

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock
Sektion Neuroimmunologie
Leiter: Prof. Dr. med. U. K. Zettl

**Untersuchung der Telomerlänge bei Patienten mit Multipler Sklerose
und Recherche nach Faktoren mit potenziellem Einfluss auf
Erkrankungsrisiko und -schwere sowie auf Telomerlängen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Jan Bühring
geboren am 12.08.1999 in Neuruppin
aus Rostock

Rostock, den 11.11.2022

Für meine Eltern,
Großeltern und Familie

Gutachter

1. Gutachter Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl
Klinik und Poliklinik für Neurologie, Sektion Neuroimmunologie
Universitätsmedizin Rostock
18147 Rostock

2. Gutachter Prof. Dr. med. Robert Jaster
Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Gastroenterologie
Universitätsmedizin Rostock
18057 Rostock

3. Gutachter Prof. Dr. med. Ralf Gold
Klinik für Neurologie
Katholisches Klinikum Bochum
44791 Bochum

Datum der Einreichung: 11.11.2022

Datum der Verteidigung: 29.08.2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
1.1.	<i>Multiple Sklerose (MS).....</i>	7
1.1.1.	Epidemiologie.....	7
1.1.2.	Ätiologie und Pathogenese.....	8
1.1.3.	Symptomatik.....	9
1.1.4.	Verlaufsformen.....	10
1.1.5.	Diagnostik.....	11
1.1.6.	Beurteilung der Krankheitsschwere.....	12
1.1.7.	Prognose.....	12
1.1.8.	Therapie der MS.....	13
1.2.	<i>Telomere.....</i>	15
1.2.1.	Struktur und Funktion.....	15
1.2.2.	Verfahren zur Messung von Telomerlängen (TL).....	17
1.2.3.	Assoziationen zwischen TL und Krankheiten.....	18
1.3.	<i>Zelluläre Seneszenz und MS.....</i>	19
2.	Fragestellungen.....	20
3.	Material und Methoden.....	22
3.1.	<i>Messung der Leukozyten-TL (LTL) in der Rostocker Kohorte.....</i>	22
3.1.1.	Studiendesign.....	22
3.1.2.	Rekrutierung der Patienten und Kontrollen.....	23
3.1.3.	Probengewinnung und -aufbereitung.....	24
3.1.4.	Auswahl der Proben.....	24
3.1.5.	Messung der LTL.....	24
3.1.6.	Datenanalyse.....	25
3.2.	<i>Literaturrecherche zur potenziellen Relevanz von TL bei MS.....</i>	26
3.2.1.	Systematische Literatursuche nach TL-Studien bei MS.....	26
3.2.2.	Kriterien zur Auswahl geeigneter Studien.....	27
3.2.3.	Betrachtung der Studien nach definierten Gesichtspunkten.....	28
3.2.4.	Metaanalyse zum Vergleich der LTL bei Patienten mit MS und Gesunden.....	28
3.2.5.	Recherche nach Faktoren mit Assoziation zu MS und TL.....	28

4.	Ergebnisse	30
4.1.	<i>LTL in der Rostocker Kohorte</i>	30
4.1.1.	Patientencharakteristika.....	30
4.1.2.	Technische Validierung und Reproduzierbarkeit der LTL-Messungen.....	31
4.1.3.	Vergleich der LTL von Patienten mit MS und Kontrollen.....	32
4.1.4.	Assoziation der LTL mit klinischen Parametern der Patienten.....	34
4.1.5.	Korrelation zwischen klinischem Langzeitverlauf und der LTL.....	34
4.2.	<i>Forschungsstand zu TL bei MS und assoziierten Faktoren</i>	37
4.2.1.	Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche.....	37
4.2.1.1.	<i>Identifizierte Studien zu TL bei Patienten mit MS</i>	37
4.2.1.2.	<i>Allgemeine Informationen zu den eingeschlossenen Studien</i>	38
4.2.1.3.	<i>Methoden und Ergebnisse der eingeschlossenen Studien</i>	39
4.2.1.4.	<i>Vergleich der Studien nach spezifischen Gesichtspunkten</i>	43
4.2.1.5.	<i>Integration bisheriger Befunde zur LTL bei Patienten mit MS durch Metaanalyse</i>	44
4.2.2.	Literaturrecherche nach mit MS und TL assoziierten Faktoren.....	46
4.2.2.1.	<i>Genetische Faktoren mit Assoziation zu MS und TL</i>	46
4.2.2.2.	<i>Assoziation von Umweltfaktoren mit MS und TL</i>	49
4.2.2.3.	<i>Auswirkungen des Lebensstils auf MS und TL</i>	51
4.2.2.4.	<i>Übersicht über mit der MS und der TL assoziierte Faktoren</i>	55
5.	Diskussion	56
5.1.	<i>Repräsentativität der Rostocker Kohorte</i>	56
5.2.	<i>Betrachtung der verwendeten Proben sowie TL-Messmethode</i>	58
5.3.	<i>Einordnung der TL-Messergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext</i>	60
5.4.	<i>TL als möglicher Prädiktionsmarker des Krankheitsverlaufes</i>	63
5.5.	<i>Potenzielle Einflussfaktoren auf MS und TL</i>	65
5.6.	<i>Interaktionen zwischen Faktoren mit möglicher Auswirkung auf MS und TL</i>	68
5.7.	<i>Limitierungen und Ausblick</i>	69
6.	Zusammenfassung	72
7.	Literaturverzeichnis	75

8.	Anhang.....	97
8.1.	<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>97</i>
8.2.	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>100</i>
8.3.	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>101</i>
8.4.	<i>Supplementäre Tabellen.....</i>	<i>102</i>
8.5.	<i>Eidesstattliche Erklärung.....</i>	<i>104</i>
8.6.	<i>Danksagung.....</i>	<i>105</i>
8.7.	<i>Curriculum Vitae.....</i>	<i>106</i>
9.	Thesen.....	108

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose (MS)

Die Multiple Sklerose (MS), auch *Encephalomyelitis disseminata* genannt, ist die häufigste immunmedierte Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit inflammatorischen und neurodegenerativen Aspekten [1]. Sie manifestiert sich meist im jungen Erwachsenenalter [2] und verursacht bei den Patienten eine heterogene Symptomatik, weshalb sie auch „die Krankheit der 1000 Gesichter“ genannt wird. Trotz jahrelanger Forschung sind Ätiologie und Pathomechanismen der MS bislang nicht vollständig geklärt.

1.1.1. Epidemiologie

Weltweit sind circa (ca.) 2,8 Millionen Menschen an MS erkrankt, von denen mehr als 250.000 in Deutschland leben [3]. Die globale Prävalenz der MS ist inhomogen (Abbildung (Abb.) 1). Während die Prävalenz der MS im Jahr 2020 in Gebieten des westlichen Pazifiks bei 4,8 und in Afrika sowie Südostasien bei 8,8 beziehungsweise (bzw.) 8,6 Patienten mit MS pro 100.000 Einwohnern lag, betrug sie in Nord- und Südamerika 117,5 und in Europa 142,8 Patienten pro 100.000 Einwohnern. Die globale Prävalenz der MS ist zwischen 2013 und 2020 um ca. 50% von 29,3 auf rund 44,0 Patienten mit MS pro 100.000 Einwohner gestiegen [3]. Allerdings liegen nicht aus jedem Land Daten vor. Aus den epidemiologischen Studien lässt sich schlussfolgern, dass die MS in Gebieten mit gemäßigttem Klima und gut entwickelter Wirtschaft häufiger auftritt [2]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz der MS signifikant mit dem Breitengrad assoziiert ist (Zunahme der Prävalenz um ca. drei pro 100.000 Einwohner pro Breitengrad) [4].

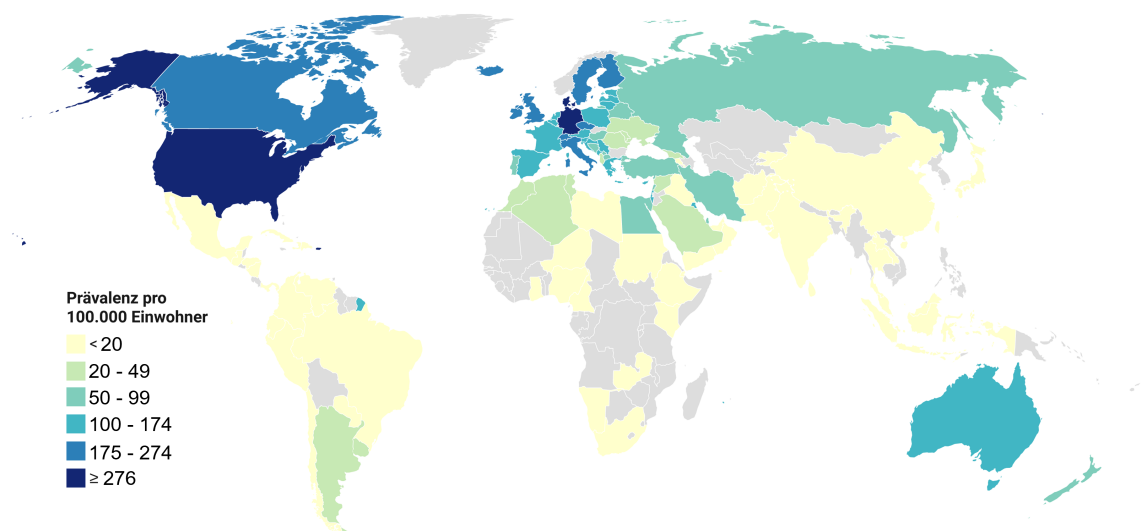


Abb. 1: Globale Prävalenz der MS

Die Weltkarte zeigt die globale Verteilung der Prävalenz der MS. Die Färbung der Länder repräsentiert die jeweilige Anzahl an Patienten mit MS pro 100.000 Einwohner. Die Zuordnung der Farbe zur Prävalenz kann der Legende in der unteren linken Ecke entnommen werden. Länder, für die keine Prävalenzdaten vorlagen, sind grau dargestellt. Die Prävalenzdaten wurden dem Atlas der MS [3] entnommen. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Online-Tools Datawrapper erstellt.

MS: Multiple Sklerose.

Dass trotz des gleichen Heimatlandes die MS-Prävalenz von der Ethnie abhängt, zeigen die Ergebnisse einer Studie aus der südafrikanischen Provinz KwaZulu-Natal. Hier war die Prävalenz der MS unter Weißen Einwohnern, die zum Großteil auch in der Provinz geboren wurden, weitaus höher (25,6 pro 100.000) als unter Schwarzen Einwohnern (0,2 pro 100.000) [5]. Auch Migration und das Alter bei ebendieser scheinen einen Einfluss auf das MS-Risiko zu haben. Bei Nordeuropäern, die nach Südafrika, also aus einem Gebiet mit höherer in ein Gebiet mit niedrigerer Prävalenz der MS immigrierten, wurde eine mehr als vier Mal höhere MS-Prävalenz identifiziert als bei dort geborenen Weißen Südafrikanern [6]. Außerdem war die Prävalenz bei den unter 15-jährigen Immigranten deutlich geringer als jene bei den über 15-jährigen [6]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich bei Immigration vor dem 15. Lebensjahr das MS-Risiko zumindest zum Teil an die Prävalenz des neuen Landes angleicht, während sich das Risiko bei Individuen, die nach dem 15. Lebensjahr immigrierten, nur wenig verändert und vergleichbar mit dem des Herkunftslandes bleibt [6,7].

Die MS manifestiert sich typischerweise im jungen Erwachsenenalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr [2]. Etwa drei bis fünf Prozent der Patienten leiden schon vor dem 18. Lebensjahr an der Erkrankung [8], wohingegen bei rund fünf Prozent der Patienten die ersten Symptome erst nach dem 50. Lebensjahr auftreten [9]. Frauen sind ca. zwei bis drei Mal häufiger von MS betroffen als Männer [10,11]. Hingegen zeigen sich bei Männern oftmals schwerere Krankheitsverläufe und eine schnellere Behinderungsprogression [11].

1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der MS bisher nicht vollständig verstanden. Es wurden jedoch eine Reihe von genetischen Faktoren, beispielsweise (bspw.) Konstellationen der humanen Leukozytenantigene (HLA) und Einzelnukleotidpolymorphismen (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) [12], Umweltfaktoren, wie die Sonnenlichtexposition [13] oder eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) [14], und Faktoren des Lebensstils, bspw. Rauchen [15], mit der Entstehung der MS in Verbindung gebracht (Kapitel (Kap.) 4.2.2.1., 4.2.2.2., 4.2.2.3.). Das weltweit unterschiedliche Auftreten dieser Faktoren ist eine mögliche Erklärung für die Heterogenität der globalen MS-Prävalenz (Kap. 1.1.1., Abb. 1). Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Ursache der MS zwischen Patienten unterscheidet, es wird jedoch eine autoimmune Genese vermutet [16]. Wahrscheinlich führt ein Zusammenspiel von verschiedenen bekannten und unbekanntenen Faktoren zur Krankheitsentstehung.

Die MS ist durch einen immunmedierten Neuronen- und Synapsenverlust des ZNS mit reaktiver Gliose charakterisiert [17]. Kennzeichnend für die Erkrankung sind lokale Immunreaktionen in Gehirn und Rückenmark (sogenannte Läsionen oder Herde) sowie diffuse Veränderungen und Demyelinisierungsreaktionen in weißer und grauer Hirnsubstanz, in denen es u. a. zum Untergang von Oligodendrozyten kommt [18,19]. Diese Veränderungen sind in Zahl und Größe sehr variabel und können durch die Magnetresonanztomografie (MRT) dargestellt werden. In den Läsionen finden sich in der histologischen Untersuchung perivaskuläre Ansammlungen von Immunzellen [16]. Diese bestehen vor allem aus Makrophagen und CD8-positiven T-Zellen sowie CD4-positiven T-Zellen und B-Zellen [20]. Physiologischerweise durchlaufen T- und B-Zellen verschiedene Selektionsmechanismen, bspw. die positive und negative Selektion der T-Zellen im Thymus, um Immunreaktionen gegen den eigenen Körper zu verhindern und die immunologische Funktion der

Zellen zu gewährleisten [21,22]. Dennoch gelangen einige autoreaktive T- und B-Zellen in die Peripherie [21,22]. Es wird derzeit vermutet, dass die MS durch die periphere Aktivierung dieser autoreaktiven T- und/oder B-Zellen beginnt [21,22]. Diesen ist es möglich, die Blut-Hirn-Schranke (BHS), eine Barriere zwischen ZNS und Peripherie, die unter anderem (u. a.) das besondere Milieu des ZNS schützt, zu überqueren und ins ZNS zu gelangen, wo sie durch lokale antigenpräsentierende Zellen reaktiviert werden [21]. Als Folge dessen werden Zytokine, Proteasen und Mediatoren ausgeschüttet und weitere Immunzellen akkumulieren in den ZNS-Läsionen, was schließlich zu den entzündlichen Läsionen führt [21,23]. Sowohl in Patienten mit MS als auch in Gesunden konnten reaktive T-Zellen gegen das im ZNS vorkommende Myelin (sogenannte myelin-reaktive T-Zellen) nachgewiesen werden [21]. Diese befanden sich bei MS-Patienten meist in einem aktivierten Zustand, wohingegen sie bei Gesunden vorwiegend im naiven Zustand waren.

B-Zellen durchlaufen einen physiologischen Prozess für die Ausbildung der zentralen und peripheren Toleranz. Es wird davon ausgegangen, dass es bei Patienten mit MS zu Fehlern in der Ausbildung der peripheren Toleranz kommt [22]. Da sowohl die Anzahl als auch die Funktion von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit MS vermindert ist, diese jedoch große Relevanz bei der Kontrolle autoreaktiver B-Zellen haben, wird bei diesen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vermutet [22]. B-Zell- und antikörperproduzierende Plasmazellklone, die intrathekal Antikörper (AK) produzieren, welche sich als oligoklonale Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis nachweisen lassen, konnten im ZNS von MS-Patienten nachgewiesen werden [22,24]. Diese AK scheinen an der Entmarkung der Axone beteiligt zu sein und führten in Tiermodellen zu Schädigungen von Nervenzellen [16]. Weiterhin konnten Myelinfragmente mit gebundenen myelin-spezifischen AK in phagozytierenden Zellen in perivaskulären Läsionen bei Patienten mit MS nachgewiesen werden [22].

Neben den Immunzellen tragen auch Zellen innerhalb des ZNS zur Pathophysiologie der MS bei. So konnte gezeigt werden, dass sich in den ZNS-Läsionen Astrozyten vom Typ A1 befinden, die destruktive Wirkungen auf Synapsen haben [25]. Zudem wird vermutet, dass A1-Astrozyten die Remyelinisierung der Axone durch Störung der Oligodendrozytenproliferation verhindern. Die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia spielt somit u. a. bei der Hirnatrophie eine Rolle [18]. Kortikale Demyelinisierung kann schon in frühen Stadien der MS identifiziert werden, verstärkt sich jedoch beim Übergang zum progressiven Krankheitsverlauf [19].

1.1.3. Symptomatik

Das klinische Bild der MS ist interindividuell sehr heterogen und vielgestaltig. Dennoch gelten u. a. Empfindungsstörungen, Paresen, Sehstörungen, Schwächesymptomatiken (Fatigue), kognitive Defizite, sexuelle Dysfunktionen sowie Blasen- und Darmentleerungsstörungen zu den häufigsten Symptomen der MS [26,27]. Das Auftreten und die Schwere der Symptomatik hängen u. a. von der Verlaufsform der MS (Kap. 1.1.4.) und der Lokalisation der Läsionen im ZNS ab. Auch die Erkrankungsdauer ist mit der Symptomatik assoziiert. So haben Patienten im frühen Stadium der Krankheit vor allem Empfindungsstörungen, Optikusneuritiden, Paresen, kognitive und psychische Störungen und Fatigue [26]. Mit längerer Krankheitsdauer treten vermehrt Ataxien, Spastiken und Schmerzsyndrome auf.

1.1.4. Verlaufsformen

Der Verlauf der Erkrankung wird nach Lublin *et al.* [28] in drei Hauptverlaufsformen eingeteilt: die schubförmig remittierende MS (*relapsing-remitting MS*, RRMS), die sekundär progrediente MS (*secondary progressive MS*, SPMS) und die primär progrediente MS (*primary progressive MS*, PPMS). Zusätzlich zur Klassifikation des Verlaufs kann bei der RRMS die aktive von der nicht-aktiven Form unterschieden werden. SPMS und PPMS können in aktiv oder nicht-aktiv und progredient oder nicht-progredient differenziert werden [28]. Aktiv ist dabei als auftretende Schubsymptomatik und/oder Aktivität im MRT definiert. Progression beschreibt eine objektive, schubunabhängige Zunahme der neurologischen Defizite über einen definierten Zeitraum [28]. Der Diagnose der MS geht häufig das klinisch isolierte Syndrom (*clinically isolated syndrome*, CIS) voraus. Das CIS beschreibt eine einzelne akute oder subakute Episode von neurologischen Störungen, die die Diagnosekriterien der MS (Kap. 1.1.5.) jedoch nicht erfüllt [29]. Im Durchschnitt beträgt die Zeit zwischen ersten Symptomen und Diagnose einer RRMS etwa ein Jahr [30].

Schubförmig remittierende MS

Mit ca. 85-90% der Fälle ist die RRMS die mit Abstand häufigste initiale Manifestation der MS [31]. Die RRMS ist durch Symptomschübe gekennzeichnet, die sich meist über Tage oder Wochen entwickeln und anschließend wieder zurückbilden können (Abb. 2). Dies geschieht nicht immer vollständig, sodass bei unvollständiger Remission Einschränkungen bestehen bleiben können. Zwischen zwei Schüben sind die Patienten meist stabil und erleiden keine Verschlechterungen [28]. Schübe sind definiert als akutes oder subakutes Auftreten von neuen oder als Wiederauftreten eines oder mehrerer neurologischer Defizite [32]. Die Symptomatik muss länger als 24 Stunden bestehen und seit dem letzten Schubereignis müssen mehr als 30 Tage vergangen sein. Des Weiteren müssen andere Ursachen für die Defizite, bspw. das Uthoff-Phänomen [33], ausgeschlossen sein [32,34]. Jährlich konvertiert bei etwa zwei bis drei Prozent der initial mit RRMS diagnostizierten Patienten die Erkrankung in eine SPMS [35]. Es ist allerdings nicht zwingend erforderlich, dass es bei Patienten mit RRMS zu einer Konversion kommt.

Sekundär progrediente MS

Klinisch wird die Diagnose der SPMS in den meisten Fällen retrospektiv gestellt, wenn sich nach initialer Erkrankung an RRMS eine progrediente Verschlechterung der Symptomatik abzeichnet [28] (Abb. 2). Trotz des progredienten Verlaufs können aufgesetzte Schübe, stabile Phasen und leichte Remissionen auftreten [28]. Es ist bisher nicht bekannt, weshalb es zu einer Konversion kommt, allerdings konnte gezeigt werden, dass das männliche Geschlecht sowie ein höheres Alter bei Erkrankungsbeginn mit einer kürzeren Zeit bis zur Konversion assoziiert sind [36].

Primär progrediente MS

Im Gegensatz zur RRMS ist die PPMS nicht durch initiale Schübe mit anschließender Remission charakterisiert, sondern durch eine seit Anfang an bestehende kontinuierliche Progression mit individuell unterschiedlicher Dynamik der Symptomatik (Abb. 2), ähnlich der SPMS [28]. Auch hier kann es trotz Progression der Symptomatik zu Plateaus, geringfügigen Remissionen oder selten zu aufgesetzten Schüben kommen [28,34]. Mit ca. zehn Prozent der Patienten bildet diese Form der MS den geringsten Anteil [31]. Im Vergleich zur RRMS wird die Diagnose der PPMS typischerweise im höheren Lebensalter gestellt, wobei beide Geschlechter gleichermaßen betroffen sind [31].

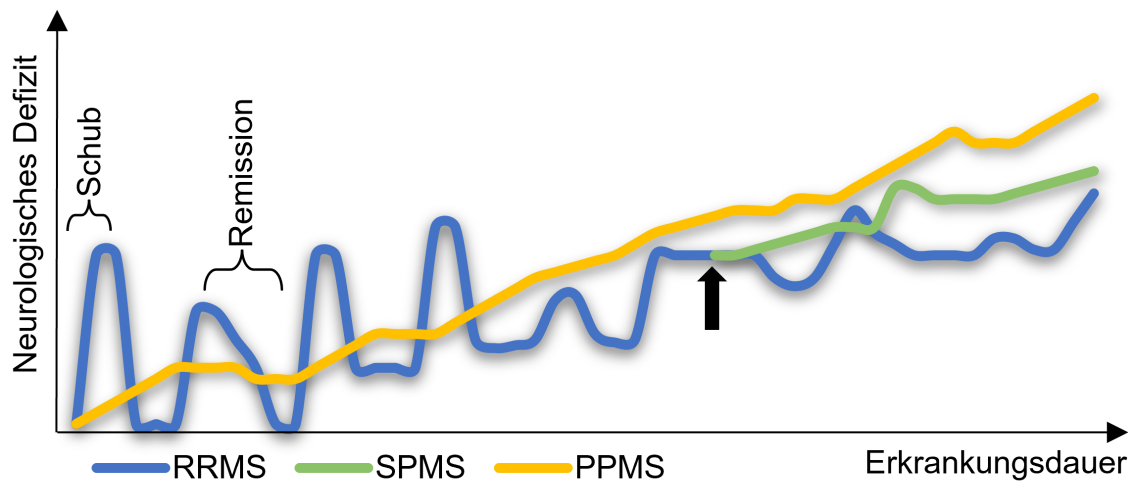


Abb. 2: Schematischer Verlauf der drei Hauptverlaufsformen der MS

Die Abbildung skizziert den klinischen Krankheitsverlauf der drei Hauptverlaufsformen der MS: RRMS, SPMS und PPMS. Das relative Ausmaß des neurologischen Defizits (Y-Achse) ist über die Erkrankungsdauer (X-Achse) aufgetragen. Die RRMS konvertiert typischerweise nach mehreren Jahren in eine SPMS (mit Pfeil markiert). Die farbliche Zuordnung der Verlaufsformen ist der Legende zu entnehmen. Diese Abbildung wurde mit Microsoft Powerpoint (Version 2210) erstellt.

MS: Multiple Sklerose; PPMS: primär progrediente MS; RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS.

1.1.5. Diagnostik

Die Kriterien zur Diagnose der MS wurden in den vergangenen Jahrzehnten mehrfach überarbeitet, um die Diagnose sicherer und schneller stellen zu können [34,37-40]. In den aktuellen McDonald-Kriterien zur Diagnose der MS von 2017 [34] wird neben klinischen und paraklinischen Befunden besonders auch die Bildgebung des ZNS durch die MRT hervorgehoben, wobei die räumliche und zeitliche Dissemination von Läsionen eine wesentliche Rolle spielt. Eine MS kann diagnostiziert werden, sofern mögliche Differentialdiagnosen ausgeschlossen sind [34]. Die Diagnose der RRMS kann bei Vorliegen von mehr als zwei Schüben in der Vergangenheit und mehr als zwei klinisch belegten Läsionen in verschiedenen Regionen des ZNS gestellt werden [34]. Bei weniger Schüben und/oder Läsionen sind zusätzlich die Nachweise von OKB und/oder der zeitlichen oder räumlichen Dissemination der Läsionen im ZNS notwendig, um eine definitive RRMS zu diagnostizieren. Bei rund 95% der Patienten mit MS liegen im Liquor OKB von IgG-AK vor, welche auf eine pathologische intrathekale AK-Synthese hinweisen [22,41]. Die SPMS wird nach initialer RRMS-Erkrankung retrospektiv diagnostiziert. Grundlage dafür ist der Übergang von primär schubförmiger Symptomatik in eine kontinuierlich progrediente Symptomatik (Kap. 1.1.4.) [28].

Zur Diagnose einer PPMS müssen eine schubunabhängige Symptomatik und eine Verschlechterung dieser über ein Jahr vorliegen. Zusätzlich müssen zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein: 1. mindestens eine MS-typische Läsion in bestimmten Hirnregionen; 2. zwei oder mehr Läsionen im Rückenmark im MRT; 3. Liquor-spezifische OKB [34]. Trotz ständiger Überarbeitung der Diagnosekriterien sind Fehldiagnosen möglich, da die Diagnosestellung durch die heterogene Symptomatik und uneindeutige oder atypische klinische und paraklinische Präsentationen erschwert wird [42,43]. Eine Unterscheidung zwischen einer MS und möglichen Differentialdiagnosen ist zudem nicht immer eindeutig.

