

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Marienkrankenhaus Hamburg - Neurologische Klinik
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Hamburg

Prof. Dr. med. Th. Weber

HLA-DR2-Typisierung unter immunmodulatorischer Basistherapie bei Patienten mit Multiple Sklerose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jan Mirko Schilling
aus Bielefeld

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.11.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. T. Weber

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. C. Heesen

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. M. Frieese

“What gets us into trouble
Is not what we don’t know
It’s what we know for sure
That just ain’t so.”

Mark Twain

1. Inhaltsverzeichnis

2. Abkürzungsverzeichnis	8
3. Einleitung	9
3.1. Einführung	9
3.1.1. Ätiologie und Pathogenese	9
3.1.2. HLA und Multiple Sklerose	11
3.1.3. Glatirameracetat	13
3.2. Therapiestrategien & Interferontherapie	15
3.2.1. Überblick	15
3.2.2. Interferontherapie	16
3.3. Hypothese/Fragestellung	19
4. Patienten, Material und Methoden	20
4.1. Patienten	20
4.2. Kontrollgruppe	20
4.3. Studiendesign	20
4.4. Geräte, Kleinmaterialien und Reagenzien	21
4.5. Interessenkonflikt	21
4.6. Untersuchungen zur genetischen Disposition	21
4.6.1. Blutentnahme und DNA-Extraktion	21
4.6.2. Bestimmung des DNA-Gehalts	22
4.6.3. Sequenz-spezifische Primer-PCR (PCR-SSP)	22

4.6.4. Gelelektrophorese	22
4.7. Auswertung	23
4.7.1. Primäre und sekundäre Endpunkte; fehlende Daten	23
4.8. Dokumentation und Software	24
4.8.1. AlphaDigiDocRT™	24
4.8.2. Helmberg Score™	24
4.9. Statistische Auswertung	26
5. Ergebnisse	27
5.1. Fragestellung und Vorgehen	27
5.2. Basisdaten beider Gruppen	28
5.2.1. Geschlecht	28
5.2.2. Altersverteilung in beiden Gruppen	29
5.3. Basisdaten der Patienten	31
5.3.1. Alter bei Diagnosestellung und Zeit bis Therapiebeginn	31
5.3.2. Schübe im Beobachtungszeitraum	32
5.3.3. MS-Typ und Medikation	33
5.3.4. Nebendiagnosen	34
5.4. PCR-SSP HLA-Typisierung	37
5.5. Analysegruppe	38
5.5.1. Definition der Analysegruppe	38
5.5.2. Basisdaten	38

5.5.2.1.	Alter und Geschlecht	38
5.5.2.2.	Alter bei Diagnosestellung und Zeit bis Therapiebeginn	39
5.5.3.	Medikamentenverteilung in der Analysegruppe	40
5.5.4.	Schübe im Beobachtungszeitraum	40
5.6.	EDSS: Entwicklung, Verteilung und Vergleich	42
5.6.1.	EDSS-Werte zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Monat	42
5.6.2.	EDSS-Verteilung zu Beginn	43
5.6.3.	EDSS-Entwicklung in den Behandlungsgruppen	44
5.6.4.	Vergleich der EDSS-Differenzen	46
6.	Diskussion	48
6.1.	Einführung	48
6.2.	Methodenkritik	48
6.3.	Vergleich der Basisdaten	49
6.4.	Vergleich der HLA-Typisierung	52
6.5.	Vergleich der primären und sekundären Endpunkte	53
7.	Zusammenfassung und Fazit	57
8.	Protokolle	58
8.1.	DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA (Blood) Mini Kit	58
8.1.1.	Vorbereitung der Reagenzien und Geräte	58
8.1.2.	Vorbehandlung von EDTA/Citrat-Blut	58
8.1.3.	Durchführung der DNA-Extraktion	59

8.1.4. Konzentrationsbestimmung mittels OD-Messung	60
8.2. Arbeitsanleitung zu OlerupSSP™-Kits	61
8.2.1. SSP-Primermixe und Mastermix (ohne Taq Polymerase®)	61
8.2.2. Testansatz	61
8.2.3. Kit Olerup SSP™ DR low resolution	62
8.2.4. Kit Olerup SSP™ DRB1*15	62
8.2.5. PCR-Programm für Olerup SSP™ Kits	62
9. Anhang	63
9.1. Adressen	63
9.2. Geräte	63
9.3. Kleinmaterialien	64
9.4. Reagenzien	65
9.5. Auswertungstabellen der HLA-Kits	67
10. Literaturverzeichnis	77
11. Danksagung	95
12. Lebenslauf	96
13. Eidesstattliche Versicherung	100

2. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
APL	altered peptide ligand; "veränderter Peptidligand"
BDNF	brain-derived neurotropic factor
CMV	Cytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FST	Faces Symbol Test
GA	Glatirameracetat
H ₂ O	chemische Summenformel für Wasser
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IFN	Interferon
MBP	Myelin-Basisches Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
MKH	Marienkrankenhaus Hamburg
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MS	Multiple Sklerose
MSAGN	Multiple Sklerose Arbeitsgemeinschaft Norddeutschland
MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
NGF	nerve growth factor
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-buffered-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPMS	Primary-Progressive Multiple Sklerose
RBC	red blood cell
rcf	relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
RPMS	Relapsing-Progressive Multiple Sklerose
RRMS	Relapsing-Remitting Multiple Sklerose
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SPMS	Secondary-Progressive Multiple Sklerose
SSP	Sequenzspezifische Primer
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
USCD	unrelated stem cell donor (nicht-verwandter Stammzellspender)
ZNS	zentrales Nervensystem

3. Einleitung

3.1. Einführung

Gegenwärtig gibt es keine etablierten objektiven Kriterien, die es gestatten, bei Beginn der Behandlung einer Multiplen Sklerose (MS) Vorhersagen über den Verlauf bzw. das Ansprechen auf eine immunmodulierende bzw. immunsupprimierende Behandlung zu machen. In der Literatur wurden im Zusammenhang mit der MS verschiedene Assoziationen mit HLA-Klasse-II-Merkmalen beschrieben (Ramagopalan and Ebers, 2009), die je nach Vorkommen und Epistase entweder eine positive oder negative Assoziation mit dem Auftreten der MS zeigen.

Assoziationen mit der Schwere der Erkrankung werden diskutiert, sind jedoch gegensätzlich und nicht eindeutig (Barcellos et al., 2002; Barcellos et al., 2003; Okuda et al., 2009). Das Augenmerk liegt vor allem auf der Assoziation des HLA-Klasse-II-Haplotyps DRB5*0101 - DRB1*1501 - DQA1*0102 - DQB1*0602 mit dem Erkrankungsrisiko für MS, der vor allem in der nordeuropäischen Bevölkerung vorkommt (Fogdell et al., 1995). Diese legt die Annahme nahe, dass Glatirameracetat (Copaxone®) (GA), das unter anderem an den T-Zellrezeptor (TCR) an verschiedene HLA-Klasse-II-Allele bindet, seine Wirkung abhängig von den jeweiligen HLA-Antigenen entfalten könnte (Fusco et al., 2001; Neuhaus et al., 2001; Weinshenker et al., 1998). Diese Überlegung ist Gegenstand der durchgeführten Studie. Um einen Überblick über das Thema zu erhalten, wird zunächst auf die klinische Sicht der Multiplen Sklerose mit ihren verschiedenen Facetten eingegangen.

3.1.1. Ätiologie und Pathogenese

Die MS ist eine chronische, autoimmun-vermittelte und multifokale Erkrankung, die sich sehr heterogen darstellen kann. Sie ist die häufigste neurologische Erkrankung, die im jungen Erwachsenenalter zu bleibender Behinderung und vorzeitiger Berentung führt (Gold and Hartung, 2008). Die Prävalenz der Multiplen Sklerose wird für Deutschland mit ca. 43 - 145 / 100'000 bei ca. 100'000 - 120'000 Erkrankten (Kobelt et al., 2006) und für Europa, Nordamerika, Neuseeland und Südost-Australien mit ca. 70 - 150 / 100'000 (Ebers, 2008) angegeben. Es besteht ein Zusammenhang, zwischen dem Risiko eine MS zu entwickeln und dem Abstand zum

Äquator. Das Risiko steigt bei zunehmendem nördlichen und südlichen Breitengrad (Alonso and Hernán, 2008; Ebers and Sadovnick, 1994; Hernán et al., 1999). Die jährliche Inzidenz beträgt studienabhängig ca. 2-5 / 100'000 (Ares et al., 2007; Flachenecker et al., 2005; Mayr et al., 2003). Das Hauptmanifestationsalter liegt in der dritten und vierten Lebensdekade, es sind jedoch auch Ersterkrankungen vor dem 10. und nach dem 60. Lebensjahr beschrieben worden. Frauen sind ca. zwei- bis dreimal so häufig betroffen wie Männer (Confavreux et al., 1980; Flachenecker et al., 2005; Mayr et al., 2003; Orton et al., 2006; Sadovnick, 2009; Steinman, 1993). Bei Verwandten 1.Grades wird ein 15-35-fach erhöhtes Risiko diskutiert (Compston and Coles, 2002; Ramagopalan et al., 2009). Die Kosten für das Gesundheitssystem werden mit ca. € 40'000 pro Patient und Jahr angegeben (Kobelt et al., 2006). Pathogenetisch liegen der MS verschiedene Arten von Gewebeschäden zugrunde (Weiner, 2004). Hierbei spielen Entzündung, Demyelinisierung und axonale Degeneration als Pathomechanismen in der Genese der Erkrankung die Hauptrollen und verursachen das klinische Erscheinungsbild (Compston and Coles, 2008; Lassmann et al., 2007). Durch die sog. „bystander“ Aktivierung während eines unspezifischen entzündlichen Vorgangs werden spezifische autoreaktive T-Zellen rekrutiert und wenden sich nicht nur gegen virale Antigene, sondern auch gegen molekular ähnliche Selbstantigene (Münz et al., 2009). An dieser durch autoreaktive Lymphozyten vermittelten entzündlichen Autoimmunreaktion (Compston and Coles, 2008; Steinman, 2001; Weiner, 2004), ist der HLA-Antigen-T-Zell Komplex (trimolekularer Komplex) maßgeblich beteiligt (Zamvil and Steinman, 1990). Im weiteren Verlauf wird die Erkrankung dominiert durch die Aktivierung von Mikroglia und eine chronische Neurodegeneration (Roach, 2004). Weitere Rollen spielen die Bindung zytotoxischer CD8+ T-Zellen an demyelinisierte Axone, sowie die Ausschüttung zytotoxischer Faktoren und Zytokine. Eine Triggerung des Entzündungsprozesses und ein Einfluss auf die Progredienz der Erkrankung durch multiple Einflussfaktoren, wie z.B. die Aktivierung autoreaktiver, Myelin-spezifischer T-Helfer (TH)-Zellen in der Peripherie, durch molekulares Mimikry bei einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Ascherio and Munger, 2007; Thacker et al., 2006) oder dem Varizella-Zoster-Virus (VZV) (Gilden, 2005; Sotelo et al., 2008), sowie Umweltfaktoren wie Rauchen (Franklin and Nelson, 2003; Hernán et al., 2005; Riise et al., 2003), Vitamin D-Mangel (Ascherio and Munger, 2007; Bäärnhielm et al.,

2012) oder der Geburtsmonat (Willer et al., 2005), wären innerhalb der „bystander“ Aktivierung durch beeinträchtigte Spezifität und Genauigkeit der Antigenerkennung zu erklären (Kantarci and Wingerchuk, 2006; Sospedra and Martin, 2005). Es kommt zu einem Durchtritt aktivierter Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke die im ZNS durch Myelin-Antigene reaktiviert werden. Dieser Vorgang führt zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen. Infolgedessen entwickelt sich eine Entzündungskaskade, die zur Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und anderen Entzündungszellen am bzw. zum Entzündungsherd führt. Aktivierte B-Zellen schütten vermehrt Myelin-Antikörper aus. Diese binden Komplement und fördern die Opsonisierung von Myelin-Peptiden. Die anhaltende Zerstörung der Myelinhülle resultiert in einer reversiblen und zum Teil irreversiblen Funktionsbeeinträchtigung von Axonen u.a. mit Beeinträchtigung und Unterbrechung ihrer saltatorischen Exzitation. Zusätzlich können Mechanismen, wie z. B. Exzitotoxizität, infolge der Glutaminsäureausschüttung aus apoptotischen Zellen zum Absterben der Neuronalzellen beitragen (Schrempf and Ziemssen, 2007; Steinman, 2001).

3.1.2. HLA und Multiple Sklerose

Der HLA-Komplex ist eine dicht mit Genen gepackte Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6p21.1-21.3. Diese Region umfasst ca. 3.5 Megabasen (Mb) und mindestens 150 verschiedene Gene (Dorman and Bunker, 2000); nach neueren Angaben und einem erweiterten Modell sogar 7.6 Mb und wenigstens 252 Gene (Horton et al., 2004; Ramagopalan and Ebers, 2009). Es werden hauptsächlich Proteine kodiert, von denen die meisten Aufgaben bei der Entwicklung, Reifung und Funktion des Immunsystems erfüllen. Innerhalb des HLA-Komplexes in der Klasse-II-Subregion befinden sich die Gene, die für die HLA-Klasse-II-Moleküle kodieren. Die Aufgabe dieser Moleküle ist das Erkennen und die Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen, die durch diese Stimulation differenzieren (The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium & The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2011) und über die Sekretion von Zytokinen und Aktivierung von weiteren Komponenten des Immunsystems eine Abwehrreaktion hervorrufen (siehe 3.2.1). Sie werden hauptsächlich auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC), zu denen neben Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen auch die Mikroglia-

Zellen zählen, exprimiert. Die HLA-Klasse-II-Moleküle wurden mit der Empfänglichkeit gegenüber MS (Kalanie et al., 2000) und verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert (Schmidt et al., 2007). Im Gegensatz zu Interferonen (Graber et al., 2010) wirkt GA an der Bindungsstelle von Myelin-basischen Protein (MBP) und konkurriert dort mit HLA-Klasse-II-Molekülen (Aharoni et al., 1999; Fridkis-Hareli and Strominger, 1998; Fridkis-Hareli et al., 1999). Die Assoziation zwischen der Multiplen Sklerose und Allelen der MHC-Region wurde erstmals in den 1970ern und zunächst als HLA-A*03 (Naito et al., 1972) und HLA-B*07 (Jersild et al., 1972) identifiziert, bevor sie genauer als differenziert und als HLA-DR2-Merkmale beschrieben wurden (Compston and Coles, 2008; Compston et al., 1976; Jersild et al., 1973; Terasaki et al., 1976). Bei weiteren Untersuchungen wurden die beschriebenen Antigene als DR15 und DQ6 mit ihren korrespondierenden Genotypen DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102 und DQB2*0602 identifiziert (Compston and Coles, 2008; Olerup and Hillert, 1991). Die Assoziation der MS mit verschiedenen HLA-Klasse-I und -II-Merkmalen ist in der Literatur gut belegt (Compston and Coles, 2008; Compston, 1999; Hafler et al., 2007; Lincoln et al., 2005; Ramagopalan and Ebers, 2009; Schmidt et al., 2007). Einen guten Überblick über die aktuelle Studienlage bezüglich der Verteilung der Merkmale des HLA-DR15 Haplotyps gibt eine im Jahr 2007 erschienene Metaanalyse, die zwischen 1993 und 2004 publizierte englischsprachige Studien untersucht. In dieser Studie werden insgesamt 60 Studien dargestellt, von denen 48 Studien die Assoziation zwischen HLA-DRB1*1501 und MS untersuchen (Schmidt et al., 2007). In fast allen hier betrachteten Studien zeigt sich eine deutliche Häufung in der Frequenz des HLA-Merkmals DRB1*1501 in der Patienten- gegenüber der Kontrollgruppe.

In einer Übersichtsarbeit von Ramagopalan et al. (Ramagopalan et al., 2009) werden verschiedenen Haplotypen der HLA-Klasse-II-Merkmale und das Erkrankungsrisiko in verschiedenen Regionen der Welt dargestellt. Dem Haplotyp DRB5*0101 - DRB1*1501 - DQA1*0102 - DQB1*0602 wird bei Heterozygotie ein Erkrankungsrisiko von 3, bei Homozygotie sogar von 6, in der nordeuropäischen Bevölkerung zugeordnet (Dyment et al., 2004; Fogdell et al., 1995). Diese Häufung der Frequenz von HLA-DRB1*1501 und HLA-DRB5*0101 bei Nordeuropäern und Menschen kaukasischer Abstammung beruht auf einem sehr hohen

Kopplungungleichgewicht der beiden Merkmale (LD: engl.: Linkage Disequilibrium) mit konsekutiver gemeinsamer Vererbung dieser Gene (Olsson and Hillert, 2008). In einer sardinischen Studie wurde dagegen eine Assoziation mit dem Haplotyp HLA-DRB1*0301 – HLA-DQA1*0501 – HLA-DQB1*0201 und HLA-DRB1*0405 – HLA-DQA1*0501 – HLA-DQB1*0301 gezeigt (Marrosu et al., 1997). Eine kanadische Studie aus dem Jahre 2005 mit einer großen Fallzahl zeigte bzw. bestätigte (Dyment et al., 2005), dass nicht nur HLA-DRB1*15, sondern auch HLA-DRB1*17 (Masterman et al., 2000; Modin et al., 2004) mit einem erhöhten MS-Risiko assoziiert sein kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass einige Merkmale ebenso einen protektiven Effekt ausüben können. Hierzu zählen HLA-DRB1*14 (Dyment et al., 2005), welches bei HLA-DRB1*15-positiven Patienten das MS-Risiko außer Kraft setzt, sowie HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*01 und HLA-DRB1*10 (Ramagopalan et al., 2007).

3.1.3. Glatirameracetat

Glatirameracetat [GA, Copolymer-1 (Cop-1)] ist ein zur Basistherapie der MS zugelassenes synthetisch hergestelltes Polypeptid bestehend aus den vier Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin, L-Tyrosin (GLAT) im molaren Verhältnis von 1.4:3.4:4.2:1.0 mit einem variablen Molekulargewicht im Bereich von etwa 4,7 und 11 kDa (Arnon and Aharoni, 2004; Arnon, 1996; Teitelbaum et al., 1971). Die Gabe erfolgt als eine tägliche subkutane Injektion von 20mg in Oberarm, Oberschenkel oder Bauch (Ziemssen et al., 2002a). Zu den Nebenwirkungen von Glatirameracetat zählen vor allem lokale Reaktionen, wie Reizungen und Indurationen an der Injektionsstelle und die sog. „systemische Postinjektionsreaktion“ (Gold and Hartung, 2008; Olek, 2010). Diese ist charakterisiert durch ein Engegefühl verbunden mit Schmerzen in der Brust bzw. des Thorax, Flushing, Dyspnoe und Palpitationen, oft begleitet von einem Gefühl der Angst. Die Reaktion kann zwischen 30 sec. und 30 min. andauern und sistiert meist spontan (Gold and Hartung, 2008; Johnson et al., 1995; Johnson et al., 2001). Aufgrund seiner starken Polarität und der damit verbundenen Hydrophilie ist das Überwinden der Blut-Hirnschranke für GA erschwert. Die immunologischen Effekte werden daher wahrscheinlich vor allem in der Peripherie vermittelt (Neuhaus et al., 2007). Die immunmodulierende Wirkung beruht auf verschiedenen Mechanismen. Hierunter zählen u.a. Einfluss auf die Antigenpräsentation, T-Zell-Differenzierung und

Induktion von antiinflammatorisch wirkenden T-Zellen (Farina et al., 2005; Gold and Hartung, 2008; Larsen and Alper, 2004). Im Einzelnen beinhaltet dies 1) Die Bindung von GA an MHC-Klasse-II-Moleküle (Fridkis-Hareli et al., 1994; Teitelbaum et al., 1996) und das Konkurrieren mit dem MBP um die MHC-Bindungsstelle (Aharoni et al., 1999; Fridkis-Hareli and Strominger, 1998; Fridkis-Hareli et al., 1999), 2) das Konkurrieren des GA/MHC-Komplexes mit dem MBP/MHC-Komplex um die Bindung am TCR (Aharoni et al., 1999), 3) die Aktivierung und Entwicklung einer Toleranz gegenüber MBP-spezifischen T-Zellen nach dem Modell eines „veränderten Peptidliganden“ (altered peptide ligand, APL) (Gran et al., 2000), 4) die vermehrte Bildung bzw. Induktion von Th2-polarisierten GA-reaktiven CD4+ T-Zellen, die einen sog. Bystander-Suppressionseffekt vermitteln (Duda et al., 2000; Neuhaus et al., 2000) und 5) eventuell durch Neurotrophine wie den „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) (Aharoni et al., 2003; Arnon and Aharoni, 2004; Chen et al., 2003; Ziemssen et al., 2002b) oder den „nerve growth factor“ (NGF) (Flügel et al., 2001), vermittelte neuroprotektive Effekte im Bereich von MS-Läsionen. Das heutige Wissen bezüglich der Wirkung von GA beruht jedoch hauptsächlich auf Versuchen am Tiermodell, so dass sich die Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen lassen. Die Effekte beim Menschen wurden in mehreren Placebo-kontrollierten Studien evaluiert (Fogdell et al., 1995; Johnson et al., 1995). Hier konnte gezeigt werden, dass eine früh einsetzende Therapie mit GA einer späteren überlegen war (Johnson et al., 2000) und dass es unter Therapie zu einer Abnahme entzündlicher Läsionen im CCT kam (Comi et al., 2001b).

Studien, die die Wirksamkeit von GA in Zusammenhang mit dem HLA-Typ untersuchen, kommen zur Zeit zu keinem eindeutigen Ergebnis. So zeigten Fusco et al. (Fusco et al., 2001), dass HLA-DRB1*1501 positive Patienten einen besseres Ansprechen auf eine Therapie mit GA zeigen. Diese Studie bildet die Rationale für unsere Untersuchung (siehe 3.1). Eine aktuelle retrospektive Studie aus dem Jahre 2010 hingegen legte dar, dass ein längeres schubfreies Intervall lediglich bei Patienten, homozygot für das untersuchte Merkmal, zu finden war (Gross et al., 2010). Grossman et al. (Grossman et al., 2007) konnten dagegen bei einer Analyse von mit GA Therapierten, keinen Therapievorteil für HLA-DRB1*1501 positive Patienten finden.

