

Aus der Neurologischen Klinik
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. C. Weiler

Apoptosemarker (sCD95 und DNA-Fragmente) als
Aktivitätsparameter bei der Multiplen Sklerose

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Susanne Gheorghiu
aus
Tecuci

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Universität Hamburg am: 09.August 2004

veröffentlicht mit Genehmigung des
Fachbereichs Medizin der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss: Der Vorsitzende: Prof. Dr. C. Weiller

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in : Prof. Dr. D. Lorke

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in : PD Dr. A. Erbersdobler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Definition der Multiplen Sklerose.....	5
1.2	Epidemiologie der Multiplen Sklerose.....	6
1.3	Diagnose der Multiplen Sklerose.....	7
1.4	Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose.....	10
2	Fragestellung.....	22
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Materialverzeichnis.....	23
3.1.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs für die Serumanalyse von sCD95.....	23
3.1.2	Charakterisierung des Patientenkollektivs für die Liquoranalyse von DNA-Fragmenten (TUNEL).....	24
3.1.3	Technische Geräte.....	25
3.1.4	Kleingeräte.....	25
3.1.5	Materialien für die Bestimmung von sCD95 im Serum.....	25
3.1.6	Materialien für die Analyse von DNA-Fragmenten im Liquor.....	26
3.2	Methodik.....	27
3.2.1	Entnahme, Aufbereitung und Lagerung von Liquor und Serum.....	27
3.2.2	sCD95 (sAPO-1/Fas)- Bestimmung im Serum.....	27
3.2.3	Bestimmung der DNA-Fragmente im Liquor	28
3.2.4	Statistische Auswertung.....	31
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Serologische Untersuchung des sCD95-Wertes im Serum.....	32
4.2	Histologische Untersuchung der TUNEL-positiven Zellen im Liquor.....	45
5	Diskussion.....	47
6	Zusammenfassung.....	54
7	Literaturverzeichnis.....	56
8	Verzeichnisse.....	67
9	Abkürzungen	68
10	Anhang.....	70
10.1	Danksagung.....	70
10.2	Erklärung.....	71
11	Lebenslauf.....	72

1 Einleitung

1.1 Definition der Multiplen Sklerose

Jean Marie Charcot (1825-1893) beschrieb erstmals 1868 aufgrund makroskopischer und mikroskopischer Befunde umfassend das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose (MS) und grenzte diese von der ebenfalls durch ihn beschriebenen myatrophischen Lateralsklerose ab.

In seinen Vorlesungen an der Salpêtrière in Paris trug er 1872 die klinischen Besonderheiten der Krankheit vor, stellte 1877 den Myelinverlust fest und vermutete, dass die Impulse über die nackten Axone nicht weitergeleitet werden könnten und dass wahrscheinlich auch die Axone selbst geschädigt würden. Charcot hielt fest, dass die Ursache der Krankheit unbekannt sei und machte 1879 auch auf die benignen Verlaufsformen aufmerksam.

Aufgrund der Beobachtung, dass die entzündlichen Herde mit reaktiver Gliose unregelmäßig vorwiegend die weiße Substanz des Zentralnervensystems befallen und durch die disseminierte Lokalisation völlig unterschiedliche Symptome und Symptomkonstellationen erzeugen, veranlasste Leyden 1875 den Ausdruck „disseminierte Sklerose“ in den Sprachgebrauch einzuführen.

Der Verlauf der Multiplen Sklerose ist sehr unterschiedlich (Wingerchuk et al. 2000). Bei der schubförmigen MS können die Krankheitserscheinungen immer wieder erscheinen (Schübe) und können sich anfänglich fast ganz oder vollständig zurückbilden. Nach einem Schub kann sich der Gesundheitszustand wieder normalisieren und die Beschwerden klingen vollständig ab, wodurch die Krankheit monate- oder gar jahrelang eine Heilung vortäuschen kann. Bei 15-25% der Patienten ist der Verlauf primär chronisch progredient. Oft schreitet sie nur langsam fort, und es kommt erst nach Jahren oder Jahrzehnten zu mehr oder weniger schwerem Verlauf. Die benigne MS kann so leicht verlaufen, dass über Jahrzehnte oder sogar

das ganze Leben fast keine oder nur eine geringe Beeinträchtigung besteht. Die Krankheit kann allerdings auch hoch akut und so zerstörerisch beginnen, dass sie sofort zur völligen Pflegebedürftigkeit oder gar zum Tod führt. Es ist unbekannt, warum die Erkrankung bei den Patienten so unterschiedlich verläuft. Auch die Geschwindigkeit der Zunahme neurologischer Behinderungen durch die Multiple Sklerose kann sehr unterschiedlich sein und schwankt zwischen geringen Behinderungen nach 30jährigem Verlauf oder aber erheblichen Behinderungen schon nach drei bis fünf Jahren (Wingerchuk 2000, Hein 2000).

1.2 Epidemiologie der Multiplen Sklerose

Multiple Sklerose ist die häufigste entzündliche neurologische Erkrankung des Zentralnervensystems (Compston et Coles 2002).

Die Inzidenz (Zahl der Neuerkrankungen während eines Jahres pro 100000 Einwohner) der MS für Deutschland wird auf $3/10^6$ geschätzt (Wilkström et al. 1977, Firnhaber et al. 1985, Buddenhage et al. 1985, Hein et al. 2000). Die Prävalenz (Zahl aller Erkrankten pro 100000 Einwohner zu einem bestimmten Zeitpunkt) liegt in Südniedersachsen bei $85/10^6$ Einwohner und in Südhessen bei $68/10^6$ Einwohner.

Betrachtet man die Prävalenz der MS in ganz Europa so findet man die höchste Prävalenz in Nordschottland mit $155/10^6$ Einwohner (Downie et al. 1983) und die niedrigste Prävalenz in Malta ($4/10^6$) und auf den Kanarischen Inseln ($1/10^6$).

Allerdings können die einzelnen Untersuchungen zur Inzidenz und Prävalenz der MS wegen methodischer Unterschiede oft nur schwer und nur unter Vorbehalt miteinander verglichen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Häufigkeit der MS in den gemäßigten Breiten und etwas kälteren Zonen größer ist als z.B. in den Mittelmeerregionen. Dieses Nord-Süd-Gefälle zeigt sich nicht nur in

Europa, sondern auch in Amerika und zum Teil auch in Asien. Diese geographische Verteilung der Erkrankung lässt vermuten, dass Umweltfaktoren wie Lichteinwirkung eine Rolle bei der Ätiologie der MS eine Rolle spielen. Leverkus et al (1997) zeigten, dass die Expression von CD95 auf Zellen des Immunsystems durch UV-Licht-Exposition induziert wird.

1.3 Diagnose der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose bereitet durch die große Varianz ihrer Erscheinungsweise häufig diagnostische Schwierigkeiten, vor allem wenn die Symptomkonstellation nicht typisch ist oder wenn andere, meist sehr viel seltenere Krankheiten das typische Bild der MS nachahmen.

Die diagnostischen Möglichkeiten, die sich bis ans Ende des 18. Jahrhunderts ausschließlich auf die klinische Beobachtung und Prüfung der Reflexe beschränkten, wurden 1891 durch Quincke erweitert, der die diagnostische Lumbalpunktion einführte. Im Liquor werden im Rahmen der MS-Diagnostik vorwiegend das Proteinprofil, die oligoklonalen Banden und die qualitativen bzw. quantitativen Veränderungen der Zellen bestimmt. Die Untersuchung der Elektrolyte, Enzyme und Glucose spielt nur bei differentialdiagnostischen Überlegungen eine Rolle.

Unter den Liquorproteinen sind vor allem das Albumin und Immunglobulin G von Bedeutung. Diese Proteine treten bei einer Schrankenstörung, die bei MS, aber auch bei anderen neurologischen Erkrankungen auftreten kann aus dem Blut in den Liquorraum über und verursachen eine Gesamteiweißerhöhung im Liquor (Tourtelotte et al. 1978). Das IgG stammt dabei zum größten Teil direkt aus MS-Herden, wo es von proliferierenden B-Zellen (Plasmazellen) produziert wird (Tourtelotte et al. 1985). Insbesondere dann, wenn die IgG-Erhöhung im Liquor grenzwertig ist kann die Bestimmung der oligoklonalen Banden im Liquor die diagnostische Sicherheit erhöhen.

Die Muster der oligoklonalen Banden bleiben bei einem Patienten im Verlaufe der Krankheit relativ konstant und werden auch durch Immunsuppression nur wenig modifiziert oder abgeschwächt (Tourtelotte et al. 1984). Das Auftreten von oligoklonalen Banden im Liquor ist eines der wichtigsten diagnostischen Kriterien für die Multiple Sklerose. Bei gesicherter MS sind die oligoklonalen Banden in 95% der Fälle nachweisbar (Lievera et al. 1981), bei wahrscheinlicher MS sinkt der Wert aber auf 40% ab (Ebers et al. 1980).

Die oligoklonalen Banden zeigen zwar eine höhere Spezifität für die MS als der Absolutwert des IgG, sie sind aber ebenfalls nicht auf die MS beschränkt. Man findet sie auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie Neurolyues, Borreliose, Enzephalitis und Meningitis.

Die 1965 vom sog. Schumacher-Komitee ausgearbeiteten Schumacher-Kriterien (Schumacher et al. 1965) wurden in den folgenden Jahren von anderen Wissenschaftlern modifiziert (Mc Alpine et al. 1972, McDonald et al. 1976, Rose et al. 1976), wobei sich alle Kriterien ausschließlich auf klinische Daten aus der Anamnese im Verlauf der Krankheit beziehen. Der Wahrscheinlichkeitsgrad der Diagnose Multiplen Sklerose wurde abgestuft in „klinisch sicher“, „wahrscheinlich“, bis zu „möglich“. Außerdem wurde in den Kriterien festgelegt, dass bei der klassischen MS die Läsionen polytop und zeitlich versetzt auftreten, vorwiegend die weiße Substanz betreffen und dass die Krankheit auch chronisch progredient verlaufen kann.

Zusatzuntersuchungen wie Liquoruntersuchungen und evozierte Potentiale werden erst seit 1984 in Form der Poser-Kriterien (Poser et al. 1984) in die allgemein diagnostischen Kriterien mit einbezogen. Poser erweiterte damit die Schumacher-Kriterien um zwei zusätzliche Kategorien wie „laborunterstützt sichere MS“ und „laborunterstützt wahrscheinliche MS“. Die Poser-Kriterien erlauben es dem Arzt die Diagnose Multiple Sklerose schon beim zweiten Schub zu stellen. Dabei müssen zusätzlich typische

Liquorveränderungen wie oligoklonale Banden oder IgG-Erhöpfung im Liquor auftreten und es müssen sich Läsionen entweder klinisch oder paraklinisch, also mit Hilfe von evozierten Potenzialen oder Kernspintomographie nachweisen lassen.

Die Ableitung von evozierten Potentialen ist die wichtigste elektrophysiologische Methode für die Diagnostik der Multiplen Sklerose (O'Connor et al. 1998) und dient auch der Diagnose von stummen MS-Herden (Gronseth et al. 2000).

Mit den evozierten Potentialen kann die Leitgeschwindigkeit der Impulse zwischen bestimmten Strukturen des Zentralnervensystems bestimmt werden und damit Hinweise für die Lokalisation einer Schädigung gewonnen werden. Dabei spielt die Tatsache, dass auch klinisch stumme Herde gefunden werden können eine große Rolle.

Die größere Sensivität zeigt die Ableitung der visuell evozierten Potentiale (VEP) und der motorisch evozierten Potentiale (MEP). Die Ableitung der somatosensibel evozierten Potentiale (SSEP) und der frühen akustisch evozierten Potentiale (FAEP) sind weniger sensitiv (Spiegel et al. 2003).

Die Magnetresonanz- oder Kernspintomographie (MRI= magnetic resonance imaging) ist ein außerordentlich sensitives Verfahren (98%) um Läsionen, auch klinisch stumme, im Gehirn von MS-Patienten aufzudecken (Willoughby et al. 1989). Es können auch isolierte Läsionen nachgewiesen werden, die von der Lokalisation her meist die klinische Symptomatik zu erklären vermögen.

Multifokale, periventrikuläre Läsionen in der weißen Substanz sind für MS typisch, aber nicht spezifisch. Sie finden sich auch bei vaskulären Hirnkrankheiten oder bei der akuten disseminierten Enzephalomyelitis, Neurosarkoidose oder zerebralen Lupus. Ganz ähnliche Läsionen können aber auch bei gesunden Personen mit zunehmendem Alter gefunden werden (Kesselring et al. 1988, Kesselring et al. 1989).

Durch Gabe von paramagnetischen Kontrastmitteln (z.B. Gadolinium-DTPA) lässt sich auch die Krankheitsaktivität, wie sie sich in Zahl, Größe und Alter der Läsionen manifestiert, bei der MS verfolgen. Somit dient die MRI auch der Evaluation von Therapien (Barkhof et al. 1997, Sormani et al. 2002, McFarland et al. 2002). Ohne Zweifel hat die Magnetresonanztomographie in den letzten Jahren die Diagnostik der MS wesentlich erleichtert. Die McDonald-Kriterien (McDonald et al. 2001, McDonald et al. 1992) erlauben die Diagnose MS auch bei Patienten mit isolierten Symptomen (Dalton et al. 2002).

1.4 Ätiopathogenese der Multiplen Sklerose

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist unbekannt.

Es fällt eine familiäre Häufung von gesicherten MS-Fällen auch über mehrere Generationen auf, wobei klar ist, dass sie nicht einem einfachen Mendelschen Erbgang folgt. Das Risiko, an MS zu erkranken, ist für Verwandte ersten Grades eines Betroffenen 30-40mal höher als das Durchschnittsrisiko von 0,1% in der Bevölkerung (Sadovnik et al. 1988). Aus Beobachtungen bei Zwillingen haben sich Hinweise für eine genetische Disposition bis hin zu HLA-Assoziationen ergeben. HLA (Human Leukocyte Antigen) ist eine Region auf Chromosom 6 und spielt eine wichtige Rolle bei der genetischen Immunantwort. Sie codieren die MHC-Moleküle, die notwendig sind, um den T-Zellen Antigene zu präsentieren. Für Angehörige der weißen Rasse ist das Risiko, eine MS zu bekommen, etwa um das 2,5-fache erhöht, wenn sie Träger des HLA-DR-2 Genes sind. Die Beziehung

von HLA-DR-2 zur MS ist allerdings nicht eng genug, um für die klinische Diagnostik von Bedeutung zu sein (Jong et al. 2002). Die Zahl der falsch positiven und falsch negativen Fälle ist zu groß, denn HLA-DR-2 kommt auch zu ca. 20% in der gesunden Bevölkerung vor, und 30-50% der MS-Patienten sind HLA-DR2 negativ. Krankheiten, die bekanntermaßen auf einen Autoimmunmechanismus zurückgehen, zeigen eine Korrelation zu Genprodukten, die vom HLA-Komplex codiert werden. Eine starke Assoziation zu HLA, wie sie bei der MS vorliegt, darf deshalb als Hinweis auf eine Immunpathogenese gewertet werden (Martin et al. 1992, Batchelor et al. 1985). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre weisen außerdem darauf hin, dass in der Pathogenese der MS Autoimmunprozesse eine wichtige Rolle spielen (Aktas et al. 2000).

Ein immunologischer Selektionsprozess im Thymus beseitigt beim Gesunden nahezu alle autoreaktiven T-Zellen (Steinmann et al. 1996, Jones et al. 1995, Sprent et al. 1989). Trotzdem können einige autoreaktive, z.B. gegen Myelin gerichtete T-Zellen diesen Schutzmechanismus überwinden und im Blut persistieren (Hellings et al. 2001, Trotter et al. 1998). Die Aktivierung dieser persistierenden, autoreaktiven T-Zellen ist ein entscheidender Punkt in der Entstehung der MS (Hemmer et al. 2002). Die T-Zellen können in der Peripherie z.B. durch Umweltfaktoren wie UV-Licht-Exposition (Leverkus et al. 1997), Stress (Ackerman et al. 2002) oder durch virale oder bakterielle Antigene oder Peptide aktiviert werden. Diese Antigene müssen eine genügend große Anzahl übereinstimmender Proteinsequenzen oder eine ähnliche molekulare Gestalt haben wie das körpereigene Peptid, z.B. Myelin, gegen das die T-Zelle ausgerichtet ist (De Keyser et al. 2003, Wekerle et al. 1993, Wucherpfennig et al. 1995). Man spricht in diesem Fall von Molekularer Mimikri (Fujinami 1992). Daraus folgt, dass das für das Initialereignis verantwortliche Agens (z.B. Virus) nicht unbedingt zu persistieren braucht, um die Kaskade der weiteren Ereignisse zu unterhalten. Außerdem muss

das Initialereignis nicht bei allen Betroffenen durch ein und dasselbe Agens ausgelöst werden. Zusammenfassend wird die MS eher als eine späte allgemeine Reaktion gegen Infektionen, die in einer Periode erhöhter immunologischer Vulnerabilität durchgemacht wurden, denn als Reaktion gegen ein spezifisches Agens interpretiert (Alter et al. 1981).

