	10
3.4 FRAGESTELLUNG	12
4 Material und Methoden	13
4.1 MATERIAL	13
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	13
4.1.2 Medien für die Zellkultur	13
4.1.3 FACS-Antikörper und FACS-Pufferlösungen	14
4.1.4 ELISA-Kits und ELISA-Pufferlösungen	15
4.1.5 Geräte	16
4.1.6 Sonstiges.....	16
4.2 KOLLEKTIVE DER GESUNDEN PROBANDEN UND MS PATIENTEN.....	17
4.2.1 Probandenkollektiv.....	17
4.2.2 Unbehandelte MS Patienten	17
4.2.3 MS Patienten unter der Therapie mit IFN- β 1a.....	19
4.3 METHODEN	19
4.3.1 Blutentnahme	19
4.3.2 Zellkultur.....	19
4.3.2.1 Gradient	19
4.3.2.2 Zellansatz.....	21

4.3.2.3	Proliferationsassay	21
4.3.3	FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell staining)	22
4.3.4	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	24
4.4	STATISTIK	26
5	Ergebnisse.....	27
5.1	KINETIK	27
5.2	PROLIFERATION	29
5.2.1	Unstimulierte PBL.....	29
5.2.2	PHA-stimulierte PBL	29
5.3	CHEMOKINREZEPTOREXPRESSION UND DEREN MODULATION DURCH IFN- β 1A.....	31
5.3.1	Methodik: Identifikation und Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten in der Durchflusszytometrie (FACS)	31
5.3.2	CXCR3 Expression	36
5.3.2.1	Modulation der CXCR3 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ der unstimulierten PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten	39
5.3.2.2	CXCR3 Expression auf isoliert kultivierten Monozyten von gesunden Probanden (Tab. 9):	42
5.3.2.3	Modulation der CXCR3 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ der unstimulierten PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten	43
5.3.3	CCR2 Expression	48
5.3.3.1	Modulation der CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten	50
5.3.3.2	CCR2 Expression auf isoliert kultivierten Monozyten von gesunden Probanden (Tab. 16):	53
5.3.3.3	Modulation der CCR2 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten	54
5.4	CHEMOKINPRODUKTION MONONUKLEÄRER ZELLEN <i>IN VITRO</i> UND DEREN MODULATION DURCH IFN- β 1A.....	57
5.4.1	IP-10 Produktion durch PBL von gesunden Probanden.....	57

5.4.1.1	Unstimulierte PBL (Abb. 9)	57
5.4.1.2	PHA-stimulierte PBL (Abb. 10)	59
5.4.2	IP-10 Produktion durch PBL von unbehandelten MS Patienten	61
5.4.2.1	Unstimulierte PBL	61
5.4.2.2	PHA-stimulierte PBL	63
5.4.3	IP-10 Produktion durch PBL von MS Patienten während s.c. IFN-β1a Therapie	65
5.4.3.1	Unstimulierte PBL	65
5.4.3.2	PHA-stimulierte PBL	66
5.4.4	Vergleich der IP-10 Produktion durch PBL von MS Patienten vor und während der s.c. IFN-β1a Therapie	68
5.4.4.1	Vergleich der spontanen IP-10 Produktion unstimulierter und PHA- stimulierter PBL von MS Patienten vor und während der s.c. Therapie	68
5.4.4.2	Vergleich des <i>in vitro</i> Ansprechens der IP-10 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf 1000 U IFN-β1a/ml bei MS Patienten vor und während der s.c. Therapie	69
5.4.5	Vergleich der IP-10 Produktion durch PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten	71
5.4.5.1	Vergleich der spontanen IP-10 Produktion unstimulierter und PHA- stimulierter PBL von Probanden und unbehandelten MS Patienten	71
5.4.5.2	Vergleich des Ansprechens der IP-10 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf die <i>in vitro</i> Gabe von 1000 U IFN-β1a/ml bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten	72
5.4.6	<i>In vitro</i> Modulation der IP-10 Produktion der isoliert kultivierten Monozyten von gesunden Probanden durch IFN-β1a	73
5.4.6.1	Unstimulierte Monozyten (Abb. 16)	73
5.4.6.2	LPS-stimulierte Monozyten (Abb. 17)	74
5.4.7	MCP-1 Produktion durch PBL von gesunden Probanden	76
5.4.7.1	Unstimulierte PBL	76
5.4.7.2	PHA-stimulierte PBL	78
5.4.8	MCP-1 Produktion durch PBL von unbehandelten MS Patienten	80
5.4.8.1	Unstimulierte PBL	80
5.4.8.2	PHA-stimulierte PBL	81

5.4.9	MCP-1 Produktion durch PBL von MS Patienten während <i>in vivo</i> Therapie mit IFN- β 1a s.c.....	83
5.4.9.1	Unstimulierte PBL.....	83
5.4.9.2	PHA-stimulierte PBL.....	85
5.4.10	Vergleich der MCP-1 Produktion durch PBL von MS Patienten vor und unter der Therapie mit IFN- β 1a.....	86
5.4.10.1	Vergleich der spontanen MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL von MS Patienten vor und während der s.c. Therapie.....	86
5.4.10.2	Vergleich des <i>in vitro</i> Ansprechens der MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf 1000 U IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und während der s.c. Therapie.....	87
5.4.11	Vergleich der MCP-1 Produktion durch PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten.....	90
5.4.11.1	Vergleich der spontanen MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten.....	90
5.4.11.2	Vergleich des <i>in vitro</i> Ansprechens der MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf 1000 U IFN- β 1a/ml bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten.....	91
5.4.12	MCP-1 Produktion durch PBL in den Überständen isoliert kultivierter Monozyten von gesunden Probanden.....	91
5.4.12.1	Unstimulierte Monozyten.....	92
5.4.12.2	LPS-stimulierte Monozyten.....	93
6	Diskussion.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	103
8	Veröffentlichungen.....	108
9	Danksagung.....	109
10	Lebenslauf.....	110

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildungen:

1: ELISA (Schematische Darstellung).....	25
2: Kinetik	28
3: Durchflusszytometrie frisch isolierter PBL nach Färbung von T-Zellen mit dem anti-CD3-Antikörper und von Monozyten mit dem anti- CD64-Antikörper	33
4: Durchflusszytometrie nach 16 stündiger Kultur der PBL und nach Färbung der T-Zellen mit dem anti-CD3-Antikörper und der Monozyten mit dem Anti-CD64-Antikörper	34
5: Durchflusszytometrie nach 68 stündiger Kultur der PBL und nach Färbung der T-Zellen mit dem anti-CD3-Antikörper und der Monozyten mit dem Anti-CD64-Antikörper	35
6: Fluoreszenzintensitätshistogramme der CXCR3-Färbungen unstimulierter PBL eines Probanden nach 16 stündiger Kultur	37
7: Fluoreszenzintensitätshistogramme der CXCR3-Färbungen unstimulierter PBL eines Probanden nach 68 stündiger Kultur	38
8: Färbeintensitätshistogramme der CCR2-Färbungen unstimulierter PBL eines Probanden nach 16 stündiger Kultur	49
9: Modulation der IP-10 Produktion unstimulierter PBL von gesunden Probanden durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	58
10: Modulation der IP-10 Produktion PHA-stimulierter PBL von gesunden Probanden durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	60
11: Modulation der IP-10 Produktion unstimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	62
12: Modulation der IP-10 Produktion PHA-stimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	64
13: IFN- β 1a-bedingte <i>in vitro</i> Modulation der IP-10 Produktion unstimulierter PBL von MS Patienten während s.c. IFN- β 1a-Therapie	66
14: IFN- β 1a-bedingte <i>in vitro</i> Modulation der IP-10 Produktion PHA-stimulierter PBL von MS Patienten während s.c. IFN- β 1a-Therapie	68
15: Modulation der IP-10 <i>in vitro</i> Produktion PHA-stimulierter PBL durch 1000 U IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und während der Therapie mit IFN- β 1a s.c.....	71

16: Modulation der IP-10 Produktion unstimulierter isolierter Monozyten von gesunden Probanden durch 1000 U IFN- β 1a/ml <i>in vitro</i>	74
17: Modulation der IP-10 Produktion LPS-stimulierter Monozyten von gesunden Probanden durch 1000 U IFN- β 1a/ml <i>in vitro</i>	75
18: Modulation der MCP-1 Produktion unstimulierter PBL-Kulturen von gesunden Probanden durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	77
19: Modulation der MCP-1 Produktion PHA-stimulierter PBL-Kulturen von gesunden Probanden durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	79
20: Modulation der MCP-1 Produktion unstimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	81
21: Modulation der MCP-1 Konzentrationen PHA-stimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten durch IFN- β 1a <i>in vitro</i>	82
22: IFN- β 1a-bedingte <i>in vitro</i> Modulation der MCP-1 Produktion unstimulierter PBL-Kulturen von MS Patienten während s.c. IFN- β 1a-Therapie.....	84
23: IFN- β 1a-bedingte <i>in vitro</i> Modulation der MCP-1 Produktion PHA-stimulierter PBL von MS Patienten während s.c. IFN- β 1a-Therapie.....	86
24: Modulation der MCP-1 <i>in vitro</i> Produktion unstimulierter PBL durch 1000 U IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und während der <i>in vivo</i> Therapie mit IFN- β 1a s.c.	88
25: Modulation der MCP-1 <i>in vitro</i> Produktion PHA-stimulierter PBL durch 1000 U IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und während der Therapie mit IFN- β 1a s.c.	90
26: Modulation der MCP-1 Produktion unstimulierter isolierter Monozyten von gesunden Probanden durch 1000 U IFN- β 1a/ml <i>in vitro</i>	93
27: Modulation der MCP-1 Produktion LPS-stimulierter isolierter Monozyten von gesunden Probanden durch 1000 U IFN- β 1a/ml <i>in vitro</i>	94

Tabellen:

1: Patientenkollektiv.....	18
2: MS Patienten unter der Therapie mit IFN- β 1a.....	19
3: Pipettierschema Zellkulturansatz der PBL.....	21
4: Pipettierschema Proliferationsassay.....	22

5: <i>In vitro</i> Modulation des Proliferationsassays PHA-stimulierter PBL von 14 gesunden Probanden, zwölf unbehandelten MS Patienten und sieben mit <i>in vivo</i> IFN- β 1a behandelten Patienten durch IFN- β 1a nach 40 und nach 92 h Kultur.....	30
6: CXCR 3 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden.....	40
7: CXCR3 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten	41
8: Vergleich von CXCR3 auf Zellen im „Monozyten-Gate“ frischer PBL ohne Kultur; MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a s.c.	42
9: CXCR3 Expression auf isoliert kultivierten, unstimulierten Monozyten von gesunden Probanden.....	43
10: CXCR 3 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2) unstimulierter PBL von gesunden Probanden.....	45
11: CXCR3 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2) unstimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten	46
12: Vergleich von CXCR3 auf nativen Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2); MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a.....	48
13: CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden; 16 h Kultur	50
14: CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten; 16 h Kultur.....	51
15: Vergleich der CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ frisch isolierter PBL von MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a s.c.	52
16: CCR2 Expression auf isoliert kultivierten, unstimulierten Monozyten von gesunden Probanden.....	53
17: CCR2 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden; 16 h Kultur	54
18: CCR2 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ unstimulierter PBL von unbehandelten MS Patienten; 16 h Kultur.....	55
19: Vergleich der CCR2 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ frisch isolierter PBL von MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a s.c.	56
20: IFN- β 1a-bedingte <i>In vitro</i> Modulation der IP-10 Produktion PHA-stimulierter PBL von MS Patienten während s.c. IFN- β 1a Therapie	67

21: IP-10 Konzentrationen PHA-stimulierter PBL-Kulturen von sieben MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a.....	69
22: <i>In vitro</i> Modulation der MCP-1 Produktion durch unstimulierte PBL von 13 gesunden Probanden durch IFN- β 1a nach 16 und 68 h Kultur	76
23: <i>In vitro</i> Modulation der MCP-1 Produktion durch PHA-stimulierte PBL von 13 gesunden Probanden durch IFN- β 1a nach 16 und 68 h Kultur	78
24: IFN- β 1a-bedingte <i>In vitro</i> Modulation der MCP-1 Produktion unstimulierter PBL von sieben MS Patienten während s.c. IFN- β 1a-Therapie nach 16 und 68 h Kultur	83
25: IFN- β 1a-bedingte <i>In vitro</i> Modulation der MCP-1 Produktion PHA-stimulierter PBL von sieben MS Patienten unter s.c. IFN- β 1a-Therapie nach 16 und 68 h Kultur	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	CC Chemokin-Ligand (Mitglied der Chemokinfamilie)
CCR	CC Chemokin-Rezeptor (Mitglied der Chemokinrezeptoren)
CD	Cluster of differentiation
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
cpm	Counts per minute
CXCL	CXC Chemokin-Ligand (Mitglied der Chemokinfamilie)
CXCR	CXC Chemokin-Rezeptor (Mitglied der Chemokinrezeptoren)
d	Tag
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
ED	Erstdiagnose
EDSS	Expanded disability status scale
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Erstmanifestation
FACS	Fluorescence-activated cell staining (Durchflusszytometrie)
FCS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (Klassifikation humaner Histokompatibilitätsantigene)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IP-10 (CXCL-10)	Interferon-gamma-inducible protein-10 (Ligand des CXCR3)
LFA	Leukozyten-Funktionsantigen (Adhäsionsmolekül)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Basisches Myelinprotein
MCP-1 (CCL-2)	Monocyte chemoattractant protein-1 (Ligand des CCR2)
MHC	Major histocompatibility complex
Mig	Monokine induced by IFN- γ
Mio.	Millionen
MIP-1alpha	Macrophage inflammatory protein 1alpha
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOG	Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid (Messenger Ribonukleinsäure)
MS	Multiple Sklerose
NO	Stickstoffmonoxyd
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	phosphate buffered saline
PHA	Phytohämagglutinin
PLP	Proteolipid-Protein
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
rpm	rounds per minute
s	Standardabweichung
s.c.	subkutan
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
S-100	ein Calcium-bindendes Protein im Zytoplasma von Astrozyten
Th	T-Helfer

TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
U	unit(s)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule (endotheliales Adhäsionsmolekül)
VLA	Very late activation antigen
w	well
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose ist die häufigste organspezifische Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems. Ein wichtiger Aspekt in ihrer Immunpathogenese ist die Migration von T-Lymphozyten und Makrophagen durch die Blut-Hirn-Schranke. Hierbei spielen Chemokine und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Interferon- β , das heute bevorzugt als Immuntherapeutikum bei der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose eingesetzt wird, könnte relevante Chemokine und ihre Rezeptoren modulieren.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 10, 100 und 1000 U Interferon- β 1a/ml *in vitro* auf die Produktion der Chemokine IP-10 und MCP-1 durch unstimulierte und mit PHA Mitogen-stimulierte periphere mononukleäre Blutleukozyten mittels ELISA und auf die Expression der entsprechenden Chemokinrezeptoren CXCR3 beziehungsweise CCR2 mittels Durchflusszytometrie der Zellen bei gesunden Probanden untersucht und bei Multiple Sklerose Patienten vor und während subcutaner *in vivo* Therapie mit Interferon- β 1a gemessen.

Durch 1000 U Interferon- β 1a/ml *in vitro* wurden die Expressionsdichten von CXCR3 und CCR2 auf durchflusszytometrisch getrennt untersuchten peripheren mononukleären Blutleukozytensubpopulationen reduziert: Für CXCR3 war die Reduktion auf Zellen mit hoher CXCR3 Dichte im „Lymphozyten-Gate“ der gesunden Probanden und unbehandelten Multiple Sklerose Patienten nach 16 h und 68 h Kultur statistisch signifikant. CCR2 wurde binnen 16 h auf einer im wesentlichen aus Monozyten bestehenden Population statistisch signifikant vermindert.

Auch während einer mindestens fünf-wöchigen *in vivo* Therapie nahm die *ex vivo* untersuchte CCR2 Expression auf den mononukleären Zellen im „Monozyten-Gate“ signifikant ab. Die Dichte von CXCR3 auf diesen Zellen nahm während der Behandlung zwar statistisch signifikant zu, war absolut aber sehr niedrig.

Die IP-10 Produktion wurde *in vitro* durch Interferon- β 1a dosisabhängig in unstimulierten und mitogenstimulierten peripheren mononukleären Blutleukozytenkulturen von Probanden, unbehandelten und behandelten Multiple Sklerose Patienten um bis zum 33 fachen nach Kulturdauer von 16 h und 68 h gesteigert. Auch die MCP-1 Produktion erhöhte sich statistisch signifikant in den *unstimulierten* Blutleukozytenkulturen von Probanden (nach 16 h und 68 h Kultur) und unbehandelten Multiple Sklerose Patienten (nach 16 h Kultur) durch 1000 U Interferon- β 1a/ml am stärksten. Nach langer Kulturdauer, Mitogen-Stimulation oder Interferon-

Vorbehandlung konnte die MCP-1 Modulation nur noch in abgeschwächter Form beobachtet werden oder führte *in vitro* Interferon sogar zur Inversion der Chemokinproduktion: Dies bedingte im Einzelnen, dass nach 68 stündiger Mitogen-Kultur der Zellen aller drei Donorgruppen, bei den mit Interferon- β 1a behandelten MS Patienten auch nach 16 h und nach unstimulierter 68 h Kultur, MCP-1 in den Überständen durch Interferon- β 1a signifikant reduziert wurde. Entsprechend wurde durch 1000 U Interferon- β 1a *in vitro* die MCP-1 Produktion unstimulierter Kulturen Interferon- β 1a-behandelter Patienten signifikant geringer erhöht als vor der *in vivo* Behandlung.

Die spontane *in vitro* Produktion von IP-10 und MCP-1 unstimulierter und Mitogen-stimulierter Kulturen wurde durch die *in vivo* Vorbehandlung mit Interferon- β 1a in Bezug auf die unbehandelten Patienten nicht wesentlich verändert.

Unter der Annahme, dass die Interferon- β 1a induzierte Chemokinproduktion im wesentlichen im lymphatischen Gewebe erfolgt und kurzzeitig ist, kann postuliert werden, dass dadurch T-Lymphozyten und Makrophagen chemotaktisch zurückgehalten werden. Hierdurch würde die Migration der Zellen in das zentrale Nervensystem limitiert und könnte die autoimmune Entzündung inhibiert werden. Zudem kann die MCP-1 Induktion die Entwicklung von Th2-Lymphozyten, welche bei der Multiplen Sklerose regulatorisch wirken können, begünstigen. Letztlich könnte eine *in vitro* beobachtete, *in vivo* möglicherweise vorübergehend erfolgende Herunterregulation der Chemokinrezeptoren durch Interferon- β 1a die Suszeptibilität der Zellen für schwache chemotaktische Reize (zum Beispiel aus entzündlichen Läsionen des zentralen Nervensystem) reduzieren.

In Anbetracht dieser Tatsachen könnten die IP-10 und MCP-1 Induktion und die reduzierte Expression von CXCR3 und CCR2 durch Interferon- β 1a einen relevanten Wirkmechanismus des klinischen Effekts von Interferon- β 1a bei der Multiple Sklerose-Therapie darstellen.

2 SUMMARY

Modulation of the chemokines IP-10 and MCP-1 and their receptors CXCR3 and CCR2 by interferon- β 1a *in vitro* and *in vivo*

Multiple sclerosis is the most frequent chronic inflammatory disease of the central nervous system. An important feature in its immunopathogenesis is the migration of T-lymphocytes and macrophages through the blood-brain-barrier into the central nervous system. During this process chemokines and their receptors play a central role. The type I interferon interferon- β , which is approved for immunotherapy of relapsing-remitting multiple sclerosis, might modulate chemokines and their receptors.

This study analysed the *in vitro* effect of interferon- β 1a on the production of the chemokines IP-10 and MCP-1 by peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients before and during the therapy with subcutaneous interferon- β 1a and of healthy individuals by ELISA of cell culture supernatants. In parallel, the *in vitro* and *in vivo* modulation of the corresponding receptors CXCR3 and CCR2 by interferon- β 1a was measured by immunofluorocytometry.

By 1000 U interferon- β 1a/ml *in vitro* CXCR3 and CCR2 were downregulated on subpopulations of unstimulated peripheral blood mononuclear cells, separated by flow cytometry. This reduction of CXCR3 was statistically significant after 16 and 68 hours of culture on cells in a lymphocyte-gate (subpopulation with high CXCR3 expression) of healthy persons and multiple sclerosis patients without therapy. During 16 hours CCR2 was considerably reduced by interferon- β 1a on cells within a monocyte-gate (mainly monocytes).

Also during the *in vivo* treatment with interferon- β 1a for at least five weeks the density of CCR2 expression was significantly downregulated on cells in the monocyte-gate. In contrast, CXCR3 was upregulated on these cells by subcutaneous interferon- β 1a with statistical significance, but on a very low expression level.

In vitro interferon- β 1a dose dependently and strongly enhanced the production of IP-10 in unstimulated and mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cell cultures from healthy subjects and untreated and interferon- β 1a-treated multiple sclerosis patients during 16 and 68 hours of culture. Interferon- β 1a also stimulated the production of MCP-1 by *unstimulated* peripheral blood mononuclear cell cultures of healthy adults (after 16 and 68 hours of culture)

and multiple sclerosis patients without therapy (after 16 hours of culture) significantly. This stimulatory effect was less pronounced or became even inversed in mitogen-stimulated and long lasting cultures or after *in vivo* pre-treatment with interferon- β 1a: In Phytohemagglutinin-stimulated cell cultures of 68 hours duration from all three donor groups MCP-1 was significantly reduced by interferon- β 1a *in vitro* and in cultures from interferon- β 1a-treated patients MCP-1 was even reduced in stimulated cultures of 16 hours and unstimulated cultures of 68 hours duration. Correspondingly, the interferon- β 1a-mediated induction of MCP-1 in unstimulated cultures was significantly lower with cells from interferon- β 1a-treated patients than with cells from the same patients before interferon- β 1a therapy.

Spontaneous *in vitro* production of IP-10 and MCP-1 did not change considerably by the *in vivo* therapy with interferon- β 1a as compared to cell cultures of the same patients before treatment.

With respect to the *in vivo* situation of multiple sclerosis treatment with interferon- β 1a one may assume that chemokine induction by subcutaneous interferon- β 1a occurs mainly in the lymphoid system and is short-lived. This should keep the T-lymphocytes and macrophages in the lymphoid organs. In consequence, the migration of cells into the central nervous system may be reduced and autoimmune inflammation in the central nervous system mitigated. In addition, the MCP-1 induction could favour the development of Th2-lymphocytes, which are thought to act as regulatory cells in multiple sclerosis. Finally, the downregulation of the chemokine-receptors by interferon- β 1a which was evident *in vitro* may also happen *in vivo* for a short time after interferon- β 1a application and may render the immune cells less sensitive for weak chemotactic stimuli, e.g. from inflammatory lesions of the central nervous system.

Thus, the induction of IP-10 and MCP-1 and the downregulation of CXCR3 and CCR2 by interferon- β 1a may be important immune mechanisms for the clinical benefit of interferon- β 1a in multiple sclerosis treatment.

3 EINLEITUNG

3.1 MULTIPLE SKLEROSE

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch-entzündliche neurologische Erkrankung und manifestiert sich vor allem im jungen Erwachsenenalter mit einem Inzidenz Gipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Sie tritt bei Frauen etwa doppelt so häufig auf wie bei Männern. Die Prävalenz liegt in Mitteleuropa bei 60-100 pro 100.000 Einwohner, ist jedoch von der geographischen Breite abhängig. Die Häufigkeit nimmt auf der Nordhalbkugel mit steigender Entfernung vom Äquator zu. Hierbei spielt die Krankheitsinzidenz der Region, in der die Person bis zur Pubertät aufwächst, eine Rolle für ihr Erkrankungsrisiko. Neben den Umwelteinflüssen sind auch genetische Faktoren relevant. Hier konnte eine Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätsantigen HLA-DR2 gezeigt werden (COMPSTON, 1998). Insgesamt ist die Ätiologie jedoch weitgehend ungeklärt.

Histo- und immunpathogenetisch ist die MS eine immunvermittelte Entmarkungserkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Deshalb ist vorwiegend die weiße Substanz betroffen. Die herdförmigen Entzündungen, bei denen die Markscheiden, aber auch das Axon geschädigt werden, liegen bevorzugt perivenös im periventrikulären Marklager und Hirnstamm, im Kleinhirn und den Kleinhirnstielen, im cervicalen Rückenmark und in den Sehnerven (LASSMANN, 1998). Hieraus ergeben sich die unterschiedlichen klinischen Symptome wie Paresen der Hirnnerven oder Extremitäten, Sensibilitätsstörungen, zerebelläre Störungen, Blasenfunktionsstörungen, supranukleäre Störungen der Okulomotorik, Visusminderung sowie nach mehrjähriger Krankheitsdauer neuropsychologische Veränderungen (MATTHEWS, 1998).

Bei bis zu 90 % der Patienten beginnt die Erkrankung schubförmig, d.h. mit Episoden von neurologischen Funktionsausfällen, die für einige Wochen anhalten und sich danach komplett zurückbilden können. Während des späteren Verlaufs erfolgt häufiger eine unvollständige Rückbildung der Symptome der Schübe. In der Mehrzahl der Verläufe entwickelt sich zudem eine allmähliche, schubunabhängige Verschlechterung. Der schubförmige Verlauf geht hier in einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf über. Bei einem geringen Anteil von ca. 10 % nimmt die Erkrankung bereits von Beginn an einen schleichend progressiven (primär chronisch-progredienten) Verlauf (EBERS, 1998).

Die Erkenntnis, dass die MS eine entzündliche Autoimmunerkrankung ist, bei der zelluläre und humorale Mechanismen des Immunsystems mitwirken, stammt aus histopathologischen Untersuchungen cerebraler MS-Läsionen und aus dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). An diesem Modell werden Krankheitsmechanismen und Therapiemöglichkeiten der MS erforscht. Die EAE kann in dafür suszeptiblen Tieren wie z.B. Ratten, Mäusen und Affen durch Immunisierung mit Myelinproteinen des ZNS in Verbindung mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) ausgelöst werden. Neben dem Basischen Myelinprotein (MBP) existieren noch die Myelinproteine Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und Proteolipid-Protein (PLP) und das astrozytäre Protein S-100, die als Autoantigene der MS in Frage kommen. Außerdem lässt sich die EAE durch den Transfer von myelinspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten induzieren (WEKERLE et al., 1994). Hier scheinen Th1-Zellen die prädominante Rolle zu spielen (ZAMVIL, 1990), wohingegen Th2-Zellen eher protektiv wirken sollen (RÖCKEN et al., 1996). Th1-Zellen sezernieren Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Th2-Zellen produzieren IL-4, IL5, IL-10 und IL-13 (MOSMANN, SAD, 1996).

Histopathologische Studien haben gezeigt, dass sich die entzündlichen Infiltrate hauptsächlich aus T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, aktivierter Mikroglia und zu einem kleineren Anteil aus B-Lymphozyten zusammensetzen (LASSMANN, 1998). Eine bedeutende Komponente im Bereich des frischen Entzündungsherdens ist die Störung der Blut-Hirn-Schranke (SOERENSEN, RANSOHOFF, 1998).

In aktiven, frischen Läsionen finden sich aktivierte T-Lymphozyten, die als Initiator der Entzündung gelten. Wie jedoch diese neuroantigen-spezifischen Lymphozyten in der Peripherie initial aktiviert werden, ist weitgehend unbekannt. Ein möglicher Mechanismus ist das „molekulare Mimikri“. Dabei erkennt eine T-Zelle Peptide, die in Verbindung mit Klasse II Oberflächenmolekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major histocompatibility complex II; MHC II) von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. Im Fall der MS wird vermutet, dass diese Fremdantigene von Viren oder evtl. auch Bakterien exprimiert werden und Strukturhomologien mit den oben genannten Autoantigenen des ZNS aufweisen (FUJINAMI, OLDSTONE, 1985; SHAW et al., 1986), so dass autoreaktive T-Zellen aktiviert werden.

Die aktivierten, zirkulierenden Lymphozyten können dann unabhängig von ihrer Spezifität die intakte Blut-Hirn-Schranke durchwandern (WEKERLE et al., 1994). Die aktivierten T-Zellen, die im ZNS durch Neuroantigene restimuliert werden, verbleiben dort und lösen eine entzündliche Immunantwort durch Zytokinausschüttung aus. Dabei werden die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α sezerniert. Die beiden letztgenannten Zytokine bedingen auf Endothelzellen eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und endotheliales Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) (POBER et al., 1993), wirken stimulierend auf die Expression von MHC-Molekülen und auf die Sekretion von Chemokinen (ADAMS, LLOYD, 1997). Durch diese Mechanismen werden weitere Leukozyten aus der Peripherie mobilisiert. Nach dem ersten Kontakt der Leukozyten mit dem Gefäßendothel, dem sog. „Tethering“ und der Verlangsamung ihrer Zirkulation („Rolling“) binden die Leukozyten fest an die oben genannten Adhäsionsmoleküle. Dort erhalten sie einen gerichteten Stimulus durch die Chemokine, um letztendlich die Blut-Hirn-Schranke zu durchwandern (RANSOHOFF, 1999).

Neben der Rekrutierung von Leukozyten aus der Peripherie aktivieren sowohl die oben genannten Zytokine als auch Chemokine die eingewanderten Zellen und sich im ZNS befindliche Zellen wie Mikroglia und Astrozyten (MERRILL, BENVENISTE, 1996). Die Demyelinisierung wird in erster Linie von aktivierten Makrophagen und aktivierter Mikroglia ohne oder in Zusammenwirken mit myelinspezifischen Antikörpern verursacht: Die Zellen können das Myelin direkt phagozytieren, eine rezeptorvermittelte Endozytose kann mittels Antikörpern erfolgen, es können toxische Faktoren wie TNF und Stickstoffmonoxyd (NO) produziert werden, oder es kann eine Opsonisierung durch Komplement stattfinden (SOERENSEN, RANSOHOFF, 1998).

3.2 CHEMOKINE

Wie bereits oben erwähnt, sind die Chemokine bei der entzündungsgerichteten Anlockung von Leukozyten (Chemotaxis) beteiligt. Sie lassen sich in vier Familien einteilen. Die α -Chemokine (CXC) unterscheiden sich von den β -Chemokinen (CC) dadurch, dass die ersten beiden N-terminalen Zysteine durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind, was bei den β -Chemokinen nicht der Fall ist, hier sind sie zusammenhängend. Die dritte Klasse der Chemokine ist das Lymphotactin (C), die vierte Klasse das Fraktalkine oder Neurotactin (CX3C). Einige Chemokine binden an mehr als einen Chemokinrezeptor, und viele Rezeptoren haben mehrere Chemokinliganden, so dass es sich im Vergleich zum Zytokinsystem um ein relativ

redundantes System handelt. Die Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die am intensivsten erforschte und wichtigste biologische Aufgabe der Chemokine ist die Rekrutierung von Leukozyten, z.B. an den Ort einer Entzündung. Dabei aktivieren sie leukozytäre Integrine und veranlassen die Migration durch Gefäßendothel (BAGGIOLINI, 2001). Die Chemokine sind basisch und binden so an Proteoglykane der luminalen endothelialen Glykokalyx. Hier fungieren sie als fixierte Liganden. Sie veranlassen die Leukozyten, entlang eines Konzentrationsgradienten zu wandern. Zur α -Familie der Chemokine gehört das Interferon- γ -inducible protein (IP-10; neue Klassifikation: CXCL-10), welches an den Chemokinrezeptor CXCR3 bindet. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; neue Klassifikation: CCL-2) zählt zu den β -Chemokinen. Hier ist CCR2 der passende Rezeptor (RANSOHOFF, 1999). IP-10 löst chemotaktische Wirkung hauptsächlich auf T-Zellen, aber auch auf natürliche Killerzellen aus (ADAMS, LLOYD, 1997). MCP-1 hat Monozyten, jedoch auch aktivierte T-Zellen, NK-Zellen und basophile Granulozyten als Zielzellen. Der CCR2 ist auf Monozyten und auf aktivierten T-Zellen exprimiert (IZIKSON et al., 2002). Die genannten Chemokine und Chemokinrezeptoren sind bei MS Patienten im Blut, im Liquor und im Gewebe des ZNS nachzuweisen (TREBST, RANSOHOFF, 2001). Studien *in vitro* haben gezeigt, dass während eines Entzündungsschubes der MS die Konzentration von IP-10 im Liquor und Serum abrupt anstieg und wieder fiel, als der Schub abklang. Die Konzentration von MCP-1 im Liquor sank jedoch im Schub (FRANCIOTTA et al., 2001), obwohl im Tiermodell der MS in der akuten Phase der EAE die Produktion von MCP-1 parallel zur Produktion von IP-10 *in situ* (im Gewebe des ZNS) gestiegen ist (GLABINSKI et al., 1997). Die beiden Chemokine werden u.a. von am Rand der Entzündung befindlichen Astrozyten sezerniert (SIMPSON et al., 2000; MAHAD, RANSOHOFF, 2003). Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass während eines Schubes die CXCR3 Expression auf peripheren CD4⁺ T-Lymphozyten im Blut hochreguliert wird (MAHAD et al., 2003). Analoge Untersuchungen zu CCR2 liegen bisher nicht vor.

Die Chemokine wirken allerdings auch immunmodulatorisch, indem sie Zytokinproduktionen in T-Zellen modulieren oder stimulieren (LUTHER, CYSTER, 2001). Von Mäusen isolierte T-Zellen haben *in vitro* mit der Inkubation von MCP-1 vermehrt IL-4 sezerniert. Dieses Zytokin lenkt die Entwicklung der naiven T-Zellen in die Richtung des Th2-Phänotyps (KARPUS et al., 1997). Es wird angenommen, dass die vermehrte Bildung von Th2-Zellen einen antiinflammatorischen Effekt hat, der sich günstig auf den Verlauf entzündlicher Th1-Autoimmunerkrankungen auswirken kann. KARPUS et al. haben nicht nur gezeigt, dass MCP-1 die IL-4 Produktion hochreguliert hat, sondern auch, dass erhöhte MCP-1 Konzentra-

tionen im Darmendothel, in den Peyer'schen Plaques und in den mesenterialen Lymphknoten bei Mäusen die Sezernierung von IL-12 durch Makrophagen supprimiert haben (KARPUS et al., 1998). In seiner Funktion als die Differenzierung von Th2-Zellen förderndes Chemokin war MCP-1 im Modell der EAE bei der Induktion einer oral induzierten antigenspezifischen Immuntoleranz beteiligt (KARPUS et al., 1998). Gemäß den genannten experimentellen Ergebnissen in der EAE könnten erhöhte MCP-1 Konzentrationen außerhalb des ZNS eher günstige Effekte auf den Verlauf der MS haben. Es gibt aber auch Studien, die zeigten, dass MCP-1 bei der Vermittlung krankheitsauslösender Mechanismen beteiligt sein kann. In einer Arbeit von YOUSSEF et al. wurden Ratten mit MCP-1 Desoxyribonukleinsäure (DNA) geimpft, und danach wurde die EAE induziert. Doch die geimpften Ratten waren aufgrund der Bildung MCP-1 neutralisierender Antikörper weitgehend resistent gegenüber der EAE (YOUSSEF et al., 1998). Analog wurde in MCP-1 knock-out Mäusen gezeigt, dass diese resistent gegenüber der EAE waren, die aktiv durch Immunisierung mit ZNS-Autoantigenen induziert wurde. Es wurde eine stark verminderte Rekrutierung von Makrophagen in das ZNS sowie eine reduzierte Expression von IFN- γ in Lymphknoten und im ZNS beobachtet (HUANG et al., 2001). Aufgrund dieser Resultate scheint MCP-1, abhängig vom Expressionstyp, duale Effekte auszuüben, dahingehend dass die Expression im Darmepithel antigenspezifische orale Toleranzentwicklung begünstigt (KARPUS et al., 1998), aber die Expression im ZNS durch Entzündungsvermittlung eine krankheitsverstärkende Wirkung hat (YOUSSEF et al., 1998; HUANG et al., 2001).

