



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Neurologische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Bernhard Hemmer)

Prädiktive Faktoren kernspintomographischer Krankheitsaktivität nach Erstmanifestation einer chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankung

Ana-Katharina Klein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Bernhard Hemmer

2. apl. Prof. Dr. Jan Stefan Kirschke

Die Dissertation wurde am 29.07.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 01.01.2020 angenommen.

I. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zellen
AUC	Area under the curve
CI	Konfidenzintervall
CIS	Klinisch-isoliertes Syndrom
CSF	Liquor cerebrospinalis
DIR	Double inversion recovery sequence
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FLAIR	Fluid attenuate inversion recovery
Gd	Gadolinium
HLA	Humanes leucozyten Antigen
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMT	Immunmodulatorische Therapie
ISO	Isointens
MPR	Multiplanar reconstruction
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NF-H	Neurofilament schwere Kette
NF-L	Neurofilament leichte Kette
NF-M	Neurofilament mittlere Kette
Nm	Nanometer
OKB	Oligoklonale Banden
OR	Odds Ratio
PBS	Phosphate buffered saline
Pg	Picogramm
PPMS	Primär progressive MS
ROC	Receiving Operating Characteristic
RRMS	Schubförmig-remittierende MS
SPMS	Sekundär progressive MS
TMB	3,3',5,5' –Tetramethylbenzidin
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

II. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Multiple Sklerose	2
1.1.1. Pathogenese	4
1.1.2. Klinik und Verlauf	6
1.1.3. Ätiologie	8
1.1.4. Diagnostik	8
1.1.4.1. Magnetresonanztomographie	11
1.1.4.2. Liquordiagnostik	11
1.1.5. Therapie	13
1.2. Zielsetzung der Dissertation	15
1.2.1. Die Suche nach prädiktiven Biomarkern	15
1.2.2. Die intrathekale Bildung von Immunglobulinen	17
1.2.3. Die Distribution der Immunglobulin G Subklassen im Liquor	17
1.2.4. Die lösliche Variante des CD27 Oberflächenmoleküls	18
1.2.5. Die leichte Kette des Neurofilaments	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Studiendesign	20
2.2. Patientenkollektiv	22
2.3. Retrospektiv ausgewertete Liquordaten	24
2.3.1. Berechnung der Immunglobulin Indices	24
2.3.2. Nachweis von intrathekal produzierten Immunglobulinen	25
2.3.3. Isoelektrische Fokussierung der oligoklonalen Banden	26
2.4. Versuche	27
2.4.1. Geräte und Material	27
2.4.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay	28
2.4.2.1. sCD27 Instant ELISA® der Firma eBioscience	30

2.4.2.2. NF-light® ELISA der Firma UmanDiagnostics	31
2.4.3. IgG-Subklassen Nephelometrie	32
2.5. Statistische Auswertungen	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Intrathekale IgG, IgM und IgA Synthese	34
3.2. Oligoklonale Banden	39
3.3. NFL und sCD27 im Liquor	40
3.4. Multivariable Analyse der Liquorparameter	41
3.5. Prognostischer Nutzen des Liquors versus MRT	43
3.6. Risikokala für cMRT Aktivität	44
4. Diskussion	45
5. Zusammenfassung	48
6. Abbildungsverzeichnis	49
7. Tabellenverzeichnis	49
8. Literaturverzeichnis	50

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose¹ ist eine in Schüben verlaufende, chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems². Die MS ist gekennzeichnet durch multifokale entzündliche Läsionen der weißen Substanz des Gehirns und Rückenmarks, die zu einer Demyelinisierung, axonalem Schaden und daraus folgenden neurologischen Ausfällen führen. Da sich diese Entzündungsherde, auch als Plaques bezeichnet, im gesamten ZNS lokalisieren können, ist die klinische Symptomatik höchst variabel: Es können sowohl motorische, sensorische als auch vegetative Nervenleitungsbahnen befallen sein und somit zu einem vielfältigen phänotypischen Krankheitsbild führen. Meist beginnt die Erkrankung schubförmig mit fast vollständiger Remission zwischen den einzelnen Schüben und geht dann im Verlauf in eine progrediente Form über. Einige Patienten leiden jedoch bereits zu Beginn an einer progredienten Form der MS, ohne dass im Verlauf Schübe auftreten. (Thompson, Baranzini, et al., 2018)

Mit einer Prävalenzrate von 50-300 pro 100 000 Einwohnern ist sie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenen (Thompson, Baranzini, et al., 2018). Die Erkrankung manifestiert sich typischerweise im Alter zwischen 20 und 40 Jahren (Compston & Coles, 2002). In Bayern betrug die Zahl der Erkrankten im Jahr 2015 277 pro 100 000 Einwohnern (Daltrozzo et al., 2018).

Mit Hilfe diverser Immunsuppressiva und Immunmodulatoren kann das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt werden, eine kausale Therapie gibt es bis dato jedoch nicht.

¹ Multiple Sklerose, kurz: MS

² Zentrales Nervensystem, kurz ZNS

1.1.1. Pathogenese

Man vermutet eine autoimmunvermittelte Genese der MS, bei der es zu einer peripheren Aktivierung von Entzündungszellen gegen Bestandteile des ZNS und nach Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion innerhalb der myelinisierten Areale kommt.

Diese Hypothese wird durch das Tiermodell der experimentellen autoimmunvermittelten Enzephalomyelitis unterstützt. Hierbei handelt es sich um eine z.B. bei Nagern induzierte Enzephalomyelitis, die klinisch und pathologisch der MS beim Menschen ähnelt und oft als Erklärungsmodell verwendet wird. Die Erkrankung kann in suszeptiblen Tierstämmen durch die Immunisierung mit Myelinbestandteile und Freund's Adjuvans induziert werden. Hierdurch wird eine T-Zell-Reaktion gegen Myelinantigene induziert. Die aktivierten T-Zellen wandern in das ZNS ein und verursachen eine Entzündungsreaktion in der Folge eine Demyelinisierung auftreten kann. (Gold et al., 2006)

Weiterhin wird die Theorie einer Dysregulation des Immunsystems durch Laborparameter gestützt, die eine chronische Entzündung im ZNS zeigen. Bei 88 % aller diagnostizierten Patienten findet man oligoklonale Banden.³ Diese stellen intrathekal gebildete Immunglobulin G⁴-Antikörper dar. (Dobson et al., 2013) Auch der IgG-Index, welcher das Verhältnis der Liquor Serum Quotienten von IgG und Albumin angibt, ist bei mehr als der Hälfte aller Patienten erhöht. (Stangel et al., 2013)

Außerdem findet man eine erhöhte Anzahl von Immunzellen, u.a. auch B-Zellen und Plasmablasten, im Liquor von Patienten mit MS (Cepok et al., 2005). Des Weiteren sind im Liquor der Patienten proinflammatorische Zytokine und Chemokine nachweisbar, die ebenfalls mit einer entzündlichen Genese der Erkrankung vereinbar sind. (Cannella & Raine, 1995; Karpus et al., 1995)

Die Autoimmunhypothese der MS wird durch die bereits erwähnte Assoziation mit HLA-Haplotypen und für das Immunsystem relevanten genetischen Varianten unterstützt. (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011)

³ Oligoklonale Banden, kurz OKBs

⁴ Immunglobulin G, kurz IgG

Es wird heute davon ausgegangen, dass die Krankheit durch autoreaktive T- und B-Zellen vermittelt wird. Man geht davon aus, dass aktivierte T Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und der Kontakt mit Autoantigene dort zu einer Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen führt. Hierdurch werden weitere Immunzellen, insbesondere B Zellen und Makrophagen, rekrutiert, die die Entzündungsreaktion verstärken und zur Läsion führen. Zur eigentlichen Demyelinisierung führt eine Vielzahl von biochemischen Prozessen: Während Makrophagen und Mikrogliazellen toxische Sauerstoffradikale bilden oder das Komplementsystem aktivieren, greifen die B-Zellen über die von ihnen gebildeten Immunglobuline die Myelinscheide an. Des Weiteren können einige Zytokine auch direkt oligodendrozytotoxisch wirken. (Thompson, Baranzini, et al., 2018)

Nach Phagozytose des zerstörten Myelins kommt es zu einer Gliose und teilweisen Regeneration der Axonscheiden durch Oligodendrozyten, jedoch nimmt diese Regenerationsfähigkeit im Laufe der Erkrankung allmählich ab.

Man unterscheidet zwischen aktiven und inaktiven Läsionen. Aktivität ist gekennzeichnet durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke und einem daraus folgenden Ödem. Die Läsionen bestehen aus aktivierten Entzündungszellen und Nachweis von Myelin phagozytierenden Makrophagen und Zeichen einer akuten axonalen Schädigung. In den inaktiven Läsionen fehlen die Entzündungszellen weitgehend und die Blut-Hirn-Schranke zeigt sich intakt. In diesen Plaques ist die Gliose bereits weiter fortgeschritten, weshalb die inaktiven Läsionen als „sklerotisch“ bezeichnet werden, was der Krankheit ihren Namen verleiht. (Prineas et al., 2001)

Durch die Demyelinisierung wird die saltatorische Impulsweiterleitung entlang der Axone behindert und es kommt zu einer Minderung der Nervenleitungsgeschwindigkeit. Da die demyelinisierten Axone zusätzlich empfindlicher gegen mechanische Reize sind, kommt es zu Missempfindungen und Kribbelparästhesien (Thompson, Baranzini, et al., 2018). Zu Beginn zeigt sich im begrenzten Maße eine Remyelinisierung (Prineas & Connell, 1979; Prineas et al., 2001). Im Verlauf der Erkrankung nehmen diese Reparaturmechanismen jedoch nach und nach ab. Es lässt sich vermuten, dass der entstandene Axonschaden bereits

so groß ist, dass eine Assoziation mit neu gebildetem Myelin unmöglich ist (Chang et al., 2002).

Doch es sind nicht nur isoliert die Myelinscheiden betroffen. Zusätzlich lässt sich in den histologischen Präparaten eine deutliche Axondegeneration feststellen, welche nicht nur auf die MS Plaques begrenzt ist, sondern sich global im Gewebe zu finden ist. In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass vor allem diese Axonschäden für die irreversible neurologische Behinderung verantwortlich sind. (Wujek et al., 2002)

1.1.2. Ätiologie

Trotz umfangreicher Forschung ist die Ursache der MS noch nicht ausreichend geklärt. Man vermutet eine multifaktorielle Genese:

Aufgrund diverser Familien- und Zwillingsstudien wird eine genetische Prädisposition zur MS diskutiert. Eine Kanadische Untersuchung ergab ein bis zu 25-fach höheres Risiko für Familienmitglieder ersten Grades an MS zu erkranken (Sadovnick et al., 1999). Weiterhin betrug die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge eine MS zu entwickeln in einer weiteren Studie mehr als 25% und lag damit weit über der Rate dizygoter Zwillinge mit 5,4% und anderer Geschwister mit 2,0 % (Willer et al., 2003). Um den Einfluss geteilter Haushalte und Lebensbedingungen von genetischen Faktoren zu unterscheiden, wurden zusätzlich Studien mit Stiefgeschwistern und Adoptivkindern durchgeführt, bei denen keine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden konnte (Dyment et al., 2006; Ebers et al., 1995).

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen bestimmten HLA Klasse II Varianten⁵ und einem erhöhten MS-Risiko gefunden werden (Jersild et al., 1972). Die stärkste MS Assoziation findet sich mit dem HLA-DRB1*1501 Allel. Träger dieses Allels haben ein fast dreifach erhöhtes Risiko eine MS zu entwickeln (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011). HLA- Antigene, welche auf den HLA-Genen kodiert sind, befinden sich auf der Zellmembran und dienen der Identifikation als körpereigen oder körperfremd. Man unterscheidet zwischen HLA Klasse I und II Molekülen. Während die Klasse I Moleküle auf beinahe allen Zellen

⁵ human leucocyte antigen, kurz HLA

vorkommen und endogen gebildete Peptide einer Zelle präsentieren, befinden sich Klasse II HLA Antigene nur auf antigenpräsentierenden Zellen⁶, wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen, und dienen der Aktivierung von T-Zellen nach Präsentation exogener Antigene. (Welsch & Deller, 2010)

Neben den HLA Allelen konnten inzwischen mehr als 200 weitere genetische Varianten identifiziert werden, die das MS Risiko beeinflussen. Der Einfluss dieser genetischen Faktoren ist allerdings gering und führt nur zu einer Risikoerhöhung von 5 bis 30 %. Es wird angenommen, dass die MS assoziierten genetischen Varianten ihre Wirkung vorwiegend im Immunsystem entfalten. (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011)

Zusätzlich stehen auch Umweltfaktoren im Verdacht, einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu nehmen. Diese These unterstützen die unterschiedlichen Prävalenzen je nach Region. Vereinfacht betrachtet, steigt die Anzahl der Erkrankten mit zunehmender Entfernung zum Äquator. Während Nordamerika, Nordeuropa, Neuseeland und Südaustralien als Hoch-Inzidenzgebiete mit Prävalenzraten von mehr als 30:100000 Einwohnern bezeichnet werden, gelten Asien, Afrika und die Karibik als Niedrig-Inzidenzzonen mit Prävalenzraten kleiner als 5:100000. (Kurtzke, 1980)

Dieser Gradient wird in geringerer Ausprägung auch in Regionen mit relativer ethnischer Homogenität wie Amerika, Europa und Australien beobachtet. Auch diverse Migrationsstudien untermauern diese Theorie: Es zeigte sich, dass Migranten bei Ortswechsel im Alter von über 15 Jahren das Lebenszeitrisiko ihres Geburtslandes mitnahmen und bei Ortswechsel in der Kindheit das Risiko des jeweiligen Landes an MS zu erkranken annahmen. (Dean, 1967; McLeod et al., 2011, 2012)

Welche Umweltfaktoren zu diesem Phänomen führen, ist bis dato nur unvollständig verstanden. Im Gespräch steht die Dauer an Sonnenstrahlung pro Tag und der damit verbundenen Vitamin D-Versorgung. (Munger et al., 2004)

⁶ Antigenpräsentierenden Zellen, kurz APC

Auch der Beitrag viraler Infektionen wird diskutiert, wobei hier insbesondere die Infektion mit Epstein-Barr-Virus⁷ von Bedeutung zu sein scheint. Ursache hierfür ist einerseits eine sehr ähnliche Epidemiologie beider Erkrankungen (Correale & Gaitan, 2015), als auch die Tatsache, dass die Durchseuchung mit EBV bei MS Patienten höher ist als bei Kontrollpersonen (Ascherio et al., 2001; Sumaya et al., 1980). Weiterhin erhöht eine Mononukleose das Risiko später an MS zu erkranken (Burnard et al., 2017; Sundqvist et al., 2012; Thacker et al., 2006). Auch finden sich bei MS Patienten deutlich erhöhte Serumtitere gegen das EBNA-1 Protein von EBV (Ascherio & Munger, 2007; Lindsey & Hatfield, 2010). Weitere diskutierte Kofaktoren für die Entwicklung einer MS stellen Nikotinabusus und Adipositas dar (Thompson, Baranzini, et al., 2018).

1.1.3. Klinik und Verlauf

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist nicht vorhersehbar und variiert stark zwischen einzelnen Individuen. Das Ausmaß kann von einem gutartigen Verlauf, ohne Einschränkung der Lebenserwartung und mit keiner oder nur geringer klinischer Symptomatik nach 10-15 Jahren, bis zu einem malignen Verlauf reichen, bei dem innerhalb weniger Jahre eine schwere Behinderung auftritt.

Allgemein unterscheidet man zwischen vier verschiedenen phänotypischen Ausprägungen

- **Klinisch isoliertes Syndrom („Clinically Isolated Syndrome“)⁸:**

Hierbei handelt es sich um eine einmalige Funktionsstörung, die auf einen entzündlich-demyelinisierenden Prozess im ZNS zurückzuführen ist. Obwohl hier die diagnostischen Kriterien für eine MS nicht erfüllt sind, gehört das CIS bereits seit 2013 zur phänotypischen Klasse der MS-Erkrankungen und wird als Vorstufe zur schubförmig verlaufenden MS gesehen.