3.2. Therapiestrategien & Interferontherapie

3.2.1. Überblick

Da gegenwärtig keine kurative Therapie der MS zur Verfügung steht, wurden von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) Hauptziele der Behandlung formuliert. Hierzu zählen „1. Die möglichst vollständige Rückbildung schubassoziierter Symptome, 2. Die Vorbeugung weiterer Krankheitsschübe, 3. Die Unterbindung bzw. Verlangsamung der Entwicklung dauerhafter neurologischer Defizite (Krankheitsprogression) und 4. bei eingetretenen dauerhaften Ausfällen eine Stabilisierung der funktionellen Einschränkung auf möglichst niedriger Beeinträchtigungsstufe“ (Gold and Hartung, 2008). Die Schubtherapie, eine verlaufsmodifizierende Therapie und die Behandlung krankheitsassoziierter Symptome (Henze et al., 2006) bilden derzeit die Grundlagen einer optimalen Therapie innerhalb eines multimodalen Behandlungskonzeptes und können dabei helfen, das Fortschreiten der Erkrankung zu verzögern. Als Standardtherapie des akuten MS-Schubes gilt derzeit die intravenöse Gabe von hochdosiertem Methylprednison (Beck et al., 1992; Grauer et al., 2001; Kaufman et al., 2000; Milligan et al., 1987). Falls diese Therapie nicht den gewünschten Effekt zeigt, kann eine erneute hochdosierte Gabe von Kortikosteroiden erfolgen. Bei weiterhin ausbleibendem Erfolg kann eine Plasmapherese in einem darauf spezialisiertem Zentrum eine weitere Option sein (Weinshenker et al., 1999). Zur Schubprophylaxe bzw. verlaufsmodifizierenden Therapie sind in Deutschland mehrere Präparate zugelassen. Hierzu gehören Interferon- β -1a (AvonexTM und Rebif®) (Jacobs et al., 1996; PRISM Study Group, 1998), Interferon- β -1b (Betaferon®) (Comi et al., 2001a; IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 2001), Glatirameracetat (Copaxone®) (Johnson et al., 1995), der monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri®) (Polman et al., 2006) und Chemotherapeutika wie Mitoxantron (Ralenova®) (Edan et al., 2004; Hartung et al., 2002), Azathioprin (z.B. Imurek®) (Casetta et al., 2007) und Fingolimod (Gilenya®) (Kappos et al., 2006; Kappos et al., 2010). Eine weitere Therapieoption stellt die Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen (Sorensen et al., 2002) dar, jedoch sind die Studienergebnisse hier weniger eindeutig (Fazekas et al., 2008; Schwarz et al., 2009). Ein Algorithmus zur Unterstützung bei der Therapiefindung ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Nach gegenwärtiger Studienlage sollte so früh wie möglich mit einer Therapie begonnen werden, um ein Fortschreiten

der Erkrankung zu stoppen oder zu verlangsamen (Comi et al., 2001a; Comi et al., 2009; Coyle, 2008; Garcea et al., 2009; Jacobs et al., 2000; Johnson et al., 2000; Rieckmann et al., 2004; Rovaris et al., 2006). Diese Ansicht stützt sich vor allem auf Untersuchungen zu diagnostischen Verfahren wie dem MRT und der Bestimmung evozierter Potentiale (Barkhof et al., 1997; O'Riordan et al., 1998; Rieckmann et al., 2004; Tintoré et al., 2000) und wird von den großen Fachgesellschaften empfohlen (Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) and Rieckmann, 2006; Oger and Freedman, 1999; Rieckmann et al., 2004; Van den Noort et al., 2007). Bezüglich der Therapie mit Copaxone ist aktuell in den publizierten Leitlinien (Gold and Hartung, 2008) keine Empfehlung für eine HLA-Typisierung vor Therapiebeginn enthalten, da wie bereits erwähnt, in aktuellen Studien lediglich ein längeres schubfreies Intervall bei Patienten, homozygot für HLA-DRB1*1501 sind, nachgewiesen werden konnte (Gross et al., 2010).

3.2.2. Interferontherapie

Interferone sind Glykoproteine, die zur Familie der Zytokine gehören und der Kommunikation der Zellen untereinander dienen. Sie haben antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften. In der Gruppe der Interferone lassen sich Interferon- α , Interferon- β und Interferon- γ unterscheiden (Lengyel, 1982), wobei Interferon- β für die Therapie der Multiplen Sklerose relevant ist. Natürliches Interferon- β wird hauptsächlich von Fibroblasten gebildet, auf Chromosom 9 kodiert und besteht aus 166 Aminosäuren (Lengyel, 1982; Mäurer et al., 2001; Neuhaus et al., 2007). Interferon- β bindet an einen transmembranösen Rezeptor (IFN $_1$ -R) und das Signal wird daraufhin über eine von Tyrosinkinasen vermittelte Kaskade (JAK-STAT-Kaskade) weitergeleitet. Am Ende dieser Kaskade steht die Aktivierung oder Suppression unterschiedlicher Genprodukte (Hohlfeld, 1999; Karpusas et al., 1998). Interferon- β vermittelt eine große Spannbreite von Effekten, die sich ständig erweitert (Liu et al., 2001; Neuhaus et al., 2007; Yong, 2002). Zu den wichtigsten heute bekannten gehören 1) die Unterdrückung der T-Zell Proliferation (Pette et al., 1997; Rep et al., 1996), 2) eine verminderte IFN- γ -induzierte Hochregulierung der Expression von MHC-Klasse-II Molekülen (Joseph et al., 1988; Lu et al., 1995), 3) eine verminderte T-Zellmigration durch eine Down-Regulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Leppert et al., 1996; Stüve et al.,

1996; Trojano et al., 1999) und eine verminderte Expression von Oberflächen- (Calabresi et al., 1997) und löslichen (Trojano et al., 1999) Adhäsionsmolekülen, 4) die Induktion der Produktion von Th2- und eine verminderte Synthese von Th1-Zytokinen (Rep et al., 1996; Rudick et al., 1996) und 5) die Inhibition der Aktivierung von Monozyten (Van Weyenbergh et al., 1998). Natürliches Interferon- β ist bereits in den 70er Jahren zur Behandlung der MS eingesetzt worden (Jacobs, 1994). Jedoch ermöglichte erst die gentechnisch hergestellte Substanz den breiten und kontrollierten Einsatz. Derzeit sind drei Interferon- β -Präparate zur Therapie der MS zugelassen und im Handel erhältlich. Interferon- β -1a wird als AvonexTM (30 μ g 1x pro Woche i.m.) oder Rebif® (22 μ g oder 44 μ g 3x pro Woche s.c.) vertrieben und entspricht bezüglich der Aminosäuresequenz, Struktur und Glykolisierung im Prinzip dem im Menschen natürlicherweise vorkommenden Interferon- β (Mäurer et al., 2001). Interferon- β -1b ist als Betaferon® (8 MIU jeden 2. Tag s.c.) im Handel. Im Gegensatz zum natürlichen Interferon- β und zu Interferon- β -1a ist INF- β nicht glykosyliert und Serin ersetzt Cystein an Position 17 (Mäurer et al., 2001). Es wurden leichte Unterschiede in der Pharmakodynamik zwischen IFN β -1a und -1b bezüglich der Zytokin-Konzentrationen in Lymphozytenkulturen gefunden, jedoch scheint die Wirkung der beiden Zubereitungsformen vergleichbar zu sein (Sega et al., 2004). Die Wirksamkeit der Interferonpräparate wurde in mehreren randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase-III-Studien für Avonex® (Jacobs et al., 1996), Rebif® (Goodkin, 1998; PRISM Study Group, 1998) und Betaferon® (Jacobs et al., 1996) eindeutig belegt.

An häufigen Nebenwirkungen sind vor allem lokale Reaktionen an der Injektionsstelle bis hin zur Nekrose, Grippe-ähnliche Symptome (Rio et al., 2004) und häufig eine asymptomatische Erhöhung der ALT dokumentiert (Tremlett et al., 2004). Des Weiteren sind in seltenen Fällen eine Hepatoxizität, Leukopenie, Anämie und Suizid berichtet worden (Olek, 2010). Ein weiteres Problem bei der Therapie mit Interferon- β -Präparaten ist die Entwicklung neutralisierender Antikörper (Deisenhammer et al., 1999; Namaka et al., 2006; Pachner, 2003; Ross et al., 2000; Sorensen et al., 2003), jedoch ist das Regime bezüglich dem Umgang mit deren Auftreten bis heute weiterhin nicht vollständig geklärt (Hemmer et al., 2005; Pachner, 2003).

Indikation	CIS ¹	RRMS ¹		SPMS ¹	
Eskalations- therapie			1. Wahl – Fingolimod ⁴ – Natalizumab ⁴	2. Wahl – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵	mit aufgesetzten Schüben ohne aufgesetzte Schübe
	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c.	– Glatirameracetat – Interferon-β 1a i.m. – Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. (– Azathioprin) ² (– IVlg) ³			– Interferon-β 1a s.c. – Interferon-β 1b s.c. – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵ – Mitoxantron (– Cyclophosphamid) ⁵
Schub- therapie	2. Wahl	– Plasmaseparation			
	1. Wahl	– Methylprednisolonpuls			

¹ = Substanzen in alphabetischer Reihenfolge. Die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens).

² = Zugelassen, wenn IFN-β nicht möglich ist oder unter Azathioprin-Therapie ein stabiler Verlauf erreicht wird.

³ = Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.

⁴ = Fingolimod und Natalizumab haben neben der Zulassung zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung Therapie-naiver Patienten bei mindestens 2 behindernden Schüben mit Krankheitsprogression binnen der letzten 12 Monate und mindestens einer Gd+-Läsion bzw. einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT.

⁵ = Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren.

Abbildung 3.1: Therapeutische Entscheidungsfindung bei Multipler Sklerose der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), 2012).

3.3. Hypothese/Fragestellung

Ziel dieser Untersuchung ist es einen Zusammenhang der Wirksamkeit von Glatirameracetat (Copaxone®) (GA) mit bestimmten HLA-Merkmalen zu zeigen. Tatsächlich konnte bei einer kleinen Zahl von MS-Patienten eine Beziehung zwischen dem Ansprechen auf GA und dem HLA-Merkmal DRB1*1501 gezeigt werden, das sich für Interferon- β -1a (IFN β -1a) nicht fand (Fusco et al., 2001). In einer Gruppe von 83 mit Glatirameracetat therapierten MS-Patienten mit schubförmig verlaufender Erkrankung (RRMS) sprachen lediglich 39,4%, die HLA-DRB1*1501-negativ waren im Verlauf der Erkrankung an, während 81,8% der HLA-DRB1*1501-positiven Patienten innerhalb von zwei Jahren keine Schübe aufwiesen bzw. sich um weniger als einen EDSS-Punkt verschlechterten (Fusco et al., 2001). Eine durch das HLA Merkmal DRB1*1501 vorgegebene Behandlung mit GA könnte so zu einem signifikant besseren Krankheitsverlauf, im Vergleich zu einer allein auf klinischen Kriterien beruhenden Auswahl der Therapie führen. Eine Behandlung mit GA wäre in diesen Fällen der mit einem IFN β -1a bzw. IFN β -1b überlegen.

Die zu prüfende Nullhypothese H_0 lautet dementsprechend:

*„Es gibt bei Vorhandensein von HLA-DRB1*1501 keinen Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Glatirameracetat und anderen zur Initialbehandlung der RRMS eingesetzten immunmodulatorisch wirksamen Substanzen“.*

Die Alternativhypothese lautet:

*„Es gibt bei Vorhandensein von HLA-DRB1*1501 einen Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Glatirameracetat und anderen zur Initialbehandlung der RRMS eingesetzten immunmodulatorisch wirksamen Substanzen“.*

4. Patienten, Material und Methoden

4.1. Patienten

Die Patienten wurden aus den Patienten der Neurologischen Klinik des MKH und partizipierenden Mitgliedern der MSAGN (siehe 9.1) nach ausführlicher Aufklärung gemäß §12 und §12a des Hamburgischen Krankenhausgesetzes (HmbKHG) vom 17. April 1991, rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patienten mit einer nach den McDonald-Kriterien (McDonald et al., 2001) klinisch definierten MS. Die Pseudonymisierung wurde mittels der vom Labor Fenner routinemäßig zugeordneten Labornummer durchgeführt. Dieser Pseudonymisierung wurde eine weitere Pseudonymisierung mittels einer dreistelligen laufenden Nummer zugeordnet. Die Liste mit der eindeutigen Zuordnung wird im Marienkrankenhaus Hamburg verwahrt.

4.2. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden Blutspendern im Marienkrankenhaus (MKH). Die Patienten gaben ihr Einverständnis über die im MKH geltende Einverständniserklärung zur Blutspende gemäß §12a des Hamburgischen Krankenhausgesetzes (HmbKHG) vom 17. April 1991. Die Versendung der Blutproben erfolgte im Zeitraum von Mai bis September 2006 an das Labor Fenner und Partner. Die Patientendaten wurden doppelt pseudonymisiert. Zunächst erfolgte die Pseudonymisierung durch die Auftragsnummer der Blutbank des MKH, anschließend wurde diese Nummer einer laufenden Nummer der Auftragsnummer im Labor Fenner eindeutig zugeordnet. Die Geschlechterverteilung innerhalb der Kontrollgruppe orientiert sich am MS-Register Deutschland (Flachenecker et al., 2005). Dieser Pseudonymisierung wurde eine weitere Pseudonymisierung mittels einer dreistelligen laufenden Nummer zugeordnet. Die Liste mit der eindeutigen Zuordnung wird im Marienkrankenhaus Hamburg verwahrt.

4.3. Studiendesign

Das Studiendesign entspricht einer Beobachtungsstudie mit prospektiv und retrospektiv erhobenen Patientendaten. Es wurden zur Charakterisierung der Patienten folgende Basisdaten erhoben und dokumentiert: Alter, Geschlecht,

Zeitpunkt der Diagnose, Schübe im Beobachtungszeitraum, MS-Typ, Medikation und Nebendiagnosen.

Als klinische Daten zur Krankheitsprogression wurden der EDSS-Score (Kurtzke, 1983) zum Zeitpunkt 0 (Einschlussdatum), nach 12 Monaten und nach 24 Monaten erhoben und die Anzahl der Schübe im Beobachtungszeitraum erfasst. Der Beobachtungszeitraum und die Erhebung der Daten fand von September 2004 bis Mai 2008 statt.

Als abhängige Variable, an der ein möglicher Unterschied zwischen den Therapien festgestellt werden sollte, wurde eine HLA-Typisierung durchgeführt.

4.4. Geräte, Kleinmaterialien und Reagenzien

Das Labor Fenner & Kollegen ist gemäß DIN EN ISO 15189 akkreditiert.

Die Geräte, Kleinmaterialien und Reagenzien werden im Einzelnen im Anhang unter 8.2-8.4 tabellarisch aufgelistet.

4.5. Interessenkonflikt

Als möglicher Interessenkonflikt muss angemerkt werden, dass die Firma *Sanofi-Aventis Deutschland GmbH* finanzielle Mittel zur Durchführung der Studie in Höhe von 15.000 EUR zur Verfügung gestellt hat. Diese Mittel wurden ausschließlich zum Erwerb von Geräten und Labormaterialien verwendet, die zur Durchführung der Studie notwendig waren. Mitarbeiter der Firma *Sanofi-Aventis Deutschland GmbH* haben zu keinem Zeitpunkt Einfluss auf die Durchführung der Untersuchung, die Auswertung und Interpretation der Daten genommen.

4.6. Untersuchungen zur genetischen Disposition

4.6.1. Blutentnahme und DNA-Extraktion

Die Blutentnahme zur HLA-Typisierung erfolgte in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen (siehe 8.1.1) in der Neurologischen Klinik des MKH, in den Praxen der MSAGN und der Blutbank des MKH. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels QIAamp® DNA (Blood) Mini Kit als Maxi-Präp-Verfahren anhand der von Qiagen im Begleitheft angegebenen Prozedur bzw. des im Labor geltenden routinemäßig durchgeführten Standards (siehe 8.1). Hierbei wird die DNA der Leukozyten mittels chaotroper Zell-Lyse und anschließender Bindung an eine Silica-Membran isoliert.

Die Reaktionsgefäße mit den Eluaten und Rückstellproben von Leukozytenpellets wurden mit Probennummer beschriftet und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

4.6.2. Bestimmung des DNA-Gehalts

Der DNA-Gehalt der so gewonnenen Eluate wurde anhand einer Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Die Bestimmung wurde bei 23 Proben aus der Kontrollgruppe zur Orientierung durchgeführt. Diese orientierende Untersuchung diente dazu festzustellen, ob die in der Anleitung des PCR-Kits geforderte DNA-Konzentration mit unserer Methode der DNA-Isolierung erreicht wurde.

4.6.3. Sequenz-spezifische Primer-PCR (PCR-SSP)

Die Bestimmung der HLA Klasse II-Merkmale erfolgte mit Hilfe einer PCR-SSP. Hierzu wurden die Kits *Olerup SSP™ low not licensed for PCR* und *Olerup SSP™ DRB1*15 not licensed for PCR* (siehe 8.4) verwendet. Die Proben wurden zunächst mit dem DR low niedrigauflösenden Kit untersucht. Bei Nachweis von DRB1*15 wurde zusätzlich eine Feintypisierung des Locus DRB1*15 durchgeführt. Die Durchführung der PCR-SSP erfolgte anhand kitspezifischer Produktinformation (siehe 8.2). Die Kits bestehen aus vorpipettierten und lyophilisierten Reaktionsansätzen mit allel- und gruppenspezifischen Primern, sowie einem internen Kontrollprimer. Die abschließende Auswertung erfolgte anhand der mitgelieferten Auswertungstabellen (siehe 9.5) und dem Programm Helmberg™ Score.

4.6.4. Gelelektrophorese

Nach Durchführung der PCR wurde eine Gelelektrophorese (Wide Mini Sub-Cell GT; Bio-Rad) mit einem 3%-igem Fertig-Agarosegel (siehe 9.3) und einem 0,5 x TBE-Puffer bei 120 mV für 18 min durchgeführt. Als Größenmarker fand der DNA-Marker pUC 18 (siehe 9.4) Verwendung.

4.7. Auswertung

4.7.1. Primäre und sekundäre Endpunkte; fehlende Daten

Primäre Endpunkte sind der EDSS-Score (Kurtzke, 1983) zum Zeitpunkt 0 (Einschlussdatum) und nach 2 Jahren. Sekundärer Endpunkt sind die Anzahl der klinisch dokumentierten Schübe im Beobachtungszeitraum. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm SPSS® 17.0 (Version 17.0.0) mit Hilfe deskriptiver Statistik, dem Chi-Quadrat-Test, Fishers exaktem zweiseitigen Test, sowie mittels UNIANOVA. Als „fehlende Daten“ bzw. „keine Angabe“ wurden Daten und Werte deklariert, die nicht in der Dokumentation über die Patienten gefunden werden konnten.

4.8. Dokumentation und Software

4.8.1. AlphaDigiDocRT™

AlphaDigiDoc™ RT (siehe 9.2) ist ein System zur Dokumentation und digitalen Bearbeitung von Agarosegelen (siehe Abbildung 4.1). Es besteht aus einer Digitalkamera, die durch die Software AlphaEaseFC (siehe 9.2) gesteuert wird. Die Digitalkamera ist zusätzlich mit einem EtBr-Filter und einer Dunkelhaube ausgerüstet. Die Fotos können mit Hilfe dieses Systems direkt auf dem PC gespeichert und bearbeitet werden.

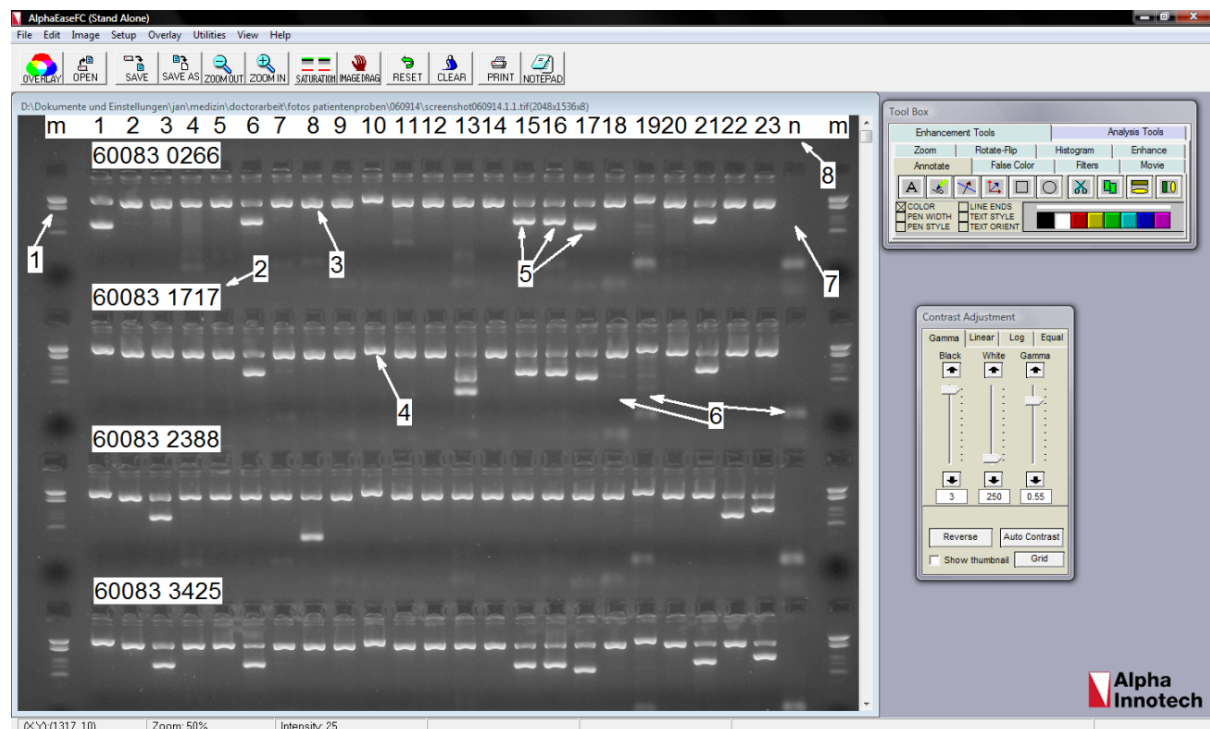


Abbildung 4.1: Fotodokumentation mit dem System AlphaDigiDoc™ RT. (1. DNA-Marker; 2. Labornummer; 3. interne positive Kontrolle 430 bp; 4. interne positive Kontrolle 515 bp; 5. positive Banden; 6. negative Banden; 7. interne negative Kontrolle; 8. Beschriftung: 1-23 = Amplifikate, m = DNA-Marker, n = interne negative Kontrolle)

4.8.2. Helmberg Score™

Die Auswertung der Gele erfolgte mit der Software Helmberg Score™ (siehe Abbildung 4.2 & Abbildung 4.3 und 9.2). Die im Programm enthaltene Datenbank stützt ihre Analyse auf ein jeweiliges Muster aus Amplifikaten der PCR-SSP.