Das Chemokin MCP-1 bindet an den Rezeptor CCR2. Hier haben Studien mit Mäusen, bei denen CCR2 fehlte, gezeigt, dass diese Tiere nach aktiver Immunisierung mit MOG-Peptiden keinerlei klinische Zeichen einer EAE aufwiesen. Es waren keine entzündlichen mononukleären Zellinfiltrate im ZNS zu beobachten (IZIKSON et al., 2000). Diese Aussage wurde aber von GAUPP et al. relativiert. Sie zeigten, dass die CCR2 knock-out Mäuse nicht vollständig resistent gegen die EAE waren. Abhängig vom Mäusestamm waren die Symptome der EAE in MCP-1-knockout Tieren leicht abgeschwächt oder diese erkrankten erst zu einem späteren Zeitpunkt an der EAE (GAUPP et al., 2003).

Wie der Name schon sagt, wird IP-10 durch den Einfluß von IFN- γ induziert. Es kann von aktivierten Makrophagen, Astrozyten, T-Zellen und Endothelzellen produziert werden (SIMPSON et al., 2000). In einem Tiermodell, in dem das ZNS von Mäusen mit einem Hepatitis-Virus der Maus infiziert wurde, kam es ähnlich wie bei der MS zur Encephalomyelitis und zur chronischen Demyelinisierung. An diesem Modell wurde beobachtet, dass durch eine

anti-IP-10 Therapie die Krankheit einen mildereren Verlauf nahm. Dabei war die Invasion von $CD4^+$ T-Lymphozyten und Makrophagen in das ZNS reduziert, und es wurde weniger $IFN-\gamma$ im ZNS exprimiert. Außerdem wurde die weitere Demyelinisierung inhibiert, und man sah eine vermehrte Remyelinisierung (LIU et al., 2001). Einen klinisch benigneren Verlauf der EAE und eine histologisch geringere Infiltration von mononukleären Zellen und T-Zellen in das ZNS durch die Gabe von anti-IP-10-Antikörpern zeigten auch FIFE et al. in ihrem Experiment (FIFE et al., 2001). Gegenteiliges haben NARUMI et al. dargestellt: In ihrem Artikel wurde beschrieben, dass sich die EAE durch die Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IP-10 verschlechtert habe. Es wurden eine erhöhte Akkumulation von $CD4^+$ Zellen im ZNS, verkleinerte Lymphknoten und eine verminderte Produktion von $IFN-\gamma$ im lymphatischen Gewebe festgestellt. Da IP-10 und CXCR3 im lymphatischen Gewebe exprimiert werden, wurde diskutiert, dass durch die verminderte Produktion von IP-10 in den Lymphknoten die CXCR3 exprimierenden T-Zellen von den Lymphknoten leichter in die Organe und das ZNS wandern und somit die organständige Entzündung fördern (NARUMI et al., 2002).

Der Rezeptor CXCR3 ist bevorzugt auf aktivierten T-Lymphozyten, aber auch auf Monozyten, B-Zellen, NK-Zellen und proliferierenden Endothelzellen exprimiert (ADAMS, LLOYD, 1997; SOERENSEN et al., 2002). Eine Studie, bei der neutralisierende Antikörper gegen CXCR3 verabreicht wurden, bevor bzw. nachdem die Mäuse aktiv mit einem PLP-Peptid immunisiert wurden, hat demonstriert, dass die Mäuse vor der Entwicklung der EAE geschützt waren. Histologische Analysen ergaben eine verminderte mononukleäre Zellinfiltration in das ZNS (ARIMILLI et al., 2000).

Die angeführten Untersuchungen zeigen, dass insbesondere die Chemokine IP-10 und MCP-1 sowie ihre korrespondierenden Hauptrezeptoren eine sehr differenzierte, aber essentielle Funktion in der Immunpathogenese von Autoimmunität im ZNS ausüben.

3.3 INTERFERON-B

Interferone sind natürlich vorkommende Glykoproteine mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulierenden Eigenschaften. Die beiden Hauptgruppen der Interferone sind das Typ I und Typ II Interferon. Zum Typ I zählen die α - und β -Interferone, zum Typ II das Interferon- γ (WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 1994). Zur Therapie der MS wird das Interferon- β verwendet.

Zur Behandlung der schubförmigen MS werden heute β -Interferone oder Glatirameracetat als immunmodulatorische Basistherapeutika empfohlen. Als alternative Basistherapie können Azathioprin und Immunglobuline gegeben werden. Doch am häufigsten werden momentan zur Immuntherapie β -Interferone eingesetzt. In klinischen Studien konnte demonstriert werden, dass sich unter der Interferontherapie die Schubfrequenz bis zu 35 % und die kernspintomographische Krankheitsaktivität um bis zu 90 % reduziert haben.

Wie bereits oben erwähnt, haben die Interferone auf Lymphozyten einen antiproliferativen Effekt. Studien haben dies belegt, indem sie gezeigt haben, dass rekombinantes Interferon- β die mitogenstimulierte Aktivierung von T-Zellen *in vitro* und *in vivo* inhibiert hat (RUDICK et al., 1993). Außerdem hemmte Interferon- β die durch IFN- γ induzierte Expression von MHC II Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (JIANG et al., 1995; LU et al., 1995).

Einen weiteren Benefit für den Verlauf der MS bringt die durch IFN- β verminderte Akkumulation von T-Lymphozyten im ZNS. STÜVE et al. legten in ihren *in vitro* Experimenten dar, dass IFN- β 1b die Aktivität der Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) reduzierte und somit die T-Zellinfiltration durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS hemmen könnte (STÜVE et al., 1996). Eine weitere wichtige Komponente, die die Invasion in das ZNS ermöglicht, sind die Adhäsionsmoleküle am Endothel der Blut-Hirn-Schranke, die neben der oberflächlichen Membranexpression auch löslich im Blut vorkommen. Unter einer Therapie mit IFN- β 1b wurden höhere Konzentrationen von löslichem VCAM-1 beobachtet als bei Kontrollpersonen oder bei den MS Patienten vor der Therapie (CALABRESI et al., 1997). Durch die Bindung löslicher VCAMs an VLA-4 auf aktivierten T-Zellen könnten weniger T-Zellen an die Adhäsionsmoleküle der Blut-Hirn-Schranke binden, um sie zu durchwandern.

Durch die *in vitro* Gabe von IFN- β 1a wurden erhöhte Konzentrationen von IL-10 in der mononukleären Zellkultur gemessen (RUDICK et al., 1996). Später zeigten RUDICK et al., dass neben der gesteigerten IL-10 Produktion auch die Sezernierung von IL-4 im Blut unter *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a zunahm (RUDICK et al., 1998). Das Th2-geprägte Zytokinmilieu könnte inhibitorisch auf die entzündliche Autoimmunerkrankung wirken. Hinzu kommt, dass die *in vitro* Gabe von IFN- β 1b die IL-12 Produktion durch PBL, über einen IL-10-abhängigen Mechanismus, supprimiert hat (WANG et al., 2000).

Andere immunmodulatorische Effekte der Typ I Interferone betreffen die Expression von IFN- γ . Abhängig von den experimentellen Bedingungen kann die Produktion von IFN- γ durch Interferon- α/β sowohl hochreguliert als auch gesenkt werden (NGUYEN et al., 2000).

Neben dem IFN- γ können möglicherweise auch andere lösliche Faktoren durch Interferon- α/β hoch- und herunterreguliert werden.

Wie gesagt, verminderte IFN- β 1a die Leukozytenwanderung in das ZNS durch Induktion von löslichen Adhäsionsmolekülen und durch die Inhibition der MMP-9. Die verminderte Leukozyteninvasion könnte aber auch durch die Modulation von Chemokinen und ihren Rezeptoren geschehen. Es gibt bereits Untersuchungen, die gezeigt haben, dass durch die *in vitro* Gabe von IFN- β 1a die Expression von Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) für RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) und für ihren Rezeptor CCR5 in T-Zellen von MS Patienten erniedrigt wurde (ZANG et al., 2001). In der Arbeit von MCMANUS et al. wurde konträr zu den genannten Chemokinen die Konzentration von MCP-1, produziert von Monozyten gesunder Probanden, durch Interferon- β *in vitro* signifikant erhöht (MCMANUS et al., 2000).

3.4 FRAGESTELLUNG

Wie bereits dargestellt, dürften die Chemokine IP-10 und MCP-1 und deren Rezeptoren eine relevante Rolle in der Effektorphase der Immunpathogenese der MS einnehmen.

Die funktionelle Bedeutung dieser Chemokine und ihrer Rezeptoren CXCR3 und CCR2 in der EAE sowie ihre Expression bei der MS gaben Anlass, deren Modulation unter dem *in vivo* und *in vitro* Einfluss des MS-Therapeutikums IFN- β 1a (Rebif®) bei MS Patienten und gesunden Probanden im Folgenden zu untersuchen. Eine wesentliche Modulation der Chemokine durch IFN- β 1a könnte einen weiteren relevanten Mechanismus des antiinflammatorischen Effektes von IFN- β 1a bei der MS darstellen.

Die Immuneffekte sollten *in vitro* an den für die MS relevanten Entzündungszellen, nämlich mononukleären Blutleukozyten (PBL = Monozyten und Lymphozyten) sowie teils auch isolierten Monozyten untersucht werden. Bei PBL erfolgten parallel Proliferationsassays, um evtl. hemmende IFN- β 1a Effekte auf die Chemokinproduktion einer *in vitro* verminderten Lymphozytenvermehrung zuordnen zu können. Diese Versuche sollten unter 'Ruhebedingungen' (unstimulierte Zellen) sowie unter 'Aktivierungsbedingungen' (Mitogenstimulation mit PHA von PBL oder LPS-Stimulation von Monozyten) erfolgen. *In vivo* Effekte von IFN- β 1a sollten durch *ex vivo* Untersuchungen von PBL IFN- β 1a-behandelter MS Patienten und im Vergleich mit deren Zellverhalten vor der Therapie geprüft werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MATERIAL

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

BSA (bovines Serumalbumin, Lyophilisat)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Ethanol C ₂ H ₅ OH 70 %	Fa. Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck, Darmstadt
Interferon-β1a (Rebif [®] ; 12 x 10 ⁶ U/ml)	Fa. Serono, Unterschleißheim
L-Glutamin 200 mM	Fa. Gibco, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH) 10 M	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) x 1H ₂ O	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat 100 mM	Fa. Gibco, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren	Fa. Gibco, Karlsruhe
PHA (Phytohemagglutinin)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)	Fa. Biochrom, Berlin
RPMI 1640 ohne Glutamin	Fa. Gibco, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Fa. Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 1 M (H ₂ SO ₄)	Fa. Merck, Darmstadt
Serum, fetal calf, PAA clone (FCS)	Fa. PAA Laboratories, Cölbe
Serum, human off the clot, Typ AB (AB-Serum)	Fa. PAA Laboratories, Cölbe
Thymidin [methyl- ³ H] 37 MBq = 1 mCi	Fa. Perkin Elmer Wallac, Freiburg
TMB (Tetramethylbenzidine)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Fa. Fluka Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Fa. Merck, Darmstadt
Venimmun [®] N (IgG vom Menschen; 50 mg/ml)	Fa. Centeon, Marburg

4.1.2 Medien für die Zellkultur

Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll, Dichte: 1,077 g/ml):	Fa. PAA Laboratories, Cölbe
10 x PBS (phosphate-buffered saline), 5 l:	400 g NaCl
	10 g KCl
	71 g Na ₂ HPO ₄
	69 g NaH ₂ PO ₄ (x 1 H ₂ O)
	pH = 6,7
	steril filtriert

1 x PBS:	10 x PBS 1 : 10 verdünnt
RPMI 1640:	1640 RPMI Pulver 22 g NaHCO ₃ ad 10 l Aqua destilat pH = 7,4
RPMI komplett:	RPMI 1640 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 1 % Natriumpyruvat steril filtriert
10 % AB-Medium:	RPMI komplett 10 % humanes AB-Serum (30 min bei 56 °C) steril filtriert

4.1.3 FACS-Antikörper und FACS-Pufferlösungen

anti-humaner CXCR3-Antikörper, Phycoerythrin-konjugiert monoklonales Maus IgG (Klon 49801.111; 25 µg/ml)	Fa. R&D, Wiesbaden
anti-humaner CCR2-Antikörper, Phycoerythrin-konjugiert monoklonales Maus IgG (Klon 48607.211; 25 µg/ml)	Fa. R&D, Wiesbaden
anti-Maus IgG, Phycoerythrin-konjugiert, affinitätsgereinigtes polyklonales Esel IgG (1,4 mg/ml)	Fa. Dianova, Hamburg
anti-humaner CD3-Antikörper, Phycoerythrin-konjugiert monoklonales Maus IgG	Fa. Pharmingen, San Diego
anti-humaner CD64-Antikörper, Biotin-konjugiert monoklonales Maus IgG	Fa. Pharmingen, San Diego

FACS-Puffer	1 x PBS 0,1 % BSA 0,1 % Natriumazid
-------------	---

4.1.4 ELISA-Kits und ELISA-Pufferlösungen

OptEIA für humanes IP-10	Fa. Pharmingen, San Diego
1. monoklonaler anti-humaner IP-10 Antikörper; Fängerantikörper	
2. Maus anti-humaner IP-10 Antikörper, biotinyliert; Detektionsantikörper	
3. Konjugat aus Avidin u. Meerrettich Peroxidase; Enzym Reagens	
4. Rekombinantes humanes IP-10; Standard (Stammlösung: 95-240 ng/ml)	
OptEIA für humanes MCP-1	Fa. Pharmingen, San Diego
1. monoklonaler anti-humaner MCP-1 Antikörper; Fängerantikörper	
2. Maus anti-humaner MCP-1 Antikörper, biotinyliert; Detektionsantikörper	
3. Konjugat aus Avidin u. Meerrettich Peroxidase; Enzym Reagens	
4. Rekombinantes humanes MCP-1; Standard (Stammlösung: 38-189 ng/ml)	

Carbonat-/Bicarbonat-Puffer	3,56 g Na ₂ CO ₃ 8,4 g NaHCO ₃ Aqua destilat mit NaOH ad pH = 9,5, 1 l
-----------------------------	--

Waschpuffer	1 x PBS 0,05 % Tween 20
-------------	----------------------------

4.1.5 Geräte

Betaplate 96-well harvester	Fa. Perkin Elmer Wallac, Freiburg
Brutschrank	Fa. Thermo LifeSciences, Egelsbach
Counter 1450 Microbeta	Fa. Perkin Elmer Wallac, Freiburg
Durchflusszytometer FACScan	Fa. Becton Dickinson, San Diego
ELISA-reader	Fa. AnthosLabTech, Salzburg
ELISA-washer	Fa. Denley, England
Gefrierschrank -80 °C	Fa. Thermo LifeSciences, Egelsbach
Mikroskop Standard 25	Fa. Zeiss, Jena
Zentrifuge 5810 R (4000 rpm =3200 g)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 R (13200 rpm =16100 g)	Fa. Eppendorf, Hamburg

4.1.6 Sonstiges

Combitips	Fa. Eppendorf, Köln
Einmal-Filterhalter, 0,2 µm	Fa. Schleicher&Schuell, Dassel
Festszintillator, Melti Lex [®]	Perkin Elmer Wallac, Freiburg
Glasfaserfilter, Printed Filtermat [®] A	Perkin Elmer Wallac, Freiburg
Immuno-Platten, MaxiSorp [®] , 96 well	Fa. Nunc, Wiesbaden
Kalium-EDTA-Monovette, 9 ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
konische Röhrchen; 50 ml, 15 ml	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Latex-Untersuchungshandschuhe, unsteril	Fa. Braun, Melsungen
Mikrowellplatten, U-Form, 96 well	Fa. Nunc, Wiesbaden
Monocyte Negative Isolation Kit:	Fa. Dynal Biotech, Hamburg
Depletion Dynabeads (4 x 10 ⁸ beads pro ml)	
Antibody Mix; monoklonale Maus IgG Antikörper	
Blocking Reagent; Gammaglobuline (10 mg/ml)	
Multischalen, 48 well	Fa. Nunc, Wiesbaden
Neubauer-Zählkammer	
Pipetten, steril	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Reagenzgefäße; 1,5 ml	Fa. Eppendorf, Köln
Rundboden-Röhrchen	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Steritop [®] 0,22 µm	Fa. Millipore Corporation, Massachusetts

4.2 KOLLEKTIVE DER GESUNDEN PROBANDEN UND MS PATIENTEN

Die Kollektive nahmen an den Experimenten freiwillig teil, nachdem sie über den Ablauf und Sinn der Studie aufgeklärt worden waren und den Untersuchungen sowie der anonymisierten Datenverarbeitung schriftlich zugestimmt hatten.

Es wurden drei Personengruppen untersucht:

- a) 14 gesunde Probanden
- b) 12 unbehandelte MS Patienten
- c) 7 MS Patienten während *in vivo* Behandlung mit IFN- β 1a (3 x 22 μ g pro Woche s.c.)

Die sieben behandelten MS Patienten waren alle auch vor der Therapie untersucht worden und bilden vor Behandlung eine Teilmenge der 12 unbehandelten MS Patienten. Statistische Vergleiche der erhobenen Parameter oder gemessenen Effekte erfolgten zwischen gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten sowie im Hinblick auf *in vivo* Effekte und Langzeiteffekte von IFN- β 1a zwischen den behandelten Patienten und der genannten Teilmenge von unbehandelten Patienten.

4.2.1 Probandenkollektiv

Es nahmen 14 Personen am Versuch teil, von diesen waren sechs männlich und acht weiblich. Das Durchschnittsalter im Probandenkollektiv betrug 32,7 Jahre (\pm 10,8; 23- 59 Jahre).

4.2.2 Unbehandelte MS Patienten

Das Kollektiv umfasste zwölf MS Patienten (drei männlich und neun weiblich), die bestimmte Auswahlkriterien erfüllen mussten. Hierzu gehörte die sichere Diagnose der MS. Nur die Patienten mit schubförmiger oder sekundär chronisch-progredienter Verlaufsform wurden eingeschlossen. Zur Zeit der Blutentnahme (in den Jahren 2001 bzw. 2002) und mindestens einen Monat vorher durften sie nicht hochdosiert mit Kortison therapiert werden. Eine evtl. früher erfolgte Immuntherapie musste mindestens drei Monate zuvor beendet worden sein. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 33,1 Jahren (\pm 8,7; 23-53 Jahre). Das Geschlecht sowie das Alter und andere Angaben der Anamnese jedes einzelnen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

MS Patient	Geschlecht	Alter	MS seit X Monaten	Verlaufsform	aktueller Schub	frühere Immuntherapie	aktueller EDSS
MS-A	m	27	EM: 7 ED: <1	schubförmig	ja	nein	3,0
MS-B	w	33	EM/ED: 3	schubförmig	ja	nein	1,0
MS-C	w	23	EM: 15 ED: <1	schubförmig	ja	nein	1,5
MS-E	m	28	EM: 6 ED: <1	schubförmig	nein	nein	2,5
MS-F	m	32	ED: 141	schubförmig	nein	nein	1,5
MS-G	w	27	ED: 117	schubförmig	ja	1992-98: Azathioprin	1,5
MS-H	w	37	EM: 6 ED: <1	schubförmig	nein	bis 10 Tage zuvor 10 mg Methyl- prednisolon	3,0
MS-I	w	46	EM: 6 ED: 3	schubförmig	nein	nein	2,0
MS-J	w	53	EM: 17 ED: 1	schubförmig	nein	nein	2,0
MS-K	w	33	ED: 165	schubförmig	ja	8'98-4'99: IFN β -1a (30 μ g/Wo i.m.)	3,5
MS-L	w	32	ED: 153	seit 1997: sek. chron. progr.-	nein	'97- 10'98: (30 μ g IFN- β 1a/Wo i.m.); seit 10'98: Mitoxantron (110 mg) seit 6'01: keine Therapie	6,0
MS-M	w	26	EM: 63 ED: <1	schubförmig	nein	6 mg Deflazacort/ d	3,5

TABELLE 1: PATIENTENKOLLEKTIV

m: männlich; w: weiblich

EM: Erstmanifestation; ED: Erstdiagnose

EDSS: expanded disability status scale

4.2.3 MS Patienten unter der Therapie mit IFN- β 1a

Zwei männliche und fünf weibliche der eingeschlossenen unbehandelten Patienten begannen innerhalb eines Monats eine Therapie mit IFN- β 1a und wurden nach einer Behandlungsdauer von wenigstens einem Monat erneut untersucht (Mittelwert der Behandlungsdauer: 77 Tage; Median: 65 Tage). Die Dosis des IFN- β 1a lag für alle Patienten bei 3 x 22 μ g pro Woche. Die Blutabnahme erfolgte am Tag nach einer subkutanen Injektion des Medikamentes (12-18 h). Informationen über die Therapiedauer vor dem Zellkulturansatz werden in Tabelle 2 wiedergegeben.

MS Patient	Geschlecht	Alter in Jahren	seit X Tagen Therapie mit IFN- β 1a
MS-a	m	27	149
MS-e	m	28	44
MS-g	w	27	96
MS-h	w	37	36
MS-i	w	46	65
MS-j	w	53	93
MS-l	w	32	57

TABELLE 2: MS PATIENTEN UNTER DER THERAPIE MIT IFN- β 1A

4.3 METHODEN

4.3.1 Blutentnahme

Um periphere Blutleukozyten für die Zellkultur zu gewinnen, wurden den Probanden bzw. Patienten 5 x 9 ml venöses Blut in EDTA-Monovetten abgenommen.

4.3.2 Zellkultur

4.3.2.1 Gradient

Innerhalb von fünf Stunden nach der Blutabnahme wurden die PBL mittels eines Dichtegradienten von peripheren Erythrozyten und Thrombozyten getrennt. Dies geschah unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden 10 ml PBS (phosphate buffered saline) in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit ca. 9 ml EDTA-Blut mit einer sterilen Pipette gemischt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde mit 10 ml Lymphozytenseparationsmedium vorsichtig unterschichtet. Die Separation erfolgte bei 1600 rpm für 20 min bei 20 °C ohne Zentrifugenbremse.

Der Überstand wurde bis auf 5-10 ml über der Interphase abgesaugt, wohingegen die Interphase selbst mit einer 5 ml Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die PBL wurden gewaschen, wobei zwei Interphasen gepoolt und auf 50 ml PBS aufgefüllt wurden. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und 1400 rpm mit Bremse zentrifugiert.

Die so entstandenen Überstände wurden komplett abgesaugt und verworfen. Beim Waschen wurden zwei Pellets vereinigt und auf 50 ml PBS aufgefüllt. Die nächste Zentrifugation erfolgte bei 1200 rpm für 8 min. bei 4 °C.

Zum Schluss wurden alle Pellets in einem Zentrifugenröhrchen gewaschen. Nach der Zentrifugation (1200 rpm für 8 min bei 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml 10 % AB-Medium pro 9 ml EDTA-Monovette aufgenommen und resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in einem geeigneten Verhältnis verdünnt. Ein Tropfen der Suspension wurde durch Kapillarkräfte in die Neubauer Zählkammer überführt, wo 2 x 16 Großquadrate (2 x 0,1 µl) ausgezählt wurden. Man multipliziert den Mittelwert mit 10^4 und ermittelt so die Zellzahl pro ml der verdünnten Zellsuspension.

Neben den PBL wurden auch isolierte Monozyten untersucht, die vor der Kultur mittels Depletion aller nicht-monozytären Zellen „negativ“ separiert worden waren. Wie oben beschrieben, wurden die PBL hierfür isoliert und in die entsprechende Menge in 10 % AB-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 4 °C für 8 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100-200 µl PBS/ 0,1 % BSA (bovines Serumalbumin) pro zehn Millionen Zellen resuspendiert. Zuerst wurden 20 µl Blockreagens (Gammaglobulin, welches Fc-Rezeptoren auf Monozyten blockiert) und dann 20 µl Antibody Mix (Mixtur aus monoklonalen Maus Antikörpern gegen CD2, CD7, CD16, CD19 und CD56; Oberflächenantigene, die sich auf T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen befinden) pro zehn Millionen PBL hinzugegeben und für 20 min. bei 2-8 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit ca. 1 ml PBS/ 0,1 % BSA gewaschen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet wurde in 0,9 ml PBS/ 0,1 % BSA pro zehn Millionen Zellen aufgenommen. Die vorher gewaschenen Depletionskugeln wurden in einer Menge von 100 µl pro zehn Millionen PBL zusammen mit den resuspendierten Zellen für 15 min. bei 2-8 °C unter leichter Rotation inkubiert. Hierbei wurden die mit Antikörpern beladenen Zellen von den Depletionskugeln gebunden. Bevor 1-2 ml PBS/ 0,1 % BSA pro zehn Millionen Zellen zu der Zellsuspension hinzugefügt wurden, wurde diese vorsichtig gemischt. Als nächstes stellte man das Röhrchen an einen Magneten und pipettierte die freie Zellsuspension in ein neues Röhr-

chen, in dem sich die dann isolierten Monozyten befanden, da die anderen Leukozyten mittels der Depletionskugeln von dem Magneten angezogen wurden. Die Monozyten wurden zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 10 % AB-Medium gegeben, und die Monozyten konnten gezählt werden.

4.3.2.2 Zellansatz

Für den Zellkulturansatz zur Gewinnung von Überständen wurden die PBL bzw. die Monozyten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in 500 μ l 10 % AB-Medium mit zusätzlich 50 μ l verschiedener IFN- β 1a Konzentrationen (0, 10, 100, 1000 U/ml) pro well einer 48 well Multischale ausgesät. Zusätzlich wurde die Hälfte der PBL mit 50 μ l Phytohämagglutinin (PHA 5 μ g/ml) und die Hälfte der Monozyten mit 50 μ l Lipopolysaccharid (LPS 0,1 μ g/ml) stimuliert. Es erfolgte ein Doppelansatz zur separaten Überstandsgewinnung nach zwei unterschiedlich langen Inkubationsperioden. Die PBL wurden 16 und 68 h und die Monozyten 16 und 42 h im Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert, bevor die Zellen resuspendiert und in Reagenzgefäße überführt wurden. Als nächstes wurde die Suspension bei 1400 rpm, 4 °C und für 5 min zentrifugiert, und der Zellkulturüberstand wurde bei -80 °C eingefroren. Die PBL bzw. Monozyten des Pellets wurden in 10 % AB-Medium aufgenommen, um sie für die FACS-Analyse vorzubereiten.

		16 h				
		IFN- β 1a 0	10	100	1000	U/ml
PHA 5 μ g/ml		1	2	3	4	
\emptyset		5	6	7	8	
		68 h				
		IFN- β 1a 0	10	100	1000	U/ml
PHA 5 μ g/ml		9	10	11	12	
\emptyset		13	14	15	16	

TABELLE 3: PIPETTIERSHEMA ZELLKULTURANSATZ DER PBL

4.3.2.3 Proliferationsassay

Parallel zum genannten Zell- und Überstandsansatz wurden Proliferationsassays durchgeführt. Die PBL wurden ebenfalls in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in 200 μ l 10 % AB-Medium in eine Vertiefung in 96-well Rundboden-Mikrotiterplatten pipettiert. Die Zellen wurden mit 20 μ l PHA (5 μ g/ml) und 20 μ l IFN- β 1a (0, 10, 100, 1000 U/ml) inkubiert. Die

Aussaat erfolgte in Triplikaten pro IFN- β 1a Konzentration und in zwei Ansätzen auf separaten Platten. Nach 16 bzw. 68 stündiger Kultivierung im Brutschrank (Bedingungen s.o.) wurden die Zellen der beiden Platten mit 25 μ l/w [3 H]-Thymidin gelabelt. Geerntet wurden die PBL nach weiteren 16 h mit einem Betaplate 96-well harvester auf Glasfaserfilter. Nach dem Beschichten mit einem Festszintillator wurde die im Filter gebundene, partiell radioaktiv markierte DNA mit einem Betaplate counter gemessen.

		16 h, Platte I												
		IFN- β 1a 0			10			100			1000			U/ml
PHA 5 μ g/ml		1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	
\emptyset		5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8	
		68 h, Platte II												
		IFN- β 1a 0			10			100			1000			U/ml
PHA 5 μ g/ml		9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	
\emptyset		13	13	13	14	14	14	15	15	15	16	16	16	

TABELLE 4: PIPETTIERSHEMA PROLIFERATIONSASSAY

4.3.3 FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell staining)

Die aus dem Blut isolierten sich noch in 10 % AB-Medium befindenden, nicht kultivierten PBL und die genannten kultivierten Zellen wurden immundurchflusszytometrisch untersucht. Die PBL wurden zu je 200 000 auf vier FACS-Röhrchen verteilt. Hinzu kamen jeweils 3 ml FACS-Puffer (PAB). Bevor die Zellen bei 1200 rpm, 4 °C und für 5 min. mit Bremse abzentrifugiert wurden, wurden die Proben mit dem Reagenzglasschüttler in Suspension gebracht.

Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt, und die Rezeptoren CXCR3 und CCR2 konnten direkt gefärbt werden.

- Färbungen:
- 1) kein Antikörper + 100 μ l PBS
 - 2) 1 μ l Esel α -mIgG-PE + 99 μ l PBS
 - 3) 10 μ l α -hCXCR3-PE + 20 μ l PBS
 - 4) 10 μ l α -hCCR2-PE + 20 μ l PBS

Das PE-konjugierte Esel α -mIgG wurde als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Die Proben wurden gemischt und für 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

Die Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen, danach erneut zentrifugiert (s.o.) und das Pellet in 300 μ l PBS resuspendiert.

Die Expression der Chemokinrezeptoren wurde auf Leukozyten untersucht. Da im FACScan sowohl die Größe als auch die Granularität der Zellen gemessen wurde, konnten noch vorhandene Erythrozyten durch Ausgrenzung aus dem Messbereich eliminiert werden. Von jeder Probe wurden 10 000 Zellen gemessen.

Die Zellen der Probanden und der MS Patienten wurden auch nach 16 bzw. 68 h Kultivierung mit dem FACScan nach dem gleichen Schema analysiert.

Färbungen:	Probe 1:	1) kein Antikörper	+ 100 μ l PBS
		2) 1 μ l Esel α -mIgG-PE	+ 99 μ l PBS
		3) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS
		4) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS
Probe 2:	5) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	6) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	
Probe 3:	7) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	8) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	
Probe 4:	9) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	10) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	
Probe 5:	11) kein Antikörper	+ 100 μ l PBS	
	12) 1 μ l Esel α -mIgG-PE	+ 99 μ l PBS	
	13) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	14) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	
Probe 6:	15) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	16) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	
Probe 7:	17) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	18) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	
Probe 8:	19) 10 μ l α -hCXCR3-PE	+ 20 μ l PBS	
	20) 10 μ l α -hCCR2-PE	+ 20 μ l PBS	

An den Proben nach 68 h Kultivierung erfolgten die gleichen Färbungen.

Vor Durchführung der spezifischen Färbung mit den Antikörpern gegen CXCR3 bzw. CCR2 wurden in Vorversuchen die einzelnen Zellen mit Venimmun[®] (hIgG) inkubiert, um festzustellen, ob eine vorangehende Blockade von Fc-Rezeptoren die anschließende spezifische Färbung verändert. Nach Fc-Rezeptor-Blockade wurde keine andere Chemokinrezeptorfärbung beobachtet als ohne Fc-Rezeptor-Blockade, weshalb die analytischen Immunfärbungen der Studie ohne Vorinkubation mit hIgG erfolgten.

Ebenso wurde in einigen Voruntersuchungen die Chemokinrezeptorfärbung bei Raumtemperatur und bei 2-8 °C miteinander verglichen. Hier waren keine Unterschiede zu erkennen, und es wurde die Färbung im Kühlschrank beibehalten.

4.3.4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Zur Bestimmung der Chemokinkonzentrationen von IP-10 und MCP-1 in den Zellkulturüberständen der PBL bzw. Monozyten wurden ELISAs durchgeführt.

Zuerst wurden MaxiSorp[®] Mikrotiterplatten mit 100 µl/w monoklonalem Fängerantikörper (α -IP-10 bzw. α -MCP-1) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Dazu wurden die Antikörper jeweils 1:250 in Carbonat-/ Bicarbonat-Puffer verdünnt.

Nach ca. 18 h wurden die Platten dreimal mit einem automatischen ELISA-washer mit Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend mit 200 µl/w 1 % BSA/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

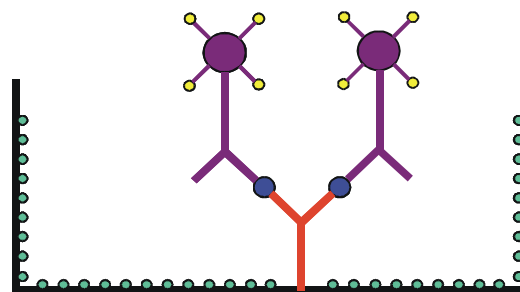
In der Zwischenzeit wurden die Proben aus dem -80 °C Kühlschrank aufgetaut und in passender Vorverdünnung in Triplikaten, in Ausnahmefällen in Duplikaten angesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen der geblockten Mikrotiterplatten wurden sie als 100 µl Probe auf die Platten pipettiert. Zur späteren Konzentrationsberechnung der Proben wurde eine Standardreihe aus rekombinantem humanem-IP-10 in den Konzentrationen 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 und 0 pg/ml zusätzlich aufgetragen (100 µl/w). Die Konzentrationen für das rekombinante humane-MCP-1 betragen 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 und 0 pg/ml. Die Proben-/Standardverdünnungen erfolgten in der Blocklösung. Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung wurden 10 µl/w 0,05 % Tween in 1 x PBS zugegeben. Die Inkubation der Standards und Proben erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Platten sechsmal gewaschen, um nicht gebundene Chemokine wegzuspülen. Danach wurden 100 $\mu\text{l/w}$ monoklonaler Detektionsantikörper ($\alpha\text{-IP-10}$ bzw. $\alpha\text{-MCP-1}$, biotinyliert) mit dem Konjugat Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase auf die Platten aufgebracht. Sowohl der Antikörper als auch das Konjugat wurden 1:250 in 1 % BSA/PBS verdünnt.

Bevor eine Stunde später das Substrat Tetramethylbenzidine (TMB 100 $\mu\text{l/w}$) zugegeben wurde, wurde wiederum sechsmal gewaschen. Diesmal wurde für 30 min unter Lichtentzug inkubiert. In dieser Zeit setzte die Peroxidase das TMB um, was zu einer blauen Farbreaktion führte. Die Reaktion wurde durch 1 M Schwefelsäure (50 $\mu\text{l/w}$) gestoppt. Die pH-Verschiebung zeigte sich durch einen gelben Farbumschlag.

Die Messung der Extinktion mit dem ELISA-reader erfolgte bei 450 nm (automatische Korrektur durch Kontrollmessung bei 620 nm) innerhalb der nächsten 15 min.

Im Folgenden ist noch einmal das Prinzip des ELISA schematisch dargestellt.