⁷ Epstein-Barr-Virus, kurz EBV

⁸ Klinisch isoliertes Syndrom, Englisch: Clinically Isolated Syndrome kurz CIS

- **Schubförmig remittierend verlaufende MS („Relapsing remitting MS“)⁹:**

85% der Patienten erleben primär einen schubförmigen Verlauf. Zu Beginn der Erkrankung bilden sich die entstehenden Symptome jeweils zurück, im Verlauf können sie allerdings durch unvollständige Rückbildung zu einer kumulativen Behinderung führen.

- **Sekundär progrediente MS („Secondary progressive MS“)¹⁰:**

In etwa 30% der Fälle geht die RRMS in einem Zeitraum von 20-30 Jahren in einen chronisch progredienten Verlauf über, bei der die Verschlechterung oft in Abwesenheit eines Schubes auftritt. Teilweise haben die Patienten auch in dieser Phase zusätzlich noch aufgelagerte Schübe.

- **Primär progrediente MS („Primary progressive MS“)¹¹:**

Bei ca. 15% der Patienten verläuft die Krankheit von Beginn an progredient, ohne Phasen der Remission. Im Krankheitsverlauf lassen sich keine einzelnen Schübe abgrenzen. Der primär progrediente Verlauf tritt gehäuft auf, wenn sich die Krankheit im höheren Lebensalter manifestiert und wird bei Kindern und Jugendlichen praktisch nicht beobachtet. (Thompson, Baranzini, et al., 2018)

Als Schub gelten Symptome, die durch eine Reaktivierung einer bereits vorhandenen Läsion oder durch eine neue Läsion im ZNS zu erklären sind. Diese müssen per Definition über 24 Stunden anhalten und seit dem letzten Schub müssen mindesten 30 Tage vergangen sein. Des Weiteren dürfen diese Symptome nicht durch eine Erhöhung der Körpertemperatur (Uthoff-Phänomen) oder einem Infekt entstanden sein. (Diener et al., 2005)

Hierbei ist vor allem die Definition eines Schubes bedeutsam, um von einem Pseudoschub abzugrenzen, der sich klinisch als solcher darstellt, jedoch durch äußere Umstände oder physiologische Schwankungen zu erklären ist.

⁹ Schubförmig remittierend verlaufende MS, Englisch: Relapsing remitting MS, kurz RRMS

¹⁰ Sekundär progressive MS, Englisch: Secondary progressive MS, kurz SPMS

¹¹ Primär progrediente MS, Englisch: Primary progressive MS, kurz PPMS

Die Art des Erstsymptoms ist abhängig vom Erkrankungsalter: Während bei unter 30-Jährigen vor allem Sensibilitätsstörungen beobachtet werden, nimmt bei über 30-Jährigen der Anteil mit motorischen Ausfällen deutlich zu. Im Verlauf kommt es weiterhin zu zerebellären, autonomen und psychischen Symptomen wie Blasenstörungen, Depression oder vermehrter Erschöpfbarkeit („Fatigue“).

1.1.4. Diagnostik

Die Diagnose der MS wird mittels klinischer und paraklinischer Befunde gestellt. Bei bestehendem Verdacht sind vor allem Anamnese und eine gründliche neurologische Untersuchung unverzichtbar. Sollte sich dieser Verdacht klinisch erhärten, kann durch weiterführende Diagnostik die Diagnose gemäß der aktuellen McDonald Kriterien gestellt werden. (Thompson, Banwell, et al., 2018)

Seit 2017 beruft man sich auf die revidierten Diagnosekriterien nach McDonald et al. (s. Tabelle 1.1.). Diese wurden erstmalig 2001 formuliert und unterlagen drei Revisionen. Der Schwerpunkt liegt hier auf der Verwendung des MRT¹²s zur Diagnosesicherung. Während in der Revision von 2010 zunächst die Liquordiagnostik in den Hintergrund rückte, ist diese 2017 erneut in die Diagnosekriterien in Form von OKBs aufgenommen worden. (Polman et al., 2011)

Es gilt das Prinzip der räumlichen und zeitlichen Dissemination, welches mittels entsprechender klinischer Präsentation, Nachweis entsprechender Läsionen in der MRT, und typischem Liquorbefund erfüllt werden kann.

Örtliche Dissemination ist bei ≥ 2 T2 Läsionen im MRT in 2 von 4 Regionen (juxtakortikal, infratentoriell, periventrikulär, spinal) oder durch zwei Syndrome, welche klinisch zwei verschiedenen Lokalisationen im ZNS zuzuordnen sind, erfüllt. Die zeitliche Dissemination ist entweder durch den Nachweis mindestens einer neuen MS typischen Läsion in einem Follow-up-MRT, das gleichzeitige Vorhandensein von kontrastmittelaufnehmenden und nicht-kontrastmittelaufnehmenden Läsionen in der spinalen oder zerebralen MRT, zwei klinische Schübe, oder neuerdings mittels Nachweis von OKBs im Liquor erfüllt.

¹² Magnetresonanztomographie, kurz MRT

Essenziell für die Diagnose ist weiterhin, dass zumindest einmalig eine MS typische klinische Symptomatik aufgetreten ist und jegliche Differentialdiagnosen beachtet und ausgeschlossen werden müssen.

Zur Diagnose der PPMS gehört zusätzlich zum Vorliegen einer schubunabhängigen klinischen Krankheitsprogression über ein Jahr das Erfüllen zwei der nachfolgenden drei Bedingungen: der Nachweis mindestens einer T2-hyperintensen Läsion periventrikulär, juxtakortikal oder infratentoriell, der Nachweis von mindestens zwei Läsionen in der sMRT und das Vorliegen von OKBs im Liquor (s. Tabelle 1.1.). (Thompson, Banwell, et al., 2018)

Tabelle 1.1: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (Thompson, Banwell, et al., 2018)

Klinische Präsentation	Zusätzlich benötigte Daten
RRMS	
<p>≥ 2 Schübe + klinisch objektivierbarer Nachweis von ≥ 2 Läsionen</p>	Keine
<p>≥ 2 Schübe + 1 klinisch objektivierbare Läsion</p>	Räumliche Dissemination im MRT oder Nachweis eines Schubes, welcher klinisch einer weiteren Lokalisation zuzuordnen ist.
<p>1 Schub + ≥ 2 klinisch objektivierbare Läsionen</p>	Zeitliche Dissemination im MRT, ein weiteres klinisches Ereignis oder durch liquorspezifische OKBs.
<p>1 Schub + 1 klinisch objektivierbare Läsion</p>	Räumliche und zeitliche Dissemination mittels MRT, Klinik oder Liquorbefund.
PPMS	
Klinische Progression über 1 Jahr	<p>Plus 2/3 Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Räumliche Dissemination in der cMRT - ≥2 Läsionen in der sMRT - Positiver Liquorbefund (OKBs)

1.1.4.1. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie nimmt zur Diagnosestellung und Verlaufskontrolle der MS eine entscheidende Rolle ein. Die MRT ist deutlich sensitiver entzündliche Läsionen nachzuweisen als die klinische Untersuchung, da nur ca. jede 10. MS Läsion mit einer klinischen Symptomatik oder einem nachweisbaren Defizit einhergeht. In der T2 gewichteten Aufnahme stellen sich die Entzündungsherde aufgrund einer erhöhten Wasserakkumulation hyperintens dar. Mittels der sogenannten FLAIR-Technik¹³, die zu einer Kontrasterhöhung der Entzündungsareale gegenüber dem gesunden Mark führt, können bereits kleinste Läsionen dargestellt werden. Durch die intravenöse Gabe von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln kann zwischen aktiven und inaktiven Läsionen unterschieden werden. Die Kontrastmittelaufnahme ist bedingt durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke, welche bei neuen Läsionen initial oft homogen erscheint, im weiteren Verlauf randständig betont bleibt und schließlich nach 3-5 Wochen verschwindet (Gaitan et al., 2011).

1.1.4.2. Liquordiagnostik

Die Liquordiagnostik gehört seit der neuesten Revision von 2017 wieder zu den im Rahmen der Diagnosesicherung empfohlenen Untersuchungen bei MS. Sie spielt insbesondere eine Rolle Differentialdiagnosen auszuschließen und die zeitliche Dissemination der Erkrankung nachzuweisen.

In der MS Diagnostik wird im Liquor meist qualitativ und quantitativ abnormales IgG meist im Routinelabor gemessen: Qualitativ über den Nachweis von OKBs, quantitativ z.B. mit Hilfe des IgG-Index oder dem Schema nach Reiber.

Der Nachweis von sogenannten oligoklonalen IgG Banden im Liquor erfolgt mithilfe der isoelektrischen Fokussierung. Im direkten Vergleich der OKBs im Serum und Liquor spricht man von einem positiven Befund, wenn zwei oder mehr IgG Banden im Liquor aber nicht im Serum finden (Link & Huang, 2006). Da OKBs jedoch auch bei einer Vielzahl weiterer neurologischer Erkrankungen

¹³ Fluid attenuate inversion recovery

gefunden werden, besitzen sie trotz einer sehr guten Sensitivität eine nur geringe Spezifität (Awad et al., 2010; Reiber et al., 1998).

In 50-60% der Fälle ist bei MS-Patienten auch der IgG-Index erhöht. Dieser wird definiert durch den Liquor-Serum-Quotienten von IgG geteilt durch den Liquor-Serum-Quotienten des Albumins und gilt als Marker für eine intrathekale Bildung der Immunglobuline. Die Konzentration der Immunglobuline wird hierbei mittels Nephelometrie gemessen. Ab einem Wert von 0,7 gilt der IgG Index als pathologisch.

Die intrathekale Immunglobulin-Synthese kann auch nach dem Reiber Schema ermittelt werden, welches einer graphischen Gegenüberstellung der Liquor-Serum-Quotienten der Immunglobuline und des Albumins entspricht (Reiber et al., 1998).

Auch der Nachweis einer IgA¹⁴- und IgM¹⁵-Synthese im Liquor und die Bildung der dazugehörigen Indices gehört in den meisten Kliniken zum Routinelabor.

Standardparameter wie Albumingehalt und Zellzahl sind normal bis geringfügig erhöht und dienen in erster Linie dem Ausschluss anderer Diagnosen

¹⁴ Immunglobulin A, kurz IgA

¹⁵ Immunglobulin M, kurz IgM

1.1.5. Therapie

Bis dato gibt es keine kausale Therapie der Multiplen Sklerose. Dennoch stehen dem behandelnden Arzt eine Bandbreite an Medikamenten zur Verfügung, um den Schüben und einer im MRT nachweisbaren entzündlichen Aktivität entgegenzuwirken. Dank der intensiven Forschung nimmt die Anzahl zugelassener Medikamente ständig zu.

Das Therapieschema eines Patienten mit Multipler Sklerose setzt sich aus drei Teilbereichen zusammen:

- **Schubtherapie**

Ziel der Schubtherapie ist die rasche und möglichst komplette Rückbildung des Krankheitsschubs. In der Akuttherapie des Schubes stehen vor allem Glukokortikoide im Vordergrund. Die Therapie sollte innerhalb von vier, bis maximal sechs Wochen nach Schubbeginn eingeleitet werden. Obwohl ihr Wirkmechanismus nicht vollends geklärt ist, weiß man, dass sie sich auf die Bildung von Entzündungsmediatoren, der Aktivierung von Immunzellen und die damit verbundene Ödembildung in der Läsion auswirken. Hierbei ist die Durchführung einer intravenösen oder oralen Hochdosis-Stoßtherapie von täglich 500-1000 mg Methylprednisolon über einen Zeitraum von 3-5 Tagen Standard. Kommt es nach Beendigung der Therapie zu keiner Besserung der Symptomatik, kann zunächst eine Erhöhung der Dosis auf 2000 mg und eine Verlängerung der Therapie, anschließend nach erneuter Therapierefraktärität eine Plasmapherese in Erwägung gezogen werden. (Thompson, Baranzini, et al., 2018)

- **Immunmodulatorische Therapie¹⁶**

Um die Schubrate und einer damit potentiell einhergehenden Behinderung entgegen zu wirken, können eine Reihe von immunmodulatorischen und immunsuppressiven Medikamenten verwendet werden. Neuere Studien haben ergeben, dass sich ein frühzeitiger Therapiebeginn auch positiv auf die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in die sekundäre Progredienz ausüben kann. (Brown et al., 2019)

Hier gibt es in der Regel zwei Gruppen an Medikamenten: Basis- und Eskalationstherapeutika. In einigen Kliniken wird zunächst mit einer Basistherapie begonnen und im Verlauf bei unzureichender Krankheitsprogression eskaliert. In anderen Kliniken wird mit einer hochwirksamen Therapie begonnen und bei Krankheitsstabilität die Medikation auf die schwächere Basistherapie herabgestuft.

- **Basistherapie**

Für die Basistherapie stehen dem behandelnden Arzt vier immunmodulatorische Therapeutika zur Verfügung: Beta-Interferone, Glatirameracetat, Teriflunomid und Dimethylfumarat.

- **Eskalationstherapie:**

Kommt es unter der Basistherapie zu keiner hinreichenden Krankheitssuppression bieten sich folgende Immunsuppressiva und Immunspezifika als Eskalationstherapeutika: Cladribin, Fingolimod, Natalizumab, Alemtuzumab und Ocrelizumab. Eine weitere Option ist die off-label Verwendung von Rituximab. (Thompson, Baranzini, et al., 2018)

¹⁶ Immunmodulatorische Therapie, kurz IMT

1.2. Zielsetzung der Dissertation

1.2.1. Die Suche nach prädiktiven Biomarkern

Da der Verlauf dieser chronischen Erkrankung höchst variabel ist und der behandelnde Arzt zunächst keine genaue Angabe über den individuellen Krankheitsverlauf geben kann, stellen sich einem MS-Patienten nach Erstdiagnose viele Fragen hinsichtlich der Prognose. Diese Ungewissheit führt nicht nur beim Patienten zu einer enormen psychischen Belastung, sondern auch der Arzt steht vor der schwierigen Entscheidung, ob sich ein abwartendes Verhalten, eine frühzeitige immunmodulatorische Therapie, oder gar eine hochaktive Immuntherapie empfiehlt.

Aus diesem Grund wäre es höchst erstrebenswert, Biomarker zu identifizieren, welche den behandelnden Arzt bei der Einschätzung der Prognose des Patienten bei Erstdiagnose und bei der Entscheidungsfindung der adäquaten Therapie unterstützen.

Viele Liquor- und MRT-Parameter stehen in Diskussion mit einer früheren Krankheitsprogression assoziiert zu sein: OKBs im Liquor, ein erhöhter IgG-Index und eine hohe Läsionslast im initialen MRT scheinen mit einem höheren Konversionsrisiko zu MS bei klinisch isoliertem Syndrom einherzugehen. (Dobson et al., 2013; Kuhle et al., 2015; Tintore et al., 2015; Tintore et al., 2008)

Des Weiteren wurde in einer Studie gezeigt, dass ein erhöhter Albuminquotient bei Erstmanifestation einer MS mit einer rapideren zerebralen Atrophie und einem daraus folgenden Anstieg des Behinderungsgrades einhergeht (Uher et al., 2015).

Auch eine Immunglobulin M Synthese könnte prognostischen Wert besitzen. IgM oligoklonale Banden scheinen mit einem früheren zweiten Schub assoziiert zu sein (Ferraro et al., 2013) und auch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen intrathekalem IgM und MRT-Progress (Durante et al., 2012). In einer zweiten Studie wurde dies jedoch widerlegt. Hier erkannte man keine Assoziation zwischen intrathekalem IgM und einem früheren zweiten Schub (Schneider et al., 2007).