1.1.6. Beurteilung der Krankheitsschwere

Zur klinischen Beurteilung der neurologischen Defizite der Patienten mit MS werden Leistungsskalen genutzt. Am häufigsten wird die klinisch etablierte *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) verwendet, die 1983 von John F. Kurtzke eingeführt wurde [44]. Für die Einschätzung des EDSS-Scores eines Patienten werden die Defizite innerhalb von acht funktionellen Systemen (FS), u. a. Pyramidenbahn, Kleinhirn und Sensorik, anhand von Graden eingeschätzt und mithilfe von Kriterien einem Punktwert auf der EDSS zugeordnet. Die EDSS reicht von 0 bis 10, wobei 0 die Freiheit von neurologischen Defiziten beschreibt („gesunder“ Zustand) und 10 den Tod infolge der MS-Erkrankung (Kap. 8.4., Tabelle (Tab.) S1) [44]. Ein Hauptkritikpunkt am EDSS-Score ist u. a. die asymmetrische Wichtung der Funktionssysteme mit einer Dominanz der Motorik der unteren Extremität und Vernachlässigung kognitiver Fähigkeit sowie Variabilität bei der Einschätzung der Beeinträchtigung einzelner Funktionssysteme [45]. Dennoch ist er einer der am häufigsten verwendeten Scores zur Einschätzung des Behinderungsgrades und der -progression bei Patienten mit MS.

Ein weiterer Score zur Objektivierung der Körperfunktion der Patienten ist der *Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) -Score* der amerikanischen National Multiple Sclerosis Society [46,47]. Hierfür werden verschiedene Tests zur Funktionsprüfung der Arme, Beine und Kognition des Patienten durchgeführt. Anhand von Referenzwerten gesunder Probanden können Abweichungen der Körperfunktionen eingeschätzt werden.

Des Weiteren gibt es den *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS) [48] und die *Age-Related Multiple Sclerosis Severity* (ARMSS) [49], die sich beide auf den EDSS-Score beziehen. Der MSSS setzt den EDSS-Score ins Verhältnis zur Krankheitsdauer und schätzt damit die Schwere der Erkrankung bei einmaliger Messung des EDSS-Scores ein [48]. Der ARMSS-Score hingegen setzt den EDSS-Score in Relation zum Alter [49].

1.1.7. Prognose

Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung ist es schwierig, den weiteren Krankheitsverlauf individuell vorherzusagen. Dennoch ermöglichen einige Faktoren eine grobe Prognose. Patienten mit CIS, bei denen OKB im Liquor nachgewiesen wurden, haben verglichen mit Patienten ohne OKB ein etwa doppelt so hohes Risiko für die Entwicklung einer klinisch gesicherten MS [30]. Für die Konversion von der RRMS zur SPMS sind bisher keine spezifischen Biomarker bekannt. Allgemein sind eine unvollständige Erholung von einem Schub, ein kurzer Zeitraum zwischen dem ersten und dem zweiten Schub sowie eine höhere Anzahl an Schüben innerhalb der ersten fünf Jahre der Erkrankung mit einer schlechteren Prognose assoziiert [50,51]. Das weibliche Geschlecht, eine lange Zeit zwischen erstem und zweitem Schub und ein jüngerer Alter zu Beginn der Erkrankung sind hingegen eher günstige Prognosefaktoren [52]. Patienten mit PPMS haben einen eher ungünstigeren Krankheitsverlauf als Patienten mit RRMS und eine ca. sechs Jahre geringere Lebenserwartung [31,53,54]. Paraklinische Untersuchungen wie die Bildgebung mit der MRT [55], die vor allem in der Diagnostik und dem Therapiemonitoring eingesetzt werden, eignen sich bedingt auch zur Prognostik des weiteren Krankheitsverlaufs [1]. Es wurden bereits weitere prognostische Biomarker, bspw. OKB oder andere AK im Liquor, in Betracht gezogen, jedoch konnten diese bislang nicht in unabhängigen Studien validiert werden [56,57]. Die Etablierung von

neuen molekularen Biomarkern, mit denen sowohl eine Diagnose als auch eine Prognose mit hoher Sicherheit gestellt werden können, bleibt somit Ziel aktueller Forschungen. Es wäre denkbar, dass die Länge der Telomere (Kap. 1.2.) als potenzieller Marker zukünftig zur Abschätzung der Prognose genutzt werden und somit helfen könnte, für jeden Patienten individuell die bestmögliche Therapie auszuwählen.

1.1.8. Therapie der MS

Zur Zeit gibt es keine kurative Behandlung der MS. Die Therapie der MS stützt sich auf vier Säulen, die individuell an den Patienten angepasst werden müssen: die verlaufsmodifizierende Immuntherapie (*disease-modifying treatment*, DMT), die symptomatische Therapie, die Krankheitsbewältigung (*Coping*) und die sozialmedizinische Betreuung. Ziele der Therapien sind primär die Erhaltung der Lebensqualität der Patienten, die Verhinderung von akuten Schüben sowie die Abmilderung von Langzeitfolgen der Erkrankung [32,58]. Die medikamentöse Therapie hängt vor allem von der Verlaufsform und der Aktivität der Erkrankung ab. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Fokus auf die kausalerorientierte Therapie fallen, die sich in die akute Schubtherapie und die verlaufsmodifizierende Therapie unterteilen lässt. Die symptomatische Therapie umfasst die Behandlung von Krankheitssymptomen wie Schmerzen und Spastiken [59]. Das *Coping* soll den Patienten beim Umgang mit der Krankheit und den damit verbundenen psychischen, emotionalen und sozialen Anforderungen unterstützen [60]. Der sozialmedizinische Teil der Behandlung beinhaltet u. a. Aspekte wie die Berufsberatung oder Maßnahmen zur Rehabilitation [61].

Schubtherapie

Nach der deutschen Leitlinie für die Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose [32] besteht der Standard in der Therapie eines akuten Schubes in einer zeitnahen intravenösen, bzw. in Ausnahmefällen oralen, Glukokortikoidgabe. Nach Ausschluss von Kontraindikationen ist das Mittel der Wahl Methylprednisolon, welches für drei bis fünf Tage hochdosiert (0,5 – 1 Gramm pro Tag) verabreicht werden soll (Tab. 1). Für den Fall einer ausbleibenden Besserung der Symptomatik kann eine Eskalation der Therapie auf bis zu zwei Gramm pro Tag für drei bis fünf Tage erwogen werden. Bei anhaltender Symptomatik kann nachfolgend eine Immunadsorption oder Plasmapherese in Erwägung gezogen werden, auf die über 70% der Patienten mit einer Verbesserung der Symptomatik ansprechen [32,62].

Verlaufsmodifizierende Therapie

Aufgrund von potenziellen Interessenskonflikten und inhaltlichen Differenzen sind derzeit zwei Empfehlungen zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS verfügbar, einerseits das Positionspapier der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) [58], auf das im Folgenden hauptsächlich eingegangen wird, und andererseits die S2K-Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie [32].

Die verlaufsmodifizierende Therapie der MS stützt sich zum einen auf immunmodulierende und zum anderen auf immunsuppressive Medikamente. Diese verlaufsmodifizierenden Medikamente (*disease-modifying drugs*, DMD) sind zum Teil spezifisch für die Verlaufsformen zugelassen und erfordern oft strenge Indikationsstellungen [63]. Ziele dieser Therapie sind u. a. die Prävention neurologischer Defizite sowie der Erhalt der Lebensqualität der Patienten durch

Schubratenreduktion, Verhinderung neuer Läsionen und Abmilderung der Behinderungsprogression [58]. Die DMDs werden nach Applikationshäufigkeit in kontinuierliche bzw. gepulste Therapien eingeteilt [58]. Die RRMS kann mit verschiedenen DMDs behandelt werden, abhängig von der Aktivität der Erkrankung und den Komorbiditäten des Patienten. So kann eine moderate RRMS bspw. mit β -Interferonen oder Glatirameracetat; eine hochaktive RRMS u. a. mit Alemtuzumab, Fingolimod oder Natalizumab behandelt werden (Tab. 1) [58,64]. Die SPMS wird in Abhängigkeit von aufgesetzten Schüben oder Krankheitsaktivität in der MRT therapiert. Bei aufgesetzten Schüben kommen hier u. a. die DMDs Interferon- β -1b, Mitoxantron, Ocrelizumab und Cladribin zum Einsatz (Tab. 1) [58,64]. Mitoxantron ist zur Behandlung der SPMS aufgrund des großen Spektrums an unerwünschten Nebenwirkungen und der kumulativen Höchstdosis die Therapie der zweiten Wahl [58,65]. Die SPMS ohne Schübe, aber mit MRT-Aktivität, wird mit Siponimod behandelt. Für die Behandlung der PPMS ist das derzeit einzige zugelassene DMD Ocrelizumab; Rituximab kann allerdings als *off-label*-DMD zur Therapie erwogen werden [58,64]. Gelegentlich werden Patienten mit MS auch mit einer gepulsten Kortikosteroidtherapie behandelt, jedoch nahm dieser Anteil an Patienten in der letzten Jahren ab [66]. Das CIS, als häufige Vorstufe der MS, sollte möglichst frühzeitig mit Interferon- β -1a oder -1b therapiert werden [58].

Tab. 1: Schubtherapie und verlaufsmodifizierende Therapie der MS

		MS-Verlaufsform				
		RRMS		SPMS		
akute Schub-Therapie	1. Wahl Methylprednisolon					
	2. Wahl Plasmapherese/Immunadsorption					
verlaufsmodifizierende Therapie (mit DMDs)	hohe Krankheitsaktivität	gepulste Applikation	Alemtuzumab Cladribin Ocrelizumab	mit Schüben	1. Wahl Cladribin Interferon- β -1b Ocrelizumab Ofatumumab Ponesimod Siponimod	
		kontinuierliche Applikation	Fingolimod Natalizumab Ofatumumab Ozanimod Ponesimod		2. Wahl Mitoxantron	
	milde/moderate Krankheitsaktivität	1. Wahl Dimethylfumarat Glatirameracetat Interferon- β -1a Interferon- β -1b Teriflunomid		ohne Schübe, mit MRT-Aktivität	Siponimod	Klinische oder MRT-Aktivität Ocrelizumab
		2. Wahl Azathioprin				

Dieses Schema veranschaulicht die aktuell (2022) gültige Empfehlung der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) zur akuten und verlaufsmodifizierenden Therapie der MS. Diese Abbildung ist nach Wiendl *et al.* [58] modifiziert. Die aufgelisteten Wirkstoffe sind alphabetisch geordnet und sollen keine Wertung der Wirkstoffe angeben.

DMD: *disease-modifying drug*; MRT: Magnetresonanztomografie; MS: Multiple Sklerose; MSTKG: Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe; PPMS: primär progrediente MS; RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS.

1.2. Telomere

Telomere sind sich wiederholende DNA-Sequenzen am Ende eines jeden Chromosomenarms. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1978 [67] konnten viele Erkenntnisse über die Struktur und Funktionsweise der Telomere gesammelt und Assoziationen mit verschiedenen Krankheiten aufgezeigt werden (Kap. 1.2.1. und 1.2.3.). Telomere haben eine erbgutschützende Funktion und ihre Länge gilt als Marker des biologischen Alters von Zellen und Organismen. Der Suchbegriff „telomer*“ ergibt aktuell (08.11.2022) 45.294 Ergebnisse in der wissenschaftlichen Literaturdatenbank PubMed, mit einer jährlich stark ansteigenden Zahl an publizierten Artikeln, was das Potenzial und das große Interesse an der Telomerforschung zeigt.

1.2.1. Struktur und Funktion

Telomere bestehen beim Menschen aus nicht-kodierenden repetitiven Sequenzen des Hexanukleotids „TTAGGG“ und einem Guanin-reichen Überhang am 3'-Ende (Abb. 3) [68,69]. Die Hauptaufgabe der Telomere ist der Schutz der Erbinformation auf den Chromosomen vor internen und externen Einflüssen mit schädigender Wirkung. Des Weiteren gehören zu den Telomeren der Proteinkomplex Shelterin, welcher aus sechs Proteinuntereinheiten besteht, sowie weitere assoziierte Proteine [70]. Die Telomerlänge (TL) unterscheidet sich von Mensch zu Mensch und beträgt zwischen fünf und 15 Kilobasen (kb) [69]. Im Laufe des Lebens verlieren die Telomere physiologischerweise an Länge, vor allem durch Zellteilungen und oxidativen Stress [71]. Dies ist u. a. auf das Endreplikationsproblem zurückzuführen, welches das Phänomen beschreibt, dass bei der Replikation der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) die Tochterstränge jeweils kürzer repliziert werden als die Mutterstränge. Zur Replikation binden Primer an den Leit- und Folgestrang, wodurch DNA-Polymerasen die Tochterstränge vom 5'-Ende in Richtung des 3'-Endes synthetisieren können. Am Ende der Replikation werden die Primer durch DNA ersetzt, wird dafür jeweils ein freies 3'-Ende vor dem Primer benötigt. Da dieses an den 5'-Enden der Tochterstränge nicht vorhanden ist, geht der Primer verloren, wodurch der Tochterstrang einen Teil seiner Länge verliert. Da die Telomere keine genetische Information tragen, ist dieser Verlust vorerst unproblematisch. Beim Menschen werden die Telomere dadurch um ca. 30 bis 70 Basenpaare pro Jahr kürzer, wobei sich die Raten verschiedener Gewebe unterscheiden [72-74]. Den somatischen Zellen ist somit ein natürliches Limit für die Anzahl an Replikationen gesetzt, da die Telomere eine notwendige Mindestlänge nicht unterschreiten dürfen. Diese Mindestlänge wird durch das sogenannte Hayflick-Limit beschrieben [75]. Sobald eine kritische TL unterschritten wird, ist das sogenannte „capping“ der Telomere durch die Proteine des Shelterin-Komplexes nicht mehr möglich [76] und eine DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) wird induziert, was zur Zellseneszenz (Zellzyklusarrest), Apoptose (gezielt induzierter Zelltod) oder zur malignen Umwandlung der Zellen führt [69,71].

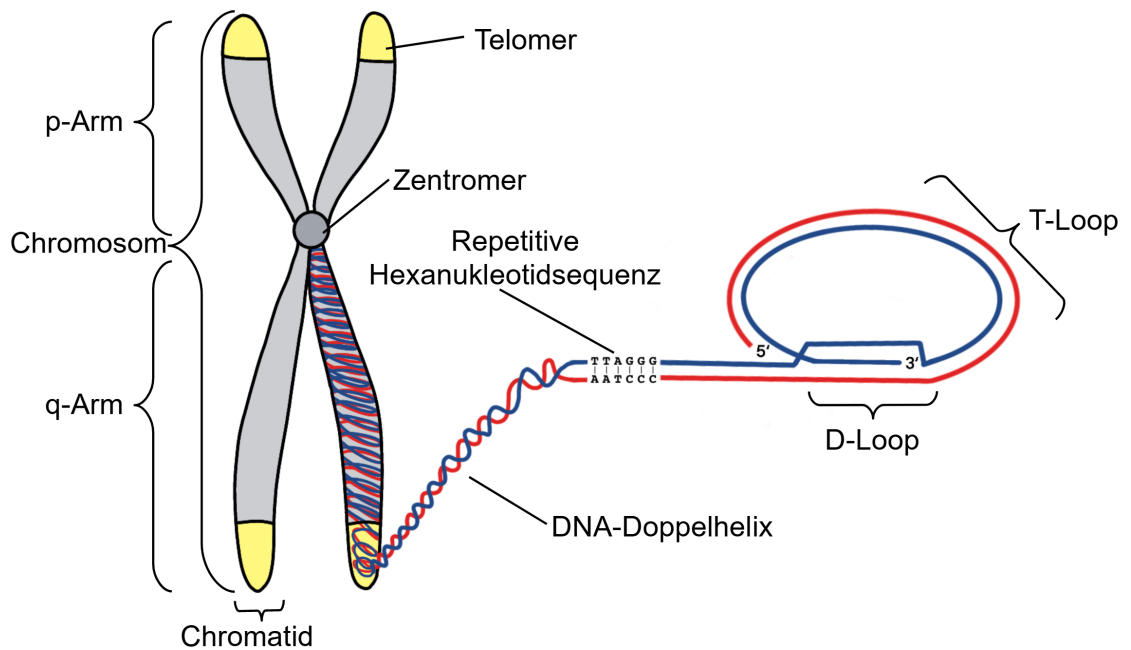


Abb. 3: Lokalisation der Telomere am Chromosom

Die Abbildung zeigt die Position der Telomere (in gelb, vereinfacht, nicht proportional dargestellt) an den Enden eines Chromosoms. Beim Menschen bestehen diese aus der repetitiven Hexanukleotidsequenz „TTAGGG“, gelesen in der 5´-3´-Richtung des Leitstranges, und dienen u. a. dem Schutz der Chromosomen und der darin gespeicherten Erbinformationen. Dazu bilden sie die sogenannte Telomerschleife (T-Loop) und die Verdrängungsschleife (D-Loop). Der Leitstrang der DNA ist blau, der Folgestrang rot dargestellt. Diese Abbildung wurde mit dem Programm ProCreate (Version 5.2.9) erstellt.

DNA: Desoxyribonukleinsäure; D-Loop: *displacement loop*, Verdrängungsschleife; p-Arm: kurzer Arm des Chromosoms; q-Arm: langer Arm des Chromosoms; T-Loop: Telomerschleife; u. a.: unter anderem.

Um den Verlust der Telomere zu verhindern, besitzen Zellen der Keimbahn und Stammzellen ein Enzym, welches die Telomere wieder verlängern kann, die Telomerase [77]. Hierbei handelt es sich um eine Reverse Transkriptase, die aus zwei essentiellen Untereinheiten besteht, zum einen der Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT), dem eigentlichen Enzym, und zum anderem der RNA-Komponente (*telomerase RNA component*, hTERC), die der hTERT als Vorlage zur Synthese der Telomere dient [71]. In somatischen Zellen ist die Telomerase nur wenig oder gar nicht exprimiert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Telomerase in entarteten Tumorzellen pathologisch aktiviert ist [78]. Dadurch besitzen Tumorzellen eine nahezu unbegrenzte Replikationskapazität und es wird verhindert, dass sie durch Apoptose absterben. Ein weiterer Prozess, durch den bei fünf bis 15% der Tumoren die Telomere erhalten werden, ist die alternative Verlängerung der Telomere (*alternative lengthening of telomeres*, ALT) [79,80]. Hierbei kommt es unabhängig von der Telomerase zur Verlängerung der Telomere durch homologe Rekombination, bei der andere Telomere als Vorlage dienen [81]. Dieser Prozess konnte bspw. auch in Plazentazellen während der Frühphase der Schwangerschaft nachgewiesen werden [81].

Telomere bilden an ihren Enden zwei Schleifen, zum einen die Telomerschleife (*telomere loop*, T-Loop) und zum anderen die Verdrängungsschleife (*displacement loop*, D-Loop) [69] (Abb. 3). Der T-Loop dient u. a. dazu, dass das Ende des Chromosomenarms nicht als DNA-Doppelstrangbruch erkannt wird. Der D-Loop schützt den guanosinreichen 3´-Überhang des Telomers, indem er mit der doppelsträngigen Telomerstruktur eine dreisträngige Sequenz ausbildet [69]. Für die Ausbildung dieser beiden Schleifen sind die Proteine TRF1 und TRF2, die Teil des Shelterin-Komplexes sind, von großer Bedeutung [82].

1.2.2. Verfahren zur Messung von Telomerlängen (TL)

Die TL kann mit verschiedenen Methoden in unterschiedlichen Geweben gemessen werden. Die erste etablierte Methode war die Messung der Telomer-Restriktionsfragmentlänge (TRFL) mittels *Southern Blot* [83]. Hierbei wird die genomische, nicht-telomerische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, wobei die Telomere unberührt bleiben. Anschließend folgen Gel-Elektrophorese, *Southern Blot* und die Hybridisierung der Telomere mit Sonden, die üblicherweise mit Hilfe von spezifischen, Enzym-gekoppelten AK als Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Aus der Stärke des Signals kann dann die mittlere TL ermittelt werden [83].

Eine neuere etablierte Methode ist die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), die von Richard M. Cawthon im Jahr 2002 [84] eingeführt und 2009 [85] überarbeitet wurde. Die Telomere und ein Einzelkopiegen werden mit Hilfe einer qPCR vervielfältigt und mit Fluoreszenzmarkern gemessen. Die gemessenen Werte werden anschließend in ein Verhältnis gesetzt, durch das die mittlere TL errechnet wird. Dabei ist T das Signal der Telomere und S das Signal des Einzelkopiegens, woraus sich die *T/S-Ratio* (Telomer-Einzelkopiegen-Verhältnis) ergibt. Ein Wert >1 steht hierbei für relativ längere Telomere, ein Wert <1 für relativ kürzere Telomere im Vergleich zu einer Referenz-DNA.

Eine weitere etablierte TL-Messmethode ist die quantitative Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Q-FISH), bei der die Telomere mit telomerspezifischen Peptid-Nukleinsäuren hybridisiert werden und mikroskopisch deren Fluoreszenzintensität, die proportional zur TL ist, gemessen wird [86]. Anders als bei *Southern Blot* und qPCR kann hier die Länge einzelner Telomere bestimmt werden. Weitere Verfahren zur Telomerlängenmessung sind die Einzel-Telomer-Längen-Analyse (*Single Telomere Length Analysis*, STELA) [87] und die darauf aufbauende universale STELA (U-STELE) [88]. Beide Methoden basieren auf Ligation spezifischer *Linker* und *Primer* an die Telomere mit anschließender qPCR, Gelelektrophorese und *Southern Blot*. Mit diesen Methoden kann chromosomenspezifisch das Spektrum der TL gemessen werden. Zur genauen Messung speziell der kürzesten Telomere wurde das *Telomere Shortest Length Assay* (TeSLA) entwickelt [89]. Diese Messmethode basiert, wie STELA und U-STELE, auf Ligation, qPCR und *Southern Blot* mit einigen Veränderungen.

Neueste Messmethoden, wie das *single telomere absolute-length rapid* (STAR) assay [90], das mit der digitalen qPCR arbeitet, sind hinsichtlich der Messgenauigkeit und der Erforschung von telomererhaltenden Mechanismen vielversprechend. Auch die Analyse ganzer Chromosomen und des menschlichen Genoms mithilfe der (ultra-)langen DNA-Sequenzierung (*long-read sequencing*) kann Aufschlüsse über die chromosomenspezifische TL und Veränderungen der DNA geben [91,92]. Eine weitere neue Methode ist die Messung einzelner TL durch *molecular combing* [93]. Hierbei wird die extrahierte DNA gedehnt und anschließend mit telomerspezifischen Sonden hybridisiert und gefärbt. Daraufhin kann die TL durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Alle Methoden haben Limitationen, die bei der Planung von TL-Messungen, bspw. im Rahmen von Studien, berücksichtigt werden müssen [94,95].

1.2.3. Assoziationen zwischen TL und Krankheiten

Seit langem werden Telomere als Biomarker für das biologische Alter diskutiert, da sie bei jeder Zellteilung kürzer werden und in den meisten somatischen Zellen nicht verlängert werden können [74,96,97]. Das biologische Alter kann sich individuell zum Teil stark vom chronologischen Alter unterscheiden, da es durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird [96,98]. Neben dem biologischen Alter sind Veränderungen der TL aber auch mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, bei denen den Telomeren teilweise ein relevanter diagnostischer und prognostischer Wert zugeschrieben wird. So konnten in Blutzellen von Patienten mit Diabetes mellitus (DM) Typ 1 und 2 signifikant kürzere Telomere festgestellt werden als bei Nicht-Diabetikern [99,100]. Außerdem war die Telomerverkürzung bei pädiatrischen Patienten mit DM Typ 1 beschleunigt [101]. Die erhöhte oxidative Beschädigung der DNA, die bei Typ 2 Diabetikern auftrat, korrelierte darüber hinaus negativ mit der TL [100]. Ferner wurde gezeigt, dass Individuen mit einer schlechteren allgemeinen kardiovaskulären Gesundheit eine kürzere Leukozyten-TL (LTL) hatten als jene mit einem „idealen“ Gesundheitszustand [102]. Außerdem war, verglichen mit gesunden Kontrollen, eine kürzere LTL mit dem Auftreten von asymptomatischer Atherosklerose der Herzkranzgefäße und mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen, Myokardinfarkte und Schlaganfälle assoziiert [103-105]. Auch bei Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen konnten in unterschiedlichen Geweben veränderte TL nachgewiesen werden. So wurden in Zellen von Sarkomen und niedriggradigen Gliomen längere Telomere gemessen, jedoch zeigten die meisten Krebserkrankungen eine Assoziation mit kürzeren Telomeren im Vergleich zu Kontrollen [106,107]. Bisher ist ungeklärt, weshalb bei einigen Krebserkrankungen längere Telomere auftreten als bei anderen, allerdings konnte in Krebszellen eine pathologische Aktivierung der Telomerase sowie ALT (Kap. 1.2.1.) beobachtet werden [78,79,108]. Gegenwärtig wird vermutet, dass das Umgehen von Apoptose- und Seneszenzmechanismen in Kombination mit weiteren Faktoren die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigt [107].

In mehreren Studien konnten bei Patienten mit altersbedingten neurologischen Krankheitsbildern Veränderungen der TL festgestellt werden. Beispielsweise hatten Patienten mit Morbus (M.) Alzheimer im Vergleich zu Kontrollen kürzere Telomere in verschiedenen Geweben [109]. Auch bei Patienten mit psychologischen Erkrankungen, bspw. Depressionen und Angststörungen, wurden verkürzte Telomere im Vergleich zu Kontrollen gemessen [110-116]. Als möglicher Grund für die kürzeren Telomere bei psychischen Krankheiten wird ein erhöhtes Stresslevel vermutet. Die TL wurde auch im Hinblick auf die MS untersucht. Die aktuelle Studienlage zu TL bei Patienten mit MS wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit systematisch recherchiert und ist in Kap. 4.2. dargestellt.

Während einige Krankheiten mit Veränderungen der TL assoziiert sind, betreffen Telomeropathien primär die Telomere. Diese Erkrankungen resultieren aus Mutationen in den für den Erhalt und die Funktion der Telomere relevanten Genen, bspw. hTERT [117]. Diese führen u. a. zur schnelleren Verkürzung der TL sowie zur beschleunigten Alterung von regenerativen Geweben [117]. Ein Beispiel für Telomeropathien ist die Dyskeratosis congenita, die aufgrund von pathologischen Varianten in telomerassozierten Genen verkürzte Telomere sowie heterogene klinische Bilder bei den Patienten verursacht [118]. Bei über der Hälfte der Patienten mit Telomeropathien zeigen sich Auffälligkeiten im MRT des Gehirns, bspw. eine verstärkte Atrophie des ZNS oder Läsionen [119]. Die Anzahl der Auffälligkeiten assoziierte dabei negativ mit der TL.