Bereits die Endothelien der ZNS-Gefäße sind ein möglicher Partner für die aktivierten, autoreaktiven T-Zellen. In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass kultivierte ZNS-Endothelien die Fähigkeit haben, nach $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung MHC-Moleküle der Klasse II zu exprimieren und den T-Zellen Antigene zu präsentieren (McCarron et al. 1985). Eine direkte Antigen-spezifische Interaktion der T-Zellen mit den Endothelzellen ist geeignet, die Blut-Hirn-Schranke selektiv zu beeinflussen. So können die autoreaktiven T-Zellen aus dem Blut in das Zentralnervensystem einwandern (Pender et al. 1988, Bechmann et al. 1999) und sind somit für die Entstehung von intrazerebralen Entzündungsreaktionen, die mit der erhöhten Expression und Sekretion gewebeschädigender Faktoren wie $\text{TNF}\alpha/\beta$, Interferon γ und CD95L einhergehen, von Bedeutung (Pender et al. 1998) (siehe Abbildung 1). CD95 ist ein Rezeptor auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, auf einer Reihe von Tumorzellen und auch auf Zellen des Zentralnervensystems wie Oligodendrozyten (Trauth et al. 1989). Die Bindung mit dem spezifischen Liganden CD95L kann zum programmierten Zelltod dieser Zellen führen (Selmaj et al. 1991, D'Souza et al. 1996).

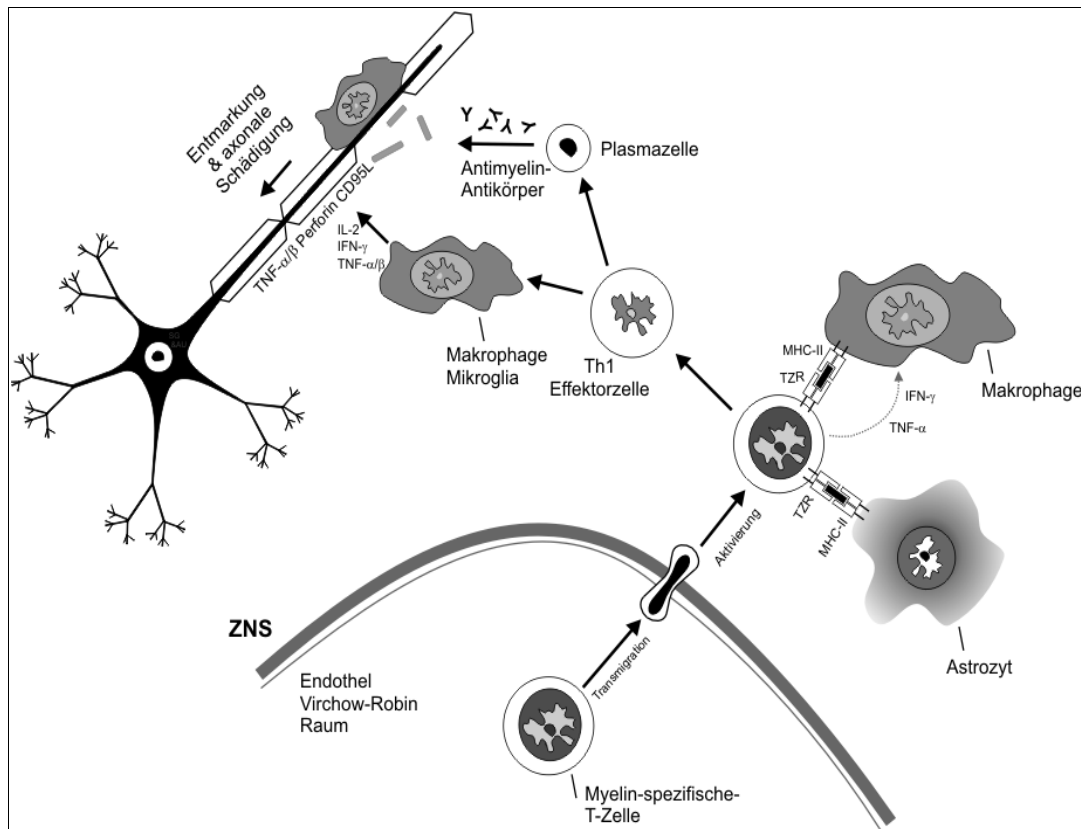


Abbildung 1- Ätiopathogenetisches Modell der MS

Gleich hinter der Endothelzellschicht und der darunter liegenden Basalmembran folgt ein dichter Filz von Astrozyten-Fußfortsätzen, die auch die dem ZNS zugewandte Seite der Gefäß-Basalmembran bilden. Astrozyten haben auch eine bekannte Funktion in der Regulierung des ZNS-internen Milieus und im Stoffwechsel von und zu den Blutgefäßen. Damit scheint ihnen prinzipiell der Zugang zu ZNS-Antigenen ermöglicht zu sein, und Astrozyten sind daher weitere Kandidaten für eine Antigen-spezifische Interaktion mit eingedrungenen autoreaktiven T-Zellen. Aktivierte T-Zellen haben die Fähigkeit, Astrozyten mittels IFN γ zur Expression von MHC-II-Molekülen zu stimulieren (De Keyser et al. 2003). In der Tat konnte durch in-vitro-Experimente gezeigt werden, dass Astrozyten in der Lage sind, den T-Zellen mit Hilfe von MHC-II-Molekülen Antigene zu präsentieren und diese damit zur Proliferation zu veranlassen

(Fierz et al. 1986). Die gegenseitige Aktivierung von perivaskulären Astrozyten und einwandernden T-Lymphozyten könnte also für die Auslösung von Entzündungsreaktionen und Gewebedestruktionen im ZNS eine Rolle spielen (Storch et al. 1997). Erkennen inflammatorische T-Zellen Peptide, die an MHC-II-Molekülen auf B-Zellen gebunden sind, regen sie diese zur Produktion von Antikörpern an. Auch Makrophagen werden durch inflammatorische T-Zellen durch das Zytokin $IFN\gamma$ und durch $TNF\alpha$ aktiviert, wenn sie Antigene mit Hilfe von MHC-II-Molekülen präsentieren (Stout et al. 1989). Aktivierte Makrophagen bilden Sauerstoffradikale und Stickstoffoxid und wirken lokal gewebeschädigend. So kann das körpereigene Myelin, ein wesentlicher Bestandteil der die Nervenzelle isolierenden Markscheide zerstört werden.

Dies konnte durch Beobachtungen von Ratten mit EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) bestätigt werden. Die EAE ist ein Tiermodell der MS. Sie wird experimentell durch Beimpfung von Ratten z.B. mit Myelin-Basischem-Protein (MBP) hervorgerufen und äußert sich mit Lähmungserscheinungen (Pender et al. 1988). Vermittelt wird diese der MS ähnliche demyelinisierende Erkrankung des ZNS durch autoreaktive, inflammatorische T-Zellen, die für MBP spezifisch sind (Pettinelli et al. 1981). Andere tierexperimentelle Modelle der EAE beruhen auf T-Zellen, die für MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) oder PLP (Proteolipid-Protein) spezifisch sind (Storch et al. 1998, Dittel et al. 2000). So finden sich im Gehirn von Ratten mit EAE demyelinisierte Neuronen und in den Läsionen inflammatorische T-Zellen. Bei Patienten mit MS liegen ebenfalls ähnliche Läsionen mit inflammatorischen T-Zellen vor.

Im Gegensatz zu den Astrozyten scheint es für die anderen zwei zellulären Hauptelemente des ZNS, die Oligodendrozyten und die Neuronen, keine Antigen-spezifische Interaktionsmöglichkeit mit den T-Zellen zu geben, zumindest was die Induktion einer Immunantwort betrifft, da bisher für beide Zelltypen keine Expression von Klasse-II-Molekülen gezeigt werden

konnte (Hemmer 2002). Hingegen führt auch bei diesen Zellen die Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ in vitro zur Expression von Klasse-I-Molekülen, so dass zumindest auf der Effektorseite ein Antigen-spezifischer Kontakt von Oligodendrozyten und Neuronen mit zytotoxischen T-Lymphozyten möglich wäre (Neumann et al. 2002).

Nachdem Glücksmann et al. 1951 als erste den Zelltod beschrieben hatten und Lockshin et al. 1964 den Begriff „programmierter Zelltod“ eingeführt hatten, wurde intensiv nach einem Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, unter anderem zur MS gesucht. 1972 beschrieben Kerr et al. zwei unterschiedliche Modelle des Zelltodes, zum einen die Nekrose, zum anderen die Apoptose. Die Apoptose scheint für die Selektion und Elimination von autoreaktiven B- und T-Zellen und für ein regelrechtes Funktionieren des gesamten Immunsystems Voraussetzung zu sein (Suda et al. 1993). Sie dient der Eliminierung von ungewollten Zellen des Organismus und spielt eine wichtige Rolle bei regenerativen und immunologischen Vorgängen sowie bei der embryonalen Entwicklung des Körpers.

Histopathologisch zeichnet sich die Apoptose durch Änderung der zellulären Strukturen (Chromatinkondensation, Zellschrumpfung und Ausknospung von Zellfragmenten) und biochemisch durch Einsetzen der DNA-Fragmentation durch endogene Nukleasen (Caspasen) an bestimmten Stellen aus (Wylie et al. 1984, Kerr et al. 1987). Dabei findet man die DNA-Fragmentation nicht nur in histologisch gesicherten apoptotischen Zellen sondern auch in morphologisch intakten Zellen, die den Prozess des programmierten Zelltodes gerade durchlaufen (Umansky et al. 1982).

Um die DNA-Bruchstücke in situ sichtbar zu machen entwickelten Gavrieli et al. 1992 die TUNEL-Methodik (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling). Dowling et al. gelang es 1997 mit Hilfe dieser Methode eine

signifikante Korrelation zwischen der erhöhten Anzahl der dUTP-markierten apoptotischen Zellen in der weißen Substanz von MS-Patienten und den histopathologischen Veränderungen, also der Destruktion des Nervengewebes, in den Läsionen nachzuweisen.

Die Frage nach dem Apoptose auslösenden Mechanismus und seiner Bedeutung im Krankheitsprozess ist bis heute ein zentraler Bestandteil der Forschung in vielen Bereichen.

Ein klassischer Weg der Apoptose wird über sogenannte Todesrezeptoren vermittelt. 1989 berichteten Yonehara et al. als erste über FAS/APO-1 (CD95) als Apoptose auslösenden Faktor auf Zellmembranen. CD95 ist ein 45 kDa Protein der Tumornekrosefaktor(TNF)/Nerve-Growth-Factor(NGF)-Rezeptorfamilie und besteht aus einer extrazellulären Region, die den spezifischen Liganden bindet, und aus einem intrazellulären Teil. Die intrazelluläre Region besitzt ein homologes Proteinmotiv aus ca. 80 Aminosäuren, das für die Signaltransduktion der Rezeptoren essentiell ist und deshalb Todesdomäne genannt wird. CD95 kann auch in einer gelösten Form ohne transmembrane Einheit als sCD95 vorliegen (Knipping et al. 1995). Die Herkunft von sCD95 lässt sich durch alternatives mRNA-Splicing oder durch eine partielle Proteolyse von membrangebundenem CD95 erklären (Cascino et al. 1995). Die Expression von CD95 auf der Zelloberfläche findet auf aktivierten T-Zellen statt (Dhein et al. 1995) und kann durch $IFN\gamma$ und $TNF\beta$ getriggert werden (Daniel et al. 1994, Klas et al. 1993). Durch Bindung des natürlichen Liganden CD95L (CD95-Ligand, ein Trimer, homolog dem TNF) an den CD95-Rezeptor wird in den entsprechenden Zellen der programmierte Zelltod induziert und auf diesem Wege können autoreaktive T-Zellen eliminiert werden (Nagata et al. 1995). Weitere spezifische Liganden sind der Tumornekrosefaktor (TNF), der Nervenwachstumsfaktor (NGF) und der jüngst näher charakterisierte TNF-verwandte, apoptoseinduzierende Ligand (TRAIL) (Aktas et al. 2000).

Der erste Schritt in der Signalkette besteht in der Bildung eines speziellen Komplexes (DISC; death inducing signal complex). Hierbei lagert sich zunächst intrazellulär das Adaptormolekül FADD, das ebenfalls eine Todesdomäne besitzt, an die entsprechende Todesdomäne des Rezeptors (siehe Abbildung 2). Diese Domäne rekrutiert die noch inaktive Vorstufe von Caspase-8 in die Nähe des Rezeptors. Diese DISC-Formation führt zur Aktivierung von Caspase-8 und induziert die proteolytische Aktivierung von Effektorcaspasen, die schließlich zelluläre Substrate spalten (Bantel et al. 1999). Die Bindung von TRAIL an seinen spezifischen Rezeptor führt ohne Bildung einer Todesdomäne direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen (Marsters et al. 1997).

Neben der rezeptorgesteuerten Apoptose ist ein weiterer Signalweg bekannt, der von Mitochondrien reguliert wird. Wahrscheinlich interagieren die beiden Signaltransduktionswege miteinander (Ferrari et al. 1998). Die Mitochondrien setzen Cytochrom c frei, welche durch Apoptose-Inhibitoren der Bcl-2-Familie blockiert werden können. Cytochrom c bindet im Zytoplasma an das Adapterprotein Apaf-a, welches anschließend die Initiatorcaspase-9 aktiviert, die ihrerseits Effektorcaspasen aktiviert und dadurch den Zelltod auslöst.

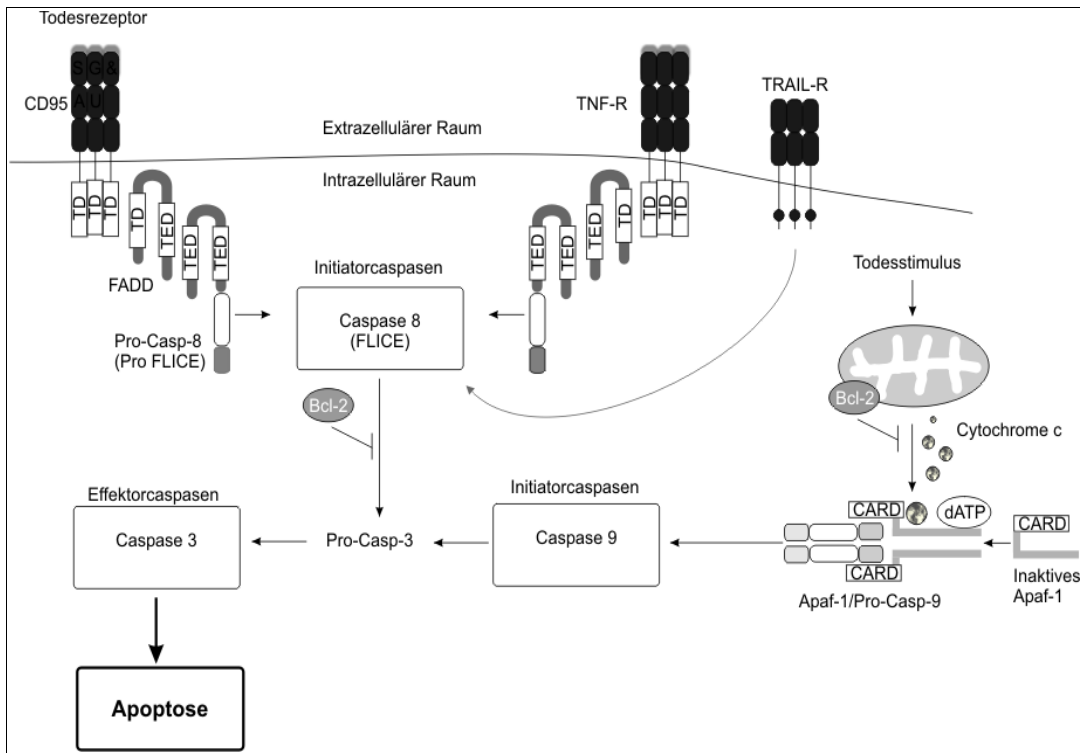


Abbildung 2- Apoptosevermittelnde Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktion

Bei Gesunden vermag die über diesen Mechanismus ausgelöste Apoptose die natürlich vorkommenden autoreaktiven T-Zellen unschädlich zu machen (Zipp et al. 1999, Gold et al. 1997). Im Gegensatz dazu finden sich im Gehirn von MS-Patienten nur selten apoptotische T-Zellen (Dowling et al. 1997), dafür aber Gewebedestruktionen als Ausdruck der Apoptose von Oligodendrozyten. Es gibt Hinweise dafür, dass Oligodendrozyten oder Neuronen apoptotisch untergehen können, allerdings ist fraglich, ob das CD95/CD95L-System für die Gewebsschädigung in den MS-Plaques verantwortlich ist (Medana et al. 2000, Jurewicz et al. 2001, Wosik et al. 2003). Dowling et al. (1997) wiesen eine erhöhte Expression von CD95L auf Astrozyten nach, was zur Apoptose-Induktion der Oligodendrozyten beitragen könnte. Nach einer aktuellen neuropathologischen Untersuchung könnte außerdem NGF für die Apoptose von Oligodendrozyten verantwortlich sein (Valdo et al. 2002).