Weitere Liquorparameter wie z.B. sCD27, neurofilament light chain¹⁷ oder IgG Subklassen scheinen auch prognostischen Wert hinsichtlich einer potentiellen Krankheitsprogression zu besitzen (Disanto et al., 2015; Hakansson et al., 2017; Kuhle et al., 2016; Norgren et al., 2004; van der Vuurst de Vries et al., 2017).

Bisherigen Studien mangelte es jedoch einerseits an festen Rahmenbedingungen, wie streng definierten Follow-up-Zeiträumen oder einer möglichst geringen Zeitspanne zwischen Erstmanifestation und Liquorpunktion, andererseits wurde der Therapiestatus der Patienten als möglicher Confounder nicht explizit beachtet.

Aus diesem Grund widmet sich diese Arbeit der Suche nach potentiellen prädiktiven Biomarkern in Blut oder Liquor von Patienten mit Erstmanifestation einer MS oder einem klinisch isolierten Syndrom, unter Berücksichtigung des jeweiligen Therapiestatus. Ein solcher Marker könnte somit bei eventuellen Therapieentscheidungen adjuvant genutzt werden und dem Arzt dazu dienen, dem Patienten eine prognostische Aussage über den individuellen Krankheitsverlauf zu geben.

Hierbei sind sowohl immunologische als auch neurodegenerative Parameter miteinbezogen worden.

Die Verwendung der Magnetresonanztomographie als Verlaufsparemeter gewährleistet im Vergleich zu klinisch ermittelten Variablen eine hohe Objektivität.

¹⁷ Zu Deutsch: Neurofilament leichte Kette, kurz NFL

1.2.2. Intrathekale Bildung von Immunglobulinen

Immunglobuline sind globuläre Proteine, welche von ausdifferenzierten B-Zellen, den sogenannten Plasmazellen, als Reaktion auf Antigenkontakt hergestellt werden und somit dem adaptiven humoralen Immunsystem zuzuordnen sind. Man unterscheidet zwischen fünf verschiedenen Isotypen: IgG, IgA, IgM, IgE¹⁸ und IgD.¹⁹

Diese Proteine liegen in der beta-Faltblattstrukturform vor und bestehen aus kurzen L-Ketten und langen H-Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander in Verbindung stehen. Sie besitzen einen konstanten Teil (Fc) und zwei variable Regionen (Fab). (Rassow et al., 2008)

Für diese Studie waren vor allem IgG, IgM und IgA von Bedeutung: IgG bildet den größten Anteil der Immunglobuline und dient der Abwehr von bakteriellen, viralen und parasitären Erregern. 10-15 % der Immunglobuline sind IgA. Dieses wird primär in Sekreten gebildet und dient der Abwehr von Bakterien, Viren und der Neutralisation von Toxinen. IgM interagiert vor allem mit dem Komplementsystem und dient der Toxin-Neutralisation. (Guder & Nolte, 2009)

1.2.3. Distribution der Immunglobulin G Subklassen im Liquor

Immunglobulin G ist mit einem Anteil von 75 % an allen Antikörpern im Blut der häufigste Vertreter und lässt sich aufgrund von Unterschieden im Aufbau der schweren Kette in 4 Subklassen unterteilen. IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. (Rassow et al., 2008)

Da die vier Subklassen sich vor allem in den Regionen unterscheiden, die für eine Bindung an den Komplementfaktor C1q und den Fc-Rezeptor relevant sind, unterscheiden sie sich primär in ihrer Fähigkeit Fc-Rezeptor tragende Zellen und das Komplementsystem zu aktivieren und in ihrer Fc-Rezeptor-abhängigen Plazentagängigkeit. Aus diesem Grund führt eine unterschiedliche Verteilung dieser Subklassen zu einer unterschiedlichen Suszeptibilität gegenüber bestimmten Erkrankungen. (Vidarsson et al., 2014)

¹⁸ Immunglobulin E, kurz IgE

¹⁹ Immunglobulin D, kurz IgD

IgG1 macht den größten Anteil unter den vier Klassen aus und wird vor allem als Reaktion auf lösliche und membrangebundene Proteine gebildet (Ferrante et al., 1990).

Bakterielle Kapselantigene triggern die Bildung von IgG2, folglich führt ein Mangel an IgG2 zu wiederkehrenden und chronischen Infekten mit bekapselten Erregern (Kuijpers et al., 1992).

Virale Infekte hingegen führen vor allem zu einer IgG3 vermittelten Reaktion (Ferrante et al., 1990).

IgG4 scheinen gemeinsam mit IgE bei allergischen Reaktionen eine große Relevanz zu besitzen: Bei längerer Exposition wird diese Subklasse gebildet und führt meist zu einer Minderung allergischer Symptome (Aalberse et al., 2009).

Wie bereits erwähnt, findet sich bei der Mehrzahl der MS Patienten eine intrathekale IgG Synthese. Auch in ihrer Subklassendistribution scheinen sich diese von gesunden Kontrollen zu unterscheiden: In Studien konnte man nachweisen, dass an MS Erkrankte einen höheren Anteil an IgG1 und IgG3 am gesamt IgG im Liquor besitzen. (Di Pauli et al., 2010; Greve et al., 2001)

1.2.4. Lösliche Variante des CD27-Oberflächenmoleküls

CD27 ist ein Oberflächenmolekül, welches zur TNF Rezeptorfamilie gehört und auf B- und T-Zellen zu finden ist (Goodwin et al., 1993).

CD27 spielt eine Rolle in der Differenzierung von B-Zellen. Nach Bindung an seinen Liganden wird die Entwicklung der B-Zellen zu Plasmazellen gestoppt und zu Memoryzellen initiiert (Raman et al., 2003).

Nach Aktivierung von T-Zellen via dem TCR/CD3 Signalweg, kommt es sowohl zu einer deutlich erhöhten Oberflächenexpression von CD27, als auch zu einer Zunahme seiner löslichen 32 kD Form (sCD27) (Hintzen, de Jong, et al., 1991). Der Marker sCD27 kann in Körperflüssigkeiten wie Urin, Plasma und Liquor nachgewiesen werden. Bei Patienten mit MS wurden höhere Konzentrationen der löslichen Variante entdeckt (Hintzen, van Lier, et al., 1991). Studien zeigten eine Assoziation zwischen hohen Spiegeln des Moleküls und einer Konversion von CIS zu MS (van der Vuurst de Vries et al., 2017). Außerdem wurde bei PPMS-Patienten

eine deutliche Assoziation zwischen Menge an sCD27 und intrathekaler Entzündungsaktivität nachgewiesen (Komori et al., 2015).

1.2.5. Die leichte Kette des Neurofilaments

Neurofilamente bilden die Intermediärfilamente der Neurone und sind somit ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts. Sie setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen: NF-L²⁰ (leichte Kette), NF-M²¹ (mittlere Kette) und NF-H²² (schwere Kette). (Lee & Cleveland, 1996)

Sowohl für NF-H als auch für NF-L wurden bei MS Patienten, als Zeichen für Axonschäden und Neurodegeneration, erhöhte Werte gemessen, wobei NF-L als besserer Biomarker gewertet wird. (Disanto et al., 2015; Hakansson et al., 2017; Kuhle et al., 2016; Kuhle et al., 2013; Norgren et al., 2004)

In einer aktuellen Studie zeigte sich außerdem eine Assoziation zwischen erhöhten NF-L-Konzentrationen im Liquor und Krankheitsaktivität bei Patienten mit CIS und RRMS (Hakansson et al., 2017). Weiterhin erkannte man eine höhere Konversionsrate zu einer MS nach einem klinisch-isoliertem Syndrom bei Patienten mit hohen NF-L Werten (Martinez et al., 2015). Auch bereits erhöhte Werte von NF-L im Serum scheinen laut einer schwedischen Studie mit dem Schweregrad der Erkrankung im MRT zu korrelieren. Hierbei wurde eine starke Korrelation zwischen den Werten von Liquor und Serum nachgewiesen (Kuhle et al., 2016).

²⁰ Neurofilament light chain, übersetzt Neurofilament leichte Kette, kurz NF-L

²¹ Neurofilament medium chain, übersetzt Neurofilament mittlere Kette, kurz NF-M

²² Neurofilament heavy chain, übersetzt Neurofilament schwere Kette, kurz NF-H

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Daten aus Liquor und Serum von 149 Patienten mit Erstmanifestation einer Multiplen Sklerose oder eines Klinisch isolierten Syndroms wurden nach potentiellen Biomarkern, die mit einer frühen Krankheitsaktivität im Verlauf assoziiert sind, erhoben. Hierfür wurden kraniale MRT-Datensätze des Patientenkollektivs retrospektiv auf eine eventuelle Krankheitsaktivität innerhalb des ersten Jahres nach Liquorpunktion ausgewertet, wobei eine Krankheitsaktivität durch eine neue T2 hyperintense und/oder eine Gadolinium-aufnehmende²³ Läsion definiert wurde. Als Baseline MRT diente ein cMRT mit standardisierten Sequenzen, welche innerhalb der ersten drei Monate nach Liquorpunktion durchgeführt wurde. Zu diesen Sequenzen zählen: T2 FLAIR transversal, DIR²⁴ sagittal, MPR²⁵ sagittal, T2 ISO²⁶ axial und MPR mit Kontrastmittel sagittal. Diese sind alle in 3D durchgeführt. Die Follow-up-MRTs erfolgten jeweils nach 12 +/- 3 Monaten mit selbigen Sequenzen. Alle MRT Untersuchungen wurden am selben 3-Tesla MRT Philips Scanner durchgeführt.

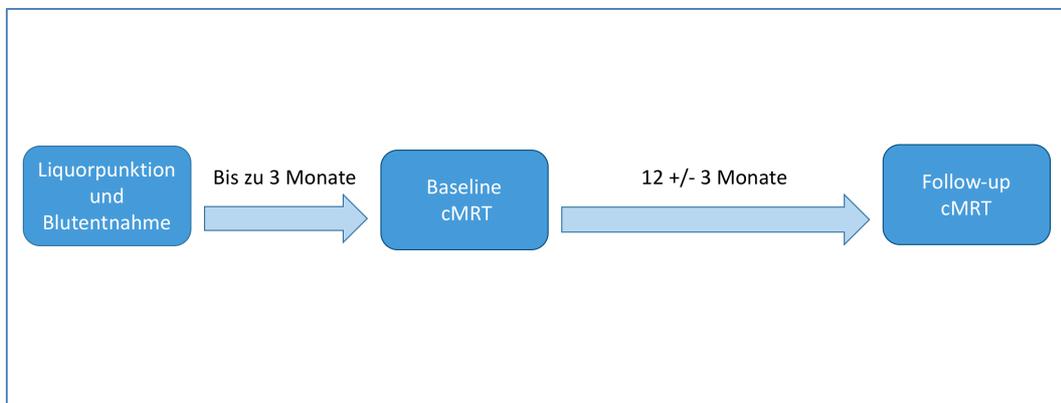


Abbildung. 2.1: Studiendesign

²³ Gadolinium, kurz Gd

²⁴ DIR = Double inversion recovery sequence

²⁵ MPR= multiplanar reconstruction

²⁶ ISO= isointens

Zwischen Erstmanifestation und initialer Liquorpunktion und Blutabnahme lagen höchstens 12 Monate. Der hierbei gewonnene Liquor wurde teilweise mittels Nephelometrie und Durchflusszytometrie direkt untersucht und teilweise eingefroren, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Retrospektiv ausgewertet wurden Liquordaten zu oligoklonalen Banden, IgG/M/A-Indices und der Nachweis von intrathekal gebildeten Immunglobulinen. Von 13 Patienten wurden hierbei extern erhobene Daten aus Arztbriefen entnommen, da diese nicht am Klinikum rechts der Isar gemessen wurden.

Bei diesen extern erhobenen Liquordaten fehlten bei 2 Patienten Informationen zu IgA- und IgM- Konzentrationen im Liquor. Bei weiteren 4 fehlten nur die IgA-Werte.

Aus zum Zeitpunkt der Erstmanifestation gewonnenem und bei -80 °C asserviertem Liquor, wurde von 84 Patienten jeweils ein Aliquot mit insgesamt 600 µl²⁷ für diese Studie erneut aufgetaut und mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay²⁸ und Immunnephelometrie untersucht.

Bei 61 dieser 84 Patienten waren ausreichende Mengen an asservierten Serumproben vorhanden, sodass eine nephelometrische Untersuchung durchgeführt werden konnte. Somit konnten anschließend Liquor-Serum-Quotienten gebildet werden.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München geprüft und genehmigt.

²⁷ µl= Mikroliter

²⁸ Enzyme-linked Immunosorbent Assay, kurz ELISA

2.2. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasst insgesamt 149 Patienten, welche nach den folgenden Einschlusskriterien ausgewählt wurden:

- Erstes klinisches Event mit Hinweis auf Multiple Sklerose innerhalb 12 Monate vor Liquorpunktion.
- Keine immunmodulatorische Therapie vor Liquorpunktion.
- Mindestens ein cMRT mit oben genannten Sequenzen 1-3 Monate nach Liquorpunktion (Baseline cMRT).
- Mindestens ein Follow-up-MRT mit selbigen Sequenzen 12 +/- 3 Monate nach Baseline cMRT.

Von den 149 Patienten erhielten 52 keine immunmodulatorische Therapie innerhalb der ersten 12 Monate nach Baseline cMRT bzw. dauerte diese nicht länger als 6 Monate und bildeten somit die IMT- Gruppe. Von den 97 IMT+ Patienten erhielten 63 Betainterferone, 28 Glatirameracetat, 3 Natalizumab, 2 Dimethylfumarat und einer Teriflunomid. IMT- und IMT+ Patienten waren vergleichbar hinsichtlich Alter, Geschlechtsverteilung und Zeit zwischen Erstmanifestation und baseline cMRT (s. Tabelle 2.1.).

109 der 149 Patienten erhielten keine Glucokortikoid Therapie innerhalb von 30 Tagen vor Liquorentnahme.

Bei insgesamt 81 Patienten waren innerhalb des Beobachtungszeitraums neue Läsionen im cMRT nachweisbar, 68 zeigten einen stabilen Befund.

Weitere Informationen zu der Patientenkohorte ist der Tabelle 2.1. zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Übersicht über die untersuchte Patientenkohorte (Klein et al., 2019)

	Gesamtkohorte	IMT-	IMT +
Demographische Daten			
Patienten [n]	149	52	97
Frauen [n (%)]	101 (68%)	32 (62%)	69 (71%)
Alter [Median (Range)]	33 (18-55)	33,5 (19-52)	33 (18-55)
Zeit EM - cMRT [d (Range)]	67 (1-345)	64,5 (1-230)	67 (1-345)
cMRT Progression [n (%)]	81 (54%)	37 (71%)	44 (45%)
cMRT Daten			
Läsionsvolumen [Median (ml) (Range)]	2,106 (0,093-35,872)	1,489 (0,093-26,762)	2,383 (0,140-35,872)
Läsionszahl >9 [n (%)]	93 (62%)	26 (50%)	67 (69%)
Schrankenstörung [n (%)]	40 (27%)	12 (23%)	28 (29%)
Neue T2 Läsionen [Median (Range)]	1 (0-15)	1 (0-8)	0 (1-15)
Liquor Daten			
OKB + [n (%)]	116 (78%)	38 (67%)	78 (80%)
Intrathekales IgG [n (%)]	75 (50%)	25 (48%)	50 (52%)
Intrathekales IgM [n (%)]	20 (14%)	9 (17%)	11 (12%)
Intrathekale IgA [n (%)]	11 (8%)	7 (14%)	4 (4%)
IgG Index [Median (Range)]	0,74 (0,25-3,20)	0,74 (0,41-2,69)	0,74 (0,25-3,20)
IgM Index [Median (Range)]	0,08 (0,00-0,67)	0,08 (0,00-0,67)	0,08 (0,00-0,51)
IgA Index [Median (Range)]	0,27 (0,00-0,80)	0,28 (0,19-0,65)	0,26 (0,00-0,80)
Zellzahl [Median (/µl) (Range)]	7 (0-126)	10 (0-126)	6 (0-46)

Abkürzungen: IMT = Immunmodulatorische Therapie; n = Anzahl; EM = Erstmanifestation

2.3. Retrospektiv ausgewertete Liquordaten

Bei allen Patienten wurde sowohl eine Lumbalpunktion, als auch eine Blutentnahme durchgeführt. Die Proben wurden zum Teil direkt untersucht und zum Teil bei -80 °C eingefroren und gelagert.