1.3. Zelluläre Seneszenz und MS

Telomere werden physiologischerweise im Laufe des Lebens kürzer [71]. In Abhängigkeit der TL können dabei Gene am Chromosomenende über lange Distanzen reguliert und somit Zell- und Gewebefunktionen verändert werden [120]. Dieser Vorgang wird Telomer-Positions-Effekt über lange Distanzen (*telomere position effect over long distances*, TPE-OLD) genannt. Das Unterschreiten einer kritischen TL kann zur replikativen Seneszenz führen, ein Zustand, in dem sich Zellen nicht mehr teilen, jedoch können sie im sogenannten Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) proinflammatorische Zytokine sezernieren [121]. In Untersuchungen von Backhefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde vermutet, dass vor allem die kürzesten Telomere eine Schlüsselrolle für die Seneszenz inne haben [122]. Vermehrter Oxidativer Stress kann im menschlichen Körper zu einer Verkürzung der Telomere führen, was als einer der Hauptgründe für die Immunseneszenz angesehen wird [71]. Immunseneszenz und Entzündungsaltern sind durch eine erhöhte Anzahl an Effektor- und Gedächtniszellen, eine abgeschwächte Immunantwort auf Pathogene und Impfungen, eine verringerte Anzahl an naiven Immunzellen sowie eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Autoantikörpern charakterisiert [123]. Die seneszenten Zellen können sich in verschiedenen Geweben ansammeln und dort zu andauernden Entzündungen sowie Verlust der Funktion führen [124,125]. Bei älteren Patienten konnten im ZNS erhöhte Marker für oxidativen Stress und Entzündungen nachgewiesen werden, was mögliche Anzeichen für altersassoziierte Entzündungsreaktionen sein könnten [126]. Es wird vermutet, dass oxidativer Stress, Telomerverlust, Immunseneszenz und Entzündungsaltern eine grundlegende Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, u. a. kardiovaskulären, neoplastischen und Autoimmunkrankheiten, spielen [123].

Die genauen Zusammenhänge zwischen der Pathogenese der MS und Immunseneszenz sowie Entzündungsaltern sind bisher ungeklärt, allerdings konnten im Blut von Patienten mit MS im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Werte von Markern für oxidativen Stress sowie eine verringerte antioxidative Kapazität gemessen werden, was Hinweise auf vorzeitiges Altern und Immunseneszenz bei Patienten mit MS gibt [127-129]. Es ist denkbar, dass kürzere Telomere einen Einfluss auf die Pathophysiologie der MS sowie den Krankheitsverlauf haben, allerdings wurden Telomere bei Patienten mit MS bislang wenig untersucht. Bisher ist ebenfalls nicht klar, inwieweit die TL mit klinischen Parametern der MS-Patienten (bspw. dem EDSS-Score) korrelieren und ob die TL als potenzieller Biomarker einen prädiktiven Wert für den klinischen Verlauf hat. Sowohl das Risiko für eine Erkrankung an MS als auch die Schwere der Erkrankung und die TL wurden mit verschiedenen genetischen und nicht-genetischen Faktoren in Verbindung gebracht. Bisher wurde allerdings nicht umfassend untersucht, welche Faktoren sowohl mit der MS als auch der TL assoziiert sind. Die Erforschung der Zusammenhänge zwischen MS und Telomeren könnte daher helfen, das Verständnis der Pathomechanismen der MS zu verbessern, die Relevanz verschiedener potenzieller Einflussfaktoren aufzuzeigen und den individuellen Einfluss der Therapien (DMT bzw. DMDs) auf die TL zu evaluieren.

2. Fragestellungen

Der MS liegen multifaktorielle Pathomechanismen zugrunde, die bis heute nicht gänzlich verstanden sind. Ziel dieser Arbeit war es einerseits, die LTL in einer „Rostocker Kohorte“ von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen in einer Studie zu vergleichen und mögliche Zusammenhänge mit dem klinischen Verlauf der Patienten zu identifizieren. Andererseits sollten existierende Studien zur TL bei Patienten mit MS identifiziert, systematisch analysiert und verglichen werden. Außerdem sollten gemeinsame Faktoren gefunden werden, die sowohl mit dem Risiko und/oder der Schwere der MS als auch mit der TL in der Literatur assoziiert worden sind.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit adressiert:

Analyse der LTL bei Patienten mit MS und Kontrollen (Rostocker Kohorte)

- Wie ist die „Rostocker Kohorte“ klinisch und soziodemografisch charakterisiert?
- Wie unterscheiden sich RRMS- und PPMS-Patienten der „Rostocker Kohorte“ hinsichtlich der Krankheitsdauer und des Grades der Beeinträchtigung durch die Erkrankung?
- Korreliert das Alter der Individuen mit deren LTL?
- Gibt es einen Unterschied zwischen den Geschlechtern in Bezug auf die LTL?
- Unterscheidet sich die LTL zwischen Patienten mit MS und Kontrollen signifikant?
- Bestehen signifikante Unterschiede in der LTL zwischen Patienten mit RRMS und PPMS?
- Inwieweit ist die LTL mit Behinderungsgrad und -progression assoziiert?
- Ist die LTL bei Patienten mit RRMS mit der Schubrate bzw. der Konversionsrate zur SPMS assoziiert?
- Ist die LTL bei Patienten mit RRMS mit der Medikation assoziiert?
- Wie verändert sich die LTL bei Patienten mit MS über einen Zeitraum von zehn Jahren?
- Unterscheidet sich die Dynamik der LTL-Verkürzung über zehn Jahre zwischen Patienten mit RRMS und PPMS?

Systematische Literaturrecherche zur TL bei Patienten mit MS

- Wie viele Untersuchungen der TL wurden bisher bei Patienten mit MS durchgeführt?
- In welchen Zellen wurde die TL bei MS-Patienten bisher untersucht?
- Welche Methoden wurden bisher zur Messung der TL bei Patienten mit MS angewandt?
- Wurden in den identifizierten Studien signifikante Unterschiede der TL zwischen Patienten mit MS und Kontrollen bzw. zwischen Patienten unterschiedlicher Verlaufsformen nachgewiesen?
- War die TL in den Studien mit klinischen Parametern der Patienten, bspw. der Schubrate und dem Behinderungsgrad, assoziiert?
- Lassen sich die bisherigen Befunde zu LTL bei Patienten mit MS metaanalytisch aggregieren?

Literaturrecherche nach mit der MS und der TL assoziierten Faktoren

- Welche genetischen Faktoren wurden bisher mit einem potenziellen Einfluss auf die Suszeptibilität für MS bzw. die Krankheitsschwere und die TL in Verbindung gebracht?
- Welche Umweltfaktoren sind nach der aktuellen Studienlage sowohl mit dem Risiko an einer MS zu erkranken und/oder dem Schweregrad der Erkrankung als auch mit der TL assoziiert?
- Für welche Variablen des Lebensstils konnten bisher mögliche Zusammenhänge mit MS-Risiko und Krankheitsaktivität sowie TL festgestellt werden?
- Wie wirken sich Interaktionen zwischen verschiedenen mit der MS assoziierten Faktoren auf das MS-Risiko bzw. auf die TL aus?

3. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Schwerpunkten, deren Durchführung in den folgenden Kap. erläutert werden soll (Abb. 4). Im ersten Schwerpunkt der Arbeit wurde eine Studie zur LTL bei Patienten mit MS durchgeführt (Kap. 3.1.). Im anschließenden zweiten Schwerpunkt wurde eine systematische Literatursuche, in der nach Studien gesucht wurde, im Rahmen derer die TL bei Patienten mit MS gemessen wurde, durchgeführt, um die eigenen Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext zu setzen und sie mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen (Kap. 3.2.). Des Weiteren wurde eine klassische Literatursuche zu mit MS und TL assoziierten genetischen, Umwelt- und Lebensstilfaktoren durchgeführt (Kap. 3.2.5.).

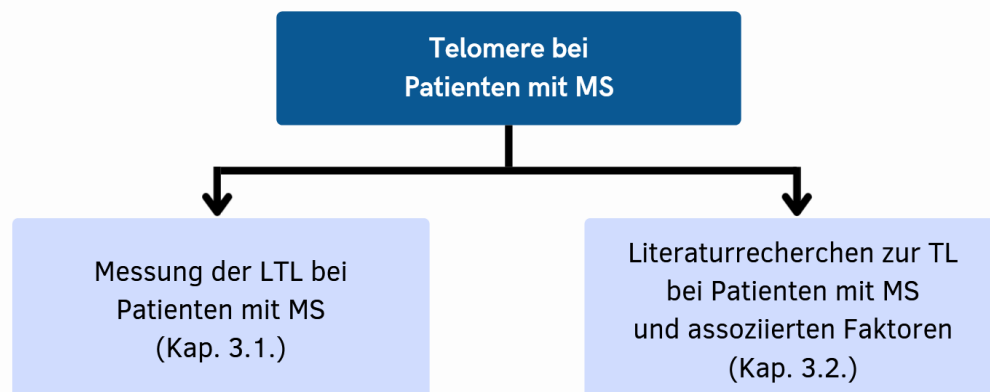


Abb. 4: Überblick über die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeiten

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Schwerpunkte unterteilt. Im ersten Schwerpunkt der Arbeit (links in der Abb.) wurde die LTL bei Patienten mit MS in der „Rostocker Kohorte“ gemessen und mit der LTL von gesunden Kontrollen verglichen. Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit wurden zwei Literaturrecherchen durchgeführt (rechts in der Abb.). Es wurde systematisch nach TL-Studien bei Patienten mit MS gesucht und nach mit der MS und der TL assoziierten Faktoren recherchiert. Diese Abbildung wurde mit dem Online-Tool Canva erstellt. Abb.: Abbildung; Kap.: Kapitel; LTL: Leukozyten-Telomerlänge; MS: Multiple Sklerose; TL: Telomerlänge.

3.1. Messung der Leukozyten-TL (LTL) in der Rostocker Kohorte

3.1.1. Studiendesign

Im Folgenden soll der Ablauf der experimentellen Studie kurz zusammengefasst und in den folgenden Kap. näher darauf eingegangen werden.

Im Rahmen eines vorhergegangenen Forschungsprojektes der Arbeitsgruppe um Prof. Zettl (Sektion Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock) wurden 600 Patienten mit MS und 600 Kontrollen aus Nordostdeutschland rekrutiert (Kap. 3.1.2.). Soziodemografische sowie krankheitsspezifische Informationen der Patienten wurden erhoben und in eine Datenbank eingepflegt. Den Patienten und Kontrollen wurde nach deren Zustimmung eine peripher-venöse Blutprobe abgenommen. Aus dieser wurde die DNA isoliert und deren Konzentration bestimmt. Anschließend wurde die DNA-Probe in einer Biobank eingelagert (Kap. 3.1.3.). Aus den in der Biobank eingelagerten DNA-Proben wurden zum Zwecke der Studie zur LTL bei Patienten mit MS Proben von 40 Patienten mit RRMS, 20 Patienten mit PPMS und 60 gesunden Kontrollen ausgewählt (Abb. 5), wobei auf ein Geschlechterverhältnis von 1:1 (weiblich : männlich) und ein annähernd gleiches Durchschnittsalter der Gruppen geachtet wurde (Kap. 3.1.4.). Die Anzahl der ausgewählten Patienten orientierte sich dabei an vergleichbaren Studien zu Telomeren bei

Patienten mit MS. In den DNA-Proben wurde die relative TL mithilfe der qPCR (Kap. 1.2.2. und 3.1.5.) ermittelt. Schließlich wurden die gewonnenen Daten statistisch analysiert.



Abb. 5: Workflow des ersten Schwerpunktes dieser Arbeit

Abgebildet ist der Abreitsablauf des ersten Schwerpunktes dieser Arbeit. Begonnen wurde diese durch Auswahl der DNA-Proben von 60 Patienten mit MS und 60 alters- und geschlechts-*gematchten* gesunden Kontrollen. Anschließend wurde die LTL mit Hilfe der qPCR-Methode nach Cawthon [85] gemessen und die gewonnenen Daten schließlich statistisch ausgewertet. Die Abbildung wurde mit dem Online-Tool Canva (Version 1.38) erstellt.

LTL: Leukozyten-Telomerlänge; MS: Multiple Sklerose; qPCR: quantitative Polymerase-Kettenreaktion.

3.1.2. Rekrutierung der Patienten und Kontrollen

Die Rekrutierung der Patienten mit MS erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock von Oktober 2003 bis April 2010 im Rahmen eines Forschungsprojektes unter der Leitung von Prof. Zettl. Es waren 600 Patienten mit MS dazu bereit, Blutproben zur DNA-Isolation und -Analyse zu spenden. Die Diagnosestellung wurde nach den zu der Zeit empfohlenen Diagnosekriterien für MS nach McDonald bestätigt [38,39]. Die Therapie der Patienten mit MS erfolgte entsprechend der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). Die Verlaufsform (CIS, RRMS, SPMS oder PPMS) wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme (BE) bestimmt. Zusätzlich wurden weitere patienten- und krankheitsspezifische Daten erhoben, u. a. Alter, Geschlecht, EDSS-Score, ARMSS-Score und Erkrankungsdauer. Die Patienten wurden, wenn möglich, über einen Folgezeitraum von zehn Jahren nachverfolgt, sodass Informationen wie Medikationswechsel, Schübe, EDSS-Scores und gegebenenfalls Konversionen der Verlaufsform retrospektiv aus den Patientenakten erhoben werden konnten. Die Kontrollpopulation umfasste ebenfalls 600 Individuen und bestand sowohl aus Rostocker Studierenden als auch aus freiwilligen Spendern. Letzteren wurde im Rahmen der allgemeinen Gesundheitsuntersuchung in drei Arztpraxen in Nordbrandenburg ebenfalls Blut zu Studienzwecken abgenommen. Ausschlusskriterium für die Rekrutierung in die Kontrollpopulation waren bestehende Autoimmunerkrankungen (sowohl MS als auch anderweitige). Die DNA-Proben wurden in einer Biobank am Institut für Immunologie der Rostocker Universitätsmedizin bei -20°C gelagert. Nach einer Dauer von über zehn Jahren konnte von zehn Patienten mit MS eine zweite Blutprobe gewonnen werden, aus der ebenfalls die DNA isoliert wurde.

Alle Patienten und Kontrollen wurden zuvor über das Forschungsprojekt aufgeklärt. Alle gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Verwendung ihrer DNA zu Forschungszwecken. Die vorliegende Studie wurde nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Es lagen zwei positive Vota für die Studie von der Ethikkommission der Universität Rostock vor (Registriernummer II HV 09/2006 für alle Patienten und Kontrollen und Registriernummer A 2019-0047 für die erneute BE bei zehn Patienten mit MS).

3.1.3. Probengewinnung und -aufbereitung

Die Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben wurde durch Doktoranden der Arbeitsgruppe von Prof. Zettl im Rahmen derer Dissertationen durchgeführt. Im Folgenden soll nur ein kurzer Überblick über die Arbeitsschritte gegeben werden. Der Leser sei an dieser Stelle für weitere Details auf zwei Dissertationsarbeiten verwiesen [130,131].

Sowohl den Patienten als auch den Kontrollen wurden jeweils Vollblutproben (8,5 ml) durch Punktion einer peripheren Vene mit einer *Venofix Butterfly*-Kanüle in ein *PAXgene Blood DNA Tube* (PreAnalytiX) entnommen. Diese Proben wurde innerhalb von 14 Tagen bei Lagerung unter Ausschluss von Licht und bei Raumtemperatur zum Institut für Immunologie transportiert.

Die DNA wurde mit Hilfe des DNA-Isolations-Sets der Firma PreAnalytiX aus dem Vollblut isoliert. Die Blutproben wurden hierbei in mehreren Arbeitsschritten mit Lyse-, Wasch- und Digestionspuffern versetzt und gemischt. In Zwischenschritten konnte das Gemisch mit Hilfe einer Zentrifuge von der enthaltenen Flüssigkeit getrennt werden. Anschließend wurde das isolierte DNA-Pellet mit Alkohol gewaschen, mit Resuspensionspuffer versetzt und in mehreren Schritten inkubiert. Die isolierte DNA wurde daraufhin bei -20° Celsius in Eppendorfröhrchen eingelagert.

Zur Bestimmung der Probenqualität wurde das Gerät NanoDrop 1000 verwendet, welches mit RNase-freiem Wasser und BG4-Puffer kalibriert wurde. Die DNA wurde mittels einer Pipette auf den Messpunkt gebracht und die photometrische Absorption bei je 260 und 280 Nanometern Wellenlänge gemessen. Daraus konnte anschließend die Reinheit und Konzentration der DNA im Gemisch berechnet werden.

3.1.4. Auswahl der Proben

Da in zuvor durchgeführten vergleichenden Studien zu TL bei Patienten mit MS und Kontrollen von zehn bis 138 reichte (Kap. 4.2.1.2., Tab. 3), wurde die Anzahl der zu untersuchenden Patientenproben auf jeweils 60 festgelegt. Aus den eingelagerten Proben wurden 40 Proben von Patienten mit RRMS, 20 Proben von Patienten mit PPMS und 60 Proben von gesunden Kontrollen ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass alle drei Gruppen ein Geschlechtsverhältnis von 1:1 (weiblich : männlich) und ein annähernd gleiches Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der BE hatten (*matching*). Die DNA-Proben lagerten über neun Jahre bei -20° Celsius.

3.1.5. Messung der LTL

Mit Hilfe der *multiplex* qPCR nach Cawthon [85] (Kap. 1.2.2.) konnte die durchschnittliche relative LTL in den DNA-Proben bestimmt werden. Die Messungen wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter Leitung von Prof. Walter an der Universitätsmedizin Rostock mit leichten Modifikationen [132] durchgeführt. Für die qPCR wurden die Telomerprimer *telg* und *telc* und die Albuminprimer *albu* und *albd* nach Cawthon [85] verwendet. Die T- und S-Signale wurden im Verhältnis zu einer Referenz-DNA gemessen, die durch *pooling* aller Proben gebildet wurde. Durch eine Verdünnungsreihe wurden sechs Konzentrationsstufen der Referenz-DNA (bis 243-fache DNA-Konzentration) gebildet. Anschließend wurden die Konzentrationsstufen in Triplikaten analysiert.

In 384-well Mikroplatten von Bio-Rad wurde die qPCR mit der Titanium Taq DNA-Polymerase von Takara Bio und jeweils 20 ng/µl Proben-DNA durchgeführt. Mit Hilfe des Bio-Rad CFX384 *real-time*

PCR *detection system* mit C1000 *thermal cycler* konnten die SYBR Green fluoreszierenden Signale während der qPCR gemessen werden. Mit dem Programm Bio-Rad CFX Manager 3.1 wurden die Schmelzkurven analysiert und der Schwellenwertzyklus (C_a) bestimmt. Jede der 120 Proben wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils ein Mal gemessen (insgesamt drei Messungen pro Probe). Die LTL wurde als einheitslose, relative T/S-Ratio berechnet, die das Verhältnis des Telomer-Signals (T) zum Einzelkopiegen-Signal (S) angibt (Kap. 1.2.2.). Dabei wurde die relative Quantität anhand der Standardkurven für die T- und S-Signale ermittelt. Der Mittelwert über die Triplikate ergab die LTL der jeweiligen DNA-Probe. Eine T/S-Ratio >1 signalisiert eine relativ lange LTL, ein T/S-Verhältnis <1 eine relative kurze LTL im Vergleich zur Referenz-DNA. Zur technischen Validierung durchliefen 15 zufällig gewählte Proben von Patienten mit MS und 15 zufällig gewählte Proben von Kontrollen den Prozess ein zweites Mal. Alle Messungen erfolgten verblindet.

Zusätzlich wurde von zehn Patienten eine zweite Blutprobe entnommen und erneut die *Baseline*-LTL (LTL zum Zeitpunkt der BE) und zusätzlich die LTL nach über zehn Jahren verblindet gemessen. Die Messung der LTL dieser Proben erfolgte nach dem gleichen Prozedere wie im vorherigen Absatz beschrieben. Insgesamt wurde 170 LTL-Messungen durchgeführt.

3.1.6. Datenanalyse

Die statistische Analyse aller in der Studie gewonnenen Daten wurde in der Programmiersprache R (Version 3.6.0) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ gesetzt. Da diese Studie einen explorativen Charakter hatte, wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet. Die LTL-Daten wurden auf Normalverteilung geprüft, woraufhin die entsprechenden statistischen Tests ausgewählt wurden.

Über die Triplikate wurde die Intra-Assay-Variabilität berechnet. Mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Pearson wurde einerseits die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse anhand der technischen Duplikate und andererseits die Korrelation zwischen Alter und LTL bestimmt. Die Prüfung auf Unterschiede in der durchschnittlichen LTL zwischen den drei Gruppen (Patienten mit RRMS oder PPMS und Kontrollen) erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA). Durch Aufteilung der Geschlechter und Eliminierung der extremsten LTL-Messwerte wurden Subgruppen- bzw. Sensitivitätsanalysen durchgeführt. Mit Hilfe des Zweistichproben-Welch-*t*-Tests und dem Mann-Whitney-*U*-Tests wurden Patienten mit RRMS und Patienten mit PPMS hinsichtlich metrischer Variablen verglichen. Für den Vergleich beider Gruppen hinsichtlich kategorischer Variablen wurden der exakte Test nach Fisher und der Chi-Quadrat-Test verwendet. Mit der Anova-Funktion des *car*-Pakets für R wurde mit dem *F*-Test für lineare Modelle (ANOVA oder Regression) die Assoziation der klinisch-demografischen Parameter mit der LTL analysiert. Hierbei wurden, falls angebracht, sowohl Geschlecht als auch Alter als mögliche Störgrößen einbezogen. Mit Hilfe der univariablen und multivariablen binären logistischen Regression wurde das Chancenverhältnis (*odds ratio*, OR) berechnet, ein T/S-Ratio >1 (relativ lange Telomere) zu haben, wobei das T/S-Verhältnis die abhängige Variable darstellte. Als unabhängige Variablen wurden in dieser Berechnung Gruppenangehörigkeit, Alter und Geschlecht berücksichtigt.

Durch den gepaarten *t*-Test wurde für die zehn Patienten, von denen sowohl zum Studienbeginn (*Baseline*) als auch nach mehr als zehn Jahren eine Blutprobe vorlag, die Veränderung der LTL

über den Zeitraum untersucht. Mit Hilfe der linearen Regression wurde für diese Patienten auf Assoziation zwischen Veränderung der LTL und Veränderung des EDSS-Scores geprüft.

Für die Betrachtung der vergangenen Zeit seit der BE (in Monaten) bis zur Konversion der Patienten mit RRMS zur SPMS wurde ein Kaplan-Meier-Diagramm erstellt. Hierbei wurden die Patienten anhand der LTL in eine Gruppe mit relativ kurzen (*T/S-Ratio* <1) und eine Gruppe mit relativ langen Telomeren (*T/S-Ratio* >1) unterteilt und verglichen. Hinsichtlich der Zeit bis zur Konversion wurde auf Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen durch Berechnung der *hazard ratio* (HR) und des Log-Rank-Tests mit der Breslow-Methode getestet (Cox-Regression). Dabei erfolgte eine Rechtszensurierung aller Patienten, die entweder während des Nachbeobachtungszeitraums verloren gegangen sind, bspw. durch einen Wechsel des Wohnorts, oder bei denen es nicht zur Konversion kam. Das Vorliegen einer Assoziation zwischen der *Baseline*-LTL und den jährlich erhobenen EDSS-Scores über den Folgezeitraum von zehn Jahren bei den Patienten mit RRMS wurde mit Hilfe eines linearen gemischten Modells analysiert.

3.2. Literaturrecherche zur potenziellen Relevanz von TL bei MS

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit soll in den folgenden Kap. methodisch dargestellt werden. Dieser teilt sich in eine systematische Literaturrecherche nach TL-Studien bei Patienten mit MS (Abb. 6, links, S. 27; Kap. 3.2.1. - 3.2.4.) und die Recherche nach Faktoren, die sowohl mit der MS als auch mit der TL assoziiert sind (Abb. 6, rechts, S. 27; Kap. 3.2.5.), auf.

3.2.1. Systematische Literatursuche nach TL-Studien bei MS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine systematische Literaturrecherche zur Identifizierung von Studien mit Patienten mit MS, bei denen die TL gemessen wurde, durchgeführt. Für die Suche wurde der Suchterminus „*multiple sclerosis*“ [AND] *telomer**“ verwendet, der in die elektronische Datenbank PubMed am 19.11.2020 eingegeben wurde. Die Suche sollte möglichst alle relevanten Publikationen einschließen und bestand daher nur aus zwei Suchbegriffen, wobei das Sternchen-Symbol (*) zur Erweiterung der Suche und Kürzung des Suchterms benutzt wurde. Die Suchergebnisse wurden anschließend in eine dafür angefertigte Tabelle im Programm LibreOffice Calc (Version 7.2.2.2.) mit Erstautor, Publikationsjahr und PubMed-Identifikationsnummer (PMID) eingetragen. Des Weiteren wurde in zwei *PrePrint*-Datenbanken (medRxiv und bioRxiv) mit dem gleichen Suchterminus, ebenfalls am 19.11.2020, nach Studien in Vorab-Publikation gesucht und die Ergebnisse zur Tabelle hinzugefügt. Die Literaturrecherche erfolgte nach den *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) [133] in den vier Stufen Identifizierung (*identification*), Vorauswahl/Prüfung (*screening*), Eignung (*eligibility*) und Einschluss (*inclusion*). Zusätzlich wurden die in den Publikationen angegebenen Quellen geprüft, um möglichst keine relevante Studie zu übersehen.

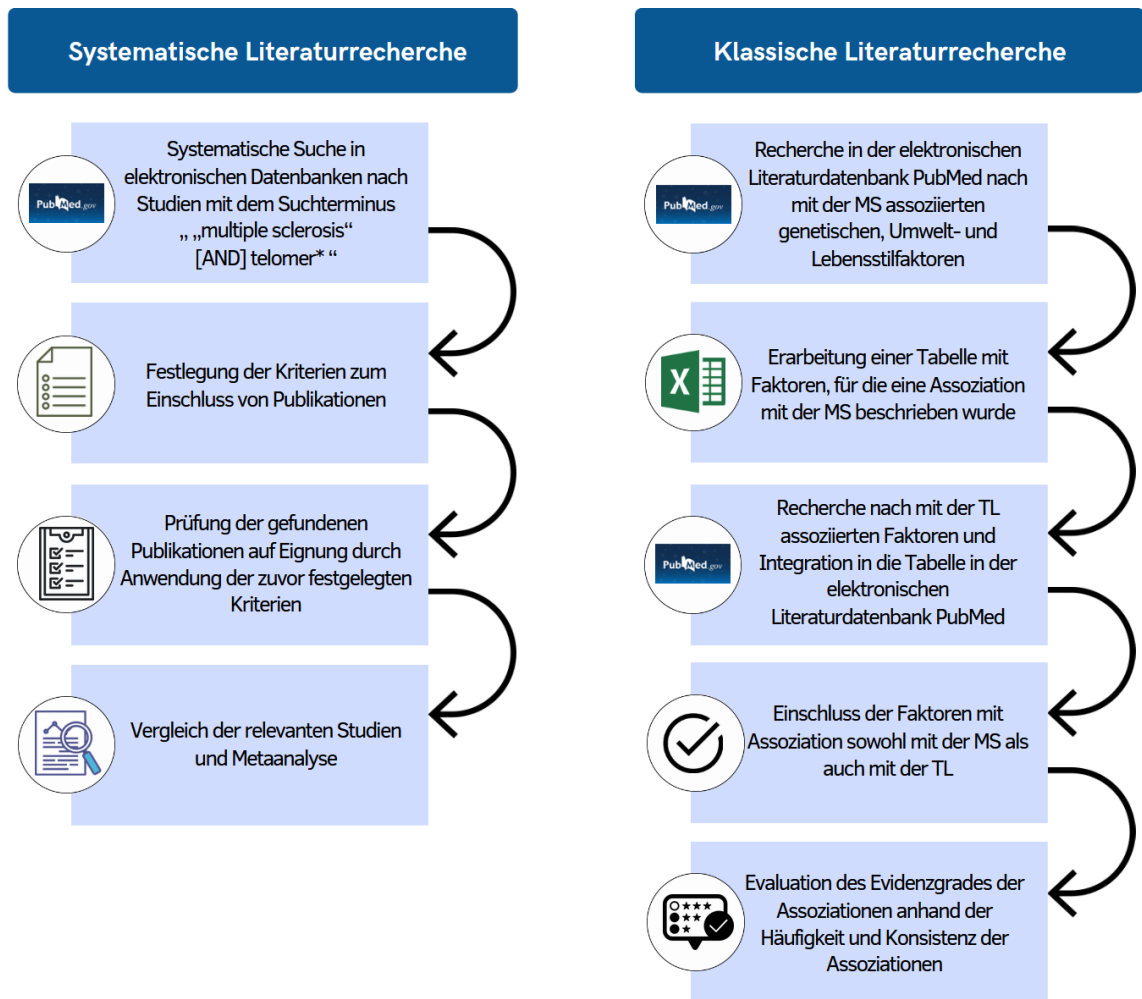


Abb. 6: Workflows des zweiten Schwerpunktes dieser Arbeit

Abgebildet ist der Ablauf des zweiten Schwerpunktes dieser Arbeit. Zuerst wurde eine systematische Literaturrecherche durchgeführt, welche dem Zweck diente, Studien, in deren Rahmen die TL bei Patienten mit MS gemessen wurde, zu identifizieren (linke Seite). In einer Metaanalyse wurde anschließend die Assoziation der TL zur MS untersucht. Des Weiteren wurde eine klassische Literatursuche durchgeführt, mit der Absicht, genetische, Umwelt- und Lebensstilfaktoren zu identifizieren, für die sowohl eine Assoziation mit der MS als auch mit der TL beschrieben wurde (rechte Seite). Die Durchführung der einzelnen Schritte ist in Kap. 3.2.1. bis 3.2.5. ausführlich beschrieben. Die Abbildung wurde mit dem Online-Tool Canva (Version 1.38) erstellt.