Das Zentralnervensystem verfügt jedoch auch über protektive Mechanismen um sich vor dem immunologischen Angriff zu schützen. Antigen-präsentierende Zellen im ZNS können beim Gesunden autoreaktive T-Zellen durch Apoptose-Induktion unschädlich machen (De Keyser et al. 2003, Gold et al. 1997). Bei der EAE finden sich während der Remissionsphase im Rückenmark der Ratten apoptotische T-Lymphozyten als Ausdruck der funktionierenden Kontrolle des Entzündungsprozesses. (Pender et al. 1992, Schmied et al. 1993). Die Induktion der Apoptose von autoreaktiven T-Zellen stellt damit ein therapeutisches Ziel bei der Behandlung der EAE dar (Critchfield et al. 1994, Zhou et al. 1999). So spielt der programmierte Zelltod wahrscheinlich nicht nur für die Initiierung, sondern auch für die Beendigung der Entzündungsreaktion im ZNS eine Rolle.

Eine Störung im Apoptose auslösenden Mechanismus könnte für die Entstehung der MS eine wichtige Rolle spielen (Pender et al. 1998). Wird der Signaltransduktionsweg in autoreaktiven T-Lymphozyten blockiert,

entgehen diese Zellen der Apoptose. Die antigenpräsentierenden Zellen stellen einen Kostimulus zur Verfügung, der zur Produktion von FLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme inhibitory protein) und Bcl-2 abhängigen Proteinen in den T-Lymphozyten führt und diese dann vor der CD95-vermittelten Apoptose schützt, da sie den Signaltransduktionsweg der Apoptose blockieren (Sharief et al. 2001, Aktas et al. 2000, siehe Abbildung 1). So können autoreaktive T-Lymphozyten zeitweilig die protektiven Mechanismen des Zentralnervensystems überwältigen und durch die direkte Zerstörung von Oligodendrozyten oder durch Aktivierung von Makrophagen, B-Zellen und anderen T-Zellen zu neurologischen Schäden führen, noch bevor die rezeptorvermittelte Apoptose den immunologischen Angriff stoppen kann.

Es wurde nachgewiesen, dass die zelluläre Expression von FLIP im Serum von Patienten mit aktiver MS im Gegensatz zu Patienten mit stabiler MS und gesunden Kontrollen deutlich erhöht ist. Die zelluläre Expression von Bcl-2 im Serum dagegen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit aktiver oder stabiler MS oder gesunden Kontrollen (Semra et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Interferon β die Expression von FLIP in aktivierten T-Lymphozyten im Serum deutlich reduziert, allerdings auf die Expression von Bcl-2 keinen Einfluss hat (Sharief et al 2001).

Der Signaltransduktionsweg der CD95-vermittelten Apoptose kann in unterschiedlicher Weise gestört sein. Zum einen kann es zu der oben erwähnten Produktion von, die Apoptose inhibierendem, FLIP und Bcl-2 abhängigen Proteinen kommen. Zum anderen können CD95 und CD95L in ihrer Funktion gestört sein, was mit Beobachtungen bei Mäusen mit Gendefekten für die Codierung von CD95 (*lpr*-Mutation) oder CD95L (*gld*-Mutation) übereinstimmt. Diese Mäuse entwickeln als Folge der gestörten Interaktion von Rezeptor und Ligand lymphoproliferative Syndrome und Autoimmunkrankheiten, weil die autoreaktiven T-Zellen der Apoptose

entgehen (Zipp et al. 1998). Van Parijs et al. (1998) stellten zudem fest, dass es auch zu einem vollständigen Verlust der CD95L-Expression kommen kann.

Zum anderen scheint auch sCD95 den Ablauf der Apoptose zu stören, indem es die zytolytische Aktivität des membrangebundenen CD95L inhibiert (Tanaka et al. 1998, Zipp et al 1998). sCD95 scheint die Zellen vor dem programmierten Zelltod zu schützen (Cheng et al. 1994). Allerdings wird die Funktion von sCD95 als Apoptose-Inhibitor oder Promotor bis jetzt noch kontrovers diskutiert.

Bislang ist nicht untersucht, inwiefern der sCD95-Wert mit den verschiedenen Krankheitsstadien der MS korreliert und ob die Höhe von sCD95 im Serum zur Beurteilung der Krankheitsaktivität herangezogen werden kann.

Auch die Veränderung der apoptotischen Aktivität von T-Lymphozyten im Liquor von MS-Patienten unter einer immunmodulatorischen Therapie sind bislang nicht untersucht.

2 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob sich Unterschiede im Serumspiegel von sCD95 zwischen MS-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und Gesunden nachweisen lassen, und ob die Serumkonzentration von sCD95 mit den verschiedenen Verlaufsformen und Stadien der Multiplen Sklerose korreliert. Weiterhin soll herausgefunden werden, wie sich eine immunmodulatorische Therapie und Krankheitsschübe im Verlauf der Krankheit auf die Serumkonzentration von sCD95 auswirken. Da es bisher keine Aktivitätsparameter im Serum gibt, wäre ein solcher Parameter von großer Bedeutung.

Außerdem soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich im Liquor von MS-Patienten DNA-Fragmente als Ausdruck des programmierten Zelltodes nachweisen lassen und ob das Ausmaß der Apoptose von T-Zellen im Liquor im Vergleich zu Kontrollen unterschiedlich ist.

Zusätzlich soll die Frage beantwortet werden, ob eine immunmodulatorische Therapie der Multiplen Sklerose mit Glatiramer-Acetat (Copaxone) Auswirkungen auf das Ausmaß der Apoptose im Liquor hat.

3 Material und Methoden

3.1 Materialverzeichnis

3.1.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs für die Serumanalyse von sCD95

Als Positivkontrolle dienten die Seren von 15 Patienten mit viraler Meningitis und als Negativkontrolle die Seren von 10 gesunden Probanden.

Alle Patienten mit Multipler Sklerose wurden aus der MS-Sprechstunde an der Universitätsklinik Eppendorf/ Hamburg rekrutiert und regelmäßig über den Nutzen der Blutabnahme aufgeklärt. Die Blutabnahme erfolgte im Rahmen einer Studie über den Verlauf der MS unter der Therapie mit Copaxone (Heesen et al. 1998). Die Serumproben wurden der MS-Serumbank entnommen.

Es wurden die Seren von 114 Patienten mit klinisch sicherer MS nach Poser (1983) analysiert. Darunter befanden sich 82 Frauen und 32 Männer im Alter von 22-64 Jahren (Mittelwert 43 Jahre) mit einem Kurtzke-Score (1983) in der erweiterten Skala (Expanded-Disability-Status-Scale, EDSS) von 0,0-8,0 (Mittelwert: 4,0). Die Verlaufsformen „schubförmig“, „sekundär chronisch progredient“ (SCP) und „primär chronisch progredient“ (PCP) wurden nach Lublin (1996) differenziert.

Eine weitere Untersuchungsgruppe bestand aus 17 Patienten (10 Frauen und 7 Männer) im Alter von 24-53 Jahren (Mittelwert 42 Jahre). Es wurden 79 Seren dieser Patienten im Krankheitsverlauf von 1-4 Jahren untersucht. Unter den Patienten befanden sich 8 mit schubförmiger MS, 6 mit SCP und 3 mit PCP. Die Patienten waren seit 4-27 Jahren (Mittelwert 9 Jahre) an MS erkrankt. Der EDSS betrug 2-7 (Mittelwert 4,0).

3.1.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs für die Liquoranalyse von DNA-Fragmenten (TUNEL)

Alle Patienten mit Multipler Sklerose wurden aus der MS-Sprechstunde an der Universitätsklinik Eppendorf/ Hamburg rekrutiert und ausführlich über den Nutzen der Liquorabnahme aufgeklärt. Die Liquorpunktion erfolgte im Rahmen einer Studie über den Verlauf der MS unter der Therapie mit Copaxone (Heesen et al. 1998). Die Liquorproben wurden der MS-Liquorbank entnommen.

Insgesamt wurden Liquorproben von 18 Patienten (15 Frauen, 3 Männer) im Alter von 30-62 Jahren (Mittelwert 46 Jahre) analysiert. Alle Patienten hatten klinisch sichere, schubförmige MS mit einem oder mehreren Schüben in zwei Jahren (Poser et al. 1983, Lublin et al. 1996). Der Grad der Behinderung nach EDSS betrug 1,5-5,5 (Mittelwert 3) bei einer durchschnittlichen Erkrankungsdauer von 14 Jahren.

Bei 7 Patienten mit schubförmiger MS war es in einem Follow-up möglich jeweils zwei Liquorproben zu analysieren. Die erste wurde vor, die zweite ein Jahr nach Beginn einer Therapie mit Glatiramer-Acetat (Copaxone, 20 mg sc./ tgl.) gewonnen. Die Krankheitsaktivität war, gemessen am EDSS, gering (Mittelwert 2,0).

Die Liquorpunktion fand im schubfreien Intervall statt. Auch erfolgte zum Zeitpunkt der Liquorentnahme keine Kortikosteroidtherapie.

Die Kontrollgruppe bestand aus 9 Patienten. 4 Liquorproben stammten von Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen (Meningitis und Guillain-Barré-Syndrom), 5 Proben von Patienten mit nicht entzündlichen ZNS-Erkrankungen (Polyneuropathie, vaskulär bedingte Demenz und Migräne).

3.1.3 Technische Geräte

- EASIA Shaker für Mikrotiterplatten (Megdemix Diagnostics, Deutschland)
- E-max ELISA-Processor (Molecular Devices, CA, USA)
- Brutschrank Typ BE 400 (Mettler, Schwabach, Deutschland)
- pH-Meter CG 840 (Schott, Mainz, Deutschland)
- Magnetrührer (Heidolph, Rust, Deutschland)
- Zentrifuge 5415 C (Eppendorf, Deutschland)
- Kühlzentrifuge 302 K (Sigma, Thum, Deutschland)

3.1.4 Kleingeräte

- Mikrotiterplattenhalter (Greiner Labortechnik, Deutschland)
- Mikrotiterplatten, Flachboden (Greiner Labortechnik, Deutschland)
- Reagenzröhrchen 10ml (Greiner Labortechnik, Deutschland)
- Eppendorfhütchen (Greiner Labortechnik, Deutschland)
- Küvetten (Greiner Labortechnik, Deutschland)
- Eppendorfpipetten (Greiner Labortechnik, Deutschland)
- Objektträger (Greiner Labortechnik, Deutschland)

3.1.5 Materialien für die Bestimmung von sCD95 im Serum

sAPO-1/Fas ELISA, Immunoassay Kit von der Firma Bender MedSystems (Wien/Österreich), enthält:

- Wash-Buffer Concentrate (50 ml)
- Assay Buffer Concentrate (5,0 ml)
- Biotin-Conjugate anti-sAPO-1/Fas (100 µl) als monoklonaler Antikörper
- sAPO-1/FAS Standard (2000pg/ml)
- Streptavidin-HRP (150 µl)
- Sample Diluent (12 ml)
- Substrate Solution I (Tetramethylbenzidin, 7 ml)
- Substrate Solution II (0,02% Hydrogenperoxid, 7 ml)
- Stop Solution (1M Phosphorsäure, 12 ml)

3.1.6 Materialien für die Analyse von DNA-Fragmenten im Liquor

In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Boehringer Mannheim, Deutschland) enthält:

- Enzyme Solution (TdT, Terminal deoxynucleotidyl Transferase)
- Label Solution (Nukleotid-Lösung)
- Converter-AP (anti-fluorescein-Antikörper gebunden an Phosphat)
- Fast Red
- Eindeckmedium Permout „Eukitt“
- PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4
- Permeabilisationslösung 0,1% Triton X-100 (Sigma Chemical, Deutschland)

3.2 Methodik

3.2.1 Entnahme, Aufbereitung und Lagerung von Liquor und Serum

Die Seren für die Bestimmung von sCD95 wurden mit sterilen Serumröhrchen gewonnen, 5 min. bei 3000 rpm abzentrifugiert und in Eppendorfhütchen gefüllt. Anschließend wurden die Seren bei -80°C eingefroren.

Der unter sterilen Bedingungen entnommene Liquor für die Bestimmung der DNA-Fragmente wurde zunächst 10 min. abzentrifugiert, anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Cytospin 2 Standard auf Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden in Alufolie gewickelt bei -20°C eingefroren.

3.2.2 sCD95 (sAPO-1/Fas)- Bestimmung im Serum

Die Bestimmung von sCD95 (sAPO-1/Fas) im Serum erfolgte mit der ELISA-Methode (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Der verwendete monoklonale Antikörper (von der Maus) gegen humanes sCD95 ist kommerziell erhältlich (sAPO-1/Fas ELISA, Bender MedSystems, Wien, Österreich).

Die Standardlösungen und Testseren werden mit der mitgelieferten Pufferlösung verdünnt und auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, wobei die Standardreihe in absteigender Konzentration (von 1000 pg/ml bis 16 pg/ml) angelegt wird. Die an den Wänden der Mikrotiterplatte gebundenen monoklonalen Antikörper (anti-sCD95) gegen humanes sCD95 binden die in den Proben befindlichen sCD95-Antigene an sich.

Ein zweiter, biotin-markierter monoklonaler Antikörper (Biotin-anti-sCD95-Konjugat) wird dazugegeben und verbindet sich während der ersten Inkubationsphase mit dem sCD95/anti-sCD95-Komplex. Durch dreimalige Waschung mit dem mitgelieferten Waschpuffer wird der ungebundene Überstand des anti-sCD95 entfernt und anschließend Streptavidin-HRP

(horseradish peroxidase) zugesetzt. Die Peroxidase bindet sich während der zweiten Inkubation an den Komplex aus sCD95/anti-sCD95 und Biotin-markiertem Antikörper und stellt somit den vierten Bindungspartner dar. Durch erneutes Waschen wird der ungebundene Rest der Peroxidase entfernt.

Anschließend wird eine Substratlösung hinzugegeben die während der dritten Inkubation mit dem Streptavidin-Konjugat reagiert. Die Farbe dieses Produktes ist dabei direkt proportional zu der Konzentration von sCD95 im untersuchten Serum. Die Reaktion wird durch Zugabe von Phosphorsäure gestoppt.

Der sCD95-Gehalt der Proben wird bei einer Wellenlänge von 450 nm in U/ml bzw. pg/ml ermittelt, wobei als Referenz die Standardkurve bei 630 nm ermittelt wird. Die Messung erfolgt auf einem E-max ELISA-Prozessor (Molecular devices Sunnyval, CA, USA). Als Normalreferenz wurde für den Testkit vom Hersteller das Ergebnis einer sCD95-Bestimmung im Serum von 8 gesunden Blutspendern angegeben. Der mediane Wert betrug hier 1609 pg/ml (min.: 1334 pg/ml, max.: 2411 pg/ml). Die vom Hersteller angegebene Sensitivität betrug 20 pg/ml. Die vorliegende Untersuchung legt den medianen Wert der 10 selbst bestimmten Seren gesunder Blutspender ($\bar{X}=840$) als eigenen Standard zugrunde. Der Intra- und Interassay- Variationskoeffizient betrug je 4,5% und 3,15%.

3.2.3 Bestimmung der DNA-Fragmente im Liquor

Die Kennzeichnung der DNA-Fragmente in Liquorzellen als Ausdruck des programmierten Zelltodes mit Hilfe des In Situ Cell Death Detection Kit, AP der Firma Boehring Mannheimer erfolgt im wesentlichen in drei Schritten:

Nachdem die tiefgefrorenen Zytopräparate mit 3,5%Formalin fixiert wurden trägt man 0,1%iges Triton auf um die Zellmembrane zu permeabilisieren. Dieser Schritt wird nach der ersten Inkubation (2min. bei 4°C) durch

Waschung mit PBS-Puffer beendet. Anschließend wird eine Mischung aus 5µl TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) und 45µl Fluorescein-markierten Nukleotiden aufgetragen. Bei den Kontrollproben wurde die Inkubation mit TdT unterlassen.

Das Enzym TdT katalysiert während der zweiten Inkubation (60 min. bei 37°C) die Bindung der fluorescein-markierten Nukleotide an die freien 3'-Enden der DNA. Auch diese Reaktion wird durch eine Waschung mit dem PBS-Puffer beendet.

Um die fluorescein-markierten DNA-Enden sichtbar zu machen gibt man den mitgelieferten Converter-AP auf die Proben, dieser besteht aus einem an HRP (horseradish) gebundenen anti-fluorescein-Antikörper. Während der dritten Inkubation (30 min. bei 37°C) lagert sich der anti-fluorescein-Antikörper an die fluorescein-markierten DNA-Enden.

Nach erneuter Waschung mit PBS-Puffer wird eine Substratlösung (Fast Red) auf die Proben aufgetragen, die in der folgenden Inkubation (30 min. bei 37°C) durch alkalische Phosphatase zu einem Farbprodukt umgewandelt wird.