In 13 Fällen wurde die Liquorpunktion bereits an einer externen Klinik durchgeführt. Die Daten dieser Patienten wurden aus den jeweiligen Arztbriefen extrahiert. Bei 2 Patienten fehlten Daten zur IgM, bei 6 zur IgA Konzentration in Liquor und Serum.

Von den zum Entnahmekzeitpunkt ermittelten Daten wurden zum Zweck dieser Studie folgende Parameter verwendet:

Konzentrationen von Albumin, IgG, IgA und IgM sowohl im Liquor, als auch im Serum (nephelometrisch bestimmt) sowie der Nachweis von oligoklonalen Banden mittels isoelektrischer Fokussierung.

2.3.1. Berechnung der Immunglobulin Indices

IgG-, IgM- und IgA-Indices wurden mit Hilfe folgender Formel berechnet (Link & Tibbling, 1977):

$$\text{IgX-Index} = \left(\frac{\text{IgX(Liquor)}}{\text{IgX(Serum)}} \right) / \left(\frac{\text{Albumin(Liquor)}}{\text{Albumin(Serum)}} \right)$$

Hierbei werden die Liquor-Serum-Quotienten des jeweiligen Immunglobulins und des Albumins miteinander in Relation gesetzt, um den Einfluss einer eventuellen Störung der Blut-Hirn-Schranke auf die intrathekale Konzentration des Immunglobulins zu eliminieren.

Die jeweiligen Konzentrationen im Liquor und Serum wurden bei den im Klinikum rechts der Isar gewonnenen Proben mit einem Nephelometer der Firma BN prospec Siemens ermittelt.

2.3.2. Nachweis intrathekal produzierter Immunglobuline

Die intrathekale Immunglobulin-Synthese wurde mit Hilfe des Reiberschemas ermittelt. Hierbei werden die Quotienten von Liquor zu Serum der Immunglobuline in Bezug auf den altersabhängigen Albuminquotienten graphisch dargestellt (s. Abbildung 2.2.). Der Albuminquotient dient auch hier als Indikator für den Zustand der Blut-Hirn-Schranke. Bei einer intrathekalen Synthese liegen die Liquor-/Serum-Quotienten der Immunglobuline überproportional über dem des Albumins. (Reiber & Peter, 2001)

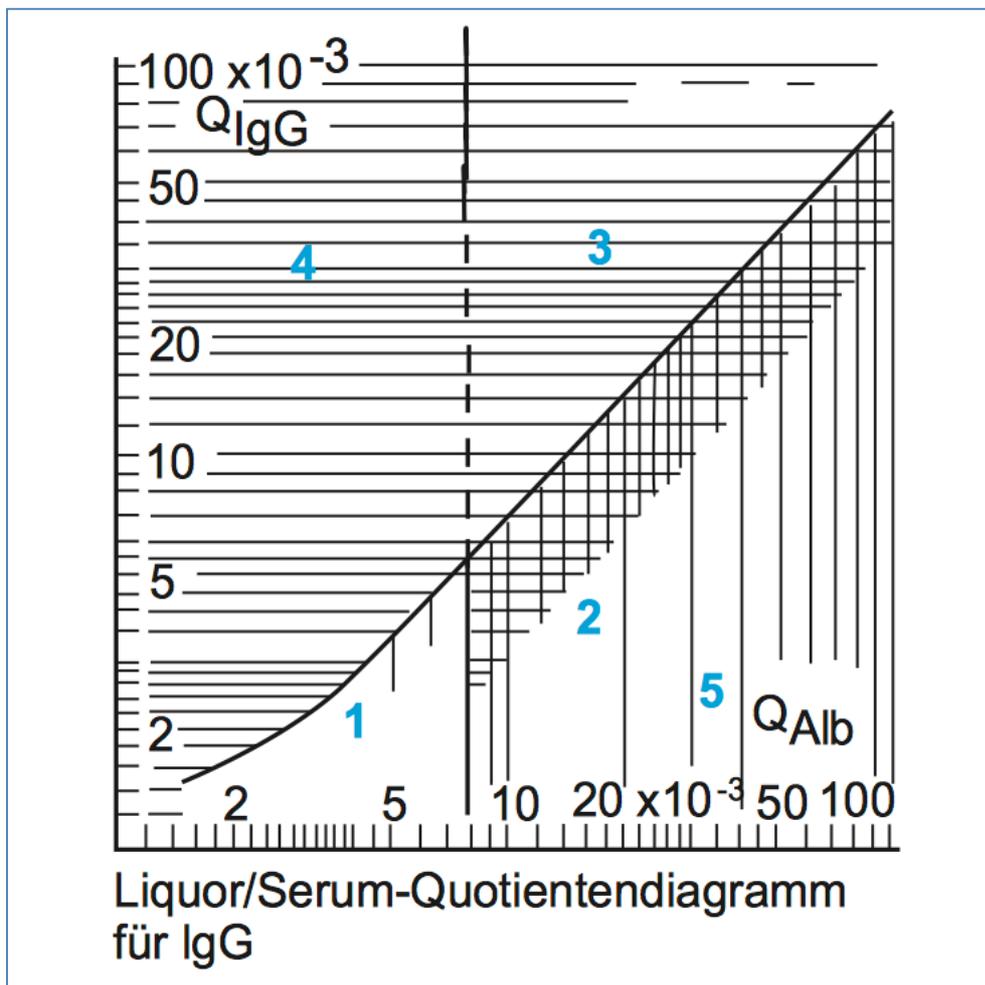


Abbildung. 2.2: Reiber Diagramm zur Darstellung einer intrathekalen IgG-Synthese (Klingelhofer & Berthele, 2015)

I Normbereich

II Q_{Alb} Erhöhung (z.B. Guillain Barré)

III IgG-Synthese + Q_{Alb} Erhöhung (z.B. Neuroborreliose)

IV Intrathekale IgG-Synthese (z.B. bei MS)

V Starke Q_{Alb} Erhöhung

Der entscheidende Unterschied liegt darin, dass der IgG-Index einer linearen Darstellung der intrathekalen IgG-Produktion entspricht, das Reiberschema

wiederum einer Hyperbelfunktion. Ein wesentlicher Vorteil dieses Quotendiagrammes ist die Möglichkeit zwischen einer reinen Schrankenstörung, einer intrathekalen Ig-Synthese oder beidem zu unterscheiden. (Guder & Nolte, 2009)

2.3.3. Isoelektrische Fokussierung der oligoklonalen Banden

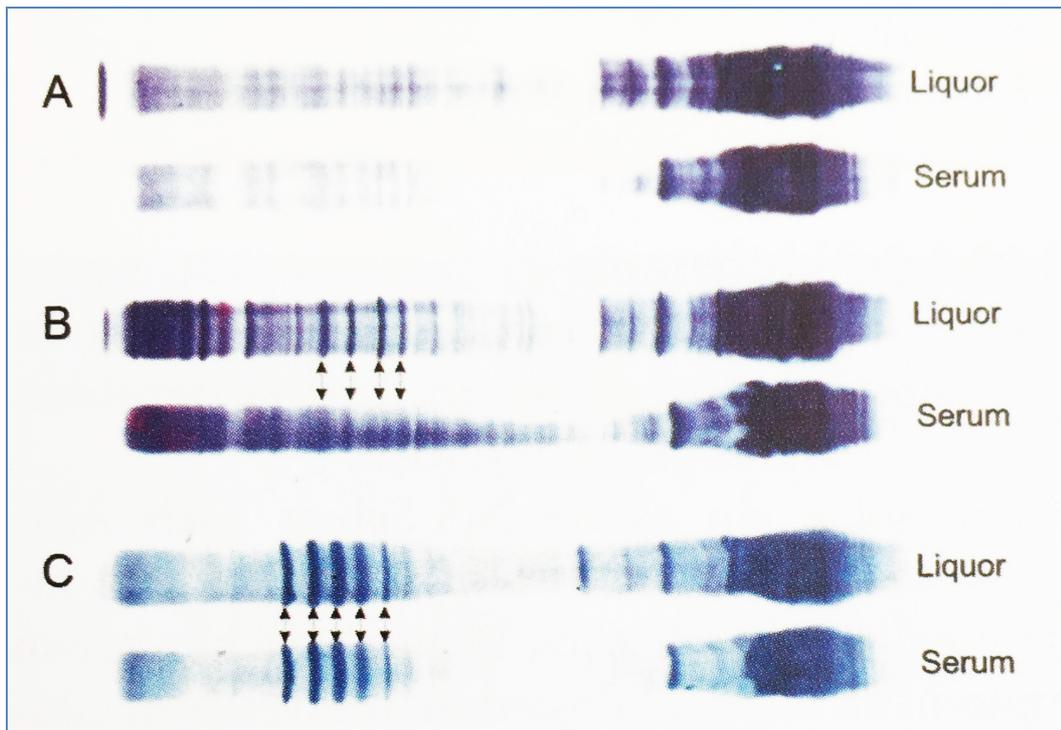


Abbildung 2.3: Oligoklonale Banden (Guder & Nolte, 2009)

A: Normalbefund: Weder im Serum noch im Liquor OKBs.

B: Befundkonstellation bei einem Patienten mit MS: OKBs im Liquor.

C: Unspezifischer Befund: OKBs im Liquor und Serum

Oligoklonale Banden wurden durch isoelektrische Fokussierung detektiert. Hierbei werden Proteine nach einem pH-Gradienten aufgetrennt, anschließend werden die aufgetrennten Banden in Agarose detektiert. Wichtig ist die gleichzeitige Analyse von Serum und Liquor, um nachzuweisen, dass die Banden spezifisch intrathekal vorkommen. Die Banden bestehen aus Immunglobulinen, die von B-Zellen intrathekal produziert werden. Diese treten nicht nur bei MS-Patienten sehr häufig auf, sondern zeigen sich auch bei einer Vielzahl anderer entzündlicher Erkrankungen, wodurch ihre hohe Sensitivität bei gleichzeitig niedriger Spezifität bedingt ist. (Guder & Nolte, 2009) In Abbildung 2.3. kann man ein typisches Befundmuster bei Patienten mit MS im Vergleich zum Normalbefund erkennen.

2.4. Versuche

2.4.1. Geräte und Material

Geräte:

- Wascher: Tecan 96 PW Wascher TECAN, Männedorf, Schweiz
- ELISA Microplate-Reader: Infinite® 200 PRO multimode reader; TECAN, Männedorf, Schweiz
- Plattformschüttler: VxR electronic Vibrax®; IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
- Nephelometer: BN Prospec. Siemens, Erlangen. Deutschland
- Vortexer: Analog Vortex Mixer; VWR international, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten.

ELISA Kits:

- sCD27: Human sCD27 Instant ELISA®; eBioscience, San Diego, CA, USA
- NF-L: NF-light® ELISA; UmanDiagnostics, Umea, Sweden

Antiseren für die Nephelometrie:

- IgG1: Siemens, Erlangen, Deutschland
- IgG3: Siemens, Erlangen, Deutschland

Weitere Lösungen (teilweise in den Kits enthalten):

- Waschpuffer: 1x PBS²⁹ Tween 20 (0,05%)
- Markerenzym: mit Streptavidin konjugierte Meerrettich-Peroxidase
- Chromogenes Substrat: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
- Stopplösung: 2N Schwefelsäure
- Verdünnungsmedium für die Nephelometrie: Kochsalzlösung

2.4.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der folgende Abschnitt bezieht sich auf das Buch „der Experimentator Immunologie“ (Luttmann et al., 2006):

²⁹ PBS = Phosphate buffered saline

Der ELISA dient dem quantitativen Nachweis von Biomolekülen auf der Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Verwendung eines Enzyms als Marker dient dazu, die Antigenkonzentration anhand des kolorimetrisch gemessenen Substratumsatzes zu bestimmen.

Man unterscheidet zwischen kompetitivem, Sandwich- und direktem ELISA.

Bei dem kompetitiven ELISA konkurrieren zwei Antigene um dieselbe Bindungsstelle eines immobilisierten Antikörpers. Das eine Antigen stellt die zu messende Größe dar, das zweite Antigen ist eine markierte Konstante. Die Konzentration des Antikörpers, des markierten Antigens und das Flüssigkeitsvolumen sind bekannt, wodurch die Menge an unmarkiertem Antigen bestimmt werden kann. Je höher diese ist, desto mehr markiertes Antigen wird vom Antikörper verdrängt und desto geringer ist das gemessene Signal.

Bei dem Sandwich-ELISA verwendet man zwei Antikörper. Der eine Antikörper (= Fängerantikörper) ist an einer festen Phase gekoppelt, der zweite mit einem Enzym markiert (= Detektionsantikörper), welche jeweils unterschiedliche Epitope desselben Antigens binden. Je höher die Konzentration des zu messenden Antigens, desto stärker ist das entsprechende Markersignal.

Bei dem direkten ELISA stellt ein Antikörper die zu messende Größe dar, während eine konstante Menge an Antigen an die feste Phase gekoppelt ist. Weiterhin benötigt wird ein markierter Antikörper, der an den zu detektierenden Antikörper bindet. Auch hier fällt das Signal umso stärker aus, je höher die Konzentration der Messgröße ist.

Da jeweils eine Komponente an eine feste Phase gebunden ist, kann ungebundenes Material durch Waschen leicht entfernt werden. Hierfür kann, wie auch in unserem Fall, ein automatischer Wascher verwendet werden, um die Arbeitszeit zu verkürzen.

Nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt die Zugabe eines chromogenen Substrats, wodurch die gekoppelte Enzymreaktion gestartet und ein farbiges Endprodukt gebildet wird. Nach Zugabe einer Stopplösung wird diese

Reaktion beendet und anschließend eine photometrische Messung der optischen Dichte, mit Hilfe eines Microplate-Readers, durchgeführt.

Mittels einer Standardkurve kann die Konzentration der einzelnen Proben berechnet werden. Eine solche Standardkurve erhält man, indem man eine Verdünnungsreihe aus einem Standard ansetzt. Dieser Standard ist im jeweiligen ELISA-Kit in bekannter Konzentration enthalten. Anschließend trägt man die Konzentrationen gegen die ermittelte optische Dichte im Diagramm auf.

Die hier verwendeten ELISAs gehören alle zur Klasse der Sandwich-Assays. Bei allen wurde einmal PBS-Tween 20 (0,05 %) als Waschpuffer, mit Streptavidin konjugiertes Meerrettich-Peroxidase³⁰-Enzym plus das chromogene 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin³¹ zur Farbreaktion und 2N Schwefelsäure als Stopplösung verwendet. Die Kopplung mit Streptavidin dient, in Kombination mit einer Biotinylierung des Detektionsantikörpers, einer Signalverstärkung. Die anschließende Absorptionsmessung der Wells wurde bei allen drei ELISAs bei 450nm³² abgelesen.

Da bei diesen Versuchen Mikrotiter-Platten mit 96 Wells verwendet wurden, die Probenanzahl jedoch mit 84 Patientenproben und mehreren Verdünnungsproben der Standardreihe (diese wurden jeweils doppelt bestimmt) über 96 lag, wurden die Proben auf zwei Platten mit jeweils eigener Standardreihe aufgeteilt.

³⁰ Meerrettich-Peroxidase, English für horseradish peroxidase, kurz HRP

³¹ 3,3',5,5' –Tetramethylbenzidin, kurz TMB

³² Nm = Nanometer

2.4.2.1. sCD27 Instant ELISA® der Firma eBioscience

Zur Messung des löslichen CD27 Rezeptors wurde der sCD27 Instant ELISA® von eBioscience für humanes Serum mit einer Sensitivität von 0,2 U/ml verwendet.