MS: Multiple Sklerose; TL: Telomerlänge.

3.2.2. Kriterien zur Auswahl geeigneter Studien

Die Kriterien zum Einschluss einer Publikation in die Übersichtsarbeit wurden vor der Suche festgelegt. Eine Publikation wurde eingeschlossen, wenn: 1. sie in den Sprachen Englisch oder Deutsch verfasst wurde, 2. es sich um eine Originalarbeit handelte, 3. mindestens ein Teil der Studienpopulation aus Patienten mit MS bestand und 4. im Rahmen dieser Studie die TL gemessen wurde. Sofern alle Kriterien erfüllt waren, wurde die entsprechende Publikation eingeschlossen. Bei Nichterfüllen mindestens eines dieser Kriterien wurde diese ausgeschlossen. Alle Artikel wurden unabhängig sowohl vom Autor dieser Dissertation als auch von Dr. Michael Hecker (Klinik und Poliklinik für Neurologie, Sektion Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Rostock) auf deren Eignung geprüft. Aufgetretene Diskrepanzen wurden durch Diskussionen beseitigt und ein gemeinsamer Konsens erreicht.

3.2.3. Betrachtung der Studien nach definierten Gesichtspunkten

Nach Ausschluss ungeeigneter Publikationen wurden zwei weitere Tabellen mit dem Programm LibreOffice Calc (Version 7.2.2.2.) zu den eingeschlossenen Studien angefertigt. Für die erste Tabelle wurden allgemeine Informationen über die jeweiligen Studien gesammelt, u. a. Studiendesign, Herkunftsland der Probanden (Patienten und Kontrollen), Fallzahl sowie Durchschnittsalter und Geschlechterverteilung der Kohorten. In einer zweiten Tabelle wurden spezielle Informationen zu den TL-Messungen und Ergebnissen herausgearbeitet, wie bspw. die genutzte Zellpopulation, die TL-Messmethode sowie statistisch signifikante Assoziationen. Hierfür wurden die Texte, Tabellen und Abbildungen der Publikationen gesichtet und die enthaltenen Informationen in den entsprechenden Tabellen gesammelt. Anschließend wurden die Publikationen hinsichtlich bestimmter Gesichtspunkte, bspw. Anzahl an eingeschlossenen Patienten und verwendeter TL-Messmethode, verglichen.

3.2.4. Metaanalyse zum Vergleich der LTL bei Patienten mit MS und Gesunden

Die Assoziation zwischen TL und MS wurde durch eine Metaanalyse untersucht. Studien, die keine Kontrollgruppe enthielten oder nicht die für die Metaanalyse erforderlichen Daten bereitstellten, wurden für diese nicht berücksichtigt. Für die Metaanalyse wurden ein *Forest-Plot* und ein *Funnel-Plot* mit Hilfe des *metafor* R-Pakets erstellt. Die standardisierte Mittelwertdifferenz der TL zwischen Patienten mit MS und Gesunden sowie das Konfidenzintervall von 95% wurden anhand der in den Studien angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen (*standard deviation*, SD) pro Gruppe errechnet. Zur Bestimmung der zusammengesetzten Effektstärke wurde ein an die Daten angepasstes Modell mit zufälligen Effekten genutzt. Auf einen Publikationsbias wurde mit dem Egger-Regressionstest geprüft. Die Heterogenität der Studien wurde mittels Q-Statistik bestimmt.

3.2.5. Recherche nach Faktoren mit Assoziation zu MS und TL

Im Rahmen der systematischen Literaturrecherche zur TL bei Patienten mit MS (Kap. 3.2.1. - 3.2.4.) wurden zahlreiche Publikationen und deren Referenzen in Augenschein genommen. Einige dieser Publikationen beschrieben Assoziationen zwischen Auftreten sowie Schwere der MS mit genetischen Faktoren sowie Umwelt- und Lebensstilfaktoren. Auf dieser Grundlage schloss sich eine tiefgreifende klassische Literaturrecherche an, in der Faktoren identifiziert werden sollten, die mit dem Risiko an MS zu erkranken und/oder der Schwere der MS sowie der TL assoziiert sind.

Es wurden mehrere Suchanfragen in der elektronischen Literaturdatenbank PubMed, u. a. mit den Suchtermini „*multiple sclerosis*“ und „*risk factors*“, „*genetic*“, „*lifestyle*“ oder „*environment*“, gestellt und die Suchergebnisse vor allem nach Metaanalysen, mendelschen Randomisierungsstudien, systematischen *Reviews*, Kohortenstudien oder Fall-Kontroll-Studien durchsucht. Die Ergebnisse dieser Suchen wurden daraufhin nach mit MS assoziierten Faktoren analysiert, welche in drei dafür angefertigte Tabellen eingetragen wurden, wobei jede Tabelle entweder die genetischen, Umwelt- oder Lebensstilfaktoren umfasste. Die Referenzlisten der gesichteten Publikationen wurden ebenfalls nach relevanten Veröffentlichungen durchsucht, um möglichst alle bisher beschriebenen Risikofaktoren zu identifizieren.

Mit den für die MS beschriebenen Risikofaktoren wurde die Suche in der Literaturodatenbank PubMed anschließend in Bezug auf Telomere durchgeführt. Auch hierbei wurden verschiedene Suchtermini verwendet, u. a. „telomer“ oder „telomere length“ und „smoking“ oder „alcohol“. Alle identifizierten potenziellen Risikofaktoren wurden nach Abschluss der Suche erneut auf eine beschriebene Assoziation sowohl mit der MS als auch der TL geprüft. Zudem wurden alle Faktoren auf eine Assoziation mit der individuellen Schwere der MS-Erkrankung überprüft. Faktoren, die entweder nur mit der MS oder nur mit der TL assoziiert waren, wurden nicht berücksichtigt. Schließlich wurde für jede Assoziation eines Faktors der Grad der Evidenz semiquantitativ, u. a. nach Studiendichte, Konsistenz der Ergebnisse und statistischer Signifikanz, beurteilt. Die Einschätzung der Evidenz erfolgte unabhängig voneinander durch den Autor dieser Dissertation sowie durch Prof. Zettl, Dr. Hecker, Dr. Fitzner (Klinik und Poliklinik für Neurologie, Sektion Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Rostock) und Prof. Rommer (Medizinische Universität Wien, Klinik für Neurologie) anhand der Häufigkeit und Konsistenz der Assoziationen. Etwaige Unstimmigkeiten in der Bewertung des Evidenzgrades konnten durch ausführliche Diskussionen gelöst werden.

4. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Schwerpunkte: zum einen in eine Studie zur LTL bei Patienten mit MS und zum anderen in eine systematische Literaturrecherche nach TL-Studien bei Patienten mit MS sowie eine Recherche zu potenziellen Einflussfaktoren sowohl auf die MS als auch die TL. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der experimentellen Studie erläutert (Kap. 4.1.) und anschließend die Ergebnisse der Literaturrecherchen zusammengefasst (Kap. 4.2.).

4.1. LTL in der Rostocker Kohorte

Im ersten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde die LTL von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen untersucht und verglichen. Zuerst sollen hierzu die Charakteristika der Patienten sowie der Kontrollen beleuchtet werden (Kap. 4.1.1.). Das Ergebnis der technischen Validierung ist in Kap. 4.1.2. dargestellt. Die Auswertung und der Vergleich der gewonnenen Messdaten werden in Kap. 4.1.3. und Assoziationen mit klinischen Parametern in Kap. 4.1.4. beschrieben. Abschließend wird die Korrelation der LTL mit dem klinischen Langzeitverlauf der Patienten erläutert (Kap. 4.1.5.). Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse wurden 2021 im Journal „*Molecular Neurobiology*“ publiziert [134].

4.1.1. Patientencharakteristika

Die Studie umfasste 120 Individuen, von denen 60 Patienten mit MS und 60 gesunde Kontrollen waren, deren Charakteristika in Tab. 2 aufgeführt sind. Das arithmetische Mittel des Alters zum Zeitpunkt der BE lag bei den Patienten bei 48,0 Jahren, die Kontrollgruppe war im Durchschnitt 48,1 Jahre alt. Nach der Definition der Verlaufsformen der MS nach Lublin *et al.* [28,135] befanden sich in der MS-Kohorte 40 Patienten mit RRMS und 20 Patienten mit PPMS. Das Geschlechterverhältnis betrug sowohl bei den Patienten mit RRMS als auch bei den Patienten mit PPMS und den Kontrollen 1:1 (weiblich : männlich). Die durchschnittliche Krankheitsdauer der Patienten mit RRMS betrug $6,1 \pm 6,8$ Jahre (Spannweite: 0-27 Jahre), wohingegen die Patienten mit PPMS eine signifikant kürzere Krankheitsdauer hatten ($3,0 \pm 4,7$ Jahre, Spannweite: 0-15 Jahre; Mann-Whitney-U-Test: $p=0,012$). Trotz der geringeren durchschnittlichen Krankheitsdauer war der Grad der Behinderung, der durch die EDSS und die ARMSS erfasst wurde, bei den Patienten mit PPMS signifikant höher als der der Patienten mit RRMS (EDSS-Score: $4,7 \pm 1,5$ bzw. $2,9 \pm 1,7$; t -Test: $p=2,3 \times 10^{-04}$; ARMSS-Score: $6,2 \pm 2,1$ bzw. $3,9 \pm 2,6$; t -Test: $p=0,001$). Während zehn Patienten (jeweils 5 Patienten mit RRMS bzw. PPMS) zum Zeitpunkt der BE keine DMDs erhielten, wurden 75% der Patienten mit RRMS mit Interferon- β -1a oder -1b behandelt. Sechzig Prozent der Patienten mit PPMS erhielten eine gepulste Kortikosteroidtherapie als Behandlung. Sechszwanzig Patienten mit RRMS sowie zehn Patienten mit PPMS sind auch nach zehn Jahren regelmäßig in der Klinik für Neurologie der Universitätsmedizin in Rostock zu Kontrolluntersuchungen erschienen. Zu den übrigen 24 Patienten sind die Daten zur langfristigen Krankheitsprogression leider nicht vollständig vorhanden, da diese Patienten während des *Follow-ups* verloren gegangen sind.

Tab. 2: Charakteristika der Rostocker Kohorte

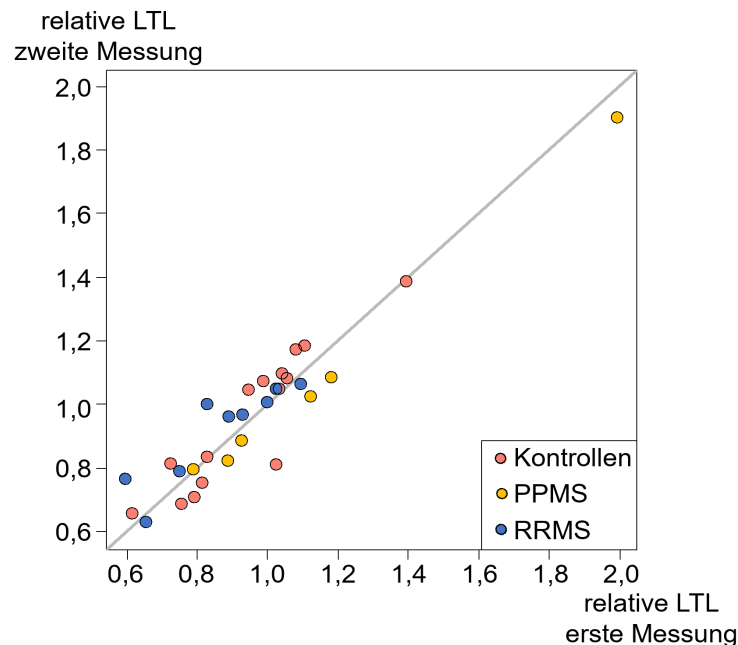
		Alter in Jahren	Frauen- anteil	Krankheitsdauer in Jahren	Schubrate im Jahr vor BE	EDSS	ARMSS
RRMS	Anzahl (%)	40 (100)	20 (50)	40 (100)	40 (100)	38 (95)	38 (95)
	Mittelwert \pm SD	48,0 \pm 9,7		6,1 \pm 6,8	0,3 \pm 0,6	2,9 \pm 1,7	3,9 \pm 2,6
	Median (Spanne)	50 (24-67)		3 (0-27)	0 (0-2)	2,5 (1,0-7,0)	4,0 (0,5-9,1)
PPMS	Anzahl (%)	20 (100)	10 (50)	20 (100)	20 (100)	19 (95)	19 (95)
	Mittelwert \pm SD	48,0 \pm 12,3		3,0 \pm 4,7	0,0 \pm 0,0	4,7 \pm 1,5	6,2 \pm 2,1
	Median (Spanne)	47 (26-68)		1 (0-15)	0 (0-0)	5,0 (1,5-7,5)	6,6 (2,1-9,3)
Kontrollen	Anzahl (%)	60 (100)	30 (50)				
	Mittelwert \pm SD	48,1 \pm 15,3					
	Median (Spanne)	51 (18-74)					

In die Studie zur LTL in der „Rostocker Kohorte“ wurden 120 Probanden integriert, von denen 40 Patienten mit RRMS, 20 Patienten mit PPMS und 60 gesunde Kontrollen waren. In jeder Gruppe war das Durchschnittsalter nahezu identisch und das Verhältnis der Geschlechter 1:1 (weiblich : männlich). Die Schubrate ist für das Jahr vor der BE angegeben. Zu zwei Patienten mit RRMS und einem Patienten mit PPMS lag kein EDSS-Score vor, weshalb auch kein ARMSS-Score berechnet werden konnte. Diese Tabelle wurde adaptiert von Hecker *et al.* [134].

ARMSS: Age-Related Multiple Sclerosis Severity; BE: Blutentnahme; EDSS: Expanded Disability Status Scale; LTL: Leukozyten-Telomerlänge; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; SD: Standardabweichung.

4.1.2. Technische Validierung und Reproduzierbarkeit der LTL-Messungen

Zu 30 Proben, von denen neun von Patienten mit RRMS, sechs von Patienten mit PPMS und 15 von Kontrollen waren, erfolgten Duplikatmessungen zur technischen Validierung. Die Messwerte dieser Duplikate korrelierten signifikant miteinander (Pearson-Korrelationskoeffizient: $r=0,948$; $p=2,0 \times 10^{-15}$; Abb. 7). Für die Proben, die zur technischen Validierung genutzt wurden, wurde das durchschnittliche T/S-Verhältnis beider Messungen in der weiteren Analyse verwendet. Die für jede Probe an drei aufeinanderfolgenden Tagen erfolgten Messungen waren reproduzierbar. Die Intra-Assay-Variabilität (das heißt der geometrische Mittelwert der Variationskoeffizienten) der T/S-Ratio-Triplikate betrug 5,7%.

**Abb. 7: Korrelation der Duplikate zur technischen Validierung der LTL-Messung**

Abgebildet ist die Korrelation der relativen LTL der doppelt gemessenen Proben. Jeder Punkt ergibt sich durch das T/S-Verhältnis für die erste Messung (X-Achse) und die zweite Messung (Y-Achse). Die Farbe der jeweiligen Punkte kennzeichnet die Zugehörigkeit zu Patienten mit RRMS ($n=9$), Patienten mit PPMS ($n=6$) oder Kontrollen ($n=15$). Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $r=0,948$ ($p=2,0 \times 10^{-15}$). Die graue Linie zeigt die $Y=X$ -Diagonale (*identity line*) durch den Koordinatenursprung.

LTL: Leukozyten-Telomerlänge; n : Anzahl; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; T/S-Verhältnis: Telomer-Einzelkopiegen-Verhältnis.

4.1.3. Vergleich der LTL von Patienten mit MS und Kontrollen

Sowohl bei den Patienten mit MS (RRMS oder PPMS) als auch bei den gesunden Kontrollen war das Alter negativ mit der LTL assoziiert (Pearson-Korrelationskoeffizient: $r=-0,222$; $p=0,015$ über alle Patienten und Kontrollen; $r<-0,128$ für alle drei Gruppen und beide Geschlechter; Abb. 8).

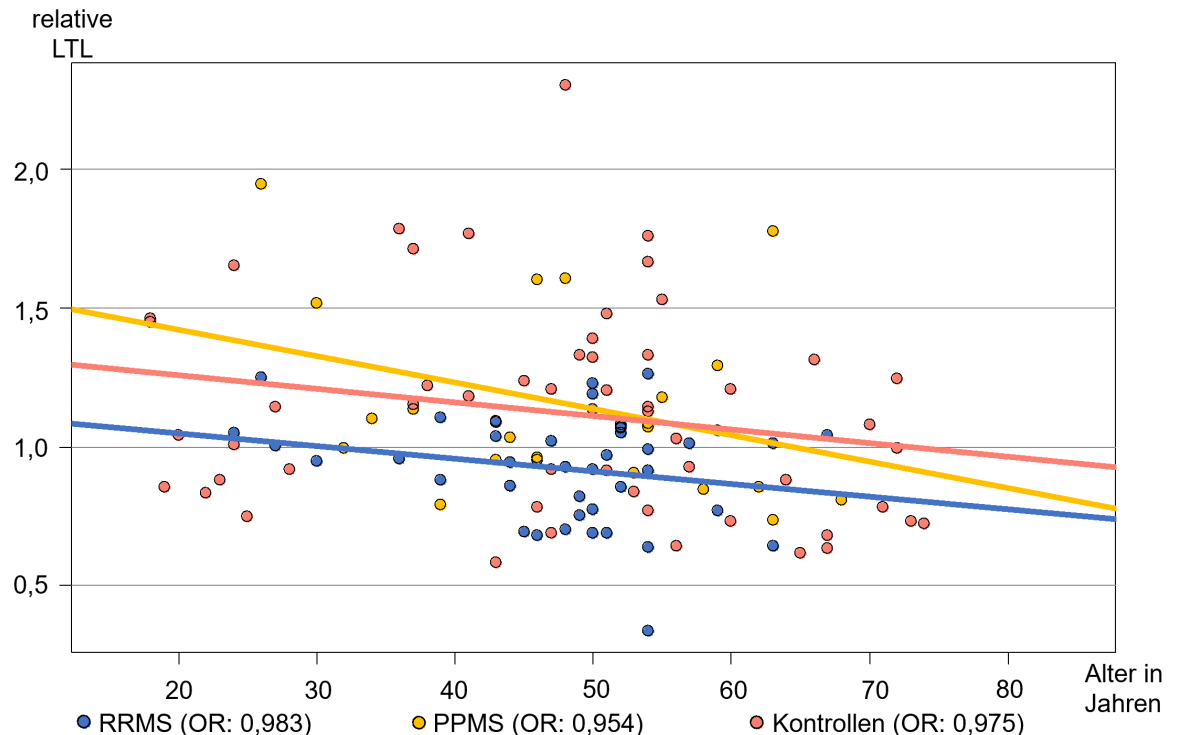


Abb. 8: Korrelation der LTL und des Alters

Höheres Alter korreliert negativ mit der LTL. Die Punkte stehen jeweils für das Alter und die LTL des jeweiligen Individuums. Die Geraden zeigen die lineare Regressionsgerade pro Gruppe. Die Färbung der Punkte und Geraden kennzeichnet die Gruppenzugehörigkeit, die der Legende entnommen werden kann. Die OR gibt die Wahrscheinlichkeit relativ langer Telomere (T/S-Verhältnis >1) für jedes weitere Lebensjahr an. Die Abbildung wurde adaptiert von Hecker *et al.* [134].

LTL: Leukozyten-Telomerlänge; OR: *odds ratio*; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; T/S-Verhältnis: Telomer-Einzelkopieigen-Verhältnis.

Die relative LTL (angegeben als T/S-Verhältnis, Kap. 1.2.2., 3.1.5.) der 120 Individuen lag im Bereich von 0,34 bis 2,30; wobei das arithmetische Mittel $1,06 \pm 0,32$ betrug. In der ANOVA unterschied sich die durchschnittliche LTL der RRMS-Gruppe signifikant von der der PPMS- und der der Kontrollgruppe ($p=0,003$). Die durchschnittliche LTL der Patienten mit RRMS ($0,92 \pm 0,19$) war signifikant kürzer als die der Patienten mit PPMS ($1,16 \pm 0,35$; t -Test: $p=0,010$) und der gesunden Kontrollen ($1,12 \pm 0,35$; t -Test: $p=4,2 \times 10^{-04}$) (Abb. 9). Der Unterschied zwischen RRMS-Patienten und Kontrollen erreichte auch in den Sensitivitätsanalysen das Signifikanzniveau (t -Test: $p<0,05$). Der Unterschied zwischen den Patienten mit PPMS und den Kontrollen erreichte hingegen keine Signifikanz (t -Test: $p=0,700$). Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied in der LTL zwischen Frauen und Männern nachgewiesen werden (t -Test: $p=0,768$). Darüber hinaus ergab die multivariable binäre logistische Regression eine geringere Chance für Patienten mit RRMS, ein T/S-Verhältnis >1 zu haben (OR: 0,399; $p=0,032$) (Abb. 10). Diese Chance war auch in der Gruppe der Patienten mit PPMS erniedrigt (OR: 0,748), erreichte hier jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p=0,585$).

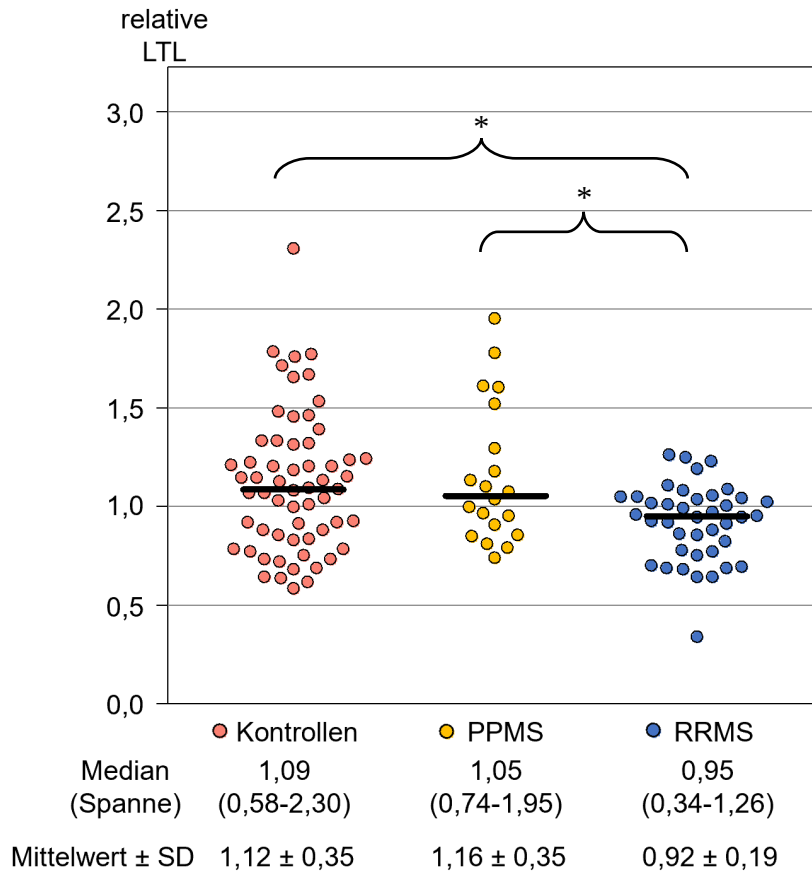


Abb. 9: Unterschiede in der LTL zwischen den Gruppen

Abgebildet sind *Beeswarm-Plots*, welche die Verteilung und den Median der Messwerte in der jeweiligen Gruppe abbilden (einfaktorielle Varianzanalyse: $p=0,003$). Patienten mit RRMS hatten signifikant kürzere Telomere als jene mit PPMS und Kontrollen (durch * markiert). Die LTL von Patienten mit PPMS und Kontrollen unterschied sich nicht signifikant ($p=0,700$). Die Abbildung wurde modifiziert übernommen von Hecker *et al.* [134].

LTL: Leukozyten-Telomerlänge; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; *: statistisch signifikante Assoziation (t -Test: $p<0,05$).

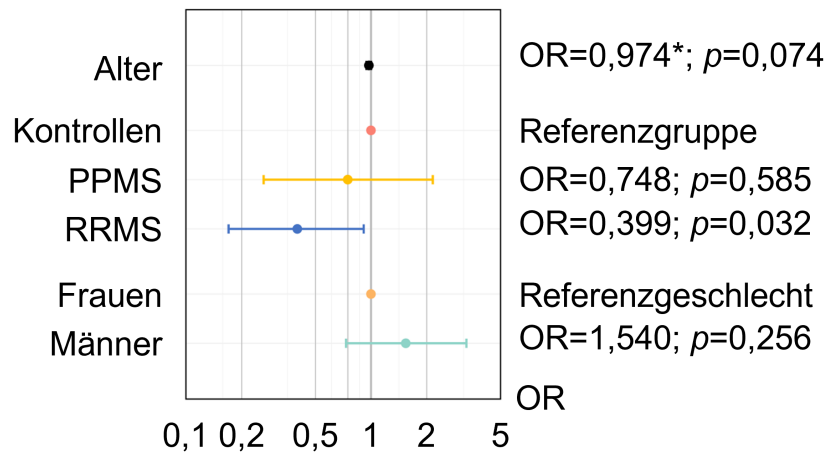


Abb. 10: Chancenverhältnisse für relativ lange Telomere in der multiplen Regression

Relativ lange Telomere wurden definiert als $T/S\text{-Ratio} > 1$. Die OR für lange Telomere und das jeweilige 95%-Konfidenzintervall sind für das jeweilige Charakteristikum abgebildet. Jedem Charakteristikum ist eine andere Farbe zur besseren Unterscheidung zugeordnet (modifiziert nach Hecker *et al.* [134]).