Zuletzt werden die Objektträger mit Glycerol-Gelatine (Eukitt) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte anschließend nach einer semiquantitativen Methode mit dem Lichtmikroskop. Die für apoptotische Zellen typische Färbung zeigt sich dabei als perlschnurartiger oder halbmondförmiger Randsaum um den Zellkern, das Zytoplasma vollständig ausfüllend oder als Färbung des Zytoplasmas mit freiem Rand um den Zellkern. Es wurden jeweils 10 Gesichtsfelder eines Liquorpräparats betrachtet und die Zahl der TUNEL-positiven und TUNEL-negativen Zellen ermittelt. In die Zählung einbezogen wurden nur Zellen mit erkennbarem Zellkern, nicht einbezogen wurden Zelltrümmer und diffuse Färbungen ohne erkennbaren Zellkern. Dabei wurden die Ergebnisse differenziert in „±“, wenn sich in der Mehrzahl

der Gesichtsfelder weniger als 50% TUNEL-positive Zellen befanden, „+“, wenn mehr als 50% der Zellen positiv waren und „++“ wenn nahezu alle sichtbaren Zellen TUNEL-positiv waren (Beispiele siehe. Abb.3 und Abb. 4).

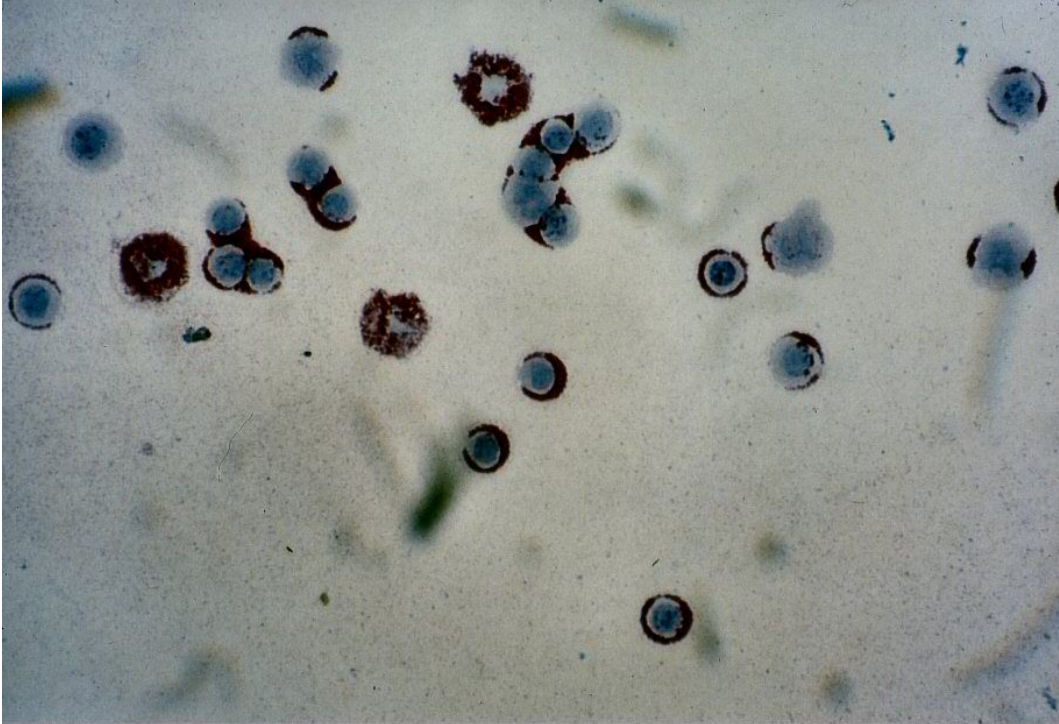


Abbildung 3 - Beispiel für (++): Fast alle Zellen eines Gesichtsfeldes apoptotisch

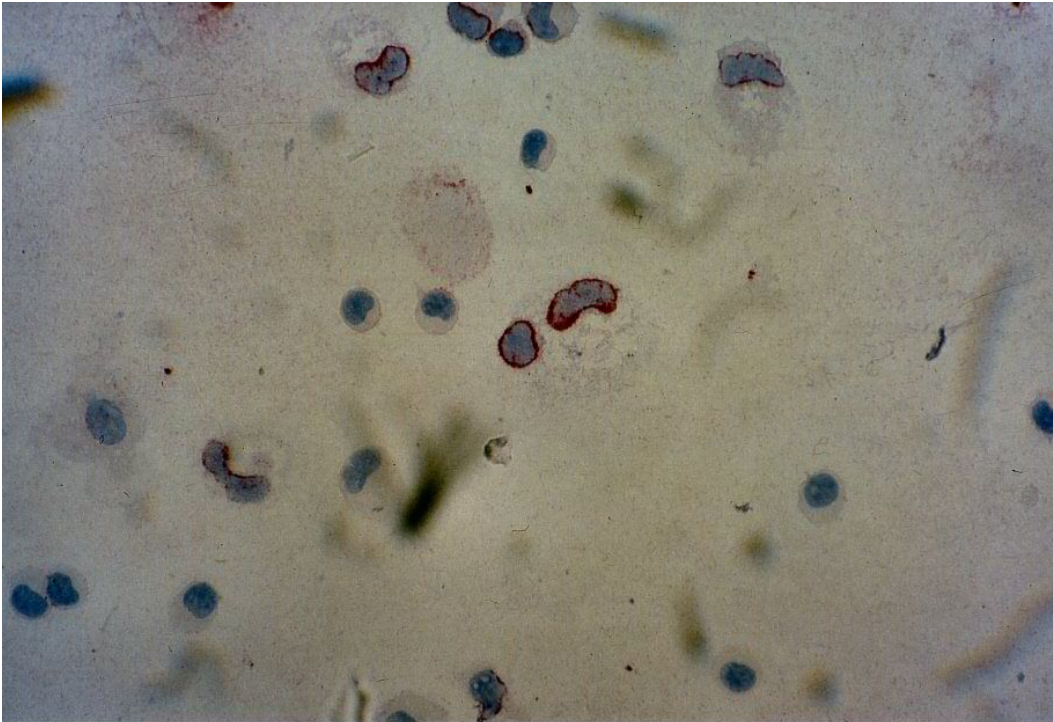


Abbildung 4 - Beispiel für (+/-): weniger als 50% apoptotische Zellen

Der Grad der Behinderung der Patienten wurde nach dem Kurtzke-Score in der erweiterten Skala (Expanded Disability Status Scale, EDSS) ermittelt. Dabei wurden verschiedene neurologische funktionelle Systeme und die Mobilität der Patienten beurteilt und bewertet.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Überprüfung der Patientengruppen mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test ergab keine Normalverteilung. Deshalb wurde zum Vergleich der unterschiedlichen MS-Verläufe ein Kruskal-Wallis ANOVA-Test durchgeführt (Kruskal et al. 1952). Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden post Hoc-Tests mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman-Rank berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Serologische Untersuchung des sCD95-Wertes im Serum

sCD95 (Fas) wurde sowohl im Serum von Patienten mit Multiple Sklerose als auch bei Patienten mit Meningitis und bei gesunden Kontrollen ohne signifikanten Unterschied im Kruskal-Wallis ANOVA-Test ($P=0,058$) nachgewiesen (siehe Tabelle 1).

Allerdings war der Unterschied zwischen den Serumwerten der gesunden Kontrollen und der Patienten mit aktiver und auch stabiler sekundär chronisch progressiver Multipler Sklerose im Man-Whitney-U-Test statistisch signifikant (Median: 840 zu 1130 pg/ml bei stabiler SCP und 1200 pg/ml bei aktiver SCP, siehe Abbildung 5)

	n	Median	Streuung	Std.-Abw.	P
Kontrollen	10	890 (840)	170-1160	14	
Meningitis	15	1880 (110)	470-8020	186	0,29
Aktive schubförmige Ms	15	1070 (990)	510-2500	46	0,27
Stabile schubförmige MS	16	1510 (1060)	610-1060	108	0,051
Aktive PCP MS	13	1140 (1120)	670-2070	39	0,072
Stabile PCP MS	16	960 (910)	520-1530	29	0,63
Aktive SCP MS	16	1460 (1200)	530-3730	91	0,0098/0,04°
Stabile SCP MS	13	1320 (1130)	760-2500	47	0,005

P-Werte im Vergleich mit Kontrollen, P°-Werte im Vergleich mit stabiler schubförmiger MS

Tabelle 1- sCD95-Werte im Serum von MS-Patienten und Kontrollen in pg/ml

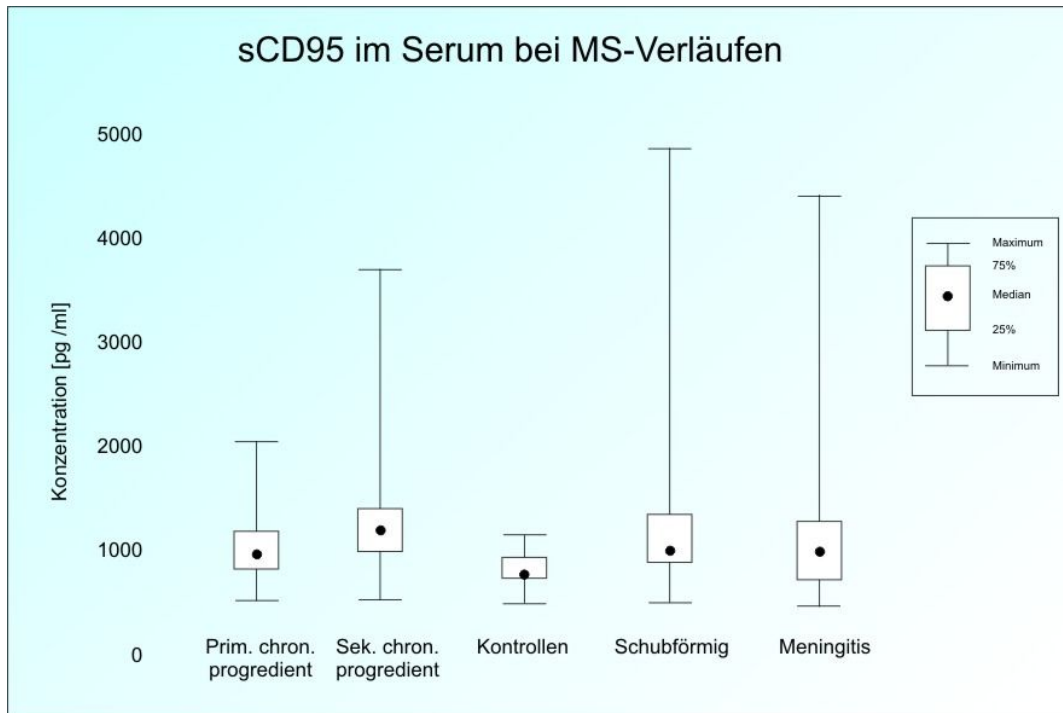


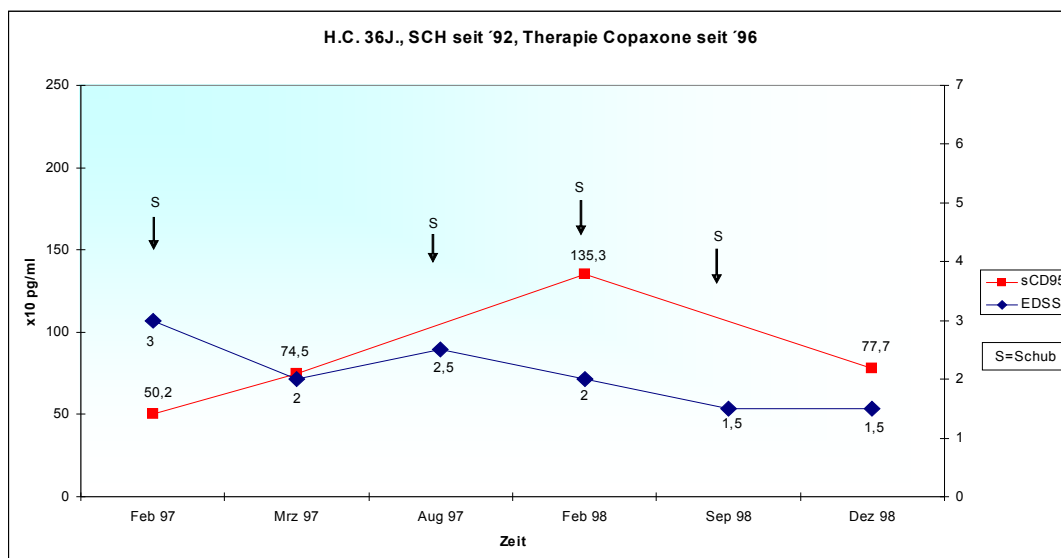
Abbildung 5- sCD95 im Serum bei MS-Verläufen - Boxchart

Außerdem wurde der sCD95-Wert im Serum von 17 Patienten ermittelt und dem EDSS gegenübergestellt. Das Auftreten eines Schubes und die Art der immunmodulatorischen Therapie wurde ebenfalls registriert. Hierbei zeigte sich bei keinem Patienten eine eindeutige Korrelation des sCD95-Wertes zum Grad der Behinderung, zum Auftreten eines Schubes oder einer immunmodulatorischen Therapie. Die Zeitfenster, in dem die sCD95-Werte jedes Patienten ermittelt wurden waren dabei unterschiedlich lang.

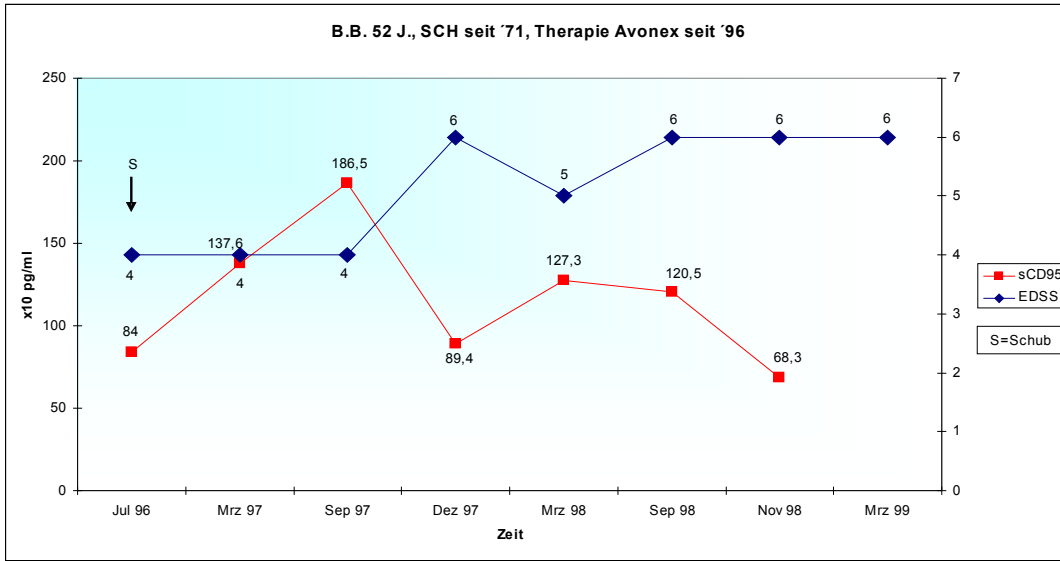
Bei einigen Patienten betrug der Untersuchungszeitraum bis zu 4 Jahre (zum Beispiel Verlauf 3), bei anderen nur 1 Jahr (zum Beispiel Verlauf 1). Auch die Frequenz der Kontrollen war sehr unterschiedlich und bei keinem Patienten erfolgte die Blutabnahme in regelmäßigen Abständen.

I. Korrelation zwischen dem sCD95-Wert im Serum und Schüben bei Patienten mit schubförmiger MS (Verläufe 1-5).

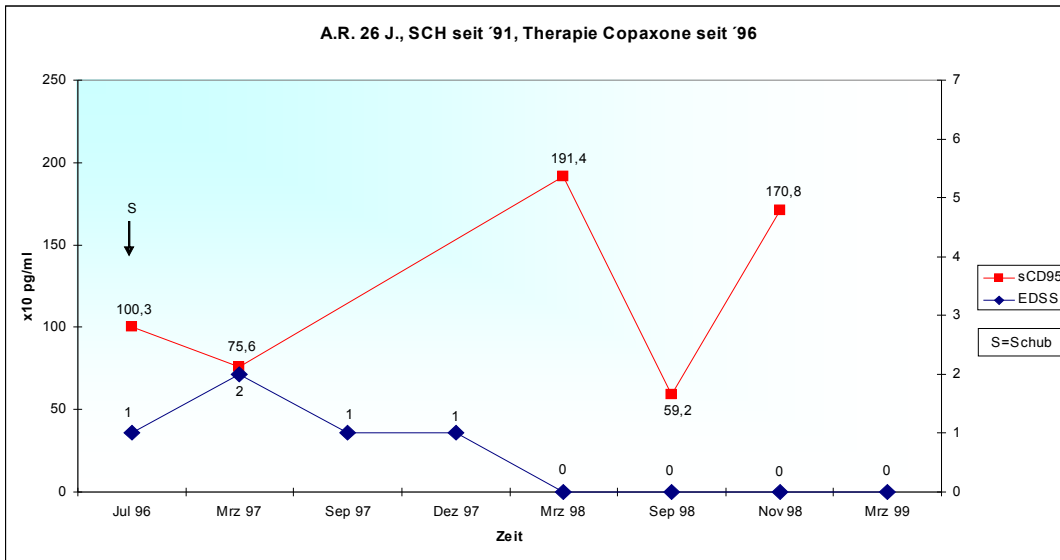
Der sCD95-Wert zeigte keine Korrelation mit stabilen oder aktiven Krankheitsphasen der MS. So konnte bei einigen Patienten mit schubförmiger MS ein Anstieg des sCD95-Wertes nach einem Krankheitsschub beobachtet werden (siehe Verlauf 1, Mrz. 97; Verlauf 2, Mrz 97). Bei anderen Patienten konnte im Gegenteil ein Absinken des sCD95-Wertes nach einem Krankheitsschub (siehe Verlauf 1, Sep. 98; Verlauf 3, Mrz 97) beobachtet werden.