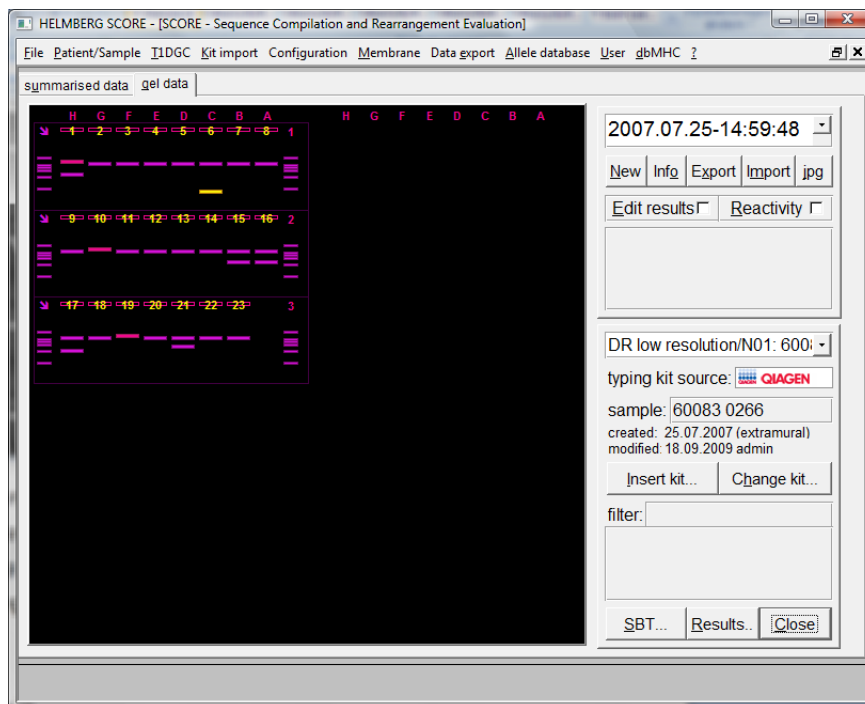


Abbildung 4.2: Auswertung mit dem Programm Helmberg™ Score (zu sehen ist exemplarisch die Oberfläche, in die die Ergebnisse der Gele, in diesem Fall des Patienten 60083 0266, eingetragen werden)

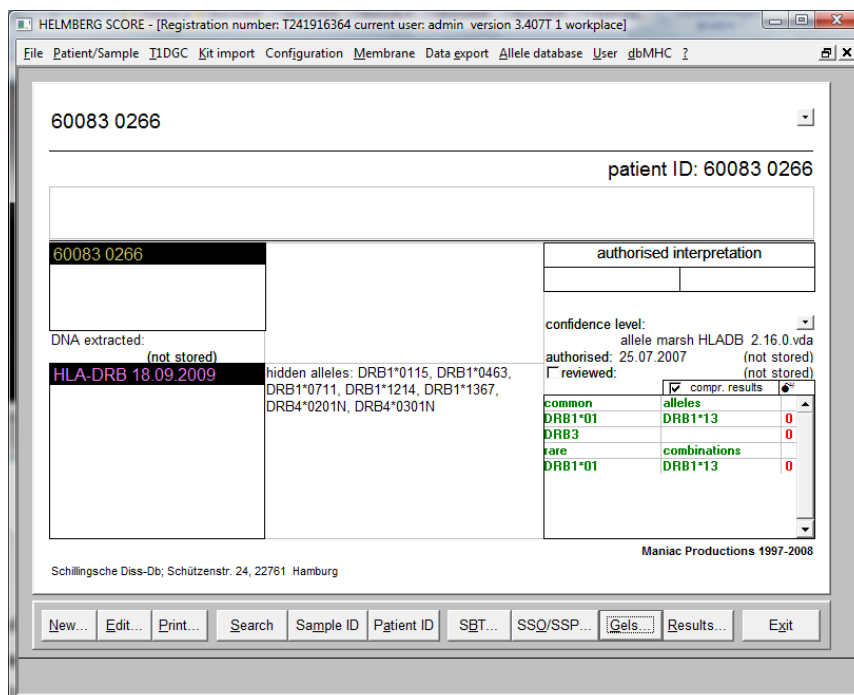


Abbildung 4.3: Auswertung mit dem Programm Helmberg™ Score (zu sehen sind exemplarisch die Ergebnisse des Patienten 60083 0266)

4.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach statistischer Beratung am Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Eppendorf und nach Teilnahme am Seminar „Der SPSS- (Wieder-) Einstieg leicht gemacht“ anhand der Software SPSS Statistics 17.0 (Version 17.0.0). Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel $\pm$ der Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt, berechnet aus den Einzelwerten (n). Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test, Chi-Quadrat-Test und Unianova beim Vergleich der Gruppen ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied bewertet und als solcher gekennzeichnet.

5. Ergebnisse

5.1. Fragestellung und Vorgehen

Ziel der Auswertung ist es festzustellen, ob sich ein Unterschied zwischen der Therapie mit Glatirameracetat und einer mit anderen, zur Initialbehandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose eingesetzten immunmodulatorisch wirksamen Substanzen, bei Vorhandensein des Genmerkmals HLA-DRB1*1501, finden lässt. Hierzu werden zunächst die Basisdaten der Patienten- und Kontrollgruppe mit einander verglichen. Anschließend wird detaillierter auf die Patientengruppe eingegangen und die MS-Typen, MS-Medikation, Nebendiagnosen, Schubhäufigkeit und die mittleren EDSS-Differenzen mittels deskriptiver Statistik beschrieben. Weiterhin werden die Ergebnisse der HLA-Typisierung ausgewertet, sowie die Ergebnisse bezüglich der in 3.3 generierten Fragestellung dargestellt.

5.2. Basisdaten beider Gruppen

5.2.1. Geschlecht

Es wurden insgesamt 141 Patienten und 237 Blutspender in der Kontrollgruppe untersucht. Der Anteil der Frauen unter Patienten betrug 85,1%. Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von w : m von 5,7 : 1. In der Kontrollgruppe betrug dieser 74,3%. Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von w : m von 2,9 : 1. Im Chi-Quadrat Test nach Pearson ergab sich eine asymptotische Signifikanz (2-seitig) von $p = 0,013$. Hier muss die zur Überprüfung der Gruppen aufgestellte Nullhypothese (H_0 = Die beiden Gruppe unterscheiden sich bezüglich ihrer Geschlechterverteilung nicht) verworfen werden. Es kann die Alternativhypothese (H_1 = Die beiden Gruppen unterscheiden sich bezüglich ihrer Geschlechterverteilung) angenommen werden. In Tabelle 5.1 sind die oben beschriebenen Daten aufgelistet.

Tabelle 5.1: Geschlechterverteilung in den Gruppen

	männlich n (%)	weiblich n (%)	Gesamt n (%)
Patienten	21 (14,9)	120 (85,1)	141 (100,0)
Kontrollgruppe	61 (25,7)	176 (74,3)	237 (100,0)
Gesamt	82 (21,7)	296 (78,3)	378 (100,0)

5.2.2. Altersverteilung in beiden Gruppen

Um die beiden Gruppen bezüglich ihrer Altersverteilung untersuchen zu können wurden zunächst alle 378 Patienten (141 Patienten und 237 Kontrollgruppe) gemeinsam betrachtet (siehe Tabelle 5.2). Es ergab sich für das Alter ein Mittelwert von 38,70 Jahren, ein Median 38,00 Jahren, eine Standardabweichung (SD) von 11,53 Jahren. Der jüngste Patient war 18 Jahre und der Älteste 81 Jahre alt. Um die beiden Gruppen besser vergleichen zu können, wurden zusätzlich noch die Quartile bestimmt. Es ergab sich für das Quartil Q1 ein Alter von 29,0 Jahren, für Q2 38,0 Jahre und für Q3 46,0 Jahre.

Tabelle 5.2: Altersverteilung (in Jahren) in den Gruppen.

		Gesamt	Patienten	Kontrollgruppe
N	Gültig	378	141	237
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert		38,70	40,59	37,58
Median		38,00	40,00	36,00
Standardabweichung		11,53	9,57	12,43
Minimum		18,00	19,00	18,00
Maximum		81,00	81,00	68,00
Perzentile	25	29,00		
	50	38,00		
	75	46,00		

Die beiden Gruppen werden in Tabelle 5.2 beschrieben und in Abbildung 5.1 als Boxplot graphisch dargestellt. Es besteht ein Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe im Mittelwert von 40,59 zu 37,58 Jahren, im Median von 40,00 Jahren zu 36,00 Jahren und in der SD von 9,57 zu 12,43 Jahren. Der jüngste Patient in der Patientengruppe war 19 Jahre alt und in der Kontrollgruppe 18 Jahre. Der älteste in der Patientengruppe war 81 Jahre und in der Kontrollgruppe 68 Jahre alt.

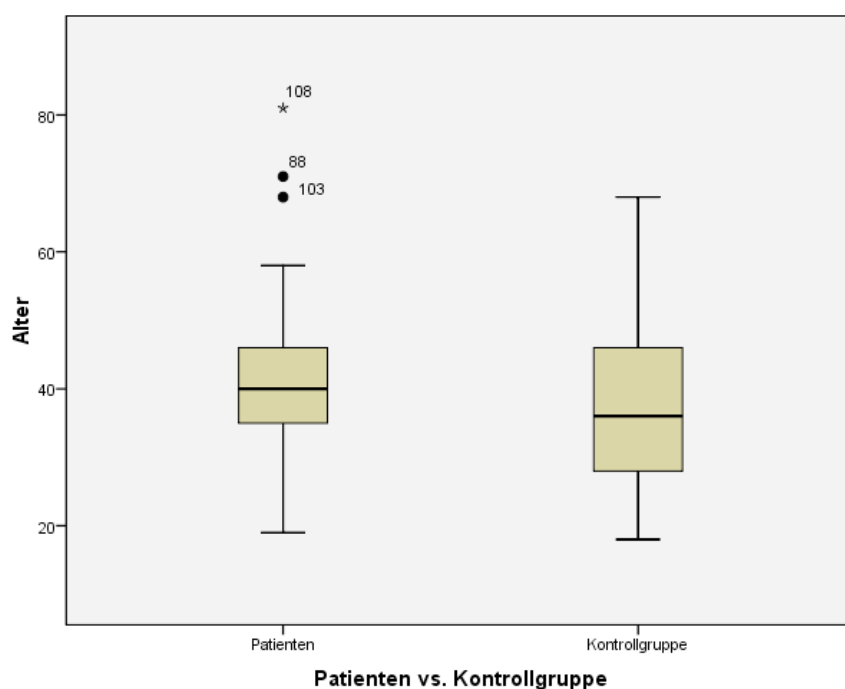


Abbildung 5.1: Boxplot zur Altersverteilung in den beiden Gruppen.

Anhand der Quartile wurden die beiden Gruppen nun getrennt voneinander betrachtet (siehe Tabelle 5.3). Dies ergab eine prozentuale Verteilung in der Gruppe „jünger als 29 Jahre“ Patienten zu Kontrollgruppe von 11,3% zu 33,8%, in der Gruppe „29 – 38 Jahre“ von 30,5% zu 23,6%, in der Gruppe „38 – 46 Jahre“ von 33,3% zu 19,8% und in der Gruppe „älter als 46 Jahre“ von 24,8% zu 22,8%.

Tabelle 5.3: Darstellung der gruppierten Altersverteilung in den beiden Gruppen.

	jünger als 29 Jahre n (%)	29 - 38 Jahre n (%)	38 - 46 Jahre n (%)	älter als 46 Jahre n (%)	Gesamt n (%)
Patienten	16 (11,3)	43 (30,5)	47 (33,3)	35 (24,8)	141 (100,0)
Kontrollgruppe	80 (33,8)	56 (23,6)	47 (19,8)	54 (22,8)	237 (100,0)
Gesamt	96 (25,4)	99 (26,2)	94 (24,9)	89 (23,5)	378 (100,0)

Im Chi-Quadrat Test nach Pearson ergab sich eine asymptotische Signifikanz (2-seitig) von $p < 0,001$. Hier muss die zur Überprüfung der Gruppen aufgestellte Nullhypothese (H_0 = Die beiden Gruppe unterscheiden sich bezüglich ihrer Altersverteilung nicht) verworfen werden. Es kann die Alternativhypothese (H_1 = Die beiden Gruppen unterscheiden sich bezüglich ihrer Altersverteilung) angenommen werden.

5.3. Basisdaten der Patienten

5.3.1. Alter bei Diagnosestellung und Zeit bis Therapiebeginn

In Tabelle 5.4 wird das Alter der Patienten bei Diagnosestellung dargestellt. Der Mittelwert beträgt 33,8 Jahre bei einer SD von 8,66 Jahren. Der Median beträgt 33,0 Jahre. Der jüngste Patient war bei Diagnosestellung 16,0 Jahre und der älteste 58,0 Jahre alt.

Tabelle 5.4: Alter der Patienten bei Diagnosestellung

Alter bei Diagnosestellung		
N	Gültig	141
	Fehlend	0
Mittelwert		33,8014
Median		33,0000
Standardabweichung		8,66126
Minimum		16,00
Maximum		58,00

In Tabelle 5.5 ist die Zeit von der Diagnosestellung bis zum Therapiebeginn in der Patientengruppe dargestellt. Der Median liegt bei 25,0 Monaten, der Mittelwert bei 60,2 Monaten und die SD beträgt 77,4 Monate. Das Minimum liegt hier bei 0 Monaten, das Maximum beträgt 293,0 Monate.

Tabelle 5.5: Zeit von der Diagnosestellung bis zum Therapiebeginn

Patienten		
N	Gültig	99
	Fehlend	42
Mittelwert		60,2020
Median		25,0000
Standardabweichung		77,39772
Minimum		,00
Maximum		293,00

5.3.2. Schübe im Beobachtungszeitraum

Tabelle 5.6 zeigt die Schubhäufigkeit bei allen Patienten während des Beobachtungszeitraums. Insgesamt hatten 59 (41,8%) Patienten keinen, 31 (22,0%) Patienten einen, 12 (8,5%) Patienten zwei, 9 (6,4%) Patienten drei, 2 (1,4%) Patient 4 und 3 (2,1%) Patienten 5 Schübe innerhalb des Beobachtungszeitraums. Bei 25 (17,7%) Patienten konnten keine Angaben gemacht werden.

Tabelle 5.6: Anzahl und Prozentwerte der Schübe innerhalb des Beobachtungszeitraums bei allen Patienten.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
kein Schub	59	41,8	50,9	50,9
ein Schub	31	22,0	26,7	77,6
zwei Schübe	12	8,5	10,3	87,9
drei Schübe	9	6,4	7,8	95,7
4 Schübe	2	1,4	1,7	97,4
5 Schübe	3	2,1	2,6	100,0
Gesamt	116	82,3	100,0	
fehlende Daten	25	17,7		
Gesamt	141	100,0		

5.3.3. MS-Typ und Medikation

In Tabelle 5.7 wird dargestellt, wie sich die Patienten auf die verschiedenen Medikamente verteilen und welcher MS-Typ bei ihnen vorliegt. Von den ursprünglich 141 Patienten konnte bei 8 Patienten keine Angabe zur Therapie gemacht werden. Unter den verbleibenden 133 Patienten ist bei 112 Patienten eine schubförmig verlaufende MS (RRMS) diagnostiziert worden. Von diesen haben insgesamt 79 Patienten entweder Glatirameracetat oder ein Interferon-Präparat erhalten.

Tabelle 5.7: Darstellung der Verteilung der Patienten in die verschiedenen Gruppen von MS-Typen und Medikamenten

	RRMS	SPMS	PPMS	MS, nicht näher bezeichnet	Gesamt
Glatirameracetat (Copaxone)	27	2	0	0	29
Interferon- β -1a (Avonex)	12	0	0	1	13
Interferon- β -1a (Rebif)	15	1	0	3	19
Interferon- β -1b (Betaferon)	25	1	1	0	27
Mitoxantron	2	5	1	0	8
Natalizumab (Tysabri)	2	1	0	0	3
IVIG	16	2	0	1	19
IVIG & Azathioprin	6	0	0	0	6
keine Medikation	7	1	0	1	9
Gesamt	112	13	2	6	133

5.3.4. Nebendiagnosen

In Tabelle 5.8 wird dargestellt, ob bei den Patienten Nebendiagnosen vorhanden waren. Bei 65 (46,1%) Patienten wurden keine Nebendiagnosen registriert. Bei 71 (50,4%) Patienten waren Nebendiagnosen vorhanden. Keine Angabe konnte bei 5 (3,5%) Patienten gemacht werden.

Tabelle 5.8: Darstellung der Häufigkeiten der Nebendiagnosen innerhalb des Patientenkollektivs

	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
keine Nebendiagnosen	65	46,1	46,1
Nebendiagnosen vorhanden	71	50,4	96,5
keine Angabe	5	3,5	100,0
Gesamt	141	100,0	

In Tabelle 5.9 werden die Nebendiagnosen, den verschiedenen Hauptgruppen des ICD-10 Codes entsprechend zugeordnet, aufgelistet. In der Hauptgruppe D50-D90 wurde eine, in E00-E90 wurden 16, in F00-F99 wurden 19, in G00-G99 wurden 14, in H00-H59 wurden eine, in I00-I99 wurden 13, in J00-J99 wurden 6, in K00-K93 wurden 9, in L00-L99 wurden drei, in M00-M99 wurden 11, in N00-N99 wurden 5, in R00-R99 wurde eine und in Z00-Z99 wurden zwei der jeweiligen Hauptgruppe zugeordneten Nebendiagnosen registriert. Zu den Hauptgruppen A00-B99, C00-D48, H60-H95, O00-O99, P00-P96, Q00-Q99, S00-T98, V01-Y84 und U00-U99 wurden keine Nebendiagnosen innerhalb des Patientenkollektivs registriert.

Tabelle 5.9: Darstellung der Nebendiagnosen in Gruppen (nach ICD-10).

ICD-10 Code	Diagnose	Häufigkeit	davon HLA- DRB1*1501 positiv	Summe
D50-D90	Thalassemia major	1	1	1
E00-E90	Adipositas	1		16
	Diabetes mellitus Typ 2	3	3	
	euthyreote Struma	1	1	
	Hypercholesterinämie	6	6	
	Hyperthyreose	2		
	Hypophyseninsuffizienz	1	1	
	Hypothyreose	2	1	
F00-F99	Akute Belastungsreaktion	1		19
	Angststörung	2		
	Depressionen	6	3	
	Dyssomnie	1	1	
	Fatiguesyndrom	4	3	
	mild cognitive Impairment	2	1	
	Psychose	1	1	
	Psychosomatose	1	1	
	somatopsychische Reaktion	1	1	
	Zwangsstörung	1		
G00-G99	diabetische Polyneuropathie	1	1	14
	Epilepsie	1		
	Migräne	7	2	
	Myopathie unklarer Genese	1		
	Neuropathisches Schmerzsyndrom	2	2	
	postherpetiforme Neuralgie	1	1	
H00-H59	Glaukom	1	1	1
I00-I99	Art Hypertonus	11	6	14
	Z.n. Myokardinfarkt	1		
	Thrombophebitis	2	1	
J00-J99	Asthma Bronchiale	2		6
	Heuschnupfen	4	2	
K00-K93	Cholelithiasis	3	1	9
	rez. Cholezystitis	1	1	
	chron rez. Gastritis	1	1	
	HP-positive Gastritis	1	1	
	Hepathopathie	1		
	M. Crohn	1		
	Steatosis hepatis	1		
L00-L99	Livedo racemosa	1	1	3

	Neurodermitis	2	1	
M00-M99	Bandscheibenprolaps L4/5	2	1	11
	Bandscheibenprolaps BWK12/ LWK1	1		
	fibröse Dyplasie der Schädelknochen	1	1	
	rez. Lumbago	2		
	lumbales Wurzelreizsyndrom L4/5	1	1	
	rheumatische Erkrankung	1		
	Wurzelkompressionssyndrom L5- S1 links	1	1	
	Zervikalsyndrom	2		
N00-N99	Harnabflussstoerung durch abberierende Harnleiter	1	1	5
	Klimakterisches Syndrom	1	1	
	Niereninsuffizienz	2	1	
	oligosymptomatische Pyelonephritis	1	1	
R00-R99	pathologische Glukosetoleranz	1		1
Z00-Z99	Penicillinallergie	2	1	2

5.4. PCR-SSP HLA-Typisierung

In Tabelle 5.10 werden die Ergebnisse der HLA-Typisierung dargestellt. Um Unterschiede in der Häufigkeit der HLA-Merkmale festzustellen, wurde ein Chi-Quadrat Test und bei einer minimalen erwarteten Häufigkeit von <5 der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Dabei ist festzustellen, dass sich die meisten HLA-Merkmale zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterscheiden. Die Merkmale HLA-DRB1*01 (14,9% vs. 23,6%; $p = 0,041$), HLA-DRB1*07 (14,2% vs. 22,8%; $p = 0,042$) und HLA-DRB1*14 (2,8% vs. 8,0%; $p = 0,042$) sind in der Patientengruppe signifikant seltener nachweisbar als in der Kontrollgruppe. HLA-DRB1*1501 als heterozygotes (53,9% vs. 24,5%; $p < 0,001$) und als homozygotes (6,4% vs. 1,3%; $p = 0,011$) Merkmal sind in der Patientengruppe signifikant häufiger nachweisbar als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 5.10: Häufigkeiten der verschiedenen HLA-Merkmale in der Patienten- (n=141) und Kontrollgruppe (n=237). Die Signifikanz wurde mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson und bei einer erwarteten Häufigkeit <5 mit dem exakten Test nach Fisher (a) bestimmt.

	Patienten n (%)	Kontrollgruppe n (%)	p-Wert
Ambiguitäten vorhanden	10 (7,1)	16 (6,8)	
HLA-DRB1*01	21 (14,9)	56 (23,6)	0,041
HLA-DRB1*03	28 (19,9)	57 (24,1)	
HLA-DRB1*03 homozygot	0 (0,0)	1 (0,4)	
HLA-DRB1*04	28 (19,9)	53 (22,4)	
HLA-DRB1*07	20 (14,2)	54 (22,8)	0,042
HLA-DRB1*08	11 (7,8)	15 (6,3)	
HLA-DRB1*09	1 (0,7)	4 (1,7)	
HLA-DRB1*10	2 (1,4)	5 (2,1)	
HLA-DRB1*11	30 (21,3)	57 (24,1)	
HLA-DRB1*12	6 (4,3)	13 (5,5)	
HLA-DRB1*13	35 (24,8)	51 (21,5)	
HLA-DRB1*14	4 (2,8)	19 (8,0)	0,042
HLA-DRB1*1501	76 (53,9)	58 (24,5)	<0,001
HLA-DRB1*1501 homozygot	9 (6,4)	3 (1,3)	0,011 (a)
HLA-DRB1*1502	0 (0,0)	4 (1,7)	
HLA-DRB1*1516	0 (0,0)	1 (0,4)	
HLA-DRB1*16	1 (0,7)	7 (3,9)	
	282	474	

5.5. Analysegruppe

5.5.1. Definition der Analysegruppe

Um bei der Analyse möglichst valide und vergleichbare Daten zu erhalten, wurde mittels SPSS 17.0 ein Filter definiert. Hiernach wurden nur die Patienten eingeschlossen, bei denen eine schubförmig verlaufende Multiple Sklerose (RRMS) diagnostiziert wurde, die entweder mit Glatirameracetat oder einem Interferonpräparat (Interferon- β -1a oder Interferon- β -1b) behandelt wurden und bei denen innerhalb des Beobachtungszeitraums kein Therapiewechsel stattgefunden hat. Von ursprünglich 141 eingeschlossenen Patienten erfüllen nach den von uns definierten Voraussetzungen 54 Patienten die Kriterien für die weitere Analyse und werden in die weitere Berechnung einbezogen (siehe Tabelle 5.14).