Da in diesem Kit die mitgelieferte Mikrotiterplatte bereits mit einem monoklonalen sCD27 Antikörper, einem biotinylierten Detektionsantikörper und Streptavidin-HRP beschichtet ist, fallen hier einige Schritte weg. Des Weiteren sind auch die Standardverdünnungen der Platte zugefügt worden.

Nach Anleitung des Herstellers wurden zunächst 100 µL destilliertes Wasser zu den Wells gegeben und jeweils 50 µL der Probe hinzu pipettiert. Da dieser ELISA für Serum konzipiert wurde, in der die Konzentration deutlich höher als im Liquor ist, wurden die Liquor Proben unverdünnt eingesetzt, obwohl in der Hersteller-Anleitung von einer 1:25 Verdünnung gesprochen wird. Nach dreistündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler wurden sechs Waschschrte mit 400 µl Waschpuffer pro Well durchgeführt. Hierbei sollte der Puffer zwischen den Schritten für ca. 10-15 Sekunden vor Aspiration ruhen. Im Anschluss wurden 100 µL TMB zu den Wells gegeben und die darauffolgende Farbreaktion nach ca. 10 Minuten durch Zugabe von 100 µL Stopplösung in die Proben beendet.

Schließlich wurde die Absorption abgelesen und die daraus folgende Konzentration bestimmt. Da die Proben auf der Platte bereits 1:2 vorverdünnt waren, wurden die abgelesenen Konzentrationen zusätzlich mit dem Faktor zwei multipliziert.

2.4.2.2. NF-light® ELISA der Firma UmanDiagnostics

Zur Messung der leichten Kette des Neurofilaments wurde der NF-light® ELISA der Firma UmanDiagnostics, mit einer Sensitivität von 32 pg/ml³³, verwendet.

Nach Herstellerprotokoll wurden im ersten Schritt die Liquorproben 1:1, mit einem Probenverdünnungspuffer zu einem Volumen von 210 µl, verdünnt. Anschließend wurde die mit einem Anti NF-light chain monoklonalen Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte drei Mal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach Aspiration des Waschpuffers wurden je 100 µl Standardverdünnungen und Proben in jedes Well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Nun erfolgten drei weitere Waschschritte und eine Zugabe von 100 µl des biotinylierten Detectionsantikörpers zu jeder Probe. Nach weiteren 45 Minuten Inkubationszeit und dreimaligem Waschen wurden 100 µl HRP pro Vertiefung hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgten erneut drei Waschgänge und durch Zugabe von 100 µl TMB pro Probe startete die Enzymreaktion, die nach 15 Minuten durch 50 µl Stopplösung beendet wurde.

Schließlich wurde die Absorption abgelesen und die daraus folgende Konzentration bestimmt.

³³ Pg/ml = Picogramm pro Milliliter

2.4.3. IgG-Subklassen Nephelometrie

Die Nephelometrie dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen in Flüssigkeiten. Hierbei wird zu einer antigenhaltigen Probe ein passendes Antiserum gegeben, wodurch Antigen-Antikörperkomplexe entstehen. Durch eine Laserdiode wird ein Lichtstrahl gebildet, der teilweise an diesen Komplexen gebrochen wird. Dieses Streulicht ist proportional zur Anzahl der Komplexe und folglich auch zur Menge des Antigens in der Probe. Durch eine Kopplung der Antikörper an Latexpartikel wird das Streulichtsignal verstärkt. Mittels verschiedener Verdünnungen eines Standards mit bekannter Antigenkonzentration wird eine Kalibrationskurve erstellt, anhand derer man die Konzentration der unbekanntenen Proben ermitteln kann. (Luttmann et al., 2006)

Um die für die Studie relevanten IgG-Subklassen 1 und 3 zu messen, wurden entsprechende Antiseren der Firma Siemens verwendet. Die verwendeten Kits enthielten zusätzlich die Standardproben, mit der die Kalibrationskurve erstellt wurde.

Insgesamt 84 Liquorproben wurden für diese Studie nephelometrisch analysiert. Jede Probe enthielt 300 µl Liquor. Da die Konzentration der Subklassen im Liquor unterhalb der Nachweisgrenze des Nephelometers lag, musste eine Verdünnung von 1:20 angegeben werden, welche nachträglich herausgerechnet wurde. Tatsächlich verdünnt wurden die Proben 1:2 mit 300 µl Kochsalzlösung, um ein Gesamtvolumen von 600 µl zu erzielen. Folglich mussten die gemessenen Werte durch 10 dividiert werden, um die korrekte Konzentration zu erhalten.

Von diesen 84 Patienten gab es bei insgesamt 61 Patienten ausreichend asserviertes Serum, welches zum Zwecke dieser Studie verwendet werden konnte.

Jede Probe enthielt 50 µl Serum und wurde mit 950 µl Kochsalzlösung verdünnt, wodurch eine Verdünnung von 1:20 erreicht wurde.

Da eine isolierte Betrachtung der Konzentration der Immunglobulin-Subklassen im Liquor keinen Rückschluss auf den Ursprung dieser Proteine zulässt, mussten auch hier die jeweiligen IgG-Indices berechnet werden, um eine sinnvolle Analyse zu gewährleisten. Auch hier erfolgte die Berechnung mit Hilfe der Formel nach Link und Tibbling (s.o.).

2.5. Statistische Auswertungen

Alle Analysen wurden mit Hilfe von R 3.5.0 (The R Foundation for statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt. Der Signifikanzlevel wurde bei 5 % festgelegt.

Die Verteilung der quantitativen Daten wurde durch Median und Range, die der qualitativen Daten durch absolute und relative Wahrscheinlichkeit, beschrieben.

Die Assoziation der Biomarker mit einer cMRT-Aktivität wurden mittels univariable und multivariable logistische Regression bestimmt und per Odds Ratios³⁴ und 95 % Konfidenzintervalle³⁵ beschrieben.

Die multivariable Analyse beinhaltete Geschlecht, IMT, OKBs, IgG, IgM, IgA (als intrathekale Synthese und die jeweiligen Indices), Läsionsvolumen und Läsionszahl. Die Variablenselektion basierte auf dem Informationskriterium nach Aikake. Die daraus folgende prognostische Güte wurde aus der Fläche unterhalb der ROC-Kurve³⁶ (AUC³⁷) ermittelt.

Zwei weitere multivariable Modelle wurden erstellt, um den zusätzlichen Nutzen der CSF³⁸ Parameter, im Vergleich zu demographischen und MRT-Parametern, allein darzustellen: Wir erstellten ein Modell mit Geschlecht, IMT, Läsionsvolumen und Läsionszahl und verglichen dieses mit einem weiteren Modell, in dem weitere CSF-Parameter (OKBs, IgG, IgA und IgM Synthese und Indices) inkludiert wurden. Auch hier wurde die diagnostische Stärke der Modelle mittels AUC quantifiziert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Likelihood-Quotienten-Test bestimmt.

Zur Darstellung der Korrelation zwischen sCD27 und IgG Index nutzten wir den Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Da es sich hier um eine exploratorische Studie handelte, wurde hier nicht für eine Alphafehler-Kumulierung durch multiples Testen korrigiert.

³⁴ Odds Ratio, kurz OR

³⁵ Konfidenzintervall, kurz CI

³⁶ ROC = Receiving Operator Characteristic

³⁷ AUC = Area under the curve

³⁸ CSF = Liquor

3. Ergebnisse

Der gesamte folgende Abschnitt bezieht sich auf die von mir verfasste Publikation der beschriebenen Daten im Journal Neurology - Neuroimmunology and Neuroinflammation (Klein et al., 2019).

3.1. Intrathekale IgG, IgM und IgA Synthese

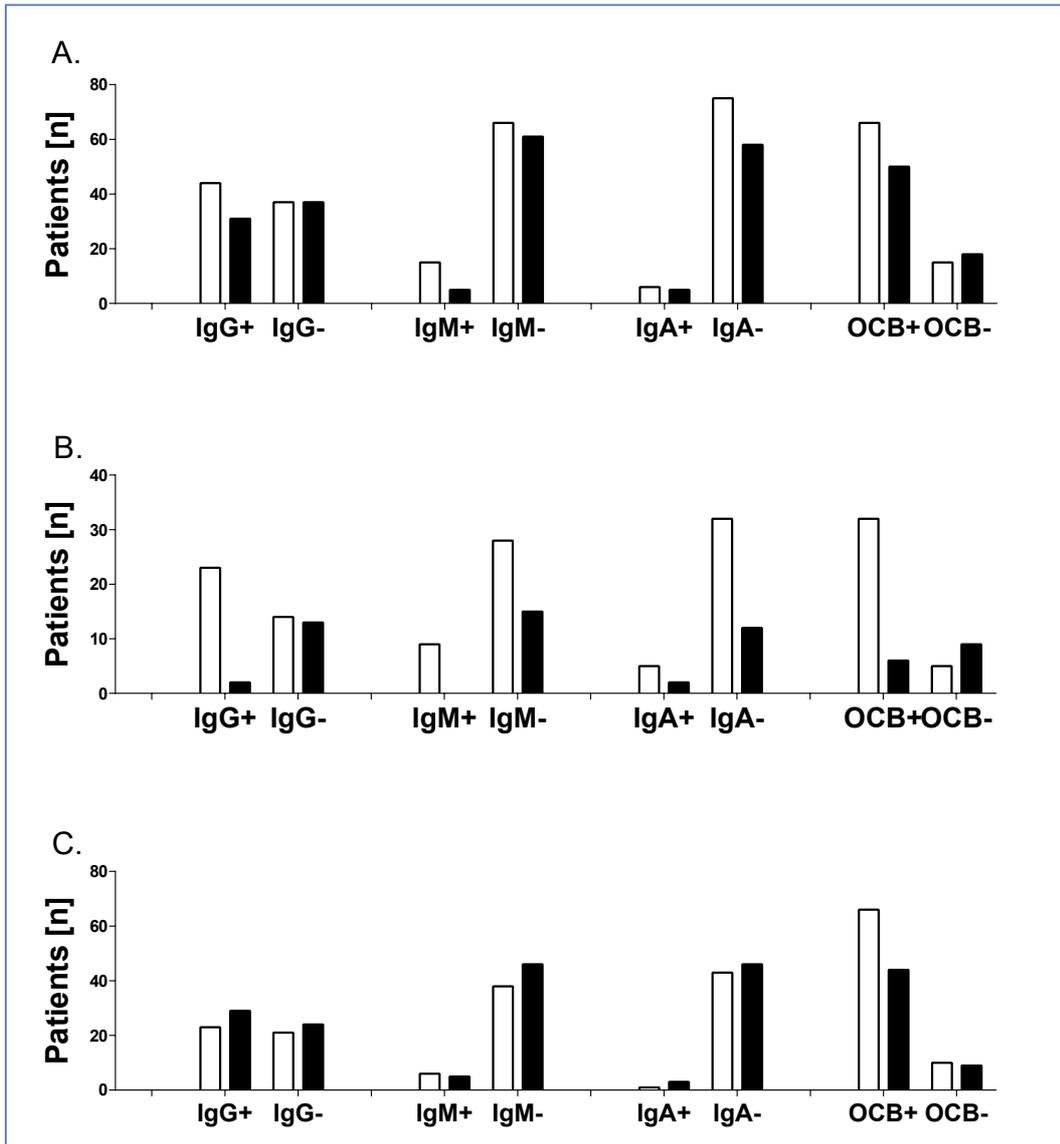


Abbildung 3.1: Intrathekale Immunglobulin Synthese und OKBs im Liquor (Klein et al., 2019)

Die Anzahl der Patienten mit IgG, IgM, IgA und OKBs im Liquor wurden hier präsentiert und hinsichtlich ihrer cMRT-Aktivität nach 12 Monaten verglichen.

A) Gesamtkohorte, B) IMT-, C) IMT+

Weisse Balken= cMRT-Progression. Schwarze Balken= keine cMRT-Progression

Das Ausmaß einer intrathekalen IgG Synthese wurde mittels IgG Index bestimmt. Der IgG Index war mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der cMRT Progression assoziiert (OR 3,441, CI 1,482 bis 9,206; p=0,008) (Tabelle 3.1).

Die Unterteilung der Patientenkohorte nach Therapiestatus führte zu einer Akzentuierung dieses Effektes bei IMT- Patienten (OR 32,021, CI 1,574 bis 651,251; p=0,024). Auch bei IMT+ Patienten führte ein hoher IgG Index zu einem erhöhten Risiko der MRT-Progression, wenn auch dieser Trend weniger ausgeprägt war und keine Signifikanz erreicht wurde (OR 2,090 CI 0,787 bis 5,553, p=0,139) (s. Tabelle 3.1).

Eine Analyse der intrathekalen IgG-Synthese, bestimmt nach Reiber, bestätigte diese Assoziation. Insgesamt wurde bei 75 Patienten (~50 %) eine intrathekale Synthese festgestellt (s. Abbildung 3.1).

Patienten, bei denen eine solche intrathekale Synthese nachgewiesen wurde, hatten ein erhöhtes Risiko eine cMRT-Progression zu erleiden (OR 1,517, CI 0,776 bis 2,995, p=0,225). In der Gruppe der IMT-Patienten war dieser Effekt noch deutlicher zu erkennen, mit einem OR von 11,528 (CI 2,237 bis 59,399, p=0,003). (s. Tabelle 3.2).

Von den 25 nicht therapierten Patienten, die eine intrathekale IgG-Synthese aufwiesen, zeigten 23 (92%) eine cMRT-Aktivität im Follow-up cMRT (s. Abbildung 3.1).

Bei den therapierten Patienten war eine intrathekale IgG-Synthese allerdings nicht mit einer erhöhten cMRT-Aktivität assoziiert (OR 0,742, CI 0,332 bis 1,661, p=0,468).

Auch ein erhöhter IgM-Index führte zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der cMRT-Progression nach 12 Monaten (OR 43,370, CI 1,177 bis 2914,982; $p=0,056$). Die Stratifizierung der Patienten nach IMT-Status zeigte hier erneut eine stärkere Risikoerhöhung bei IMT- (OR korrigiert nach Firth: 5970,034, CI 0,508 bis 70098464,401; $p=0,069$), als bei IMT+ Patienten (OR 5,092, CI 0,065 bis 396,140; $p=0,464$) (s. Tabelle 3.1).

Wiederum verglichen wir auch das Risiko eines MRT Progresses zwischen Patienten mit und ohne IgM Synthese. Eine intrathekale IgM-Synthese nach Reiber wurde bei insgesamt 20 Patienten festgestellt (ca. 14 %) und war mit einer höheren Chance für eine MRT-Progression nach 12 Monaten assoziiert (OR 2,861, CI 0,993 bis 9,572; $p=0,064$). 75 % der Patienten mit einer solchen IgM-Synthese zeigten eine kernspintomographische Progression.

Jeder der 9 IMT-Patienten mit einer intrathekalen IgM Synthese zeigte eine cMRT-Progression (OR korrigiert nach Firth 11,630, CI 0,544 bis 248,843; $p=0,116$) im Vergleich zu nur 6 der 11 IMT+ Patienten (OR 1,533, CI 0,428 bis 5,489, $p=0,511$) (s. Abbildung 3.1 und Tabelle 3.2).

Es zeigte sich eine negative Assoziation des IgA-Indexes mit einer cMRT-Progression bei den IMT+ Patienten (OR 0,662, CI 0,010 bis 44,463, $p=0,847$) und kein Effekt bei den IMT- Patienten (OR 1,035, CI 0,004 bis 254,431, $p=0,99$). Auch in der Gesamtkohorte zeigte sich eher eine negative Assoziation (OR 0,781, CI 0,027 bis 23,249, $p=0,884$) (s. Tabelle 3.1).