Verlauf 1

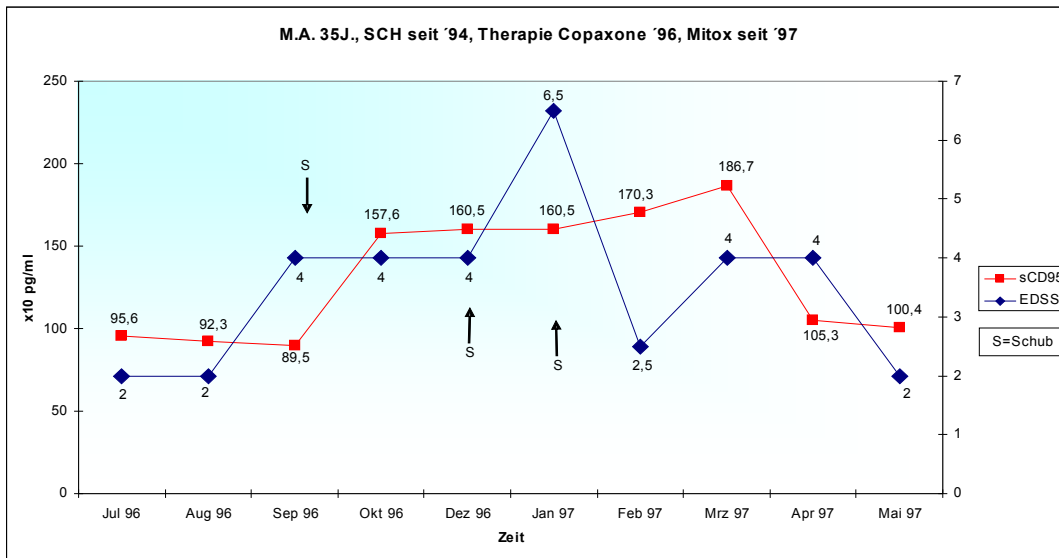


Verlauf 2

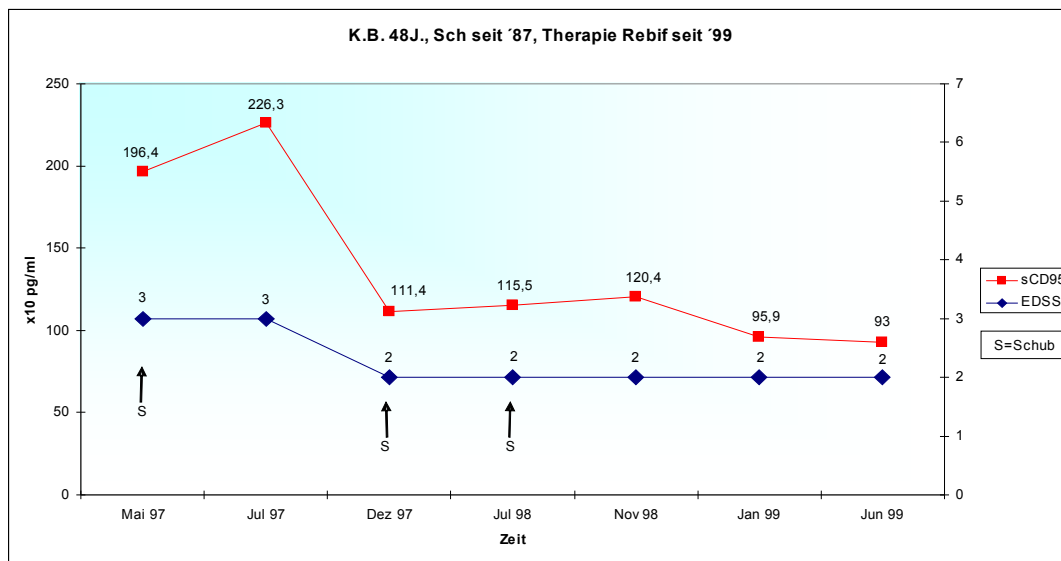


Verlauf 3

Bei einigen Patienten stieg der sCD95-Wertes im Serum nach einem Schub anfänglich an (siehe Verlauf 4, Okt 96; Verlauf 5, Jul 97). Kam es innerhalb eines Jahres zu einem erneuten Auftreten eines Schubes bei diesen Patienten blieb der sCD95-Wert allerdings nahezu gleich (siehe Verlauf 4, Jan 97; Verlauf 5, Jul 98).



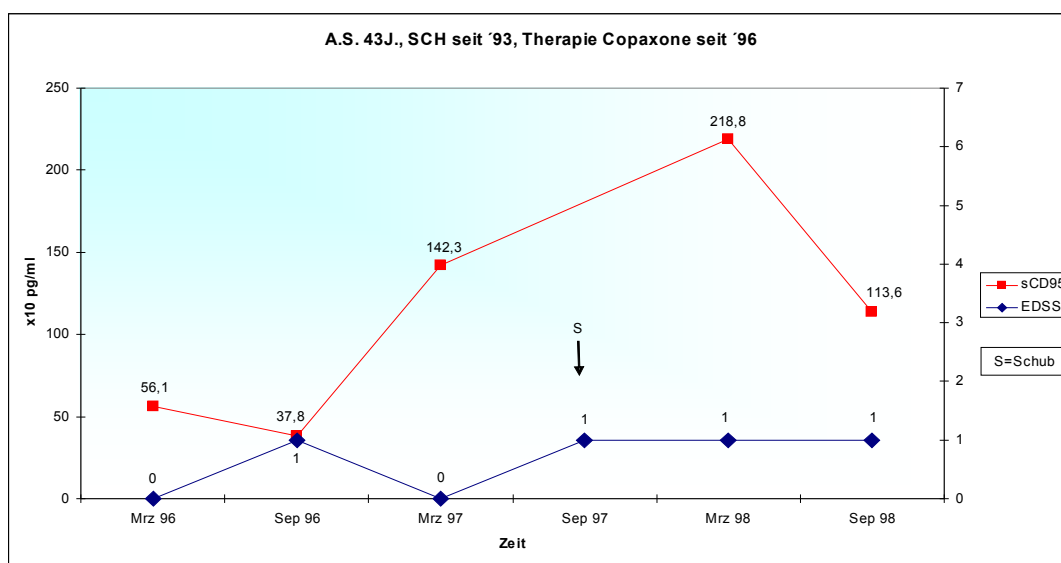
Verlauf 4



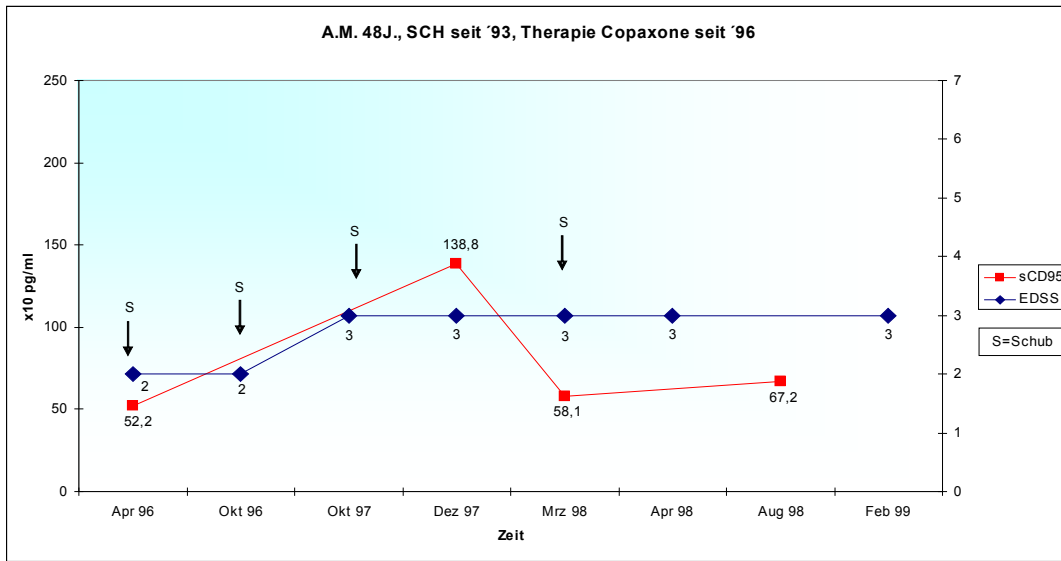
Verlauf 5

II. Korrelation zwischen dem sCD95-Wert im Serum und dem EDSS bei Patienten mit schubförmiger MS (Verläufe 6-8)

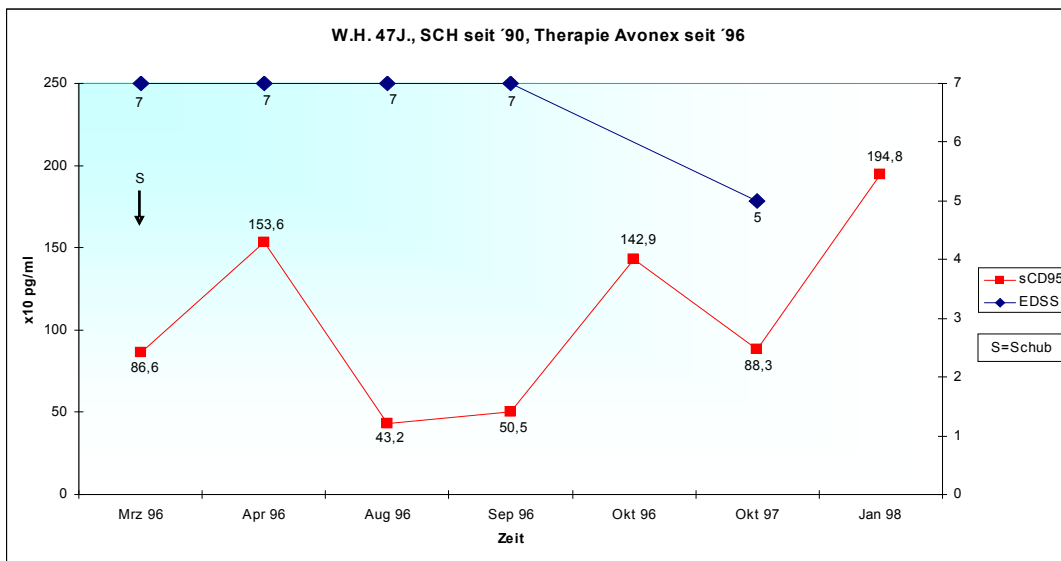
Blieb der EDSS bei Patienten mit schubförmiger MS über einen Zeitraum konstant, so konnte sowohl eine Zunahme (siehe Verlauf 6, Mrz 98; Verlauf 7, Dez 97; Verlauf 8, Apr 96) als auch eine Abnahme (siehe Verlauf 7, Mrz 98; Verlauf 8, Aug 96) des sCD95-Wertes in diesem Zeitraum beobachtet werden, unabhängig von der Art der Immuntherapie.



Verlauf 6



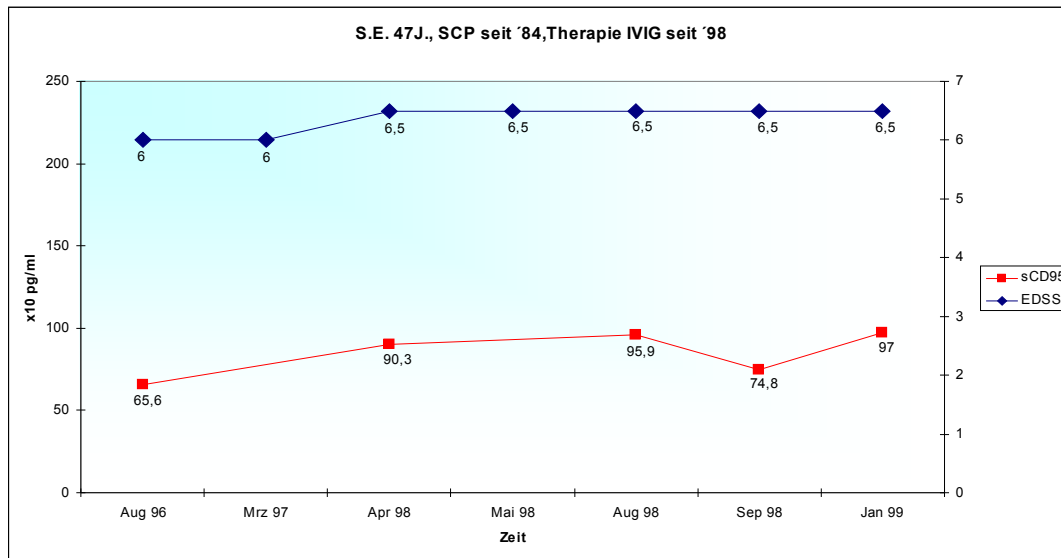
Verlauf 7



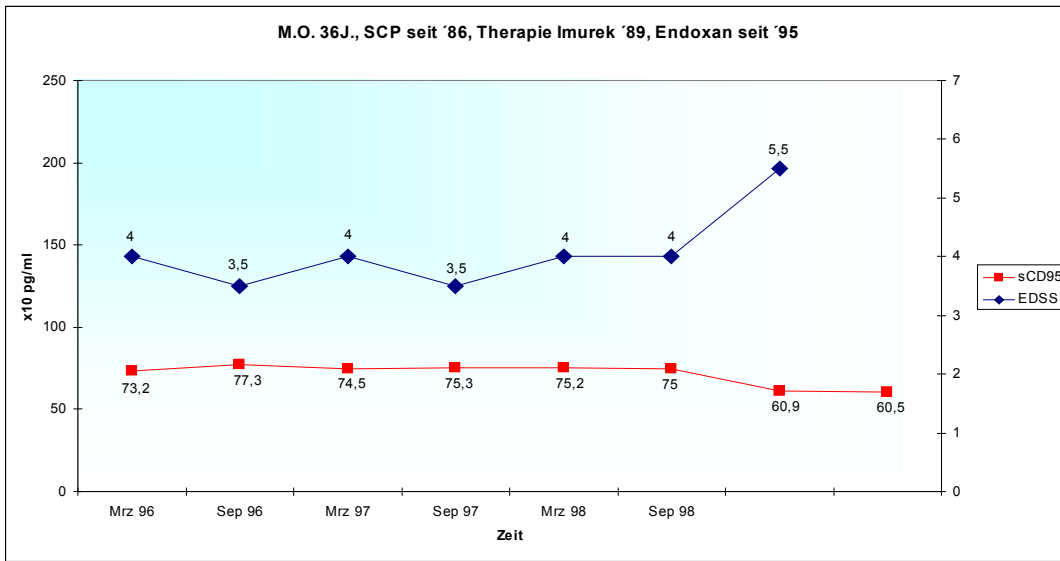
Verlauf 8

III. Korrelation zwischen dem sCD95-Wert im Serum und dem EDSS bei Patienten mit SCP (Verläufe 9-14)

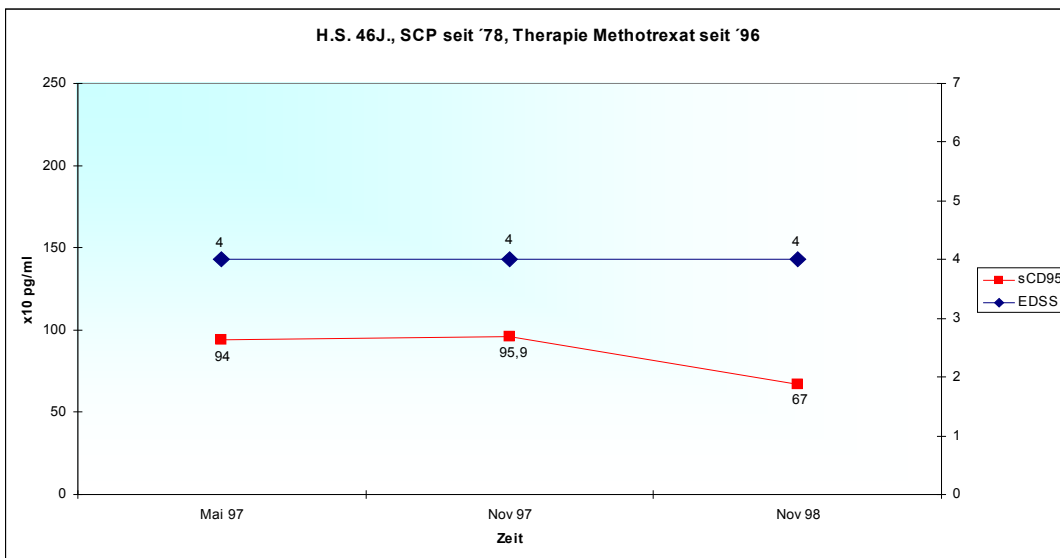
Bei einigen MS-Patienten mit SCP zeigten sich bei gleichbleibendem EDSS im Verlauf nur geringe Schwankungen des sCD95-Wertes (siehe Verläufe 9-11).