5.5.2. Basisdaten

5.5.2.1. Alter und Geschlecht

In Tabelle 5.11 werden Die Alters- und Geschlechterverteilung innerhalb des Analysekollektivs dargestellt.

Tabelle 5.11: Darstellung der Alters- und Geschlechterverteilung innerhalb des Analysekollektivs.

	jünger als 29 Jahre	29 - 38 Jahre	38 - 46 Jahre	älter als 46 Jahre	Gesamt
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
männlich (11,1%)	0 (0,0)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	6 (100,0)
weiblich (88,9%)	3 (6,3)	13 (27,1)	24 (50,0)	8 (16,7)	48 (100,0)
Gesamt (100,0%)	3 (5,6)	15 (27,8)	26 (48,1)	10 (18,5)	54 (100,0)

5.5.2.2. Alter bei Diagnosestellung und Zeit bis Therapiebeginn

In Tabelle 5.12 ist das Alter der Patienten in der Analysegruppe dargestellt. Der Mittelwert beträgt 35,3 Jahre bei einer SD von 7,58 Jahren. Der Median beträgt 34,5 Jahre. Der jüngste Patient war bei Diagnosestellung 23,0 Jahre und der älteste 58,0 Jahre alt.

Tabelle 5.12: Alter bei Diagnosestellung

N	Gültig	54
	Fehlend	0
Mittelwert		35,2963
Median		34,5000
Standardabweichung		7,58258
Minimum		23,00
Maximum		58,00

In Tabelle 5.13 ist die Zeit von der Diagnosestellung bis zum Therapiebeginn in der Patientengruppe dargestellt. Der Median bis zum Therapiebeginn betrug 10,5 Monate, der Mittelwert 35,4 Monate und die SD 51,13 Monate. Das Minimum lag bei 0 Monaten und das Maximum bei 193,0 Monaten.

Tabelle 5.13: Zeit von der Diagnosestellung bis zum Therapiebeginn

Gruppe Analyse		
N	Gültig	66
	Fehlend	13
Mittelwert		35,3939
Median		10,5000
Standardabweichung		51,12966
Minimum		,00
Maximum		193,00

5.5.3. Medikamentenverteilung in der Analysegruppe

Die in Tabelle 5.14 dargestellten prozentualen Verteilungen der Medikamente beziehen sich auf die Gruppe der Patienten, die in die Analyse einbezogen werden. Insgesamt konnten diese Informationen bei 54 Patienten ausgewertet werden. Mit Glatirameracetat (Copaxone®) wurden 20 Patienten (37,0%), mit Interferon-β-1a (Avonex®) 8 (14,8%), mit Interferon-β-1a (Rebif®) 7 (13,0%) und mit Interferon-β-1b (Betaferon®) 19 (35,2%) der Patienten während des Beobachtungszeitraums behandelt.

Tabelle 5.14: Darstellung der Verteilung der Medikamente in der Patientengruppe, die in die Analyse einbezogen werden

	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Glatirameracetat (Copaxone®)	20	37,0	37,0
Interferon-β-1a (Avonex®)	8	14,8	51,9
Interferon-β-1a (Rebif®)	7	13,0	64,8
Interferon-β-1b (Betaferon®)	19	35,2	100,0
Gesamt	54	100,0	

5.5.4. Schübe im Beobachtungszeitraum

Tabelle 5.15 zeigt die Schubhäufigkeit innerhalb der Analysegruppe abhängig von HLA-Typisierung und Medikation. Insgesamt konnten diese Informationen bei 51 Patienten ausgewertet werden. Bei 3 Patienten fehlten die Informationen bezüglich der Schubhäufigkeit. Es fällt auf, dass in beiden Gruppen die Gruppen der Patienten „ohne Schub“ am größten ist (48,3% und 54,5%). Weiterhin ist zu erwähnen, dass in der Gruppe der mit GA behandelten Patienten sowohl in der Gruppe der HLA-DRB1*1501-positiven als auch in der Gruppe der HLA-DRB1*1501-negativen Patienten jeweils ein Patient mit 5 Schüben innerhalb des Beobachtungszeitraums zu finden war. Unter den mit Interferon-β-1a behandelten fand sich ein Patient mit 4 Schüben in der Gruppe der HLA-DRB1*1501-positiven. Unter den mit Interferon-β-1b Behandelten hatte kein Patient mehr als zwei Schübe innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Wenn man die Schübe auszählt und eine Schubrate für den Beobachtungszeitraum berechnet ergeben sich für die Gruppe „HLA-DRB1*1501-positiv“ insgesamt 29 Schübe bei 29 Patienten (1,00 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate). Bei Betrachtung

jedes einzelnen Medikamentes ergeben sich für Glatirameracetat 16 Schübe bei 12 Patienten (1,33 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate), Interferon- β -1a 7 Schübe bei 6 Patienten (1,16 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate) und für Interferon- β -1b 6 Schübe bei 11 Patienten (0,54 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate). Für die Gruppe „HLA-DRB1*1501-negativ“ ergeben sich insgesamt 17 Schübe bei 22 Patienten (0,77 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate). Bei Betrachtung jedes einzelnen Medikaments in dieser Gruppe resultieren für GA 10 Schübe bei 8 Patienten (1,25 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate), Interferon- β -1a 4 Schübe bei 8 Patienten (0,50 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate) und für Interferon- β -1b 3 Schübe bei 6 Patienten (0,50 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate).

Tabelle 5.15: Anzahl und Prozentwerte der Schübe abhängig von HLA-Typisierung und Medikation.

		Glatirameracetat	Interferon- β 1-a	Interferon- β 1-b	Gesamt
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
HLA-DRB1*1501					
positiv	kein Schub	5 (41,7)	3 (50,0)	6 (54,5)	14 (48,3)
	ein Schub	3 (25,0)	1 (16,7)	4 (36,4)	8 (27,6)
	zwei Schübe	1 (8,3)	1 (16,7)	1 (9,1)	3 (10,3)
	drei Schübe	2 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,9)
	4 Schübe	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (3,4)
	5 Schübe	1 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,4)
	Gesamt	12 (100,0)	6 (100,0)	11 (100,0)	29 (100,0)
HLA-DRB1*1501					
negativ	kein Schub	5 (62,5)	3 (37,5)	4 (66,7)	12 (54,5)
	ein Schub	0 (0,0)	3 (37,5)	1 (16,7)	4 (18,2)
	zwei Schübe	1 (12,5)	2 (25,0)	1 (16,7)	4 (18,2)
	drei Schübe	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,5)
	4 Schübe	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	5 Schübe	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,5)
	Gesamt	8 (100,0)	8 (100,0)	6 (100,0)	22 (100,0)

5.6. EDSS: Entwicklung, Verteilung und Vergleich

5.6.1. EDSS-Werte zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Monat

In Tabelle 5.16 werden der Median und der Mittelwert des EDSS zu Beobachtungsbeginn, nach 12 und nach 24 Monaten dargestellt. Zu Beobachtungsbeginn beträgt der Mittelwert 2,05 nach 12 Monaten 1,94 und nach 24 Monaten 2,03. Der Median war gleich bleibend und betrug zu Beginn, nach 12 und nach 24 Monaten 2,00.

Tabelle 5.16: Median und Mittelwerte des EDSS zu Beobachtungsbeginn, nach 12 und nach 24 Monaten.

		EDSS-Wert	EDSS-Wert	EDSS-Wert
		Beginn	12-Monate	24-Monat
N	Gültig	54	50	49
	Fehlend	0	4	5
Mittelwert		2,046	1,940	2,032
Median		2,000	2,000	2,000

5.6.2. EDSS-Verteilung zu Beginn

In Tabelle 5.17 und Abbildung 5.2 werden die EDSS-Werte zu Beobachtungsbeginn bei den Patienten mit MS-Medikation abhängig von der jeweiligen Therapie dargestellt. Am häufigsten wurden die EDSS-Werte 1,0 (22,2%) und 2,0 (35,2%) gefunden. Insgesamt hatten 85,1% der Patienten zu Beginn der Untersuchung einen EDSS-Wert von kleiner oder gleich 3,0. Die weiteren genauen Werte könne der Tabelle 5.17 entnommen werden.

Tabelle 5.17: Darstellung des EDSS zu Beobachtungsbeginn in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

EDSS-Wert Beginn	Glatirameracetat (Copaxone®)	Interferon-β-1a (Avonex®)	Interferon-β-1a (Rebif®)	Interferon-β-1b (Betaferon®)	Gesamt
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
,0	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (10,5)	3 (5,6)
1,0	4 (20,0)	1 (12,5)	3 (42,9)	4 (21,1)	12 (22,2)
1,5	1 (5,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	4 (7,4)
2,0	6 (30,0)	2 (25,0)	2 (28,6)	9 (47,4)	19 (35,2)
2,5	1 (5,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,7)
3,0	4 (20,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (5,3)	6 (11,1)
3,5	1 (5,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (5,3)	3 (5,6)
4,0	2 (10,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (5,3)	4 (7,4)
5,0	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (1,9)
Gesamt	20 (100,0)	8 (100,0)	7 (100,0)	19 (100,0)	54 (100,0)

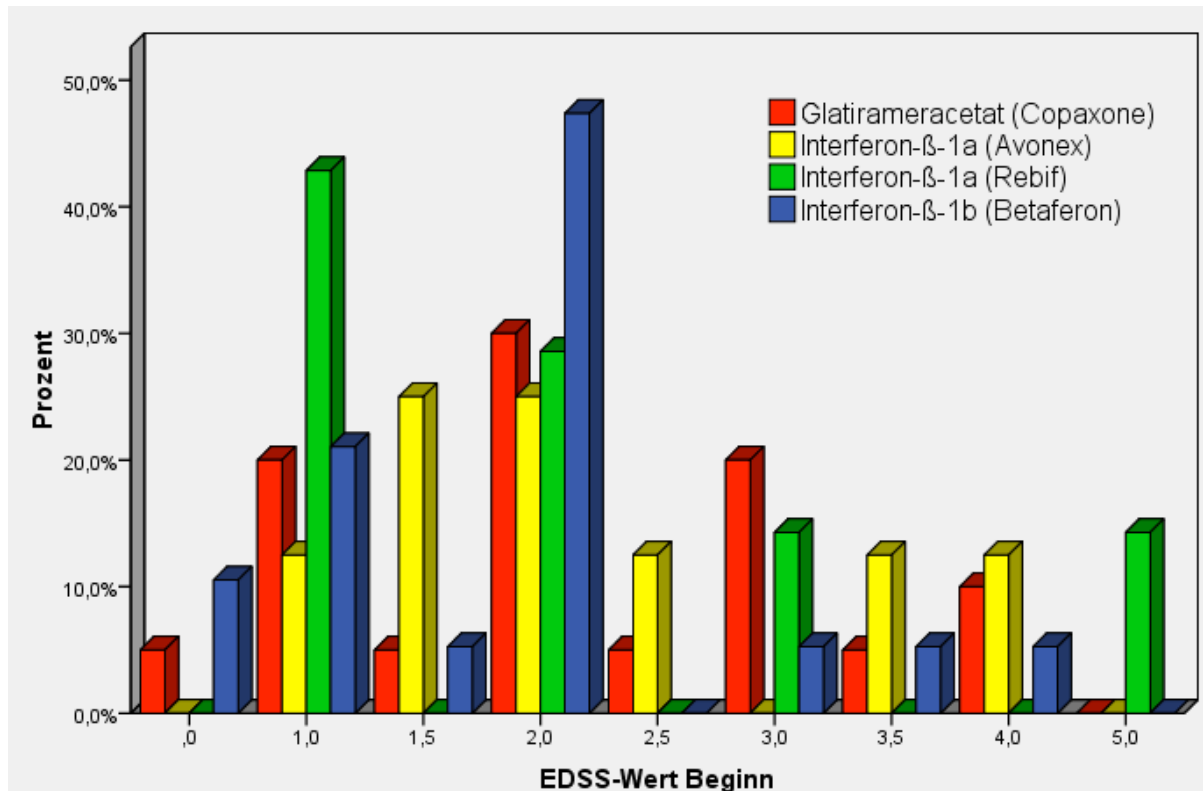


Abbildung 5.2: Balkendiagramm zur Darstellung des EDSS zu Beobachtungsbeginn in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

5.6.3. EDSS-Entwicklung in den Behandlungsgruppen

Die Entwicklung des EDSS in den verschiedenen Behandlungsgruppen über die 24 Monate wird in Tabelle 5.18, Tabelle 5.19 und Tabelle 5.20 dargestellt. Die EDSS-Differenz (a) beschreibt die EDSS Entwicklung über 24 Monate. Hier wurde der EDSS-Wert zu Beginn vom EDSS-Wert nach 24 Monaten abgezogen. Ein negatives Vorzeichen der EDSS-Differenz beschreibt also eine klinische Verbesserung um die entsprechenden Punkte, wobei positive Werte eine Verschlechterung darstellen. Des Weiteren kann man in dieser Tabelle sehen, wie häufig welche Änderung im EDSS nach 24 Monaten in den verschiedenen Behandlungsgruppen abhängig von der HLA-Typisierung aufgetreten sind, sowie die Anzahl der in jeweiligen Behandlungsgruppen ausgewerteten Patienten. Insgesamt konnten die Daten von 49 Patienten ausgewertet werden. Bei diesen Patienten lag der vollständige 24-Monatsverlauf des EDSS (siehe Tabelle 5.16) vor.

Tabelle 5.18: Darstellung der Häufigkeiten der Entwicklung des EDSS und Verteilung der Patienten bei **Glatirameracetat** (HLA-DRB1*1501 positiv n=12, fehlend n= 0, Gesamt n=12; HLA-DRB1*1501 negativ n=7, fehlend n= 1, Gesamt n=8); (a) = EDSS-Differenz über 24 Monate.

Glatirameracetat	(a)	Häufigkeit	Prozente
HLA-DRB1*1501 positiv	-0,5	1	8,3
	0,0	9	75,0
	1,0	2	16,7
Gesamt		12	100,0
Mittelwert	0,125		
Median	0,000		
HLA-DRB1*1501 negativ	-1,0	1	14,3
	0,0	4	57,5
	0,5	1	14,3
	1,0	1	14,3
Gesamt		7	100,0
Mittelwert	0,071		
Median	0,000		

Tabelle 5.19: Darstellung der Häufigkeiten der Entwicklung des EDSS und Verteilung der Patienten bei **Interferon-β 1a** (HLA-DRB1*1501 positiv n=6, fehlend n= 0, Gesamt n=6; HLA-DRB1*1501 negativ n=8, fehlend n= 1, Gesamt n=9); (a) = EDSS-Differenz über 24 Monate.

Interferon-β 1-a	(a)	Häufigkeit	Prozente
HLA-DRB1*1501 positiv	-2,0	1	16,7
	-0,5	1	16,7
	0,0	3	50,0
	0,5	1	16,7
Gesamt		6	100,0
Mittelwert	-0,333		
Median	0,000		
HLA-DRB1*1501 negativ	-2,5	1	12,5
	-1,0	1	12,5
	-0,5	1	12,5
	0,0	3	37,5
	0,5	1	12,5
	1,0	1	12,5
Gesamt		8	100,0
Mittelwert	-0,313		
Median	0,000		

Tabelle 5.20: Darstellung der Häufigkeiten der Entwicklung des EDSS und Verteilung der Patienten bei **Interferon-β 1b** (HLA-DRB1*1501 positiv n=10, fehlend n= 1, Gesamt n=11; HLA-DRB1*1501 negativ n=6, fehlend n= 2, Gesamt n=8); (a) = EDSS-Differenz über 24 Monate.

Interferon-β 1-b	(a)	Häufigkeit	Prozente
HLA-DRB1*1501 positiv	-2,0	1	10,0
	0,0	7	70,0
	1,0	2	20,0
Gesamt		10	100,0
Mittelwert	0,000		
Median	0,000		
HLA-DRB1*1501 negativ	-0,5	1	16,7
	0,0	2	33,3
	0,5	2	33,3
	1,0	1	16,7
Gesamt		6	100,0
Mittelwert	0,250		
Median	0,250		

5.6.4. Vergleich der EDSS-Differenzen

In Tabelle 5.21 werden die verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich ihrer mittleren 24-Monats-EDSS-Differenz und des Vorhandenseins bzw. Fehlens von HLA-DRB1*1501 mittels einer UNIANOVA miteinander verglichen. Innerhalb der HLA-DRB1*1501-positiven Patienten kann zwischen keiner der Behandlungen ein signifikanter p-Wert gefunden werden. Die zu Beginn der Auswertung beschriebene Nullhypothese kann also nicht verworfen werden und es besteht bei Vorhandensein von HLA-DRB1*1501 kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Glatirameracetat (Copaxone®) und anderen zur Initialbehandlung der RRMS eingesetzten immunmodulatorisch wirksamen Substanzen. Das gleiche Ergebnis ergibt sich auch für die Gruppe der HLA-DRB1*1501 negativen Patienten.

Tabelle 5.21: Vergleich der Medikation in Abhängigkeit vom EDSS und dem Merkmal HLA-DRB1*1501 mittels UNIANOVA. Basiert auf den geschätzten Randmitteln (a) Anpassung für Mehrfachvergleiche: Geringste signifikante Differenz (entspricht keinen Anpassungen). (*) Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

HLA-Typisierung (I)		(J)	Mittlere 24-Monats EDSS-Differenz (I-J)	Sig. ^a	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^a	
					Untergrenze	Obergrenze
HLA-DRB1*1501 positiv	Glatirameracetat	Interferon-β 1-a	,458	,221	-,286	1,203
		Interferon-β 1-b	,125	,695	-,513	,763
	Interferon-β 1-a	Glatirameracetat	-,458	,221	-1,203	,286
		Interferon-β 1-b	-,333	,387	-1,102	,436
	Interferon-β 1-b	Glatirameracetat	-,125	,695	-,763	,513
		Interferon-β 1-a	,333	,387	-,436	1,102
HLA-DRB1*1501 negativ	Glatirameracetat	Interferon-β 1-a	,384	,321	-,387	1,155
		Interferon-β 1-b	-,179	,666	-1,007	,650
	Interferon-β 1-a	Glatirameracetat	-,384	,321	-1,155	,387
		Interferon-β 1-b	-,563	,166	-1,367	,242
	Interferon-β 1-b	Glatirameracetat	,179	,666	-,650	1,007
		Interferon-β 1-a	,563	,166	-,242	1,367

6. Diskussion

6.1. Einführung

Um die Ergebnisse der hier beschriebenen Studie zu diskutieren wird zunächst kurz auf die Schwierigkeiten bei der Durchführung der Studie hingewiesen. Anschließend werden die Basisdaten im Vergleich mit der aktuellen Literatur erläutert. Darauf folgt die Bewertung der Ergebnisse der HLA-Typisierung sowie der primären und sekundären Endpunkte.

6.2. Methodenkritik

Bei der Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Studie, fielen mehrere Schwierigkeiten und Limitationen auf. In den teilnehmenden Praxen und der Klinik kamen verschiedene Dokumentationssysteme zum Einsatz. Die Dichte der Patientendaten variierte zwischen den Praxen der MSAGN und der Klinik. Daraus resultiert die geringe Fallzahl an auswertbaren Daten bezüglich klinisch definierter Endpunkte. Die beschriebene Differenz in der Geschlechterverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zu Gunsten von Patientinnen ließ sich durch den Einschluss von mehr männlichen Probanden nicht ausgleichen.

Die fehlende Verblindung der Patienten und behandelnden Ärzte für die Therapien birgt die Möglichkeit einer Verzerrung in der Häufigkeitsverteilung der immunmodulierenden Medikamente. Die „Einnahmetreue“ oder Adhärenz zu einer Substanz wie INF- β 1a, INF- β 1b oder Copaxone läßt sich nicht ausreichend erfassen. Damit ist eine verlässliche Beurteilung der Wirksamkeit dieser Substanzen in dieser Kohorte erschwert und verdeutlicht die generelle Problematik einer geringeren Aussagekraft von retrospektiven erhobenen Daten in Beobachtungsstudien. Dennoch kann diese Beobachtung einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Multiplen Sklerose liefern (Rieckmann, 2008). Bei Durchführung einer retrospektiven Datenanalyse bzw. Beobachtungsstudie können beispielsweise die bestehenden Richtlinien zur Behandlung (Gold and Hartung, 2008) besser beachtet werden, ohne das evtl. Nachteile für die Patienten entstehen oder die Ergebnisse von Evidenz-Klasse-III-Studien missachtet würden.

6.3. Vergleich der Basisdaten

Um die von uns erhobenen Basisdaten zu vergleichen und einordnen zu können lässt sich am besten das MS-Register in Deutschland zu Rate ziehen. Die hier systematisch erhobenen Daten verfolgen das Ziel, verlässliche Angaben zur Prävalenz der Erkrankung, deren Unterformen, der Therapie und den verschiedenen Umgebungs- und sozialen Faktoren machen zu können (Flachenecker et al., 2005; Flachenecker et al., 2008). Die Repräsentativität der Daten der in dieser Studie beteiligten Patienten, kann anhand dieser Veröffentlichung besonders gut dargestellt werden.