- Capture - AK
- Blocking-Puffer
- Standard/Probe
- 2.AK biotinyliert
- Streptavidin HRP

ABBILDUNG 1: ELISA (SCHEMATISCHE DARSTELLUNG)

4.4 STATISTIK

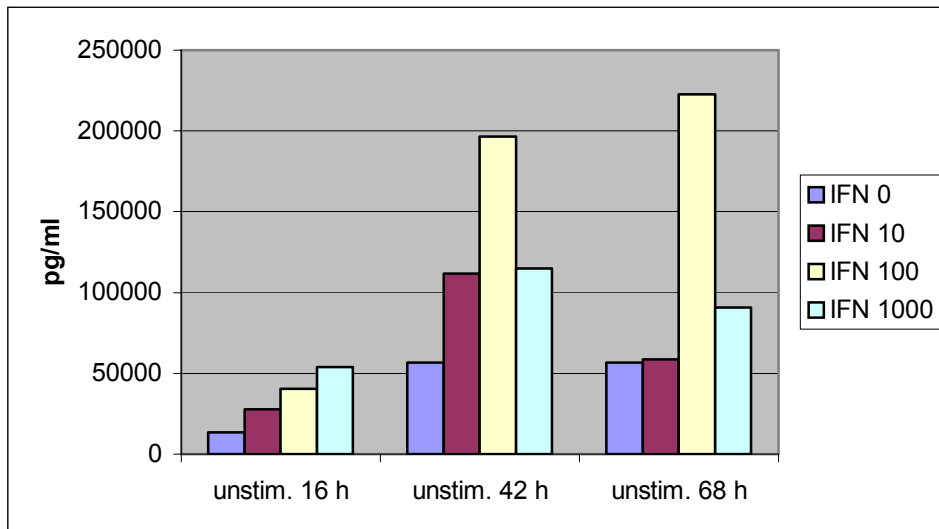
Zur Überprüfung der Signifikanz der Daten im Ergebnisteil wurde der zweiseitige Student-t-Test für unverbundene oder verbundene Stichproben verwendet, wobei ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant erachtet wurde. In den Tabellen sind die statistischen Signifikanzen mit Sternchen gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5 ERGEBNISSE

5.1 KINETIK

Um günstige Zeitpunkte für die Kultivierungsdauer der PBL zu finden, wurden zunächst die Zellen eines Probanden ohne und mit Zugabe von IFN- β 1a für 16, 42 und 68 Stunden inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und die Konzentrationen der Chemokine MCP-1 und IP-10 bestimmt. Wie in der Abb. 2 zu sehen ist, steigt mit einer Interferonkonzentration von 1000 U/ml die Konzentration des MCP-1 in den Überständen sowohl unstimulierter als auch PHA-stimulierter PBL nach 16 h. Nach 42 und 68 h wurde bei PHA-stimulierten PBL hingegen ein suppressiver Effekt des IFN- β 1a auf die MCP-1 Konzentration festgestellt. Diese Tendenz war bei IP-10 nicht zu sehen (keine Abb.). Aufgrund dieser biphasischen Regulation wurden für die Studie die Untersuchungszeitpunkte 16 und 68 h gewählt.

a)



b)

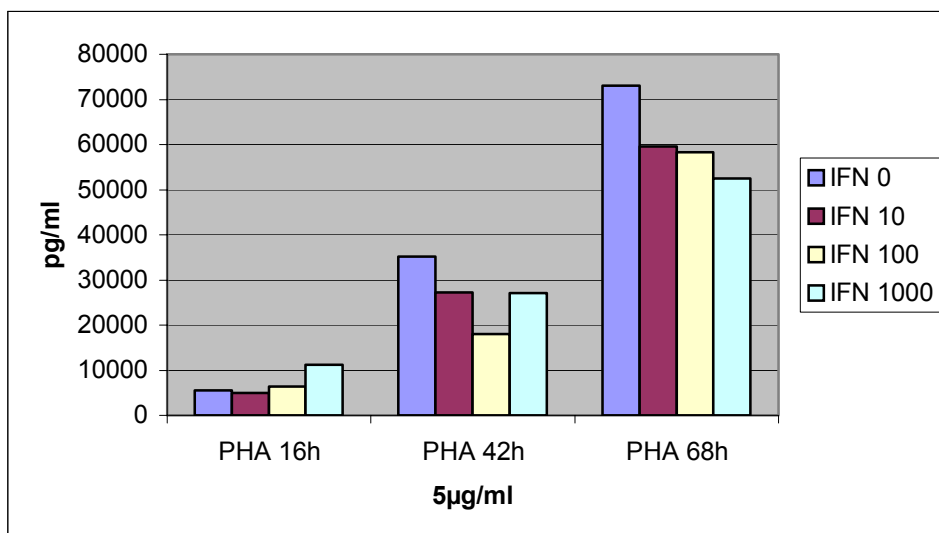


ABBILDUNG 2: KINETIK

Es wurde die Konzentration von MCP-1 in pg/ml in den Überständen
 a) unstimulierter PBL und
 b) PHA-stimulierter PBL
 eines Probanden nach 16, 42 und 68 Stunden und unter dem Einfluss der angegebenen Konzentrationen IFN-β1a (in U/ml) gemessen

5.2 PROLIFERATION

In den Proliferationstests wurde die Einbaurate von ^3H -methyl-Thymidin in die Zellen nach 40 und 92 h gemessen. Cpm entspricht den counts per minute, die im Betaplate counter gemessen wurden, und damit dem Ausmaß der Zellproliferation. In den Abbildungen ist jeweils der Mittelwert des Dreifachansatzes angegeben (Tab. 4 auf S. 25).

5.2.1 Unstimulierte PBL

In allen drei Personengruppen (gesunde Probanden, unbehandelte und behandelte MS Patienten) wurde durch verschiedene *in vitro* Konzentrationen von IFN- β 1a weder nach 40 noch nach 92 h Kultivierung der unstimulierten Leukozyten eine Veränderung der Proliferation gesehen.

5.2.2 PHA-stimulierte PBL

Bei den PHA-stimulierten Kulturen der drei Kollektive (Tab. 5) wurde sowohl bei den gesunden Probanden als auch bei den unbehandelten MS Patienten in den 40 h Proliferationstests eine signifikante Reduktion der Proliferation durch 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* bedingt, jedoch nicht bei den PHA-stimulierten Kulturen der IFN- β 1a behandelten MS Patienten.

Nach 92 stündiger Inkubation war nach statistischen Regeln keine Veränderung der Proliferation dieser PHA-stimulierten Kulturen zu beobachten.

IFN- β 1a (U/ml) <i>in vitro</i>		0	10	100	1000
Gesunde Probanden					
40 h	Mittelwert (cpm)	21936	21711	20118 *	15963***
	Standardabweichung	4206	4530	3963	2983
92 h	Mittelwert (cpm)	39295	38907	37635	35694
	Standardabweichung	10365	10712	12973	12843
Unbehandelte MS Patienten					
40 h	Mittelwert (cpm)	23049	22829	21469 *	16723***
	Standardabweichung	8142	8622	7915	6701
92 h	Mittelwert (cpm)	50090	51552	49872	46888
	Standardabweichung	15601	14456	13816	14563
Behandelte MS Patienten					
40 h	Mittelwert (cpm)	18008			18769
	Standardabweichung	4251			4018
92 h	Mittelwert (cpm)	41205			42749
	Standardabweichung	7696			4484

TABELLE 5: *IN VITRO* MODULATION DES PROLIFERATIONSASSAYS PHA-STIMULIERTER PBL VON 14 GESUNDEN PROBANDEN, ZWÖLF UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN UND SIEBEN MIT *IN VIVO* IFN- β 1A BEHANDELTEN PATIENTEN DURCH IFN- β 1A NACH 40 UND NACH 92 H KULTUR

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

5.3 CHEMOKINREZEPTOREXPRESSION UND DEREN MODULATION DURCH IFN- β 1A

5.3.1 Methodik: Identifikation und Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten in der Durchflusszytometrie (FACS)

In einzelnen Basisexperimenten zur Festlegung von separaten Messbereichen (Gates) für Lymphozyten oder Monozyten erfolgte die Färbung von T-Zellen (mit anti-CD3-Ak) und von Monozyten (mit anti-CD64-Ak) nach der angegebenen Methodik der Durchflusszytometrie. Mittels dieser beiden Marker lassen sich die CD3 positiven T-Lymphozyten und die CD64 positiven Zellen (im wesentlichen Monozyten) innerhalb der PBL in der FACS-Analyse differenzieren.

Die PBL wurden frisch isoliert, nach 16 h und nach 68 h Kultur ohne Mitogen-Stimulation untersucht.

Die Zellpopulation innerhalb frisch isolierter PBL, die mit dem ersten Gate (S. 33; Abb. 3 a-f) gekennzeichnet wurde, war größer und granulärer als die Population, die mit dem zweiten Gate (Abb. 3 g-l) markiert wurde. Im ersten Gate befanden sich 93,9 % CD64 positive Zellen (Abb. 3 d) und 15,8 % CD3 positive Zellen (Abb. 3 c), welches in der Folge daher als „Monozyten-Gate“ bezeichnet wird. Im komplementären zweiten Gate („Lymphozyten-Gate“) waren 73,7 % der Zellen CD3 positiv (Abb. 3 i). Die Lymphozytenpopulation lässt sich unterscheiden in B- und T-Zellen. Die restlichen Zellen dürften also im wesentlichen B-Lymphozyten sein.

Nach 16 h Kultur (S. 34) wurde die Diskrimination der Populationen besser. Zu dieser Zeit handelte es sich im Gate drei („Monozyten-Gate“) zu 97,3 % um CD64 positive Zellen und bei 10 % um CD3 positive Lymphozyten (Abb. 4 d und c). Im „Lymphozyten-Gate“ waren 5/6 der Zellen als T-Lymphozyten identifizierbar (Gate 4, Abb. 4 i).

Nach 68 h Kultivierung (S. 35) fanden sich 83,6 % CD64 positive Zellen und nur 7,6 % T-Zellen in dem fünften Gate („Monozyten-Gate“; Abb. 5 d und c). In dem sechsten Gate („Lymphozyten-Gate“) wurden 80,9 % mit CD3 markiert (Abb. 5 i).

In den Abbildungen 4 und 5 zeigen die Histogramme die Ergebnisse nach IFN- β 1a Inkubation. Die Histogramme sind für verschiedene IFN- β 1a Konzentrationen nahezu identisch, woraus entnehmbar ist, dass wohl keine Verschiebung der CD3 bzw. CD64 Population durch

IFN- β 1a bedingt wird. Die Differenzierung der Populationen mittels FSC/SSC Gates ist also in gleicher Weise auch nach Inkubation mit IFN- β 1a möglich.

Da die Lymphozyten von den CD64 positiven Zellen (im wesentlichen Monozyten) in der Gesamtpopulation der unstimulierten PBL mittels gating in der FSC/SSC-Analyse weitgehend zu trennen waren, werden die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR2 auf beiden Zellpopulationen (den Zellen im etablierten „Monozyten-Gate“ und den Zellen im etablierten „Lymphozyten-Gate“) getrennt untersucht.

Bei der FACS-Analyse der Rezeptoren CXCR3 und CCR2 auf PHA-stimulierten PBL konnten Lymphozyten und Monozyten nicht als separate Populationen in der FSC/SSC (Größe vs. Granularität) via Gate getrennt werden. Die Durchmischung von aktivierten Lymphoblasten mit Monozyten mögen in der Gesamtanalyse dazu geführt haben, dass keine Rezeptormodulation durch IFN- β 1a zu sehen war. Deshalb erfolgte für PHA-stimulierte PBL keine Prüfung auf statistisch signifikante Veränderungen.

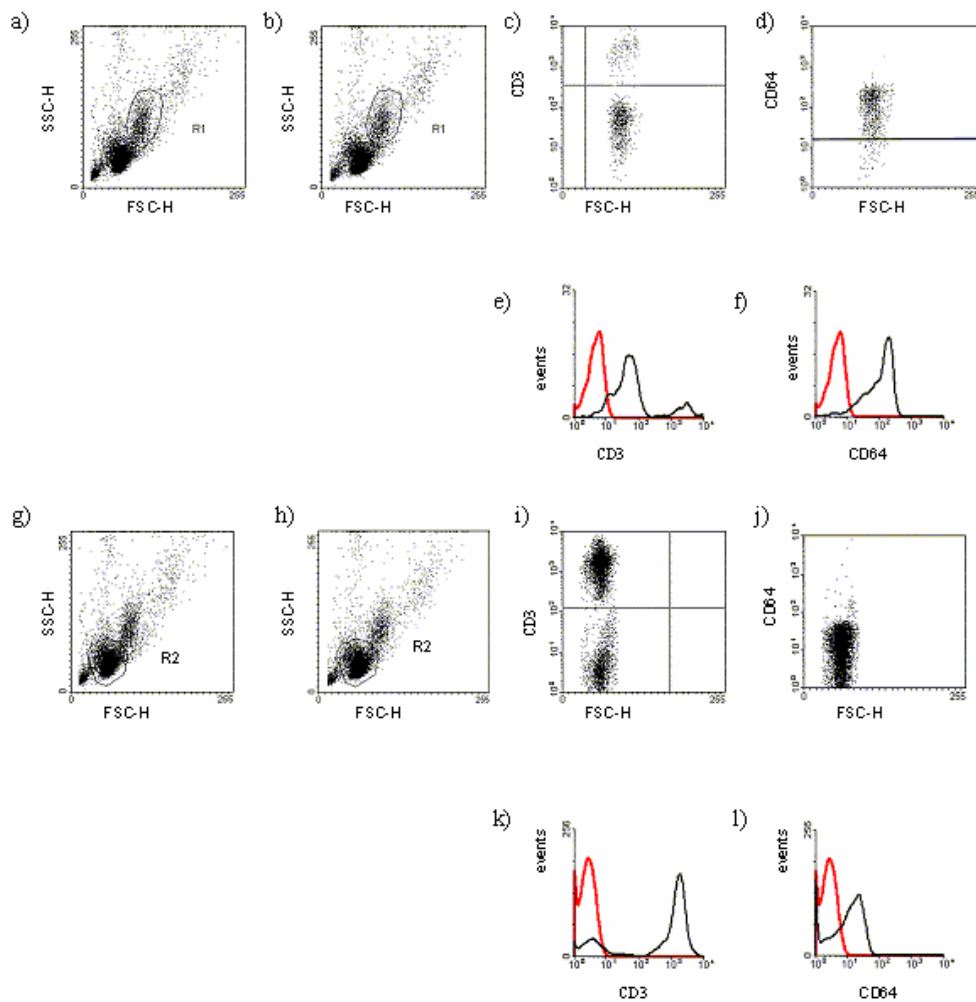


ABBILDUNG 3: DURCHFLUSSZYTOMETRIE FRISCH ISOLIERTER PBL NACH FÄRBUNG VON T-ZELLEN MIT DEM ANTI-CD3-ANTIKÖRPER UND VON MONOZYTEN MIT DEM ANTI-CD64-ANTIKÖRPER

- a) – f) Gate 1: im wesentlichen Monozyten
- g) – l) Gate 2: im wesentlichen T-Lymphozyten
- Histogramme: rot: negative Isotyp-Kontrolle
- schwarz: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL

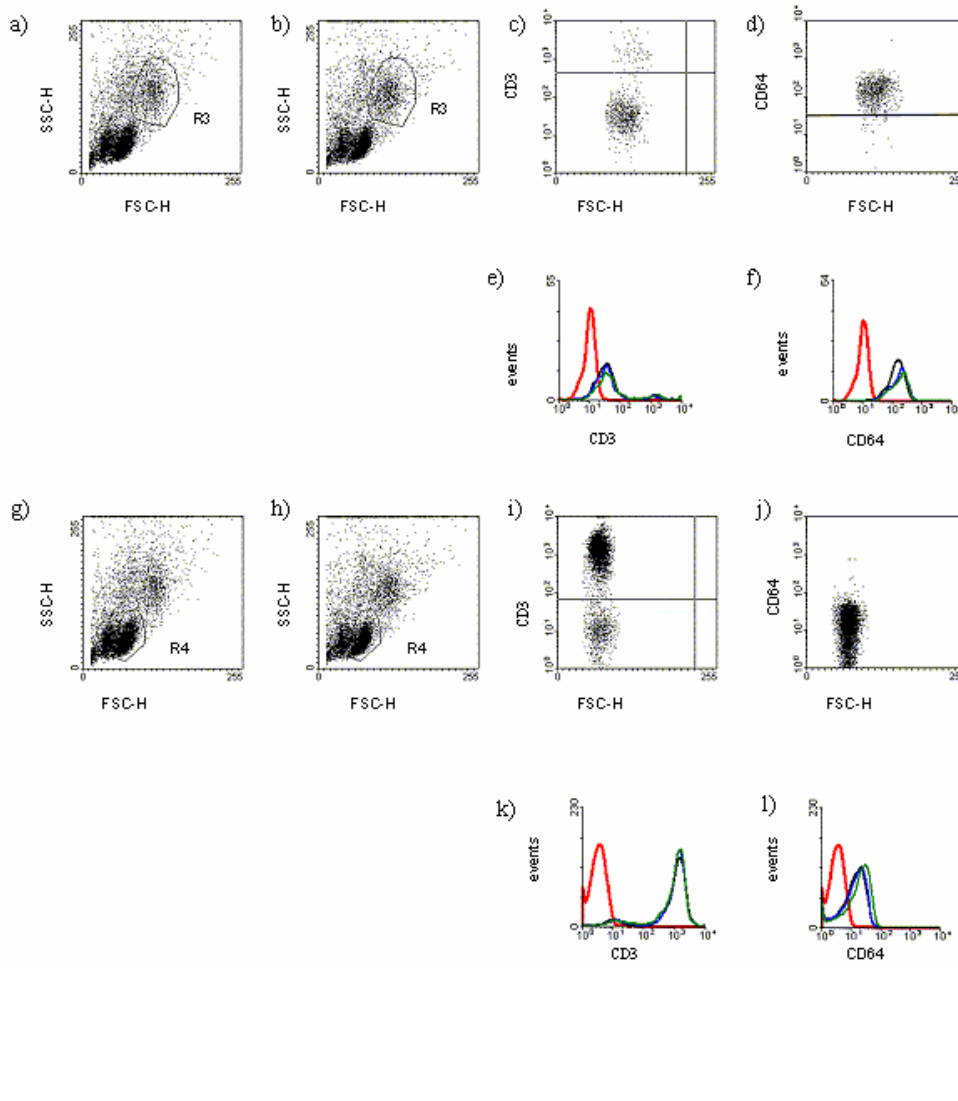


ABBILDUNG 4: DURCHFLUSSZYTOMETRIE NACH 16 STÜNDIGER KULTUR DER PBL UND NACH FÄRBUNG DER T-ZELLEN MIT DEM ANTI-CD3-ANTIKÖRPER UND DER MONOZYTEN MIT DEM ANTI-CD64-ANTIKÖRPER

a) – f) Gate 1: im wesentlichen Monozyten

g) – l) Gate 2: im wesentlichen T-Lymphozyten

Histogramme: rot: negative Isotyp-Kontrolle
 schwarz: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL ohne IFN- β 1a
 blau: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL mit 100 U IFN- β 1a/ml
 grün: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL mit 1000 U IFN- β 1a/ml

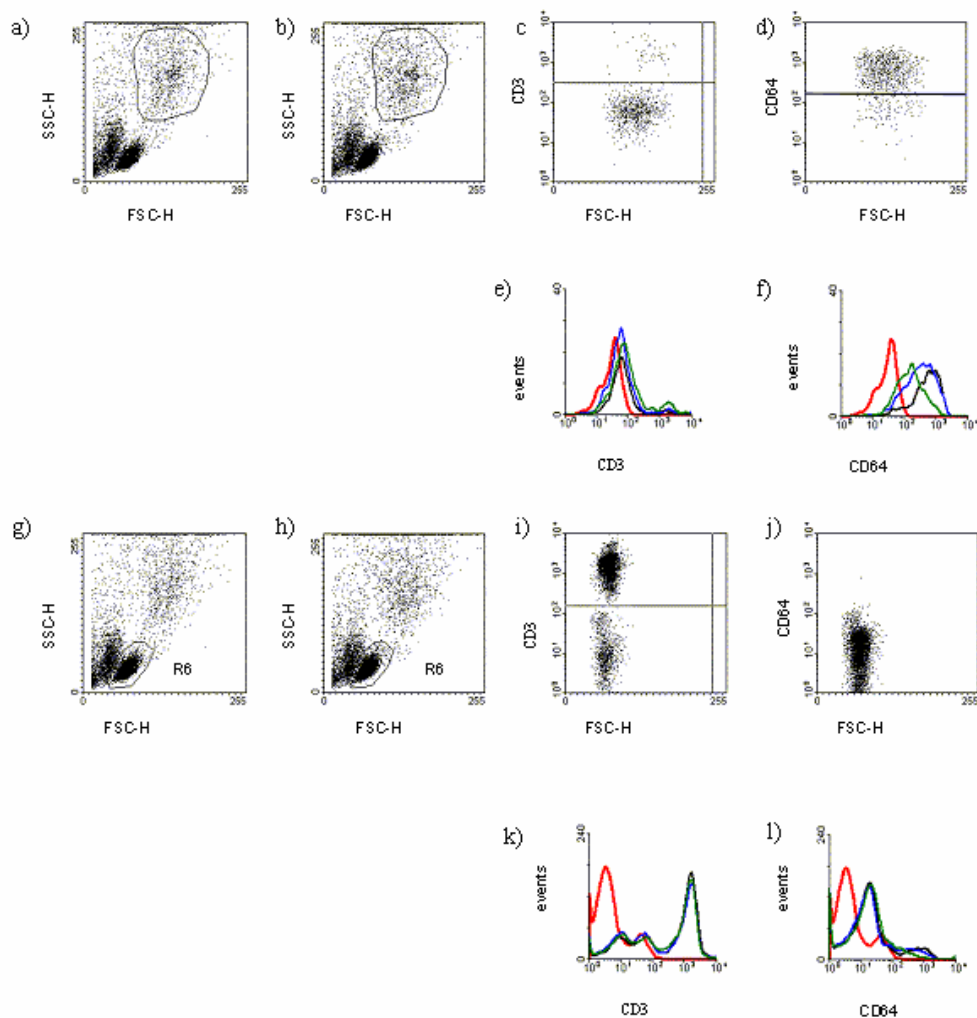


ABBILDUNG 5: DURCHFLOSSZYTOMETRIE NACH 68 STÜNDIGER KULTUR DER PBL UND NACH FÄRBUNG DER T-ZELLEN MIT DEM ANTI-CD3-ANTIKÖRPER UND DER MONOZYTEN MIT DEM ANTI-CD64-ANTIKÖRPER

a) – f) Gate 1: im wesentlichen Monozyten

g) – l) Gate 2: im wesentlichen T-Lymphozyten

Histogramme: rot: negative Isotyp-Kontrolle
 schwarz: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL ohne IFN-β1a
 blau: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL mit 100 U IFN-β1a/ml
 grün: spezifisch mit anti-CD3-Ak bzw. anti-CD64-Ak gefärbte PBL mit 1000 U IFN-β1a/ml

5.3.2 CXCR3 Expression

In der gerade dargestellten Weise wurde die CXCR3 Expression von Zellen im „Monozyten-Gate“ und „Lymphozyten-Gate“ separat analysiert. Zum statistischen Vergleich der Expressionsdichte der Rezeptoren unter dem *in vitro* Einfluß von verschiedenen IFN- β 1a Konzentrationen wird der Median der Immunfluoreszenzintensität herangezogen, da es sich um eine logarithmische Skalierung handelt. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen am Beispiel eines Probanden, dass die Zellen im „Monozyten-Gate“ eine relative homogene CXCR3 Expression aufweisen. Sie wurden bzgl. ihrer Expression im Rahmen der Studie als einheitliche Population ausgewertet. Hingegen sind die im „Lymphozyten-Gate“ liegenden Zellen in zwei Subpopulationen differenzierbar, eine mit niedriger CXCR3 Expression und eine mit hoher Expression. Folglich wurden die Zellen im „Lymphozyten-Gate“ gemäß ihrer Färbeintensität in zwei Populationen differenziert, die niedrigexprimierende Population M 1 und die hochexprimierende Population M 2.

Anhand dieses Probanden lassen sich schon einmal die Effekte des IFN- β 1a *in vitro* auf die CXCR3 Expression unstimulierter PBL zeigen. Durch Inkubation in steigenden IFN- β 1a Konzentrationen nimmt die Rezeptorexpression auf den Zellen mit hoher CXCR3 Expression im „Lymphozyten-Gate“ ab. Auf den Zellen im „Monozyten-Gate“ ist insgesamt eine extrem niedrige, teils fehlende Expression von CXCR3 zu erkennen, aber auch hier scheint die Expression unter IFN- β 1a abzunehmen.

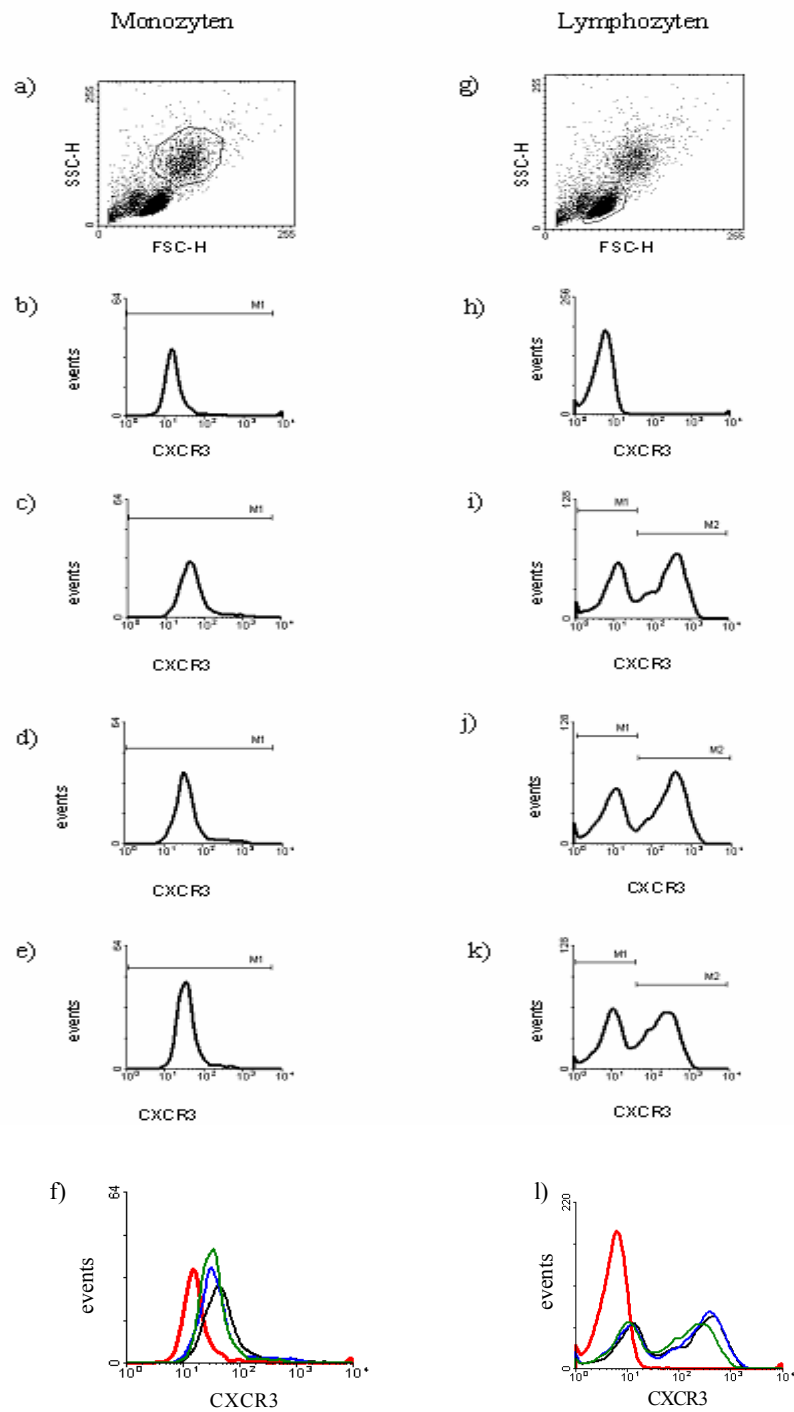


ABBILDUNG 6: FLUORESCENZINTENSITÄTSHISTOGRAMME DER CXCR3-FÄRBUNGEN UNSTIMULIERTER PBL EINES PROBANDEN NACH 16 STÜNDIGER KULTUR

- b) negative Isotyp-Kontrolle (rote Kurve in f)
- c) CXCR3-gefärbte Monozyten ohne IFN-β1a (schwarze Kurve in f)
- d) CXCR3-gefärbte Monozyten mit 10 U IFN-β1a/ml (blaue Kurve in f)
- e) CXCR3-gefärbte Monozyten mit 1000 U IFN-β1a/ml (grüne Kurve in f)
- h) negative Isotyp-Kontrolle (rote Kurve in l)
- i) CXCR3-gefärbte Lymphozyten ohne IFN-β1a (schwarze Kurve in l)
- j) CXCR3-gefärbte Lymphozyten mit 10 U IFN-β1a/ml (blaue Kurve in l)
- k) CXCR3-gefärbte Lymphozyten mit 1000 U IFN-β1a/ml (grüne Kurve in l)
- f, l) Überlagerung der Färbeintensitätskurven

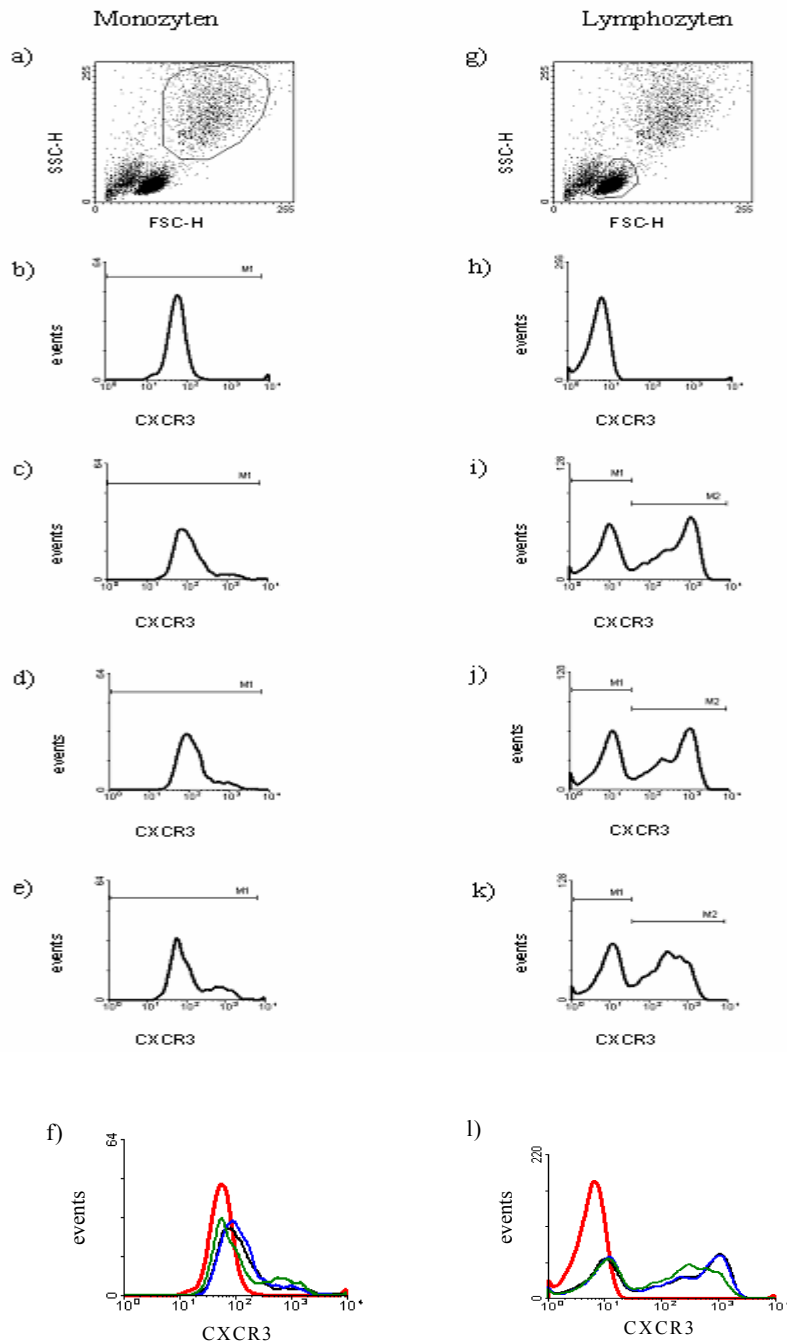


ABBILDUNG 7: FLUORESCENZINTENSITÄTSHISTOGRAMME DER CXCR3-FÄRBUNGEN UNSTIMULIERTER PBL EINES PROBANDEN NACH 68 STÜNDIGER KULTUR

- b) negative Isotyp-Kontrolle (rote Kurve in f)
- c) CXCR3-gefärbte Monozyten ohne IFN- β 1a (schwarze Kurve in f)
- d) CXCR3-gefärbte Monozyten mit 10 U IFN- β 1a/ml (blaue Kurve in f)
- e) CXCR3-gefärbte Monozyten mit 1000 U IFN- β 1a/ml (grüne Kurve in f)
- h) negative Isotyp-Kontrolle (rote Kurve in l)
- i) CXCR3-gefärbte Lymphozyten ohne IFN- β 1a (schwarze Kurve in l)
- j) CXCR3-gefärbte Lymphozyten mit 10 U IFN- β 1a/ml (blaue Kurve in l)
- k) CXCR3-gefärbte Lymphozyten mit 1000 U IFN- β 1a/ml (grüne Kurve in l)
- f,l) Überlagerung der Färbeintensitätskurven

5.3.2.1 Modulation der CXCR3 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ der unstimulierten PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten

Eine extrem niedrige Expression von CXCR3 ist insgesamt zu erkennen. Da aber in der Literatur CXCR3 Untersuchungen bei Monozyten erfolgten, werden die Ergebnisse dargestellt.

Gesunde Probanden (Tab. 6):

Bei der Gegenüberstellung der IFN- β 1a freien Kultur und der Kulturen, die mit 10, 100 oder 1000 U IFN- β 1a/ml inkubiert wurden, ließ sich nach 16 h Kultur tendenziell eine Reduktion der Rezeptordichte durch IFN- β 1a auf den Zellen im „Monozyten-Gate“ erkennen. Diese Veränderung war nicht statistisch signifikant.

Nach 68 h Inkubation hatten 1000 U IFN- β 1a/ml ebenfalls einen leicht suppressiven, nicht statistisch signifikanten Effekt auf die CXCR3 Expression, durch 100 U/ml ergab sich keine Veränderung in der Rezeptordichte, wohingegen 10 U/ml ein leichtes Ansteigen bewirkte, was aber auch nicht statistisch signifikant war.

a)

	16 h; unstimulierte Zellen im „Monozyten-Gate“			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 10 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität			
<i>SS</i>	29,4	34		22,1
<i>GH</i>	11,6	12,4		13,8
<i>CH</i>	143,3	148,6		72,3
<i>TK</i>	305,1	264,2		339,8
<i>GB</i>	72,3	54,3		86,6
<i>SJ</i>	48,7	36,5		35,2
<i>IU</i>	69,8		60,4	54,3
<i>UN</i>	96,5		86,6	69,8
<i>VG</i>	43,7		45,3	36,5
<i>KS</i>	35,2		34	29,4
<i>KK</i>	56,2		45,3	39,2
<i>HH</i>	42,2		45,3	47
\bar{x} Prob.1-6 $\pm s$	101,7 109,6	91,7 97		
\bar{x} Prob. 7-12 $\pm s$	57,3 22,8		52,8 18,6	
\bar{x} Prob. 1-12 $\pm s$	79,5 79			70,5 87,5

b)

	68 h; unstimulierte Zellen im „Monozyten-Gate“			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 10 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität			
<i>SS</i>	77,7	73,7		60,4
<i>GH</i>	40,7	45,3		34
<i>CH</i>	77,7	100		83,5
<i>TK</i>	93,1	138,2		165,5
<i>GB</i>	339,8	392,4		184,3
<i>SJ</i>	107,5	115,5		86,6
<i>IU</i>	77,7		62,6	67,3
<i>UN</i>	86,6		107,5	107,5
<i>VG</i>	48,7		45,3	45,3
<i>KS</i>	69,8		72,3	52,3
<i>KK</i>	85,1		83,5	60,4
<i>HH</i>	83,5		83,5	77,7
\bar{x} Prob. 1-6	122,8	144,2		
$\pm s$	108,7	125,8		
\bar{x} Prob. 7-12	75,2		75,8	
$\pm s$	14,4		21,2	
\bar{x} Prob. 1-12	99			85,4
$\pm s$	78			46,4

TABELLE 6: CXCR 3 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „MONOZYTEN-GATE“ UNSTIMULIRTER PBL VON GESUNDEN PROBANDEN

- a) Rezeptorexpression nach 16 h
b) Rezeptorexpression nach 68 h

Unbehandelte MS Patienten (Tab. 7):

Bei den MS Patienten wurde nur die Wirkung von 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml auf die CXCR3 Expression geprüft.