Verlauf 9

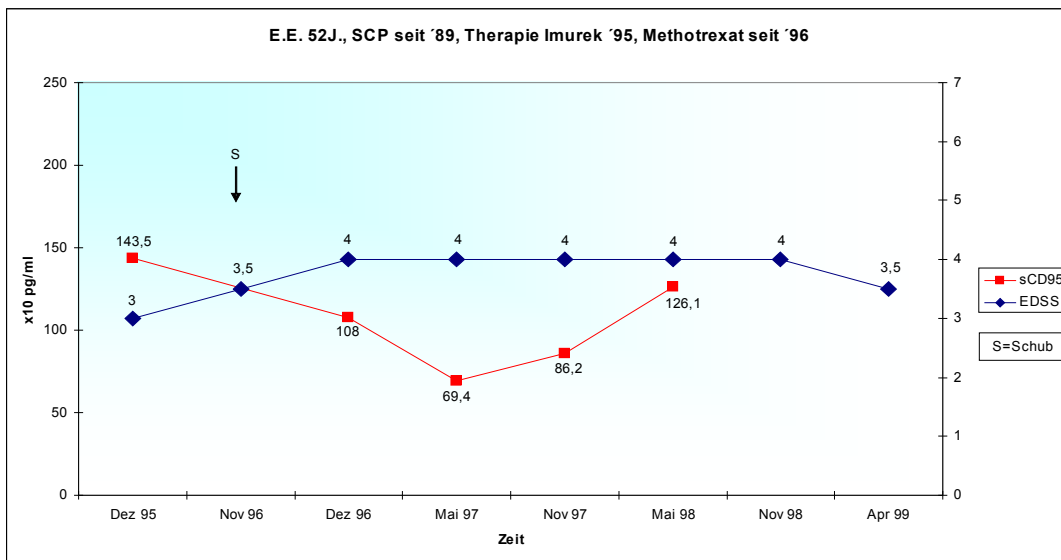


Verlauf 10

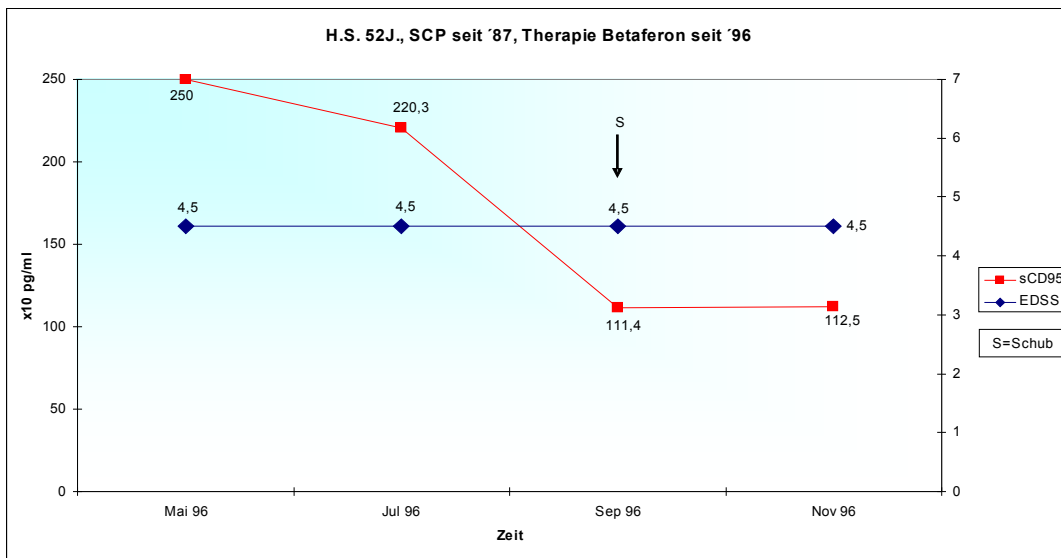


Verlauf 11

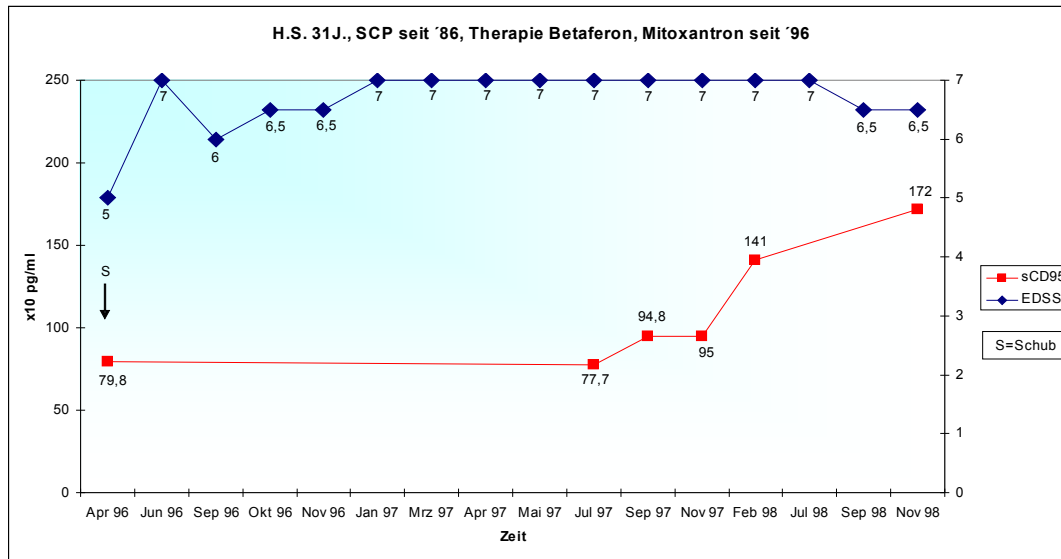
Bei anderen MS-Patienten mit SCP kam es bei gleichbleibendem EDSS sowohl zum Abfall (siehe Verlauf 12, Mai 97; Verlauf 13, Sep 96) als auch zum Anstieg (siehe Verlauf 14, Feb 98) des sCD95-Wertes.



Verlauf 12



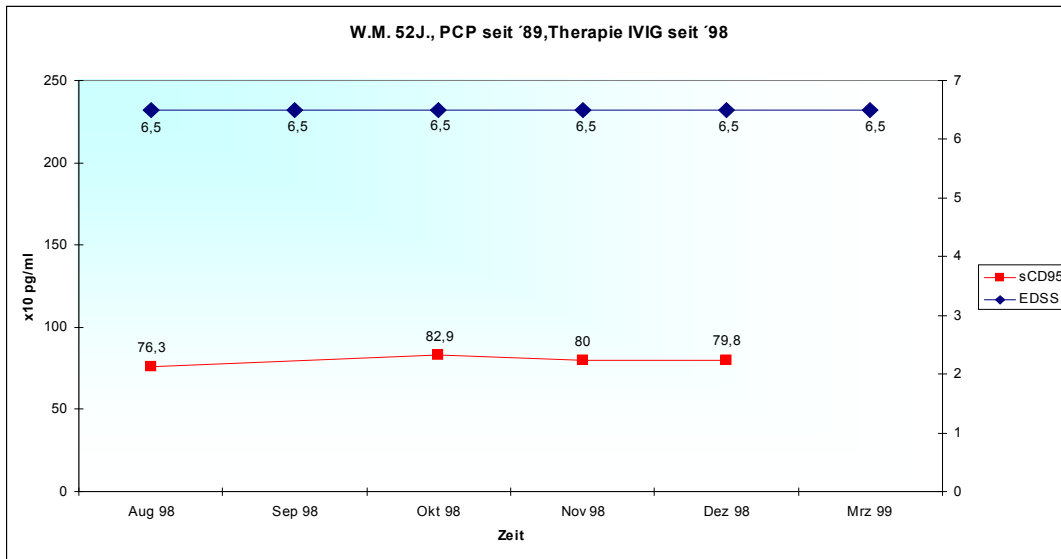
Verlauf 13



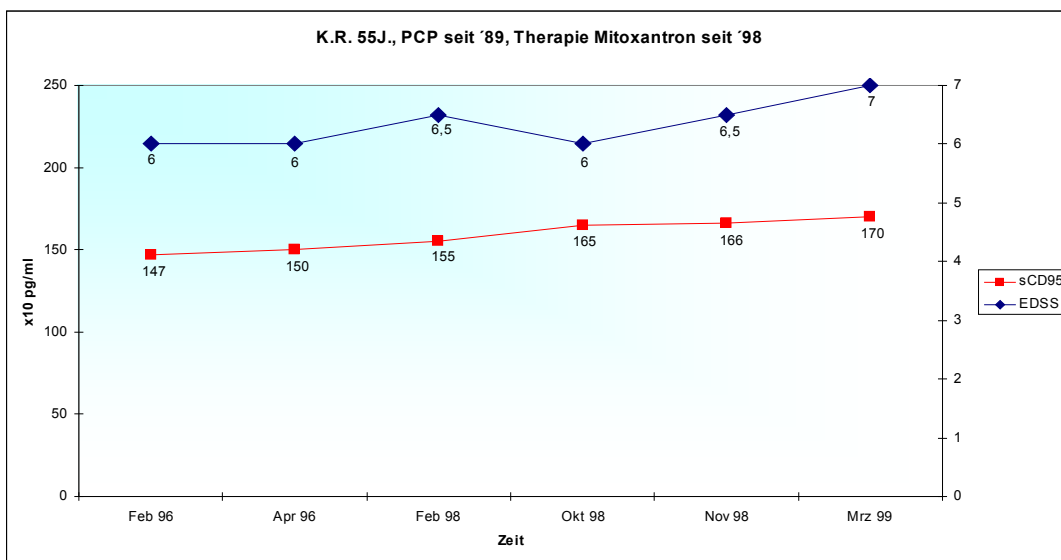
Verlauf 14

IV. Korrelation zwischen dem sCD95-Wert im Serum und dem EDSS bei Patienten mit PCP (Verläufe 15-17)

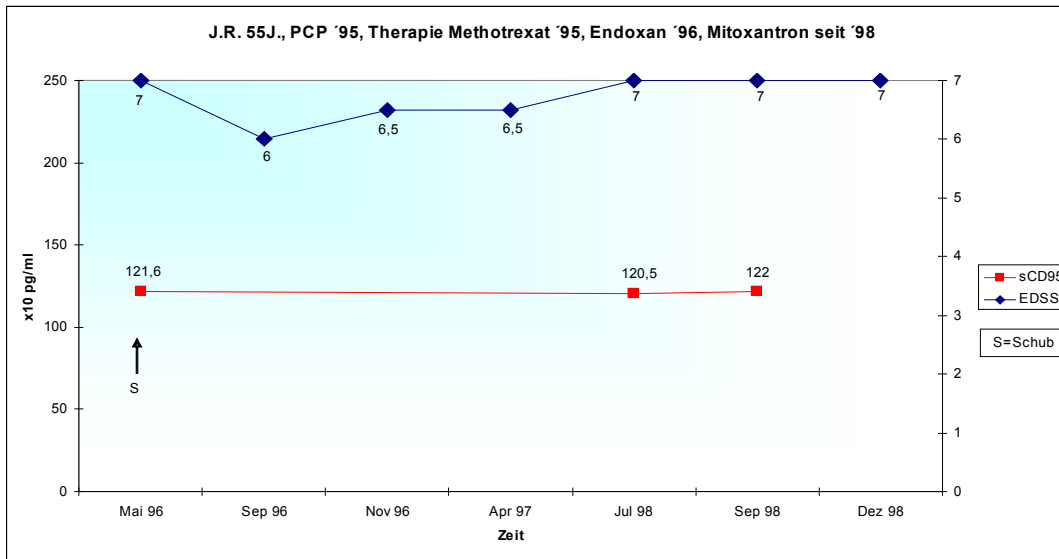
Bei den Patienten mit PCP war im Verlauf der EDSS relativ stabil und auch der sCD95-Wert im Serum aller drei Patienten blieb auf dem Niveau des jeweiligen Ausgangswertes und unterlag nur kleinen Schwankungen (siehe Verläufe 15-17). Die Patienten erhielten zum einen IVIG, zum anderen Mitoxantron. Eine Korrelation des sCD95-Wertes im Serum zur Art der immunmodulatorischen Therapie lag nicht vor. Bei einem Patienten mit PCP kam es zum Auftreten eines Schubes, der sCD95-Wert im Serum blieb dabei jedoch gleich (siehe Verlauf 17).



Verlauf 15



Verlauf 16



Verlauf 17

4.2 Histologische Untersuchung der TUNEL-positiven Zellen im Liquor

TUNEL-positive Zellen im Liquor ließen sich sowohl bei Patienten mit schubförmiger MS als auch im Liquor der Kontrollpatienten nachweisen.

Bei 18 von 27 Liquorpräparaten wurde eine hohe Anzahl TUNEL-positiver Zellen ermittelt, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der Patienten mit MS und den Kontrollgruppen auszumachen war (siehe Tabelle 2).

TUNEL	MS (n=18)	EE (n=4)	NEE (n=5)
++	1	1	–
+	10	2	4
+/-	6	1	1
-	1	-	-
++ = nahezu alle Zellen der 10 Gesichtsfelder sind TUNEL-positiv + = mehr als 50% der Zellen der 10 Gesichtsfelder sind TUNEL-positiv +/- = weniger als 50% der Zellen der 10 Gesichtsfelder sind TUNEL-positiv – = keine TUNEL-positiven Zellen EE = Entzündliche Erkrankungen NEE = nicht entzündliche Erkrankungen			

Tabelle 2- Liquor TUNEL Färbung bei schubförmiger MS und bei Kontrollen

Bei 7 Patienten mit MS konnte in einem Follow-up sowohl eine Liquorprobe vor und ein Jahr nach der Therapie mit Glatiramer-Acetat (Copaxone, 20mg sc./tgl.) untersucht werden. Bei 2 Patienten war die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen ein Jahr nach Beginn der Therapie mit Copaxone verringert, während bei 4 Patienten keine Veränderung eintrat. Bei 1 Patient fanden sich semiquantitativ mehr TUNEL-positive Zellen im Liquor ein Jahr nach Beginn der Therapie mit Copaxone als vor Beginn der Therapie (siehe Tabelle 3).

Nr.	vor Therapie	1 Jahr nach Therapie
1	++	++
2	-	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+/-
6	+/-	+/-
7	+/-	+/-

Tabelle 3- TUNEL-positive Zellen im Liquor vor und ein Jahr nach der Therapie mit Copaxone

5 Diskussion

Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit die sCD95-Werte im Serum von Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen der MS ermittelt. Dabei zeigten sich nur bei Patienten mit SCP-MS im Vergleich zu gesunden Kontrollen statistisch signifikant erhöhte sCD95-Werte im Serum. In der Verlaufsuntersuchung von 17 Patienten mit MS ergab sich aber weder eine deutliche Korrelation zur Krankheitsaktivität, zum EDSS, noch zu einer immunmodulatorischen Therapie. Zwar konnte bei 3 Patienten mit PCP-MS die Beobachtung gemacht werden, dass der sCD95-Wert bei gleichbleibendem EDSS nur geringen Schwankungen unterlag, was auf einen unterschiedlichen Pathomechanismus im Vergleich zu den anderen Verlaufsformen schließen lässt. Die Ergebnisse der 17 Verlaufsuntersuchungen der verschiedenen Krankheitsverläufe der MS lassen sich allerdings nur bedingt miteinander vergleichen, da der Zeitraum der Analyse und die Frequenz der Blutabnahmen bei allen Patienten unterschiedlich war. Insgesamt schränkt auch die geringe Fallzahl die Relevanz unserer Befunde ein.