In dieser Arbeit ergibt die in den Tabellen 5.1 und 5.11 dargestellte Geschlechterverteilung ein Verhältnis von w:m von 5,7:1 unter allen eingeschlossenen Patienten bzw. von 8:1 in der Analysegruppe. Weiterhin ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Patienten- (s.o.) und Kontrollgruppe (w:m entspricht 2,9:1). Die Geschlechterverteilung in der Patientengruppe entspricht somit nicht der für die MS in der Literatur beschriebenen von 2:1 bis zu 3,2:1 (w:m) (Confavreux et al., 1980; Flachenecker et al., 2005; Orton et al., 2006; Sadovnick, 2009; Steinman, 1993). Es ist anhand dieser Beobachtung festzustellen, dass die Randomisierung bezüglich der Geschlechterverteilung in der Patienten- und Analysegruppe nicht vollständig zufriedenstellend war. Die Frage, ob evtl. das Patientenkollektiv der partizipierenden Praxen der MSAGN nicht der in der Literatur beschriebenen Geschlechterverteilung entspricht, ist nicht mit Sicherheit zu verneinen, jedoch geben hier die Daten des MS-Registers den Hinweis, dass dies nicht so ist. Hier wurde z.B. in einer Subgruppe von 231 Patienten für Hamburg ein Geschlechterverhältnis (w:m) von 3,5:1 beschrieben (Flachenecker et al., 2005). Bei der Betrachtung des Alters der Patienten bei Diagnosebeginn (Tabelle 5.4) kann man feststellen, dass hier eine gute Vergleichbarkeit z.B. mit dem deutschen MS-Register (Flachenecker and Stuke, 2008; Flachenecker et al., 2005; Flachenecker et al., 2008), einer großen kanadischen Stichprobe von 1996 (Ramagopalan et al., 2009; Sadovnick et al., 1998), sowie einer Studie zum Krankheitsverlauf der MS (Tremlett et al., 2006) besteht. Im Vergleich der Altersverteilung zwischen der Patienten- und Kontrollgruppen fällt jedoch auf, dass diese sich in den beiden Gruppen signifikant unterscheidet ($p < 0,001$). In der Kontrollgruppe liegt der Anteil an unter 29-jährigen höher und der an 38-46-jährigen niedriger als unter den Patienten.

Bezüglich der Altersverteilung zwischen der Gruppe mit allen eingeschlossenen Patienten und der Analysegruppe waren kleinere und größere Unterschiede in allen Gruppen feststellbar („jünger als 29 Jahre“ (11,3% vs. 5,6%), 29 – 38 Jahre (30,5% vs. 27,8%), 38 – 46 Jahre (33,3% vs. 48,1%) und älter als 46 Jahre (24,8% vs. 18,5%)). Es muss allerdings bemerkt werden, dass in beiden Gruppen der Hauptteil der Patienten zwischen 29 und 46 Jahren (64,1% vs. 75,9%) alt war. Der Median des „Alters bei Diagnosestellung“ (33,00 Jahre vs. 34,50 Jahre) (siehe 5.3.1 und 5.5.2.2) und die Verteilung um den Mittelwert ($33,80 \pm 8,66$ vs. $35,30 \pm 7,58$) gliedern sich bezüglich ihrer Ergebnisse in die in der Einleitung (siehe 3.2.1) erwähnten epidemiologischen Untersuchungen ein (Confavreux et al., 1980; Flachenecker et al., 2005; Sadovnick, 2009).

Zu den erhobenen Basisdaten gehören außerdem die „Zeit von der Diagnose bis zum Therapiebeginn“ sowie die Art der „Nebendiagnosen“.

Der Median der „Zeit von der Diagnose bis zum Therapiebeginn“ war in der Analysegruppe kürzer als in der Gruppe mit allen Patienten (10,5 Monate vs. 25,0 Monate). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass diese Gruppe aufgrund der von uns formulierten Filterkriterien [RRMS + (Glatirameracetat oder Interferontherapie) + kompletter 24-Monats-Therapieverlauf] homogener war. In dieser Gruppe waren z.B. Patienten, die noch nie immunmodulatorisch behandelt wurden oder Patienten mit SPMS und PPMS bereits ausgeschlossen. In diesem Zusammenhang sei erneut auf den Vorteil eines möglichst frühen Therapiebeginns hingewiesen (siehe 3.2.1) (Comi et al., 2001a; Comi et al., 2009; Coyle, 2008; Garcea et al., 2009).

Die in dieser Studie verglichenen Therapien entsprechen in ihrer Verteilung (siehe Tabelle 5.7) für Glatirameracetat und Natalizumab in etwa der Marktverteilung im Norddeutschen Raum. Für IFN- β -1a- (Avonex & Rebif®) liegen sie leicht darunter und für IFN- β -1b (Betaferon®) darüber (persönliche Kommunikation mit Hans-Dieter Weimar, Sanofi-Aventis Deutschland). Exakte Daten sind leider nicht verfügbar.

Die von uns gefundenen und nach ICD-10 kodierten „Nebendiagnosen“ (siehe 5.3.4) stammten vor allem aus den Bereichen der psychischen Erkrankungen und Verhaltensstörungen (19-mal), den endokrinen, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten (16-mal), den Krankheiten des Nervensystems (14-mal), den Krankheiten des Kreislaufsystems (14-mal) und den Krankheiten des Muskel-Skelettsystems und des Bindegewebes (11-mal). Seltener konnten Erkrankungen

des Verdauungssystems (9-mal), Krankheiten des Atmungssystems (6-mal) Krankheiten des Urogenitalsystems (5-mal), Krankheiten der Haut und der Unterhaut (3-mal), Faktoren, die den Gesundheitszustand beeinflussen (2-mal), Krankheiten des Blutes und der blutbildenden Organe, Krankheiten des Ohres und andernorts nicht klassifizierte Symptome und Laborbefunde (jeweils 1-mal) gefunden werden. Hierbei fällt auf, dass Patienten, die HLA-DRB1*1501 positiv getestet wurden besonders häufig (12/16) von Erkrankungen der Hauptgruppe E00-E90 (Endokrine, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten) betroffen waren. Innerhalb dieser Gruppe fiel zudem auf, dass alle Fälle von Diabetes mellitus Typ 2 (3/3) und Hypercholesterinämie (6/6) auf die HLA-DRB1*1501 positiven Patienten fiel. Die Bedeutung des HLA-Systems für chronische Erkrankungen autoimmuner Genese wurde in diversen Studien untersucht und besonders der Zusammenhang zwischen dem HLA System und Diabetes mellitus Typ 1 sei hier hervorgehoben (Baschal et al., 2012; Howson et al., 2011; Nakanishi and Saitoh, 2011; Noble et al., 2010; Vandiedonck et al., 2011). Erwähnenswert ist dies, da in unserem Kollektiv keine Fälle von Diabetes mellitus Typ 1 bei den HLA-DRB1*1501 positiv getesteten Patienten gefunden wurden. Bei der MS besteht der Zusammenhang zwischen HLA-System und Erkrankung im Haplotyp HLA-A3-B7-Cw7-DR15, welcher ebenfalls assoziiert ist mit dem Auftreten von systemischem Lupus erythematodes, auf der anderen Seite jedoch in Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 1 einen protectiven Effect zeigt (Barcellos et al., 2003; Larsen and Alper, 2004). Die molekularen Mechanismen, die Ursache dieser Erkrankungen sind liegen beispielsweise in haplotypisch unterschiedlicher Genexpression, unterschiedlichem alternativen Splicing und vielfältiger intergenischer Transkription (Vandiedonck et al., 2011).

Bezüglich der dokumentierten Nebendiagnosen ist zu erwähnen, dass sich diese Daten auf die Akteneinsicht bei den Mitgliedern der MSAGN stützen. Daher wäre es einerseits möglich, dass neurologische Erkrankungen hier überrepräsentiert sind, andererseits kommen weitere, als neurologisch und psychisch klassifizierte Erkrankungen, als Ko-Morbiditäten der Multiplen Sklerose gehäuft vor (Compston and Coles, 2008; Henze et al., 2006; Olek, 2010; Ziemssen, 2009).

6.4. Vergleich der HLA-Typisierung

Die in Tabelle 5.10 dargestellten Ergebnisse der HLA-Typisierung haben die bereits bekannten Ergebnisse diverser Studien (Ramagopalan and Ebers, 2009; Schmidt et al., 2007) bestätigt und beschreiben diese für den Großraum Hamburg. So finden sich die Ergebnisse bezüglich des Merkmals HLA-DRB1*1501 z.B. in der in Abschnitt 3.1.2 erwähnten Metaanalyse von Schmidt et al. (Schmidt et al., 2007) wieder. Die Assoziation der MS mit weiteren HLA-Klasse-II-Merkmalen wurde zudem detaillierter in einer Übersichtsarbeit von Ramagopalan et al. (Ramagopalan et al., 2009) zusammengefasst. Die von uns in der Patientengruppe gefundene negative Assoziation der Merkmale HLA-DRB1*01, *07, *14 mit der Multiplen Sklerose wurde hier ebenfalls beschrieben und dargestellt. Die Assoziation mit weiteren Merkmalen wie HLA-DRB1*03, *04, *08, *09, *10, *11, *12 und *13 konnte von uns nicht reproduziert werden. Diese Merkmale sind jedoch in den aufgeführten Studien nicht vorrangig für Nordeuropa (außer HLA-DRB1*03 für Schweden) sondern für andere Regionen und Länder wie Südeuropa (Italien, Sizilien, Sardinien, Spanien, Malta), Ost-Asien (Japan), den Mittleren Osten (Israel) und Nordamerika (Kanada) beschrieben worden (Ramagopalan and Ebers, 2009).

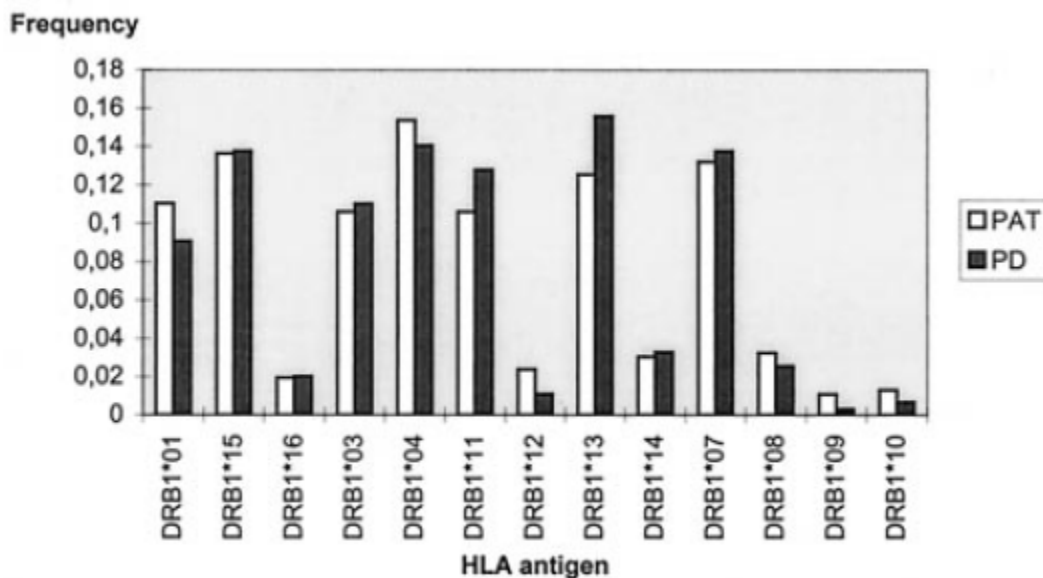


Abbildung 6.1: HLA-DRB1 Verteilung in einer Gruppe von 231 Patienten und deren 821 nicht verwandten potentiellen Stammzell-Spendern; (PAT = Patienten; PD = nichtverwandte potentielle Stammzell-Spender); aus Knipper et al. 2000 (Knipper, 2000).

Die Verteilung der HLA-Merkmale in der Kontrollgruppe entspricht der in einer Untersuchung an 231 deutschen Patienten und deren 821 nicht-verwandten

potentiellen Stammzell-Spendern (unrelated potential stem cell donors, USCD) (Knipper et al., 2000). Wenn man die Ergebnisse dieser Untersuchung (siehe Abbildung 6.1) mit dieser Studie (siehe Tabelle 5.10) vergleicht, ergeben sich zwischen den beiden Gruppen (Kontrollgruppe vs. USCD) sehr ähnliche Ergebnisse für alle HLA-DRB1-Allele. Es kann somit festgestellt werden, dass unsere Studie die Ergebnisse bezüglich der Verteilung der HLA-DRB1-Allele in Patienten- und Kontrollgruppe valide reproduzieren konnte.

6.5. Vergleich der primären und sekundären Endpunkte

Bei Betrachtung der Ergebnisse des primären Endpunktes EDSS in unserer Studie fällt auf, dass keine statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen Therapien, weder in der Gruppe der HLA-DRB1*1501-positiven noch der HLA-DRB1*1501-negativen, berechnet werden konnte.

Die in Abschnitt 3.3 aufgestellte Nullhypothese kann weder bezüglich des primären, noch des sekundären Endpunktes verworfen werden.

Unsere Daten bestätigen somit eine bereits veröffentlichte retrospektive Studie an einem grösseren Patientenkollektiv, die die Wirksamkeit von Glatirameracetat im Vergleich mit Interferon- β untersuchte (Gross et al., 2010). Die Wirksamkeit der von uns untersuchten Therapien wurde in den entsprechenden Zulassungsstudien eindeutig bewiesen (IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 2001; Jacobs et al., 1996; Johnson et al., 1995; PRISM Study Group, 1998). Wenn man nun weitere Studien betrachtet, die die verschiedenen immunmodulatorisch wirksamen Therapien miteinander vergleichen, fällt auf, dass in diesen Studien nur minimale Vorteile im Vergleich der Substanzen herausgearbeitet werden konnten. Als Beispiele seien hier vor allem die BECOME- (Cadavid et al., 2009), REGARD- (Mikol et al., 2008) und BEYOND-Studie (O'Connor et al., 2009) genannt. In diesen Studien wird GA (Copaxone®) mit Interferon-Präparaten (Betaferon® & Rebif®) vergleichen. Die BECOME-Studie (Cadavid et al., 2009) vergleicht GA (Copaxone®) und IFN- β -1b (Betaferon®) in Hinblick auf MRT-Messdaten. In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied bei der Verringerung aktiver Läsionen oder in der Schubfrequenz nachgewiesen werden. Die REGARD-Studie (Mikol et al., 2008) [IFN- β -1a (Rebif®) vs. GA (Copaxone®)] fand keinen signifikanten Unterschied im primären (Zeit bis zum ersten Schub), sekundären (Zahl T1-hypointensen- und T2-

Läsionen) und tertiären (Subrate/Jahr) Endpunkt. Signifikant waren hingegen weniger Gadolinium-aufnehmende Laesionen unter IFN- β -1a- (Rebif®) und eine geringere Abnahme des Hirnvolumens unter GA-Therapie (Copaxone®). In der BEYOND-Studie (O'Connor et al., 2009) werden zwei verschiedene Dosierungen (250 μ g und 500 μ g) IFN- β -1b (Betaferon®) mit GA (Copaxone®) verglichen. In dieser Studie mit der höchsten Patientenzahl unter den Vergleichsstudien konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied im primären Endpunkt (Wahrscheinlichkeit eines Schubes) in den drei Behandlungsarmen gefunden werden. Eine weitergehende Auswertung der BEYOND Studie fand eine Überlegenheit von INF β 1b gegenüber Copaxone in der Verhinderung einer permanenten Gewebsschädigung, gemessen als sog. permanente „black holes“ (Filippi et al., 2011).

Die bereits in 3.3 erwähnten Ergebnisse von Fusco et al. (Fusco et al., 2001) nehmen hier ebenfalls am „Vergleichsstudienkarussell“ der Basistherapien teil und geben den Hinweis darauf, dass Glatirameracetat bei HLA-DRB1*1501-positiven Patienten evtl. einen Vorteil gegenüber einer Therapie mit Interferonen besitzen könnte. Unsere Ergebnisse widersprechen dieser Annahme. Sie entsprechen den Ergebnissen von Gross et al. (Gross et al., 2010) und Grossman et al. (Grossman et al., 2007). Gründe hierfür lassen sich möglicherweise an mehreren Stellen finden. Vergleicht man Postmarketing Studien, bei denen Interferone und Copaxone als Komparatoren dienten wie die EVIDENCE-Studie (Panitch et al., 2002; Panitch et al., 2005), die INCOMIN-Studie (Durelli et al., 2002) und eine 2006 veröffentlichte dänische Studie (Koch-Henriksen et al., 2006) so finden sich einige Besonderheiten. Die EVIDENCE-Studie zeigt eine Überlegenheit von IFN- β -1a (Rebif®) gegenüber IFN- β -1a (Avonex®) bezüglich der Schubhäufigkeit im Beobachtungszeitraum und der Läsionslast im MRT, nicht jedoch in der Entwicklung des EDSS über die Zeit. Die INCOMIN-Studie vergleicht IFN- β -1b (Betaferon®) mit IFN- β -1a (Avonex®) und zeigt die Überlegenheit von IFN- β -1b bezüglich Schubrate, Läsionslast im MRT und der Krankheitsprogression gemessen als EDSS. In der dänischen Studie konnte kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen IFN- β -1a (Rebif®) und IFN- β -1b (Betaferon®) bezüglich der Schubrate, der Zeit bis zum ersten Schub und der Krankheitsprogression festgestellt werden.

Bezüglich meiner Studie könnte eine höhere Fallzahl in den verschiedenen Therapiegruppen evtl. ein eindeutigeres Ergebnis liefern oder einen Zusammenhang

demaskieren. Eine weitere Möglichkeit, einen genaueren Einblick in den Verlauf der Erkrankung in Verbindung mit einer immunmodulatorischen Therapie und dadurch evtl. verlässlichere Ergebnisse bezüglich des Therapieerfolges zu erhalten, ist z.B. ein längerer Beobachtungszeitraum (Carroll, 2009).

Ein weiterer Kritikpunkt ist der EDSS (Kurtzke, 1983) als klinischer Verlaufssparameter, da er einige Qualitäten der Erkrankung nicht eindeutig mit einbezieht, anderen jedoch einen sehr hohen Stellenwert zuschreibt. Hier sind vor allem die schlechte Repräsentation auf die Krankheitsprogression bei einem hohen Score (EDSS $\geq 6,0$) (Kragt et al., 2006), eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit im unteren Score-Bereich, eine starke Konzentration auf die Gehfähigkeit im mittleren Score-Bereich, die eingeschränkte Beurteilung der oberen Extremität und die unzureichende Beachtung des emotionalen Befindens und der kognitiven Fähigkeiten der Patienten hervorzuheben (Rudick et al., 2009; Whitaker et al., 1995). Andere Scores, wie z.B. der MSFC (Cutter et al., 1999) sind vorhanden, jedoch gegenwärtig als Endpunkt in klinischen Studien nur selten zu finden (Rieckmann, 2008). Außerdem hat dieser Score ebenfalls nicht nur Vorteile zu bieten (Rudick et al., 2009). Die EDSS bleibt, trotz ihrer nicht-linearen und verzerrenden Systematik weiterhin die am weitesten verbreitete und vergleichbare Methode die Krankheitsprogression (Flachenecker et al., 2008) zu erfassen.

Bezüglich des sekundären Endpunktes "Schubanzahl" innerhalb des Beobachtungszeitraums konnte ebenfalls kein eindeutiges für eine der Therapien sprechendes Ergebnis gefunden werden. Anhand der in 5.5.4 beschriebenen und dargestellten Daten stellt sich aber die Frage, ob in den Gruppen der mit IFN- β -1b therapierten Patienten insgesamt weniger Schübe aufgetreten sind oder eine eventuelle Therapieumstellung, bei den mit Glatirameracetat behandelten Patienten mit 5 Schüben und dem mit Interferon- β -1a behandelten Patient mit 4 Schüben während des Beobachtungszeitraums, versäumt wurde.

Insgesamt war außerdem die Schubrate bei HLA-DRB1*1501-positiv getesteten Patienten höher als die der HLA-DRB1*1501-negativen (1,00 Schübe vs. 0,77 Schübe/ pro Patient/ 24 Monate), jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

In bisherigen Studien zum Krankheitsverlauf bzw. zur Krankheitsprogression beschreibt in diesem Zusammenhang eine 2010 veröffentlichte Studie einen früheren Beginn der Erkrankung bei Homozygotie (3.2 Jahre früher) und

Heterozygotie (1.3 Jahre) für das Merkmal HLA-DRB1*1501 (Van der Walt et al., 2011). Jedoch kann keine Assoziation mit der Schwere der Erkrankung, Kognitionsdefiziten oder zerebraler Atrophie gefunden werden. Ein Großteil der Studien, die hier in einer Übersicht gezeigt werden, kommen zu dem gleichen Ergebnis.

Hieran schließt sich die Frage, ob Patienten mit malignem Verlauf bzw. vielen Schüben in frühen Stadien der Erkrankung bisher nur schlecht oder gar nicht gefunden werden, an. Es wäre die frühe Identifikation dieser Patienten nötig und wünschenswert. Auf der einen Seite könnte so eher versucht werden, einen malignen Verlauf abzumildern. Auf der anderen Seite wäre es gut, genauer über den möglichen Verlauf der Erkrankung in Einzelfällen Bescheid zu wissen, um die Chance zu haben, Studien mit sehr differenzierten Patientenclustern durchzuführen. Dieser so wie der Frage nach möglichen Surrogat-Markern, die einen besseren klinischen Verlauf einer immunmodulatorischen Therapie voraussagen könnten, sollte in weiteren klinischen Studien nachgegangen werden. Bezogen auf die vorausgegangenen Überlegungen sollte bei zukünftigen Untersuchungen besonderes Augenmerk auf den Verlauf der MS unter der Therapie gelegt werden, um somit in Zukunft evtl. bessere Therapieentscheidungen treffen zu können (Rieckmann et al., 2004).

7. Zusammenfassung und Fazit

Zusammenfassend kann zunächst gesagt werden, dass unser hier beschriebenes Patientenkollektiv bezüglich der Basisdaten „Alter“ und „Alter bei Diagnosestellung“ gut randomisiert war und dem anderer Studien zum Therapievergleich und den Daten des MS-Registers Deutschland entspricht. Bezüglich der „Geschlechterverteilung“ und der Aussagekraft der dokumentierten „Nebendiagnosen“ bestehen jedoch Unterschiede, die sowohl der geringen Zahl der auswertbaren Patienten als auch der kurzen prospektiven Phase der Untersuchung geschuldet sind.

Die Ergebnisse der HLA-Typisierung beschreiben anhand eines großen Patientenkollektivs die Verteilung der HLA-DRB1-Allele für den Großraum Hamburg und reihen sich nahtlos in die bereits bekannten Ergebnisse zu den MHC-Klasse II Merkmalen ein.

Bezüglich des primären und sekundären Endpunktes konnte kein Unterschied in der Therapie bezüglich des EDSS im 24-Monatsverlauf und der Schubhäufigkeit zwischen Glatirameracetat, IFN- β -1a und IFN- β -1b bei HLA-DRB1*1501 -positiv oder -negativ getesteten Patienten mit schubförmig verlaufender multipler Sklerose gefunden werden.

Abschließend möchte ich auf die Sichtweise eines Übersichtsartikels über die Therapie mit Interferon- β -Präparaten, der bezüglich der Evidenz bei klinischen Studien Stellung bezieht, hinweisen: „Für den klinisch tätigen Neurologen sollte die Basis einer Therapie die klinische Evidenz einer Phase-III-Studie darstellen“ (Mäurer et al., 2001). Dieses Statement gilt somit uneingeschränkt weiterhin und so lange, bis eindeutige Beweise für oder gegen die Überlegenheit einer Substanz oder neue Therapieformen gefunden werden. Jedoch können, nicht zuletzt wegen möglicher ethischer Bedenken, z.B. auch standardisierte, anhand von Registern erhobene retrospektive Daten mit einer großen Fallzahl einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des Verlaufs unter den verschiedenen Therapieformen liefern (Carroll, 2009; Flachenecker and Stuke, 2008; Rieckmann, 2008). Die von uns bearbeitete Fragestellung kann hier einen Denkanstoß zur Durchführung weiterer Studien geben, sowie z.B. anhand der beschriebenen Register mit einer größeren Fallzahl reproduziert werden, und so einen Beitrag zur Optimierung der Versorgung von Multiplen Sklerose-Patienten liefern.