Beim Vergleich der Expressionsdichte der Rezeptoren der IFN- β 1a freien Kultur mit den Kulturen, die mit 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml inkubiert worden waren, ließ sich nach 16 h Kultivierung durch IFN- β 1a eine Reduktion der CXCR3 Dichte beobachten, welche bei der Konzentration von 1000 U/ml nach statistischen Regeln signifikant war ($p < 0,05$).

Nach 68 h Inkubation wurde eher ein leichtes Ansteigen der Rezeptordichte durch IFN- β 1a festgestellt. Dieses war aber nicht statistisch signifikant.

a)

16 h; unstimulierte Zellen im „Monozyten-Gate“			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
Median (Iq) der Fluoreszenzintensität			
MS-A	135,8	103,7	86,6
MS-B	21,3	19,8	22,9
MS-C	45,3	47	40,7
MS-E	21,3	21,3	25,5
MS-F	56,2	43,7	37,9
MS-G	47	43,7	48,7
MS-H	37,9	43,7	39,2
MS-I	77,7	83,5	60,4
MS-J	22,1	22,1	24,6
MS-K	111,4	107,5	93,1
MS-L	89,8	77,7	52,3
MS-M	22,1	21,3	20,5
\bar{x}	57,3	52,9	46 *
$\pm s$	38,5	32,3	24

b)

68 h; unstimulierte Zellen im „Monozyten-Gate“			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
Median (Iq) der Fluoreszenzintensität			
MS-A	124,1		124,1
MS-B	56,2		62,6
MS-C	50,5	54,3	56,2
MS-E	54,3	52,3	45,3
MS-F	77,7	77,7	60,4
MS-G	83,5	82,1	159,6
MS-H	103,7	128,6	103,7
MS-I	121,9	124,1	148,6
MS-J	58,3	54,3	62,6
MS-K	100	128,6	154
MS-L	254,8	264,1	165,5
MS-M	54,3	50,5	54,3
\bar{x} MS-C-M	95,9	101,7	
$\pm s$	61	65,7	
\bar{x} MS-A-M	94,9		99,7
$\pm s$	57,1		47,7

TABELLE 7: CXCR3 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „MONOZYTEN-GATE“ UNSTIMULERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN

- a) Rezeptorexpression nach 16 h
 b) Rezeptorexpression nach 68 h

Vergleich der CXCR3 Expression auf nativen Zellen im „Monozyten-Gate“ von MS Patienten vor und unter *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a s.c. (Tab. 8):

Hierbei wurden die frisch isolierten PBL vor und unter Therapie betrachtet.

Bei den MS Patienten unter Therapie war ein signifikanter Anstieg der CXCR3 Dichte um 51,7 % im Vergleich zu den unbehandelten Patienten zu erkennen ($p < 0,05$).

	CXCR3; Monozyten nativ gated	
	vor Therapie	unter Therapie
	Median (Iq) der Fluoreszenzintensität	
MS-A/-a	165,5	327,8
MS-G/-g	237,1	406,8
MS-H/-h	80,6	228,8
MS-I/MS-i	283,9	294,3
MS-J/-j	48,7	43,7
MS-L/MS-l	198,1	237,1
\bar{x}	169	256,4 *
$\pm s$	90,5	122,9

TABELLE 8: VERGLEICH VON CXCR3 AUF ZELLEN IM „MONOZYTEN-GATE“ FRISCHER PBL OHNE KULTUR; MS PATIENTEN VOR UND UNTER THERAPIE MIT IFN- β 1A S.C.

5.3.2.2 CXCR3 Expression auf isoliert kultivierten Monozyten von gesunden Probanden (Tab. 9):

Zusätzlich zu den PBL-Kulturen, die in der FACS-Analyse aufgrund ihrer Größe und Granularität in Populationen von vorwiegend T-Lymphozyten oder Monozyten eingeteilt wurden, wurden Monozyten aus nativen PBL durch Immunelimination aller anderen Leukozyten isoliert und für 16 bzw. 42 h ohne und mit IFN- β 1a in Kultur gebracht.

Sowohl nach 16 h als auch nach 42 h sank die CXCR3 Dichte auf den Monozyten durch den Einfluss von 1000 U IFN- β 1a/ml bezogen auf die IFN- β 1a freien Kulturen tendenziell ab. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

a)

	16 h; unstimulierte Monozyten	
	IFN 0 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
GB	12,9	7,2
CH	22,9	21,3
SS	12,9	11,6
SJ	7,5	7,5
TK	11,6	14,9
AS	11,1	10,8
\bar{x}	13,1	12,2
$\pm s$	5,2	5,3

b)

	42 h; unstimulierte Monozyten	
	IFN 0 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
CH	13,3	5,2
SS	7,5	6,7
TK	8,7	8,1
AS	11,6	10,4
\bar{x}	10,3	7,6
$\pm s$	2,7	2,2

TABELLE 9: CXCR3 EXPRESSION AUF ISOLIERT KULTIVIERTEN, UNSTIMULIERTEN MONOZYTEN VON GESUNDEN PROBANDEN

- a) Rezeptorexpression nach 16 h
b) Rezeptorexpression nach 42 h

5.3.2.3 Modulation der CXCR3 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ der unstimulierten PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten

Innerhalb der Population der Zellen im „Lymphozyten-Gate“ waren Populationen mit unterschiedlicher Rezeptorexpression zu sehen, so dass diese Lymphozyten bei der Betrachtung der Rezeptormodulation in zwei Subpopulationen M 1 und M 2 eingeteilt wurden.

Bei der CXCR3-niedrigexprimierenden Lymphozyten-Population (M 1) fand sich weder bei Probanden noch bei unbehandelten MS Patienten durch IFN- β 1a *in vitro* eine Modulation der CXCR3 Dichte nach 16 oder 68 h Kultur. Auch war die CXCR3 Expression dieser Lymphozyten-Population in den nativen PBL von unbehandelten MS Patienten nicht verschieden von den behandelten MS Patienten.

Die CXCR3-hochexprimierende Lymphozyten-Population M 2 wird im Folgenden näher betrachtet:

Gesunde Probanden (Tab. 10):

Bei der Betrachtung der zweiten Subpopulation (M 2) sank nach 16 h Inkubation die Expression der Rezeptoren auf den Zellen mit steigender Interferonkonzentration. Durch 100 U/ml fiel sie in Bezug auf die Rezeptorendichte der IFN- β 1a freien Kultur auf 93 % ($p < 0,01$) und durch 1000 U IFN- β 1a/ml auf 70,7 % ($p < 0,01$), was auch von statistischer Signifikanz war. 10 U IFN- β 1a/ml bewirkten eine unwesentliche statistisch nicht signifikante Erniedrigung.

Nach 68 h konnte die Expressionsdichte von CXCR3, bezogen auf die IFN- β 1a freien Kulturen, nur durch 1000 U IFN- β 1a/ml statistisch signifikant supprimiert werden und zwar auf 66,4 % ($p < 0,02$). Beim Vergleich der Kultur ohne IFN- β 1a mit den Kulturen mit 10 U/ml oder 100 U/ml wurde keine Wirkung auf die Rezeptorendichte der CXCR3-hochexprimierenden Zellen im „Lymphozyten-Gate“ gesehen.

a)

	16 h; unstimulierte Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2)			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 10 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (Iq) der Fluoreszenzintensität			
SS	62,6	75		46,1
GH	47	50,5		36,5
CH	89,8	83,5		77,7
TK	107,5	111,4		103,7
GB	254,8	245,8		148,6
SJ	327,8	316,2		205,4
IU	191,1		171,5	148,6
UN	143,3		133,4	119,7
VG	154		148,6	115,5
KS	205,4		191,1	133,4
KK	220,7		205,4	159,6
HH	245,8		228,8	154
\bar{x} Prob. 1-6 ± s	148,3 115,1	147,1 107,9		
\bar{x} Prob. 7-12 ± s	193,4 39,3		179,8 ** 35,7	
\bar{x} Prob. 1-12 ± s	170,8 85,3			120,7 ** 48,9

b)

68 h; unstimulierte Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2)				
	IFN 0 (U/ml)	IFN 10 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (Iq) der Fluoreszenzintensität			
SS	86,6	83,5		60,4
GH	64,9	60,4		58,3
CH	89,8	100		64,9
TK	58,3	77,7		69,8
GB	339,8	352,3		237,1
SJ	626,4	604,3		339,8
IU	171,5		191,1	128,6
UN	159,6		191,1	124,1
VG	205,4		198,1	143,3
KS	305,1		264,2	154
KK	165,5		159,6	133,4
HH	294,3		294,3	191,1
\bar{x} Prob. 1-6	211	213,1		
$\pm s$	229,8	220,7		
\bar{x} Prob. 7-12	216,9		216,4	
$\pm s$	66,1		51,4	
\bar{x} Prob. 1-12	213,9			142,1 *
$\pm s$	161,2			83,2

TABELLE 10: CXCR 3 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „LYMPHOZYTEN-GATE“ (M 2) UNSTIMULIERTER PBL VON GESUNDEN PROBANDEN

- a) Rezeptorexpression nach 16 h
b) Rezeptorexpression nach 68 h

Unbehandelte MS Patienten (Tab. 11):

Bei den MS Patienten wurde nur die Wirkung von 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml auf die CXCR3 Expression geprüft.

Beim Betrachten der Subpopulation M 2 der Zellen im „Lymphozyten-Gate“ wurden nach 16 h weniger Rezeptoren auf den Zellen gemessen, die mit 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml inkubiert worden waren, als auf den ohne IFN- β 1a kultivierten Zellen. Durch 100 U/ml wurde die Rezeptordichte auf 96,4 % und durch 1000 U/ml auf 78,7 % supprimiert. Die Veränderung durch 1000 U/ml war von statistischer Signifikanz ($p < 0,001$).

Nach 68 h war durch 100 U/ml noch kein Effekt festzustellen, aber durch 1000 U IFN- β 1a/ml wurde die Rezeptordichte bezogen auf die IFN- β 1a freie Kultur signifikant reduziert ($p < 0,01$): Sie betrug 78,6 % der Dichte von IFN- β 1a frei kultivierten Lymphozyten.

a)

16 h; unstimulierte Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2)			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
Median (lg) der Fluoreszenzintensität			
MS-A	159,6	133,4	138,2
MS-B	133,4	148,6	119,7
MS-C	228,8	212,9	177,8
MS-E	159,6	148,6	107,5
MS-F	133,4	138,2	96,5
MS-G	154	119,7	96,5
MS-H	154	143,3	119,7
MS-I	75	77,7	67,3
MS-J	80,6	83,5	77,7
MS-K	103,7	111,4	86,6
MS-L	107,5	103,7	77,7
MS-M	128,6	138,2	107,5
\bar{x}	134,8	129,9	106,1 ***
$\pm s$	41,6	35,6	30,5

b)

68 h; unstimulierte Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2)			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
Median (lg) der Fluoreszenzintensität			
MS-A	205,4		128,6
MS-B	184,3		133,4
MS-C	237,1	220,7	165,5
MS-E	177,8	191,1	111,4
MS-F	205,4	245,8	115,5
MS-G	184,3	143,3	128,6
MS-H	148,6	133,4	115,5
MS-I	133,4	131	128,6
MS-J	124,1	138,2	119,7
MS-K	115,5	128,6	133,4
MS-L	138,2	138,2	159,6
MS-M	154	143,3	138,2
\bar{x} MS-C-M	161,8	161,4	
$\pm s$	38,7	42,2	
\bar{x} MS-A-M	167,3		131,5 **
$\pm s$	37,6		16,7

TABELLE 11: CXCR3 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „LYMPHOZYTEN-GATE“ (M 2) UNSTIMULIRTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN

- a) Rezeptorexpression nach 16 h
b) Rezeptorexpression nach 68 h

Vergleich der spontanen *in vitro* CXCR3 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten:

Beim Vergleich der M 2 Populationen der Zellen im „Lymphozyten-Gate“ IFN- β 1a freier Kulturen wurde nach 16 h Inkubation bei den Probanden ein Mittelwert von 170,8 (\pm 85,3) und bei den Patienten einer von 134,8 (\pm 41,6) beobachtet. Eine ähnliche Konstellation war auch nach 68 h zu sehen. Der Mittelwert bei den Probanden lag bei 213,9 (\pm 161,2) und bei den Patienten bei 167,3 (\pm 37,6). Diese Mittelwerte waren jedoch zwischen den beiden Gruppen nicht statistisch signifikant verschieden.

Vergleich des *in vitro* Ansprechens der CXCR3 Expression auf 1000 U IFN- β 1a/ml von Zellen im „Lymphozyten-Gate“ bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten:

Durch Inkubation mit 1000 U IFN- β 1a/ml konnte die Rezeptordichte auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (M 2) nach 16 h Kultur bei den Probanden um 25,7 % (\pm 11,2) und bei den Patienten um 20 % (\pm 10,1) gesenkt werden. Auch nach 68 h konnte die Rezeptorexpression bei den Patienten nicht ganz so deutlich supprimiert werden wie bei den Probanden. Bei den Probanden erfolgte dies um 25,5 % (\pm 17,8) und bei den Patienten nur um 17,9 % (\pm 20,4). Das Ausmaß der Suppression der CXCR3 Expression war zwischen Probanden und Patienten nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Vergleich der CXCR3 Expression auf nativen Zellen im „Lymphozyten-Gate“ von MS Patienten vor und unter *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a s.c. (Tab. 12):

Innerhalb der M 2 Population frisch isolierter PBL wurden unter der Therapie vermehrt CXCR3 Rezeptoren exprimiert. Diese Veränderung war nach statistischen Kriterien jedoch nicht signifikant.

CXCR3; Lymphozyten nativ gated (M 2)		
	vor Therapie	unter Therapie
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
MS-A/-a	294,3	310,6
MS-G/-g	352,3	278,8
MS-H/-h	212,9	245,8
MS-I/MS-i	220,7	327,8
MS-J/-j	228,8	254,8
MS-L/MS-l	148,6	220,7
\bar{x}	242,9	273,1
$\pm s$	70,9	40,6

TABELLE 12: VERGLEICH VON CXCR3 AUF NATIVEN ZELLEN IM „LYMPHOZYTEN-GATE“ (M 2); MS PATIENTEN VOR UND UNTER THERAPIE MIT IFN- β 1A

5.3.3 CCR2 Expression

Im Folgenden (Abb. 8) wird am Beispiel der FACS-Analyse eines Probanden gezeigt, dass im Gegensatz zu CXCR3 die Zellen im „Lymphozyten-Gate“ eine relative homogene CCR2 Expression aufweisen. Daher wurden sie in dieser Studie einheitlich ausgewertet. Auch die im „Monozyten-Gate“ liegenden Zellen konnten bzgl. ihrer CCR2 Dichte als homogene Population gesehen und analysiert werden.

Der Rezeptor CCR2 wurde nur nach 16 h Kultur untersucht.

Anhand dieses Probanden lassen sich schon einmal die Effekte des IFN- β 1a *in vitro* auf die CCR2 Expression unstimulierter PBL zeigen. Es kommt zur Suppression der Rezeptorexpression auf den Zellen im „Monozyten- und Lymphozyten-Gate“ durch steigende IFN- β 1a Konzentrationen.

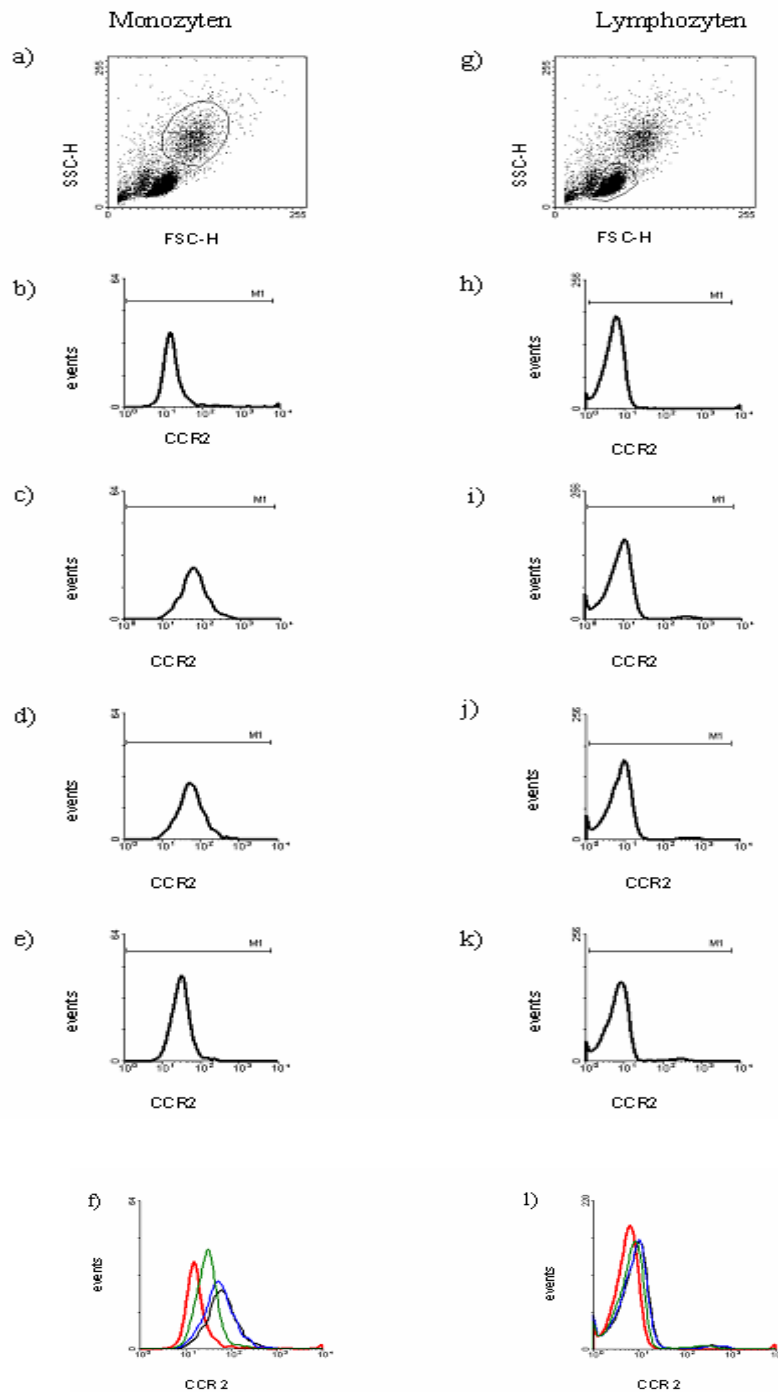


ABBILDUNG 8: FÄRBEINTENSITÄTSHISTOGRAMME DER CCR2-FÄRBUNGEN UNSTIMULIERTER PBL EINES PROBANDEN NACH 16 STÜNDIGER KULTUR

- b) negative Isotyp-Kontrolle (rote Kurve in f)
- c) CCR2-gefärbte Monozyten ohne IFN- β 1a (schwarze Kurve in f)
- d) CCR2-gefärbte Monozyten mit 10 U IFN- β 1a/ml (blaue Kurve in f)
- e) CCR2-gefärbte Monozyten mit 1000 U IFN- β 1a/ml (grüne Kurve in f)
- h) negative Isotyp-Kontrolle (rote Kurve in l)
- i) CCR2-gefärbte Lymphozyten ohne IFN- β 1a (schwarze Kurve in l)
- j) CCR2-gefärbte Lymphozyten mit 10 U IFN- β 1a/ml (blaue Kurve in l)
- k) CCR2-gefärbte Lymphozyten mit 1000 U IFN- β 1a/ml (grüne Kurve in l)
- f,l) Überlagerung der Färbeintensitätskurven

5.3.3.1 Modulation der CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten

Gesunde Probanden (Tab. 13):

Bei den Zellen im „Monozyten-Gate“ war zu beobachten, dass die Rezeptordichte durch den Einfluss von 10, 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml bezogen auf die IFN- β 1a freie Kultur jeweils sank. Die Reduktion durch 1000 U/ml auf 56,1 % der Dichte der IFN- β 1a freien Kultur war statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

	16 h; Zellen im „Monozyten-Gate“			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 10 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität			
<i>SS</i>	30,5	26,4		17,2
<i>GH</i>	19,8	17,2		15,4
<i>CH</i>	50,5	47		30,5
<i>TK</i>	67,3	52,3		50,5
<i>GB</i>	34	35,2		28,4
<i>SJ</i>	62,6	54,3		30,5
<i>IU</i>	89,8		80,6	39,2
<i>UN</i>	69,8		75	34
<i>VG</i>	37,9		34	23
<i>KS</i>	69,8		60,4	36,5
<i>KK</i>	45,3		40,7	22,1
<i>HH</i>	50,5		48,7	24,6
\bar{x} Prob. 1-6 $\pm s$	44,1 19	38,7 15		
\bar{x} Prob. 7-12 $\pm s$	60,5 19,4		56,6 18,7	
\bar{x} Prob. 1-12 $\pm s$	52,3 20,2			29,4 *** 9,9

TABELLE 13: CCR2 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „MONOZYTEN-GATE“ UNSTIMULIRTER PBL VON GESUNDEN PROBANDEN; 16 H KULTUR

Unbehandelte MS Patienten (Tab. 14):

Bei den MS Patienten wurde der *in vitro* Effekt von nur 100 U/ml und 1000 U IFN- β 1a/ml betrachtet.

Eine Reduktion der Rezeptordichte wurde durch 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml im Vergleich zu der Kultur ohne IFN- β 1a induziert, welche nach statistischen Regeln jeweils signifikant war. Durch 100 U/ml sank sie auf 86,5 % ($p < 0,05$) und durch 1000 U/ml sogar auf 50,9 % der CCR2 Dichte, die ohne IFN- β 1a zu messen war, ($p < 0,0001$).

	16 h; Zellen im „Monozyten-Gate“		
	IFN 0 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität		
MS-A	100		42,2
MS-B	47		25,5
MS-C	60,4	48,7	30,5
MS-E	45,3	40,7	25,5
MS-F	96,5	67,3	36,5
MS-G	45,3	27,4	24,6
MS-H	60,4	52,3	29,4
MS-I	80,6	72,3	39,2
MS-J	48,7	54,3	30,5
MS-K	36,5	40,7	27,4
MS-L	48,7	43,7	29,4
MS-M	64,9	60,4	32,8
\bar{x} MS-C-M	58,7	50,8 *	
$\pm s$	18,3	13,6	
\bar{x} MS-A-M	61,2		31,1 ***
$\pm s$	20		5,6

TABELLE 14: CCR2 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „MONOZYTEN-GATE“ UNSTIMULIERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN; 16 H KULTUR

Vergleich der spontanen *in vitro* CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten:

Beim Vergleich der IFN- β 1a freien Kulturen konnte bei den Patienten nach 16 h Kultur eine nicht statistisch signifikant höhere Rezeptordichte auf den Zellen im „Monozyten-Gate“ festgestellt werden als bei den Probanden. Der Mittelwert der Mediane betrug bei den Probanden 52,3 (\pm 20,2) und bei den Patienten 61,2 (\pm 20,8).

Vergleich des *in vitro* Ansprechens der CCR2 Expression auf 1000 U IFN- β 1a/ml von Zellen im „Monozyten-Gate“ bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten:

Durch 1000 U IFN- β 1a/ml wurde die Rezeptorexpression auf den Zellen im „Monozyten-Gate“ bei den unbehandelten MS Patienten während einer 16 h Kultur nicht signifikant stärker supprimiert als bei den Probanden. Die Expression sank durchschnittlich um 41,3 % (\pm 13,2) bei den Probanden und um 46,6 % (\pm 9,7) bei den Patienten.

Vergleich der CCR2 Expression auf Zellen im „Monozyten-Gate“ frisch isolierter PBL von MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a s.c. (Tab. 15):

Der Rezeptor wurde auf frisch isolierten, nicht kultivierten PBL vor und unter *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a betrachtet.

Beim Vergleich der CCR2 Expression bei MS Patienten war unter der *in vivo* Therapie eine erniedrigte Rezeptordichte zu sehen. Sie sank auf 45,4 % der Expression vor der IFN- β 1a-Therapie. Diese Veränderung war nach statistischen Kriterien signifikant ($p < 0,05$).

	CCR2; Monozyten nativ gated	
	vor Therapie	unter Therapie
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
MS-A/-a	624,4	184,3
MS-G/-g	327,8	69,8
MS-H/-h	220,7	264,2
MS-I/-i	562,3	339,8
MS-J/-j	365,2	64,9
MS-L/-l	237,1	138,2
\bar{x}	389,6	176,9 *
$\pm s$	168	109,3

TABELLE 15: VERGLEICH DER CCR2 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „MONOZYTEN-GATE“ FRISCH ISOLIERTER PBL VON MS PATIENTEN VOR UND UNTER THERAPIE MIT IFN- β 1A S.C.

5.3.3.2 CCR2 Expression auf isoliert kultivierten Monozyten von gesunden Probanden (Tab. 16):

Wie schon bei der Darstellung von CXCR3 erläutert, wurden zusätzlich Monozyten aus PBL frisch isoliert und für 16 und 42 h in Kultur gebracht.

Nach 16 h Kultivierung wurde durch den Einfluss von 1000 U IFN- β 1a/ml keine Veränderung der Rezeptordichte beobachtet.

Gegenläufig war die Expression des CCR2 nach 42 h. Hier wurde durch 1000 U IFN- β 1a/ml eine Reduktion festgestellt, welche wegen der geringen Probenzahl aber nicht statistisch signifikant war.

a)

	16 h; unstimulierte Monozyten	
	IFN 0 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
<i>CH</i>	12,4	13,3
<i>SS</i>	9,7	10,8
<i>SJ</i>	7,5	5,8
<i>TK</i>	7,8	9,7
<i>AS</i>	7	6
\bar{x}	8,9	9,1
$\pm s$	2,2	3,2

b)

	42 h; unstimulierte Monozyten	
	IFN 0 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
<i>CH</i>	5,6	3,9
<i>SS</i>	6,3	5,4
<i>TK</i>	5,8	5,2
<i>AS</i>	15,4	5,4
\bar{x}	8,3	5
$\pm s$	4,8	0,7

TABELLE 16: CCR2 EXPRESSION AUF ISOLIERT KULTIVierten, UNSTIMULierten MONOzyTEN VON GESUNDEN PRObandEN

- a) Rezeptorexpression nach 16 h
b) Rezeptorexpression nach 42 h

5.3.3.3 Modulation der CCR2 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ unstimulierter PBL von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten

Gesunde Probanden (Tab. 17):

Nur durch 1000 U IFN- β 1a/ml wurde eine statistisch signifikante Suppression auf 89,1 % der CCR2 Dichte, die ohne IFN- β 1a zu messen war, bedingt ($p < 0,01$).

	16 h; Zellen im „Lymphozyten-Gate“			
	IFN 0 (U/ml)	IFN 10 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität			
<i>SS</i>	7	6		5,2
<i>GH</i>	5,8	5,8		5,4
<i>CH</i>	10	9		9
<i>TK</i>	16	13,3		13
<i>GB</i>	7,2	8,1		7,2
<i>SJ</i>	8,4	8,1		7
<i>IU</i>	7		7	7,2
<i>UN</i>	6,7		7	6,5
<i>VG</i>	6,3		6,1	5,8
<i>KS</i>	7		6,3	6,3
<i>KK</i>	7		6,5	6,3
<i>HH</i>	7,2		7,8	6,3
\bar{x} Prob. 1-6	9,1	8,4		
$\pm s$	3,7	2,7		
\bar{x} Prob. 7-12	6,9		6,8	
$\pm s$	0,3		0,6	
\bar{x} Prob. 1-12	8			7,1 **
$\pm s$	2,7			2,1

TABELLE 17: CCR2 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „LYMPHOZYTEN-GATE“ UNSTIMULIERTER PBL VON GESUNDEN PROBANDEN; 16 H KULTUR

Unbehandelte MS Patienten (Tab. 18):

Bei der Gegenüberstellung der IFN- β 1a freien Kultur und der Kulturen, die mit 100 oder 1000 U IFN- β 1a/ml inkubiert worden waren, nahm die Rezeptordichte durch IFN- β 1a leicht ab. Mit einem p-Wert kleiner 0,01 war das Absinken der CCR2 Expression auf 92,8 % der CCR2 Dichte, die ohne IFN- β 1a zu messen war, durch 1000 U IFN- β 1a/ml statistisch signifikant.

	16 h; Zellen im „Lymphozyten-Gate“		
	IFN 0 (U/ml)	IFN 100 (U/ml)	IFN 1000 (U/ml)
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität		
MS-A	7,8		6,3
MS-B	6,5		5,6
MS-C	6,3	6	6
MS-E	7	6,3	6,3
MS-F	9	7	7,8
MS-G	5,6	5,6	5,2
MS-H	6,5	7	6
MS-I	6,5	6,7	6,7
MS-J	6,3	6,7	6
MS-K	6	6,3	6
MS-L	6,5	6,3	6,5
MS-M	6	5,8	5,6
\bar{x} MS-C-M	6,6	6,4	
$\pm s$	0,9	0,5	
\bar{x} MS-A-M	6,7		6,2 **
$\pm s$	0,9		0,6

TABELLE 18: CCR2 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „LYMPHOZYTEN-GATE“ UNSTIMULIERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN; 16 H KULTUR

Vergleich des *in vitro* Ansprechens der CCR2 Expression auf 1000 U IFN- β 1a/ml von Zellen im „Lymphozyten-Gate“ bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten:

Bei den Probanden sank die Expression von CCR2 auf den Zellen im „Lymphozyten-Gate“ während der 16 h Kultur in 1000 U IFN- β 1a/ml durchschnittlich um 9,9 % (\pm 8,1), bei den MS Patienten um 6,7 % (\pm 6,6). Der Unterschied war nicht von statistischer Signifikanz.

Vergleich der CCR2 Expression auf Zellen im „Lymphozyten-Gate“ frisch isolierter PBL von MS Patienten vor und unter Therapie mit IFN- β 1a s.c. (Tab. 19):

Die *ex vivo* Rezeptorexpression wurde auf frisch isolierten PBL vor und unter *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a ohne Kultivierung betrachtet.

Es wurde eine leichte Abnahme der CCR2 Expression auf den Zellen im „Lymphozyten-Gate“ unter der Therapie beobachtet, welche nicht von statistischer Signifikanz war.

	CCR2; Lymphozyten nativ gated	
	vor Therapie	unter Therapie
	Median (lg) der Fluoreszenzintensität	
MS-A/-a	9,3	7,5
MS-G/-g	7,8	6,5
MS-H/-h	6,3	7
MS-I/-i	8,4	7
MS-J/-j	7,5	6,3
MS-L/-l	6,7	7
\bar{x}	7,7	6,9
$\pm s$	1,1	0,4

TABELLE 19: VERGLEICH DER CCR2 EXPRESSION AUF ZELLEN IM „LYMPHOZYTEN-GATE“ FRISCH ISOLIERTER PBL VON MS PATIENTEN VOR UND UNTER THERAPIE MIT IFN- β 1A S.C.

5.4 CHEMOKINPRODUKTION MONONUKLEÄRER ZELLEN *IN VITRO* UND DEREN MODULATION DURCH IFN- β 1A

Mittels ELISAs wurden die Konzentrationen der Chemokine IP-10 und MCP-1 in den Überständen der Zellkulturen von gesunden Probanden, unbehandelten und behandelten MS Patienten gemessen.

5.4.1 IP-10 Produktion durch PBL von gesunden Probanden

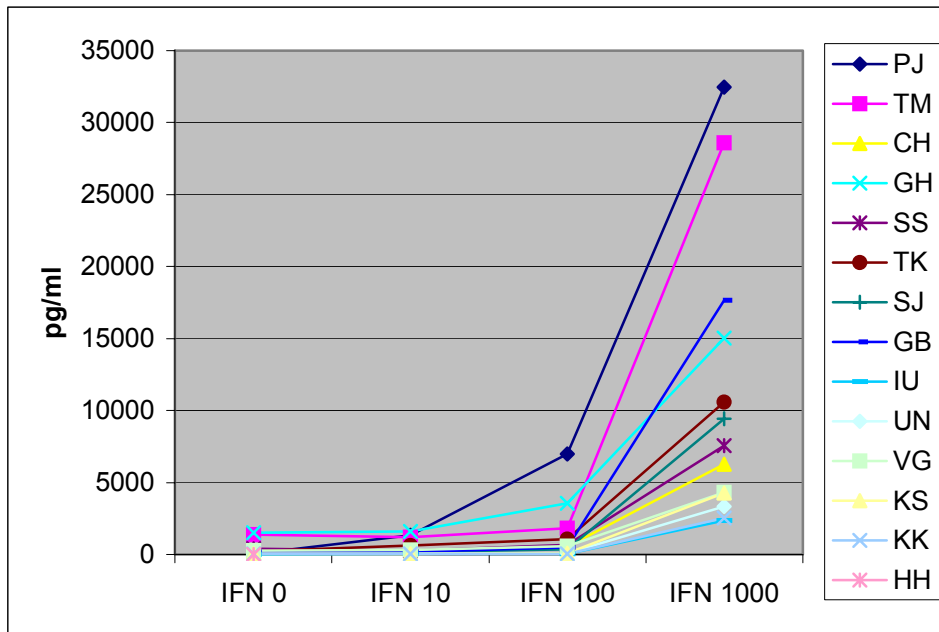
Bei den Probanden und MS Patienten wurde die Veränderung der Chemokinproduktion unter 10, 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml in Bezug auf IFN- β 1a freie Kulturen *in vitro* untersucht.

5.4.1.1 Unstimulierte PBL (Abb. 9)

Bei der Gegenüberstellung von IFN- β 1a freien Kulturen von 16 h Dauer (\bar{x} = 332 pg/ml; \pm 484) und der Kulturen, die durch 1000 U IFN- β 1a/ml stimuliert wurden, konnte gezeigt werden, dass eine statistisch signifikante Erhöhung der IP-10 Konzentration durch 1000 U IFN- β 1a/ml bewirkt wurde ($p < 0,001$). Die Chemokinkonzentration wurde auf das 33,1 fache (\bar{x} = 10982 pg/ml; \pm 9471) gesteigert. Durch die Interferonkonzentration von 10 U/ml (\bar{x} = 437 pg/ml; \pm 540) und 100 U/ml (\bar{x} = 1205 pg/ml; \pm 1899) war tendenziell eine nicht statistisch signifikante Erhöhung der Chemokinkonzentration in Bezug auf die IFN- β 1a freien Kulturen zu beobachten.