LTL: Leukozyten-Telomerlänge; OR: *odds ratio*; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; $T/S\text{-Ratio}$: Telomere-Einzelkopiegen-Verhältnis; *: OR ist für jedes zusätzliche Lebensjahr angegeben.

4.1.4. Assoziation der LTL mit klinischen Parametern der Patienten

Die LTL der Patienten mit MS wurde auf Assoziationen mit dem klinischen Grad der Behinderung, gemessen anhand der EDSS und der ARMSS, und der Medikation zum Zeitpunkt der BE untersucht. Obwohl für alle drei Variablen (EDSS, ARMSS und Medikation) eine signifikante Assoziation mit der LTL vorlag (F -Test: jeweils $p < 0,05$), verschwand diese nach Aufteilung der Patienten in Gruppen von Patienten mit RRMS und Patienten mit PPMS (F -Test: $p > 0,31$). Lediglich das Alter der Patienten war somit signifikant mit der LTL assoziiert (F -Test: $p = 0,05$).

4.1.5. Korrelation zwischen klinischem Langzeitverlauf und der LTL

Für die Analyse der Veränderung der LTL über einen längeren Zeitraum (> 10 Jahre) wurde von zehn Patienten mit MS, wovon sechs die Diagnose der schubförmigen und vier die der primär progredienten Verlaufsform hatten, über zehn Jahre nach Abnahme der ersten Probe eine zweite abgenommen. Hierbei zeigte sich eine jährliche Verringerung des T/S-Verhältnis zwischen 0,003 und 0,026 (Abb. 11). Die durchschnittliche jährliche LTL-Abnahme betrug $0,014 \pm 0,008$; der Median 0,013. Die jährliche Abnahme der relativen LTL war sowohl in der RRMS-Gruppe als auch in der PPMS-Gruppe signifikant (paarige t -Tests: $p < 0,05$). Eine Analyse auf Assoziation zwischen LTL-Abnahme und Anstieg des EDSS-Wertes über den Beobachtungszeitraum erreichte das Signifikanzniveau nicht (F -Test: $p = 0,182$).

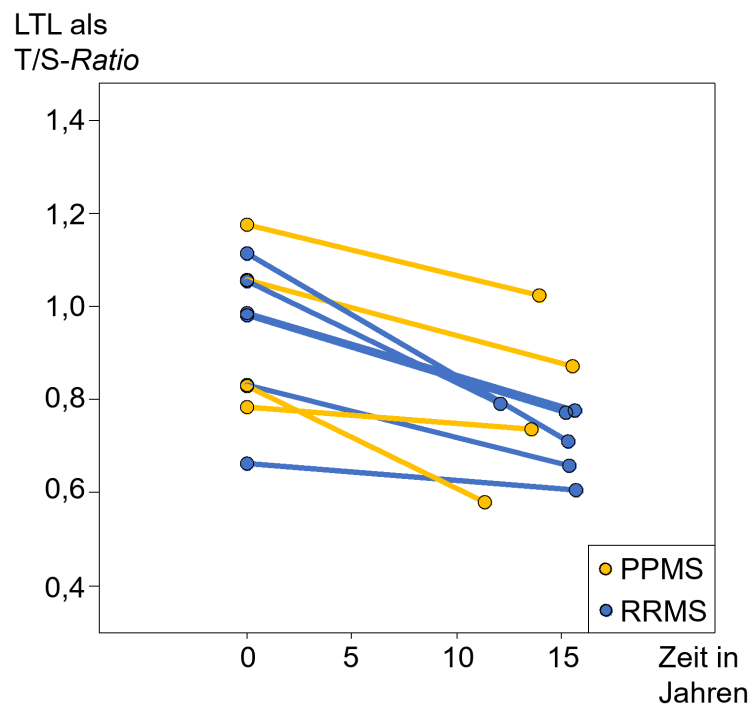


Abb. 11: Veränderung der LTL bei Patienten mit MS nach über zehn Jahren

Von sechs Patienten mit RRMS und vier Patienten mit PPMS konnte nach einem Zeitraum von mehr als zehn Jahren eine zweite Blutprobe gewonnen und die relative LTL bestimmt werden. Die Veränderung der LTL ist durch die Verbindung der *Baseline*-LTL und der LTL nach über zehn Jahren für die einzelnen Patienten gezeigt. Die durchschnittliche jährliche Abnahme betrug 0,014 (modifiziert nach Hecker *et al.* [134]). LTL: Leukozyten-Telomerlänge; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; T/S-Ratio: Telomere-Einzelkopieen-Verhältnis.

Weiterhin wurde der prädiktive Wert der *Baseline*-LTL für den Krankheitsverlauf bei Patienten mit RRMS untersucht. Der größte Teil der Patienten mit RRMS (87,5%) erhielt eine Therapie der MS zum Zeitpunkt der BE (Kap. 4.1.1.). Innerhalb von zehn Jahren gab es nur bei neun Patienten mit RRMS keine Änderung der Medikation. Die Assoziation zwischen *Baseline*-Medikation und LTL erreichte in der Gruppe der Patienten mit RRMS keine Signifikanz ($p=0,713$). RRMS-Patienten mit einer LTL >1 ($n=16$) und jene mit einer LTL <1 ($n=24$) unterschieden sich hinsichtlich der Dauer bis zum ersten dokumentierten Schub nicht (Log-Rank-Test: $p=0,939$). Auch die jährliche kumulative Schubrate in der Nachbeobachtung unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant (0,07-0,20 bzw. 0,09-0,21; t -Test: $p>0,26$). Allerdings konnte bei den Patienten mit RRMS mit kürzeren Telomeren ein höheres Risiko für eine Konversion in eine SPMS festgestellt werden (HR: 8,284; Log-Rank-Test: $p=0,016$; Abb. 12). Während nur ein Patient aus der Gruppe mit längeren Telomeren am Ende des zehnjährigen Nachbeobachtungszeitraums als Patient mit SPMS eingestuft wurde, waren es in der Gruppe der Patienten mit kürzeren Telomeren 11.

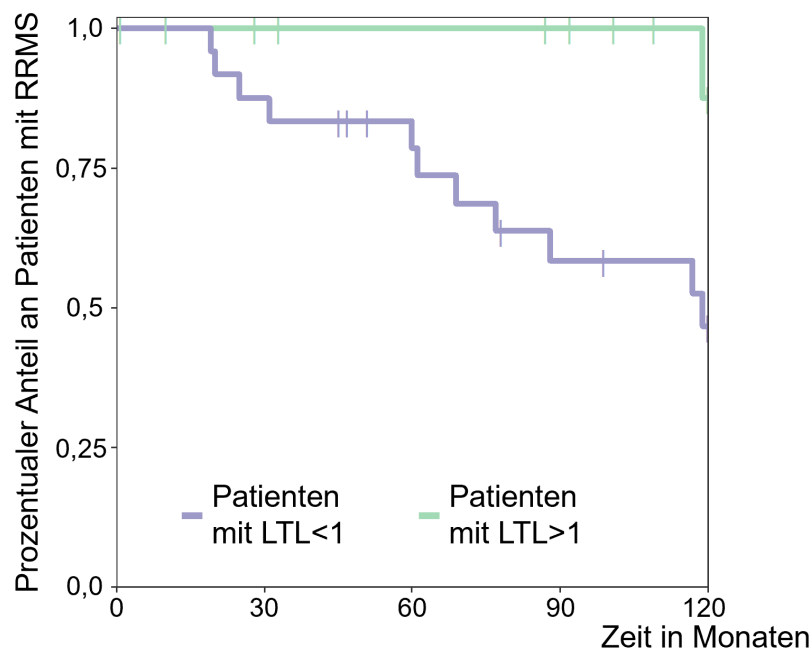


Abb. 12: Konversionsrisiko der Patienten mit RRMS in Abhängigkeit der LTL

Die 40 Patienten mit RRMS wurden in zwei Gruppen mit entweder relativ langen Telomeren (LTL >1 , $n=16$) bzw. relativ kurzen Telomeren (LTL <1 , $n=24$) eingeteilt. Über einen Zeitraum von zehn Jahren wurde die Konversion zur SPMS verfolgt. Mit den gewonnenen Daten wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Es konnte festgestellt werden, dass Patienten mit relativ kurzen Telomeren (LTL <1) ein erhöhtes Risiko für eine Konversion zur SPMS hatten (HR: 8,284; $p=0,016$). Patienten, die im Nachbeobachtungszeitraum verloren gingen oder keine Konversion zur SPMS zeigten, wurden rechtszensiert (adaptiert von Hecker *et al.* [134]). HR: *hazard ratio*; LTL: Leukozyten-Telomerlänge; n : Anzahl; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; SPMS: sekundär progrediente Multiple Sklerose.

Obwohl im linearen gemischten Modell die Interaktion der *Baseline*-LTL mit dem EDSS-Wert das Signifikanzniveau nicht erreichte ($p=0,277$), zeigten Patienten mit kürzeren Telomeren eine progressive Verschlechterung der Behinderung mit tendenziell etwas höheren EDSS-Werten als Patienten mit längeren Telomeren (Abb. 13). Im vierten und neunten Jahr konnte im Mittel ein signifikant höherer EDSS-Wert bei den Patienten mit kürzeren Telomeren identifiziert werden (t -Test: $p<0,05$).

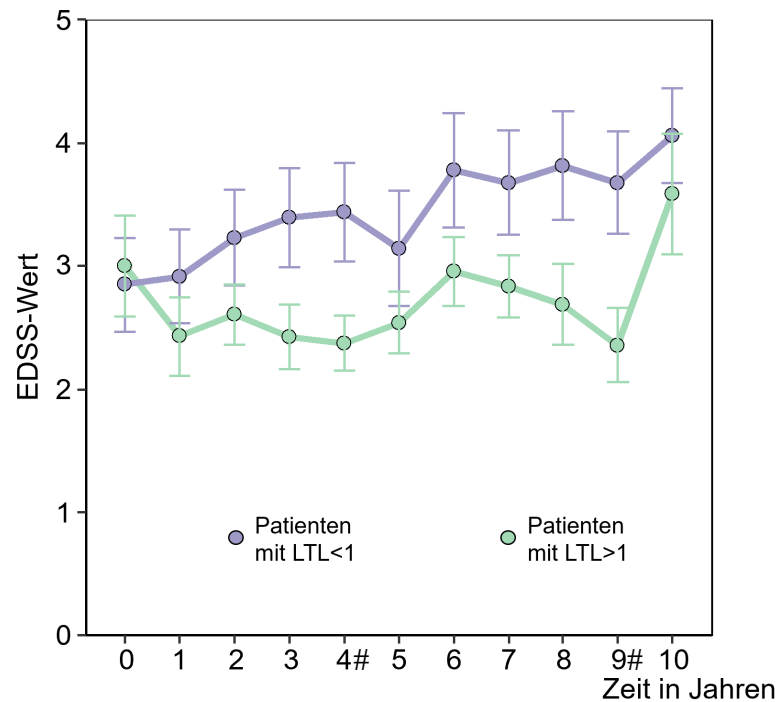


Abb. 13: Veränderung des Behinderungsgrades der Patienten in Abhängigkeit der *Baseline*-LTL

Der Behinderungsgrad der Patienten mit RRMS ($n=40$) wurde über einen Zeitraum von zehn Jahren erhoben und die Patienten abhängig von der LTL zum Zeitpunkt der Blutentnahme in eine Gruppe mit relativ langen Telomeren ($LTL > 1$, $n=16$) und in eine Gruppe mit relativ kurzen Telomeren ($LTL < 1$, $n=24$) eingeteilt. Die aufgetragenen Punkten stehen für den Mittelwert der EDSS-Scores der jeweiligen Gruppe, die Antennen zeigen den Standardfehler. Im vierten und neunten Jahr unterschied sich der mittlere EDSS-Score signifikant zwischen den beiden Gruppen (zweiseitiger t -Test: $p < 0,05$; durch „#“ markiert). Insgesamt schienen Patienten mit relativ langen Telomeren einen günstigeren Krankheitsverlauf zu haben als jene mit relativ kurzen Telomeren (modifiziert nach Hecker *et al.* [134]).

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; LTL: Leukozyten-Telomerlänge; n : Anzahl; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose.

4.2. Forschungsstand zu TL bei MS und assoziierten Faktoren

Im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit wurde zum einen eine systematische Literaturrecherche durchgeführt, bei der nach Studien, im Rahmen derer es Messungen der TL bei Patienten mit MS gab, gesucht wurde. Die Ergebnisse der Analyse und Gegenüberstellung der identifizierten Studien sind in Kap. 4.2.1. aufgeführt. Zum anderen werden die durch die klassische Literatursuche identifizierten gemeinsamen potenziellen Einflussfaktoren auf die MS und die TL in Kap. 4.2.2. ausführlich dargestellt. Die Ergebnisse wurden jeweils publiziert [136,137].

4.2.1. Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche zusammengefasst. Die eingeschlossenen Studien werden anschließend nach spezifischen Gesichtspunkten verglichen. Schließlich werden die Ergebnisse der durchgeführten Metaanalyse dargestellt.

4.2.1.1. Identifizierte Studien zu TL bei Patienten mit MS

Die systematische Literatursuche in elektronischen Datenbanken ergab insgesamt 51 Publikationen, von denen 49 bei PubMed und zwei weitere in den *PrePrint*-Servern medRxiv und bioRxiv gelistet waren (Kap. 8.4., Tab. S2). In den angegebenen Quellen der einzelnen Publikationen konnte keine weitere relevante Publikation identifiziert werden. Jede Publikation wurde als Volltext gelesen und gemäß der PRISMA-Leitlinie [133] auf ihre Eignung geprüft. Alle Publikationen waren in Englisch verfasst (1.). Fünf Publikationen waren nicht geeignet, da es sich nicht um Originalarbeiten handelte (2.). Des Weiteren wurden in 18 Studien keine Proben von Patienten mit MS analysiert (3.), woraufhin diese ausgeschlossen wurden. Schließlich wurden weitere 21 Publikationen ausgeschlossen, da im Rahmen der Studien keine TL-Messung durchgeführt wurde (4.). Sieben Studien erfüllten alle geforderten Kriterien und konnten somit in die Synthese aufgenommen werden (Abb. 14) [127,128,134,138-141]. Darunter befindet sich auch die in Kap. 4.1. dieser Arbeit beschriebene und im Journal „*Molecular Neurobiology*“ publizierte Studie zur TL in der „Rostocker Kohorte“ [134]. Gesichtspunkte der sieben Studien, bspw. Nationalität der Kohorte, Studiendesign und TL-Messmethode, wurden beleuchtet und sind in Tab. 3 und 4 dargestellt. Von den sieben eingeschlossenen Studien konnten vier Studien für die Metaanalyse herangezogen werden (Kap. 4.2.1.5, Abb. 15 und 16) [127,128,134,141].

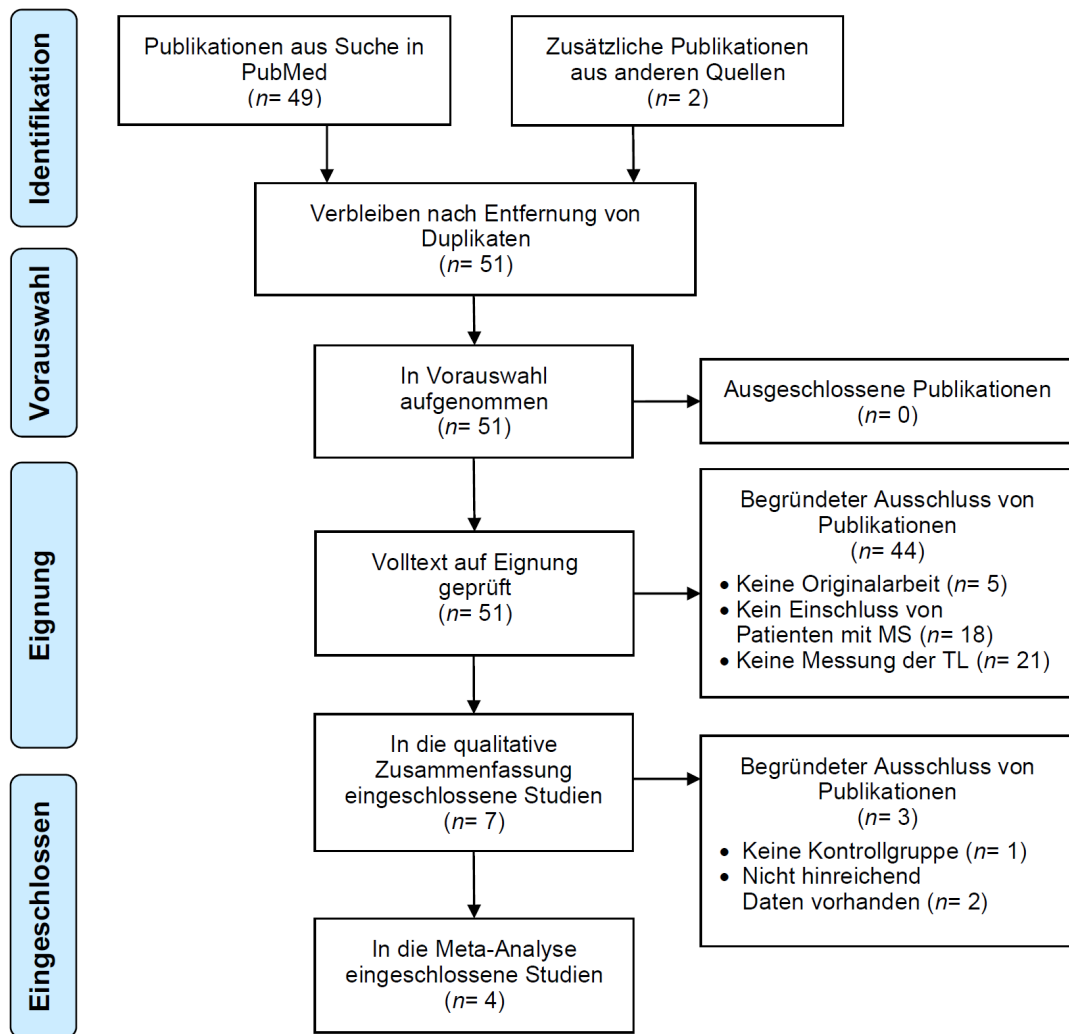


Abb. 14: Flussdiagramm der systematischen Literatursuche und -auswahl

Diese Abbildung stellt den Ablauf der systematischen Literatursuche und die Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien entsprechend der PRISMA-Leitlinie [133] dar. In drei elektronischen Datenbanken (PubMed, medRxiv, bioRxiv) wurde nach Publikationen durch den Suchterm „*multiple sclerosis*“ [AND] *telomer**“ gesucht. Studien, die die Einschlusskriterien erfüllten, sind in die Synthese aufgenommen worden (adaptiert von Bühring *et al.* [136]).

MS: Multiple Sklerose; *n*: Anzahl; PRISMA: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*; TL: Telomerlänge.

4.2.1.2. Allgemeine Informationen zu den eingeschlossenen Studien

Die älteste Studie ist die der Arbeitsgruppe Hug *et al.* [138] und stammt aus dem Jahr 2003. Alle anderen Studien wurden 2015 oder später publiziert. Unter den untersuchten Individuen waren verschiedene Nationalitäten vertreten: Guan *et al.* [127,128] untersuchten asiatische Patienten und Kontrollen; Hecker *et al.* [134], Hug *et al.* [138], Habib *et al.* [141] und Redondo *et al.* [139] untersuchten Europäer und Krysko *et al.* [140] amerikanische Patienten mit MS. In allen Studien wurde ein Querschnittsdesign verwendet, wobei in drei Studien zusätzlich ein Längsschnittsdesign mit einem Folgezeitraum von bis zu mehr als zehn Jahren für weitere BE und klinische Untersuchungen gewählt wurde [128,134,140]. Die Anzahl der untersuchten Patienten mit MS reichte von zehn [139] bis 516 [140]. In allen Studien, abgesehen von jener von Krysko *et al.* [140], wurde die TL von Patienten mit MS mit der einer Kontrollgruppe verglichen. Allgemeine Informationen zu den jeweiligen Studien sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Allgemeine Informationen zu den sieben eingeschlossenen Studien

Erster Autor, Jahr	Studiendesign	Herkunft der Studie	Diagnosekriterien nach	Fallzahl (Patienten : Kontrollen)	Verlaufsform	Durchschnittsalter in Jahren (Patienten : Kontrollen)	Frauenanteil in % (Patienten : Kontrollen)	Matching
Hug, 2003	Beobachtungsstudie mit Patienten und Kontrollen	Deutschland	Poser, 1983	20 : 20	RRMS: 20 SPMS: 0 PPMS: 0	k.A. : k.A.	k.A. : k.A.	Alter
Guan, 2015	Beobachtungsstudie mit Patienten und Kontrollen	Asien	McDonald, 2001	59 : 60	RRMS: 19 SPMS: 20 PPMS: 20	33,3 : 34,3	45,8 : 43,3	Alter, Geschlecht, Lebensstil, Ernährung
Guan, 2018	Interventionsstudie mit Patienten und Kontrollen	Asien	McDonald, 2001	34 : 44	RRMS: k.A. SPMS: k.A. PPMS: k.A.	32,8 : 33,6	47,1 : 47,7	Alter, Geschlecht
Redondo, 2018	Beobachtungsstudie mit Patienten und Kontrollen ^a	Vereinigtes Königreich	k.A.	10 : 6	RRMS: 0 SPMS: 5 PPMS: 5	54,1 : 55,7	30,0 : 33,3	Alter, Geschlecht
Krisko, 2019	Beobachtungsstudie mit Patienten	USA	McDonald, 2001	516 : 0	RRMS: 367 SPMS: 47 PPMS: 17 Weitere ^b : 85	42,6 : k.K.	68,6 : k.K.	Alter, Geschlecht, Erkrankungsdauer, EDSS ^c
Habib, 2020	Beobachtungsstudie mit Patienten und Kontrollen	Deutschland	McDonald, 2001	138 : 120	RRMS: 102 SPMS: 27 PPMS: 5 Weitere ^d : 4	39,4 : 44,6	62,3 : 45,8	-
Hecker, 2020	Beobachtungsstudie mit Patienten und Kontrollen	Deutschland	McDonald, 2001/2005	60 : 60	RRMS: 40 SPMS: 0 PPMS: 20	48,0 : 48,1	50,0 : 50,0	Alter, Geschlecht

Es konnten sieben Studien identifiziert werden, in denen die TL bei Patienten mit MS untersucht wurde. Zur Diagnose der MS wurden in den identifizierten Studien die Diagnosekriterien von Poser *et al.* [37] oder nach McDonald [38,39] herangezogen. Der Stichprobenumfang lag zwischen zehn und 516, wobei sich die Zusammensetzung der MS-Verlaufsformen, die Anteile der Geschlechter und das Durchschnittsalter zwischen den untersuchten Kohorten unterschieden. Sechs von sieben Studien schlossen eine Kontrollgruppe zum Vergleich der TL mit der von Patienten mit MS ein. Diese Tabelle wurde von Bühring *et al.* [136] modifiziert übernommen.

a: keine gesunden Kontrollen

b: 80 Patienten mit CIS, vier Patienten mit progressiver schubförmiger MS, ein Patient mit unklarer Diagnose

c: das *Matching* erfolgte für eine Untergruppe von Patienten, deren Verlaufsform von RRMS zu SPMS konvertierte bzw. nicht konvertierte

d: Verlaufsform der MS unklar

CIS: klinisch isoliertes Syndrom; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; k.A.: keine Angabe; k.K.: keine Kontrollgruppe; MS: Multiple Sklerose; PPMS: primär progrediente MS; RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS; TL: Telomerlänge.

4.2.1.3. Methoden und Ergebnisse der eingeschlossenen Studien

Im Folgenden sind die einzelnen Studien in chronologischer Reihenfolge kurz zusammengefasst. Anschließend folgt der Vergleich der Studien hinsichtlich bestimmter Gesichtspunkte, bspw. Studiendesign und TL-Messmethode (Kap. 4.2.1.4.). Informationen zu den in den Studien verwendeten TL-Messmethoden sowie deren Ergebnisse können Tab. 4 entnommen werden.

Tab. 4: Methoden und Ergebnisse der sieben eingeschlossenen Studien

Erster Autor, Jahr	Probenmaterial	Probenahme	TL-Messmethode	Berücksichtigte Confounder in statistischer Analyse	TL von Patienten mit MS ^a	TL von Kontrollen ^a	Assoziation der TL mit der MS	Identifizierte Variablen mit signifikanter Assoziation mit kürzerer TL
Hug, 2003	CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten des peripheren Blutes	Querschnitt	TRFL-Analyse	Alter	CD4+: 10,1 kb CD8+: 9,2 kb	CD4+: 8,8 kb CD8+: 9,4 kb	-	Höheres Alter
Guan, 2015	Leukozyten aus dem peripheren Blut	Querschnitt	TRFL-Analyse	k.A.	RRMS: 9,5 ± 0,8 kb SPMS: 9,3 ± 0,9 kb PPMS: 6,7 ± 0,7 kb	9,1 ± 2,5 kb	PPMS ↓	Höheres Alter
Guan, 2018	Leukozyten aus dem peripheren Blut	Querschnitt und Längsschnitt, Follow-up: 3 Monate	TRFL-Analyse	k.A.	6,9 ± 1,0 kb	9,1 ± 1,4 kb	MS ↓	-
Redondo, 2018	Knochenmarkszellen (mesenchymale Stromazellen)	Querschnitt	TRFL-Analyse	Alter, Passagenanzahl	k.A.	k.A.	-	Höheres Alter, höhere Passagenanzahl ^{c,d}
Krysko, 2019	Leukozyten aus dem peripheren Blut	Querschnitt und Längsschnitt, Follow-up: 10 Jahre	singleplex qPCR	Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer	0,97 ± 0,18 (5,6 kb)	k.K.	k.K.	Höheres Alter, höherer EDSS, längere Krankheitsdauer, geringeres Hirnvolumen, Höhere Schubrate ^e
Habib, 2020	Leukozyten aus dem peripheren Blut	Querschnitt	multiplex qPCR	Alter, Geschlecht	RRMS: 0,76 ± 0,22 SPMS: 0,67 ± 0,21 PPMS: 0,67 ± 0,27	0,94 ± 0,25	PPMS ↓, RRMS ↓, SPMS ↓	Höheres Alter, höherer EDSS, höhere Passagenanzahl ^c
Hecker, 2020	Leukozyten aus dem peripheren Blut	Querschnitt und Längsschnitt, Follow-up: >10 Jahre	multiplex qPCR	Alter, Geschlecht	RRMS: 0,92 ± 0,19 PPMS: 1,16 ± 0,35	1,12 ± 0,35	RRMS ↓	Höheres Alter, frühere Konversion zur SPMS ^e

Mit Ausnahme einer Studie wurde die TL in Zellen des peripheren Blutes gemessen. In drei von sieben Studien wurde die TL zumindest für einen Teil der Patienten zu mehreren Zeitpunkten gemessen, wohingegen bei vier Studien eine einmalige Messung der TL erfolgte. In vier Studien wurde die TRFL-Analyse verwendet, in drei Studien die qPCR-basierten Verfahren von Cawthon [84,85]. Von den Autoren wurden die statistischen Analysen teilweise für Alter und/oder Geschlecht als Störfaktoren (*Confounder*) adjustiert. Die mittlere TL ± Standardabweichung ist, wenn möglich, für die einzelnen Verlaufsformen angegeben. Eine signifikante Assoziation der TL mit der MS oder einer Verlaufsform konnte in vier von sechs Studien im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden. Es wurden außerdem weitere signifikante Assoziationen der TL mit anderen Variablen, am häufigsten mit dem Alter, beschrieben. Diese Tabelle wurde von Bühring *et al.* [136] modifiziert übernommen.