Cheng et al. (1994) gehen davon aus, dass sCD95 die Signalkette der Apoptose von autoreaktiven T-Zellen inhibiert. Auch Zipp et al. (1998b) konnten eine Apoptosehemmung durch sCD95 feststellen, wobei weder die CD95-Expression noch die Empfindlichkeit für den programmierten Zelltod peripherer Blutzellen von MS-Patienten HLA-assoziiert waren (Zipp et al. 1998a). Diese Befunde passen zu der Beobachtung, dass es bei MS-Patienten in vitro zu einer verringerten Eliminierung von Myelin-spezifischen T-Zellen kommt (Zhang et al. 1994, Macchi et al. 1999). Analog dazu fanden Zipp et al. (1998c) erhöhte sCD95-Werte im Serum von 71 Patienten mit schubförmiger MS, wobei der Serumspiegel nicht mit der Anzahl Gadolinium-anreichernder Läsionen im MRT in der aktiven Krankheitsphase und auch nicht mit dem EDSS der Patienten korrelierte. In der vorliegenden Studie war der sCD95-Wert in der Gruppe der Patienten

mit schubförmiger MS im Vergleich zu den gesunden Kontrollen statistisch nicht signifikant erhöht, wobei trotz der relativ kleinen Fallzahl eine Tendenz zu erkennen war (K/Sch: Median 80/100 pg/ml). Andere Autoren konnten keine erhöhten sCD95-Werte im Serum von MS-Patienten feststellen, aber Inou et al. (1997) ermittelten bei 40 Patienten mit aktiver schubförmiger MS höhere sCD95-Werte im Liquor als bei Patienten mit stabiler schubförmiger MS und bei Kontrollen. Auch Ciusani et al. (1998) beobachteten sowohl eine erhöhte intrathekale CD95-Produktion als auch eine verringerte spontane intrathekale Apoptose-Rate von T-Zellen bei MS-Patienten. Dies könnte die durch sCD95-vermittelte Apoptosehemmung von autoreaktiven T-Zellen im aktiven Stadium der Erkrankung widerspiegeln. Dowling et al. (1997) fanden damit übereinstimmend nur wenige apoptotische T-Zellen in akuten MS-Läsionen trotz einer gleichzeitigen massiven Infiltration durch inflammatorische Zellen und trotz einer erhöhten Expression von CD95 auf Astrozyten, Oligodendrozyten und Makrophagen (Dowling et al. 1996). Das Fehlen einer deutlich erhöhten CD95-Expression auf eingedrungenen T-Zellen und die Expression von anti-apoptotischen Proteinen der bcl-2-Familie (Bonetti et al. 1997) könnten nach Zipp et al. (1997) darauf hinweisen, dass T-Zellen weniger Zielzellen für die CD95-vermittelte Apoptose als vielmehr Effektorzellen sein könnten. Dies passt auch mit der Beobachtung zusammen, dass das Serum von MS-Patienten eine Glioma-Zelllinie vor der CD95-vermittelten Apoptose schützt, was die Vermutung erlaubt, dass bei der MS ein anti-apoptotisches Potential vorliegt. Auf der anderen Seite konnten Alcázar et al. (1998) zeigen, dass der Liquor von Patienten mit aktiver PCP eine Apoptose-induzierende Wirkung auf Neuronen hat und untermauern damit die Bedeutung der T-Zellen als Effektorzellen. Sabelko-Downes et al. (1999) gehen davon aus, dass der CD95-abhängige Regulationsmechanismus sowohl ein krankheitsauslösendes als auch krankheitslimitierendes Potential besitzt, da es sowohl zur Apoptose von Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen als auch von aktivierten T-Zellen führen kann. Schmied et al. (1993) stellten

dazu passend fest, dass in der Remissionsphase der EAE massiv apoptotische T-Zellen auftreten und somit der neurologische Schaden limitiert wird.

Die beobachteten unterschiedlichen sCD95-Werte im Serum und Liquor von Patienten mit verschiedenen Krankheitsverläufen der MS spiegeln die Komplexität dieses Systems für die Regulation der Apoptose im Immunsystem wieder. Es ist unklar, ob sCD95 ein Apoptose-Faktor für alle genannten Zellen ist oder ob andere spezifische Apoptose-Faktoren bezogen auf die Zielzelle existieren. In einer neueren Studie zeigte sich neben erhöhten Serumwerten von CD95 und CD95-Ligand bei Patienten mit schubförmiger MS auch eine erhöhte Expression von FLIP und Caspase-8, die im Pathomechanismus der Apoptose alle eine Schlüsselrolle zu spielen scheinen (Gomes et al. 2003). Auch das TRAIL-System ist als Effektormechanismus bei der ZNS-Gewebeschädigung von Bedeutung (Lunemann et al. 2002, Dorr et al. 2002).

Den verschiedenen Verlaufsformen der MS könnten unterschiedliche ätiopathogenetische Modelle zu Grunde liegen, was den in dieser Arbeit festgestellten erhöhten sCD95-Wert im Serum von Patienten mit SCP-MS im Vergleich zu den nicht signifikant erhöhten Werten bei Patienten mit schubförmiger und PCP-MS erklären könnte. Eine Erhöhung von sCD95 im Serum von Patienten mit SCP-MS wurde bisher von keinem anderen Autor beschrieben. Zipp et al. (1998c) stellten nur bei der Behandlung der schubförmigen MS mit IFN β ein anfängliches Absinken und eine nachfolgende Steigerung des sCD95-Wertes im Serum fest. Nach einem Jahr der Therapie war sCD95 deutlich reduziert, was für die Rolle von sCD95 als Apoptose-Inhibitor und für die Wirkung von IFN β sprechen könnte. Auch die Erhöhung der CD95-Expression auf T-Zellen nach einer Therapie mit IFN β wurde beobachtet (Zipp et al. 2000). Allerdings muss die Interaktion der T-Lymphozyten mit Zellen der verschiedenen Kompartimente des ZNS wie Endothelzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten

und Neuronen berücksichtigt werden. Erst dann kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den festgestellten Veränderungen von sCD95 um den Effekt einer Therapie oder nur um eine zufällige Begleiterscheinung handelt.

Obwohl bei der MS primär die T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion im Vordergrund steht, finden sich auch Hinweise für eine Bedeutung der humoralen Abwehr in der Pathogenese der MS. TH2-Zellen induzieren die Produktion von Antikörpern und regulieren gleichzeitig den Entzündungsprozess durch Produktion von Zytokinen wie IL10. Die T-Zell-vermittelte Immunreaktion scheint also nicht die einzige Immunantwort in der Pathogenese der MS zu sein. Sekundär kommt es zur Einbeziehung von Makrophagen und nachfolgend zur Demyelinisierung.

Andererseits könnte die MS-Läsion auch primär neurodegenerativ (Lassmann et al. 1999) entstehen und erst sekundär zu Entzündungsreaktionen führen. Dies unterstützt die Beobachtung, dass gegen T-Zellen gerichtete Therapien nur eingeschränkt und nicht bei allen Verlaufsformen der MS gleichsam wirken. Daraus folgt, dass die Demyelinisierung bei der MS Ausdruck der Zerstörung der Oligodendrozyten sein könnte. Die Oligodendrozyten können durch eine Reihe von Immunmechanismen und folglich durch die Entzündung geschädigt werden. So können aktivierte Makrophagen und Gliazellen proinflammatorische Zytokine wie IFN β und TNF produzieren. Akassoglou et al. (1998) zeigten, dass durch TNF bei Patienten mit MS die Apoptose von Oligodendrozyten induziert wird. Selmaj et al. (1991) bestätigten dies. Weitere Studien haben den programmierten Zelltod von Oligodendrozyten in MS-Läsionen durch morphologische und DNA-Markierungen nachgewiesen (Dowling et al. 1996). Dementsprechend fanden D'Souza et al. (1996) heraus, dass die CD95-Expression auf Oligodendrozyten in MS-Läsionen erhöht ist. Auf der anderen Seite wurde die CD95-Ligand-Expression auf Mikrogliazellen und T-Zellen festgestellt

und somit könnten diese Zellen die Effektorzellen der CD95-vermittelten Apoptose von Oligodendrozyten sein.

Mit der TUNEL-Methode konnten in der vorliegenden Arbeit keine überzeugenden Unterschiede zwischen der Anzahl von apoptotischen Zellen im Liquor von Patienten mit MS und anderen inflammatorischen und nicht inflammatorischen neurologischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz kam es bei 2 von 7 MS-Patienten nach einer einjährigen Therapie mit Glatiramer-Acetat zu einer sinkenden Anzahl von apoptotischen Zellen im Liquor, was mit den sinkenden inflammatorischen Routine-Parametern im Liquor korreliert (Heesen et al. 1998).

Ciusani et al. (1998) konnten eine hohe Anzahl von apoptotischen Zellen im Liquor bei unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen durch Nachweis der DNA-Fragmente zeigen. Allerdings zeigte sich in der Studie bei 11 Patienten mit MS eine geringere Apoptose-Rate im Vergleich zu den nicht inflammatorischen neurologischen Kontrollen. Dies unterstützt unsere Ergebnisse, die ein erhöhtes Vorkommen von apoptotischen T-Zellen im Liquor von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen zeigen.

Das Erscheinen von apoptotischen Zellen im Liquor ist auf nur wenige Minuten begrenzt (Russell et al. 1972, Sanderson et al. 1976, Mater et al. 1979, Kerr et al. 1987) und die apoptotischen Zellbestandteile sind nur für einige Stunden sichtbar, bevor sie phagozytiert werden (Wyllie et al. 1980, Bruschi et al. 1990). Gavrieli et al. (1992) untersuchten Zellen des Dünndarms und der Epidermis, beides Gewebe mit bekanntlich hoher Erneuerungsrate, mit Hilfe der TUNEL-Methode. Die Chance der Identifikation von Zellen in der Apoptose kann dabei mit der sehr seltenen Gelegenheit verglichen werden, Zellen in der Mitose sichtbar zu machen. Im Zentralnervensystem ist die Zelltodrate sehr niedrig, so dass sich zu einer beliebigen Zeit nur ein Bruchteil der Zellen in der Apoptose befinden. Dieses gilt auch für Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, die im

Liquor von MS-Patienten ohnedies nur in geringer Menge vorkommen. Überdies sind die DNA-Fragmente nicht nur in histologisch gesicherten apoptotischen Zellen sondern auch in morphologisch noch intakten Zellen darzustellen, die den Prozess des programmierten Zelltodes gerade durchlaufen (Umansky et al. 1982, Motyka et al. 1991)

Ferner sind die Methoden der in situ Bestimmung der Apoptose im späten Stadium der Apoptose unzuverlässig, da sie nicht eindeutig zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden können (Bredesen et al. 2000).

Die Detektion der Apoptose mit Hilfe der TUNEL-Methode ist somit ein unpräzises Unterfangen, was die Relevanz unserer Befunde einschränkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Apoptose eine ambivalente Rolle in der MS-Pathogenese zu spielen scheint. Einerseits gibt es Hinweise, dass die pathologisch verminderte Elimination autoreaktiver T-Zellen an der Initiierung dieser Erkrankung ursächlich beteiligt ist. Andererseits scheinen immunkompetente Zellen die Apoptose als Effektormechanismus für die entzündliche, zu neurologischen Defiziten führende Gewebeschädigung zu verwenden.

Langfristiges Ziel muss es daher sein, eine weitere Charakterisierung der verantwortlichen Apoptosesysteme und der entsprechenden Regulationsmechanismen vorzunehmen, um hieraus neue Therapiestrategien entwickeln zu können.

Für die Entwicklung weiterer Therapien muss zudem geklärt werden, welche Zellen in welchen Kompartimenten von der Fehlfunktion des CD95-Rezeptor/Ligand-Systems betroffen sind. Zum einen wäre eine Blockade der lokalen Apoptose im ZNS wünschenswert, um den Untergang von Gliazellen und eventuell Neuronen zu verhindern. Andererseits scheinen bei der MS pro-apoptotische Kontrollmechanismen des Immunsystems zu versagen, wenn die Eliminierung aktivierter, ZNS-spezifischer T-Zellen

ansteht. An dieser Stelle wäre eine gezielte Apoptoseinduktion eine wünschenswerte therapeutische Option. Beispielsweise könnte mittels geeigneter Filtrationsverfahren lösliches CD95 oder andere apoptosehemmende Faktoren aus dem Serum entfernt und damit eine eventuelle Apoptosehemmung autoaggressiver T-Zellen aufgehoben werden. Ziel ist demnach die Entwicklung potenter Substanzen zur Induktion spezifischer Apoptose von aktivierten T-Zellen.

6 Zusammenfassung

Das CD95-Rezeptor/Ligand-System ist ein zentraler Bestandteil der Signalkaskade, die zur Apoptose von Zellen führt. CD95 wird auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Es können sowohl autoreaktive T-Zellen durch Apoptose unschädlich gemacht werden, als auch Zellen des ZNS apoptotisch zugrunde gehen, was zu neurologischem Schaden bei der MS führt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob der sCD95-Wert im Serum von MS-Patienten mit der Verlaufsform, der Krankheitsaktivität oder einer immunmodulatorischen Therapie korreliert.

Wir analysierten 114 Seren von MS-Patienten mit den unterschiedlichen Verlaufsformen schubförmig, PCP und SCP unter verschiedenen immunmodulatorischen Therapien im Vergleich mit gesunden Kontrollen und Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen. Ein statistisch signifikant erhöhter sCD95-Wert im Serum konnte nur bei der SCP nachgewiesen werden. Inwiefern dies auf mögliche unterschiedliche pathogenetische Mechanismen der verschiedenen Verlaufsformen der MS hinweist, bleibt der Klärung durch weitere Studien vorbehalten.

Außerdem wurden die Seren von 17 Patienten mit den unterschiedlichen Verlaufsformen der MS im Verlauf von mehreren Jahren untersucht. Gleichzeitig wurde der EDSS im Verlauf ermittelt. Allerdings korrelierte der sCD95-Wert weder bei der SCP noch bei den anderen Verlaufsformen der MS mit der Krankheitsaktivität, dem EDSS oder einer immunmodulatorischen Therapie. Die bisherigen Studien zur Korrelation von sCD95 zu verschiedenen Krankheitsstadien der MS, Krankheitsaktivität und EDSS haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt und erlauben es nicht, sCD95 als Aktivitätsmarker der MS heranzuziehen.

Zusätzlich wurden in unserer Studie apoptotische Zellen im Liquor von 18 MS-Patienten analysiert. Dabei ließen sich DNA-Fragmente als Ausdruck der Apoptose von T-Zellen im Liquor sowohl bei MS, aber auch bei anderen neurologischen Erkrankungen ohne signifikante Bevorzugung und ohne klaren Bezug zur Krankheitsaktivität darstellen. Die Detektion apoptotischer Zellen im Liquor dient somit nicht als spezieller Aktivitätsmarker für MS.

7 Literaturverzeichnis

Ackerman KD, Heyman R, Rabin BS, Anderson BP, Houck PR, Frank E, Baum A (2002) Stressful life events precede exacerbations of multiple sclerosis. *Psychosom Med.* 64: 916-920

Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, Probert L (1998) Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 153: 801-813

Aktas O, Wendling U, Zschenderlein R, Zipp F (2000) Apoptose bei multipler Sklerose. *Nervenarzt* 71: 757-773

Alcázar A, Rigidor I, Masjuan J, Salina M, Álvarez JC (1998) Induction of apoptosis by cerebrospinal fluid from patients with primary-progressive multiple sclerosis in cultured neurons. *Neurosci. Lett.* 255:75-78

Bachmann R, Eugster HP, Frei K, Fontana A, Lassmann H (1999) Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J. Pathol.* 154: 1417-1422

Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Ader HJ, Losseff N, Valk J (1997) *Brain* 120: 2059-2069

Batchelor JR, Compston A, McDonald WI (1985) The significance or the association between HLA and multiple sclerosis. *Brit. Med. Bull.* 34: 279-284

Bansil S, Holtz CR, Cook SD, Rohowsky-Kochan C (1997) sApo-1/Fas levels in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 95:208-210

Bantel H 1999: Erkrankungen mit Störungen der Apoptose. *Die gelben Hefte* 39: 91-100

Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27: 62-74

Bonetti B, Raine CS (1997) Multiple sclerosis: oligodendrocytes display cell death-related molecules in situ but do not undergo apoptosis. *Ann. Neurol.* 42: 74-84

- Bredesen DE (2000) Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J. Neurotrauma* 17: 801-810
- Brusch W, Kleine L, Tenniswood M (1990) The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 88: 1071-1074
- Buddenhage F, Pantovic M (1985) Vergleichende epidemiologische Analyse der MS in Gebieten des mittleren und südlichen Europas. *Psych. Neurol. Med. Psychol.* 37: 565-572
- Cascino I, Fiucci G (1995) Three functional soluble forms of the human apoptosis in T cell hybridomas. *J. Immunol.* 154: 2706-2713
- Cheng J, Zhou T (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263: 1759-1762
- Ciusani E, Frigerio S, Gelati M et al. (1998) Soluble Fas (Apo-1) levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 82: 5-12
- Compston A, Coles A (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359: 1221-1231
- Critchfield J, Racke M et al. (1994) T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 263: 1139-1143
- Dalton CM, Brex PA, Jenkins R, Fox NC, Miskiel KA, Crum WR, O'Riordan JI, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH (2002) Progressive ventricular enlargement in patients with clinically isolated syndromes is associated with the early development of multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73: 141-147
- Daniel P, Krammer P (1994) Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J. Immunol.* 152: 5624-5632
- de Jong BA, Huizinga TW, Zanelli E, Giphart MJ, Bollen EL, Uitdehaag BM, Polman CH, Westendorp RG (2002) Evidence for additional genetic risk indicators of relapse-onset MS within the HLA region. *J. Neurol.* 59: 549-555
- De Keyser J, Zeinstra E, Frohmann E (2003) Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch. Neurol.* 60: 132-136
- Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Krammer PH (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by CD95. *Nature* 373: 438-441