Nach 68 h Kultur stieg die IP-10 Produktion durch 1000 U IFN- β 1a/ml (\bar{x} = 25105 pg/ml; \pm 24990) statistisch signifikant auf das 13,6 fache der Produktion von IFN- β 1a freien Kulturen (\bar{x} = 1844 pg/ml; \pm 1416; $p < 0,01$) an. 10 U/ml (\bar{x} = 1844 pg/ml; \pm 1462) und 100 U/ml (\bar{x} = 3622 pg/ml; \pm 4254) zeigten eine leichte statistisch insignifikante Erhöhung der Chemokinkonzentration in Bezug auf die IFN- β 1a freien Kulturen.

a)



b)

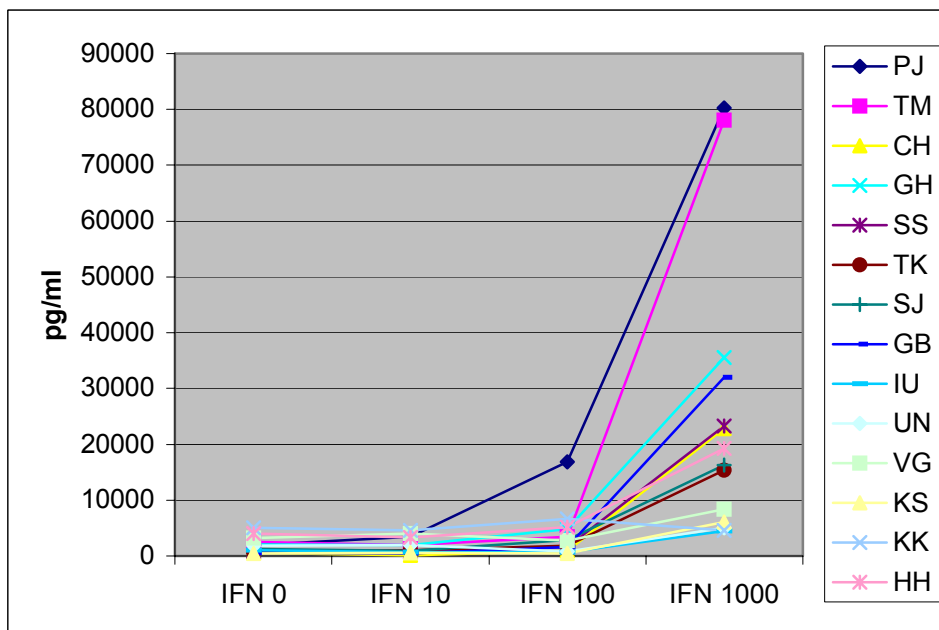


ABBILDUNG 9: MODULATION DER IP-10 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH IFN- β 1A *IN VITRO*

Frisch isolierte PBL von 14 Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 68 h unstimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN- β 1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des IP-10 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

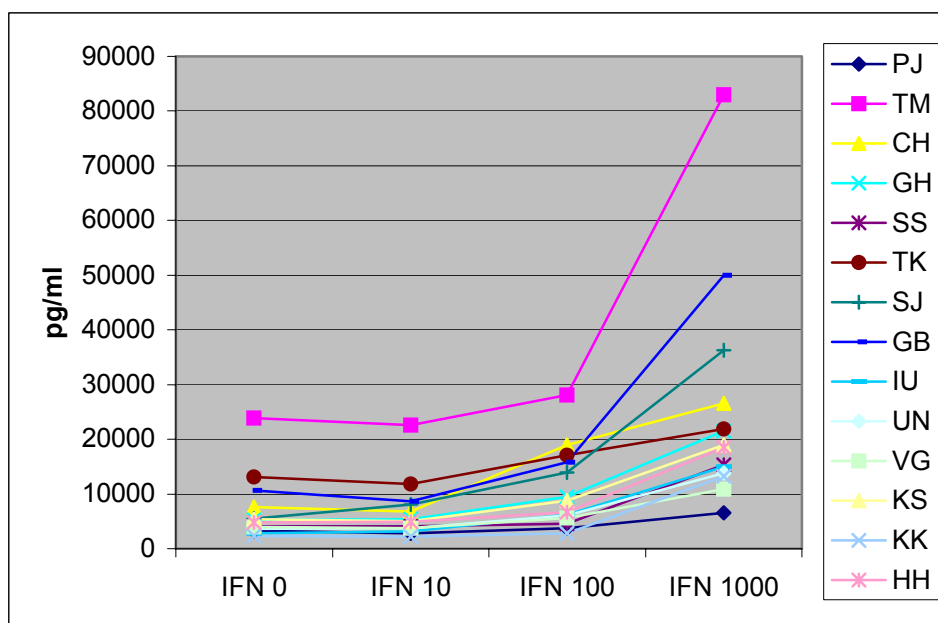
- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.1.2 PHA-stimulierte PBL (Abb. 10)

Durch 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml stieg die IP-10 Produktion PHA-stimulierter Leukozyten nach 16 stündiger Kultivierung statistisch signifikant an im Vergleich zur IFN- β 1a freien Kultur (\bar{x} = 6868 pg/ml; \pm 5740). Durch 100 U/ml ergab sich eine Steigerung um 54 % (\bar{x} = 10574 pg/ml; \pm 7250; $p < 0,001$) und durch 1000 U/ml um 265 % (\bar{x} = 25097 pg/ml; \pm 20016; $p < 0,001$). 10 U IFN- β 1a/ml bewirkten während 16 h eher ein leichtes, statistisch insignifikantes Absinken der Chemokinkonzentration (\bar{x} = 6633 pg/ml; \pm 5285).

Nach 68 h Kultur sank die IP-10 Konzentration durch 10 U IFN- β 1a/ml signifikant ($p < 0,02$) auf 75,9 % (\bar{x} = 38252 pg/ml; \pm 19026) der IFN- β 1a freien Kulturen (\bar{x} = 50416 pg/ml; \pm 29556). Durch 1000 U IFN- β 1a/ml wurde eine statistisch signifikant höhere IP-10-Produktion induziert ($p < 0,02$). Hier wurde die Chemokinkonzentration um 53,9 % gesteigert (\bar{x} = 77587 pg/ml; \pm 41946). Durch 100 U IFN- β 1a/ml wurde im Gegensatz zur 16 h Kultur nach 68 h tendenziell eine Reduktion der Chemokinkonzentration bewirkt (\bar{x} = 41565 pg/ml; \pm 20906 pg/ml). Diese Veränderung war nach statistischen Kriterien aber nicht signifikant.

a)



b)

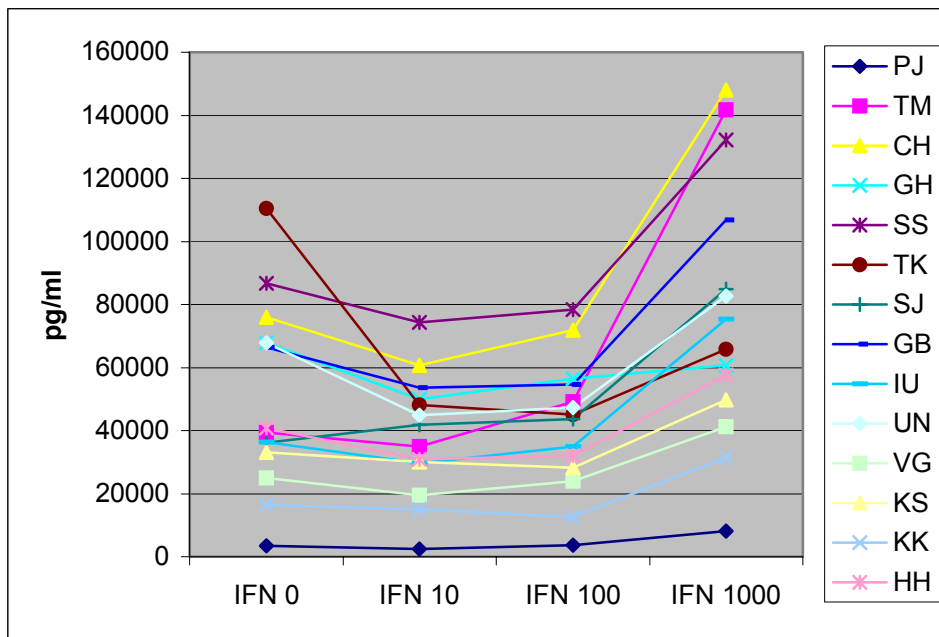


ABBILDUNG 10: MODULATION DER IP-10 PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH IFN-β1A *IN VITRO*

Frisch isolierte PBL von 14 Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 68 h mit PHA (5 µg/ml) stimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN-β1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des IP-10 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

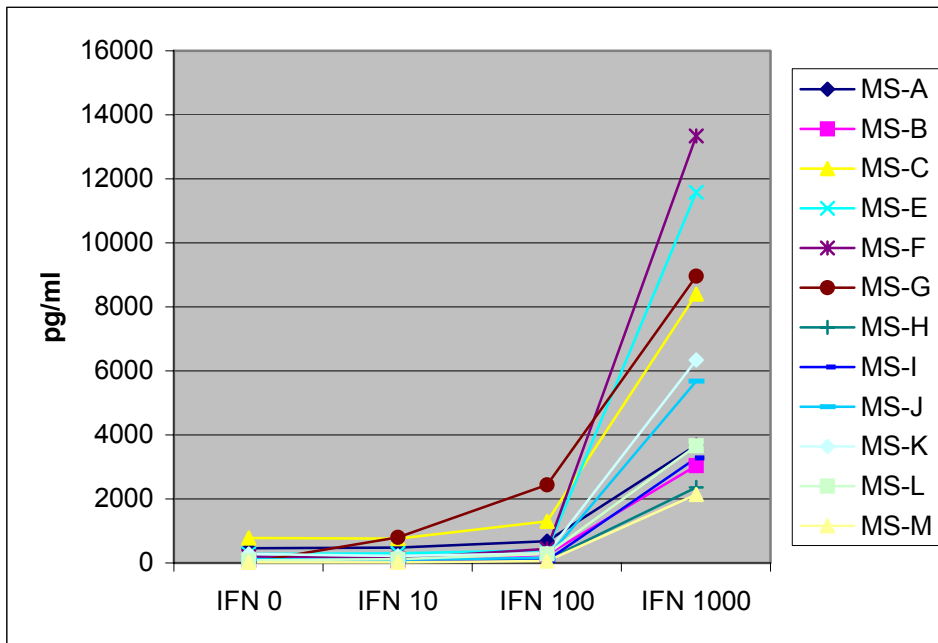
5.4.2 IP-10 Produktion durch PBL von unbehandelten MS Patienten

5.4.2.1 Unstimulierte PBL

Wie schon bei den unstimulierten PBL der gesunden Probanden gesehen wurde, konnte auch bei den MS Patienten (Abb. 11) nur durch den Einfluss von 1000 U IFN- β 1a/ml eine statistisch signifikante Erhöhung der Chemokinkonzentration in der 16 h Kultur in Bezug auf die IFN- β 1a freien Kulturen (\bar{x} = 205 pg/ml; \pm 227) festgestellt werden. Durch IFN- β 1a nahm die Konzentration des IP-10 auf das 29,5 fache (\bar{x} = 6039 pg/ml; \pm 3750; $p < 0,001$) zu. Beim Vergleich zwischen der IFN- β 1a freien Kultur und den Kulturen, die mit 10 bzw. 100 U IFN- β 1a/ml stimuliert wurden, stieg die Chemokinkonzentration nach 16 h Inkubation durch 10 bzw. 100 U/ml tendenziell an, aber eine statistische Signifikanz dieser Veränderung wurde nicht erreicht. Der Mittelwert der IP-10 Konzentration der Kulturen, die mit 10 U/ml stimuliert wurden, betrug 259 pg/ml (\pm 274) und von denen, die mit 100 U/ml inkubiert wurden, 541 pg/ml (\pm 690).

Nach 68 h Kultur konnte die IP-10 Konzentration der IFN- β 1a freien Kulturen (\bar{x} = 1677 pg/ml; \pm 1348) durch den Einfluss von 1000 U IFN- β 1a/ml statistisch signifikant auf das 7,2 fache gesteigert werden (\bar{x} = 12032 pg/ml; \pm 110; $p < 0,01$). Statistische Insignifikanz zeigte sowohl der leichte Anstieg der Konzentration des IP-10 durch 100 U IFN- β 1a/ml (\bar{x} = 1962 pg/ml; \pm 1158) als auch das eher Absinken durch 10 U/ml (\bar{x} = 1455 pg/ml; \pm 1147).

a)



b)

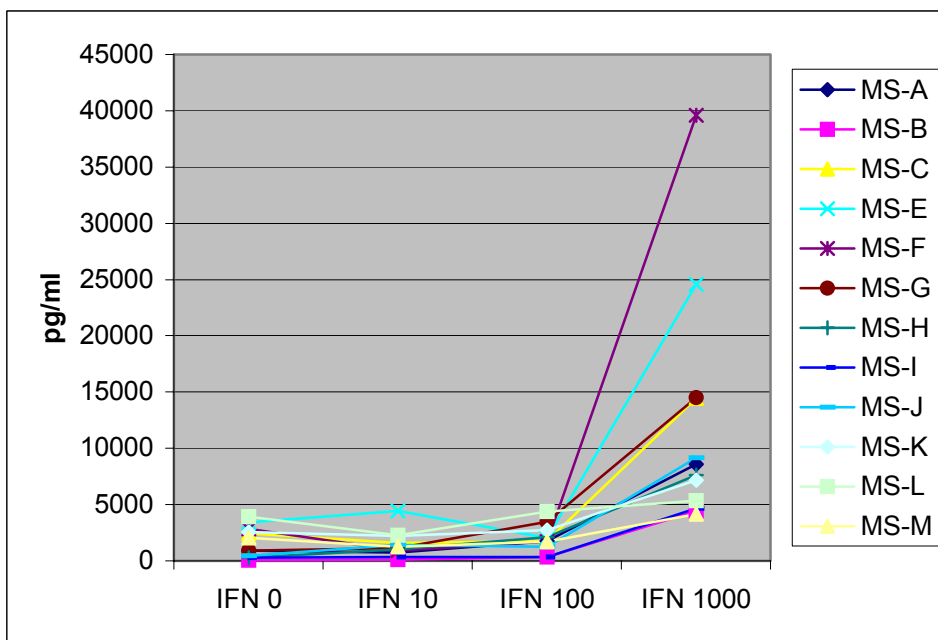


ABBILDUNG 11: MODULATION DER IP-10 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN DURCH IFN-β1A *IN VITRO*

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

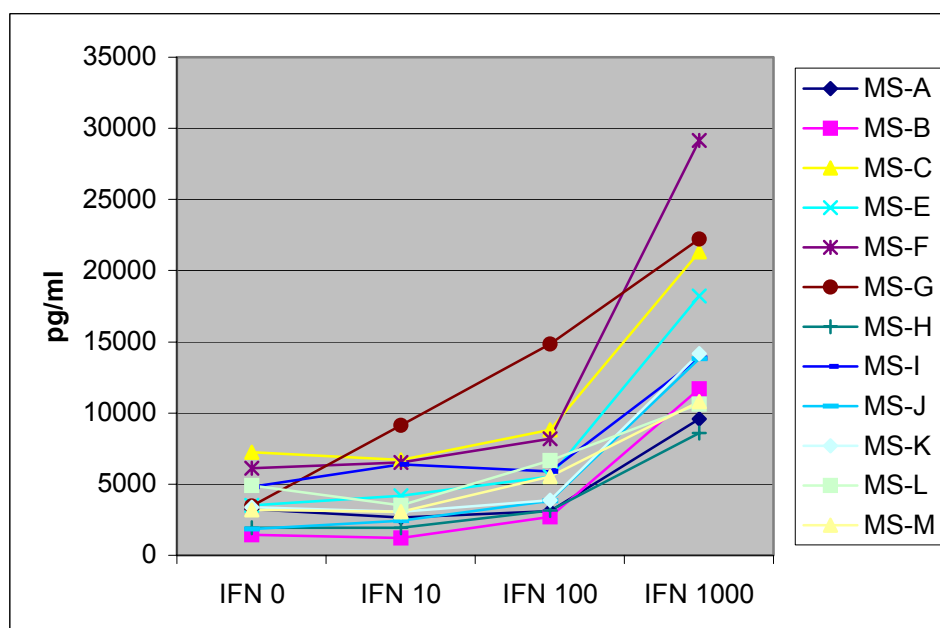
5.4.2.2 PHA-stimulierte PBL

Bei den PHA-stimulierten Leukozyten unbehandelter MS Patienten (Abb. 12) konnte nach 16 h Kultivierung gezeigt werden, dass sowohl 100 ($\bar{x} = 6010 \text{ pg/ml}; \pm 3423$) als auch 1000 U IFN- β 1a/ml ($\bar{x} = 15333 \text{ pg/ml}; \pm 6210$) eine Steigerung der Chemokinproduktion in Bezug auf die IFN- β 1a freie Kultur bewirkten ($\bar{x} = 3757 \text{ pg/ml}; \pm 1743$). Diese erwiesen sich als statistisch signifikant. Durch 100 U IFN- β 1a/ml erhöhte sich die Konzentration um 60 % ($p < 0,05$) und durch 1000 U/ml um 308 % ($p < 0,0001$). 10 U IFN- β 1a/ml ließen die Chemokinkonzentration tendenziell ansteigen, aber nach statistischen Regeln war diese Veränderung nicht signifikant ($\bar{x} = 4239 \text{ pg/ml}; \pm 2400$).

Während 68 stündiger Inkubation wurden durch 10 U IFN- β 1a/ml die Konzentration des IP-10 im Vergleich zur IFN- β 1a freien Kultur auf 82,7 % ($\bar{x} = 36765 \text{ pg/ml}; \pm 22049; p < 0,05$) und durch 100 U/ml auf 84,3 % ($\bar{x} = 37458 \text{ pg/ml}; \pm 21675; p < 0,05$) der von IFN- β 1a freien Kulturen ($\bar{x} = 44432 \text{ pg/ml}; \pm 29065 \text{ pg/ml}$) supprimiert.

Im Gegensatz dazu wurde in den Überständen der Kulturen, die mit 1000 U IFN- β 1a/ml stimuliert wurden, eine erhöhte Chemokinkonzentration bezogen auf die IFN- β 1a freie Kultur ($\bar{x} = 44432 \text{ pg/ml}; s = \pm 29065 \text{ pg/ml}$) gemessen. Es handelte sich um eine Steigerung von 32,8 % ($\bar{x} = 59010 \text{ pg/ml}; s = \pm 28223 \text{ pg/ml}; p < 0,01$).

a)



b)

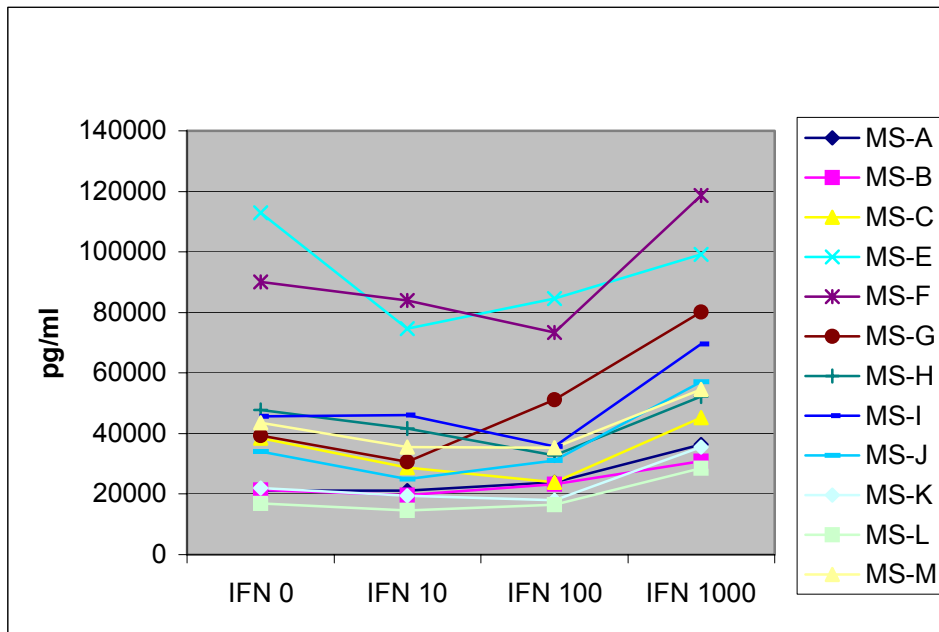


ABBILDUNG 12: MODULATION DER IP-10 PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN DURCH IFN-β1A *IN VITRO*

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.3 IP-10 Produktion durch PBL von MS Patienten während s.c. IFN- β 1a Therapie

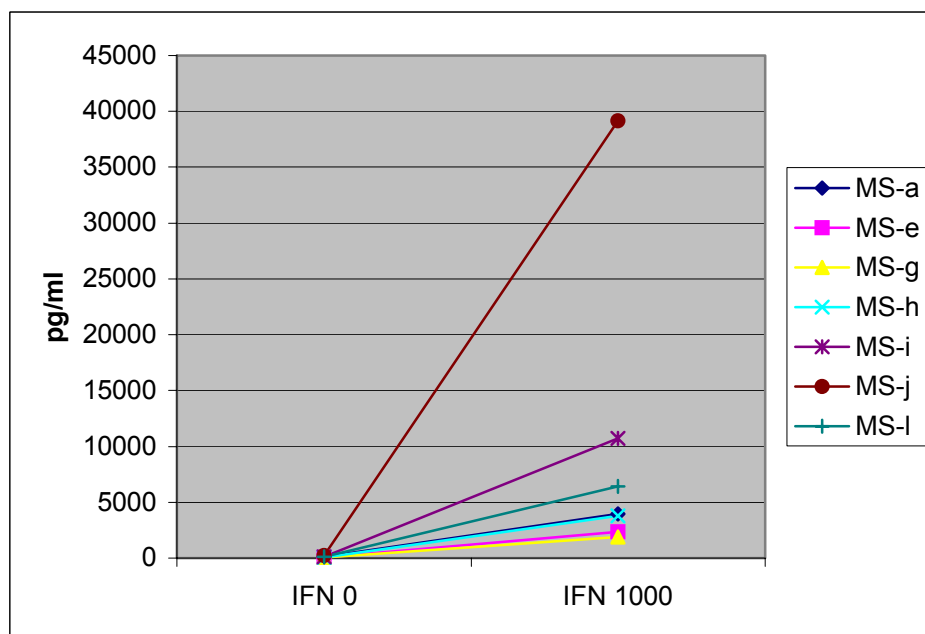
Da bei Probanden und unbehandelten MS Patienten *in vitro* jeweils die 1000 U IFN- β 1a/ml signifikante Veränderungen der Chemokinproduktion bewirkten, wurde bei den MS Patienten, die auch während einer *in vivo* Therapie mit s.c. IFN- β 1a untersucht wurden, lediglich noch der *in vitro* Effekt von 1000 U IFN- β 1a/ml getestet.

5.4.3.1 Unstimulierte PBL

Bei den unstimulierten Leukozyten (Abb. 13) erhöhte sich nach 16 h Kultur die Konzentration des IP-10 unter dem Einfluss von 1000 U IFN- β 1a/ml ($\bar{x} = 9755$ pg/ml; ± 13301) bezogen auf die IFN- β 1a freie Kultur ($\bar{x} = 99,8$ pg/ml; $\pm 57,9$) stark. Doch diese Erhöhung war nach statistischen Regeln nicht mehr signifikant.

Nach 68 h zeigte sich in den Überständen der Kultur, die mit 1000 U IFN- β 1a/ml versetzt wurde, ein Anstieg auf das 8,5 fache ($\bar{x} = 12275$ pg/ml; ± 8740) als statistisch signifikant ($p < 0,02$). Die Kultur ohne IFN- β 1a hatte einen Mittelwert von 1448 pg/ml (± 1887).

a)



b)

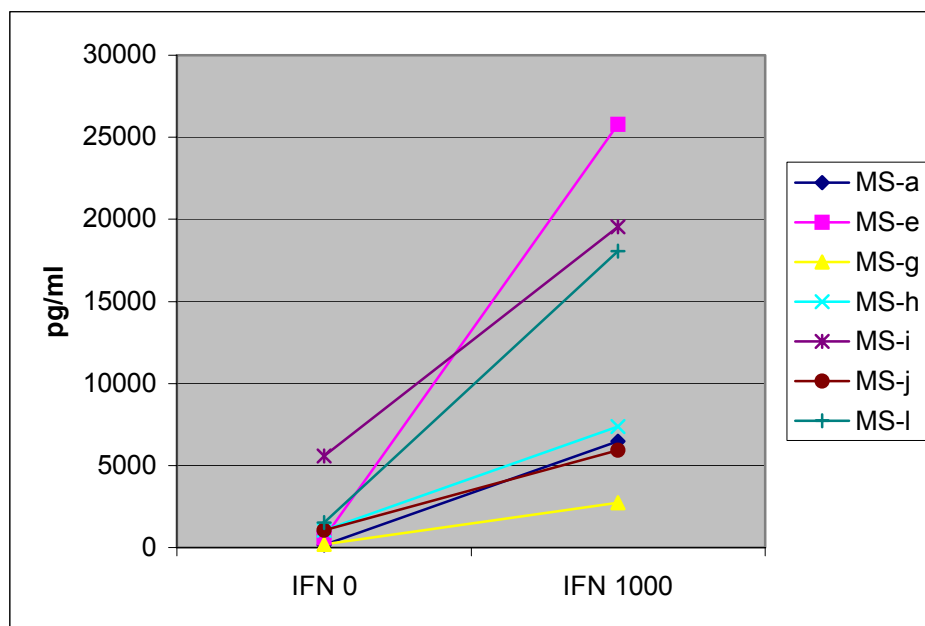


ABBILDUNG 13: IFN-β1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER IP-10 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL VON MS PATIENTEN WÄHREND S.C. IFN-β1A-THERAPIE

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

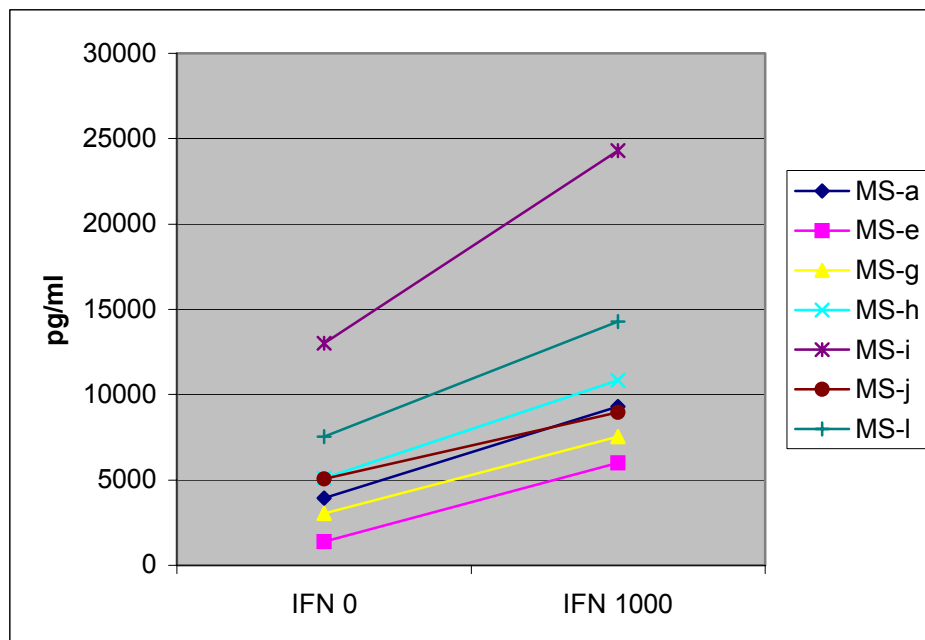
5.4.3.2 PHA-stimulierte PBL

Die Überstände der PHA-aktivierten Kulturen (Tab. 20; Abb. 14), die für 16 oder 68 h mit 1000 U IFN-β1a/ml inkubiert wurden, zeigten eine höhere Konzentration des IP-10 als die Überstände der IFN-β1a freien Kulturen. Nach 16 h wurde eine Steigerung auf das 2,1 fache erreicht und nach 68 h auf das 1,2 fache. Für 16 h ergab sich ein p-Wert kleiner 0,001 und für 68 h kleiner 0,02.

IFN-β1a (U/ml) <i>in vitro</i>		0	1000
16 h	Mittelwert (pg/ml)	5583	11607 ***
	Standardabweichung	3799	8185
68 h	Mittelwert (pg/ml)	26999	32603 *
	Standardabweichung	12363	15290

**TABELLE 20: IFN-β1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER IP-10 PRODUKTION PHA-
STIMULIERTER PBL VON MS PATIENTEN WÄHREND S.C. IFN-β1A THERAPIE**

a)



b)

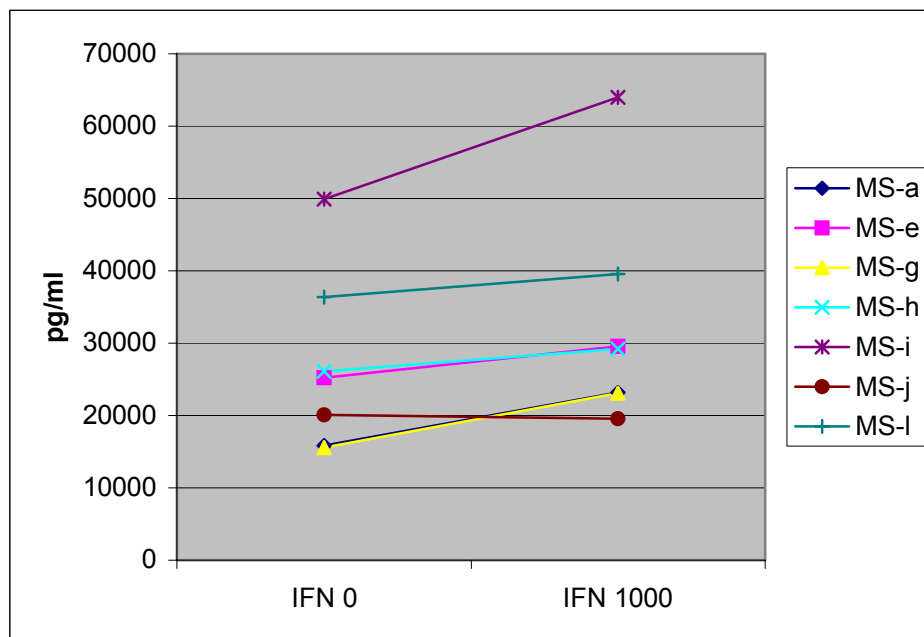


ABBILDUNG 14: IFN- β 1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER IP-10 PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL VON MS PATIENTEN WÄHREND S.C. IFN- β 1A-THERAPIE

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
 b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.4 Vergleich der IP-10 Produktion durch PBL von MS Patienten vor und während der s.c. IFN- β 1a Therapie

Hierbei wurden die spontanen Chemokinproduktionen und das Ansprechen der IP-10 Produktion auf die *in vitro* Gabe von 1000 IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und unter der s.c. Therapie mit IFN- β 1a gegenübergestellt.

5.4.4.1 Vergleich der spontanen IP-10 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL von MS Patienten vor und während der s.c. Therapie

Bei den unstimulierten Leukozyten konnte keine Veränderung der Chemokinproduktion, die statistische Signifikanz zeigte, festgestellt werden:

Beim Vergleich der IFN- β 1a freien Kulturen (\bar{x} = 157 pg/ml; \pm 161) vor und unter der Therapie mit IFN- β 1a war insgesamt eher ein Absinken der Konzentration des IP-10 zu sehen, wobei nach 16 h Kultivierung die PBL von fünf Patienten mehr und von zwei Patienten weniger Chemokin produzierten (\bar{x} = 100 pg/ml; \pm 57,9). Nach 68 h (Wert bei unbehandelten Pa-

tienten: $\bar{x} = 1453$ pg/ml; ± 1541) wiesen nur noch drei Patienten einen Anstieg auf, und bei vier Patienten sank die Konzentration ($\bar{x} = 1478$ pg/ml; ± 1887). Die einzelnen Patienten verhielten sich also in ihrem Ansprechen uneinheitlich.

In den Überständen PHA-stimulierter PBL (Tab. 21) ohne *in vitro* Zugabe von IFN- β 1a war durch die *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a nach 16 h Kultivierung kein statistisch signifikanter Unterschied zu der Konzentration vor Therapie erkennbar.

kein IFN- β 1a <i>in vitro</i>		vor Therapie	unter Therapie
16 h	Mittelwert (pg/ml)	3382	5583
	Standardabweichung	1224	37999
68 h	Mittelwert (pg/ml)	45390	26999
	Standardabweichung	31986	12363

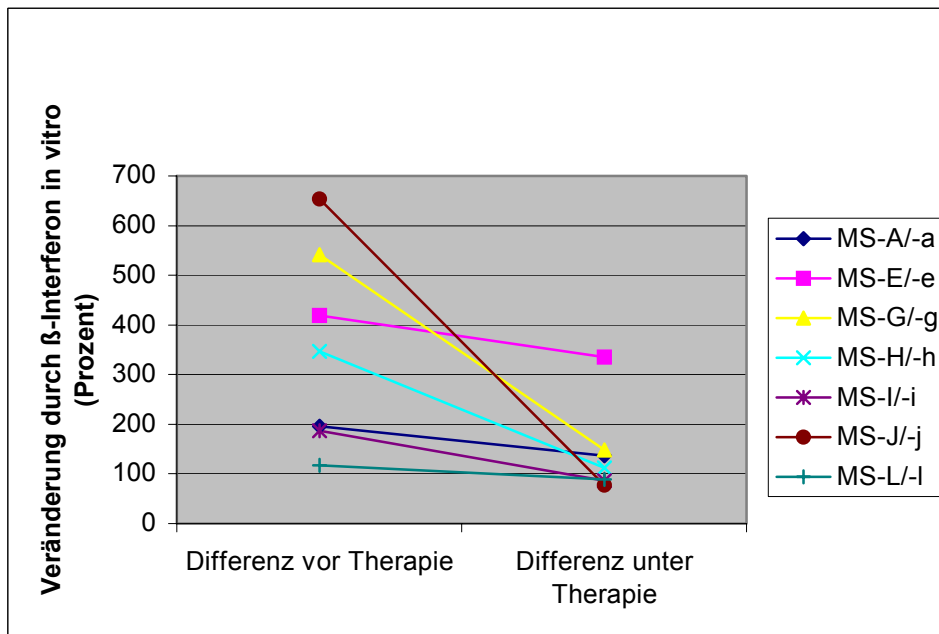
TABELLE 21: IP-10 KONZENTRATIONEN PHA-STIMULIERTER PBL-KULTUREN VON SIEBEN MS PATIENTEN VOR UND UNTER THERAPIE MIT IFN- β 1A

5.4.4.2 Vergleich des *in vitro* Ansprechens der IP-10 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf 1000 U IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und während der s.c. Therapie

Bei den Patienten stieg die IP-10 Produktion vor Therapie durch 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* nach 16 h Kultur unstimulierter PBL durchschnittlich um 7841 % (± 10393). Unter der s.c. Therapie nahm sie durch 1000 U IFN- β 1a/ml um 7440 % (± 5106) zu. Die Chemokinproduktion der Zellen, die für 68 h mit 1000 U IFN- β 1a/ml inkubiert wurden, erhöhte sich im Vergleich zu Kulturen ohne IFN- β 1a bei den unbehandelten Patienten um 1306 % (± 899) und bei den Patienten unter Therapie um 1709 % ($s = \pm 1697$ %). Keine Veränderung der ChemokinKonzentration war statistisch signifikant unterschiedlich von der vor der *in vivo* Therapie.

Bei den PHA-stimulierten PBL (Abb. 15) von 16 h Kulturdauer bewirkten 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* keine derart starke Stimulation der Chemokinproduktion unter der Therapie wie vor der Therapie ($p < 0,05$): Vor s.c. Therapie wurde die Konzentration um 352 % (± 199) gesteigert und unter Therapie nur um 141 % ($\pm 89,7$). Eine statistische Signifikanz zeigte sich nach 68 stündiger Kultur aber nicht mehr, obwohl auch hier die Chemokinkonzentration bei den unbehandelten Patienten mehr zunahm als bei den behandelten ($\bar{x} = 51,8\%$; ± 40 bzw. $\bar{x} = 22,7\%$; $\pm 19,4$).

a)



b)

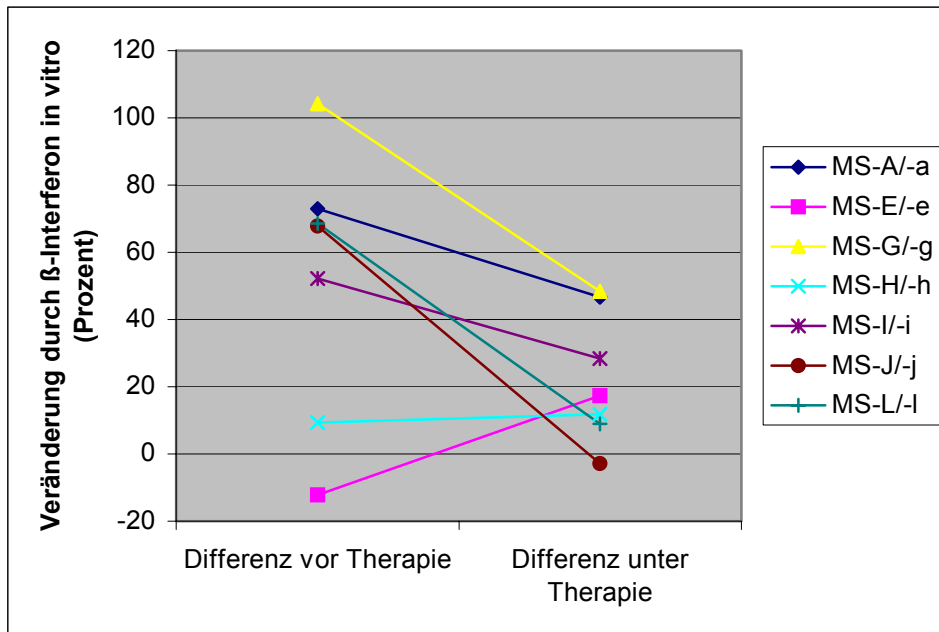


ABBILDUNG 15: MODULATION DER IP-10 *IN VITRO* PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL DURCH 1000 U IFN- β 1A/ML BEI MS PATIENTEN VOR UND WÄHREND DER THERAPIE MIT IFN- β 1A S.C.