Eine intrathekale IgA-Synthese nach Reiber wurde nur in 11 Patienten (8 %) nachgewiesen (s. Abbildung 3.1) und war unabhängig vom Therapiestatus negativ mit dem cMRT-Progressionsrisiko assoziiert, (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.1: Vergleich verschiedener Liquorparameter hinsichtlich ihres cMRT-Progressionsrisikos (Klein et al., 2019)

MS/CIS	Gesamtkohorte	IMT-	IMT+
	MRT+/MRT-	MRT+/MRT-	MRT+/MRT-
IgG Index*	0,81/0,69	0,81/0,53	0,74/0,73
p-Wert	0,008	0,024	0,139
OR	3,441	32,021	2,090
CI	1,482 - 9,206	1,574 - 651,251	0,787 - 5,553
IgM Index*	0,09/0,07	0,1/0,05	0,08/0,08
p-Wert	0,056	0,069* ¹	0,464* ¹
OR	43,370	5970,034* ¹	5,092* ¹
CI	1,177 - 2914,982	0508 - 70098464,40* ¹	0,065 - 396,14* ¹
IgA Index*	0,27/0,26	0,28/0,25	0,26/0,26
p-Wert	0,884	0,990	0,847
OR	0,781	1,035	0,662
CI	0,027 - 23,249	0,004 - 254,431	0,010 - 44,463
IgG1 Index*	0,63/0,62	0,72/0,58	0,6/0,66
p-Wert	0,416	0,132	0,636
OR	1,391	9,876	0,780
CI	0,645 - 3,314	0,503 - 194,019	0,279 - 2,179
IgG1 (mg/l)*	27,85/23,2	35/19,55	25,3/24,4
p-Wert	0,039	0,052	0,338
OR	1,023	1,059	1,012
CI	1,003 - 1,048	1,000 - 1,122	0,988 - 1,036
IgG3 Index*	0,34/0,34	0,39/0,33	0,34/0,39
p-Wert	0,999	0,581	0,385
OR	1,001	2,558	0,141
CI	0,086 - 13,063	0,091 - 71,672	0,002 - 11,719
IgG3 (mg/l)*	0,77/0,68	0,68/0,65	0,8/0,7
p-Wert	0,683	0,397	0,673
OR	1,130	1,601	0,826
CI	0,643 - 2,193	0,539 - 4,758	0,339 - 2,012
sCD27 (U/ml)*²	11,72/9,26	14,55/5,36	11,5/10,12
p-Wert	0,030	0,085	0,200
OR	1,552	2,619	1,335
CI	1,087 - 2,430	0,875 - 7,842	0,858 - 2,075
NFL (pg/ml)*³	1620,84/644,12	1959,55/676,52	1524,98/634,4
p-Wert	0,324	0,425	0,541
OR	1,033	1,047	1,025
CI	0,971 - 1,107	0,936 - 1,170	0,947 - 1,109

* Median, *¹ Korrigiert nach Firth, *² Korrigiert nach Firth um 10 Einheiten, *³ Korrigiert nach Firth um 500 Einheiten

Abkürzungen: IMT = Immunmodulatorische Therapie; MRT = Magnetresonanztomographie; OR = Odds Ratio; CI = Konfidenzintervall; NFL = Neurofilament leichte Kette

In einem weiteren Schritt wurden die IgG-Subklassen 1 und 3 im Liquor einiger Patienten gemessen und die zugehörigen Indices gebildet (s. Tabelle 3.1).

Erhöhte IgG1 Indices gingen mit einer tendenziell erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine cMRT-Progression nach 12 Monaten einher (OR 1,391, CI 0,645 bis 3,314, $p=0,416$). Auch hier war dieser Trend deutlicher bei den IMT- Patienten zu erkennen (OR 9,876, CI 0,503 bis 194,019, $p=0,132$). Bei den IMT+ Patienten zeigte sich eher eine negative Assoziation zwischen IgG1-Index und cMRT-Aktivität (0,780, CI 0,279 bis 2,179, $p=0,636$).

Erhöhte IgG1 Gesamtkonzentrationen im Liquor gingen mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine cMRT-Progression (OR 1,023, CI 1,003 bis 1,048; $p=0,039$) einher. Sowohl bei den IMT- als auch bei den IMT+ Patienten wurde hier keine statistische Signifikanz erreicht.

In der Gesamtkohorte zeigte sich keine Assoziation der IgG3-Indices mit einer cMRT-Progression (OR 1,001, CI 0,086 bis 13,063, $p=0,999$). Eine isolierte Betrachtung der untherapierten Patienten zeigte jedoch eine tendenziell erhöhte Wahrscheinlichkeit einer cMRT-Aktivität nach 12 Monaten bei erhöhten IgG3-Indices (OR 2,558, CI 0,091 bis 71,672, $p=0,581$). Im Vergleich hierzu war bei IMT+ Patienten eher eine negative Assoziation zu verzeichnen (OR 0,141, CI 0,002 bis 11,719, $p=0,385$).

Weiterhin zeigte sich auch eine tendenziell positive Assoziation zwischen IgG3-Konzentrationen der untherapierten Patienten und einer frühen cMRT-Aktivität (OR 1,601, CI 0,539 bis 4,758, $p=0,397$), welche erneut in der Gesamtkohorte weniger stark ausgeprägt war (OR 1,130, CI 0,643 bis 2,193, $p=0,683$) als bei IMT+ Patienten (OR 0,826, CI 0,339 bis 2,012, $p=0,673$).

3.2. Oligoklonale Banden

Tabelle 3.2: Intrathekale Immunglobulin Synthese und OKBs im Liquor (Klein et al., 2019)

MS/CIS	Gesamtkohorte	IMT-	IMT+
	MRT +/-	MRT +/-	MRT +/-
Patienten mit IgG Synthese [n (%)]	44(54%) / 31(46%)	23(62%) / 2(13%)	21(48%) / 29(55%)
p-Wert	0,225	0,003	0,468
OR	1,517	11,528	0,742
CI	0,776 – 2,995	2,237 – 59,399	0,332 – 1,661
p-Wert der Interaktion	0,003		
	MRT +/-	MRT +/-	MRT +/-
Patienten mit IgM Synthese [n (%)]	15(19%) / 5(8%)	9(24%) / 0(0%)	6(14%) / 5(10%)
p-Wert	0,064	0,116*	0,511*
OR	2,861	11,630*	1,533*
CI	0,993 – 9,572	0,544 – 248,843*	0,428 – 5,489*
p-Wert der Interaktion	0,135		
	MRT +/-	MRT +/-	MRT +/-
Patienten mit IgA Synthese [n (%)]	6(7%) / 5(8%)	5(14%) / 2(14%)	1(2%) / 3(6%)
p-Wert	0,516	0,937	0,390
OR	0,648	0,931	0,364
CI	0,171 – 2,496	0,159 – 5,471	0,036 – 3,649
p-Wert der Interaktion	0,527		
	MRT +/-	MRT +/-	MRT +/-
Patienten mit OKBs [n (%)]	66(82%) / 50(74%)	32(86%) / 6(40%)	34(77%) / 44(83%)
p-Wert	0,139	0,002	0,513
OR	1,855	9,327	0,714
CI	0,824 – 4,279	2,296 – 37,890	0,260 – 1,960
p-Wert der Interaktion	0,004		

*Korrigiert nach Firth

Abkürzungen: IMT = Immunmodulatorische Therapie; MRT = Magnetresonanztomographie; OR = Odds Ratio; CI = Konfidenzintervall; OKBs = Oligoklonale Banden

Insgesamt wurden bei 116 Patienten (78 %) OKBs festgestellt (s. Abbildung 3.1).

Das Vorhandensein von liquorspezifischen OKBs scheint mit einer höheren Chance einer früheren cMRT-Aktivität einherzugehen (OR 1,855; CI 0,824 bis 4,279; $p=0,139$) (s. Tabelle 3.2).

In der Gruppe der IMT- Patienten war diese Tendenz noch deutlicher zu erkennen und erreichte statistische Signifikanz (9,327, CI 2,296 bis 37,890; $p=0,002$). Von den 38 Patienten mit positiven OKBs zeigten 32 (84 %) eine cMRT-Progression nach 12 Monaten, im Vergleich zu nur 5 der 14 Patienten (36 %) ohne OKBs (s. Abbildung 3.1).

In der IMT+ Gruppe zeigte sich eine leicht negative Assoziation zwischen Vorliegen von OKBs und cMRT-Aktivität, ohne dass das Signifikanzniveau erreicht wurde (OR 0,714, CI 0,260 bis 1,960, $p=0,513$) (s. Tabelle 3.2).

3.3. NFL und sCD27 im Liquor

Der direkte Vergleich von Patienten mit und ohne cMRT-Aktivität in Hinblick auf deren sCD27-Konzentration im Liquor zeigte, dass erhöhte sCD27-Konzentrationen mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit einer cMRT-Progression einhergehen (OR 1,552, CI 1,087 bis 2,430; $p=0,030$). Derselbe Trend zeigte sich auch in IMT- Patienten (OR 2,619, CI 0,875 bis 7,842; $p=0,085$) und zu einem geringeren Ausmaß auch bei IMT+ Patienten (OR 1,335, CI 0,858 bis 2,075; $p=0,200$).

Interessanterweise korrelierte sCD27 stark mit dem IgG-Index ($r=0,884$, $p=1,916 \times 10^{-20}$)

NFL-Spiegel waren unabhängig von der jeweiligen Subgruppe nur marginal positiv mit einer frühen cMRT-Aktivität assoziiert (s. Tabelle 3.1).

3.4. Multivariable Analyse der Liquorparameter

Im zweiten Schritt führten wir eine multivariable logistische Regression der Liquorvariablen durch, um Parameter zu identifizieren, welche mit einer MRT-Progression assoziiert sind. Aufgrund der geringen Patientenzahlen fokussierten wir uns zunächst auf die Gesamtkohorte und verzichteten auf eine weitere Unterteilung nach Therapiestatus. Weiterhin schlossen wir einige Variablen aus, bei denen zu geringe Probenzahlen vorlagen (sCD27, NFL und IgG-Subklassen). Selektiert wurden IgG-Index, IMT, weibliches Geschlecht, IgM-Index und intrathekale IgA-Synthese (s. Tabelle 3.3).

Höhere IgG-Indices waren mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit für eine MRT-Progression assoziiert (OR 3,144, CI 1,156 bis 8,554; p=0,025). Wie zu erwarten, war auch eine IMT mit einem geringeren Risiko der cMRT-Progression assoziiert (OR 0,249, CI 0,105 bis 0,594; p=0,002).

Auch ein erhöhter IgM-Index führte zu einer höheren Wahrscheinlichkeit einer früheren cMRT-Aktivität (OR 115,834, CI 0,923 bis 14531,160, p=0,054). Die intrathekale IgA-Synthese war tendenziell mit geringerer cMRT-Aktivität assoziiert (OR 0,274, CI 0,058 bis 1,292; p=0,102).

Tabelle 3.3: Multivariable Liquoranalyse (Klein et al., 2019)

	p-Wert	OR	CI
IgG Index	0,025	3,144	1,156 – 8,554
IMT	0,002	0,249	0,105 – 0,594
Geschlecht	0,028	2,506	1,107 – 5,672
IgM Index	0,054	115,834	0,923 – 14531,16
Intrathekale IgA-Synthese	0,102	0,274	0,058 – 1,292

Abkürzungen: OR = Odds Ratio; CI = Konfidenzintervall; IMT = Immunmodulatorische Therapie

Die ROC Analyse führte zu einer AUC von 0,734 ($p < 0,001$), welche den prognostischen Vorteil dieser Parameter unterstreicht (s. Abbildung 3.2).

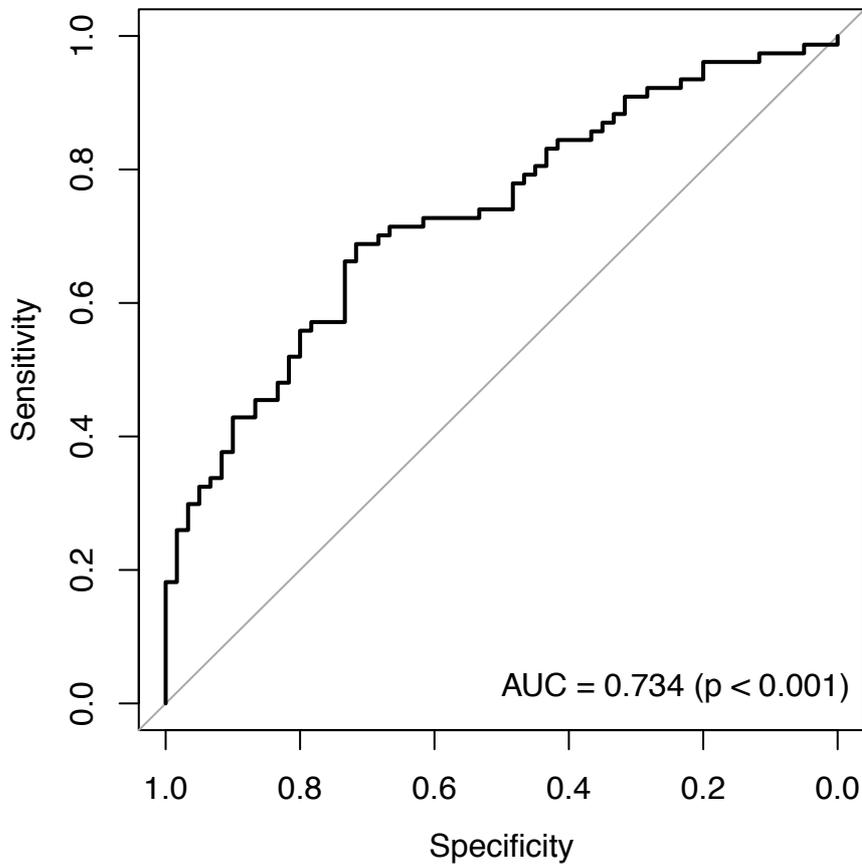


Abbildung 3.2: ROC-Analyse der multivariablen Liquoranalyse (Klein et al., 2019)

Multivariable Analyse potentieller Biomarker in MS/CIS-Patienten führte zu einer Selektion von IgG-Index, IMT, Geschlecht, IgM-Index und intrathekale IgA-Synthese. Die ROC-Analyse führte zu einer AUC von 0,734 ($p < 0,001$).

AUC = Area under the curve

3.5. Prognostischer Nutzen des Liquors versus MRT

Um den zusätzlichen Nutzen der Liquorparameter im Vergleich zu cMRT-Parameter zu verdeutlichen, erstellten wir zwei weitere multivariable Modelle.

Das erste Modell beinhaltete Geschlecht, IMT, Läsionsvolumen und Läsionszahl und führte zu einer AUC von 0,679. Das zweite Modell beinhaltete zusätzlich Liquorparameter wie OKBs, intrathekale IgG-, IgM- und IgA-Synthese, sowie deren Indices und führte zu einem deutlich erhöhten prognostischen Wert der Analyse mit einer AUC von 0,751 ($p=0,025$) (Abbildung 3.3).