- Dittel BN (2000) Evidence that Fas and FasL contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 48: 381-388
- Dorr J, Bechmann I, Waiczies S, Aktas O, Walczak H, Krammer PH, Nitsch R, Zipp F (2002) Lack of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain. *J. Neurosci.* 22: RC209
- Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W (1996) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp. Med.* 184: 1513-1518
- Dowling P, Husar W, Menonna J, Donnenfeld H, Sidhu M (1997) Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Science* 149: 1-11
- Downie A, Phadke J (1983) The chief scientist reports: MS in North East Scotland. *H. Bull.* 42: 151-156
- D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP (1996) Multiple sclerosis: Fas signalling in oligodendrocyte cell death. *J. Exp. Med.* 184: 2361-2370
- Durelli L et al. (1986) High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations. *J. Neurol.* 36: 238-243
- Ebers G, Paty D (1980) CSF-electrophoresis in thousand patients. *Canad. J. Neurol. Sci.* 7: 275-280
- Ebers GC (1984) Cerebrospinal fluid electrophoresis in multiple sclerosis. Thieme Stratton Inc. 42: 179-184
- Ferrari D, Stepczynska A, Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1998) Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188: 979-984
- Fierz W, Endler B, Reske K, Wekerle H, Fontana A (1985) Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T-cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J. Immunol.* 134: 3785-3793
- Fierz W, Fontana A (1986) The role of astrocytes in the interaction between the immune and nervous system. In: *Astrocytes: Cell biology and pathology of astrocytes*: ed. S. Fedoroff and A. Vernadakis. Academic Press, London 1986: 3: 203-229

Firnhaber W, Laurer K (1985) Prevalence incidence and mortality data on MS in Southern Hessen. International MS conference, Hamburg

Fujinami RS (1992) Molekular mimikry. In: Rose NR, MacKay IR (Hrsg.) The autoimmune diseases II, 2. Auflage Orlando. S. 153-171

Gavrieli Y, Sherman Y et al. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 119: 493-501

Glücksman A (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. 26: 59-86

Gold R, Hartung HP, Lassmann H (1997) T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. Trends Neurosci. 20: 399-404

Gomes AC, Jonsson G, Mjornheim S, Olsson T, Hillert J, Grandien A (2003) Upregulation of the apoptosis regulators cFLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 135: 126-134

Gronseth G, Ashman E (2000) Practice parameter: The usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review). J. Neurol. 54: 1720-1725

Hallervorden (1940) Die zentralen Entmarkungserkrankungen. Dt. Z. Nervenheilkunde 150: 201-239

Heesen C, Hadji B, Gbadamosi J, Kunze K (1998) CSF inflammatory parameters decline in glatiramer acetate treated multiple sclerosis patients. Multiple Sclerosis 4:336

Hein T, Hopfenmuller W (2000) Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany [Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland.] Nervenarzt 71: 288-294

Hellings N, Baree M, Verhoeven C et al. (2001) T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. J. Neurosci. Res. 63: 290-302

Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N (2002) Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. Neurol. 15: 227-231

- Hershey L, Trotter I (1980) The use and abuse of the cerebrospinal fluid IgG profile in the adult: a practical evaluation. *Ann. Neurol.* 8: 426-434
- Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG (1997) The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin. Proc.* 72: 871-878
- Ichikawa H, Ota K, Iwata M (1996) Increased Fas antigen on T cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 71: 125-129
- Jones DE, Diamond AG (1995) The basis of autoimmunity: an overview. *Bailliers Clin. Endocrinol. Metab.* 9: 1-24
- Kesselring J, Ormerod IEC, Miller DH, du Boulay EPGH, McDonald WI (1989) Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis- an atlas of diagnosis and differential diagnosis. Thieme, Stuttgart 1989.
- Kesselring J (1989) Magnetresonanztomographie (MRI) und Multiple Sklerose (MS). *Schweiz Rundschau Med. (PRAXIS)* 78: 950-955
- Kerr J, Searle J, Harmon V, Bishop C (1987) Apoptosis. In perspectives on mammalian cell death. Oxford University Press 93-128
- Kerr J, Wyllie A (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B. J. Cancer* 26: 239
- Klas C, Debatin K (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T-cells. *Int. Immunol.* 5: 625-630
- Knipping E, Debatin K (1995) Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias. *Blood* 85: 1562-1569
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Statst. Assoc.* 47: 583-621
- Kurtzke J (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444-1452
- Lassmann H (1999) The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Biol. Sci.* 354: 1635-1640
- Leverkus M, Yaar M, Gilchrest BA (1997) Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell. Res.* 232: 255-262

- Lievera P et al. (1981) Intrathecal IgG-synthesis in multiple sclerosis: comparison between isoelectric focusing and quantitative estimations of cerebro-spinal fluid IgG. *J. Neurol.* 224: 159-169
- Lockshin R (1964) Programmed cell death. *Insect Physiol.* 10: 643-649
- Lublin F, Reingold S (1996) For the national multiple sclerosis society (USA) Advisory committee on clinical trials of new agents in MS. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *J. Neurol.* 46: 907-11.
- Lunemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, Wendling U, Seeger B, Kamradt T, Zipp F (2002) Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *J. Immunol.* 168: 4881-4888
- Macchi B, Matteucci C, Nocentini U, Caltagirone C, Mastino A (1999) Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *Neurol. Report* 10:399-402
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7: 1003-1006
- Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M (1990) Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J. Immunol.* 145: 540-548
- Martin R, McFarland HF, McFarlin DE (1992) Immunological aspects of demyelinating diseases. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 153-187
- Mater A (1979) Microcinematography and electron microscopic analysis of target cell lyses induced by cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 36:179-190
- McAlpine D, C.Lumsden (1972) *Multiple Sclerosis: A Reappraisal*. 2nd.ed.Churchill Livingstone, Edinburgh 1972
- McCarron RM, Spatz M, Kempinski O (1986) Interaction between myelin basic protein-sensitized T lymphocytes and murine cerebral vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 137: 3428-3435
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD (2001) Recommended diagnostic criteria for MS: guidelines from the International Panel on the diagnosis of MS. *Ann. Neurol.* 50: 121-127

- McDonald WI (1992) Multiple Sclerosis: diagnostic optimism. *J. Brit. Med.* 304: 1259-1260
- McDonald WI, Halliday AM (1977) Diagnosis and classification of multiple sclerosis. *Brit. Med. Bull.* 33: 4-8
- McFarland HF, Barkhof F, Antel J, Miller DH (2002) The role of MRI as a surrogate outcome measure in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 8: 40-51
- Motyka B (1991) Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the chicken bursa of Fabricius: a possible role in cell selection. *J. Eur. Immunol.* 21: 1951-1958
- Nagata S, Goldstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 257: 1449-1456
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 25: 313-319
- Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F (2000) Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 356: 827-828
- O'Connor P, Marchetti P, Lee L, Perera M (1998) Evoked potential abnormality scores are useful measure of disease burden in relapsing remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 44: 404-407
- Pender M, McCombe P (1992) Apoptosis of T-Lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J. Autoimmunol.* 5: 401-410
- Pender M (1988) The pathophysiology of myelin basic protein-induced acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Neurol. Sci.* 86: 277-289
- Pender M (1998) Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T-cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet* 351: 978-981
- Pettinelli C, McFarlin D (1981) Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+2- T-lymphocytes. *J. Immunol.* 127: 1420-1423

Poser C, Paty D et al. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13: 227-231

Reiber H (1980) The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of CNS. *J. Neurol.* 224: 89-99

Rose A, Ellison G (1976) Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. *J. Neurol.* 26: 20-22

Russell S, Rosenau W, Lee J (1972) Cytolysis induced by human lymphotoxin. *Ann. J. Pathol.* 69:103-118

Sabelko-Downes KA, Russel KJH, Cross AH (1999) Role of Fas-FasL interactions in the pathogenesis and regulation of autoimmune demyelination disease. *J Neuroimmunol.* 100: 42-52

Sanderson C (1976) The mechanism of T cell mediated cytotoxicity II. Morphological studies of cell death by time lapse microcinematography. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 192: 241-255

Schipper H (1989) Lokale IgG-Produktion im Liquor bei Multipler Sklerose. Springer, Berlin 1989

Schmied M, Breitschopf H (1993) Apoptosis of T-lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am. J. Pathol.* 143: 446-452

Schumacher G, Beebe G (1965) Problems of experimental trials of therapy in MS: report by the panel on the evaluation of experimental trials of the therapy in MS. *Ann. N.Y. Academy Sci.* 122: 552-558

Selmaj K, Raine C, Farooq M, Morton W, Brosnan C (1991) Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J. Immunol.* 147: 1522-1529

Semra YK, Seidi OA, Sharief MK (2001) Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 113: 268-274

Sharief MK, Semra YK, Seidi OA, Zoukos Y (2001) Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptotic protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 120: 199-207

- Sormani MP, Bruzzi P, Comi G, Filippi M (2002) MRI metrics as surrogate markers for clinical relapse rate in relapsing-remitting MS patients. *J. Neurol.* 58: 417-421
- Spiegel J, Hansen C, Baumgartner U, Hopf HC, Treede TD (2003) Sensitivity of laser-evoked potentials versus somatosensory evoked potentials in patients with multiple sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 114: 992-1002
- Sprent J, Lo D, Gao EK, Ron Y (1989) T cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.* 10: 57-61
- Steinmann L (1996) Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85: 299-302
- Storch M, Lassmann H (1997) Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 10: 186-192
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998) Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* 8: 681-194
- Stout R, Bottomly K (1989) Antigen-specific activation of effector macrophages by Interferon-Gamma producing (TH1) T-Cell clones. Failure of IL-4 producing (TH2) T-Cell clones to activate effector functions in macrophages. *J. Immunol.* 142: 760
- Suda T, Takahashi T (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178
- Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* 4: 31-36
- Tourtelotte W, Ma B (1978) Multiple Sclerosis: the blood brain barrier and the measurement of the novo central nervous system IgG synthesis. *J. Neurol.* 28: 76-83
- Tourtelotte W (1980) Multiple sclerosis de novo CNS IgG synthesis: effect of ACTH and corticosteroids. *J. Neurol.* 30: 1155-1162
- Tourtelotte W, Staugaitis S (1985) The basis of intra-blood-brain barrier IgG-synthesis. *Ann. Neurol.* 17: 21-87
- Trauth B, Klas C (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305

- Trotter JL, Pelfrey CM, Trotter AL (1998) T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects. *J. Neuroimmunol.* 84: 172-178
- Umansky S (1982) The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: Transformation, carcinogenesis, ageing. *J. Theor. Biol.* 97: 591-602
- Valdo P, Stegagno C, Mazzucco S, Zuliani E, Zanusso G, Moretto G, Raine CS, Bonetti B (2002) Enhanced expression of NGF receptors in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61: 91-98
- Vamvakas C, Pmeda A (1995) Meta analysis of clinical studies of the efficacy of plasma exchange in the treatment of chronic progressive ms. *J. Clin. Apheresis* 10: 168-170
- Van Parijs L (1998) Homeostasis and selftolerance in immunsystem: Turning lymphocytes off. *Science* 280: 243
- Wekerle H (1993) T-cell autoimmunity in the central nervous system. *Intervirolgy* 35: 95-100
- Willoughby EW, Grochowski E, Li DK, Oger J, Kastrukoff LF, Paty DW (1989) Serial magnetic resonance scanning in multiple sclerosis: a second prospective study in relapsing patients. *Ann. Neurol.* 25: 43-49
- Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis: epidemiology, genetics, classification, natural history, and clinical outcome measures. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 10: 611-624
- Wikström J, Ritter G, Poser S (1977) Das Vorkommen der MS in Süd-Niedersachsen. Ergebnisse einer Feldstudie über 12 Jahre. *Nervenarzt* 48: 494-499
- Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T-cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80: 695-705
- Wyllie A, Morris R (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142: 67-77
- Wyllie A (1980) Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556

- Yonehara S (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169: 1747-1756
- Zamvil S, Nelson P (1985) T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317: 355-358
- Zhou T, Song L, Yang P, Wang Z, Lui D, Jope RS (1999) Bisindolylmaleinide VIII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T cell-mediated autoimmune diseases. *Nat. Med.* 5: 42-48
- Zipp F, Weber F, Huber S (1995) Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor- α by HLA-DR-2+ T cells. *Ann. Neurol.* 38: 723-730
- Zipp F, Faber E, Sommer N, Müller C, Dichgans J, Krammer PH, Martin R, Weller M (1998a) CD95 expression and CD95-mediated apoptosis of T cells in multiple sclerosis. No differences from normal individuals and no relation to HLA-DR2. *J. Neuroimmunol.* 81: 168-172
- Zipp F, Otzelberger K, Dichgans J, Martin R, Weller M (1998b) Serum CD95 of remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. *J. Neuroimmunol.* 86: 151-154
- Zipp F, Weller M (1998c) Increased serum levels of soluble CD95 (APO1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43: 116-120
- Zipp F, Krammer PH, Weller M (1999) Immune (dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95 ligand system. *Immunol. today* 20: 550-554

8 Verzeichnisse

Verläufe

Verlauf 1	34
Verlauf 2	35
Verlauf 3	35
Verlauf 4	36
Verlauf 5	37
Verlauf 6	38
Verlauf 7	39
Verlauf 8	39
Verlauf 9	40
Verlauf 10	41
Verlauf 11	41
Verlauf 12	42
Verlauf 13	42
Verlauf 14	43
Verlauf 15	44
Verlauf 16	44
Verlauf 17	45

Abbildungen

Abbildung 1- Ätiopathogenetisches Modell der MS	13
Abbildung 2- Apoptosevermittelnde Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktion	18
Abbildung 3 - Beispiel für (+/+): Fast alle Zellen eines Gesichtfeldes apoptotisch	30
Abbildung 4 - Beispiel für (+/-): weniger als 50% apoptotische Zellen	31
Abbildung 5- sCD95 im Serum bei MS-Verläufen - Boxchart	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1- sCD95-Werte im Serum von MS-Patienten und Kontrollen in pg/ml	32
Tabelle 2- Liquor TUNEL Färbung bei schubförmiger MS und bei Kontrollen	46
Tabelle 3- TUNEL-positive Zellen im Liquor vor und ein Jahr nach der Therapie mit Copaxone	46

9 Abkürzungen

COP	COPAXONE/ Glatiramer Acetat/ GA
CT	Computertomographie
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribosnucleinsäure)
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
FLIP	Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme inhibitory protein
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN	Interferon
MHC	Major histocompatibility complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
N	Anzahl
NGF	Nerve-Growth-Factor
PCP	primär chronisch progredient
PCPa	primär chronisch progredient aktiv
PCPs	primär chronisch progredient stabil
SA	Schubförmig aktiv
Sch	Schubförmig

SCP	sekundär chronisch progredient
SCPa	sekundär chronisch progredient aktiv
SCPs	sekundär chronisch progredient stabil
SS	Schubförmig stabil
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Unit/ Einheit
z.B.	zum Beispiel

10 Anhang

10.1 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. C. Weiler für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. C. Heesen danke ich für seine Betreuung und das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten. Er war auch in seiner Freizeit immer bemüht, mir bei Problemen zu helfen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Appell, der mir mit Geduld bei der Einarbeitung in die Labortechnik half. Ich möchte seine freundliche und kompetente Unterstützung bei allen technischen Fragen und Problemen nicht missen.

Dankend erwähnen möchte ich besonders auch meine lieben Eltern, die mich immer zur Beendigung dieser Arbeit ermutigten und mich nicht nur durch den Kauf eines PC's unterstützten.

Für die Lösung kleiner und größerer PC-Probleme möchte ich mich auch sehr bei Herrn A. Ude bedanken.

10.2 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig 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 an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 12.2.2004

11 Lebenslauf

Gheorghiu, Susanne

Geburtstag:	17.08.1973
Geburtsort:	Tecuci/ Rumänien
1980-1984	Grundschule Düsseldorf
1984-1985	Koblenzer Gymnasium Düsseldorf
1985-1988	Gymnasium Petrinum Dorsten
1988-1993	Hebbel Gymnasium Kiel, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1994	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität zu Budapest/ Ungarn
1996	Ärztliche Vorprüfung
1996	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg, UKE
1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Beginn des Praktischen Jahres
Okt.-Dez. 1999	Chirurgie, Allgemeines Krankenhaus Altona, Hamburg
Dez.-Feb. 2000	Chirurgie, Semmelweis Universität Budapest, Ungarn
Feb.-Apr. 2000	Innere Medizin, Regionalkrankenhaus Bozen, Italien
Apr.-Jun. 2000	Innere Medizin, Universität Gemelli Rom, Italien
Jun.-Sep. 2000	Gynäkologie, Regionalkrankenhaus Bozen, Italien
2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.11.2000- 16.04.2001	Ärztin im Praktikum in chirurgischer Praxis Dr. med. C. Gheorghiu und in der Klinik WALDWIESE in Kiel
17.04.2001- 30.04.2002	Ärztin im Praktikum in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus ELIM bei Prof. Dr. med. C. Lindner.
01.05.2002- 31.05.2002	Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus ELIM bei Prof. Dr. med. C. Lindner.
01.06.2002- 30.06.2003	Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe in der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf bei Prof. Dr. med. F. Jänicke
01.07.2003- 31.01.2004	Medizinische Mitarbeiterin in chirurgischer Praxis und in der Klinik WALDWIESE in Kiel