Angegeben ist die prozentuale Veränderung der IP-10 Konzentrationen durch 1000 U IFN- β 1a/ml jeweils zur interferonfreien Kultur.

- a) nach 16 h Kultivierung
b) nach 68 h Kultivierung

5.4.5 Vergleich der IP-10 Produktion durch PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten

Untersucht wurden Konzentrationen von IFN- β 1a freien Kulturen und von Kulturen mit 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro*.

5.4.5.1 Vergleich der spontanen IP-10 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL von Probanden und unbehandelten MS Patienten

Nach beiden Inkubationsintervallen unstimulierter PBL war in IFN- β 1a freien Kulturen bei den unbehandelten MS Patienten eine statistisch insignifikant niedrigere IP-10 Konzentration als bei den Probanden zu sehen. Bei einer Inkubationszeit von 16 h betrug der Mittelwert der Chemokinkonzentration bei den PBL von Probanden 380 pg/ml (\pm 509) und von den MS Patienten 205 pg/ml (\pm 227). Nach 68 h wiesen die Chemokinkonzentrationen der Probanden

einen Mittelwert von 1907 pg/ml (\pm 1518) auf, und die der Patienten einen von 1677 pg/ml (\pm 1348).

Auch bei den PHA-stimulierten PBL gab es wie schon bei den unstimulierten PBL keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Chemokinkonzentrationen IFN- β 1a freier Kulturen der Probanden und MS Patienten. Es war jedoch tendenziell eine niedrigere Konzentration bei den MS Patienten zu erkennen. Die Chemokinkonzentration betrug bei 16 stündiger Kultur bei den Probanden im Mittel 7504 pg/ml (\pm 5986) und bei den Patienten 3757 pg/ml (\pm 1743). Nach 68 h lag diese bei den Probanden bei 55491 pg/ml (\pm 28042) und bei den Patienten bei 44432 pg/ml (\pm 29065).

5.4.5.2 Vergleich des Ansprechens der IP-10 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf die *in vitro* Gabe von 1000 U IFN- β 1a/ml bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten

Bei der 16 h Kultur unstimulierter PBL von Probanden stieg durch 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* die Chemokinkonzentration um durchschnittlich 4891 % (\pm 2969) im Vergleich zu der IFN- β 1a freien Kultur und bei den unbehandelten MS Patienten um durchschnittlich 6390 % (\pm 8084). Während 68 h Inkubation wurde die Chemokinproduktion bei den Probanden stärker stimuliert als bei den Patienten, nämlich um 1871 % (\pm 1703). Bei den Patienten war eine Steigerung um 1425 % (\pm 1623) festzustellen. Diese Veränderungen waren nach statistischen Regeln nicht signifikant verschieden.

Bei den PHA-stimulierten PBL von 16 h Kulturdauer war bei dem Patientenkollektiv ein höheres Ansteigen (um 349 %; \pm 127) der Chemokinkonzentration unter 1000 U IFN- β 1a/ml zu erkennen als bei den Probanden (um 295 %; \pm 196 %). Nach 68 h verhielt es sich umgekehrt. Die Konzentration erhöhte sich bei den Probanden um 68,6 % (\pm 76,2) und bei den Patienten um 45,3 % (\pm 32,4). Zu beiden Zeitpunkten bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ansprechen der PBL von Probanden und MS Patienten.

5.4.6 *In vitro* Modulation der IP-10 Produktion der isoliert kultivierten Monozyten von gesunden Probanden durch IFN- β 1a

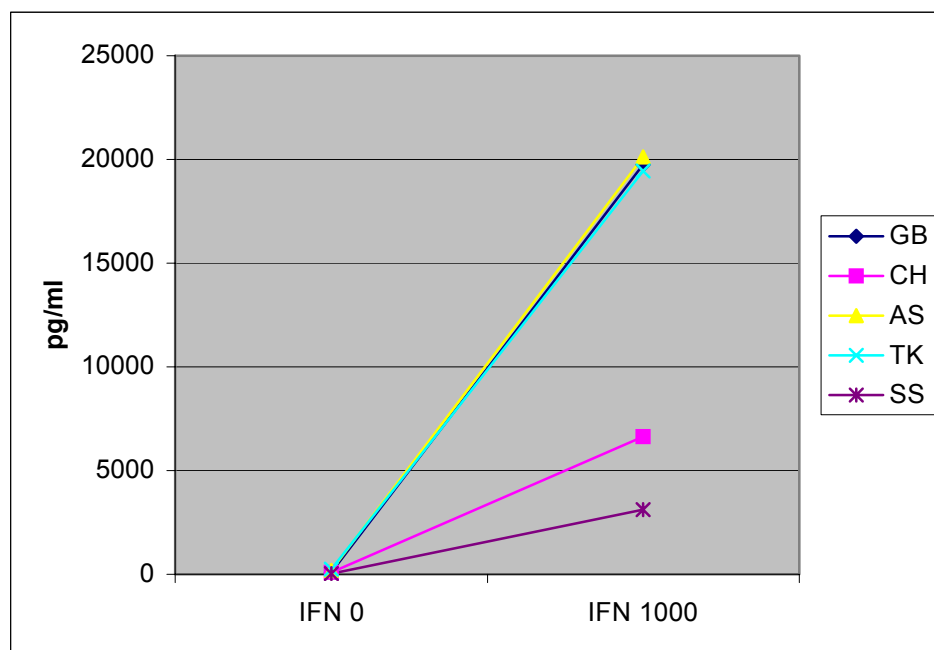
Zusätzlich zu den kultivierten PBL wurden von fünf Probanden auch isolierte Monozyten kultiviert. Die IP-10 Konzentrationen wurden nach 16 und 42 h Kultur mit und ohne LPS-Stimulation gemessen. LPS wurde in einer Konzentration von 0,1 μ g/ml verwendet.

5.4.6.1 Unstimulierte Monozyten (Abb. 16)

In den Überständen der IFN- β 1a freien Kultur wurde nach 16 h Kultivierung durchschnittlich eine IP-10 Konzentration von 124 pg/ml (\pm 81,1) gemessen. Durch 1000 U IFN- β 1a/ml stieg sie statistisch signifikant auf 13816 pg/ml (\pm 8253; $p < 0,05$) an.

Auch nach 42 h Kultur konnte die IP-10 Konzentration durch 1000 U IFN- β 1a/ml statistisch signifikant gesteigert werden ($p < 0,01$). Der Mittelwert der IP-10 Konzentrationen betrug bei der IFN- β 1a freien Kultur 1135 pg/ml (\pm 2067) und bei der Kultur, die durch 1000 U IFN- β 1a/ml stimuliert wurden, 63869 pg/ml (\pm 28242).

a)



b)

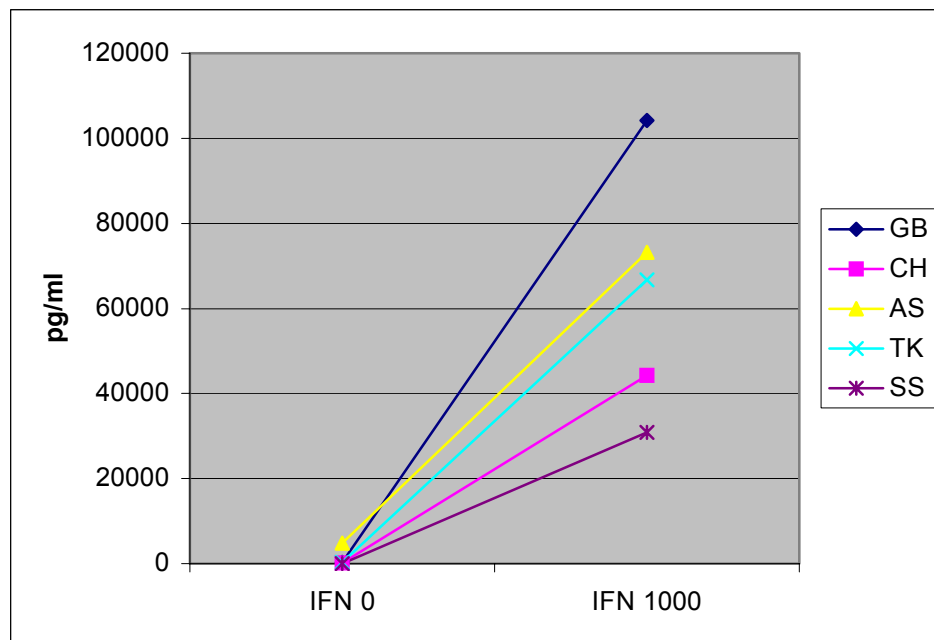


ABBILDUNG 16: MODULATION DER IP-10 PRODUKTION UNSTIMULIERTER ISOLIERTER MONOZYTEN VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH 1000 U IFN- β 1A/ML *IN VITRO*

Frisch isolierte Monozyten von fünf Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 42 h unstimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN- β 1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des IP-10 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

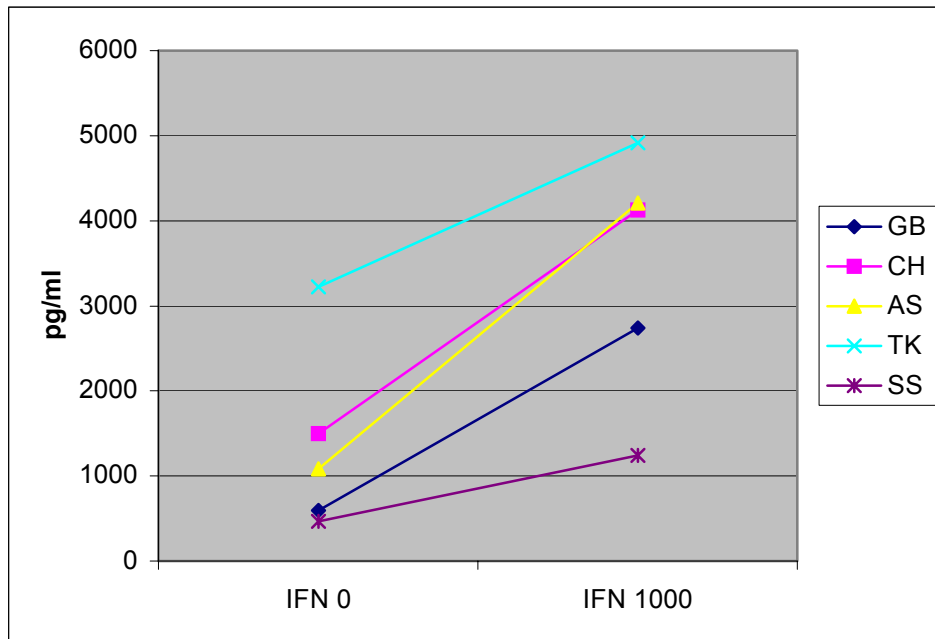
- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 42 h

5.4.6.2 LPS-stimulierte Monozyten (Abb. 17)

Beim Vergleich der IFN- β 1a freien Kulturen (\bar{x} = 1372 pg/ml; \pm 1111) mit der Kultur, die für 16 h mit 1000 U IFN- β 1a/ml kultiviert wurde, konnte die IP-10 Produktion statistisch signifikant durch IFN- β 1a auf 251,1 % (\bar{x} = 3446 pg/ml; \pm 1461; $p < 0,01$) gesteigert werden.

Nach 42 Kultur war der gleiche Effekt zu beobachten ($p < 0,02$): Die Chemokinkonzentration der IFN- β 1a freien Kultur nahm durch 1000 U IFN- β 1a/ml im Mittel von 1586 pg/ml (\pm 1223) auf 3554 pg/ml (\pm 1527) zu.

a)



b)

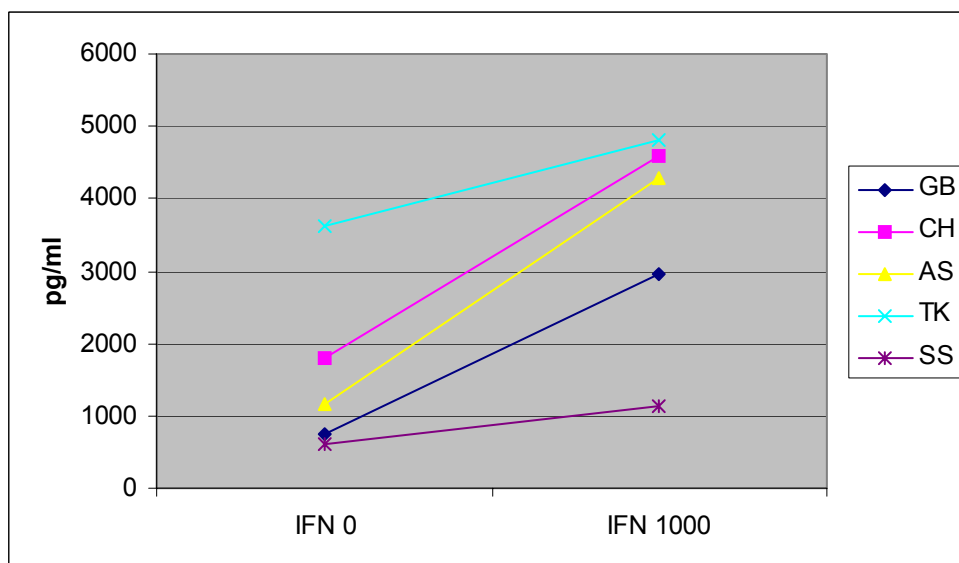


ABBILDUNG 17: MODULATION DER IP-10 PRODUKTION LPS-STIMULIERTER MONOZYTEN VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH 1000 U IFN- β 1A/ML *IN VITRO*

Frisch isolierte Monozyten von fünf Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 42 h mit LPS (0,1 μ g/ml) stimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN- β 1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des IP-10 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 42 h

5.4.7 MCP-1 Produktion durch PBL von gesunden Probanden

5.4.7.1 Unstimulierte PBL

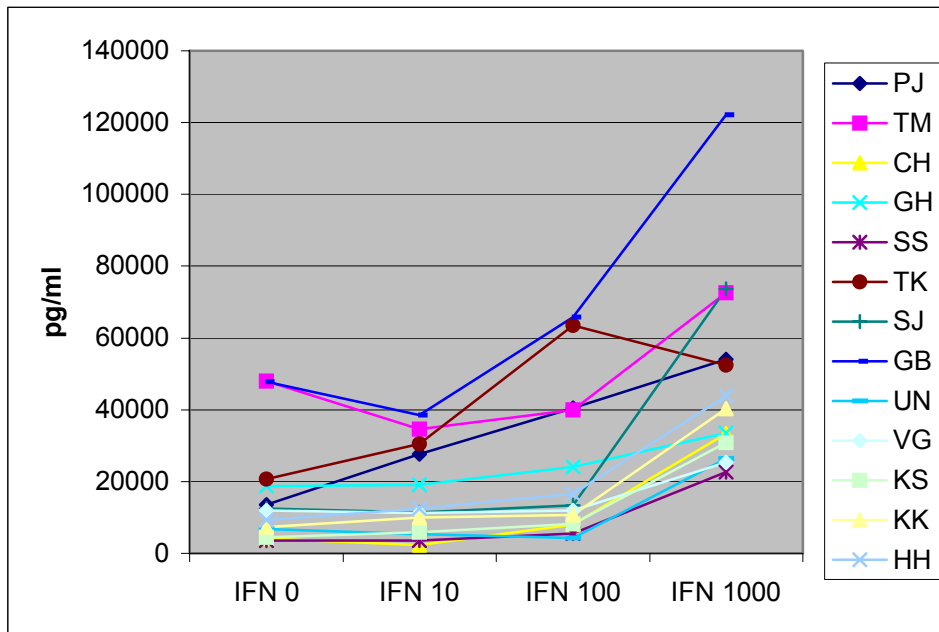
Beim Vergleich mit den unstimulierten PBL-Kulturen ohne IFN- β 1a (Tab. 22; Abb. 18) stieg durch die Zugabe von 10, 100, 1000 U IFN- β 1a/ml die MCP-1 Konzentration nach 16 h Kultivierung an. Jedoch wurde nur durch 1000 U IFN- β 1a/ml die Zunahme um 202 % statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

Nach 68 h Kultur wurde ein Absinken der Chemokinkonzentration auf 83,9 % durch den Einfluss von 10 U IFN- β 1a/ml in Bezug auf die IFN- β 1a freie Kultur beobachtet, was sich auch als statistisch schwach signifikant erwies ($p < 0,05$). Hingegen erhöhte sich durch 1000 U IFN- β 1a/ml die Konzentration des MCP-1 um 78,5 % statistisch signifikant ($p < 0,01$). Durch 100 U IFN- β 1a/ml zeigte sich tendenziell bereits eine Stimulierung des Chemokins, doch diese Veränderung wurde nach statistischen Regeln nicht signifikant.

IFN- β 1a (U/ml) <i>in vitro</i>		0	10	100	1000
16 h	Mittelwert (pg/ml)	16068	16351	24035	48547 ***
	Standardabweichung	15076	12445	21502	27733
68 h	Mittelwert (pg/ml)	111363	93433 *	130391	198760 **
	Standardabweichung	60090	45804	64080	97564

TABELLE 22: *IN VITRO* MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION DURCH UNSTIMULIERTE PBL VON 13 GESUNDEN PROBANDEN DURCH IFN- β 1A NACH 16 UND 68 H KULTUR

a)



b)

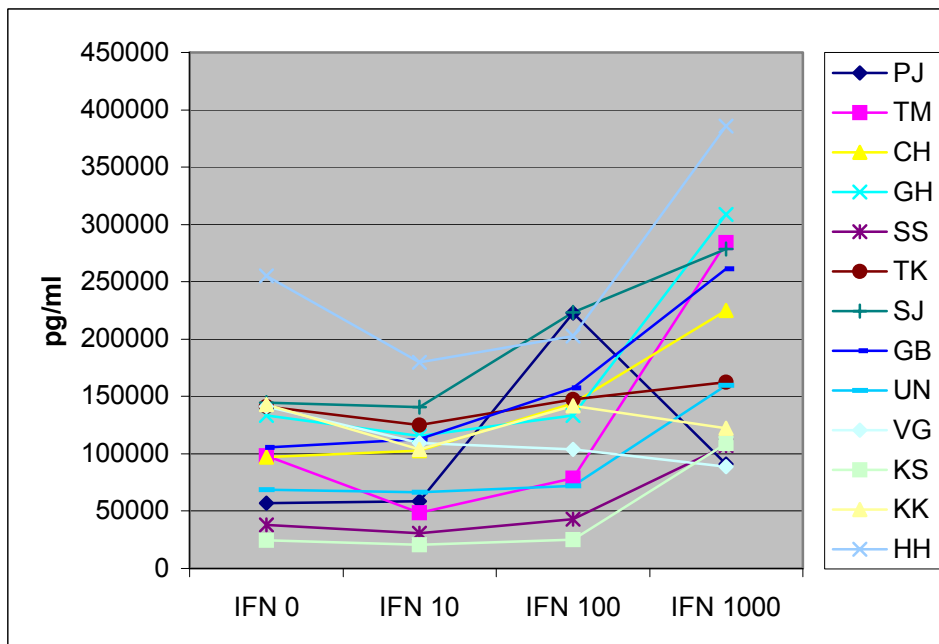


ABBILDUNG 18: MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL-KULTUREN VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH IFN-β1A *IN VITRO*

Frisch isolierte PBL von 13 Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 68 h unstimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN-β1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des MCP-1 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

a) Chemokinkonzentration nach 16 h

b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.7.2 PHA-stimulierte PBL

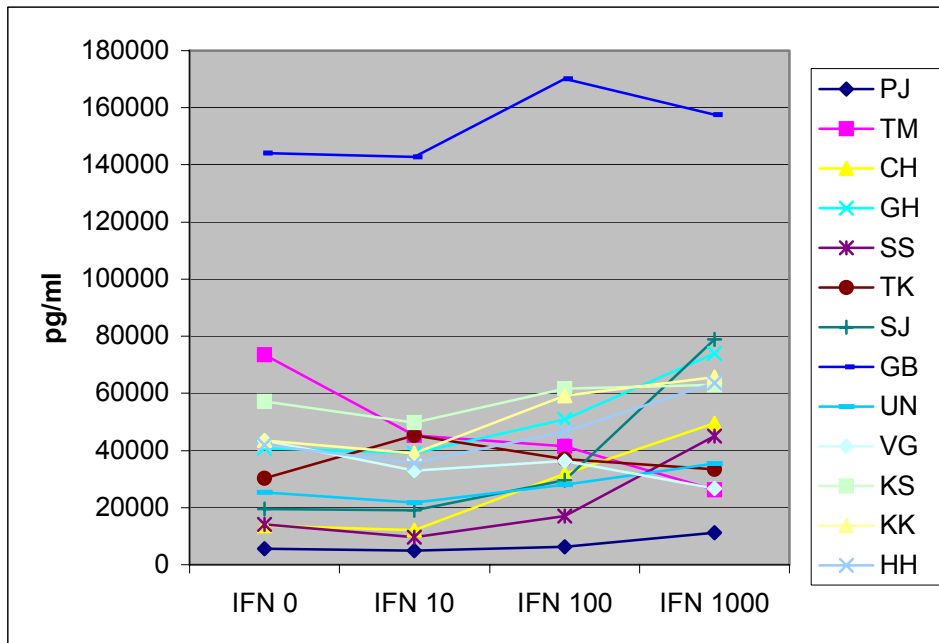
Bei den PHA-stimulierten mononukleären Zellen (Tab. 23; Abb. 19) zeigte sich nach 16 h Inkubation ebenfalls die Tendenz, dass die Chemokinkonzentration durch den Einfluss von 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml zunahm. Eine statistisch insignifikante Reduktion der Konzentration des MCP-1 war durch 10 U IFN- β 1a/ml zu verzeichnen.

Nach 68 h fand sich bei 1000 U IFN- β 1a/ml hingegen eine statistisch signifikante Abnahme um 41,4 % ($p < 0,01$). Durch 10 und 100 U IFN- β 1a/ml zeigte sich tendenziell ein Absinken der MCP-1 Produktion.

IFN- β 1a (U/ml) <i>in vitro</i>		0	10	100	1000
16 h	Mittelwert (pg/ml)	42511	38227	47389	56202
	Standardabweichung	35915	34696	40021	36793
68 h	Mittelwert (pg/ml)	314781	275663	293178	184363 **
	Standardabweichung	135130	116825	145203	107009

TABELLE 23: *IN VITRO* MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION DURCH PHA-STIMULIERTE PBL VON 13 GESUNDEN PROBANDEN DURCH IFN- β 1A NACH 16 UND 68 H KULTUR

a)



b)

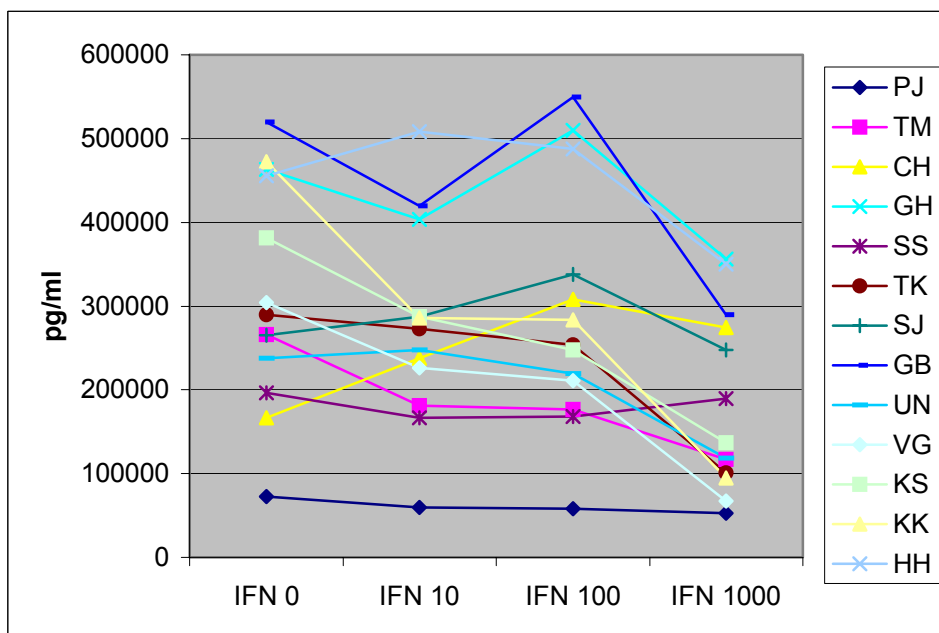


ABBILDUNG 19: MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL-KULTUREN VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH IFN-β1A *IN VITRO*

Frisch isolierte PBL von 13 Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 bzw. 68 h mit PHA (5 µg/ml) stimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN-β1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des MCP-1 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

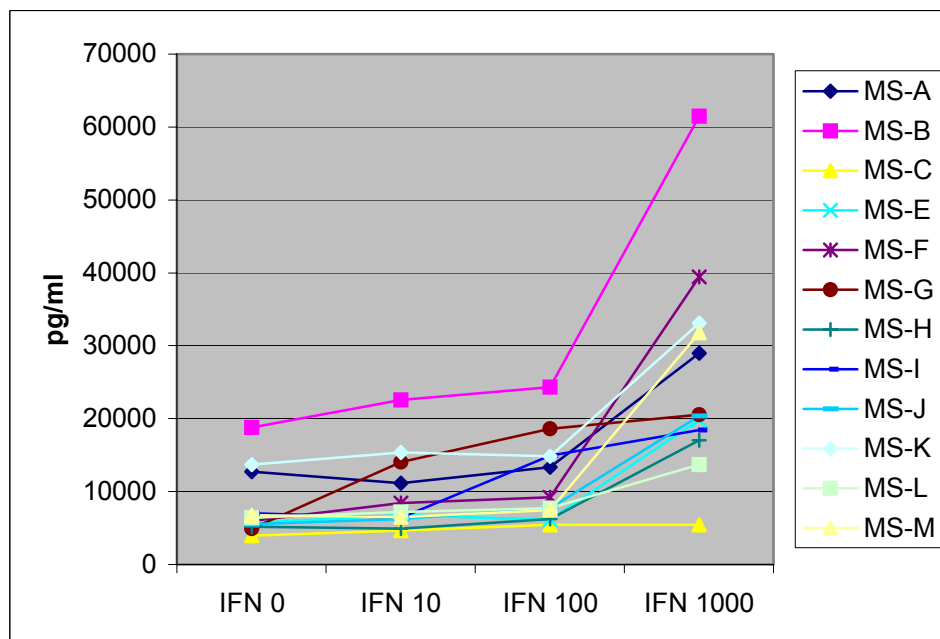
5.4.8 MCP-1 Produktion durch PBL von unbehandelten MS Patienten

5.4.8.1 Unstimulierte PBL

Eine Zunahme von MCP-1 resultierte nach 16 h Kulturdauer der unstimulierten PBL (Abb. 20) durch 100 bzw. 1000 U IFN- β 1a/ml verglichen mit der IFN- β 1a freien Kultur (\bar{x} = 8055 pg/ml; \pm 4523). Die Unterschiede waren jeweils statistisch signifikant. Die Chemokinkonzentration vervielfachte sich durch 100 U/ml um den Faktor 1,4 (auf \bar{x} = 11341 pg/ml; \pm 5917; $p < 0,02$) und durch 1000 U/ml um den Faktor 3,2 (auf \bar{x} = 25865 pg/ml; \pm 14595; $p < 0,001$). Durch 10 U IFN- β 1a/ml stiegen die Chemokine zwar an, doch war die Tendenz nicht statistisch signifikant (\bar{x} = 9517 pg/ml; \pm 5351).

Nach 68 h Kultur konnte beim Vergleich der IFN- β 1a enthaltenden Kulturen mit der IFN- β 1a freien Kultur kein Unterschied festgestellt werden. In der unstimulierten Kultur wurde in Abwesenheit von IFN- β 1a ein Mittelwert von 128534 pg/ml (\pm 56339) gemessen. Der Mittelwert der MCP-1 Konzentration betrug bei 10 U IFN- β 1a/ml 127442 pg/ml (\pm 59992), bei 100 U IFN- β 1a/ml 139791 pg/ml (\pm 56998) und bei 1000 U IFN- β 1a/ml 125957 pg/ml (\pm 83699).

a)



b)

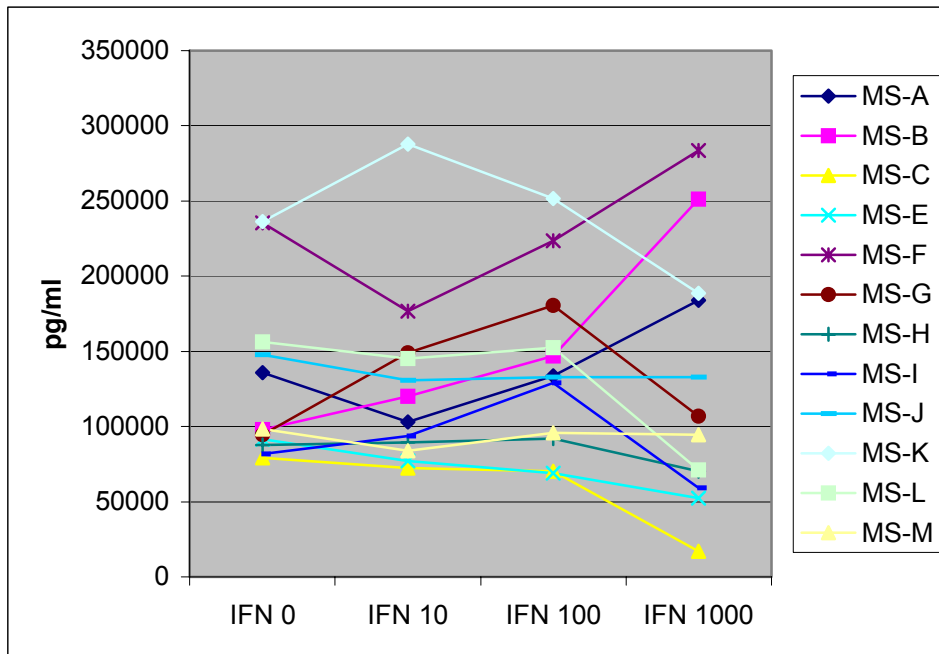


ABBILDUNG 20: MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN DURCH IFN- β 1A *IN VITRO*

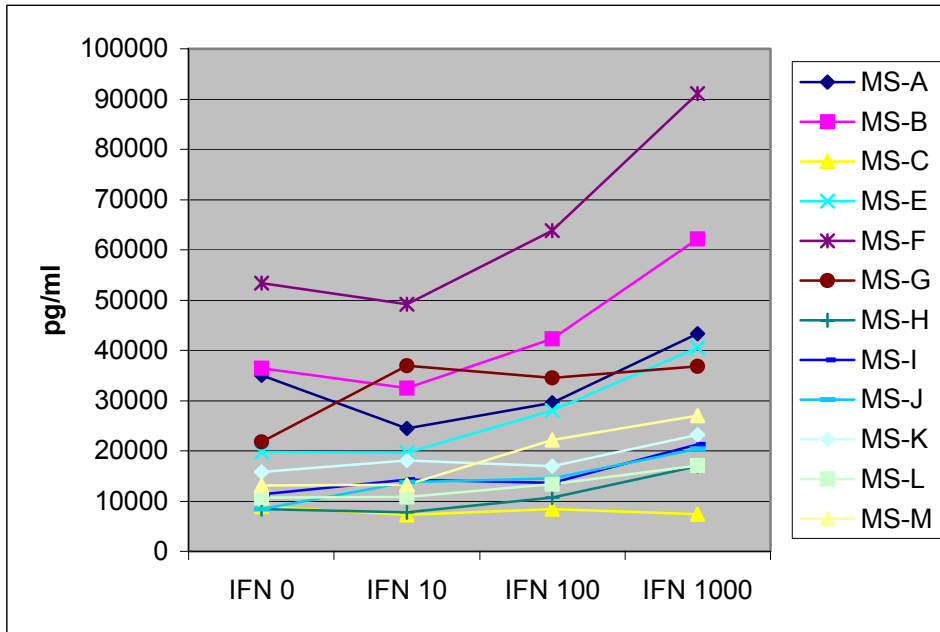
- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.8.2 PHA-stimulierte PBL

Auch bei den PHA-stimulierten PBL (Abb. 21) wurde nach 16 h ein Ansteigen der MCP-1 Konzentration durch 100 und 1000 U IFN- β 1a/ml in statistisch signifikanter Höhe induziert. Der Mittelwert der Chemokinkonzentrationen der Kultur ohne IFN- β 1a betrug 20258 pg/ml (\pm 14222). Die MCP-1 Konzentration stieg durch 100 U IFN- β 1a/ml auf das 1,2 fache (\bar{x} = 24853 pg/ml; \pm 16121; $p < 0,02$) und durch 1000 U/ml auf das 1,7 fache (\bar{x} = 33937 pg/ml; \pm 23325; $p < 0,001$). Durch 10 U IFN- β 1a/ml konnte noch kein Effekt erzielt werden (\bar{x} = 20664 pg/ml; \pm 12887).

Die IFN- β 1a Effekte waren nach 68 h gegensätzlich. Durch 100 U/ml sank MCP-1 bezogen auf die IFN- β 1a freie Kultur (\bar{x} = 272189 pg/ml; \pm 181706) auf 81,8 % mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ (\bar{x} = 222502 pg/ml; \pm 140318) und durch 1000 U/ml auf 50,8 % mit $p < 0,0001$ (\bar{x} = 138198 pg/ml; \pm 128133). Ein leichtes Fallen war durch den Einfluss von 10 U/ml zu verzeichnen, was aber nach statistischen Regeln nicht signifikant war (\bar{x} = 249866 pg/ml; \pm 148445).

a)



b)

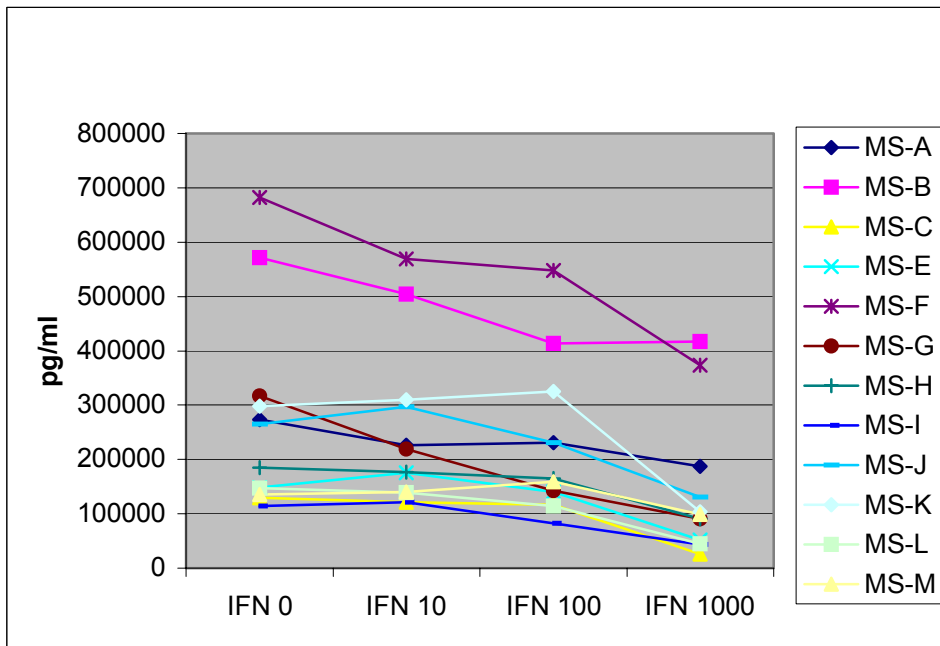


ABBILDUNG 21: MODULATION DER MCP-1 KONZENTRATIONEN PHA-STIMULIERTER PBL VON UNBEHANDELTEN MS PATIENTEN DURCH IFN-β1A *IN VITRO*

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.9 MCP-1 Produktion durch PBL von MS Patienten während *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a s.c.