8. Protokolle

8.1. DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA (Blood) Mini Kit

8.1.1. Vorbereitung der Reagenzien und Geräte

- Abstrichpuffer: 400 ml dH₂O vorlegen, 5 ml Tris (1M pH7,4) und 12,5 ml SDS (10%) zugeben, dann mit dH₂O auf 500 ml auffüllen.
- Einen Beutel PBS-Fertigpuffer in 1000 ml dH₂O lösen (siehe 9.4).
- Proteinase K: Lyophilisat mit H₂O auf eine Konzentration von 20mg/ml verdünnen.
- Waschpuffer AW1 und AW2 (siehe 9.4):
 - Buffer AW1: Vor der Verwendung 125 ml Ethanol (siehe 9.4) zu dem 95 ml Konzentrat hinzufügen um 220 ml Puffer AW1 zu erhalten.
 - Buffer AW2: Vor der Verwendung 160 ml Ethanol zu dem 66 ml Konzentrat hinzufügen um 226 ml Puffer AW1 zu erhalten.
- Carrier RNA 2 mg in 0,5 ml Elution Buffer (Buffer AE, Fertigpuffer, siehe 9.4) lösen bzw. bei -20°C eingefrorene Reste der Blutbank Präparationen verwenden. In 60 µl Portionen aliquotieren und bei -20°C lagern. Haltbarkeit bei -20°C: 12 Monate.

8.1.2. Vorbehandlung von EDTA/Citrat-Blut

- 200 µl Ansatz:
 - Blut durch Schwenken im EDTA-Röhrchen mit der Hand mischen, bis Plasma und Erythrozyten vollständig vermischt sind; 200 µl in ein 1,5 ml Schraubkappenröhrchen (siehe 9.3) geben.
 - 600 µl RBC-Lösung (siehe 9.4) zugeben – mischen – 10 min bei RT inkubieren.
 - (Das restliche Blut für 10 min bei 1200 rcf zentrifugieren – 0,5 ml abnehmen und für evtl. weitere Untersuchungen sichern)
 - Das 1,5 ml Schraubkappenröhrchen mit Zellen und RBC-Lösung 1 min bei 20.000 rcf zentrifugieren.
 - Überstand mit Plastikpasteurpipette (siehe 9.3) entfernen und verwerfen, nochmals kurz anzentrifugieren, restlichen Überstand entfernen.
 - Leukozyten-Pellet in 200 µl PBS resuspendieren.
- Maxi-Präp-Verfahren:

- EDTA-Blut durch Schwenken mischen, je nach Bedarf 1,0 bis 3,0 ml EDTA-Blut in ein 15 ml Spitz-Röhrchen (siehe 9.3) geben.
- Die dreifache Menge RBC-Lösung zugeben (für 1 ml Blut 3 ml RBC-Lösung) – mischen und 10 min bei RT inkubieren.
- Das Röhrchen mit Zellen und RBC-Lösung 10 min bei 1.300 rcf zentrifugieren.
- Überstand mit Plastikpasteurpipette entfernen und verwerfen, nochmals kurz anzentrifugieren, restlichen Überstand entfernen.
- Das Leukozytenpellet wird pro ml aufgearbeitetes EDTA-Blut in 200 µl PBS resuspendiert. (Bei 3,0 ml Blut wird das Pellet in 600 µl PBS resuspendiert).

8.1.3. Durchführung der DNA-Extraktion

- Pro Aufarbeitungsvorgang eine Positiv- und Negativ-Aufarbeitungs-Kontrolle (oder PBS) bei der Extraktion mitführen.
- 20 µl Protease bzw. x µl Protease/IC-Mix in ein Schraubkappenröhrchen vorlegen und 200 µl Proben- bzw. Kontrollmaterial zugeben.
- Puffer AL durch Schütteln mischen und 200 µl zu den Proben geben, 15 sec. vortexen bis Schlieren zu sehen sind.
- 10 min bei 56°C unter Schütteln inkubieren (Thermomixer 5436; Eppendorf). Anschließend kurz abkühlen lassen (1 min) und anzentrifugieren.
- 200 µl abs. Ethanol zur Probe geben und auf einem Vortex VF2 (Jahnke und Kunkel) ca. 10 Sekunden bei höchster Stufe mischen.
- Das komplette Reaktionsgemisch auf die vorbereitete Säule (siehe 9.3) geben (Pipettenspitze an der Wandung ansetzen und langsam pipettieren) und 1 min bei 6.000 rcf zentrifugieren.
- Die Säulen aus der Zentrifuge entnehmen und in ein neues Sammelröhrchen (siehe 9.3) setzen. Altes Sammelröhrchen mit Filtrat verwerfen.
- Säule öffnen – 500 µl Waschpuffer AW1 zugeben – 1 min bei 6.000 rcf zentrifugieren, Säule in ein neues Sammelröhrchen setzen – altes Sammelröhrchen mit Filtrat verwerfen.
- Säule öffnen – 500 µl Waschpuffer AW2 zugeben – 3 min bei 20.000 rcf zentrifugieren, Säule in ein neues Sammelröhrchen setzten – altes Sammelröhrchen mit Filtrat verwerfen.

- Den restlichen Waschpuffer durch 1-minütige Zentrifugation bei 20.000 rcf entfernen.
- Säulen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen -100 µl Puffer AE/H₂O auf die Säule geben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 1 min bei 6.000 rcf zentrifugieren – Säule nach Zentrifugation verwerfen
- bei Proben, die im Maxi-Präp-Verfahren bearbeitet worden sind, wird 2 x mit 200 µl H₂O eluiert. Die 2. Elution erfolgt in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß.
- Das Reaktionsgefäß mit der Probennummer beschriften und bis zum Ansatz der PCR im Kühlschrank lagern (bis zu 24 h), für längerfristige Lagerung bei -20°C einfrieren.

8.1.4. Konzentrationsbestimmung mittels OD-Messung

- Die DNA-Konzentration des Eluats kann mit einer 1:5 Verdünnung im Photometer (RNA-DNA-Calculator, 80-2105-98 Genequant; Pharmacia Biotech) bestimmt werden.

8.2. Arbeitsanleitung zu OlerupSSP™-Kits

8.2.1. SSP-Primermixe und Mastermix (ohne Taq Polymerase®)

Die Primergemisch liegen in getrockneter Form in den PCR-Platten bzw. Streifen vor. Das Primergemisch muss bei -20°C gelagert werden. Die Komponenten des Mastermix können der Tabelle 9.4 entnommen werden. Der Mastermix sollte bei -20°C gelagert werden und ist dann für 18 Monate haltbar (Bei einer Lagerung von +4°C ist der Mastermix nur 4 Wochen haltbar. Ein anschließendes Einfrieren bei -20°C garantiert nicht die 18 monatige Haltbarkeit!). Jedem Kit liegt eine kitspezifische Produktinformation bei. Diese beinhaltet eine Tabelle, der man die Anordnung der einzelnen Primermixe in den PCR-Platten bzw. (-Streifen) entnehmen kann. Das Röhrchen 1 ist in jedem Kit mit einer „1“ und der jeweiligen Lotnummer markiert. Außerdem enthält diese kitspezifische Produktinformation die Interpretationstabelle zur Auswertung der Typisierung.

8.2.2. Testansatz

Die optimale DNA-Konzentration liegt bei 30 ng/µl (bei einer DNA-Konzentration von >50 ng/µl können unspezifische Reaktionen auftreten). Die DNA wird aus EDTA- oder Citrat-Blut isoliert.

Pro Testansatz:
2 µl DNA (30 ng/µl)
+3 µl Mastermix
+0,4 U Taq Polymerase®
(= 0,08 µl Taq Polymerase® bei einer Konzentration von 5 U/µl)
+5 µl dH2O
Σ10,08 µl PCR Mix

(Bitte immer 2-4 Extrareaktionen mit einrechnen)

8.2.3. Kit Olerup SSP™ DR low resolution

Pro Testansatz DR low in einem 0,5ml Reaktionsgefäß:

+28 x 3 µl = 84 µl Mastermix

+2,2 µl Taq Polymerase®

(= 0,08 µl Taq Polymerase® bei einer Konzentration von 5 U/µl)

- gut mischen, dann 3 µl des PCR Mastermix-Taq Gemisches in No. 24 pipettieren und anschließend 7 µl dH₂O hinzufügen

- anschließend werden die DNA und dH₂O in das den 84 + 2,2 - 3 = 83,2 µl PCR Mastermix-Taq Gemisch enthaltene 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und jeweils 10 µl in No. 1-23 pipettiert

27 x 2 µl = 54 µl DNA (30 ng/µl)

+27 x 5 µl - 2,2 µl dH₂O

8.2.4. Kit Olerup SSP™ DRB1*15

Pro Testansatz DRB1*15 in einem 0,5ml Reaktionsgefäß::

19 x 2 µl = 38 µl DNA (30 ng/µl)

+19 x 3 µl = 57 µl Mastermix

+1,5 µl Taq Polymerase®

(= 0,08 µl Taq Polymerase® bei einer Konzentration von 5 U/µl)

+19 x 5 µl = 93,5 dH₂O

- gut mischen, anschließend werden 10 µl des DNA-PCR Mastermix-Taq-H₂O Gemisches in No. 1-16 pipettiert

- PCR Röhrchen (siehe 9.3) mit beiliegenden Deckeln gut verschließen und in den Thermocycler (siehe 9.2) geben.

8.2.5. PCR-Programm für Olerup SSP™ Kits

Tabelle 8.1: PCR-Programm für Olerup SSP™ Kits

PCR-Programm für Olerup SSP™ Kits:

1.	1 Zyklus	94°C	2 Minuten	Denaturierung
2.	10 Zyklen	94°C	10 Sekunden	Denaturierung
		65°C	60 Sekunden	Hybridisierung und Elongation
3.	20 Zyklen	94°C	10 Sekunden	Denaturierung
		61°C	50 Sekunden	Hybridisierung
		72°C	30 Sekunden	Elongation

anschließend bei +4°C halten

9. Anhang

9.1. Adressen

<i>Partizipierende Mitglieder der MSAGN:</i>	
Cramer, Tobias	Lister Meile 72, 30161 Hannover
Dr. med Cramer, Irmgard	Rundestr. 10; 30161 Hannover
Dr. med Siever, Arno	Stau 1; 26122 Oldenburg
Dr. med. Brinkmann, Hans-Georg	Segeberger Str. 9, 23617 Stockeldorf
Dr. med. Elias, Wolfgang-Gerhard	Bengelsdorfstr. 5; 22179 Hamburg
Dr. med. Freidel, Matthias	Brauerstr. 1-3; 24568 Kaltenkirchen
Dr. med. Gerckens, Wolfgang	Segeberger Str. 9, 23617 Stockeldorf
Dr. med. Niedhammer, Mathias	Stau 1; 26122 Oldenburg
Dr. med. Straube, Elmar	Marktstr. 27-29; 30890 Barsinghausen
Dres. med. Steck, Iris	Georg-Gleistein-Str. 93; 28757 Bremen
Prof. Dr. med. Weber, Thomas	Kath. Marienkrankenhaus gGmbH; Alfredstraße 9; 22087 Hamburg
Steck, Arno	Georg-Gleistein-Str. 93; 28757 Bremen
<i>Labor:</i>	
Labor Fenner und Kollegen	Bergstraße 14; 20095 Hamburg

9.2. Geräte

Computer	Fujitsu Siemens, Intel® Premium, 4CPU 1,60 GHz, AT/AT Compatible, 261.616 kB RAM, Windows 2000 Professional
Software	Helmberg Score™; Version 3.407T; user database 3.400; allele database: allele marsh HLADB_2.16.0
	AlphaEaseFC™ Software, Version 4.0.0, Alpha Innotech
	SPSS® Statistics 17.0, Version 17.0.0; SPSS Inc.
	EndNote X3® [Bld 4094]; Thomson Reuters
	Office Enterprise 2007; Microsoft®
Digitalkamera und Dunkelhaube	System "AlphaEaseFC" mit Olympus-Kamera C5060, 5,1 Megapixel; Art.-Nr. 510045; Biozym
Gelelektrophoresekammer	Wide Mini Sub-Cell GT; Bio-Rad
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch, Liebherr, Privileg, Kryotech
Photometer	RNA-DNA-Calculator, 80-2105-98 Genequant; Pharmacia Biotech
Pipetten	0,2-2 µl Gilson und Labsystems
	0,5-10 µl Gilson und Labsystems
	5-40 µl Gilson und Labsystems

	40-200 µl Gilson und Labsystems
	200-1000 µl Gilson und Labsystems
Spannungsquelle (für Gelkammer)	PowerPac 300, Bio-Rad
Thermocycler	TC 9600; Perkin Elmer
Thermomixer	5436; Eppendorf
UV-Leuchttisch	Transilluminator TFX35M; Roth
Vortex	VF2; Jahnke und Kunkel
Zentrifugen	Centrifuge 5415C; Eppendorf
	Mikrozentrifuge Mikro 20 Typ 2004; Hettich
	EBA 12/1000; Hettich

9.3. Kleinmaterialien

Agarosegele	Agarose 96Plus 3%TBE w/ETBR, Art.-Nr. 1613062; Bio-Rad
EDTA-Monovetten	EDTA K 2,7 ml; Bestellnummer 05.1167; Sarstedt
	EDTA KE/9 ml; Bestellnummer 02.1066; Sarstedt
Einmalpipetten	Liquipette PE, 1 ml, mit Mikrospitze; REF 12.023.0100; nerbe plus GmbH
Glaswaren	Brandt
Pipettenspitzen	ART® 10 Reach Pipet Tips; Catalog # 2140
	ART® 20 Reach Pipet Tips; Catalog # 2149P
	Safeseal Tips Premium 50 µl; Art.-Nr. 692050; Biozym
	Safeseal Tips Professional 200 µl; Art.-Nr. 770200; Biozym
	CellSafer 200 µl, farblos; Art.-Nr. 729058; Biozym
	Safeseal Tips Professional 1000 µl; Art.-Nr. 770600; Biozym
Tubes	Collection Tubes (2ml); Qiagen; enthalten im Kit zur DNA-Isolierung (siehe 8.4)
	PP-Röhrchen, steril 15 ml, Cat.No. 188.271; Greiner
	Mikro-Schraubröhre 1,5 ml; REF 72.692.005; Sarstedt
	Mikro-Schraubröhre 2,0 ml; REF 72.694.006; Sarstedt
	PCR-Röhrchen mit Deckel; Firma: Olerup; enthalten im Kit zur HLA-Typisierung (siehe 8.4)
	Reaktionsgefäße 1,5 ml; Art.-Nr. 710340; Biozym
	Säule; QIAamp Mini Column; Qiagen; enthalten im Kit zur DNA-Isolierung (siehe 8.4)

9.4. Reagenzien

Kit zur DNA-Isolierung	QIAamp DNA (Blood) Mini Kit (250); Cat. No. 51106; Qiagen
Fertigpuffer	Buffer AW1, Wash buffer 1 (95 ml concentrat), enthalten im Kit zur DNA-Isolierung; Qiagen
	Buffer AW2, Wash buffer 2 (66 ml concentrat), enthalten im Kit zur DNA-Isolierung; Qiagen
	Buffer AE, Elution buffer (60 ml), enthalten im Kit zur DNA-Isolierung; Qiagen
	Buffer AL, Lysis buffer (54 ml), enthalten im Kit zur DNA-Isolierung; Qiagen
Proteasen	Qiagen Protease, enthalten im Kit zur DNA-Isolierung; Qiagen
	Protease Solvent, enthalten im Kit zur DNA-Isolierung; Qiagen
PBS-Puffer	Phosphate buffered Saline (PBS) Fertigpuffer, ein Beutel gelöst in 1000 ml (Endkonzentration: 0,01 M PBS; 0,138 M NaCl; 0,0027 M KCl; pH 7,4 bei 25°C dH ₂ O); P-5368; Sigma
RBC-Lösung	RBC Lysis Solution 225 ml, Mat. No. 1045695, Qiagen
Carrier-RNA (4mg/ml)	aus High Pure System Viral Nucleic Acid Kit, P/N: 03 502 295-001; Qiagen
Ethanol (96%)	Merck
H ₂ O steril, PCR-Grade	wechselnde Hersteller; Hain; Roth; Roche
Kit zur HLA-Typisierung	Olerup SSP™ DRB1*15 not licensed for PCR; Product number: 101.125-24u-not licensed for PCR; Lot number: M79; Firma: Olerup
	Olerup SSP™ DR low not licensed for PCR; Product number: 101.101-48u - not licensed for PCR; Lot number N01; Firma: Olerup
Master Mix without Taq:	Mastermix ist enthalten in den Kits zur HLA-Typisierung
Glycerol	Endkonzentration des Glycerols ist: 5%
Kresolrot	Endkonzentration des Kresolrots ist: 100 µg/ml
Nukleotide	Endkonzentration der Nukleotide für jedes dNTP ist 200 µM
PCR-Puffer	Endkonzentration: 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,001% w/v gelantine
Taq-Polymerase	GoTaq® Flexi DNA Polymerase; Catalog# M8305; Promega
Detektion:	

Gelladepuffer	0,5 x TBE-Puffer mit 1:20 Verdünnung aus 10 x TBE-Puffer (1,0 M Tris – Borat (pH 8,3) – 20 mM EDTA), Fertigpuffer, Art.-Nr. 3061.1; Roth
Marker	pUC 18 DNA Markers (501-26 bp), Product Number D 4797, Sigma; Plasmid pUC 18 was digested to completion, then purified by phenol extraction

9.5. Auswertungstabellen der HLA-Kits

Tabelle 9.1: DR low Interpretationstabelle

INTERPRETATION TABLE													
DR low resolution SSP typing													
Amplification patterns of the DRB1*0101 to DRB1*1001 alleles													
		Tube											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Length of spec.		195	195	210	215	220	80	80	100	230	105	85	205
PCR product							210	210			160	250	
											215		
Length of int. pos. control ¹		515	430	430	430	430	430	430	430	430	515	430	430
5'-primer(s) ²		14	14	13	13	13	13	13	13	14	16	9	31
		5'-gAA ^{3'}	5'-gAA ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-A CA ^{3'}	5'-AT A ^{3'}	5'-gT T ^{3'}	5'-Tg A ^{3'}	5'-gC g ^{3'}
							16		13	14	16	58	
							5'-gT T ^{3'}		5'-A CC ^{3'}	5'-AT A ^{3'}	5'-gT T ^{3'}	5'-gAg ^{3'}	
3'-primer(s) ³		67	67	71	69	73	26	28	33	77	37	73	86
		5'-gAg ^{3'}	5'-gAT ^{3'}	5'-CgC ^{3'}	5'-TC T ^{3'}	5'-g gC ^{3'}	5'-g gT ^{3'}	5'-CT C ^{3'}	5'-gTg ^{3'}	5'-A AT ^{3'}	5'-C gT ^{3'}	5'-g gC ^{3'}	5'-C AC ^{3'}
				71	72	73	71	70		78	57	78	
				5'-CTC ^{3'}	5'-gC g ^{3'}	5'-g gC ^{3'}	5'-g CT ^{3'}	5'-CTg ^{3'}		5'-CAC ^{3'}	5'-gCT ^{3'}	5'-CAC ^{3'}	
				74							74		
				5'-CAg ^{3'}							5'-CAg ^{3'}		
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DRB1 allele ⁴	ser ⁵												
*010101-010202, 0104-0111	1	+											
*0103	103		+										
*030101-030102, 0304-0306, 0309, 0311-0316, 0318-0320, 0322, 0323, 0325	17					+	+						
*030201-0303	18					+		+					
*0307, 0317, 0321, 0324	-					+							
*0308	-					+	+					+	
*0310	-					+	+						
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Length of spec.		195	195	210	215	220	80	80	100	230	105	85	205
PCR product							210	210			160	250	
											215		

Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
*040101-0414, 0416-0448, 0450	4								+				
*0415	4								+				
*070101-0708	7									+			
*080101-080203, 080401-0807, 0811, 0816, 0817, 0822, 0824, 0827	8										+		
*080302, 0810, 0812-0815, 0818, 0819, 0823, 0825, 0827	8										+		
*0808	-										+		
*0809, 0821, 1415	8										+		
*0820, 1318, 1347, 1355	8.13												
*090102, 0902	9											+	
*0903	-											+	
*100101-100102	10												+
*110101-110105, 110401-110402, 110601-110602, 111201, 1115, 1124, 112701-1129, 1132, 1133, 1135, 1137-1139, 1143, 1144, 1147, 1149	11												
*1102, 1103, 1111, 1114, 1121, 1136, 1141, 1148	11						+						
*1105, 1130	11												
*1107	-					+						+	
*110801-110802, 1118, 1119, 1142	11												
*1109, 1110, 1146	11												
*111202	-												
*1113, 1117	11												
*1116, 1120, 1140	-						+						
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Length of spec.		195	195	210	215	220	80	80	100	230	105	85	205
PCR product							210	210			160	250	
											215		
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
*1122	-												
*1123, 1125	11												

*1126, 1134	11							+					
*1131, 1145	-												
*120101-120102, 120302, 1205-1209	12												
*120201-120202	12												
*1204	-												
*130101-130103, 130201, 1304, 1308, 1316, 1320, 1322-1324, 1327-1329, 1331, 1332, 1334-1336, 1338-1341, 1348, 1351, 1352, 1354, 1359, 1361	13							+					
*130202, 130301- 130302, 1310, 1333, 1337	13							+					
*1305, 130701-130702, 1311, 131401-131402, 1321, 1342, 1346, 1349, 1350, 1362	13												
*1306, 1312, 1325, 1330, 1356, 1358, 1360	13												
*1309	13												
*1313	-												
*1315, 1319, 1353, 1357	-							+	+				
*1317	13							+			+		
*1326	-								+				
*1343	-							+					
*1344	-								+				
*1345	-							+					
*140101-140102, 1404, 140701-140702, 1410, 1426, 1428, 1431, 1432, 1435, 1438, 1439	14												
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Length of spec.		195	195	210	215	220	80	80	100	230	105	85	205
PCR product							210	210			160	250	
											215		
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
*1402, 1406, 1409, 1413, 1417, 1420, 1429, 1430, 1433, 1441, 1447, 1448	14							+					