↓: Variable oder Gruppe war mit signifikant kürzeren Telomeren assoziiert

a: die Angabe der TL ist abhängig von der jeweiligen Messmethode in kb (TRFL-Analyse) oder in einheitslosen Werten (qPCR) angegeben

b: statistische Signifikanz nur für männliche Patienten mit SPMS und Kontrollen

c: auf *in vitro* Experimente bezogen

d: nur für mesenchymale Stromazellen der Patienten mit MS konnte eine signifikante Abnahme der TL nach mehreren Passagen in der Zellkultur beobachtet werden

e: bezogen auf die Analyse von Patienten mit RRMS

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; k.A.: keine Angabe; kb: Kilobasen; k.K.: keine Kontrollgruppe;

MS: Multiple Sklerose; PPMS: primär progrediente MS; qPCR: quantitative Polymerase-Kettenreaktion;

RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS; TL: Telomerlänge;

TRFL: *telomere restriction fragment length*, Telomerrestriktionsfragmentlänge.

Die Studie der Arbeitsgruppe Hug *et al.* [138] wurde im Jahr 2003 publiziert. In dieser Studie wurde bei 20 Patienten mit RRMS und 20 gesunden Kontrollen mittels TRFL-Analyse die TL in CD4+ und CD8+ T-Zellen des peripheren Blutes bestimmt und auf Unterschiede untersucht. In beiden Zelltypen konnten kürzere Telomere bei höherem Alter beobachtet werden. Zwischen Patienten mit RRMS und Kontrollen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (CD4+: 10,1 kb bzw. 8,8 kb; CD8+: 9,2 kb bzw. 9,4 kb). Des Weiteren untersuchten Hug *et al.* [138] die enzymatische Aktivität der Telomerase in den CD4+ und CD8+ T-Zellen, allerdings konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit RRMS und Kontrollen gezeigt werden.

Die Arbeitsgruppe Guan *et al.* [127] publizierten ihre erste Studie im Jahr 2015. In dieser Studie wurde die Assoziation von oxidativem Stress mit der TL in Zellen des peripheren Blutes untersucht. An der Studie nahmen 59 Patienten mit MS und 60 gesunde Kontrollen teil. Die Gruppe der

Patienten setzte sich aus 19 Patienten mit benigner RRMS, 20 Patienten mit SPMS und 20 Patienten mit PPMS zusammen. Die Patienten und Kontrollen waren ähnlich hinsichtlich Alter, Geschlecht, Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten (Tab. 3). Neben der TRFL-Analyse zur Bestimmung der durchschnittlichen TL wurden zur Bestimmung des oxidativen Stresslevels der Patienten auch die 8-iso-PGF2 α -Konzentration im Urin sowie als Marker der antioxidativen Kapazität im Plasma die Resistenz des Lipoproteins LDL gegen Oxidation gemessen. Die TRFL-Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der TL zwischen den Kontrollen und Patienten mit RRMS oder SPMS. Die TL der Patienten mit PPMS allerdings war im Mittel sowohl bei den Frauen (7,0kb) als auch bei den Männern (6,5kb) signifikant kürzer als bei den Kontrollen (10,1kb bzw. 8,4kb), den Patienten mit RRMS (9,3kb bzw. 9,7kb) und den Patienten mit SPMS (9,0kb bzw. 9,5kb). Nur in der Kontrollgruppe und bei den männlichen Patienten mit SPMS konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen TL und Alter nachgewiesen werden. Obwohl der Marker für oxidativen Stress bei den Patienten mit MS, insbesondere bei denen mit PPMS, signifikant erhöht bzw. der Marker für die antioxidative Kapazität erniedrigt war, konnte keine signifikante Assoziation dieser Marker mit der TL nachgewiesen werden.

Eine weitere Studie von Guan *et al.* [128] wurde 2018 publiziert. In dieser wurden der systemische Peroxidationsstatus und die TL bei 34 Patienten mit MS und 44 gesunden Kontrollen untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten und Kontrollen war nahezu identisch, genauso wie die Geschlechterverteilung (Tab. 3). Die Bestimmung der TL in peripheren Blutzellen erfolgte wie in der vorherigen Studie [127] mit Hilfe der TRFL-Analyse. Ebenfalls wurden die Oxidationsresistenz des Lipoproteins LDL und die 8-iso-PGF2 α -Konzentration im Urin als Oxidationsmarker gemessen. Die Arbeitsgruppe konnte bei den Patienten mit MS im Mittel eine signifikant kürzere TL im Vergleich zu der Kontrollgruppe feststellen ($6,9 \pm 1,0$ kb bzw. $9,1 \pm 1,4$ kb; $p=0,001$). Außerdem konnte bei den Patienten mit MS eine signifikant niedrigere Oxidationsresistenz des LDL ($p<0,001$) sowie eine signifikant höhere 8-iso-PGF2 α -Konzentration im Urin ($p=0,003$) gemessen werden. Zur Bestimmung des Effektes einer Vitamin E-Supplementierung wurde die Patientengruppe zusätzlich in zwei Gruppen zu je 17 Patienten geteilt. Eine Gruppe erhielt über einen Zeitraum von drei Monaten ein Vitamin E-Präparat (α -Tocopherol, 400 mg/Tag). Nach erneuter BE konnten keine signifikanten Unterschiede bei der TL oder der Oxidationsresistenz identifiziert werden, allerdings reduzierte sich die 8-iso-PGF2 α -Konzentration im Urin bei den Patienten mit Vitamin E-Supplementierung um ca. 19%, womit sie signifikant niedriger war als bei den Patienten ohne Supplementierung ($p<0,001$). Diese Studie konnte somit zeigen, dass Patienten mit MS eine durchschnittlich kürzere TL und eine höhere Belastung mit oxidativem Stress haben, sowie, dass eine antioxidative Therapie das Level von oxidativem Stress bei Patienten mit MS reduzieren kann.

Im Gegensatz zu den anderen Studien wurden bei der 2018 publizierten Studie von Redondo *et al.* [139] mesenchymale Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) des Knochenmarks zur Messung der TL verwendet. Diese Zellen wurden von zehn Patienten mit progredienter MS und sechs Kontrollpatienten mit Arthrose entnommen und in Zellkulturen expandiert. Bei Passagenanzahl P2 (nach ca. 30 Tagen) und P6 (nach ca. 105 Tagen) der Expansion wurden jeweils Zellen zur Messung der TL mittels TRFL-Analyse entnommen. Eine signifikante negative Korrelation zwischen Alter der Patienten bzw. Kontrollen und TL konnte festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied in der TL zwischen Patienten mit MS und Kontrollen wurde nicht identifiziert. In der Gruppe der Patienten mit MS nahm die TL jedoch signifikant zwischen P2 und

P6 ab ($p=0,004$), wohingegen bei den Kontrollen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass MSCs von Patienten mit MS eine beschleunigte Verkürzung der Telomere aufweisen als jene von Kontrollen.

Die bislang einzige amerikanische Studie zu TL bei MS wurde 2019 von Krysko *et al.* [140] publiziert. Diese Studie ist mit 516 eingeschlossenen Patienten die bisher größte Studie zu Telomeren bei Patienten mit MS und hatte zum Ziel, die Assoziationen zwischen LTL und dem langfristigen Krankheitsverlauf der Patienten zu untersuchen. Den Patienten wurde peripheres Vollblut entnommen und mit Hilfe der qPCR von Cawthon [84] (Kap. 1.2.2.) wurde die relative LTL als *T/S-Ratio* bestimmt. Die Patienten wurden in einem *Follow-up*-Zeitraum von bis zu zehn Jahren klinisch und paraklinisch (u. a. mit der MRT) untersucht. Geschlecht ($p=0,36$), Raucherstatus ($p=0,12$) und Körpermasseindex (*body mass index*, BMI) ($p=0,62$) waren nicht signifikant mit der LTL assoziiert. Auch der Zusammenhang zwischen LTL und Therapie mit DMDs erreichte das Signifikanzniveau nicht. Eine signifikante negative Assoziation mit der LTL konnte für ein höheres Patientenalter ($r=-0,29$; $p<0,001$) sowie für eine längere Krankheitsdauer ($r=-0,16$; $p<0,001$) nachgewiesen werden. Außerdem war, nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer, für jede um 0,2 Einheiten kürzere LTL der *Baseline*-EDSS-Score der Patienten um 0,27 höher ($p<0,001$) und das Gesamthirnvolumen um 7,4 Kubikmillimeter (mm^3) sowie die weiße Hirnsubstanz um $4,0 \text{ mm}^3$ geringer ($p<0,05$ für beide). Die LTL war zudem schwach mit der Veränderung des EDSS-Scores und des Volumens der grauen Hirnsubstanz im zeitlichen Verlauf assoziiert ($p=0,06$ bzw. $p=0,02$). Bei den Patienten mit RRMS konnte eine 1,27-fach höhere Schubrate für jede um 0,2 Einheiten kürzere LTL festgestellt werden ($p=0,001$). Um die Assoziation der LTL mit der Konversion der RRMS zur SPMS abzuschätzen, wurden 23 Patienten ausgewählt, bei denen im Studienverlauf eine solche Konversion stattfand. Es wurden dazu passend 23 weitere Patienten, *gematcht* nach Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer und EDSS-Score zum Studienbeginn, ausgewählt, bei denen es nicht zur Konversion kam. Für diese insgesamt 46 Patienten wurde die LTL zu mehreren Zeitpunkten (bis zu zehn Jahre nach *Baseline*) bestimmt. Eine Abnahme der LTL um 0,2 Einheiten in der Gruppe der 46 Patienten der Längsschnittuntersuchung war mit einer durchschnittlichen Erhöhung der EDSS-Scores um 0,34 ($p=0,012$) assoziiert. Außerdem stieg das Risiko einer Konversion von RRMS zu SPMS um das 1,4-fache pro 0,2 Einheiten kürzere LTL, allerdings erreichte diese Assoziation nicht das Signifikanzniveau ($p=0,40$). Krysko *et al.* [140] konnten insgesamt zeigen, dass die LTL bei Patienten mit MS, unabhängig von Krankheitsdauer und Alter, mit einer fortschreitenden Beeinträchtigung der Patienten sowie dem langfristigen Krankheitsverlauf assoziiert ist.

An der Studie von Habib *et al.* [141] nahmen 258 Personen teil, von denen 138 Patienten mit MS und 120 gesunde Kontrollen waren. Der Frauenanteil war bei den Patienten mit MS höher als bei den Kontrollen (Tab. 3, Seite (S.) 37). Das höchste Durchschnittsalter hatten die Patienten mit SPMS mit 51,8 Jahren. Die durchschnittlich jüngsten Patienten waren jene mit RRMS (35,2 Jahre). Den Teilnehmern wurde peripheres Vollblut abgenommen, um die relative LTL zu bestimmen. Zur Messung dieser wurde der *multiplex* qPCR-Assay [85] verwendet. Sowohl bei den Patienten mit MS als auch bei den gesunden Kontrollen konnte eine starke negative Assoziation zwischen Alter und LTL festgestellt werden ($r=-0,46$ bzw. $-0,65$; $p<0,001$). Ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der LTL wurde nicht identifiziert. Verglichen mit den Kontrollen ($0,94\pm 0,25$) war die durchschnittliche LTL aller drei Patientengruppen signifikant geringer (RRMS: $0,76\pm 0,22$;

SPMS: $0,67 \pm 0,21$; PPMS: $0,67 \pm 0,27$; für alle $p < 0,001$). Eine signifikante Assoziation zwischen LTL und EDSS-Score der Patienten konnte nachgewiesen werden ($r = -0,296$; $p = 0,001$), jedoch wurde diese maßgeblich durch den Effekt des chronologischen Alters erklärt. Des Weiteren wurden von drei Patienten mit MS und drei Kontrollen für ein *in vitro*-Experiment lymphoblastoide Zelllinien aus B-Zellen des peripheren Blutes gewonnen. Im Vergleich mit den TL der lymphoblastoiden Zelllinien der Kontrollen waren die der Patienten mit MS kürzer, allerdings war der Telomerverlust über die Dauer der Zellkultur in beiden Gruppen ähnlich.

Die Ergebnisse der siebten Studie (Hecker *et al.* [134]) wurden bereits in Kap. 4.1. dieser Arbeit ausführlich beschrieben, sodass sie an dieser Stelle nicht im Detail wiederholt sein sollen. Zusammengefasst zeigten sich in der „Rostocker Kohorte“ ($n = 120$) eine negative Korrelation zwischen LTL und Alter sowie signifikant kürzere LTL bei Patienten mit RRMS im Vergleich zu Patienten mit PPMS und Gesunden, wobei eine relativ kurze LTL mit einer früheren Konversion zur SPMS assoziiert war.

4.2.1.4. Vergleich der Studien nach spezifischen Gesichtspunkten

Sechs der sieben Studien waren Beobachtungsstudien, wohingegen die Studie von Guan *et al.* [128] die einzige Interventionsstudie war, bei der die Auswirkung einer täglichen Einnahme von Vitamin E auf die TL in Blutzellen untersucht wurde. In die Studie von Krysko *et al.* [140] wurden als einzige keine Kontrollen eingeschlossen, dafür umfasste diese jedoch mit Abstand die meisten Patienten ($n = 516$). Von den Studien mit Kontrollgruppe hatten Redondo *et al.* [139] als einzige keine gesunden Kontrollen, sondern Patienten mit Arthrose. In den meisten Studien ($n = 5$) wurden die Patienten ausschließlich oder zumindest teilweise mit den Diagnosekriterien nach McDonald aus dem Jahr 2001 [38] diagnostiziert (Tab. 3). Der Frauenanteil in der Gruppe der Patienten mit MS variierte in den Studien von 30,0% [139] bis 68,8% [140]. Die Studie von Redondo *et al.* [139] wies das höchste Durchschnittsalter sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen auf (54,1 bzw. 55,7 Jahre). Die jüngsten Teilnehmer hatte die Studie von Guan *et al.* [128] mit einem Altersdurchschnitt von 32,8 Jahren (Patienten) bzw. 33,6 Jahren (Kontrollen). Innerhalb von fünf der sieben Studien waren die zu vergleichenden Gruppen ähnlich hinsichtlich der Altersverteilung und der Geschlechterverteilung (*gematcht*).

Die am häufigsten verwendeten Zellen zur Messung der TL waren Leukozyten aus peripherem Vollblut (in fünf der sieben Studien). In der Studie von Hug *et al.* [138] wurden spezifisch CD4+ und CD8+ T-Zellen zur Messung der TL verwendet. Als Besonderheit der Studie von Redondo *et al.* [139] wurde hier die TL in aus dem Knochenmark gewonnenen MSCs gemessen. Sowohl in der zuletzt genannten Studie als auch bei jener von Habib *et al.* [141] wurden mit den gewonnenen Zellen auch Experimente zur TL-Dynamik in Zellkulturen (*in vitro*) durchgeführt.

Bisher wurde in allen Studien zur TL bei Patienten mit MS nicht die Länge einzelner Telomere eines Chromosoms gemessen, sondern die durchschnittliche Länge aller 92 Telomere pro Zelle. In vier der sieben Studien wurde die TL durch die TRFL-Analyse mittels *Southern Blot* bestimmt [127,128,138,139]. In den Studien von Krysko *et al.* [140], Habib *et al.* [141] und Hecker *et al.* [134] wurden die relativen TL als T/S-Verhältnisse mittels qPCR-Assays bestimmt. Krysko *et al.* nutzten den 2002 eingeführten *singleplex* qPCR-Assay von Cawthon [84], wohingegen Habib *et al.* und Hecker *et al.* den 2009 beschriebenen *multiplex* qPCR-Assay [85] nutzten.

In keiner der in dieser Übersichtsarbeit eingeschlossenen Studien zu TL bei Patienten mit MS konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern hinsichtlich der TL identifiziert werden. Abgesehen von der zweiten Studie von Guan *et al.* [128] wurde bisher in allen Studien eine signifikante negative Assoziation zwischen TL und chronologischem Alter gezeigt. Aufgrund dessen wurde in fünf Studien eine Adjustierung für den Effekt des Alters als *Confounder* in der statistischen Analyse durchgeführt (Tab. 4). Krysko *et al.* [140] berücksichtigten darüber hinaus Geschlecht und Krankheitsdauer als *Confounder* in der statistischen Analyse. In der Studie zur „Rostocker Kohorte“ [134] wurde für Alter und Geschlecht adjustiert (Kap. 3.1.6.).

4.2.1.5. Integration bisheriger Befunde zur LTL bei Patienten mit MS durch Metaanalyse

In vier der sieben Studien konnten signifikant kürzere Telomere in Immunzellen von Patienten mindestens einer Verlaufsform der MS identifiziert werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Telomere in den Studien von Guan *et al.* bei Patienten mit MS um ca. 24% [128] und bei Patienten mit PPMS um ca. 26% [127] kürzer. In der Studie von Habib *et al.* [141] zeigten Patienten mit RRMS rund 19% kürzere und Patienten mit SPMS bzw. PPMS jeweils ca. 29% kürzere Telomere als die Kontrollgruppe. Achtzehn Prozent kürzere Telomere konnten in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie (Kap. 4.1.) in der Kohorte der Patienten mit RRMS im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden. Basierend auf den Daten dieser vier Studien konnte eine Metaanalyse durchgeführt werden. Die standardisierte Mittelwertdifferenz ergab -0,66 ($p=0,003$; Abb. 15).

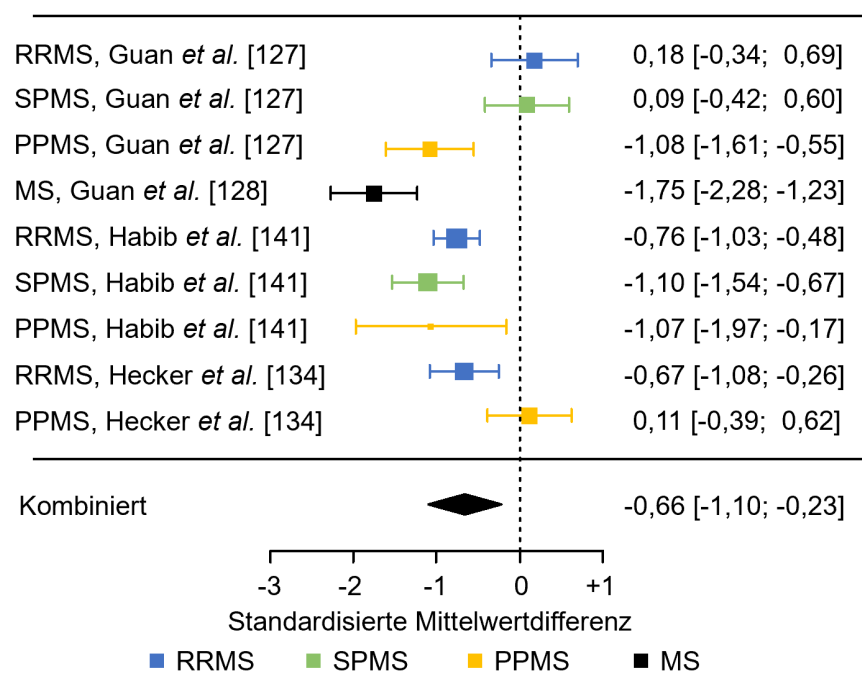


Abb. 15: Forest-Plot der Metaanalyse der vier Studien

Die standardisierten Mittelwertdifferenzen und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle sind für den Vergleich der LTL der Patienten mit MS (wenn möglich in Verlaufsform unterteilt) und der jeweiligen Kontrollgruppen gezeigt. Zwischen den Studien konnte Heterogenität festgestellt werden (Cochran's Q-Test: $p<0,001$). Insgesamt ergab die Analyse signifikant kürzere Telomere bei Patienten mit MS im Vergleich zu Kontrollen ($p=0,003$) mit einer Effektstärke von -0,66. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Bühring *et al.* [136].

LTL: Leukozyten-Telomerlänge; MS: Multiple Sklerose; PPMS: primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS: schubförmig remittierende Multiple Sklerose; SPMS: sekundär progrediente Multiple Sklerose.

Ein Publikationsbias konnte durch Prüfung auf Asymmetrie im *Funnel-Plot* nicht nachgewiesen werden (Egger-Test: $p=0,771$; Abb. 16). Anhand der Q-Statistik konnte eine deutliche Heterogenität der Studienergebnisse identifiziert werden ($p<0,001$). Zwischen den MS-Verlaufsformen konnten hinsichtlich der LTL keine offensichtlichen Unterschiede erkannt werden. Aufgrund nicht ausreichender Daten aus den übrigen drei Studien konnten diese nicht in die Metaanalyse eingeschlossen werden.

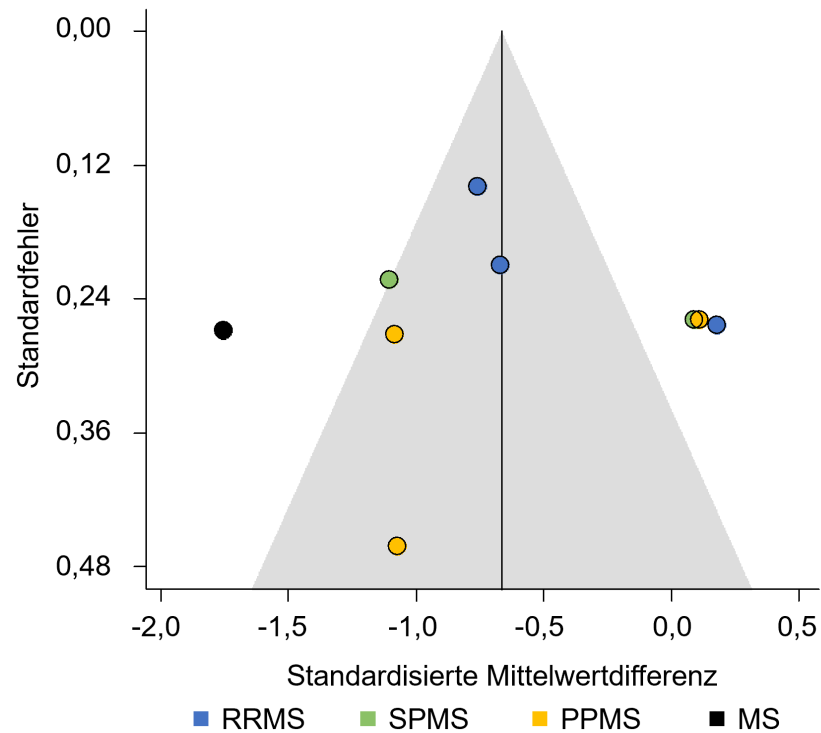


Abb. 16: Funnel-Plot der Metaanalyse der vier Studien

Es konnte im *Funnel-Plot* keine Asymmetrie festgestellt werden. Außerdem wurde im Regressionstest nach Egger eine Publikationsbias abgelehnt ($p=0,771$). Modifiziert übernommen von Bühring *et al.* [136].

MS: Multiple Sklerose; PPMS: primär progrediente MS; RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS.

4.2.2. Literaturrecherche nach mit MS und TL assoziierten Faktoren

Aufgrund der zuvor beschriebenen Zusammenhänge zwischen MS und TL wurde im Rahmen dieser Arbeit eine klassische Literaturrecherche durchgeführt, in der nach Faktoren gesucht wurde, die sowohl mit der MS als auch der TL assoziiert sind. Die Faktoren wurden in drei Kategorien eingeteilt: 1. genetische Faktoren (Kap. 4.2.2.1); 2. Umweltfaktoren (Kap. 4.2.2.2.); 3. Faktoren des Lebensstils (Kap. 4.2.2.3.). Zu jeder Kategorie wurde eine Tabelle erstellt, die jeweils die Richtung der Assoziation sowie die Evidenz anhand der Studienlage angibt. Im Folgenden werden die identifizierten Faktoren nach den Kategorien sortiert beschrieben. Für weiterführende Informationen sei an dieser Stelle auf die entsprechende Publikation [137] verwiesen.

4.2.2.1. Genetische Faktoren mit Assoziation zu MS und TL

Geschlecht

Unterschiede zwischen den biologischen Geschlechtern zeigen sich in einer Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder und Körpereigenschaften, so auch hinsichtlich MS und TL [142,143]. Für Frauen ergaben in einer Reihe von Studien ein zwei- bis dreifach höheres Risiko an MS zu erkranken als für Männer (Tab. 5) [3,10,11,144,145]. Außerdem zeigen Patientinnen mit RRMS eine höhere Schubrate als männliche Patienten [146,147]. Männer haben hingegen häufiger einen progredienten Verlauf der MS mit einer rascheren Zunahme des Behinderungsgrades und früherer Konversion der RRMS zur SPMS [148-150]. Für die PPMS zeigt sich ein annähernd ausgeglichenes Geschlechterverhältnis [151]. Okuda *et al.* [152] zeigten in einer Studie, dass sich die TL zum Zeitpunkt der Geburt zwischen männlichen und weiblichen Neugeborenen nicht signifikant unterscheidet. Dennoch wurde in einer Metaanalyse mit über 36.000 Patienten gezeigt, dass Frauen im Durchschnitt längere Telomere haben als Männer [153]. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die Telomere bei Frauen langsamer verkürzen [154].