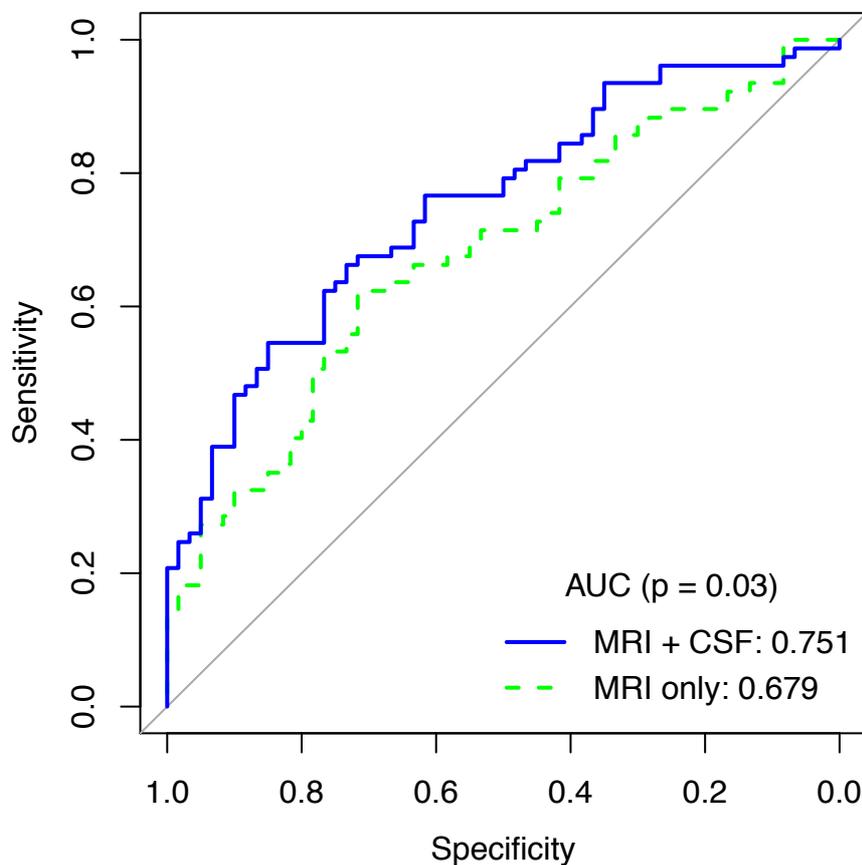


Abbildung 3.3: ROC-Analyse Liquorparameter versus cMRT-Parameter (Klein et al., 2019)

Wir führten zwei multivariable Analysen durch. Das erste Modell stellte eine isolierte Betrachtung von cMRT- und Baseline-Parametern dar, das zweite von cMRT-, Baseline- und Liquorparametern. Die ROC-Analyse führte in der ersten Analyse zu einer AUC von 0,679, in der zweiten zu einer AUC von 0,751 (p -Wert = 0,03)

MRI = cMRT

CSF = Liquor

AUC = Area under the curve

3.6. Risikoskala für cMRT Aktivität

Um das individuelle cMRT Progressionsrisiko eines Patienten zu quantifizieren, erstellten wir eine numerische Risikoskala mit Hilfe der Parameter unseres multivariablen Modells.

Werte eines jeden Faktors wurden Punkte zugeordnet, deren Addition einen kumulativen Wert bildet. Dieser kann dann in die Wahrscheinlichkeit einer cMRT-Progression übersetzt werden (s. Abbildung 3.4.)

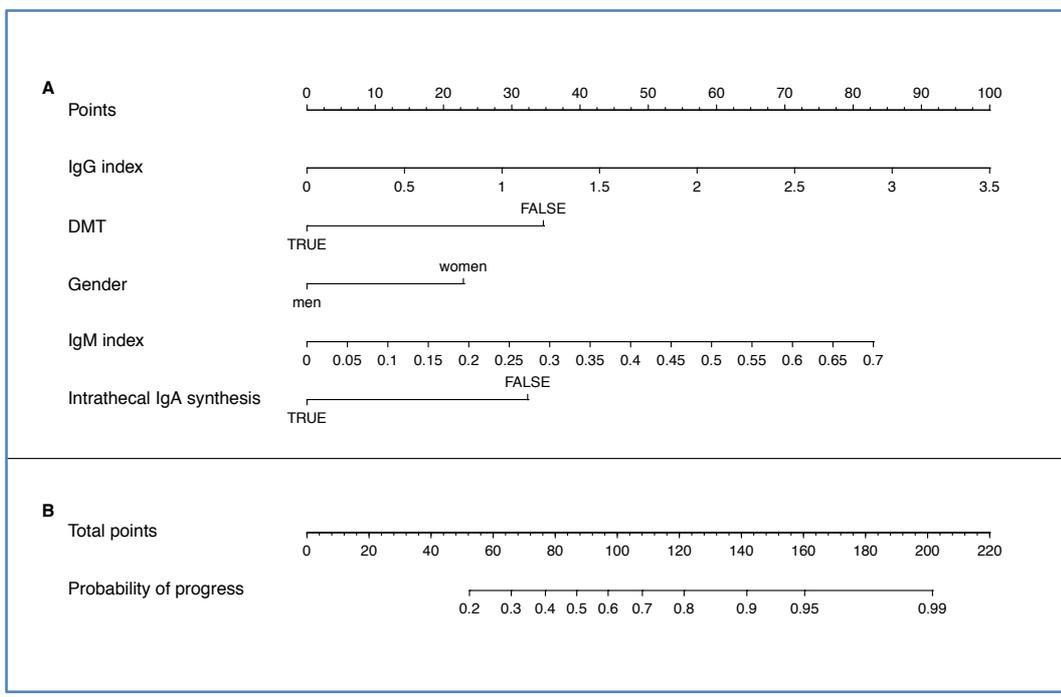


Abbildung 3.4: Risikoskala für cMRT-Aktivität in MS/CIS-Patienten (Klein et al., 2019)

Wir erstellten eine Skala zur Quantifizierung des individuellen Risikos eines Patienten für cMRT-Aktivität im Follow-up-cMRT. Die Addition der einzelnen Punkte (A) ergibt eine Gesamtscore, welcher in die Wahrscheinlichkeit des Progresses übersetzt werden kann (B).

DMT = IMT = Immunmodulatorische Therapie

4. Diskussion

Wie bereits in 1.2. erläutert, ist eine Vorhersage über den individuellen Krankheitsverlauf neu diagnostizierter MS-Patienten bisher nur begrenzt möglich. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Suche nach potentiellen Biomarkern, auf die sich der behandelnde Arzt bei der Frage nach einem eventuellen Therapiebeginn oder der individuellen Prognose des Patienten beziehen kann.

In dieser Studie analysieren wir den prädiktiven Wert verschiedener Liquorparameter in Hinblick auf die cMRT-Aktivität 12 Monate nach Diagnosestellung.

Unsere Analysen zeigten, dass erhöhte Werte von sCD27, IgG1, des IgG-Indexes und potentiell auch des IgM-Indexes bei Diagnosestellung mit einer frühen cMRT-Aktivität innerhalb der nächsten 12 Monate assoziiert sind.

Bei Patienten ohne Immuntherapie sind vor allem sCD27-, IgG1-Konzentrationen im Liquor, OKBs, IgG-Indices und potentiell IgM-Indices mit einer cMRT-Progression assoziiert.

Unsere multivariable Analyse ergab, dass IgG- und IgM-Indices, wie auch eine intrathekale IgA-Synthese, den größten prognostischen Wert der hier untersuchten Liquorparameter besitzen.

Aktuell besitzt die Liquordiagnostik einen nur geringen Stellenwert bei der Multiplen Sklerose und dient primär der Diagnosestellung. Gründe hierfür sind sicher vielfältig, wobei das Fehlen systematischer Studien, welche sich mit dem prognostischen Wert der Liquorparameter auseinandersetzen, sicherlich eine große Rolle spielt.

Bisherige Studien unterschieden nicht zwischen immuntherapierten und nicht immuntherapierten Patienten. In unserer Studie ist ein Einfluss der Therapie auf die cMRT-Aktivität auch in der nur kurzen Follow-up-Periode von 12 Monaten deutlich zu erkennen, was auch mit vielen anderen Studien übereinstimmt. (Comi et al., 2001; Comi et al., 2013; Miller et al., 2007; Wolinsky et al., 2013) Die Stratifizierung der Patienten in Gruppen mit und ohne Therapie dient dazu, den Einfluss dieses Confounders zu minimieren.

Weiterhin wählten wir im Gegensatz zu vielen anderen Studien, in denen vor allem klinische Parameter wie der EDSS³⁹ verwendet wurden, die cMRT als Verlaufparameter. Der EDSS allerdings ist in den unteren Bereichen bis zu einem EDSS von 4 deutlich untersucherabhängig und deshalb starken Schwankungen unterlegen (Goodkin et al., 1992; Meyer-Mooock et al., 2014). Weiterhin verändert sich der EDSS Wert eines Patienten in den ersten Jahren meist nur geringfügig. Diese Einschränkungen gelten auch für die Schubaktivität, die bei heute diagnostizierten Patienten mit 0,3 pro Jahr niedrig ist (Inusah et al., 2010). Da im Durchschnitt zehn neue Entzündungsherde pro klinischem Schub beobachtet werden, ist sie wenig sensitiv zur Erfassung der tatsächlichen entzündlichen Aktivität im Gehirn (Barkhof et al., 1992). Wir nutzten deshalb die cMRT, die eine objektivere und sensitivere Einschätzung der inflammatorischen Krankheitsaktivität ermöglicht. Auch die konsequente Verwendung standardisierter Sequenzen soll die Objektivität der Verlaufsbeurteilung maximieren.

Zur diagnostischen Liquoranalyse bei Verdacht auf MS gehören standardmäßig die Bestimmung von IgG, entweder in Form von OKBs, des IgG-Indexes oder der intrathekalen Synthese nach Reiber. Einige Labore messen zusätzlich noch IgM und IgA im Liquor. Aufgrund der bereits in der Literatur beschriebenen Assoziation von einer Immunglobulin-Synthese mit einer rascheren Krankheitsprogression, entschieden wir uns diese in unsere Analyse aufzunehmen.

Das Vorhandensein von OKBs oder einer intrathekalen IgG- und IgM-Synthese sind bekannte Risikofaktoren für die Konversion eines klinisch isolierten Syndroms in eine klinisch manifeste MS (Dobson et al., 2013; Huss et al., 2018; Kuhle et al., 2015; Tintore et al., 2015).

Hinsichtlich des prognostischen Wertes der Immunglobulin Subklassen ist bisher nur wenig bekannt. Im Liquor von CIS- und MS-Patienten sind erhöhte IgG1-Konzentrationen gemessen worden (Di Pauli et al., 2010; Greve et al., 2001).

Auch wir entdeckten eine Assoziation zwischen IgG-Konzentrationen im Liquor und einer erhöhten cMRT-Aktivität. Der IgG1-Index zeigte zwar eine positive

³⁹ EDSS = Expanded Disability Status Scale

Assoziation zur Krankheitsprogression, konnte allerdings keine statistische Signifikanz erreichen.

Eine aktuelle Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen erhöhten Serum IgG3-Spiegeln und einer früheren Konversion von einem CIS in eine MS (Trend et al., 2018).

Auch hier war in unserer Kohorte ein ähnlicher Trend ohne statistische Signifikanz zu erkennen.

Bei den nephelometrisch untersuchten Liquor-/Serum-Paaren handelte es sich jedoch in unserer Studie um eine kleine Subgruppe mit insgesamt nur geringen Fallzahlen, weshalb eine Bestätigung, mit Hilfe einer größeren Kohorte, von Nöten wäre.

sCD27 und NFL wurden ebenfalls als Biomarker bei der MS beschrieben. Höhere Werte in Liquor und Serum wurden in Vorstudien mit einem rascheren Krankheitsverlauf beschrieben, weshalb wir auch diese in unsere Studie einbezogen. (Arrambide et al., 2016; Sellebjerg et al., 2018; van der Vuurst de Vries et al., 2017; Wong et al., 2018)

Unsere Ergebnisse zu sCD27 bestätigen diese Erkenntnisse mit einem signifikanten Zusammenhang der Konzentrationen mit der cMRT-Aktivität. Die starke Korrelation dieses Biomarkers mit dem IgG-Index implizieren allerdings, dass es sich hier nicht um einen unabhängigen Parameter handelt, sondern Ausdruck der inflammatorischen Aktivität im ZNS ist.

Diese Theorie wurde bereits in der oben erwähnten Studie von Komori et al. thematisiert. Diese Arbeit kam zu der Erkenntnis, dass sCD27 ein guter Marker für intrathekale T-Zell bedingte entzündliche Aktivität sei (Komori et al., 2015).

In unserer Studie zeigte sich zwar ein leicht positiver Trend in der NFL-Analyse, allerdings war dieser nur marginal und erreichte keine Signifikanz. Auch hier könnte die Ursache in den geringen Fallzahlen zu finden sein.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigten wir, dass einige Liquorparameter wie sCD27, IgG1 und der IgG Index sinnvolle Biomarker zur Krankheitseinschätzung darstellen können, insbesondere wenn diese mit anderen Variablen wie Immuntherapie Status und Geschlecht kombiniert werden.

Allerdings muss hier einschränkend angemerkt werden, dass es sich um eine explorative Studie handelte und die Daten in einer auf die identifizierten Parameter fokussierten Folgestudie mit entsprechender Größe validiert werden müssen.

Nach entsprechender Validierung könnte die zukünftige Verwendung eines Risikoscores, wie in Abbildung 3.4., den Arzt in seiner Therapieentscheidung unterstützen. Höhere Scores könnten z.B. eine frühere Therapieeskalation rechtfertigen.

Da einige dieser Parameter wie der IgG- und IgM-Index oftmals standardmäßig untersucht werden, wäre es ein Leichtes, diese auch in kleineren Häusern mit begrenzten finanziellen und diagnostischen Möglichkeiten im klinischen Alltag zu verwenden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung. 2.1: Studiendesign.....	20
Abbildung. 2.2: Reiber Diagramm zur Darstellung einer intrathekalen IgG-Synthese.....	25
Abbildung 2.3: Oligoklonale Banden	26
Abbildung 3.1: Intrathekale Immunglobulin Synthese und OKBs im Liquor.....	34
Abbildung 3.2: ROC-Analyse der multivariablen Liquoranalyse	42
Abbildung 3.3: ROC-Analyse Liquorparameter versus cMRT-Parameter.....	43
Abbildung 3.4: Risikoskala für cMRT-Aktivität in MS/CIS-Patienten.....	44

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose	10
Tabelle 2.1: Übersicht über die untersuchte Patientenkohorte	23
Tabelle 3.1: Vergleich verschiedener Liquorparameter hinsichtlich ihres cMRT-Progressionsrisikos	37
Tabelle 3.2: Intrathekale Immunglobulin Synthese und OKBs im Liquor.....	39
Tabelle 3.3: Multivariable Liquoranalyse.....	41

8. Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J., & Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, *39*(4), 469-477. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x
- Arrambide, G., Espejo, C., Eixarch, H., Villar, L. M., Alvarez-Cermeno, J. C., Picon, C., . . . Tintore, M. (2016). Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology*, *87*(11), 1076-1084. doi:10.1212/WNL.0000000000003085
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, *61*(4), 288-299. doi:10.1002/ana.21117
- Ascherio, A., Munger, K. L., Lennette, E. T., Spiegelman, D., Hernan, M. A., Olek, M. J., . . . Hunter, D. J. (2001). Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*, *286*(24), 3083-3088. doi:10.1001/jama.286.24.3083
- Awad, A., Hemmer, B., Hartung, H. P., Kieseier, B., Bennett, J. L., & Stuve, O. (2010). Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, *219*(1-2), 1-7. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.09.002
- Barkhof, F., Scheltens, P., Frequin, S. T., Nauta, J. J., Tas, M. W., Valk, J., & Hommes, O. R. (1992). Relapsing-remitting multiple sclerosis: sequential enhanced MR imaging vs clinical findings in determining disease activity. *AJR Am J Roentgenol*, *159*(5), 1041-1047. doi:10.2214/ajr.159.5.1414773
- Brown, J. W. L., Coles, A., Horakova, D., Havrdova, E., Izquierdo, G., Prat, A., . . . Group, M. S. S. (2019). Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA*, *321*(2), 175-187. doi:10.1001/jama.2018.20588
- Burnard, S., Lechner-Scott, J., & Scott, R. J. (2017). EBV and MS: Major cause, minor contribution or red-herring? *Mult Scler Relat Disord*, *16*, 24-30. doi:10.1016/j.msard.2017.06.002
- Cannella, B., & Raine, C. S. (1995). The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, *37*(4), 424-435. doi:10.1002/ana.410370404
- Cepok, S., Rosche, B., Grummel, V., Vogel, F., Zhou, D., Sayn, J., . . . Hemmer, B. (2005). Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain*, *128*(Pt 7), 1667-1676. doi:10.1093/brain/awh486
- Chang, A., Tourtellotte, W. W., Rudick, R., & Trapp, B. D. (2002). Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, *346*(3), 165-173. doi:10.1056/NEJMoa010994
- Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernandez, O., . . . Early Treatment of Multiple Sclerosis Study, G. (2001). Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet*, *357*(9268), 1576-1582.
- Comi, G., Martinelli, V., Rodegher, M., Moiola, L., Leocani, L., Bajenaru, O., . . . Filippi, M. (2013). Effects of early treatment with glatiramer acetate in