*140301-140302, 1412, 1440	14							+					
*140501-140502, 1414, 1423, 1436, 1443-1445	14												
*1408, 1411, 1434	-												
*1416	6						+						
*1418	-							+					
*1419, 1421	-						+	+					
*1422	-												
*1424	-							+					
*1425	-												
*1427	14							+					
*1437	-												
*1442	-												
*1446	-												
*150101-1514	15			+									
*160101-1603, 160501-160502, 1607, 1608	16				+								
*1604	16				+								
DRB1 allele ⁴	ser ⁵												
Tube No.	DR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DRB3*010101-0110, 0201-0218, 030101-0303	52												
DRB4*010101-0106	53												
DRB5*010101-0112, 0202-0205	51												
Tube No.	ser ⁵	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

INTERPRETATION TABLE												
DR low resolution SSP typing												
Amplification patterns of the DRB1*0101 to DRB1*1001 alleles												
Tube												
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
100	105	210	195	175	100	110	110	230	215	260		Length of spec.
170			210		140	135	175					PCR product
						170	225					
430	430	430	430	430	430	515	430	430	430	430		Length of int.
												pos. control ¹
13	16	13	13	13	37	26	13	10	28	13		5'-primer(s) ²
5'-g TC ^{3'}	5'-gT T ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-g TA ^{3'}	5'-g TA ^{3'}	5'-g TC ^{3'}	5'-g CT ^{3'}	5'-g AT ^{3'}	5'-g TA ^{3'}		
13			16		37	34	34	10		13		
5'-A CA ^{3'}			5'-gT T ^{3'}		5'-g TT ^{3'}	5'-CAg ^{3'}	5'-CAg ^{3'}	5'-g CT ^{3'}		5'-g TA ^{3'}		
16												
5'-gT C ^{3'}												
38												
5'-C gT ^{3'}												
58	38	70	67	58	57	57	57	73	87	87		3'-primer(s) ³
5'-C CT ^{3'}	5'-CAg ^{3'}	5'-gTC ^{3'}	5'-gAA ^{3'}	5'-C gg ^{3'}	5'-C Ag ^{3'}	5'-C Ag ^{3'}	5'-C Ag ^{3'}	5'-g gC ^{3'}	5'-CTC ^{3'}	5'-CTC ^{3'}		
58		71	67	58	71	58	60	73				
5'-C CT ^{3'}		5'-g CT ^{3'}	5'-gAA ^{3'}	5'-C Ag ^{3'}	5'-CgC ^{3'}	5'-C CT ^{3'}	5'-gTg ^{3'}	5'-g gC ^{3'}				
			71			70	70					
			5'-CTC ^{3'}			5'-CTg ^{3'}	5'-T CC ^{3'}					
			71			70	74					
			5'-CgC ^{3'}			5'-T CC ^{3'}	5'-CAg ^{3'}					
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
											ser ⁵	DRB1 allele ⁴
											1	*010101-010202, 0104-0111
											103	*0103
				+							17	*030101-030102, 0304-0306, 0309, 0311-0316, 0318-0320, 0322, 0323, 0325
				+							18	*030201-0303
				+							-	*0307, 0317, 0321, 0324
+						+					-	*0308
						+	+				-	*0310
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
100	105	210	195	175	100	110	110	230	215	260		Length of spec.
170			210		140	135	175					PCR product
						170	225					

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
											4	*040101-0414, 0416-0448, 0450
+											4	*0415
											7	*070101-0708
			+								8	*080101-080203, 080401-0807, 0811, 0816, 0817, 0822, 0824, 0827
											8	*080302, 0810, 0812-0815, 0818, 0819, 0823, 0825, 0827
			+		+						-	*0808
			+				+				8	*0809, 0821, 1415
		+	+	+			+				8.13	*0820, 1318, 1347, 1355
						+					9	*090102, 0902
												*0903
											10	*100101-100102
+		+	+								11	*110101-110105, 110401-110402, 110601, 110602, 111201, 1115, 1124, 112701-1129, 1132, 1133, 1135, 1137-1139, 1143, 1144, 1147, 1149
+		+	+								11	*1102, 1103, 1111, 1114, 1121, 1136, 1141, 1148
+											11	*1105, 1130
+											-	*1107
+		+									11	*110801-110802, 1118, 1119, 1142
+		+	+			+					11	*1109, 1110, 1146
+		+	+			W					-	*111202
+						+	+				11	*1113, 1117
+		+	+			+					-	*1116, 1120, 1140
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
100	105	210	195	175	100	110	110	230	215	260		Length of spec.
170			210		140	135	175					PCR product
						170	225					
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
+						W					-	*1122
+		+	+				+				11	*1123, 1125

+											11	*1126, 1134
+		+					+				-	*1131, 1145
	+										12	*120101-120102, 120302, 1205-1209
	+		+								12	*120201-120202
	+					W					-	*1204
		+	+	+							13	*130101-130103, 130201, 1304, 1308, 1316, 1320, 1322-1324, 1327-1329, 1331, 1332, 1334-1336, 1338-1341, 1348, 1351, 1352, 1354, 1359, 1361
		+		+							13	*130202, 130301- 130302, 1310, 1333, 1337
		+	+	+							13	*1305, 130701-130702, 1311, 131401-131402, 1321, 1342, 1346, 1349, 1350, 1362
		+		+							13	*1306, 1312, 1325, 1330, 1356, 1358, 1360
			+	+							13	*1309
		+		+			+				-	*1313
		+	+	+							-	*1315, 1319, 1353, 1357
			+								13	*1317
		+	+	+							-	*1326
		+	+			+	+				-	*1343
				+							-	*1344
		+	+		+		+				-	*1345
					+	+	+				14	*140101-140102, 1404, 140701-140702, 1410, 1426, 1428, 1431, 1432, 1435, 1438, 1439
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
100	105	210	195	175	100	110	110	230	215	260		Length of spec.
170			210		140	135	175					PCR product
						170	225					
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
				+		+					14	*1402, 1406, 1409, 1413, 1417, 1420, 1429, 1430, 1433, 1441, 1447,1448

		+		+			+				14	*140301-140302, 1412, 1440
				+		+	+				14	*140501-140502, 1414, 1423, 1436, 1443-1445
						+	+				-	*1408, 1411, 1434
		+	+		+	+	+				6	*1416
				+		+	+				-	*1418
		+		+		W					-	*1419, 1421
		+	+		+	+	+				-	*1422
			+	+							-	*1424
		+	+		+		+				-	*1425
		+	+	+			+				14	*1427
			+	+	+						-	*1437
				+			+					*1442
						+						*1446
											15	*150101-1514
											16	*160101-1603, 160501-160502, 1607, 1608
							W				16	*1604
											ser ⁵	DRB1 allele ⁴
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	DR	Tube No.
								+			52	DRB3*010101-0110, 0201-0218, 030101-0303
									+		53	DRB4*010101-0106
										+	51	DRB5*010101-0112, 0202-0205
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	ser ⁵	Tube No.

Tabelle 9.2: DRB1*15 Interpretationstabelle

INTERPRETATION TABLE								
DRB1*15 SSP subtyping								
Amplification patterns of the DRB1*1501 to 1513 alleles								
	Tube							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Length of spec.	140	200	150	260	260	150	140	200
PCR product								
Length of int.	515	515	430	430	430	430	430	430
pos. control¹								
5'primer²	13	13	30	13	13	30	13	13
	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-gA T ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-gA C ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}
3'primer(s)³	47	67	67	86	86	67	47	67
	5'-g gA ^{3'}	5'-gAT ^{3'}	5'-gAT ^{3'}	5'-C CA ^{3'}	5'-C AC ^{3'}	5'-gAT ^{3'}	5'-g gT ^{3'}	5'-gAg ^{3'}
								67
								5'-gAg ^{3'}
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8
DRB1 allele								
*150101-150105	+	+	+	+				
*150201-150203	+	+	+		+			
*1503	+	+		+		+		
*1504	+			+				
*1505	+			+				+
*1506	+	+	+	+				
*1507		+	+	+			+	
*1508	+	+	+		+			
*1509	+	+	+	+				
*1510	+			+				
*1511		+	+		+		+	
*1512	+	+	+	+				
*1513	+	+	+	+				
*160101-160202, 1603, 1604, 1608					+		+	
*1605, 1607					+		+	
*1309, 1437			+					
DRB1 allele								
Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8

INTERPRETATION TABLE								
DRB1*15 SSP subtyping								
Amplification patterns of the DRB1*1501 to 1513 alleles								
Tube								
9	10	11	12	13	14	15	16	
90	200	170	145	215	190	200	200	Length of spec. PCR product
430	430	430	430	430	430	515	430	Length of int. pos. control ¹
50	13	13	13	13	13	13	13	5'primer ²
5'-g gC ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	5'-Agg ^{3'}	
67	67	57	48	71	64	67	66	3'primer(s) ³
5'-gAT ^{3'}	5'-gAA ^{3'}	5'-gCT ^{3'}	5'-C CT ^{3'}	5'-g CT ^{3'}	5'-C Tg ^{3'}	5'-gAT ^{3'}	5'-gTT ^{3'}	
9	10	11	12	13	14	15	16	Tube No.
								DRB1 allele
								*150101-150105
								*150201-150203
								*1503
	+							*1504
								*1505
+								*1506
								*1507
							+	*1508
			+					*1509
				+		+		*1510
								*1511
		+						*1512
					+			*1513
								*160101-160202, 1603, 1604, 1608
						+		*1605, 1607
								*1309, 1437
9	10	11	12	13	14	15	16	DRB1 allele
								Tube No.

10. Literaturverzeichnis

1. Aharoni, R., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M., 1999. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 634-9.
2. Aharoni, R., Kayhan, B., Eilam, R., Sela, M., Arnon, R., 2003. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 14157-62.
3. Alonso, A., Hernán, M.A., 2008. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology.* 71, 129-35.
4. Ares, B., Prieto, J.M., Lema, M., Dapena, D., Arias, M., Noya, M., 2007. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler.* 13, 262-4.
5. Arnon, R., 1996. The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections. *Immunol Lett.* 50, 1-15.
6. Arnon, R., Aharoni, R., 2004. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 Suppl 2, 14593-8.
7. Ascherio, A., Munger, K.L., 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol.* 61, 288-99.
8. Barcellos, L.F., Oksenberg, J.R., Green, A.J., Bucher, P., Rimmler, J.B., Schmidt, S., Garcia, M.E., Lincoln, R.R., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Hauser, S.L., Multiple Sclerosis Genetics Group, 2002. Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. *Brain.* 125, 150-8.
9. Barcellos, L.F., Oksenberg, J.R., Begovich, A.B., Martin, E.R., Schmidt, S., Vittinghoff, E., Goodin, D.S., Pelletier, D., Lincoln, R.R., Bucher, P., Swerdlin, A., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Hauser, S.L., Multiple Sclerosis Genetics Group, 2003. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet.* 72, 710-716.
10. Barkhof, F., Filippi, M., Miller, D.H., Scheltens, P., Campi, A., Polman, C.H., Comi, G., Adèr, H.J., Losseff, N., Valk, J., 1997. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain.* 120 (Pt 11), 2059-69.

11. Baschal, E.E., Jasinski, J.M., Boyle, T.A., Fain, P.R., Eisenbarth, G.S., Siebert, J.C., 2012. Congruence as a measurement of extended haplotype structure across the genome. *J Transl Med.* 10, 32.
12. Bäärnhielm, M., Hedström, A.K., Kockum, I., Sundqvist, E., Gustafsson, S.A., Hillert, J., Olsson, T., Alfredsson, L., 2012. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1* 15. *European Journal of Neurology.* 19, 955-962.
13. Beck, R.W., Cleary, P.A., Anderson, M.M., Keltner, J.L., Shults, W.T., Kaufman, D.I., Buckley, E.G., Corbett, J.J., Kupersmith, M.J., Miller, N.R., 1992. A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med.* 326, 581-8.
14. Cadavid, D., Wolansky, L.J., Skurnick, J., Lincoln, J., Cheriyan, J., Szczepanowski, K., Kamin, S.S., Pachner, A.R., Halper, J., Cook, S.D., 2009. Efficacy of treatment of MS with IFNbeta-1b or glatiramer acetate by monthly brain MRI in the BECOME study. *Neurology.* 72, 1976-83.
15. Calabresi, P.A., Pelfrey, C.M., Tranquill, L.R., Maloni, H., McFarland, H.F., 1997. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology.* 49, 1111-6.
16. Carroll, W.M., 2009. Clinical trials of multiple sclerosis therapies: improvements to demonstrate long-term patient benefit. *Mult Scler.* 15, 951-8.
17. Casetta, I., Iuliano, G., Filippini, G., 2007. Azathioprine for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* CD003982.
18. Chen, M., Valenzuela, R.M., Dhib-Jalbut, S., 2003. Glatiramer acetate-reactive T cells produce brain-derived neurotrophic factor. *J Neurol Sci.* 215, 37-44.
19. Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernández, O., Hartung, H., Seeldrayers, P., Sørensen, P.S., Rovaris, M., Martinelli, V., Hommes, O.R., Early Treatment of Multiple Sclerosis Study Group, 2001a. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet.* 357, 1576-82.
20. Comi, G., Filippi, M., Wolinsky, J.S., 2001b. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in

patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol.* 49, 290-7.

21. Comi, G., Martinelli, V., Rodegher, M., Moiola, L., Bajenaru, O., Carra, A., Elovaara, I., Fazekas, F., Hartung, H.P., Hillert, J., King, J., Komoly, S., Lubetzki, C., Montalban, X., Myhr, K.M., Ravnborg, M., Rieckmann, P., Wynn, D., Young, C., Filippi, M., PreCISe study group, 2009. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 374, 1503-11.

22. Compston, A., 1999. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354, 1623-34.

23. Compston, A., Coles, A., 2002. Multiple sclerosis. *Lancet.* 359, 1221-31.

24. Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet.* 372, 1502-17.

25. Compston, D.A.S., Batchelor, J.R., McDonald, W.I., 1976. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *The Lancet.* 308, 1261-1265.

26. Confavreux, C., Aimard, G., Devic, M., 1980. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain.* 103, 281-300.

27. Coyle, P.K., 2008. Early treatment of multiple sclerosis to prevent neurologic damage. *Neurology.* 71, S3.

28. Cutter, G.R., Baier, M.L., Rudick, R.A., Cookfair, D.L., Fischer, J.S., Petkau, J., Syndulko, K., Weinshenker, B.G., Antel, J.P., Confavreux, C., Ellison, G.W., Lublin, F., Miller, A.E., Rao, S.M., Reingold, S., Thompson, A., Willoughby, E., 1999. Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain.* 122 (Pt 5), 871-82.

29. Deisenhammer, F., Reindl, M., Harvey, J., Gasse, T., Dilitz, E., Berger, T., 1999. Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. *Neurology.* 52, 1239-43.

30. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), 2012. DGN/KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS - Online Version. [http://www.dmsg.de/multiple-sklerose-news/index.php?](http://www.dmsg.de/multiple-sklerose-news/index.php?w3pid=news&kategorie=therapien&anr=3610&suchbegriffe=Eskalationstherapie)

[w3pid=news&kategorie=therapien&anr=3610&suchbegriffe=Eskalationstherapie](http://www.dmsg.de/multiple-sklerose-news/index.php?w3pid=news&kategorie=therapien&anr=3610&suchbegriffe=Eskalationstherapie) (last accessed: 26 6 2012)

31. Dorman, J.S., Bunker, C.H., 2000. HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 diabetes mellitus: a HuGE review. *Epidemiol Rev.* 22, 218-27.
32. Duda, P.W., Schmied, M.C., Cook, S.L., Krieger, J.I., Hafler, D.A., 2000. Glatiramer acetate (Copaxone®) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation.* 105, 967-976.
33. Durelli, L., Verdun, E., Barbero, P., Bergui, M., Versino, E., Ghezzi, A., Montanari, E., Zaffaroni, M., Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group, 2002. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet.* 359, 1453-60.
34. Dymment, D.A., Ebers, G.C., Dessa Sadovnick, A., 2004. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology.* 3, 104-110.
35. Dymment, D.A., Herrera, B.M., Cader, M.Z., Willer, C.J., Lincoln, M.R., Sadovnick, A.D., Risch, N., Ebers, G.C., 2005. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet.* 14, 2019-26.
36. Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *Journal of neuroimmunology.* 54, 1-17.
37. Ebers, G.C., 2008. Environmental factors and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology.* 7, 268-277.
38. Edan, G., Morrissey, S., Le Page, E., 2004. Rationale for the use of mitoxantrone in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 223, 35-9.
39. Farina, C., Weber, M.S., Meinl, E., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 2005. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol.* 4, 567-75.
40. Fazekas, F., Lublin, F.D., Li, D., Freedman, M.S., Hartung, H.P., Rieckmann, P., Sørensen, P.S., Maas-Enriquez, M., Sommerauer, B., Hanna, K., PRIVIG Study Group, UBC MS/MRI Research Group, 2008. Intravenous immunoglobulin in relapsing-remitting multiple sclerosis: a dose-finding trial. *Neurology.* 71, 265-71.
41. Filippi, M., Rocca, M.A., Camesasca, F., Cook, S., O'Connor, P., Arnason, B.G.W., Kappos, L., Goodin, D., Jeffery, D., Hartung, H.-P., Comi, G., Wolinsky, J.S., Bogumil, T., Pohl, C., Beckmann, K., Sandbrink, R., Croze, E., Brown, C., Desimone,

- T.M., Arnold, D.L., Cutter, G., Knappertz, V., 2011. Interferon β -1b and glatiramer acetate effects on permanent black hole evolution. *Neurology*. 76, 1222-8.
42. Flachenecker, P., Zettl, U.K., Götze, U., Haas, J., Schimrigk, S., Elias, W., Pette, M., Eulitz, M., Hennig, M., Bertram, J., others, 2005. MS-Register in Deutschland Design und erste Ergebnisse der Pilotphase. *Der Nervenarzt*. 76, 967-975.
43. Flachenecker, P., Stuke, K., Elias, W., Freidel, M., Haas, J., Pitschnau-Michel, D., Schimrigk, S., Zettl, U.K., Rieckmann, P., 2008. Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Dtsch Arztebl Int*. 105, 113-9.
44. Flachenecker, P., Stuke, K., 2008. National MS registries. *J Neurol*. 255 Suppl 6, 102-8.
45. Flügel, A., Matsumuro, K., Neumann, H., Klinkert, W.E., Birnbacher, R., Lassmann, H., Otten, U., Wekerle, H., 2001. Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol*. 31, 11-22.
46. Fogdell, A., Hillert, J., Sachs, C., Olerup, O., 1995. The multiple sclerosis- and narcolepsy-associated HLA class II haplotype includes the DRB5*0101 allele. *Tissue Antigens*. 46, 333-6.
47. Franklin, G.M., Nelson, L., 2003. Environmental risk factors in multiple sclerosis: causes, triggers, and patient autonomy. *Neurology*. 61, 1032.
48. Fridkis-Hareli, M., Teitelbaum, D., Gurevich, E., Pecht, I., Brautbar, C., Kwon, O.J., Brenner, T., Arnon, R., Sela, M., 1994. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 4872-6.
49. Fridkis-Hareli, M., Strominger, J.L., 1998. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J Immunol*. 160, 4386-97.
50. Fridkis-Hareli, M., Neveu, J.M., Robinson, R.A., Lane, W.S., Gauthier, L., Wucherpfennig, K.W., Sela, M., Strominger, J.L., 1999. Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules. *J Immunol*. 162, 4697-704.
51. Fusco, C., Andreone, V., Coppola, G., Luongo, V., Guerini, F., Pace, E., Florio, C., Pirozzi, G., Lanzillo, R., Ferrante, P., Vivo, P., Mini, M., Macrì, M., Orefice, G.,

- Lombardi, M.L., 2001. HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 57, 1976-9.
52. Garcea, O., Villa, A., Cáceres, F., Adoni, T., Alegría, M., Barbosa Thomaz, R., Buzo, R., Llamas López, L., Rivera Kindel, M., 2009. Early treatment of multiple sclerosis: a Latin American experts meeting. *Mult Scler*. 15 Suppl 3, S1-S12.
53. Gilden, D.H., 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 4, 195-202.
54. Gold, R., Hartung, H., 2008. Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 364-383.
55. Goodkin, D.E., 1998. Interferon beta therapy for multiple sclerosis. *Lancet*. 352, 1486-7.
56. Graber, J.J., McGraw, C.A., Kimbrough, D., Dhib-Jalbut, S., 2010. Overlapping and distinct mechanisms of action of multiple sclerosis therapies. *Clin Neurol Neurosurg*. 112, 583-91.
57. Gran, B., Tranquill, L.R., Chen, M., Bielekova, B., Zhou, W., Dhib-Jalbut, S., Martin, R., 2000. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology*. 55, 1704-14.
58. Grauer, O., Offenhäusser, M., Schmidt, J., Toyka, K.V., Gold, R., 2001. Glukokortikosteroid-Therapie bei Optikusneuritis und Multipler Sklerose Evidenz aus klinischen Studien und praktische Empfehlungen. *Der Nervenarzt*. 72, 577-589.
59. Gross, R., Healy, B.C., Cepok, S., Chitnis, T., Khoury, S.J., Hemmer, B., Weiner, H.L., Hafler, D.A., De Jager, P.L., 2010. Population structure and HLA DRB1*1501 in the response of subjects with multiple sclerosis to first-line treatments. *J Neuroimmunol*.
60. Grossman, I., Avidan, N., Singer, C., Goldstaub, D., Hayardeny, L., Eyal, E., Ben-Asher, E., Paperna, T., Pe'er, I., Lancet, D., Beckmann, J.S., Miller, A., 2007. Pharmacogenetics of glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis reveals drug-response markers. *Pharmacogenet Genomics*. 17, 657-66.
61. Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I.W., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 357, 851-62.

62. Hartung, H.-P., Gonsette, R., König, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS), 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet*. 360, 2018-25.
63. Hemmer, B., Stüve, O., Kieseier, B., Schellekens, H., Hartung, H.-P., 2005. Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 4, 403-12.
64. Henze, T., Rieckmann, P., Toyka, K.V., Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group of the German Multiple Sclerosis Society, 2006. Symptomatic treatment of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG) of the German Multiple Sclerosis Society. *Eur Neurol*. 56, 78-105.
65. Hernán, M.A., Olek, M.J., Ascherio, A., 1999. Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. *Neurology*. 53, 1711-8.
66. Hernán, M.A., Jick, S.S., Logroscino, G., Olek, M.J., Ascherio, A., Jick, H., 2005. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain*. 128, 1461-5.
67. Hohlfeld, R., 1999. Therapeutic strategies in multiple sclerosis. I. Immunotherapy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 354, 1697.
68. Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Wright, M.W., Wain, H.M., Trowsdale, J., Ziegler, A., Beck, S., 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 5, 889-99.
69. Howson, J.M.M., Stevens, H., Smyth, D.J., Walker, N.M., Chandler, K.A., Bingley, P.J., Todd, J.A., 2011. Evidence that HLA class I and II associations with type 1 diabetes, autoantibodies to GAD and autoantibodies to IA-2, are distinct. *Diabetes*. 60, 2635-44.
70. IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 2001. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology*. 57, S3-9.
71. Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., others, 1996. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 39, 285-294.