Bei diesem Teil der Patienten wurde der *in vitro* Effekt alleinig von 1000 U IFN- β 1a/ml auf die MCP-1 Produktion untersucht.

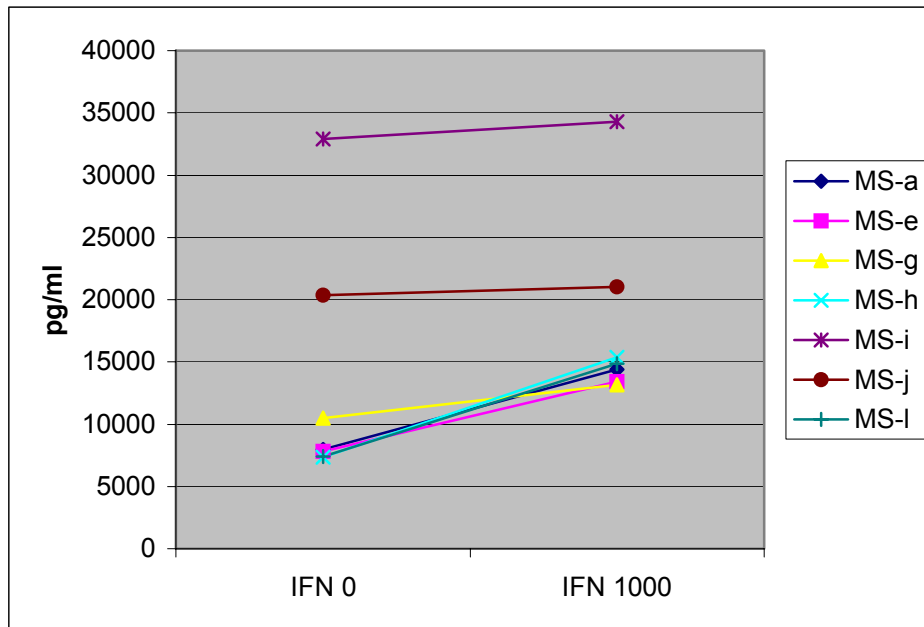
5.4.9.1 Unstimulierte PBL

Bei den unstimulierten PBL konnten, abhängig von der Kulturdauer, gegenläufige Effekte festgestellt werden (Tab. 24; Abb. 22). Nach 16 h Kultur wurde die Chemokinkonzentration durch die Wirkung von 1000 U IFN- β 1a/ml im Vergleich zur jeweils IFN- β 1a freien Kultur um 34,3 % gesteigert ($p < 0,01$), wohingegen diese nach 68 h gesenkt wurde auf 64,9 % ($p < 0,01$).

IFN- β 1a (U/ml) <i>in vitro</i>		0	1000
16 h	Mittelwert (pg/ml)	13465	18078 **
	Standardabweichung	9750	7616
68 h	Mittelwert (pg/ml)	117626	76326 **
	Standardabweichung	42259	29911

TABELLE 24: IFN-B1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL VON SIEBEN MS PATIENTEN WÄHREND S.C. IFN-B1A-THERAPIE NACH 16 UND 68 H KULTUR

a)



b)

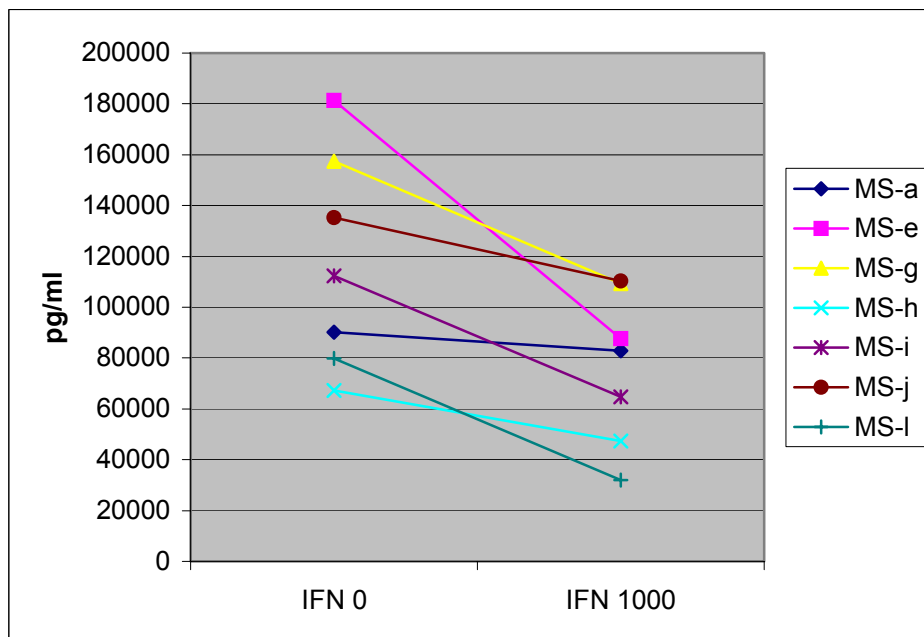


ABBILDUNG 22: IFN- β 1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL-KULTUREN VON MS PATIENTEN WÄHREND S.C. IFN- β 1A-THERAPIE

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 68 h

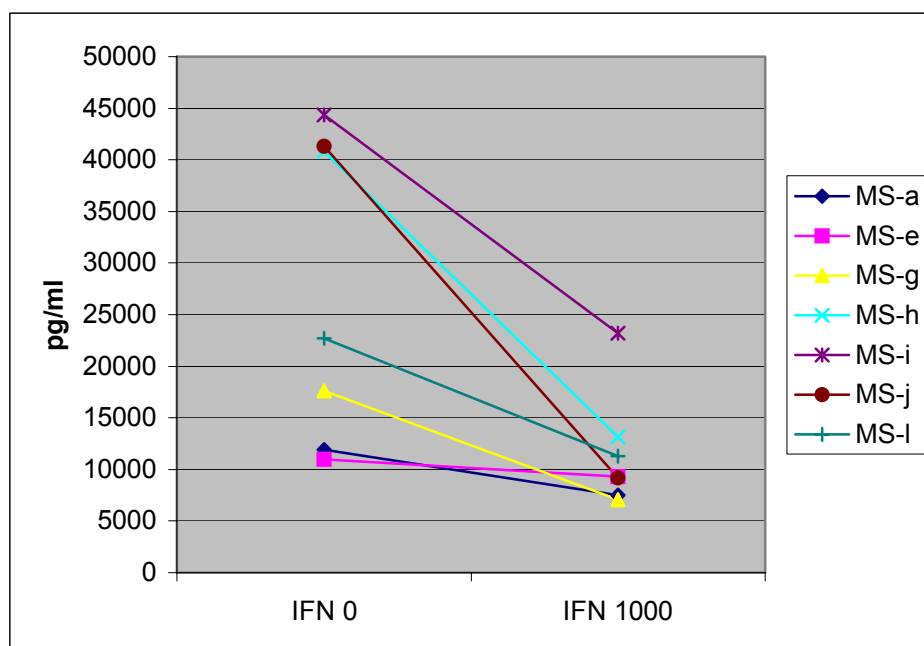
5.4.9.2 PHA-stimulierte PBL

Eine statistisch signifikante *in vitro* Modulation der Chemokinproduktion konnte auch bei den PHA-stimulierten PBL gezeigt werden (Tab. 25; Abb. 23). Verglichen mit der IFN- β 1a freien Kultur wurde nach 16 h in den Überständen, die 1000 U IFN- β 1a/ml enthielten, eine um 57,5 % niedrigere Konzentration des MCP-1 gemessen ($p < 0,02$). Die Chemokinkonzentration konnte nach 68 h noch weiter gesenkt werden und zwar auf 20,2 % der Konzentration der IFN- β 1a freien Kultur ($p < 0,0001$).

IFN- β 1a (U/ml) <i>in vitro</i>		0	1000
16 h	Mittelwert (pg/ml)	27099	11527 *
	Standardabweichung	14656	5564
68 h	Mittelwert (pg/ml)	197975	40057 ***
	Standardabweichung	40953	12584

TABELLE 25: IFN- β 1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL VON SIEBEN MS PATIENTEN UNTER S.C. IFN- β 1A-THERAPIE NACH 16 UND 68 H KULTUR

a)



b)

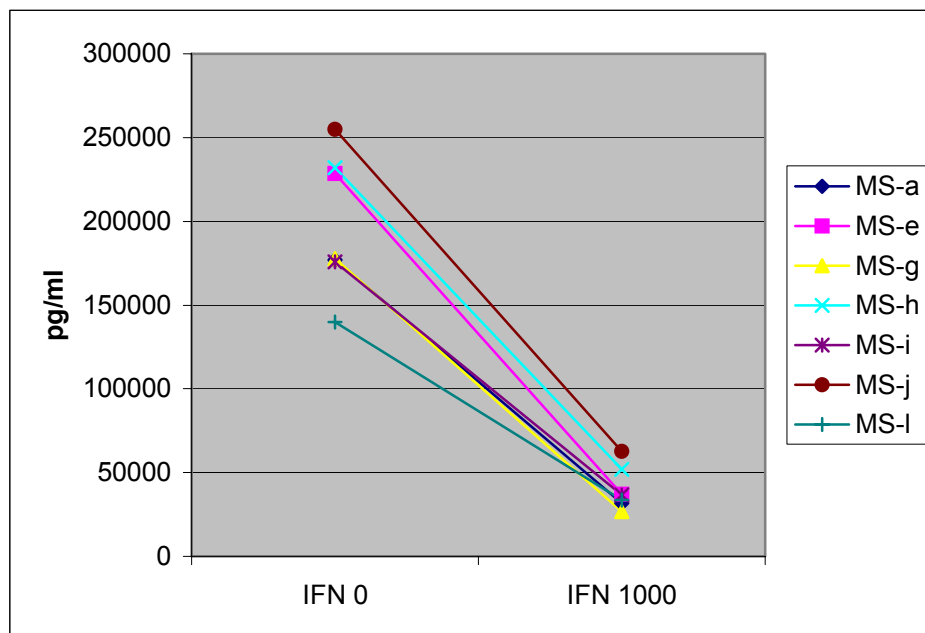


ABBILDUNG 23: IFN- β 1A-BEDINGTE *IN VITRO* MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL VON MS PATIENTEN WÄHREND S.C. IFN- β 1A-THERAPIE

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
 b) Chemokinkonzentration nach 68 h

5.4.10 Vergleich der MCP-1 Produktion durch PBL von MS Patienten vor und unter der Therapie mit IFN- β 1a

Hier wurden nur Kulturen ohne IFN- β 1a und Kulturen mit 1000 U IFN- β 1a/ml vor und unter der Therapie miteinander verglichen.

5.4.10.1 Vergleich der spontanen MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL von MS Patienten vor und während der s.c. Therapie

Bei der Gegenüberstellung von IFN- β 1a freien 16 h Kulturen unstimulierter PBL der MS Patienten vor ($\bar{x} = 6774$ pg/ml; ± 2709) und unter der Therapie war ein tendenzieller Anstieg der Chemokinkonzentration unter der Therapie zu sehen ($\bar{x} = 13465$ pg/ml; ± 9750). Nach statistischen Regeln war dieser Anstieg insgesamt aber nicht signifikant. Sechs Patienten zeigten eine erhöhte Konzentration unter der Therapie, wohingegen ein Patient eine Abnahme zeigte.

Nach 68 stündiger Inkubation wurden insgesamt keine statistisch signifikanten Veränderungen während der Therapie im Vergleich mit der *in vitro* Produktion vor Therapie beobachtet. Auch hier verhielten sich die einzelnen MS Patienten uneinheitlich. Bei vier Patienten sanken unter der Therapie die MCP-1 Konzentrationen und bei drei Patienten stiegen sie an. Der Mittelwert betrug bei der IFN- β 1a freien Kultur un behandelter Patienten 113607 pg/ml (\pm 31613) und stieg unwesentlich unter Therapie auf 117626 pg/ml (\pm 42259).

Beim Vergleich der MCP-1 Konzentrationen PHA-stimulierter PBL-Kulturen von sieben Patienten vor und unter IFN- β 1a Therapie wurde eine Zunahme der Konzentration des MCP-1 nach 16 h Kultur in den Überständen der IFN- β 1a freien Kultur der Patienten unter der Therapie gemessen. Der Mittelwert stieg statistisch nicht signifikant von 16476 pg/ml (\pm 9749) vor der Therapie auf 27099 pg/ml (\pm 14656). Auch hier verhielt sich die Patientengruppe uneinheitlich. Bei vier Patienten wurde die Konzentration gesteigert und bei drei Patienten gesenkt.

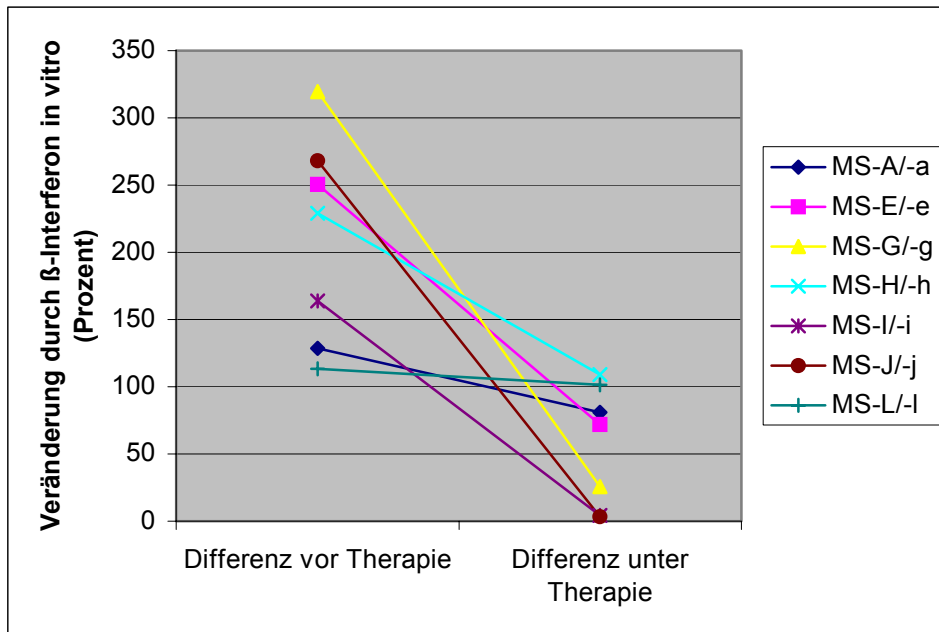
Auch bei 68 stündiger Kultur konnte bei absolut fast unveränderten Mittelwerten keine statistisch signifikante Änderung unter der Therapie mit IFN- β 1a (\bar{x} = 197975 pg/ml; \pm 40953) festgestellt werden. Der Mittelwert der MCP-1 Konzentration lag vor der Therapie bei 207007 pg/ml (\pm 77354).

5.4.10.2 Vergleich des *in vitro* Ansprechens der MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf 1000 U IFN- β 1a/ml bei MS Patienten vor und während der s.c. Therapie

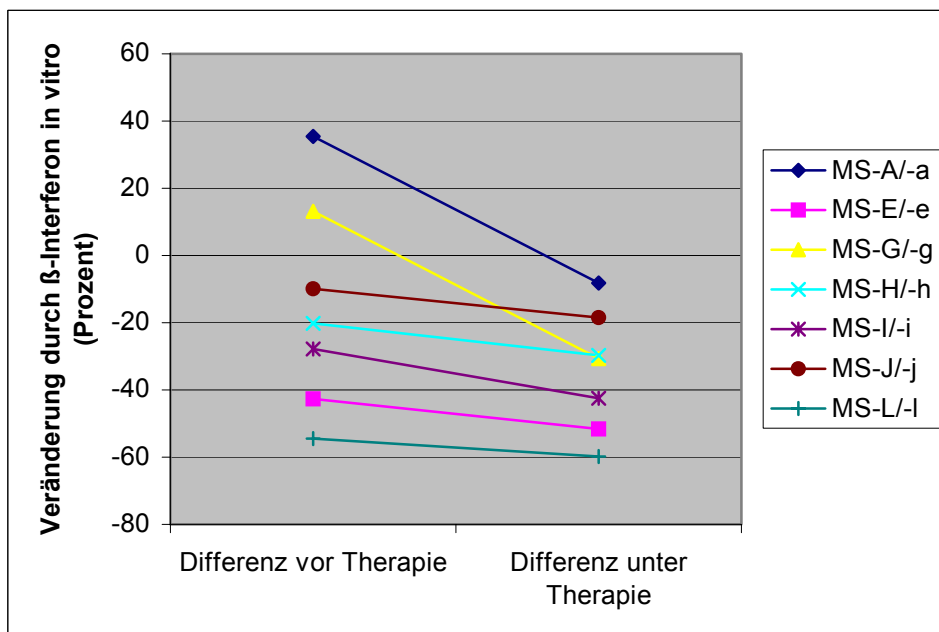
Im Hinblick auf die Stimulation durch IFN- β 1a kommt es sehr wohl zu statistisch signifikanten Unterschieden:

Bei den Patienten ohne Therapie stieg durch 1000 U IFN- β 1a/ml in 16 h Kultur unstimulierter PBL die MCP-1 Konzentration durchschnittlich um 210 % (\pm 76,9) (Abb. 24). Unter der *in vivo* Therapie erhöhte sie sich durch *in vitro* IFN- β 1a nur um 56,6 % (\pm 45). Der Unterschied im Ansprechen war nach statistischen Regeln signifikant ($p < 0,01$). Nach 68 h Kultur konnte die MCP-1 Konzentration bei behandelten Patienten durch 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* stärker supprimiert werden als vor der Therapie. Bei den un behandelten Patienten nahm die Konzentration um 15,2 % (\pm 31,3) ab und bei den behandelten um 34,4 % (\pm 18,2). Auch hier war der Unterschied zwischen den *in vitro*-Effekten von IFN- β 1a statistisch signifikant ($p < 0,05$).

a)



b)



ABBILDUN 24: MODULATION DER MCP-1 *IN VITRO* PRODUKTION UNSTIMULIERTER PBL DURCH 1000 U IFN- β 1A/ML BEI MS PATIENTEN VOR UND WÄHREND DER *IN VIVO* THERAPIE MIT IFN- β 1A S.C.

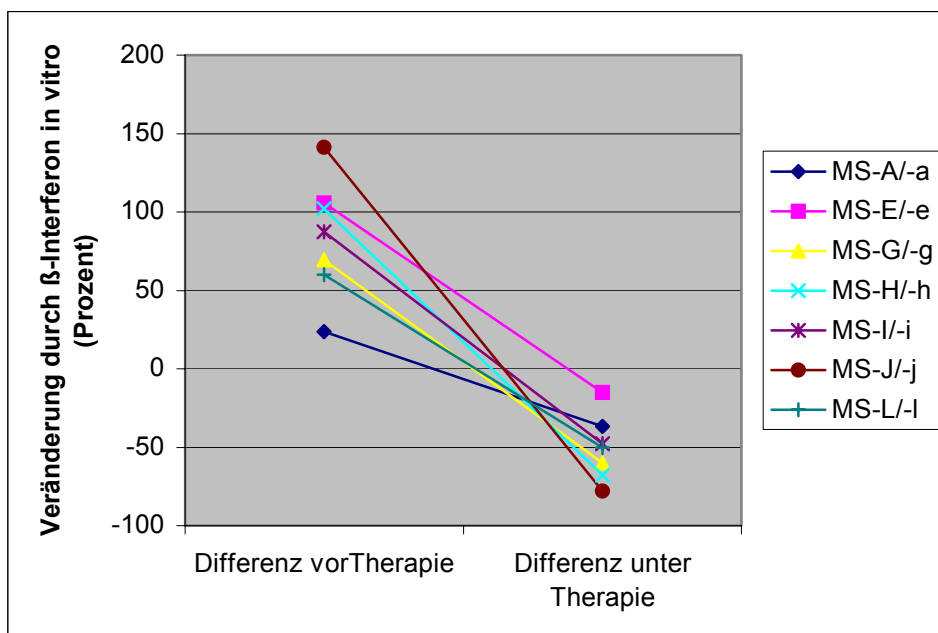
Angegeben ist die prozentuale Veränderung der MCP-1 Konzentrationen durch 1000 U IFN- β 1a/ml jeweils zur interferonfreien Kultur.

a) nach 16 h Kultur

b) nach 68 h Kultur

Beim Vergleich der *in vitro* Effekte von 1000 U IFN- β 1a/ml auf die MCP-1 Produktion von PHA-stimulierten PBL der MS Patienten vor und unter Therapie mit s.c. IFN- β 1a (Abb. 25) nahm die Chemokinkonzentration bei den Patienten ohne Therapie nach 16 h Inkubation mit 1000 U IFN- β 1a/ml um durchschnittlich 84,2 % (\pm 37,7) zu. Unter der Therapie wurde die Konzentration durch IFN- β 1a jedoch supprimiert und zwar um 50,8 % (\pm 20,7). Diese Veränderung war nach statistischen Regeln signifikant ($p < 0,001$). Nach 68 h Inkubation mit 1000 U IFN- β 1a/ml wurde die Konzentration des MCP-1 sowohl bei den unbehandelten als auch bei den behandelten Patienten gesenkt. Unter der Therapie geschah dies statistisch signifikant stärker ($p < 0,05$). Im Mittel verminderte sich die Chemokinkonzentration bei den Patienten ohne Therapie um 66 % (\pm 14,5) und bei den behandelten um 79,8 % (\pm 3,8).

a)



b)

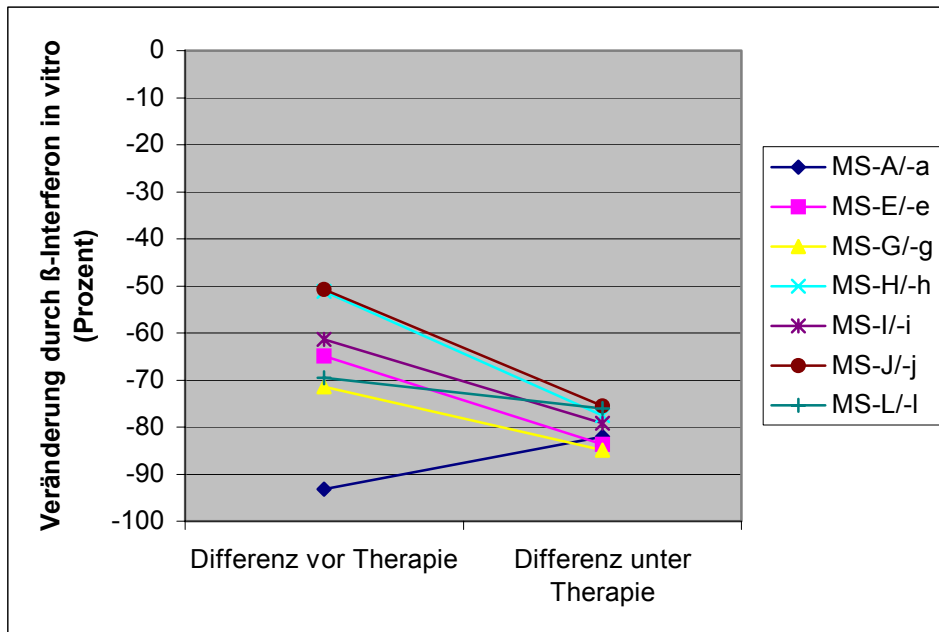


ABBILDUNG 25: MODULATION DER MCP-1 *IN VITRO* PRODUKTION PHA-STIMULIERTER PBL DURCH 1000 U IFN- β 1A/ML BEI MS PATIENTEN VOR UND WÄHREND DER THERAPIE MIT IFN- β 1A S.C.

Angegeben ist die prozentuale Veränderung der MCP-1 Konzentrationen durch 1000 U IFN- β 1a/ml jeweils zur interferonfreien Kultur.

- a) nach 16 h Kultivierung
- b) nach 68 h Kultivierung

5.4.11 Vergleich der MCP-1 Produktion durch PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten

5.4.11.1 Vergleich der spontanen MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL von gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten

Weder nach 16 noch nach 68 h Kultur unstimulierter PBL konnten in den IFN- β 1a freien Kulturen von Gesunden und unbehandelten MS Patienten statistisch signifikant andere MCP-1 Konzentration festgestellt werden. Der Mittelwert der Konzentrationen lag bei den Probanden nach 16 h bei 16275 pg/ml (\pm 15727) und bei den Patienten bei 8055 pg/ml (\pm 4523). Nach 68 h lag er bei den Probanden bei 115920 pg/ml (\pm 60370) und bei den MS Patienten bei 128534 pg/ml (\pm 56339).

In den Überständen der PHA-stimulierten PBL, die nicht mit IFN- β 1a inkubiert wurden, zeigte sich bei den gesunden Probanden nach 16 h eine statistisch schwach signifikant höhere

MCP-1 Konzentration als bei den unbehandelten MS Patienten ($p < 0,05$). Sie betrug bei den Probanden im Mittel 45596 pg/ml (± 35667) und bei den Patienten 20258 pg/ml (± 14222). Die gleiche Tendenz war nach 68 h Kultur zu sehen, jedoch ergab sich keine statistische Signifikanz. Die Chemokinkonzentration lag bei den Probanden bei 334931 pg/ml (± 119004) und bei den Patienten bei 272189 pg/ml (± 181706).

5.4.11.2 Vergleich des *in vitro* Ansprechens der MCP-1 Produktion unstimulierter und PHA-stimulierter PBL auf 1000 U IFN- β 1a/ml bei gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten

Durch 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* konnte nach 16 stündiger Inkubation unstimulierter PBL die MCP-1 Konzentration bei den MS Patienten insignifikant schwächer stimuliert werden wie bei den Probanden. Bei den Probanden stieg die Konzentration durchschnittlich um 330 % (± 219) und bei den Patienten nur um 234 % (± 139). Nach 68 h Kultur wurde die Chemokinkonzentration durch den *in vitro* Einfluss von IFN- β 1a bei den Probanden im Mittel um 114 % (± 105) gesteigert, wohingegen sie bei dem Patientenkollektiv um durchschnittlich 2,7 % ($\pm 59,4$) gesenkt wurde. Hier war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Gegensatz zur 16 stündigen Kultur statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Die MCP-1 Konzentration PHA-stimulierter PBL stieg bei den Probanden durch 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* durchschnittlich um 78,2 % (± 119) und bei den MS Patienten um 72,1 % ($\pm 41,9$). Damit ergab sich zwischen den beiden Gruppen kein statistisch signifikant unterschiedliches Ansprechen auf *in vitro* IFN- β 1a. Nach 68 h Inkubation wurde die Chemokinkonzentration durch *in vitro* IFN- β 1a jeweils eher supprimiert, bei den Probanden um 35,7 % ($\pm 40,9$) und bei den Patienten um 53,8 % (± 18). Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kollektiven.

5.4.12 MCP-1 Produktion durch PBL in den Überständen isoliert kultivierter Monozyten von gesunden Probanden

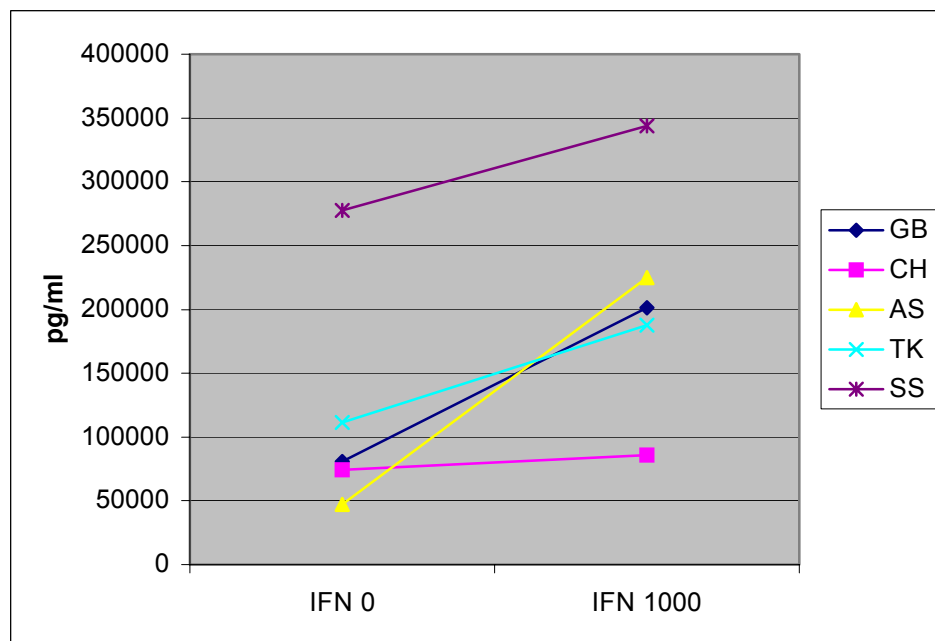
Wie schon für das Chemokin IP-10 beschrieben, wurden neben den PBL von gesunden Probanden auch isoliert kultivierte Monozyten von fünf Probanden untersucht.

5.4.12.1 Unstimulierte Monozyten

Bei der 16 h Kultur unstimulierter Monozyten (Abb. 26) wurde die MCP-1 Produktion der IFN- β 1a freien Kultur ($\bar{x} = 118277$ pg/ml; ± 91996) durch 1000 U IFN- β 1a/ml statistisch signifikant auf 177 % erhöht ($\bar{x} = 208723$ pg/ml; ± 92397). Der p-Wert war kleiner 0,05.

Eine statistisch signifikante Veränderung zeigte sich nach 42 h Kultur nicht. Aber auch hier wurde in den Überständen der Kultur, die mit 1000 U IFN- β 1a/ml inkubiert wurden ($\bar{x} = 438327$ pg/ml; ± 335037), eine höhere MCP-1 Konzentration gemessen als in den Überständen der IFN- β 1a freien Kultur ($\bar{x} = 220966$ pg/ml; ± 220778).

a)



b)

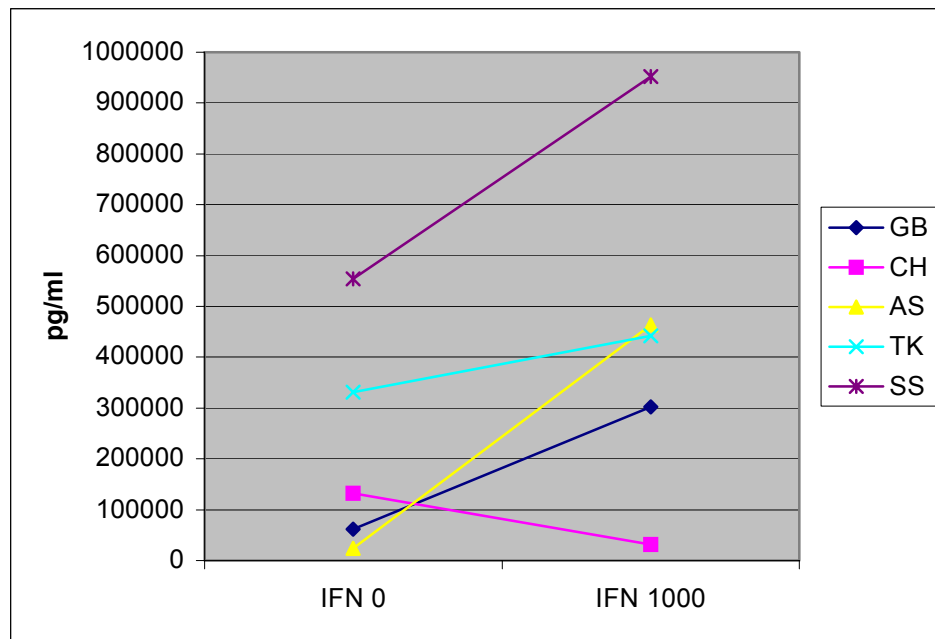


ABBILDUNG 26: MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION UNSTIMULIERTER ISOLIERTER MONOZYTEN VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH 1000 U IFN- β 1A/ML *IN VITRO*

Frisch isolierte Monozyten von fünf Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 42 h unstimuliert und teils nach Hinzugabe von IFN- β 1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des MCP-1 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

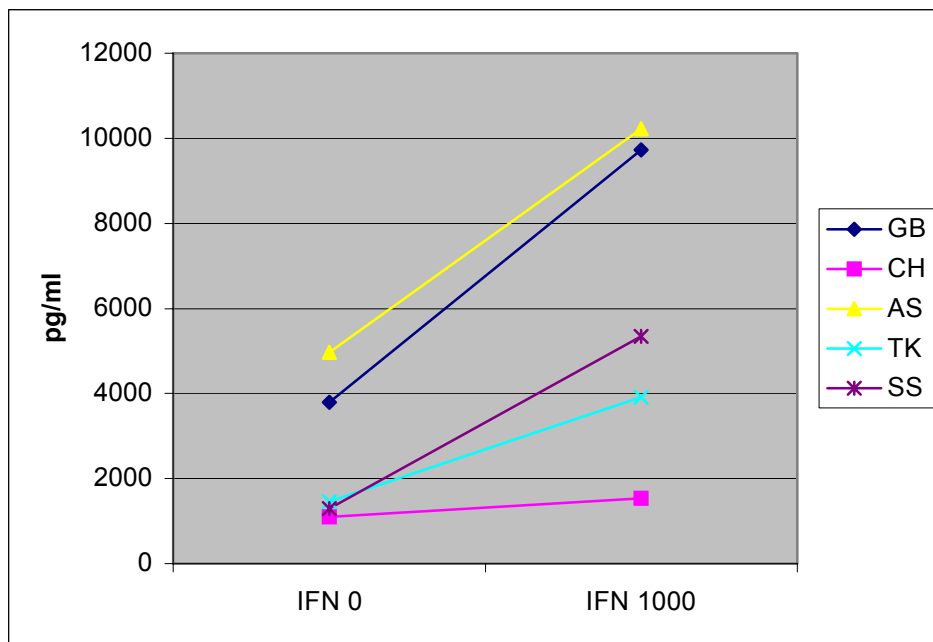
- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
- b) Chemokinkonzentration nach 42 h

5.4.12.2 LPS-stimulierte Monozyten

Bei den LPS-stimulierten Monozyten (Abb. 27) wurde nach 16 h Kultur eine Erhöhung der MCP-1 Produktion durch 1000 U IFN- β 1a/ml um 144 % (\bar{x} = 6152 pg/ml; \pm 3754) bezogen auf die IFN- β 1a freie Kultur (\bar{x} = 2523 pg/ml; \pm 1747) beobachtet. Dieser Anstieg war nach statistischen Kriterien signifikant ($p < 0,05$).