Tab. 5: Genetische Faktoren mit Assoziation zur MS und TL

Faktoren	MS-Risiko		Schwere des Verlaufs		TL	
	Einfluss	Evidenzgrad	Einfluss	Evidenzgrad	Einfluss	Evidenzgrad
Weibliches Geschlecht	↑	***	↕	***	↑	***
Östrogen bei Frauen	↑	*	↓	**	↑	*
Europäische Herkunft	↑	***	↓	*	↓	***
Familiäre Vererbung	↕	***	-	-	↕	***
HLA-Allele	↕	***	↕	*	↕	*
SNPs	↕	**	-	-	↕	**
Testosteron bei Männern	↓	*	↓	*	↑	*

Diese Tabelle veranschaulicht die Assoziation genetischer Faktoren mit dem Risiko für MS, der Schwere der Erkrankung und der TL. Die Richtung der Assoziation ist durch Pfeile dargestellt. Die Färbung zeigt, ob es sich um eine positive (grün) oder negative (rot) Assoziation handelt. Beispielsweise ist die Assoziation zwischen weiblichem Geschlecht und dem MS-Risiko durch einen nach oben gerichteten roten Pfeil gekennzeichnet, was dafür steht, dass Frauen ein erhöhtes Risiko haben, an MS zu erkranken. Ein roter, nach unten gerichteter Pfeil in der Spalte der TL steht für eine Assoziation des Faktors mit kürzeren Telomeren. Bei einem grünen Pfeil ist der Faktor mit einer längeren TL assoziiert. Gegenläufige Pfeile (blau) bedeuten eine kontextabhängige Assoziation. Der Grad der Evidenz wurde anhand der Anzahl der Studien, die eine Assoziation beschrieben haben, der Konsistenz der identifizierten Studienergebnisse und der statistischen Signifikanz semiquantitativ festgelegt, wobei „*“ für eine geringe Evidenz und „***“ für eine hohe Evidenz der Assoziation steht. Falls keine Assoziation zwischen einem Faktor und der Krankheitsschwere identifiziert werden konnte, wurde dies mit dem Zeichen „-“ gekennzeichnet. Die Faktoren wurden nach der Richtung der Assoziation mit dem Risiko für MS sortiert (modifiziert übernommen von Hecker *et al.* [137]).

HLA: Humanes Leukozytenantigen; MS: Multiple Sklerose; SNP: Einzelnukleotidpolymorphismus; TL: Telomerlänge.

Männer und Frauen unterscheiden sich hinsichtlich der Produktion von Sexualhormonen. Da sich bei Frauen während der Pubertät und der Schwangerschaft grundlegende Änderungen im Hormonhaushalt abspielen [155], sind auch Änderungen im Hinblick auf die Erkrankung mit MS naheliegend [150]. Während das Geschlechtsverhältnis der Patienten mit MS vor der Pubertät ca. 1:1 (weiblich : männlich) ist, liegt es nach der Pubertät bei 2-3:1 [146,156]. Ein späterer Eintritt der Pubertät und der Menarche ist bei Frauen mit einem geringeren Risiko für eine MS-Erkrankung assoziiert [157,158]. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Schubrate bei Schwangeren mit MS vor allem während des dritten Trimesters signifikant erniedrigt ist [155,159]. In einer interventionellen Studie mit 164 Teilnehmerinnen konnte festgestellt werden, dass Patientinnen mit RRMS, die ein Estriolpräparat erhielten, im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe eine geringere Schubrate sowie bessere kognitive Leistungen, verminderte Fatigue und einen geringeren Verlust an grauer Hirnsubstanz aufwiesen [160]. In einer anderen Studie führte die Einnahme von Estriol bei Patientinnen mit RRMS über einen Zeitraum von sechs Monaten u. a. zu einer Abnahme der Anzahl und des Volumens der Läsionen im MRT [161]. Eine lange körpereigene Östrogenproduktion (gemessen anhand der Länge des fruchtbaren Zeitraumes) war in einer Studie mit postmenopausalen Frauen positiv mit der relativen TL in Zellen des peripheren Blutes assoziiert [162]. In Ovarien von Mäusen konnte durch eine gezielte Östrogendefizienz eine Verkürzung der TL induziert werden, die durch Östrogensatztherapie reversibel war [163]. In einer weiteren Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der LTL von Männern und sowohl dem Östrogenspiegel als auch dem Testosteronspiegel im Serum festgestellt werden [164]. Bei Patienten mit testikulärer Unterfunktion, was zu einem Mangel an Testosteron führt, wurde im Vergleich zu Männern mit normaler testikulärer Funktion ein mehr als vierfach erhöhtes Risiko für eine MS beobachtet [165]. Außerdem zeigten Patienten mit MS mit niedrigen Testosteronspiegeln einen höheren Behinderungsgrad (operationalisiert mit der EDSS) [166].

Herkunft

Die Prävalenz der MS ist weltweit sehr heterogen (Kap. 1.1.1., S. 7, Abb. 1) . Neben anderen Faktoren sind die weltweit unterschiedlichen Prävalenzen auch auf die genetische Herkunft zurückzuführen. So zeigte eine Studie in einer südafrikanischen Provinz starke Unterschiede in der MS-Prävalenz zwischen Schwarzen (0,2 Patienten mit MS pro 100.000 Einwohner) und Weißen (25,6 Patienten mit MS pro 100.000 Einwohner) [5]. Zwei weitere Studien zeigten bis zu achtmal geringere Prävalenzen für Asiaten und Schwarze im Vergleich zu Weißen [167,168]. Hinsichtlich der Schwere des Krankheitsverlaufs liegen uneindeutige Daten vor. Es wurde ein schwererer Krankheitsverlauf bei afrikanischen Amerikanern im Vergleich zu weißen Amerikanern gezeigt [169], jedoch schwächte die Einbeziehung von Bildung, Einkommen sowie Krankenversicherungsstatus in die statistische Analyse diese Unterschiede ab [170]. Obwohl sich die TL zwischen Neugeborenen unterschiedlicher Abstammung nicht signifikant unterschied [152], konnten bei Kindern europäischer Abstammung kürzere Telomere im Speichel als bspw. bei Kindern mit afrikanisch-amerikanischer Abstammung festgestellt werden [171,172]. Auch bei Erwachsenen europäischer Abstammung fanden sich signifikant kürzere Telomere im Vergleich zu Individuen mit afrikanischer Herkunft in verschiedenen Geweben [74,173].

Genetische Vererbung

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer Erkrankung an MS zu einem bestimmten Teil vererbbar ist [174,175]. In einer Metaanalyse zum MS-Risiko bei Zwillingen konnte ein Risiko von 18,2% identifiziert werden, dass nach Auftreten einer MS bei einem Zwilling auch der zweite erkrankt [176]. Für nicht-Zwilling-Geschwister lag dieses Risiko bei 2,7%. Zwischen betroffenen Familienmitgliedern konnte keine Übereinstimmung des Schweregrades der Erkrankung festgestellt werden, allerdings haben betroffene Zwillinge häufig die gleiche Verlaufsform [177].

Über 200 Genorte mit Assoziation zur MS wurden bereits identifiziert, von denen die HLA-Loci die am besten untersucht sind [174,178]. Für verschiedene HLA-Allele konnten sowohl risikoerhöhende als auch protektive Effekte nachgewiesen werden. So ist die Chance einer Erkrankung mit MS für Träger des HLA-DRB1*15:01-Allels fast vierfach höher (OR: 3,92), wohingegen das HLA-A*02:01-Allel protektiv wirkt (OR: 0,67) [12,178]. Die Häufigkeitsverteilung der HLA-Allele könnte zur globalen Heterogenität der MS-Prävalenz beitragen. So ist das Risiko-Allel HLA-DRB1*15:01 bspw. bei Europäern besonders häufig [179]. Yates *et al.* [180] konnten zeigen, dass junge Patienten mit MS, die Träger des HLA-DRB1*15:01-Allels sind, schwerere Entzündungen des Parenchyms des Motorkortex und der Meningen hatten sowie eine stärkere Demyelinisierung der Neurone und stärkere kognitive Defizite. Die identifizierten nicht-HLA-Risikovarianten zeigten in Assoziationstudien eine OR zwischen 1,06 und 2,06 für die MS [174]. Außerdem sind einige dieser genetischen Varianten mit dem Behinderungsgrad sowie der Schubfrequenz assoziiert [181-183].

Die TL kann durch zwei Mechanismen vererbt werden: zum einen durch die indirekte Vererbung, bei der SNPs in nicht-telomerischen Bereichen vererbt werden und Einfluss auf die Telomererhaltung haben, und zum anderen durch die direkte Vererbung durch Unterschiede der TL in den Keimzellen der Eltern [184]. Dementsprechend korreliert die LTL zwischen sich nächstehenden Familienmitgliedern (bspw.: Geschwister: $r=0,22$; $p=3,0 \times 10^{-8}$; Cousins: $r=0,07$; $p=0,04$) [184]. Zudem konnte eine Assoziation in der TL von Eltern und deren Nachkommen gezeigt werden [185,186]. Modelle zur LTL-Verkürzungsrates konnten eine Vererbung zwischen 24 und 32% aufzeigen [187]. In einer Studie mit Amerikanern europäischer Abstammung konnten 28 bis 31% der Varianz der TL durch SNPs erklärt werden [188]. In einer ersten genomweiten Assoziationsstudie (*genome-wide association study*, GWAS) von 2013 konnten sieben Genorte mit Assoziation zur LTL gefunden werden, von denen fünf eine Rolle in der Regulation der Telomere einnehmen [189]. Die SNPs zweier Genorte (*TERC* und *RTEL1*) sind bei Europäern im Kopplungsungleichgewicht mit SNPs, die mit MS assoziiert sind, wobei jeweils das MS-Risikoallel mit längeren Telomeren assoziiert ist [137]. Des Weiteren konnte in einer Studie eine Assoziation zwischen dem Vorliegen des HLA-DRB1*04-Allels und einer signifikant kürzeren TL in CD4+ T Zellen identifiziert werden [190]. In einer aktuellen GWAS, in der mehr als 100 neue mit der LTL assoziierte Genorte gefunden wurden, konnte mittels Mendelscher Randomisierung außerdem für jede um eine Standardabweichung größere genetisch determinierte LTL ein höheres MS-Risiko (OR: 1,35) identifiziert werden [191].

4.2.2.2. Assoziation von Umweltfaktoren mit MS und TL

Infektionen

Neben den genetischen Anlagen wird das individuelle Risiko an MS zu erkranken auch wesentlich durch Umweltfaktoren beeinflusst (Tab. 6). In einem systematischen Review konnte herausgearbeitet werden, dass mehr als 90% der Patienten mit MS, jedoch nur 81,4% der Kontrollen seropositiv für EBV waren [192]. In weiteren Studien wurde eine Seroprävalenz für EBV von bis zu 100% bei Patienten mit MS [193,194] und eine Serokonversion vor der MS-Diagnose [193,195] beschrieben. In einer Metaanalyse von Belbasis *et al.* [14] konnte für die Seropositivität für AK gegen das nukleäre Antigen von EBV (*Epstein-Barr nuclear antigen*, EBNA) eine OR für MS von 4,46 berechnet werden. Außerdem konnten Assoziationen zwischen EBNA-spezifischen AK-Titern sowie Anzahl und Volumen von Läsionen im MRT und EDSS-Scores von Patienten mit MS identifiziert werden [196,197]. Darüber hinaus korrelierte die Höhe dieser AK-Titer mit einem erhöhten Risiko einer Konversion von CIS zu MS (HR: 2,2) [197].

Tab. 6: Umweltfaktoren mit Assoziation zur MS und TL

Faktoren	MS-Risiko		Schwere des Verlaufs		TL	
	Einfluss	Evidenzgrad	Einfluss	Evidenzgrad	Einfluss	Evidenzgrad
EBV-Infektion	↑	***	↑	**	↕	*
HHV-6A-Infektion	↑	*	↑	*	↓	**
Luftverschmutzung	↑	*	↑	*	↓	**
Bakterielle Infektionen	↕	*	-	-	↓	*
CMV-Infektion	↓	*	↕	*	↓	**
Sonnenlicht	↓	**	↓	*	↕	*

Diese Tabelle veranschaulicht die identifizierten Assoziationen von Umweltfaktoren mit dem Risiko einer MS, der Schwere der MS-Erkrankung sowie der TL. Die Richtung der Assoziation ist durch Pfeile dargestellt. Die Färbung zeigt, ob es sich um eine positive (grün) oder negative (rot) Assoziation handelt. Ein roter, nach unten gerichteter Pfeil in der Spalte der TL steht für eine Assoziation des Faktors mit kürzeren Telomeren. Bei einem grünen Pfeil ist der Faktor mit einer längeren TL assoziiert. Gegenläufige Pfeile (blau) bedeuten eine kontextabhängige Assoziation. Der Grad der Evidenz wurde anhand der Anzahl der Studien, die eine Assoziation beschrieben haben, der Konsistenz der identifizierten Studienergebnisse und der statistischen Signifikanz festgelegt, wobei „*“ für eine geringe Evidenz und „***“ für eine hohe Evidenz der Assoziation steht. Falls keine Assoziation zwischen einem Faktor und der Krankheitsschwere identifiziert werden konnte, wurde dies mit dem Zeichen „-“ gekennzeichnet. Die Faktoren wurden nach der Richtung der Assoziation mit dem Risiko für MS sortiert. Diese Tabelle wurde adaptiert übernommen von Hecker *et al.* [137].

CMV: *cytomegalovirus*, Zytomegalievirus; EBV: Epstein-Barr-Virus; HHV: Humanes Herpesvirus; MS: Multiple Sklerose; TL: Telomerlänge.

EBV-infizierte B-Zellen tragen das Virus dauerhaft in sich und können durch Aktivierung der Telomerase und ALT (Kap. 1.2.1.) zu „unsterblichen“ Zellen werden [198,199]. Eine Infektion mit EBV zeigte keine Assoziation mit der LTL [200]. Allerdings konnte bei Individuen mit einer gleichzeitigen Infektion mit EBV und drei weiteren Herpesviridae über drei Jahre eine signifikant stärkere LTL-Verkürzung im Vergleich zu Individuen ohne serologische Evidenz für eine dieser vier Infektionen nachgewiesen werden [200].

Ein weiteres Herpesvirus mit Assoziation zur MS ist das humane Herpesvirus (HHV) -6 mit den Subtypen A und B. Im Vergleich zu Gesunden wurde bei Patienten mit RRMS eine höhere HHV-6A/B-Seropositivität beschrieben (82,9% bzw. 93,1%) [201]. In einer Subtyp-spezifischen Studie von Engdahl *et al.* [202] war eine Antikörperreaktion mit IgG gegen HHV-6A mit einem erhöhten Risiko für MS assoziiert (OR: 1,55), wohingegen interessanterweise eine Antikörperreaktion gegen HHV-6B eine protektive Assoziation zeigte (OR: 0,74). Überdies konnte

gezeigt werden, dass die Höhe der IgG-Titer gegen HHV-6 im Serum mit einer erhöhten Schubrate assoziiert ist [203], und, dass seropositive Patienten mit MS einen höheren Behinderungsgrad als seronegative Patienten aufweisen [201]. HHV-6 kann sich in die Telomerregion verschiedener Chromosomen integrieren [204]. In der Studie von Dowd *et al.* [200] war eine Infektion mit HHV-6 mit einer kürzeren LTL bei einer Folgeuntersuchung nach drei Jahren assoziiert.

In mehreren Studien konnte eine Assoziation zwischen einer Infektion mit dem Zytomegalievirus (*cytomegalovirus*, CMV) und einem geringeren MS-Risiko (OR: 0,70) identifiziert werden [205,206]. Zivadinov *et al.* [207] konnten zeigen, dass sowohl das Vorhandensein von AK gegen CMV (als Zeichen einer durchgemachten Infektion) als auch die Höhe dieser Titer günstig mit dem Verlauf der MS korrelieren, bspw. mit geringerer Schubrate, geringerer Hirnatrophie und weniger T2-Läsionen in der MRT. Allerdings wurden in einer anderen Studie eher nachteilige Effekte einer Infektion mit CMV, nämlich eine erhöhte Schubrate sowie ein höheres Risiko einer Konversion von CIS zu MS, beschrieben [208]. Im Vergleich zu EBV und HHV-6 zeigte eine Infektion mit CMV die stärkste negative Assoziation mit der LTL [200].

In Metaanalysen wurde gezeigt, dass Infektionen mit dem bakteriellen Erreger *Helicobacter pylori* (HP) bei Patienten mit MS seltener vorkommen als bei Kontrollen [209,210]. Histologische Untersuchungen stehen allerdings im Widerspruch mit den serologischen Untersuchungen [211]. Bei Ratten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der MS, und einer Infektion mit HP konnte ein geringerer Behinderungsgrad als bei jenen mit EAE und ohne HP-Infektion gemessen werden [212].

In einer Querschnittsstudie mit rund 3.500 Teilnehmern war die Seropositivität für Anti-HP-IgG bei 55-75-Jährigen signifikant mit kürzeren LTL assoziiert, allerdings erreichte diese Assoziation in der gesamten Kohorte keine Signifikanz [213].

Sonnenlichtexposition

Die Prävalenz und Inzidenz der MS ist in Ländern mit sehr hohem UV-Index signifikant niedriger als in Ländern mit niedrigem UV-Index [214]. Hedström *et al.* [215] zeigten, dass Sonnenlicht/UV-Strahlung sowohl direkt als auch indirekt (über die Produktion von Vitamin D in der Haut) das Risiko für MS beeinflusst. Außerdem wurde gezeigt, dass im April oder Mai geborene Bewohner der nördlichen Hemisphäre ein erhöhtes Risiko, die im Oktober oder November Geborenen ein niedrigeres Risiko für eine MS haben, was u. a. durch den Vitamin D-Mangel während der Schwangerschaft in den Wintermonaten nördlich des Äquators erklärt wird [216,217]. Die Arbeitsgruppe Magalhaes *et al.* [218] fand heraus, dass wenig Sonnenlichtexposition in der Kindheit und Adoleszenz das Risiko für MS erhöht. D'hooghe *et al.* [219] konnten zeigen, dass eine höhere Sonnenlichtexposition mit einer niedrigeren HR für das Erreichen eines EDSS-Scores von sechs bei Patienten mit RRMS einhergeht. Außerdem zeigten Ostkamp *et al.* [220], dass bei Patienten mit MS niedrigere Breitengrade, verbunden mit höherer Sonneneinstrahlung, mit einem geringeren Risiko für Läsionen, einem niedrigeren Schweregrad der MS und einem geringeren Anstieg des EDSS-Wertes über zwei Jahre assoziiert sind. Telomere sind besonders anfällig für oxidativen Stress und DNA-Schäden infolge von UV-A-Strahlung [71,221,222]. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von Zellen mit UV-A dosisabhängig zu kürzeren Telomeren führt [222,223]. Überdies wurde festgestellt, dass Individuen, die ihre Haut vor Sonnenlicht geschützt hatten, längere Telomere in den Hautzellen hatten als jene ohne Schutz [224].

Luftverschmutzung

In einer Metaanalyse konnten Lotfi *et al.* [225] zeigen, dass eine Exposition gegenüber Feinstaub (*particular matter*, PM) der Größen 2,5 und 10 Mikrometer mit einem erhöhten Risiko für MS assoziiert ist (Risikoverhältnis: 1,28). Neben PM_{2,5} und PM₁₀ sind weitere Stoffe, die die Luft verunreinigen, bspw. Kohlenmonoxid und Schwefeldioxid, mit dem Auftreten der MS assoziiert [226]. Überdies korrelierte die PM₁₀-Exposition mit dem Schubrisiko bei Patienten mit RRMS (OR: 4,143) [227]. Angelici *et al.* [228] konnten außerdem eine Assoziation zwischen Krankenhausaufnahmen aufgrund eines Schubereignisses der MS und der Exposition gegenüber PM₁₀ identifizieren. Es wird vermutet, dass Luftverschmutzung u. a. zu erhöhtem oxidativen Stress im Körper und damit zu verkürzten Telomeren führt [71,229]. In zwei systematischen Reviews konnten für verschiedene Schadstoffe in der Luft Assoziationen mit der TL gezeigt werden [230,231]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine höhere Exposition gegenüber PM_{2,5} bei Schwangeren zu einer verkürzten TL im Nabelschnurblut der Neugeborenen führt [232]. Bei Vorschulkindern konnte ebenfalls eine negative Assoziation zwischen Luftverschmutzung und LTL identifiziert werden [233].

4.2.2.3. Auswirkungen des Lebensstils auf MS und TL

Rauchen

Neben genetischen sowie Umweltfaktoren konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch Faktoren des Lebensstils mit potenziellem Einfluss auf die MS und die TL in der Literatur identifiziert werden. Verglichen mit Individuen, die noch nie geraucht haben, hatten Raucher in einer Metaanalyse ein erhöhtes Risiko für MS (OR: 1,57; Tab. 7) [234]. Passives Rauchen war in einer Studie von Hedström *et al.* [235] ebenfalls mit einem höheren Risiko für MS assoziiert, wobei eine längere Exposition das Risiko weiter erhöhte. Bei rauchenden Patienten konnte außerdem ein im Durchschnitt höherer EDSS-Wert festgestellt werden als bei Nichtrauchern [236]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Raucher mit CIS ein höheres Konversionsrisiko zur MS haben als Nichtraucher (HR: 2,3) [237]. Zusätzlich erhöht Rauchen das Risiko einer Konversion von RRMS zu SPMS, und bei Patienten, die das Rauchen aufgaben, konvertierte die Erkrankung später als bei jenen, die weiterhin rauchten [15,238]. In bildgebenden Untersuchungen von 128 Rauchern mit MS wurde, verglichen mit 240 Nichtrauchern, eine größere Anzahl an Läsionen, ein größeres Läsionsvolumen sowie vermehrte Atrophie des Gehirns festgestellt [239]. Zigarettenrauch führt u. a. zu vermehrtem oxidativen Stress [240]. Verglichen mit ehemaligen Rauchern und Nichtrauchern wurden in einer Metaanalyse kürzere Telomere in Zellen des peripheren Blutes von Rauchern festgestellt [241]. Bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft rauchten, konnte in bukkalen Zellen eine kürzere TL gemessen werden als bei nicht exponierten Kindern [242].

Faktoren	MS-Risiko		Schwere des Verlaufs		TL	
	Einfluss	Evidenzgrad	Einfluss	Evidenzgrad	Einfluss	Evidenzgrad
Rauchen	↑	***	↑	***	↓	***
Übergewicht	↑	***	↕	*	↓	***
Nacht-/Schichtarbeit	↑	**	-	-	↓	*
Psychologischer Stress	↑	*	↑	*	↓	**
Alkoholkonsum	↕	*	↓	*	↓	*
Kaffeekonsum	↓	*	-	-	↑	*
Sportliche Aktivität	↓	**	↓	**	↕	**
Mediterrane Ernährung	↓	*	↓	*	↑	**
Vitamin D Suffizienz	↓	**	↓	*	↑	**
Andere Vitamine	↓	*	-	-	↑	*

Tab. 7: Lebensstilfaktoren mit Assoziation zur MS und TL

Diese Tabelle zeigt die mit dem MS-Risiko, der Schwere der Erkrankung und der TL assoziierten Faktoren des Lebensstils. Die Richtung der Assoziation ist durch Pfeile dargestellt. Die Färbung zeigt, ob es sich um eine positive (grün) oder negative (rot) Assoziation handelt. Ein roter, nach unten gerichteter Pfeil in der Spalte der TL steht für eine Assoziation des Faktors mit kürzeren Telomeren. Bei einem grünen Pfeil ist der Faktor mit einer längeren TL assoziiert. Gegenläufige Pfeile (blau) bedeuten eine kontextabhängige Assoziation. Der Grad der Evidenz wurde anhand der Anzahl der Studien, die eine Assoziation beschrieben haben, der Konsistenz der identifizierten Studienergebnisse und der statistischen Signifikanz festgelegt, wobei „*“ für eine geringe Evidenz und „***“ für eine hohe Evidenz der Assoziation steht. Falls keine Assoziation zwischen einem Faktor und der Krankheitsschwere identifiziert werden konnte, wurde dies mit dem Zeichen „-“ gekennzeichnet. Die Faktoren wurden nach der Richtung der Assoziation mit dem Risiko für MS sortiert. Diese Tabelle wurde von Hecker *et al.* [137] modifiziert übernommen.

MS: Multiple Sklerose; TL: Telomerlänge.

Übergewicht

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Übergewicht (BMI: 25-30 kg/m²) bzw. Fettleibigkeit (BMI: >30 kg/m²) mit einem höheren, Untergewicht (BMI: 15-18,5 kg/m²) mit einem geringeren Risiko für MS assoziiert ist [243,244]. In einer Mendelschen Randomisierungsstudie konnte außerdem festgestellt werden, dass das Risiko für MS durch eine genetische Prädisposition für Fettleibigkeit erhöht wird [245]. Fettleibige Patienten mit MS hatten in einer weiteren Studie auch ein erhöhtes Risiko (OR: 1,3) für einen schwereren Verlauf im Vergleich zu normalgewichtigen Patienten [246]. Es konnte einerseits eine positive Korrelation zwischen BMI und EDSS-Score bei Patientinnen mit MS, andererseits eine negative Korrelation bei männlichen Patienten mit MS identifiziert werden [247]. In einer Metaanalyse stellte sich heraus, dass BMI und TL in Blutzellen bei Erwachsenen (Alter: >18 Jahre) negativ miteinander korrelierten, wobei diese Korrelation bei Jüngeren stärker ausgeprägt war [248]. In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2021 wurde festgestellt, dass übergewichtige und fettleibige Kinder kürzere Telomere in Blutzellen aufweisen als normalgewichtige Kinder [249].

Nacht-/Schichtarbeit

Es konnte gezeigt werden, dass Arbeit im Schichtsystem, besonders bei Individuen im adoleszenten Alter (<20 Jahre), das Risiko für eine Erkrankung an MS erhöht (OR: ~1,5) [250-252]. Außerdem stieg das Risiko für eine MS mit zunehmender Intensität der Schichtarbeit und längerer Arbeit im Schichtsystem an [251]. In einigen Studien konnten Assoziationen zwischen höherer Intensität von Schichtarbeit und verstärkter Telomerverkürzung im Vergleich zu Kontrollen aufgezeigt werden [253].

Stress

Stressige Lebensereignisse wie die Scheidung vom Ehepartner, ernsthafte Konflikte sowie das Erleben von Obdachlosigkeit oder der Verlust eines Kindes konnten mit einem erhöhten Risiko einer MS in Verbindung gebracht werden [254-256]. Buljevac *et al.* [257] zeigten, dass vier Wochen nach einem als stressig erlebten Ereignis die Rate an Verschlechterungen der MS-Symptomatik um mehr als das Zweifache anstieg. Patienten, die in ihrer Kindheit Opfer schweren Missbrauchs gewesen sind, zeigten außerdem höhere Schubraten als solche, die keinen schweren Missbrauch erlebten [258]. In einer Metaanalyse konnte eine signifikante Korrelation zwischen höherem erlebten Stress und kürzerer TL in Blutzellen ($r=-0,25$) identifiziert werden [259].

Alkohol- und Kaffeekonsum

Die schädigenden Wirkungen von Alkohol auf den menschlichen Körper und vor allem das Nervensystem, u. a. durch Induzierung von Demyelinisierung und Nervenzellschädigung, sind seit langer Zeit bekannt [260]. Nichtsdestotrotz sind die Studienergebnisse hinsichtlich der Assoziation von Alkoholkonsum und MS-Risiko heterogen. Einerseits zeigten Pakpoor *et al.* [261] ein besonders bei Männern erhöhtes Risiko für MS durch Alkoholabhängigkeit und -missbrauch. Andererseits war Alkoholkonsum in einigen Studien mit einem verringerten Risiko für MS assoziiert [262-264]. Alkoholkonsum wurde zudem mit einem günstigeren Krankheitsverlauf und langsamerer Behinderungsprogression in Verbindung gebracht [265,266]. In einer Metaanalyse konnte eine signifikante Assoziation zwischen Alkoholabusus und kürzerer TL festgestellt werden [267]. Außerdem war Alkoholkonsum innerhalb des ersten Trimesters der Schwangerschaft mit verkürzten Telomeren beim Kind assoziiert [268].