72. Jacobs, L.D., Beck, R.W., Simon, J.H., Kinkel, R.P., Brownschidle, C.M., Murray, T.J., Simonian, N.A., Slasor, P.J., Sandrock, A.W., 2000. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med.* 343, 898-904.
73. Jersild, C., Svejgaard, A., Fog, T., 1972. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet.* 1, 1240-1.
74. Jersild, C., Fog, T., Hansen, G.S., Thomsen, M., Svejgaard, A., Dupont, B., 1973. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet.* 2, 1221-5.
75. Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 45, 1268-76.
76. Johnson, K.P., Brooks, B.R., Ford, C.C., Goodman, A., Guarnaccia, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Pruitt, A., Rose, J.W., others, 2000. Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. *Multiple Sclerosis.* 6, 255.
77. Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S., Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group, 2001. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. 1998 [classical article]. *Neurology.* 57, S46-53.
78. Joseph, J., Knobler, R.L., D'Imperio, C., Lublin, F.D., 1988. Down-regulation of interferon-[gamma]-induced class II expression on human glioma cells by recombinant interferon-[beta]: effects of dosage treatment schedule. *Journal of neuroimmunology.* 20, 39-44.
79. Kalanie, H., Kamgooyan, M., Sadeghian, H., Kalanie, A.R., 2000. Histocompatibility antigen (HLA) associations with multiple sclerosis in Iran. *Multiple Sclerosis.* 6, 317.
80. Kantarci, O., Wingerchuk, D., 2006. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol.* 19, 248-54.

81. Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C.H., Haas, T., Korn, A.A., Karlsson, G., Radue, E.W., FTY720 D2201 Study Group, 2006. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 355, 1124-40.
82. Kappos, L., Radue, E.-W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P., FREEDOMS Study Group, 2010. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362, 387-401.
83. Karpusas, M., Whitty, A., Runkel, L., Hochman, P., 1998. The structure of human interferon- β : implications for activity. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 54, 1203-1216.
84. Kaufman, D.I., Trobe, J.D., Eggenberger, E.R., Whitaker, J.N., 2000. Practice parameter: the role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 54, 2039-44.
85. Knipper, A.J., Hakenberg, P., Enczmann, J., Kuhröber, A., Kiesel, U., Kögler, G., Wernet, P., 2000. HLA-DRB1,3,4,5 and -DQB1 allele frequencies and HLA-DR/DQ linkage disequilibrium of 231 German caucasoid patients and their corresponding 821 potential unrelated stem cell transplants. *Hum Immunol.* 61, 605-14.
86. Kobelt, G., Berg, J., Lindgren, P., Jönsson, B., 2006. Costs and quality of life in multiple sclerosis in Europe: method of assessment and analysis. *Eur J Health Econ.* 7 Suppl 2, S5-13.
87. Koch-Henriksen, N., Sorensen, P.S., Christensen, T., Frederiksen, J., Ravnborg, M., Jensen, K., Heltberg, A., Kristensen, O., Stenager, E., Petersen, T., others, 2006. A randomized study of two interferon-beta treatments in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology.* 66, 1056.
88. Kragt, J.J., Nielsen, J.M., van der Linden, F.A.H., Uitdehaag, B.M.J., Polman, C.H., 2006. How similar are commonly combined criteria for EDSS progression in multiple sclerosis?. *Multiple Sclerosis.* 12, 782.
89. Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 33, 1444.
90. Larsen, C.E., Alper, C.A., 2004. The genetics of HLA-associated disease. *Curr Opin Immunol.* 16, 660-7.

91. Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C.F., 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 17, 210-8.
92. Lengyel, P., 1982. Biochemistry of interferons and their actions. *Annual Review of Biochemistry.* 51, 251-282.
93. Leppert, D., Waubant, E., Bürk, M.R., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 1996. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 40, 846-52.
94. Lincoln, M.R., Montpetit, A., Cader, M.Z., Saarela, J., Dymont, D.A., Tiislar, M., Ferretti, V., Tienari, P.J., Sadovnick, A.D., Peltonen, L., Ebers, G.C., Hudson, T.J., 2005. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 37, 1108-12.
95. Liu, Z., Pelfrey, C.M., Coteleur, A., Lee, J.C., Rudick, R.A., 2001. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology.* 112, 153.
96. Lu, H.T., Riley, J.L., Babcock, G.T., Huston, M., Stark, G.R., Boss, J.M., Ransohoff, R.M., 1995. Interferon (IFN) beta acts downstream of IFN-gamma-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-gamma. *J Exp Med.* 182, 1517-25.
97. Marrosu, M.G., Murru, M.R., Costa, G., Cucca, F., Sotgiu, S., Rosati, G., Muntoni, F., 1997. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet.* 61, 454-7.
98. Masterman, T., Ligers, A., Olsson, T., Andersson, M., Olerup, O., Hillert, J., 2000. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 48, 211-9.
99. Mayr, W.T., Pittock, S.J., McClelland, R.L., Jorgensen, N.W., Noseworthy, J.H., Rodriguez, M., 2003. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. *Neurology.* 61, 1373-7.
100. Mäurer, M., Gold, R., Toyka, K.V., Rieckmann, P., 2001. Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose mit rekombinanten Interferon- β -Präparaten Aspekte zur Pharmakologie und Dosierung. *Der Nervenarzt.* 72, 108-116.

101. McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 50, 121-7.
102. Mikol, D.D., Barkhof, F., Chang, P., Coyle, P.K., Jeffery, D.R., Schwid, S.R., Stubinski, B., Uitdehaag, B.M.J., REGARD study group, 2008. Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *Lancet Neurol.* 7, 903-14.
103. Milligan, N.M., Newcombe, R., Compston, D.A., 1987. A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *British Medical Journal.* 50, 511.
104. Modin, H., Olsson, W., Hillert, J., Masterman, T., 2004. Modes of action of HLA-DR susceptibility specificities in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet.* 74, 1321-2.
105. Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG), Rieckmann, P., 2006. [Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006)]. *Nervenarzt.* 77, 1506-18.
106. Münz, C., Lünemann, J.D., Getts, M.T., Miller, S.D., 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity?. *Nat Rev Immunol.* 9, 246-58.
107. Naito, S., Namerow, N., Mickey, M.R., Terasaki, P.I., 1972. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens.* 2, 1-4.
108. Nakanishi, K., Saitoh, S., 2011. Clinical and genetic characteristics of patients with type 1 diabetes associated with interferon therapy. *Diabetes Care.* 34, 471-3.
109. Namaka, M., Pollitt-Smith, M., Gupta, A., Klowak, M., Vasconcelos, M., Turcotte, D., Gong, Y., Melanson, M., 2006. The clinical importance of neutralizing antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Curr Med Res Opin.* 22, 223-39.
110. Neuhaus, O., Farina, C., Yassouridis, A., Wiendl, H., Then Bergh, F., Dose, T., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 2000. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1-reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 7452-7.

111. Neuhaus, O., Farina, C., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 2001. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 56, 702.
112. Neuhaus, O., Kieseier, B.C., Hartung, H.-P., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferon-betas, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 259, 27-37.
113. Noble, J.A., Valdes, A.M., Varney, M.D., Carlson, J.A., Moonsamy, P., Fear, A.L., Lane, J.A., Lavant, E., Rappner, R., Louey, A., Concannon, P., Mychaleckyj, J.C., Erlich, H.A., Type 1 Diabetes Genetics Consortium, 2010. HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes*. 59, 2972-9.
114. O'Connor, P., Filippi, M., Arnason, B., Comi, G., Cook, S., Goodin, D., Hartung, H.P., Jeffery, D., Kappos, L., Boateng, F., 2009. 250 [mu] g or 500 [mu] g interferon beta-1b versus 20 mg glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, randomised, multicentre study. *The Lancet Neurology*. 8, 889-897.
115. Oger, J., Freedman, M., 1999. Consensus statement of the Canadian MS CLinics Network on: the use of disease modifying agents in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 26, 274-5.
116. Okuda, D.T., Srinivasan, R., Oksenberg, J.R., Goodin, D.S., Baranzini, S.E., Beheshtian, A., Waubant, E., Zamvil, S.S., Leppert, D., Qualley, P., Lincoln, R., Gomez, R., Caillier, S., George, M., Wang, J., Nelson, S.J., Cree, B.A.C., Hauser, S.L., Pelletier, D., 2009. Genotype-Phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain*. 132, 250-9.
117. Olek, M.J., 2010. Epidemiology, risk factors, and clinical features of multiple sclerosis in adults. UpToDate, Gonzalez-Scarano, F (Ed), UpToDate, Waltham, MA.
118. Olerup, O., Hillert, J., 1991. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*. 38, 1-15.
119. Olsson, T., Hillert, J., 2008. The genetics of multiple sclerosis and its experimental models. *Current opinion in neurology*. 21, 255-260.
120. O'Riordan, J.I., Thompson, A.J., Kingsley, D.P., MacManus, D.G., Kendall, B.E., Rudge, P., McDonald, W.I., Miller, D.H., 1998. The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. *Brain*. 121 (Pt 3), 495-503.

121. Orton, S.M., Herrera, B.M., Yee, I.M., Valdar, W., Ramagopalan, S.V., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *The Lancet Neurology*. 5, 932-936.
122. Pachner, A.R., 2003. Anti-IFN beta antibodies in IFN {beta}-treated MS patients: Summary. *Neurology*. 61, 1.
123. Panitch, H., Goodin, D.S., Francis, G., Chang, P., Coyle, P.K., O'Connor, P., Monaghan, E., Li, D., Weinshenker, B., EVIDENCE Study Group. Evidence of Interferon Dose-response: European North American Comparative Efficacy, University of British Columbia MS/MRI Research Group, 2002. Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology*. 59, 1496-506.
124. Panitch, H., Goodin, D., Francis, G., Chang, P., Coyle, P., O'Connor, P., Li, D., Weinshenker, B., EVIDENCE (Evidence of Interferon Dose-response: European North American Comparative Efficacy) Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Research Group, 2005. Benefits of high-dose, high-frequency interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis are sustained to 16 months: final comparative results of the EVIDENCE trial. *J Neurol Sci*. 239, 67-74.
125. Pette, M., Pette, D.F., Muraro, P.A., Farnon, E., Martin, R., McFarland, H.F., 1997. Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes. *Neurology*. 49, 385-92.
126. Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., AFFIRM Investigators, 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 354, 899-910.
127. PRISM Study Group, 1998. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet*. 352, 1498-504.
128. Ramagopalan, S.V., Morris, A.P., Dyment, D.A., Herrera, B.M., DeLuca, G.C., Lincoln, M.R., Orton, S.M., Chao, M.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 2007. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet*. 3, 1607-13.

129. Ramagopalan, S.V., Ebers, G.C., 2009. Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation. *Genome Med.* 1, 105.
130. Ramagopalan, S.V., Knight, J.C., Ebers, G.C., 2009. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr Opin Neurol.* 22, 219-25.
131. Rep, M.H., Hintzen, R.Q., Polman, C.H., van Lier, R.A., 1996. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J Neuroimmunol.* 67, 111-8.
132. Rieckmann, P., Toyka, K.V., Bassetti, C., Beer, K., Beer, S., Buettner, U., Chofflon, M., Götschi-Fuchs, M., Hess, K., Kappos, L., Kesselring, J., Goebels, N., Ludin, H.-P., Mattle, H., Schlupe, M., Vaney, C., Baumhackl, U., Berger, T., Deisenhammer, F., Fazekas, F., Freimüller, M., Kollegger, H., Kristoferitsch, W., Lassmann, H., Markut, H., Strasser-Fuchs, S., Vass, K., Altenkirch, H., Bamborschke, S., Baum, K., Benecke, R., Brück, W., Dommasch, D., Elias, W.G., Gass, A., Gehlen, W., Haas, J., Haferkamp, G., Hanefeld, F., Hartung, H.-P., Heesen, C., Heidenreich, F., Heitmann, R., Hemmer, B., Hense, T., Hohlfeld, R., Janzen, R.W.C., Japp, G., Jung, S., Jügel, E., Koehler, J., Kölmel, W., König, N., Lowitzsch, K., Manegold, U., Melms, A., Mertin, J., Oschmann, P., Petereit, H.-F., Pette, M., Pöhlau, D., Pohl, D., Poser, S., Sailer, M., Schmidt, S., Schock, G., Schulz, M., Schwarz, S., Seidel, D., Sommer, N., Stangel, M., Stark, E., Steinbrecher, A., Tumani, H., Voltz, R., Weber, F., Weinrich, W., Weissert, R., Wiendl, H., Wiethölter, H., Wildemann, U., Zettl, U.K., Zipp, F., Zschenderlein, R., Izquierdo, G., Kirjazovas, A., Packauskas, L., Miller, D., Koncan Vracko, B., Millers, A., Orologas, A., Panellus, M., Sindic, C.J.M., Bratic, M., Svraka, A., Vella, N.R., Stelmasiak, Z., Selmaj, K., Bartosik-Psujik, H., Mitosek-Szewczyk, K., Belniak, E., Mochecka, A., Bayas, A., Chan, A., Flachenecker, P., Gold, R., Kallmann, B., Leussink, V., Mäurer, M., Ruprecht, K., Stoll, G., Weilbach, F.X., Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group, 2004. Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application. *J Neurol.* 251, 1329-39.
133. Rieckmann, P., 2008. Clinical trials in multiple sclerosis: current and future requirements - potential pitfalls. *J Neurol.* 255 Suppl 6, 66-8.
134. Riise, T., Nortvedt, M.W., Ascherio, A., 2003. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology.* 61, 1122.

135. Rio, J., Nos, C., Bonaventura, I., Arroyo, R., Genis, D., Sureda, B., Ara, J.R., Brieva, L., Martin, J., Saiz, A., others, 2004. Corticosteroids, ibuprofen, and acetaminophen for IFN beta-1a flu symptoms in MS: A randomized trial. *Neurology*. 63, 525.
136. Roach, E.S., 2004. Is multiple sclerosis an autoimmune disorder?. *Archives of Neurology*. 61, 1615.
137. Ross, C., Clemmesen, K.M., Svenson, M., Sørensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Skovgaard, G.L., Bendtzen, K., 2000. Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol*. 48, 706-12.
138. Rovaris, M., Confavreux, C., Furlan, R., Kappos, L., Comi, G., Filippi, M., 2006. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol*. 5, 343-54.
139. Rudick, R., Fischer, J., Antel, J., Confavreux, C., Cutter, G., Ellison, G., Lublin, F., Miller, A., Petkau, J., Rao, S., others, 1996. Clinical outcomes assessment in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 40, 469-479.
140. Rudick, R.A., Polman, C.H., Cohen, J.A., Walton, M.K., Miller, A.E., Confavreux, C., Lublin, F.D., Hutchinson, M., O'Connor, P.W., Schwid, S.R., Balcer, L.J., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2009. Assessing disability progression with the Multiple Sclerosis Functional Composite. *Mult Scler*. 15, 984-97.
141. Sadovnick, A.D., Risch, N.J., Ebers, G.C., 1998. Canadian collaborative project on genetic susceptibility to MS, phase 2: rationale and method. Canadian Collaborative Study Group. *Can J Neurol Sci*. 25, 216-21.
142. Sadovnick, A.D., 2009. European Charcot Foundation Lecture: the natural history of multiple sclerosis and gender. *J Neurol Sci*. 286, 1-5.
143. Schmidt, H., Williamson, D., Ashley-Koch, A., 2007. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 165, 1097-109.
144. Schrempf, W., Ziemssen, T., 2007. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 6, 469-75.
145. Schwarz, S., Meinck, H.-M., Storch-Hagenlocher, B., 2009. [Intravenous immunoglobulins in multiple sclerosis. An update]. *Nervenarzt*. 80, 918-28.

146. Segal, S., Wraber, B., Mesec, A., Horvat, A., Ihan, A., 2004. IFN-beta1a and IFN-beta1b have different patterns of influence on cytokines. *Clin Neurol Neurosurg.* 106, 255-8.
147. Sorensen, P.S., Fazekas, F., Lee, M., 2002. Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *Eur J Neurol.* 9, 557-63.
148. Sorensen, P.S., Ross, C., Clemmesen, K.M., Bendtzen, K., Frederiksen, J.L., Jensen, K., Kristensen, O., Petersen, T., Rasmussen, S., Ravnborg, M., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Danish Multiple Sclerosis Study Group, 2003. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet.* 362, 1184-91.
149. Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis*. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683-747.
150. Sotelo, J., Martínez-Palomo, A., Ordoñez, G., Pineda, B., 2008. Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 63, 303-11.
151. Steinman, L., 1993. Autoimmune disease. *Sci Am.* 269, 106-14.
152. Steinman, L., 2001. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *nature immunology.* 2, 762-763.
153. Stüve, O., Dooley, N.P., Uhm, J.H., Antel, J.P., Francis, G.S., Williams, G., Yong, V.W., 1996. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol.* 40, 853-63.
154. Teitelbaum, D., Meshorer, A., Hirshfeld, T., Arnon, R., Sela, M., 1971. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol.* 1, 242-8.
155. Teitelbaum, D., Fridkis-Hareli, M., Arnon, R., Sela, M., 1996. Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses. *J Neuroimmunol.* 64, 209-17.
156. Terasaki, P.I., Park, M.S., Opelz, G., Ting, A., 1976. Multiple sclerosis and high incidence of a B lymphocyte antigen. *Science.* 193, 1245.
157. Thacker, E.L., Mirzaei, F., Ascherio, A., 2006. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol.* 59, 499-503.

158. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium & The Wellcome Trust Case Control Consortium, T.I.M.S.G.C.&T.W.T.C.C.C., 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 476, 214.
159. Tintoré, M., Rovira, A., Martínez, M.J., Rio, J., Díaz-Villoslada, P., Brieva, L., Borrás, C., Grivé, E., Capellades, J., Montalban, X., 2000. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 21, 702-6.
160. Tremlett, H., Paty, D., Devonshire, V., 2006. Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurology*. 66, 172-7.
161. Tremlett, H.L., Yoshida, E.M., Oger, J., 2004. Liver injury associated with the beta-interferons for MS: a comparison between the three products. *Neurology*. 62, 628-31.
162. Trojano, M., Avolio, C., Liuzzi, G.M., Ruggieri, M., Defazio, G., Liguori, M., Santacroce, M.P., Paolicelli, D., Giuliani, F., Riccio, P., Livrea, P., 1999. Changes of serum sICAM-1 and MMP-9 induced by rIFNbeta-1b treatment in relapsing-remitting MS. *Neurology*. 53, 1402-8.
163. Van den Noort, S., Eidelman, B., Rammohan, K., others, 2007. National Multiple Sclerosis Society (NMSS): disease management consensus statement. New York: National MS Society.
164. Van der Walt, A., Stankovich, J., Bahlo, M., Taylor, B.V., Van der Mei, I.A.F., Foote, S.J., Rubio, J.P., Kilpatrick, T.J., Butzkueven, H., 2011. Heterogeneity at the HLA-DRB1 allelic variation locus does not influence multiple sclerosis disease severity, brain atrophy or cognition. *Mult Scler*. 17, 344-52.
165. Vandiedonck, C., Taylor, M.S., Lockstone, H.E., Plant, K., Taylor, J.M., Durrant, C., Broxholme, J., Fairfax, B.P., Knight, J.C., 2011. Pervasive haplotypic variation in the spliceo-transcriptome of the human major histocompatibility complex. *Genome Res*. 21, 1042-54.
166. Van Weyenbergh, J., Lipinski, P., Abadie, A., Chabas, D., Blank, U., Liblau, R., Wietzerbin, J., 1998. Antagonistic action of IFN-beta and IFN-gamma on high affinity Fc gamma receptor expression in healthy controls and multiple sclerosis patients. *J Immunol*. 161, 1568-74.

167. Weiner, H.L., 2004. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Archives of Neurology*. 61, 1613.
168. Weinshenker, B.G., Santrach, P., Bissonet, A.S., McDonnell, S.K., Schaid, D., Moore, S.B., Rodriguez, M., 1998. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. *Neurology*. 51, 742-7.
169. Weinshenker, B.G., O'Brien, P.C., Petterson, T.M., Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C.F., Dodick, D.W., Pineda, A.A., Stevens, L.N., Rodriguez, M., 1999. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol*. 46, 878-86.
170. Whitaker, J.N., McFarland, H.F., Rudge, P., Reingold, S.C., 1995. Outcomes assessment in multiple sclerosis clinical trials: a critical analysis. *Multiple Sclerosis*. 1, 37.
171. Willer, C.J., Dymment, D.A., Sadovnick, A.D., Rothwell, P.M., Murray, T.J., Ebers, G.C., Canadian Collaborative Study Group, 2005. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ*. 330, 120.
172. Yong, V.W., 2002. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*. 59, 802.
173. Zamvil, S.S., Steinman, L., 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*. 8, 579-621.
174. Ziemssen, T., Neuhaus, O., Farina, C., Hartung, H.P., Hohlfeld, R., 2002a. Behandlung der Multiplen Sklerose mit Glatiramer-Azetat. *Der Nervenarzt*. 73, 321-331.
175. Ziemssen, T., Kümpfel, T., Klinkert, W.E.F., Neuhaus, O., Hohlfeld, R., 2002b. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. *Brain-derived neurotrophic factor*. *Brain*. 125, 2381-91.
176. Ziemssen, T., 2009. Multiple sclerosis beyond EDSS: depression and fatigue. *J Neurol Sci*. 277 Suppl 1, S37-41.

11. Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die mich auf dem langen Weg bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet haben. Insbesondere danke ich allen Patienten/innen und Blutspendern/innen für ihre Teilnahme an dieser Studie. Herrn Prof. Dr. Th. Weber danke ich dafür, dass er mich über die lange Zeit, die das Anfertigen dieser Arbeit gekostet hat, betreut und während dieser Zeit niemals die Geduld verloren hat.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie mich während meines Studiums immer unterstützt und niemals unter Druck gesetzt hat.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labor Fenner und hier besonders an Dr. Heiko Petersen und Sabine Simon für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Laborarbeit.

Dr. Hannemann-Pohl und den Mitarbeiterinnen der Blutbank danke ich für die Einsendung der Proben für die Kontrollgruppe.

Den Mitgliedern der MSAGN danke ich für die Mitarbeit, ihre Zeit und die vertrauensvolle Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Eingabe der Patientendaten.

Last but not least danke ich Frau Schlieker für ihr organisatorisches Talent und ihre aufmunternde Worte.

12. Lebenslauf

Lebenslauf Seite 1 - entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Lebenslauf Seite 2 - entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Lebenslauf Seite 3 - entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Lebenslauf Seite 4 - entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Selbig'.

San Diego, den 04.04.2013