Wie schon bei den unstimulierten Monozyten zu sehen war, ergab sich bei den LPS-stimulierten Monozyten nach 42 h Kultur auch keine statistisch signifikante Veränderung durch 1000 U IFN- β 1a/ml. Die Chemokinkonzentration war eher gleichbleibend. Sie betrug bei der IFN- β 1a freien Kultur durchschnittlich 25042 pg/ml (\pm 17199) und bei der Kultur mit IFN- β 1a 26278 pg/ml (\pm 15285).

a)



b)

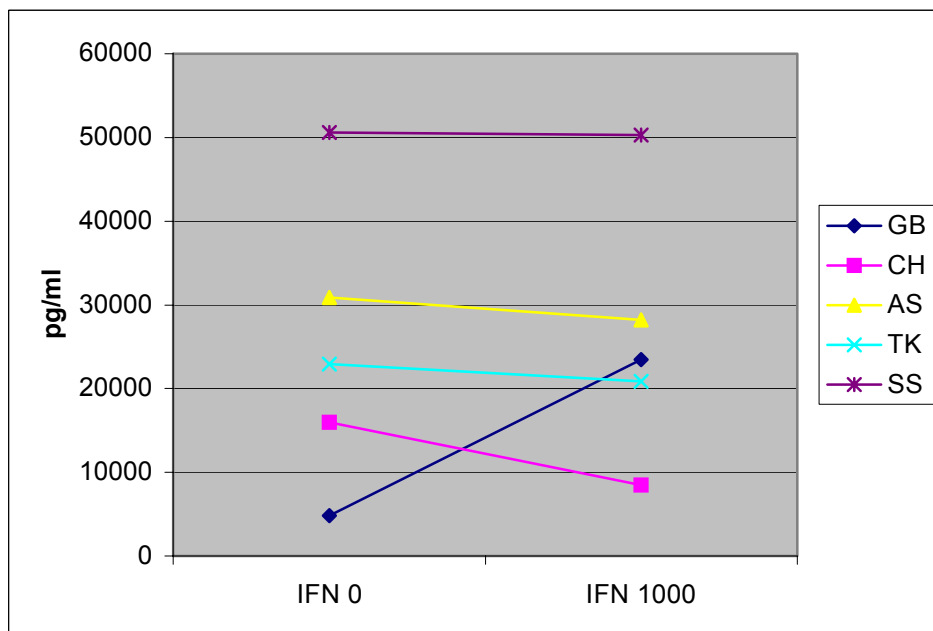


ABBILDUNG 27: MODULATION DER MCP-1 PRODUKTION LPS-STIMULIERTER ISOLIERTER MONOZYTEN VON GESUNDEN PROBANDEN DURCH 1000 U IFN-β1A/ML *IN VITRO*

Frisch isolierte Monozyten von fünf Probanden wurden mit einer Zelldichte von 1 Mio/ml pro well für 16 oder 42 h mit LPS (0,1 µg/ml) stimuliert und nach Hinzugabe von IFN-β1a (U/ml) kultiviert. In den Überständen wurde die Konzentration des MCP-1 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikatbestimmungen.

- a) Chemokinkonzentration nach 16 h
b) Chemokinkonzentration nach 42 h

6 DISKUSSION

Bezüglich der **Proliferation** von PBL haben die Untersuchungen gezeigt, dass die Proliferation unstimulierter Kulturen mononukleärer Blutzellen durch *in vitro* IFN- β 1a nicht verändert wurde. IFN- β 1a wies jedoch einen antiproliferativen Effekt auf PHA-stimulierte PBL auf, der nach 40 h Kultur statistisch signifikant war. Bei den gesunden Probanden und den unbehandelten MS Patienten veränderte sich die Proliferation im gleichen Maße. Die Inhibition nahm mit steigender *in vitro* Konzentration des IFN- β 1a bis zu 1000 U/ml zu. Diese antiproliferative Eigenschaft scheint aber an die Anwesenheit von *in vitro* IFN- β 1a gebunden zu sein, da die *ex vivo* Proliferation unter der *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a eher gleichbleibend war in Bezug auf die Proliferation der PBL derselben MS Patienten vor der Therapie. Diese Daten stimmen wie vorausszusehen mit früheren Studien überein, die dargestellt haben, dass Interferone vom Typ I die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen supprimierten (RUDICK et al., 1993; JIANG et al., 1995; LU et al., 1995).

Wie bereits im Ergebnisteil der **FACS**-Analysen erwähnt, wurde die Expression von CXCR3 und CCR2 auf PHA-stimulierten Zellen nicht näher analysiert, da die Durchmischung von aktivierten Lymphoblasten und Monozyten dazu geführt haben mag, dass die Rezeptoren in der Gesamtpopulation durch IFN- β 1a nicht als moduliert messbar waren. Bei den unstimulierten Kulturen konnten die Lymphozytenpopulation, welche überwiegend aus T-Zellen bestand, und die vorherrschend Monozyten beinhaltende Zellpopulation einzeln gated und betrachtet werden.

Bei der Betrachtung von **CXCR3** sind die im „Lymphozyten-Gate“ liegenden Zellen in zwei Subpopulationen differenzierbar, eine mit niedriger CXCR3 Expression und eine mit hoher Expression. Die CXCR3 hochexprimierenden Zellen sind gemäß der Arbeit nach CALLAHAN et al. Memory-T-Zellen, die sich in einem *in vitro* Modell durch ihre Kapazität auszeichnen, durch eine „Blut-Hirn-Schranke“ wandern zu können, (CALLAHAN et al., 2004). Dies kann heißen, dass CXCR3 in der Immunpathogenese der MS eine relevante Rolle unter den Chemokinrezeptoren spielt.

Die Expression von CXCR3 auf den Zellen im „Lymphozyten-Gate“ (Subpopulation M 2 mit hoher Expressionsdichte) wurde durch die *in vitro* Gabe von IFN- β 1a bei Probanden und MS Patienten konzentrationsabhängig supprimiert. Um den höchsten Effekt in gleicher Weise

sowohl nach 16 als auch nach 68 h zu erzielen, waren 1000 U IFN- β 1a/ml nötig. Hier ist zu überlegen, ob IFN- β 1a die Suppression direkt bedingt. Es ist bekannt, wie in der Einleitung beschrieben, dass Interferon vom Typ I inhibitorische Effekte hat: Zum Beispiel hemmt es die durch IFN- γ induzierte Expression von MHC II Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (JIANG et al., 1995; LU et al., 1995). Andererseits könnte die verminderte CXCR3 Expression durch die erhöhte Chemokinkonzentration des IP-10, einem Hauptliganden von CXCR3, zustande kommen: Wenn die PBL sich in einem Milieu befinden, das stark angereichert ist mit IP-10, könnten die Zellen die CXCR3 Expression herunterregulieren, da sie nicht mehr so sensitiv sein müssen, um auf die chemotaktischen Reize des IP-10 zu reagieren.

Hingegen zeigte sich auf den mehrheitlich CD64 positiven Zellen des „Monozyten-Gates“ (im wesentlichen Monozyten) eine extrem niedrige teils fehlende Expression von CXCR3. Ein hierzu kongruentes Ergebnis ist, dass die Expression von CXCR3 auf vorher isolierten Monozyten ebenfalls nur insignifikant durch die *in vitro* Gabe von IFN- β 1a erniedrigt wurde. Wie die Literatur beschreibt ist CXCR3 vorrangig auf T-Lymphozyten zu finden und nur in geringem Maße auf Monozyten (ADAMS,LLOYD, 1997; SOERENSEN et al., 2002). Dies könnte erklären, warum hier keine weitere Suppression, wie auf den Zellen im „Lymphozyten-Gate“, mehr möglich war. Eine alternative Erklärung wäre eine unterschiedliche Sensitivität von Monozyten und T-Zellen für IFN- β 1a. Relevant ist, dass keine Induktion der CXCR3 Expression auf den mehrheitlich monozytären Zellen durch IFN- β 1a *in vitro* stattgefunden hat, wie dies bei den behandelten Patienten während *in vivo* Therapie mit IFN- β 1a im Vergleich zu den unbehandelten Patienten zu beobachten war.

Überraschend war, dass beim Vergleich der frisch isolierten Blutzellen von MS Patienten vor und unter der Therapie die CXCR3 Expression durch die *in vivo* Gabe von IFN- β 1a auf mehrheitlich monozytären Zellen signifikant um ca. 50 % erhöht war und auf den Zellen im „Lymphozyten-Gate“ der M 2-Population unwesentlich um ca. 10 % gestiegen ist, während die Rezeptorexpression durch IFN- β 1a *in vitro* gesenkt wurde. Hier könnten zwei Einflussfaktoren diskutiert werden. Zum einen könnte die Einflussdauer von IFN- β 1a von Bedeutung sein und initial eine Herunterregulation bewirken, während bei chronischer Exposition die Dichte des Rezeptors wieder zunimmt. Alternativ sind indirekte Effekte durch IFN- β 1a zu diskutieren, welche durch die IFN- β 1a-induzierte Modulation anderer Mediatoren vermittelt werden, die nur *in vivo* oder nur *in vitro* (wie die diskutierte eventuelle Chemokin-induzierte Rezeptorsuppression *in vitro*) zum Tragen kommen. KIVISÄKK et al. beobachteten, dass die CXCR3 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von MS Patienten vor und unter Interferon-

β Therapie keine Abweichung zeigte (KIVISÄKK et al., 2003). Studienergebnisse von SOERENSEN und SELLEBJERG weichen von den letztgenannten ab: Sie beschrieben, dass die CXCR3 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unter der dreimonatigen s.c. Rebif[®] Therapie signifikant abgenommen hat (SOERENSEN,SELLEBJERG, 2002), während auf CD14-positiven Zellen (Monozyten) keine Modulation erfolgte. Zu den Ergebnissen ist jeweils anzumerken, dass beide Gruppen den Prozentsatz exprimierender Zellen und somit die Populationszusammensetzung untersuchten, während in unseren Experimenten die Intensität der positiven Zellen, also die Modulation der Expressionsdichte gemessen wurde. Aufgrund dieser unterschiedlichen Auswerteverfahren sind unsere und die beiden genannten Arbeiten nicht direkt miteinander vergleichbar. Die Resultate von SOERENSEN und SELLEBJERG bzgl. der T-Zellen sind möglicherweise auf eine zahlenmäßige Abnahme der Lymphozytenpopulation M 2 zugunsten von M 1 (Populationsshift) zurückzuführen, während dies bei unserer Arbeit ausgeschlossen ist. Bezüglich der vorliegenden Untersuchung ist einzuräumen, dass in unseren Experimenten keine immunologische Feinidentifikation der Zellen (T-Zellen, Monozyten) wie bei SOERENSEN und SELLEBJERG stattgefunden hat, sondern Populationen untersucht wurden, denen noch kleinere Anteile anderer Zellen (T-Zellen, B-Zellen) beigelegt waren.

Bei der Untersuchung von CCR2 wurden nur die 16 h Werte in Betracht gezogen. CCR2 wurde während der *in vitro* Inkubation durch IFN-β1a auf den Monozyten deutlich, auf Lymphozyten gering, aber signifikant herunterreguliert. Hier könnte der gleiche Feedback-Mechanismus wie oben beschrieben greifen, da auch MCP-1 (der wesentliche Ligand von CCR2) durch IFN-β1a anstieg. Im Gegensatz zum CXCR3 wurde die Expression von CCR2 auf mehrheitlich monozytären Zellen der PBL-Kultur stärker moduliert als auf den Zellen im „Lymphozyten-Gate“, die nur eine sehr niedrige Expression zeigten. Hierzu ist in der Literatur bekannt, dass CCR2 bevorzugt auf Monozyten exprimiert wird (IZIKSON et al., 2002) und so dort auch im größeren Maße abnehmen kann. Bei frisch isolierten Monozyten, die kultiviert wurden, wurde durch die *in vitro* Gabe von IFN-β1a ebenfalls eine Reduktion der Rezeptordichte induziert, welche in ihrem Ausmaß (um 40 %) biologisch relevant, wenn auch statistisch nicht signifikant war.

CCR2 erfuhr durch 1000 U IFN-β1a/ml *in vitro* die stärkste Regulation, die auch statistische Signifikanz zeigte. Bei beiden Kollektiven, Probanden und MS Patienten ohne Therapie, lag die Reduktion auf den mehrheitlich monozytären Zellen bei ca. 45-50 % und bei den Zellen im Lymphozyten-Gate betrug sie um 10 %. Im Falle von CCR2 sind die *in vitro* und *in vivo*

Effekte des Interferons anscheinend vergleichbar, da auch die MS Patienten unter der Therapie auf den mehrheitlich monozytären Zellen eine um ca. 55 % niedrigere und auf der Lymphozytenpopulation, welche überwiegend aus T-Zellen bestand, eine um 10 % geringere Expression von CCR2 aufwiesen als vor der Therapie. In Experimenten anderer Untersucher wurde beobachtet, dass die *in vivo* Gabe von IFN- β 1a in gleicher Dosis wie in dieser Arbeit die CCR2 Dichte auf Monozyten nach ein und drei Monaten senkte, jedoch jeweils nicht statistisch signifikant (SOERENSEN, SELLEBJERG, 2002). Die gleiche Studie zeigte auf den T-Zellen ein leichtes nicht signifikantes Ansteigen von CCR2, was im Einklang mit den Resultaten dieser Arbeit für eine nur sehr geringe *in vivo* Modulation von CCR2 auf T-Zellen spricht.

Die Untersuchungen des Chemokins **IP-10** im **ELISA** zeigten sowohl bei den Probanden als auch bei den MS Patienten ohne Therapie und unter Therapie mit IFN- β 1a bei ansteigender Konzentration des IFN- β 1a *in vitro* bis zu 1000 U/ml in der PBL-Kultur eine sehr stark und signifikant erhöhte Produktion des IP-10. Diese *in vitro* Experimente werden durch die *in vivo* Untersuchungen von BUTTMANN et al. bestätigt. Sie zeigten bei MS Patienten ein Ansteigen sowohl der IP-10 als auch der MCP-1 Konzentration sechs Stunden nach Gabe von IFN- β 1a (BUTTMANN et al., 2004). Jeweils wäre eine direkte Wirkung des IFN- β 1a auf die Chemokinproduktion denkbar, da bereits bekannt ist, dass Typ I Interferone nicht nur supprimierende sondern auch aktivierende Wirkungen haben können. Zu den aktivierenden Effekten gehört zum Beispiel, dass durch die Therapie mit IFN- β 1b bei MS Patienten eine höhere Konzentration an löslichem VCAM-1 als vor der Therapie bewirkt wurde (CALABRESI et al., 1997). Zudem stimulierte IFN- β 1a in der Therapie von MS Patienten die Produktion von IL-10 und IL-4 (RUDICK et al., 1996, 1998). Die vermehrte Produktion des IP-10 ist nicht auf eine erhöhte Zellproliferation zurückzuführen, da diese Arbeit zeigte, dass die Proliferation durch die *in vitro* Gabe von IFN- β 1a bei unstimulierten Zellen von Probanden und MS Patienten im wesentlichen gleichblieb und bei den PHA-stimulierten PBL supprimiert wurde.

Auch in den Überständen vorher isolierter Monozyten von gesunden Probanden wurde unter dem *in vitro* Einfluß von 1000 U IFN- β 1a/ml eine starke Steigerung des IP-10 festgestellt, die nach statistischen Kriterien signifikant war. Hieraus kann gefolgert werden, dass auch die Monozyten innerhalb der PBL-Kulturen zum Anstieg der IP-10 Konzentration in den IFN- β 1a Kulturen beitragen. Doch um dies genauer quantifizieren zu können, müssten auch isolierte T-Lymphozyten separat untersucht werden.

Die IP-10 Konzentration konnte bei den PHA-stimulierten PBL durch 1000 U IFN- β 1a/ml verhältnismäßig nicht so stark gesteigert werden wie bei den unstimulierten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass schon die interferonfreien Kulturen, die mit PHA stimuliert wurden, eine wesentlich höhere Chemokinkonzentration aufwiesen als die unstimulierten Kulturen. Diese schon durch PHA erfolgte Stimulation der IP-10 Produktion konnte durch IFN- β 1a nicht mehr in dem Maße gesteigert werden wie bei den unstimulierten Zellen.

Ähnliches fiel auch beim Vergleich der beiden Inkubationszeiträume von 16 und 68 h auf. Nach 68 h Kultur induzierte Interferon keine so starke Stimulation der IP-10 Produktion wie nach 16 h. Dies könnte wieder mit Feedback-Mechanismen erklärt werden, die erst während der längeren Inkubationsdauer von 68 h beeinflussend werden.

Außerdem wurde beobachtet, dass in den für 68 h PHA-stimulierten PBL-Kulturen sowohl der Probanden als auch der MS Patienten ohne Therapie durch eine Interferonkonzentration von 10 und 100 U/ml eine Reduktion der IP-10 Endkonzentration erfolgte. Hierzu ist bekannt, dass unterschiedliche Konzentrationen von IFN- β 1a in komplexen Untersuchungssystemen, in welchem direkte und indirekte IFN- β 1a Effekte in ihrem Nettoeffekt auf einen einzelnen Untersuchungsparameter konkurrieren, konträre Wirkungen haben können (BIRON, 2001).

Die spontane und IFN- β 1a-induzierte IP-10 Produktion *in vitro* wurde nicht wesentlich durch die *in vivo* Therapie verändert, wie die eher gleichbleibende IP-10 Produktion durch PBL nach 16 und 68 h Kultur bei MS Patienten vor im Vergleich zur *ex vivo* Untersuchung unter der Therapie zeigte. Hier könnte vermutet werden, dass das s.c. IFN- β 1a kurz anhaltende Effekte hat, die bereits 12 bis 18 Stunden nach der Injektion von IFN- β 1a nicht mehr zu erfassen sind, oder die wie bei der oben genannten Rezeptormodulation an die kontinuierliche Präsenz von IFN- β 1a gebunden sind. Kurz anhaltende IFN- β Effekte *in vivo* vermuteten auch BUTTMANN et al. Sie haben in ihren Experimenten gezeigt, dass bei den behandelten MS Patienten die IP-10 und MCP-1 Produktion sechs Stunden nach Injektion von IFN- β erhöht war, sie jedoch 24 Stunden nach Injektion wieder nahezu auf die Konzentration von vor der IFN- β 1a Injektion abgefallen war (BUTTMANN et al., 2004).

IFN- β 1a steigerte sowohl bei Probanden als auch bei MS Patienten ohne s.c. IFN- β 1a Therapie die **MCP-1** Produktion und zwar durch 1000 U/ml am stärksten. Wie bei der IFN- β 1a bedingten Induktion von IP-10 wurde MCP-1 nach 68 stündiger Kultur der PBL schwächer moduliert als nach 16 h, und die MCP-1 Modulation der PHA-stimulierten Zellen war niedriger als bei den unstimulierten PBL.

Die Steigerung der MCP-1 Produktion *in vitro* durch die Zugabe von IFN- β 1b zur PBL-Kultur wurde auch durch IARLORI et al. bei gesunden Probanden und MS Patienten mittels ELISA gezeigt (IARLORI et al., 2002). Ebenso bekräftigen *in vivo* Beobachtungen von BUTTMANN et al. über einen vorübergehenden MCP-1 Anstieg im Serum nach Injektion von IFN- β 1a unsere *in vitro* Ergebnisse (BUTTMANN et al., 2004).

Auch in Kulturen von vorher isolierten Monozyten von gesunden Probanden konnte die MCP-1 Produktion durch 1000 U IFN- β 1a/ml gesteigert werden. COMABELLA et al. beschrieben hingegen eine verringerte stimulationsinduzierte Produktion sowohl von MCP-1 als auch von IP-10 intrazellulär durch Monozyten in der PBL-Kultur (COMABELLA et al., 2002). Hier ist zu beachten, dass die PBL mit IFN- β 1a für 24 h vorinkubiert wurden und danach für fünf Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (T-Zellstimulation) stimuliert wurden, wodurch die Monozyten indirekt aktiviert wurden. Hierauf folgte eine FACS-Analyse, bei der die MCP-1 Produktion der Monozyten intrazellulär gemessen wurde. Demzufolge sind die Resultate von COMABELLA et al. nicht mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da sie mehr eine Veränderung der Monozytenreagibilität nach IFN- β -Exposition als einen akuten IFN-Effekt auf die MCP-1 Produktion untersuchten.

In dieser Arbeit wurden mit PHA-stimulierten PBL biphasische Effekte der Regulierung des MCP-1 durch IFN- β 1a beobachtet: Auffällig war, dass MCP-1 in den Überständen der PBL-Kultur, die für 68 h mit PHA inkubiert wurde, durch 1000 U IFN- β 1a/ml *in vitro* bei den Probanden und MS Patienten ohne Therapie um ca. 41-49 % statistisch signifikant gesenkt wurde. Dieses Umkippen der Regulation könnte damit zusammenhängen, dass die direkte Wirkung des Interferon Typ I durch einen Regelmechanismus im Sinne einer Feedback Hemmung durch das starke Ansteigen des MCP-1 zu Beginn der Kultivierung unterdrückt wird. Auch ist es wahrscheinlich, dass bei den länger inkubierten und PHA-stimulierten PBL suppressive, wie antiproliferative und IFN- γ antagonisierende Effekte des IFN- β relevant werden.

Der biphasische Effekt einer längerdauernden Einwirkung von IFN- β 1a auf die PBL spiegelte sich auch in den *ex vivo* Ergebnissen bei den MS Patienten unter s.c. IFN- β 1a Therapie wieder. Hier nahm die MCP-1 Konzentration bei der unstimulierten 68 stündigen Kultur und bei der PHA-stimulierten Kultur (16 und 68 h) durch die *in vitro* Gabe von 1000 U IFN- β 1a/ml noch deutlicher ab als bei den Kulturen derselben Patienten vor der *in vivo* Therapie. Hier könnte das *in vivo* IFN- β 1a einen additiven Effekt zu dem *in vitro* Interferon ausüben, da bei

den PHA-stimulierten Zellen der *in vivo* behandelten Patienten bereits nach 16 h ein Sinken des MCP-1 im gleichen Rahmen wie bei den MS Patienten ohne Therapie nach 68 stündiger Inkubation der nur *in vitro* IFN- β 1a exponierten Zellen zu beobachten war.

Beim Vergleich der Probanden und unbehandelten MS Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Basalexpression bzw. -konzentration aller untersuchten Parameter (CXCR3, CCR2, IP-10 und MCP-1) festgestellt werden. Dies zeigt, dass bei den MS Patienten keine grobe Immundeviation vorliegt, zumindest keine, die mit unseren Meßmethoden zu identifizieren war. Ebenso sprachen die beiden Kollektive nicht verschieden auf die *in vitro* Gabe von 1000 U IFN- β 1a/ml an. Die Ergebnisse der Probanden wären also auf unbehandelte MS Patienten übertragbar. Hieraus kann gefolgert werden, dass für die Zukunft Versuche an Probanden ausreichen würden. Zu den Untersuchungen von CXCR3 gibt es in der Literatur gegenläufige Ergebnisse. Die Studie von SINDERN et al. zeigte, dass MS Patienten, die ihren letzten Schub innerhalb der letzten drei Monate erlitten haben, eine niedrigere CXCR3 Expression auf T-Zellen im peripheren Blut aufwiesen als gesunde Kontrollpersonen. Der Hauptligand IP-10 wies wie in unseren Experimenten keine Unterschiede auf (SINDERN et al., 2002). BALASHOV et al. beobachteten hingegen bei den MS Patienten eine höhere Produktion von CXCR3 als bei Gesunden (Balashov et al., 1999). Diese Diskrepanzen könnten dadurch begründet werden, dass z.B. bei BALASHOV et al. nicht klar hervorgeht, ob sich die MS Patienten in einem akuten Krankheitsstadium befanden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN- β 1a besonders *in vitro* einen starken Einfluß auf die CXCR3 und CCR2 Expression und auf die IP-10 und MCP-1 Produktion hat.

Es ist nachgewiesen, dass IFN- β den Krankheitsverlauf bei schubförmiger MS durch Reduktion der Schubfrequenz und Verlangsamung der Behinderungsprogredienz verbessert. Die pleiotropen Wirkmechanismen der β -Interferone sind noch gar nicht alle bekannt. Die dargestellten Untersuchungen zeigen insbesondere im Hinblick auf IP-10 neuartige Effekte, die als Immunmechanismen zum klinischen Benefit der IFN- β 1a Therapie beitragen könnten.

Dadurch, dass IFN- β 1a *in vitro* die MCP-1 Produktion gesteigert hat, könnte die Immunantwort vom Th2-Zelltyp dominierend sein und so die Th1-mediierte entzündliche Autoimmunerkrankung inhibieren. Dieser Th2-Shift erfolgt indirekt und zwar über die Induktion von IL-4 und Suppression von IL-12 durch MCP-1 (LUKACS et al., 1997; KARPUS et al., 1997). LUKACS et al. beschrieben aber auch in ihrem Artikel, dass MCP-1 die Induktion von IFN- γ

bewirken könne. Hier bleibt die Frage offen, welche Wirkung als Netto-Effekt im individuellen System in den Vordergrund rückt und die Immunreaktion bestimmt.

IFN- β 1a könnte durch starke Induktion von IP-10 in der Peripherie besonders im lymphatischen Gewebe einen Konzentrationsgradienten aufbauen, der bewirkt, dass CXCR3 tragende Zellen nicht in das ZNS wandern und dort die Entzündung fördern, sondern z.B. im Lymphknoten zurückgehalten werden. Diese Annahme würde durch die Studien von NARUMI et al. untermauert. Sie fanden heraus, dass neutralisierende Antikörper gegen IP-10 die ZNS-Invasion durch Immunzellen steigerten und dass gleichzeitig verkleinerte Lymphknoten und eine verminderte Produktion von IFN- γ im lymphatischen Gewebe vorlagen (NARUMI et al., 2002). Die letztlich resultierende *in vivo* Wirkung von IP-10 scheint jedoch komplex und ist sicherlich abhängig von der Phase, in welcher IP-10 der Immunreaktion zugegeben oder entzogen wird, da andere Artikel gezeigt haben, dass anti-IP-10-Antikörper die EAE supprimieren konnten (LIU et al., 2001; FIFE et al., 2001). Auch dürfte der Ort der Chemokininduktion von entscheidender Bedeutung sein.

Durch Herunterregulierung des CXCR3 Rezeptors auf Lymphozyten mit hoher Expressionsdichte und des CCR2 Rezeptors auf Monozyten durch die *in vitro* Gabe von IFN- β 1a dürften die Zellen nicht mehr so empfindlich für chemotaktische Reize sein, und die Migration der Leukozyten in das ZNS könnte vermindert werden. Auch hierdurch würde die Entzündung im ZNS abgeschwächt.

Die starken funktionellen Effekte der Chemokine IP-10 und MCP-1 sowie ihrer Rezeptoren in den Tiermodellen der MS und die erhebliche Modulation, welche diese Chemokine durch IFN- β 1a *in vitro* erfahren, lassen annehmen, dass die in dieser Arbeit gezeigten Immuneffekte von IFN- β 1a einen relevanten Beitrag zum klinisch günstigen Effekt dieser Therapie bei der Behandlung der MS leisten. Aufgrund der Vielzahl teils gegenläufiger Wirkungen der β -Interferone auf das Immunsystem lässt sich der resultierende Netto-Effekt der aufgezeigten Mechanismen *in vivo* jedoch schwer abschätzen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams DH, Lloyd AR (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349: 490-95
2. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N, Deshpande S, Howard M, Mocci S (2000) Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 177: 43-51
3. Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250: 91-104
4. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW (1999) CCR5(+) and CXCR3(+) T-cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6873-6878
5. Biron CA (2001) Interferons α and β as immune regulators- A new look. *Immunity* 14: 661-664
6. Buttman M, Merzyn C, Rieckmann P (2004) Interferon- β induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 156: 195-203
7. Calabresi PA, Tranquill LR, Dambrosia JM, Stone LA, Maloni H, Bash CN, Frank JA, McFarland HF (1997) Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with IFN- β 1b. *Ann Neurol* 41: 669-674
8. Callahan MK, Williams KA, Kivisäkk P, Pearce D, Stins MF, Ransohoff RM (2004) CXCR3 marks CD4⁺ memory T lymphocytes that are competent to migrate across a human brain microvascular endothelial cell layer. *J Neuroimmunol* 153: 150-157
9. Comabella M, Imitola J, Weiner HL, Khoury SJ (2002) Interferon- β treatment alters peripheral blood monocyte chemokine production in MS patients. *J Neuroimmunol* 126: 205-212
10. Compston A (1998) Genetic susceptibility to multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers GC, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle (eds) *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone, London, pp 101-144
11. Ebers G (1998) Natural history of multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers GC, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle (eds) *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone, London, pp 191-222
12. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, Karpus WJ (2001) CXCL10 (IFN- γ -Inducible Protein-10) control of encephalitogenic CD4⁺ T cell accumulation in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 166: 7617-7624
13. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V (2001) Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol* 115: 192-198

14. Fujinami RS, Oldstone MB (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230: 1043-5
15. Gaupp S, Pitt D, Kuziel WA, Cannella B, Raine CS (2003) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in CCR2^{-/-} Mice: Susceptibility in multiple strains. *Am J Pathol* 162: 139-150
16. Glabinski AR, Tani M, Strieter RM, Tuohy VK, Ransohoff RM (1997) Synchronous synthesis of a- and b-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol* 150: 617-630
17. Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM (2001) Absence of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T Helper Cell Type 1 immune response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* 193: 713-725
18. Iarlori C, Reale M, De Luca G, Di Iorio A, Feliciani C, Tulli A, Conti P, Gambi D, Lugasari A (2002) Interferon β -1b modulates MCP-1 expression and production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 123: 170-179
19. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD (2000) Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in mice lacking the CC Chemokine Receptor (CCR) 2. *J Exp Med* 192: 1075-1080
20. Izikson L, Klein RS, Luster AD, Weiner HL (2002) Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clin Immunol* 103: 125-131
21. Jiang H, Milo R, Swoveland P, Johnson KP, Panitch H, Dhib-Jalbut S (1995) Interferon beta-1b reduces interferon γ -induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J Neuroimmunol* 61: 17-25
22. Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA (1997) Differential CC Chemokine-induced enhancement of T Helper cell cytokine production. *J Immunol* 158: 4129-4136
23. Karpus WJ, Kennedy KJ, Kunkel SL, Lukacs NW (1998) Monocyte Chemotactic Protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T Helper cell 1-related cytokines. *J Exp Med* 187: 733-741
24. Kivisakk P, Coteleur AC, Lee J-C, Rudick RA, Ransohoff RM (2003) Interferon- β 1a does not reduce expression of CCR5 and CXCR3 on circulating T cells. *J Neuroimmunol* 141: 150-154
25. Lassmann H (1998) Pathology of multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers GC, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle (eds) *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone, London, pp 323-358
26. Liu MT, Keirstead HS, Lane TE (2001) Neutralization of the Chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 167: 4091-4097

27. Lu HT, Riley JL, Babcock GT, Huston M, Stark GR, Boss JM, Ransohoff RM (1995) Interferon (IFN) β acts downstream of IFN- γ -induced class II transactivator messenger RNA accumulation to block major histocompatibility complex class II gene expression and requires the 48-kD DNA-binding protein, ISGF3- γ . *J Exp Med* 182: 1517-1525
28. Lukacs NW, Chensue SW, Karpus WJ, Lincoln P, Keefer C, Strieter RM, Kunkel SL (1997) C-C Chemokines differentially alter Interleukin-4 production from lymphocytes. *Am J Pathol* 150: 1861-1868
29. Luther SA, Cyster JG (2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2: 102-107
30. Mahad DJ, Lawry J, Howell SJ, Woodroffe MN (2003) Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult Scler* 9: 189-198
31. Mahad DJ, Ransohoff RM (2003) The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol* 15: 23-32
32. Matthews B (1998) Symptoms and signs of multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers GC, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle (eds) *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Churchill Livingstone, London, pp 145-190
33. McManus CM, Liu JSH, Hahn MT, Hua LL, Brosnan CF, Berman JW, Lee SC (2000) Differential induction of chemokines in human microglia by type I and II interferons. *Glia* 29: 273-280
34. Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19: 331-8
35. Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-46
36. Narumi S, Kaburaki T, Yoneyama H, Iwamura H, Kobayashi Y, Matsushima K (2002) Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 32: 1784-1791
37. Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA (2000) Interferon α/β -mediated inhibition and promotion of interferon γ : STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* 1: 70-6
38. Pober JS, Slowik MR, De Luca LG, Ritchie AJ (1993) Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 150: 5114-5123
39. Ransohoff RM (1999) Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines. *J Neuroimmunol* 98: 57-68

40. Röcken M, Racke M, Shevach EM (1996) IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today* 17: 225-31
41. Rudick RA, Carpenter CS, Cookfair DL, Tuohy VK, Ransohoff RM (1993) *In vitro* and *in vivo* inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology* 43: 2080-2087
42. Rudick RA, Ransohoff RM, 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
43. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM, Tuohy VK (1998) *In vivo* effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 50: 1294-1300
44. Shaw SY, Laursen RA, Lees MB (1986) Analogous amino acid sequences in myelin proteolipid and viral proteins. *FEBS Lett* 207: 266-70
45. Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN (2000) Expression of the interferon- γ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 133-142
46. Sinden E, Patzold T, Ossege LM, Gisevius A, Malin J-P (2002) Expression of chemokine receptor CXCR3 on cerebrospinal fluid T-cells is related to active MRI lesion appearance in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 131: 186-190
47. Soerensen TL, Ransohoff RM (1998) Etiology and Pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 18: 287-294
48. Soerensen TL, Sellebjerg F (2002) Selective suppression of chemokine receptor CXCR3 expression by interferon- β 1a in multiple sclerosis. *Mult Scler* 8: 104-107
49. Soerensen TL, Trebst C, Kivisaekk P, Klaege KL, Majmudar A, Ravid R, Lassmann H, Olsen DB, Strieter RM, Ransohoff RM, Sellebjerg F (2002) Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol* 127: 59-68
50. Stüve O, Dooley NP, Uhm JH, Antel JP, Francis GS, Williams G, Yong VW (1996) IFN- β 1b decreases the migration of T Lymphocytes *in vitro*: Effects on Matrix Metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 40: 853-863
51. Trebst C, Ransohoff RM (2001) Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 58: 1975-1980
52. Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S (2000) IFN- β 1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: Relevance to IFN- β 1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 165: 548-557
53. Weinstock-Guttman B, Ransohoff RM, Kinkel RP, Rudick RA (1995) The interferons: biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 37: 7-15

-
54. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994) Animal models. *Ann Neurol* 36 Suppl: S47-53
 55. Youssef S, Wildbaum G, Maor G, Lanir N, Gour-Lavie A, Gracie N, Karin N (1998) Long-lasting protective immunity to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis following vaccination with naked DNA encoding C-C Chemokines. *J Immunol* 161: 3870-3879
 56. Zamvil SS, Steinman L (1990) The T-lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8: 579-621
 57. Zang YC, Halder JB, Samanta AK, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2001) Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1alpha by interferon-beta. *J Neuroimmunol* 112: 174-180

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Jung S, Sabelhaus A, Korn T, Voss J, Schrepf W, Becker G (2005) Induktion der Chemokine IP-10 und MCP-1 in mononukleären Zellen durch Interferon-beta 1a und Modulation ihrer korrespondierenden Rezeptoren CXCR3 bzw. CCR2. *Aktuelle Neurologie* 32 (suppl. 4): 185

Poster:

Jung S, Sabelhaus A, Korn T, Voss J, Schrepf W, Becker G (2005) Induktion der Chemokine IP-10 und MCP-1 in mononukleären Zellen durch Interferon-beta 1a und Modulation ihrer korrespondierenden Rezeptoren CXCR3 bzw. CCR2. *78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Wiesbaden 21.-24.09.05*

9 DANKSAGUNG

An Herrn Prof. Dr. Georg Becker und seine Unterstützung erinnere ich mich in Dankbarkeit.

Herrn PD Dr. Stefan Jung danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in sein Team sowie die Betreuung und stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Silvia Seubert, die mich in die notwendigen Methoden einwies und dauerhaft unterstützte.

Darüber hinaus danke ich allen weiteren Mitarbeitern des neuroimmunologischen Labors, besonders Herrn Dr. Thomas Korn und Herrn Dr. Tim Magnus für ihre Hilfsbereitschaft und das positive Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und die mir immer mit Rat zur Seite standen.

10 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Anne Sabelhaus

geboren am 23.09.1978 in Haselünne
deutsch
römisch-katholisch
ledig

Eltern: Clemens Sabelhaus
Irmgard Sabelhaus

Geschwister: Christian, 29 Jahre
Stephan, 25 Jahre

SCHULAUSSBILDUNG

1985 – 1989	Grundschule Holthausen/Biene
1989 – 1991	Orientierungsstufe Marienschule, Lingen
1991 – 1998	Franziskusgymnasium, Lingen; Abitur

STUDIUM

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar
September 2000	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
Oktober 2000 - März 2001	Studium am University College Dublin
August 2001	Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
November 2001	Beginn der Dissertation in der Neurologischen Klinik der Universität des Saarlandes in Homburg
März 2004	Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
Mai 2005	Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung; Approbation
Ab August 2005	Assistenzärztin in der Pädiatrie im Städtischen Klinikum Karlsruhe

Karlsruhe, 10. Dezember 2005