- patients with clinically isolated syndrome. *Mult Scler*, 19(8), 1074-1083. doi:10.1177/1352458512469695
- Compston, A., & Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. *Lancet*, 359(9313), 1221-1231. doi:10.1016/S0140-6736(02)08220-X
- Correale, J., & Gaitan, M. I. (2015). Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection. *Acta Neurol Scand Suppl*, 132(199), 46-55. doi:10.1111/ane.12431
- Daltrozzo, T., Hapfelmeier, A., Donnachie, E., Schneider, A., & Hemmer, B. (2018). A Systematic Assessment of Prevalence, Incidence and Regional Distribution of Multiple Sclerosis in Bavaria From 2006 to 2015. *Front Neurol*, 9, 871. doi:10.3389/fneur.2018.00871
- Dean, G. (1967). Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J*, 2(5554), 724-730.
- Di Pauli, F., Gredler, V., Kuenz, B., Lutterotti, A., Ehling, R., Gneiss, C., . . . Berger, T. (2010). Features of intrathecal immunoglobulins in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 288(1-2), 147-150. doi:10.1016/j.jns.2009.09.016
- Diener, H. C., Putzki, N., Berlit, P., Hacke, W., Hufnagel, A., Hufschmidt, A., . . . Weller, M. (2005). *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie* (3. Auflage ed.). Stuttgart: Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.
- Disanto, G., Adiutori, R., Dobson, R., Martinelli, V., Dalla Costa, G., Runia, T., . . . on behalf of the International Clinically Isolated Syndrome Study, G. (2015). Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. doi:10.1136/jnnp-2014-309690
- Dobson, R., Ramagopalan, S., Davis, A., & Giovannoni, G. (2013). Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(8), 909-914. doi:10.1136/jnnp-2012-304695
- Durante, L., Zaaoui, W., Rico, A., Crespy, L., Wybrecht, D., Faivre, A., . . . Audoin, B. (2012). Intrathecal synthesis of IgM measured after a first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis is associated with subsequent MRI brain lesion accrual. *Mult Scler*, 18(5), 587-591. doi:10.1177/1352458511424589
- Dyment, D. A., Yee, I. M., Ebers, G. C., Sadovnick, A. D., & Canadian Collaborative Study, G. (2006). Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77(2), 258-259. doi:10.1136/jnnp.2005.063008
- Ebers, G. C., Sadovnick, A. D., & Risch, N. J. (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*, 377(6545), 150-151. doi:10.1038/377150a0
- Ferrante, A., Beard, L. J., & Feldman, R. G. (1990). IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*, 9(8 Suppl), S16-24.
- Ferraro, D., Simone, A. M., Bedin, R., Galli, V., Vitetta, F., Federzoni, L., . . . Sola, P. (2013). Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with

- clinically isolated syndrome. *J Neuroimmunol*, 257(1-2), 76-81.
doi:10.1016/j.jneuroim.2013.01.011
- Gaitan, M. I., Shea, C. D., Evangelou, I. E., Stone, R. D., Fenton, K. M., Bielekova, B., . . . Reich, D. S. (2011). Evolution of the blood-brain barrier in newly forming multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 70(1), 22-29. doi:10.1002/ana.22472
- Gold, R., Linington, C., & Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129(Pt 8), 1953-1971. doi:10.1093/brain/awl075
- Goodkin, D. E., Cookfair, D., Wende, K., Bourdette, D., Pullicino, P., Scherokman, B., & Whitham, R. (1992). Inter- and intrarater scoring agreement using grades 1.0 to 3.5 of the Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology*, 42(4), 859-863. doi:10.1212/wnl.42.4.859
- Goodwin, R. G., Alderson, M. R., Smith, C. A., Armitage, R. J., VandenBos, T., Jerzy, R., . . . et al. (1993). Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell*, 73(3), 447-456.
- Greve, B., Magnusson, C. G., Melms, A., & Weissert, R. (2001). Immunoglobulin isotypes reveal a predominant role of type 1 immunity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 121(1-2), 120-125.
- Guder, W., & Nolte, J. (2009). *Das Laborbuch für Klinik und Praxis* (Vol. 2). München: Elsevier.
- Hakansson, I., Tisell, A., Cassel, P., Blennow, K., Zetterberg, H., Lundberg, P., . . . Ernerudh, J. (2017). Neurofilament light chain in cerebrospinal fluid and prediction of disease activity in clinically isolated syndrome and relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 24(5), 703-712. doi:10.1111/ene.13274
- Hintzen, R. Q., de Jong, R., Hack, C. E., Chamuleau, M., de Vries, E. F., ten Berge, I. J., . . . van Lier, R. A. (1991). A soluble form of the human T cell differentiation antigen CD27 is released after triggering of the TCR/CD3 complex. *J Immunol*, 147(1), 29-35.
- Hintzen, R. Q., van Lier, R. A., Kuijpers, K. C., Baars, P. A., Schaasberg, W., Lucas, C. J., & Polman, C. H. (1991). Elevated levels of a soluble form of the T cell activation antigen CD27 in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 35(1-3), 211-217.
- Huss, A., Abdelhak, A., Halbgebauer, S., Mayer, B., Senel, M., Otto, M., & Tumani, H. (2018). Intrathecal immunoglobulin M production: A promising high-risk marker in clinically isolated syndrome patients. *Ann Neurol*, 83(5), 1032-1036. doi:10.1002/ana.25237
- International Multiple Sclerosis Genetics, C., Wellcome Trust Case Control, C., Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C., . . . Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), 214-219. doi:10.1038/nature10251
- Inusah, S., Sormani, M. P., Cofield, S. S., Aban, I. B., Musani, S. K., Srinivasasainagendra, V., & Cutter, G. R. (2010). Assessing changes in relapse rates in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 16(12), 1414-1421. doi:10.1177/1352458510379246

- Jersild, C., Svejgaard, A., & Fog, T. (1972). HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*, *1*(7762), 1240-1241.
- Karpus, W. J., Lukacs, N. W., McRae, B. L., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., & Miller, S. D. (1995). An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, *155*(10), 5003-5010.
- Klein, A., Selter, R. C., Hapfelmeier, A., Berthele, A., Muller-Myhsok, B., Pongratz, V., . . . Hemmer, B. (2019). CSF parameters associated with early MRI activity in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *6*(4), e573. doi:10.1212/NXI.0000000000000573
- Klingelhoefer, J., & Berthele, A. (2015). *Klinikleitfaden Neurologie* (Vol. 5. Edition). Munich, Germany: Elsevier.
- Komori, M., Blake, A., Greenwood, M., Lin, Y. C., Kosa, P., Ghazali, D., . . . Bielekova, B. (2015). Cerebrospinal fluid markers reveal intrathecal inflammation in progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *78*(1), 3-20. doi:10.1002/ana.24408
- Kuhle, J., Barro, C., Disanto, G., Mathias, A., Soneson, C., Bonnier, G., . . . Granziera, C. (2016). Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler*, *22*(12), 1550-1559. doi:10.1177/1352458515623365
- Kuhle, J., Disanto, G., Dobson, R., Adiutori, R., Bianchi, L., Topping, J., . . . Giovannoni, G. (2015). Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler*, *21*(8), 1013-1024. doi:10.1177/1352458514568827
- Kuhle, J., Malmestrom, C., Axelsson, M., Plattner, K., Yaldizli, O., Derfuss, T., . . . Lycke, J. (2013). Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, *128*(6), e33-36. doi:10.1111/ane.12151
- Kuijpers, T. W., Weening, R. S., & Out, T. A. (1992). IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. *Allergol Immunopathol (Madr)*, *20*(1), 28-34.
- Kurtzke, J. F. (1980). Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology*, *30*(7 Pt 2), 61-79.
- Lee, M. K., & Cleveland, D. W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci*, *19*, 187-217. doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.001155
- Lindsey, J. W., & Hatfield, L. M. (2010). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: cellular immune response and cross-reactivity. *J Neuroimmunol*, *229*(1-2), 238-242. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.009
- Link, H., & Huang, Y. M. (2006). Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*, *180*(1-2), 17-28. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.07.006
- Link, H., & Tibbling, G. (1977). Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest*, *37*(5), 397-401. doi:10.1080/00365517709091498
- Luttmann, W., Bratzke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2006). *Der Experimentator Immunologie* (Vol. 2). Heidelberg: Springer, Berlin.

- Martinez, M. A., Olsson, B., Bau, L., Matas, E., Cobo Calvo, A., Andreasson, U., . . . Zetterberg, H. (2015). Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*, *21*(5), 550-561. doi:10.1177/1352458514549397
- McLeod, J. G., Hammond, S. R., & Kurtzke, J. F. (2011). Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: a reassessment. I. Risk of MS by age at immigration. *J Neurol*, *258*(6), 1140-1149. doi:10.1007/s00415-010-5898-4
- McLeod, J. G., Hammond, S. R., & Kurtzke, J. F. (2012). Migration and multiple sclerosis in United Kingdom and Ireland immigrants to Australia: a reassessment. II. Characteristics of early (pre-1947) compared to later migrants. *J Neurol*, *259*(4), 684-693. doi:10.1007/s00415-011-6244-1
- Meyer-Moock, S., Feng, Y. S., Maeurer, M., Dippel, F. W., & Kohlmann, T. (2014). Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol*, *14*, 58. doi:10.1186/1471-2377-14-58
- Miller, D. H., Soon, D., Fernando, K. T., MacManus, D. G., Barker, G. J., Yousry, T. A., . . . Investigators, A. (2007). MRI outcomes in a placebo-controlled trial of natalizumab in relapsing MS. *Neurology*, *68*(17), 1390-1401. doi:10.1212/01.wnl.0000260064.77700.fd
- Munger, K. L., Zhang, S. M., O'Reilly, E., Hernan, M. A., Olek, M. J., Willett, W. C., & Ascherio, A. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*, *62*(1), 60-65.
- Norgren, N., Sundstrom, P., Svenningsson, A., Rosengren, L., Stigbrand, T., & Gunnarsson, M. (2004). Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology*, *63*(9), 1586-1590.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., . . . Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, *69*(2), 292-302. doi:10.1002/ana.22366
- Prineas, J. W., & Connell, F. (1979). Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *5*(1), 22-31. doi:10.1002/ana.410050105
- Prineas, J. W., Kwon, E. E., Cho, E. S., Sharer, L. R., Barnett, M. H., Oleszak, E. L., . . . Morgan, B. P. (2001). Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*, *50*(5), 646-657.
- Raman, V. S., Akondy, R. S., Rath, S., Bal, V., & George, A. (2003). Ligation of CD27 on B cells in vivo during primary immunization enhances commitment to memory B cell responses. *J Immunol*, *171*(11), 5876-5881.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2008). *Biochemie* (2 ed.). Stuttgart: Thieme.
- Reiber, H., & Peter, J. B. (2001). Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci*, *184*(2), 101-122.
- Reiber, H., Ungefehr, S., & Jacobi, C. (1998). The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler*, *4*(3), 111-117.
- Sadovnick, A. D., Dircks, A., & Ebers, G. C. (1999). Genetic counselling in multiple sclerosis: risks to sibs and children of affected individuals. *Clin Genet*, *56*(2), 118-122.

- Schneider, R., Euler, B., & Rauer, S. (2007). Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol*, *14*(8), 907-911. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01871.x
- Sellebjerg, F., Royen, L., Soelberg Sorensen, P., Oturai, A. B., & Jensen, P. E. H. (2018). Prognostic value of cerebrospinal fluid neurofilament light chain and chitinase-3-like-1 in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 1352458518794308. doi:10.1177/1352458518794308
- Stangel, M., Fredrikson, S., Meinl, E., Petzold, A., Stuve, O., & Tumani, H. (2013). The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, *9*(5), 267-276. doi:10.1038/nrneurol.2013.41
- Sumaya, C. V., Myers, L. W., & Ellison, G. W. (1980). Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, *37*(2), 94-96.
- Sundqvist, E., Sundstrom, P., Linden, M., Hedstrom, A. K., Aloisi, F., Hillert, J., . . . Olsson, T. (2012). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun*, *13*(1), 14-20. doi:10.1038/gene.2011.42
- Thacker, E. L., Mirzaei, F., & Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*, *59*(3), 499-503. doi:10.1002/ana.20820
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetsee, T., Comi, G., . . . Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*, *17*(2), 162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *Lancet*, *391*(10130), 1622-1636. doi:10.1016/S0140-6736(18)30481-1
- Tintore, M., Rovira, A., Rio, J., Otero-Romero, S., Arrambide, G., Tur, C., . . . Montalban, X. (2015). Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*, *138*(Pt 7), 1863-1874. doi:10.1093/brain/awv105
- Tintore, M., Rovira, A., Rio, J., Tur, C., Pelayo, R., Nos, C., . . . Montalban, X. (2008). Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*, *70*(13 Pt 2), 1079-1083. doi:10.1212/01.wnl.0000280576.73609.c6
- Trend, S., Jones, A. P., Cha, L., Byrne, S. N., Geldenhuys, S., Fabis-Pedrini, M. J., . . . Hart, P. H. (2018). Higher Serum Immunoglobulin G3 Levels May Predict the Development of Multiple Sclerosis in Individuals With Clinically Isolated Syndrome. *Front Immunol*, *9*, 1590. doi:10.3389/fimmu.2018.01590
- Uher, T., Horakova, D., Tyblova, M., Zeman, D., Krasulova, E., Mrazova, K., . . . Zivadinov, R. (2015). Increased albumin quotient (QAlb) in patients after first clinical event suggestive of multiple sclerosis is associated with development of brain atrophy and greater disability 48 months later. *Mult Scler*. doi:10.1177/1352458515601903
- van der Vuurst de Vries, R. M., Mescheriakova, J. Y., Runia, T. F., Jafari, N., Siepman, T. A., & Hintzen, R. Q. (2017). Soluble CD27 Levels in Cerebrospinal Fluid as a Prognostic Biomarker in Clinically Isolated Syndrome. *JAMA Neurol*, *74*(3), 286-292. doi:10.1001/jamaneurol.2016.4997

- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 5, 520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520
- Welsch, U., & Deller, T. (2010). *Lehrbuch Histologie* (Vol. 3). München: Elsevier, Urban&Fischer.
- Willer, C. J., Dyment, D. A., Risch, N. J., Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., & Canadian Collaborative Study, G. (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22), 12877-12882. doi:10.1073/pnas.1932604100
- Wolinsky, J. S., Narayana, P. A., Nelson, F., Datta, S., O'Connor, P., Confavreux, C., . . . Teriflunomide Multiple Sclerosis Oral Trial, G. (2013). Magnetic resonance imaging outcomes from a phase III trial of teriflunomide. *Mult Scler*, 19(10), 1310-1319. doi:10.1177/1352458513475723
- Wong, Y. Y. M., van der Vuurst de Vries, R. M., van Pelt, E. D., Ketelslegers, I. A., Melief, M. J., Wierenga, A. F., . . . Hintzen, R. Q. (2018). T-cell activation marker sCD27 is associated with clinically definite multiple sclerosis in childhood-acquired demyelinating syndromes. *Mult Scler*, 24(13), 1715-1724. doi:10.1177/1352458518786655
- Wujek, J. R., Bjartmar, C., Richer, E., Ransohoff, R. M., Yu, M., Tuohy, V. K., & Trapp, B. D. (2002). Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(1), 23-32.