Neben Alkohol wurde auch die Assoziation von Kaffeekonsum mit der MS und der TL untersucht. Hedström *et al.* [269] zeigten in zwei Kohorten, dass Kaffeekonsum, abhängig von der Menge, mit einem bis zu 36% geringeren Risiko für MS assoziiert ist. Des Weiteren war erhöhter Kaffeekonsum bei Patienten mit RRMS mit einer längeren Zeit bis zum Erreichen eines EDSS-Scores von sechs assoziiert [265]. In der *Nurses' Health Study* korrelierte Kaffeekonsum positiv mit der LTL [270].

Sportliche Aktivität

Starke körperliche Aktivität verringert das Risiko für MS um bis zu 30% [271,272]. Außerdem konnte eine Assoziation zwischen intensivem aeroben Training bei Patienten mit MS und einer geringeren Schubrate belegt werden [273]. Grover *et al.* [274] zeigten zudem, dass höhere sportliche Aktivität bei pädiatrischen Patienten mit MS (Alter: 5-18 Jahre) zu einer geringerer Fatigue-Symptomatik führt und sportliche Aktivitäten mit einem geringeren T2-Läsionsvolumen und einer niedrigeren Schubrate assoziiert sind (beides: $r=-0,66$; $p=0,006$). Außerdem berichteten sportlich aktivere Patienten mit MS eine höhere gesundheitsbezogene Lebensqualität als jene mit weniger körperlicher Aktivität [275]. Sportliche Aktivität war ebenfalls mit größeren Volumina des Thalamus und Hippocampus sowie mit besserer neuraler Integrität bei Patienten mit MS korreliert [276]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass höhere körperliche Aktivität, bspw. langjähriges Ausdauertraining, im Vergleich zu einem bewegungsarmen Lebensstil mit längeren Telomeren assoziiert ist [277-279]. In einer Studie mit Ultratrail-Teilnehmern wurde hingegen

beobachtet, dass starke akute Belastung die TL im Speichel verkürzt [278], was zeigt, dass Überbelastung einen möglichen nachteiligen Effekt auf die TL haben könnte.

Ernährung

Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Zufuhr von mehrfach ungesättigten Fettsäuren das Risiko, an MS zu erkranken, verringert [280]. Außerdem konnte in einer Fall-Kontroll-Studie ein geringeres Risiko für MS bei Individuen mit hohem Verzehr von Früchten (OR: 0,23) und Gemüse (OR: 0,41) identifiziert werden [281]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, wonach Individuen, die in ihrer Kindheit häufiger Früchte und/oder Hülsenfrüchte verzehrt haben, ein reduziertes Risiko für MS aufwiesen [282]. Hedström *et al.* [283] identifizierten eine Assoziation zwischen höherem Fischkonsum und einem geringeren MS-Risiko. Esposito *et al.* zeigten zudem, dass das Einhalten einer mediterranen Ernährung (wenig Fleisch, dafür viele Früchte, Gemüse und Nüsse) mit einem geringeren EDSS-Score und MSSS (beide $r=-0,13$) assoziiert ist [284]. Gesunde Ernährung mit mediterraner Kost ist zudem mit einer längeren TL assoziiert [285-287]. Ein eher ungesunder Lebensstil, u. a. mit hohem Verzehr von verarbeitetem Fleisch und Zucker, wurde hingegen mit kürzeren Telomeren in Verbindung gebracht [287].

Vitamine

Als Besonderheit ist Vitamin D das einzige Vitamin, welches vom menschlichen Körper unter Sonnenexposition synthetisiert wird, aber auch über die Nahrung aufgenommen werden kann. Munger *et al.* [288] konnten zeigen, dass der Serum-Vitamin D-Spiegel mit dem Risiko für MS bei Frauen assoziiert ist: im Vergleich zur Gruppe mit den höchsten Vitamin D-Werten war das Risiko einer MS bei Frauen mit den niedrigsten Werten ca. zweimal höher (relatives Risiko (RR): 2,02). Passend dazu wurde in einer Studie gezeigt, dass die Aufnahme von Vitamin D sowohl mit der Nahrung als auch durch Nahrungsergänzungsmittel mit einem geringeren Risiko für MS assoziiert ist [289]. Darüber hinaus zeigten Kinder, deren Mütter während der frühen Phase der Schwangerschaft eine Vitamin D-Insuffizienz hatten, ein knapp zweifach erhöhtes Risiko, an MS zu erkranken (RR: 1,90), verglichen mit Kindern, deren Mütter suffiziente Serum-Vitamin D-Spiegel hatten [290]. Außerdem wurde gezeigt, dass höhere Serum-Vitamin D-Spiegel mit einer geringeren Schubrate sowie einer Reduktion der Anzahl neuer Läsionen in der Bildgebung assoziiert sind, während eine Vitamin D-Insuffizienz mit schwereren Verläufen der MS assoziiert ist [291,292]. Ferner haben nach aktueller Studienlage Individuen mit suffizientem Plasma-Vitamin D-Spiegel im Mittel eine längere LTL als diejenigen mit einer Insuffizienz [293,294]. In einer Interventionsstudie stellte sich zudem heraus, dass die Supplementierung von Vitamin D über zwölf Monate mit einer Verlängerung der LTL einhergeht [295]. In anderen Studien konnte aufgezeigt werden, dass sowohl höhere mütterliche Serum-Vitamin D-Spiegel als auch eine vermehrte Vitamin D-Aufnahme mit einer längeren LTL im Nabelschnurblut von Neugeborenen assoziiert sind [296,297].

Bisher gibt es nur wenige Studien, die eine mögliche Assoziation zwischen anderen Vitaminen und der MS bzw. der TL untersucht haben. Guan *et al.* [128] konnten zeigen, dass die Gabe von Vitamin E bei Patienten mit MS zu einer signifikanten Reduktion des systemischen oxidativen Stresses führt. Allerdings konnte, mutmaßlich aufgrund des kurzen Folgezeitraums von drei Monaten, keine Auswirkung auf den EDSS-Score oder die TL beobachtet werden. Allerdings zeigten Corina *et al.* [298], dass Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und einer relativ hohen täglichen Aufnahme an Vitamin E eine längere LTL hatten als jene mit niedrigerer

Vitaminaufnahme. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Individuen, die Vitamin B-12-Nahrungsergänzungsmittel nutzten, eine 5,9% längere LTL hatten als jene ohne Supplementierung von Vitamin B-12 und, dass Patienten mit MS signifikant geringere Vitamin B-12-Serumspiegel hatten als Kontrollen [299].

4.2.2.4. Übersicht über mit der MS und der TL assoziierte Faktoren

Die im Rahmen der klassischen Literatursuche identifizierten genetischen, Umwelt- und Lebensstilfaktoren, die in der Literatur als mit der MS sowie der TL assoziiert beschrieben wurden, sind in Abb. 17 zusammenfassend dargestellt. Die entsprechenden Faktoren wurden publizierten Studien und Artikeln entnommen und im Rahmen dieser Arbeit zusammengefasst. Die detaillierten Informationen über die Assoziationen der Faktoren mit der MS und der TL können den vorherigen Kap. (Kap. 4.2.2.1.-4.2.2.3.) entnommen werden.

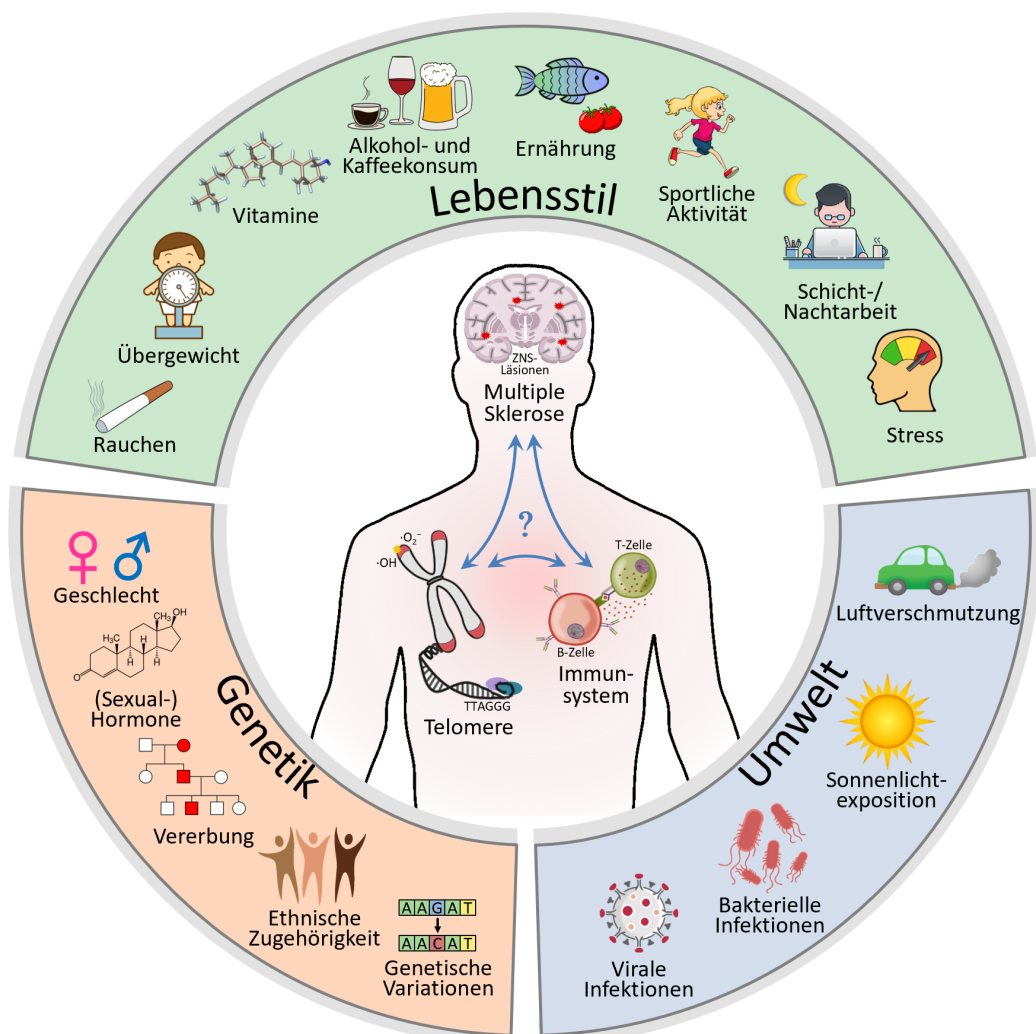


Abb. 17: Übersicht über die mit der MS und der TL assoziierten Faktoren

Es konnten Faktoren identifiziert werden, die sowohl mit dem Risiko an MS zu erkranken und/oder der Schwere der Erkrankung korrelieren, als auch mit einer Veränderung der TL assoziiert sind. Die einzelnen Faktoren sind jeweils einer der drei Überkategorien „Genetik“, „Umwelt“ oder „Lebensstil“ zugeordnet und beispielhaft veranschaulicht. Die farbliche Unterlegung der Überkategorie dient der besseren Unterscheidung. Eine zentrale Rolle in der Verbindung zwischen MS, Telomeren und Faktoren spielt vermutlich oxidativer Stress, der bspw. durch Rauchen oder ungünstige Ernährung entsteht, und u. a. zu Telomerverlust sowie Schwächung des Immunsystems führen kann. Dennoch sind die genauen Mechanismen und Auswirkungen der einzelnen Faktoren auf die MS, die TL und das Immunsystem bisweilen unvollständig aufgeklärt.

Modifiziert übernommen von Hecker *et al.* [137].

MS: Multiple Sklerose; TL: Telomerlänge.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation zwischen der neurodegenerativen Erkrankung MS und der Länge der Telomere in Blutzellen als Marker des biologischen Alters untersucht. Hierfür wurde einerseits eine Studie mit 60 Patienten mit MS sowie 60 gesunden Kontrollen, deren LTL gemessen wurde, durchgeführt (Kap. 4.1.) und andererseits systematisch nach Studien, im Rahmen derer die TL bei Patienten mit MS gemessen wurde, gesucht (Kap. 4.2.1.). Es konnten sieben Studien, inklusive der in Kap. 4.1. beschriebenen Studie zur „Rostocker Kohorte“, identifiziert werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MS kürzere Telomere in Blutzellen haben als Gesunde. Da die Ergebnisse der Studie zur LTL in der „Rostocker Kohorte“ und der systematischen Literaturrecherche thematisch eng miteinander in Verbindung stehen, werden diese teilweise gemeinsam diskutiert. Des Weiteren wurde im Rahmen einer klassischen Literaturrecherche nach Faktoren aus den Bereichen Genetik, Umwelt und Lebensstil gesucht, welche sowohl mit der MS als auch mit der TL assoziiert sind (Kap. 4.2.2.). Es konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, die in Studien mit einer Veränderung des MS-Risikos, der Schwere der Erkrankung und der TL korrelierten. In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext gesetzt und diskutiert.

5.1. *Repräsentativität der Rostocker Kohorte*

Die für die durchgeführte Studie zur LTL bei Patienten mit MS genutzten Patienten- und Kontrollproben wurden in einem vorhergegangenen Forschungsprojekt der Forschungsgruppe Neuroimmunologie gewonnen und anschließend eingelagert. Aus diesen eingelagerten Proben wurden jeweils 60 Proben von Patienten mit MS und 60 Proben von gesunden Kontrollen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie ausgewählt. Alle Patienten mit MS, von denen eine DNA-Probe verwendet wurde, erfüllten zum Zeitpunkt der BE die McDonald-Diagnosekriterien von 2001 [38] oder die revidierten Kriterien von 2005 [39], die zum damaligen Zeitpunkt der Rekrutierung der Patienten für die vorausgegangene Forschungsarbeit (zwischen 2003 und 2010) die aktuellsten Diagnosekriterien waren. Das Durchschnittsalter der ausgewählten Patienten und Kontrollen lag bei 48,0 bzw. 48,1 Jahren. Damit ähnelt die „Rostocker Kohorte“ der Stichprobe des deutschen nationalen Registers NeuroTransData ($n=21.407$) [300] sowie der Kohorte der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG, $n=35.350$) [301], wonach das Durchschnittsalter von Patienten mit MS im Jahr 2020 bei 49,0 Jahren (NeuroTransData), bzw. 2021 bei 47,3 Jahren (DMSG) lag. In der durchgeführten Studie war das Verhältnis der Geschlechter (weiblich : männlich) sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen 1:1, wobei es im NeuroTransData-Register bei ca. 2,6:1 und in der DMSG-Kohorte bei rund 2,5:1 lag [300,301]. In vergleichbaren nationalen Registern aus Finnland und Italien konnten dazu ähnliche Geschlechtsverhältnisse gezeigt werden (2,5:1 bzw. 2,0:1) [302,303]. Auch im Atlas der MS und weiteren Quellen wurde beschrieben, dass Frauen zwei bis drei Mal häufiger an MS erkranken als Männer [3,10,11,144,145,301]. Der Unterschied zwischen der „Rostocker Kohorte“ und nationalen bzw. globalen Daten ist jedoch auf die beabsichtigte Auswahl der Proben zurückzuführen, da eine ausgeglichene Geschlechts- sowie Altersverteilung zwischen den Gruppen zur besseren Vergleichbarkeit angestrebt wurde. Die „Rostocker Kohorte“ setzte sich aus 40 Patienten mit RRMS (66,6%) und 20 Patienten mit PPMS (33,3%) zusammen. Patienten mit SPMS wurden nicht

in die Kohorte aufgenommen. Von den in NeuroTransData registrierten Patienten sind 77% der Patienten mit RRMS und 15% der Patienten mit SPMS diagnostiziert, fünf Prozent leiden an einer PPMS sowie weitere drei Prozent am CIS [300], eine ähnliche Aufteilung der Verlaufsformen kann auch in der DMSG-Kohorte identifiziert werden [301]. Diese Daten decken sich ebenfalls mit den Ergebnissen verschiedener europäischer MS-Register [302,303]. Die Abweichung der „Rostocker Kohorte“ von den Angaben in der Literatur, vor allem bei der Kohorte der Patienten mit PPMS, ergibt sich auch hier aus der gezielten Auswahl der Proben.

Der Median der EDSS-Scores der Patienten mit RRMS der „Rostocker Kohorte“ betrug 2,5; wohingegen der mediane EDSS-Score von Patienten mit PPMS bei 5,0 lag (Kap. 4.1.1., Tab. 2). Im Vergleich zu den Patienten mit RRMS der DMSG-Kohorte [301], die einen medianen EDSS-Score von 2,0 aufwiesen, hatten die Patienten mit RRMS der „Rostocker Kohorte“ einen geringfügig höheren Behinderungsgrad, obwohl die mittlere Krankheitsdauer der Patienten mit RRMS in der DMSG-Kohorte länger war als die der „Rostocker Kohorte“ ($12,1 \pm 9,0$ vs. $6,1 \pm 6,8$). Ebenfalls unterschieden sich der mediane EDSS-Score sowie die durchschnittliche Krankheitsdauer zwischen den Patienten mit PPMS der beiden Kohorten (medianer EDSS-Score: 5,5 (DMSG-Kohorte) bzw. 5,0 (Rostocker Kohorte); durchschnittliche Krankheitsdauer: $14,4 \pm 10,1$ bzw. $3,0 \pm 4,7$) [301]. Eine mögliche Erklärung dieser Differenzen könnte in der unterschiedlichen Größe der Kohorten liegen, da die „Rostocker Kohorte“ mit 60 Patienten mit MS, bzw. mit 40 Patienten mit RRMS und 20 Patienten mit PPMS, in Relation zur DMSG-Kohorte mit 26.373 RRMS- bzw. 2.402 PPMS-Patienten verhältnismäßig klein war [301].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie zur LTL in der „Rostocker Kohorte“ umfasste insgesamt 60 Patienten mit MS und 60 gesunde Kontrollen. Durch durchgeführte systematische Literaturrecherche (Kap. 4.2.1.) konnten sechs weitere Studien zur TL bei Patienten mit MS identifiziert werden. Die Teilnehmer dieser Studien stammten aus Deutschland, Asien, dem Vereinigten Königreich und Nordamerika. Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten mit MS reichte von zehn [139] bis 516 [140], die Anzahl der eingeschlossenen Kontrollprobanden lag zwischen sechs [139] und 120 [141], wobei in der Studie von Krysko *et al.* [140] keine Kontrollgruppe untersucht wurde und die Kontrollgruppe von Redondo *et al.* [139] nicht aus gesunden Kontrollen, sondern aus Patienten mit Arthrose bestand. Im Vergleich zur „Rostocker Kohorte“ waren sowohl Patienten als auch Kontrollen in allen identifizierten Studien außer jener von Redondo *et al.* [139] jünger (Kap. 4.2.1.2., Tab. 3). Mit einem Durchschnittsalter von rund 33 Jahren waren die Patienten der beiden Studien von Guan *et al.* [127,128] am jüngsten und entsprachen nicht dem in der Literatur beschriebenen Durchschnittsalter bei Patienten mit MS, wohingegen die „Rostocker Kohorte“ mit einem mittleren Alter von 48,0 Jahren in etwa der Angaben der Literatur entspricht [300,301]. Nur in zwei der sechs weiteren identifizierten Studien lag der Frauenanteil bei den Patienten mit MS über 60% [140,141] und entsprach damit annähernd dem in der Literatur beschriebenen Geschlechtsverhältnis von 2-3:1 (weiblich : männlich) [300-303]. Mit 30% war der Frauenanteil in der Studie von Redondo *et al.* [139] am geringsten, allerdings bestand in dieser Studie die Patientenkohorte aus lediglich zehn Patienten. Zusammenfassend kann die „Rostocker Kohorte“ als eine repräsentative deutsche MS-Kohorte angesehen werden.

5.2. Betrachtung der verwendeten Proben sowie TL-Messmethode

Für die vorliegende Studie zur LTL bei Patienten mit MS wurde den Patienten und Kontrollen peripheres Vollblut entnommen. Die zellulären Bestandteile des Vollblutes sind Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten, von denen allerdings nur letztere einen Zellkern und somit DNA und Telomere enthalten. Mit Hilfe eines DNA-Isolations-Sets wurde die DNA aus dem Vollblut isoliert (Kap. 3.1.3.), um die mittlere LTL zu bestimmen (Kap. 3.1.5.). Die Entnahme von peripherem Blut zeichnet sich, im Gegensatz zur Entnahme von Proben durch bspw. Liquorpunktion, ZNS-Biopsie oder Knochenmarkpunktion, durch eine verhältnismäßig unkomplizierte Durchführung und Wiederholbarkeit sowie ein geringes Risiko für Komplikationen aus, weshalb sie die Methode der Wahl war. In fünf vergleichbaren Studien [127,128,134,140,141], die mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten systematischen Literatursuche identifiziert wurden, wurde ebenfalls die LTL bei Patienten mit MS gemessen. Eine weitere Arbeitsgruppe [138] untersuchte speziell die TL in CD4+ und CD8+ T-Zellen des peripheren Blutes, die bestimmte Zelltypen der Leukozyten darstellen, und die Arbeitsgruppe Redondo *et al.* [139] bestimmte die TL in MSCs des Knochenmarks, wozu eine Biopsie des Knochenmarks nötig war.

Die TL innerhalb eines Individuums unterscheidet sich in Abhängigkeit der Organe, wobei im Durchschnitt die kürzesten Telomere in Zellen des Vollblutes nachgewiesen wurden [74], was bei der Interpretation von Studienergebnissen berücksichtigt werden muss. Außerdem unterscheiden sich die jährlichen Verkürzungsraten der Telomere zwischen Zelltypen und Geweben. Dennoch korreliert die LTL mit der TL in anderen Geweben [74], sodass eine Nutzung der LTL als Marker des biologischen Alters sowie als Richtwert für die TL anderer Gewebe möglich ist. Auch in Studien zu anderen Krankheitsbildern, bspw. M. Alzheimer, wurde die TL bevorzugt in Zellen des peripheren Blutes gemessen. In einer Studie von Thomas *et al.* [304] aus dem Jahr 2008, in dem die TL von Blutzellen, bukkalen Zellen sowie hippocampalen Zellen zwischen Patienten mit M. Alzheimer und gesunden Kontrollen verglichen wurden, konnte interessanterweise gezeigt werden, dass im Vergleich zu gesunden Kontrollen die TL im Gewebe des Hippocampus bei den Patienten mit M. Alzheimer signifikant länger war als bei den gesunden Kontrollen, obwohl sowohl die TL in Blutzellen als auch in den Wangenzellen bei den Patienten signifikant kürzer war. Bisher gibt es keine Studie zur TL bei Patienten mit MS, in der die TL nicht in Blut- oder Knochenmarkszellen gemessen wurde. Trotz der möglichen Verwendung der LTL als Richtwert sollten zukünftig Studien durchgeführt werden, in denen die TL in speziellen Geweben und/oder Zellpopulationen gemessen wird. Hierfür wären vor allem Gliazellen oder Neuronen sowie pathologisch auftretende Zellen im Liquor, bspw. B-Zellen, oder in innerhalb den Läsionen befindlichen Immunzellen von großem Interesse. Durch Messungen dieser speziellen Zellgruppen könnten weitere Rückschlüsse auf die Pathomechanismen der MS gezogen und die potenzielle Bedeutung der Telomere in der Entstehung und Progression der MS besser verstanden werden.

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Studie war ein Vergleich der mittleren LTL zwischen Patienten zweier MS-Verlaufsformen (RRMS und PPMS) sowie Kontrollen. Die Methode der Wahl zur Messung der mittleren LTL bei einer größeren Anzahl an Individuen ($n=120$) war der *multiplex* qPCR-Assay nach Cawthon mit leichten Abänderungen (Kap. 1.2.2. und 3.1.5.) [84,131]. Im Gegensatz zum *Southern Blot* kann mit dieser Methode die Messung der mittleren TL bei einer relativ großen Kohorte effizient und kostengünstig realisiert werden. In vergleichbare Studien, die

im Rahmen der systematischen Literaturrecherche identifiziert wurden, kamen sowohl die qPCR-Methode [140,141], als auch der *Southern Blot* [127,128,138,139] zur Messung der TL bei Patienten mit MS zum Einsatz.

Die Länge der Telomere kann mithilfe verschiedener Methoden in Abhängigkeit des Untersuchungsziels (bspw. mittlere TL, Länge der kürzesten Telomere einer Zelle) erfolgen, wobei die unterschiedlichen Methoden je nach Studienplanung geeigneter oder ungeeigneter sein können. Die Bestimmung der TL mittels *Southern Blot* wird als Goldstandard bezeichnet und misst, ähnlich der qPCR, die mittlere TL [94]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Messergebnisse durch die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme variieren können [94]. Weiterhin wird für den *Southern Blot* eine relativ große Menge an DNA benötigt, darüber hinaus ist die Messung zeitaufwändiger als die hier verwendete qPCR-Methode [94,305]. Daher wurden in den letzten Jahren zunehmend die TL-Messungen mithilfe des qPCR-Assays realisiert. Die Bestimmung der TL mithilfe der qPCR wird aufgrund ihrer Vorteile, u. a. wenig benötigte DNA und hoher Durchsatz, häufig in Populationsstudien verwendet [94]. Mit Hilfe der qPCR-Methode kann die mittlere relative TL in Zellen gemessen werden, jedoch stellt das Messergebnis hierbei ein relatives Verhältnis zwischen Telomerprodukt und einem Einzelkopiegen dar (Kap. 1.2.2) und keine absolute TL, wie es bspw. beim *Southern Blot* der Fall wäre. Außerdem muss bei Messverfahren auf Basis der qPCR beachtet werden, dass die Messergebnisse je nach Arbeitsgruppe und Labor, abhängig vom gewählten Einzelkopiegen und verwendetem Enzym-Kit, variieren können [306,307]. Daher ist die Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Labore oder Studien eingeschränkt [305]. Außer in der hier durchgeführten Studie wurde die qPCR-Methode in zwei weiteren Studien anderer Forschungsgruppen zur LTL-Messung bei Patienten mit MS genutzt [140,141]. Auch in einer Vielzahl an Studien zu anderen Erkrankungen, bspw. M. Alzheimer [109] und kardiovaskuläre Erkrankungen [308,309], findet die qPCR-Methode häufig Anwendung bei der Messung der mittleren TL.

Beide Messmethoden, sowohl der qPCR-Assay als auch der *Southern Blot*, ermöglichen eine Analyse der durchschnittlichen TL und sind weder für die Messung der Verteilung der TL noch für Messungen von einzelnen bzw. den kürzesten Telomeren konzipiert. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass besonders kritisch verkürzte Telomere zur Zellseneszenz und -dysfunktion beitragen [69] und damit möglicherweise die Entstehung der MS begünstigen. Mithilfe verschiedener Messmethoden, wie STELA, TeSLA, STAR, Q-FISH, *long-read sequencing* oder *molecular combing* (Kap. 1.2.2.), wäre es denkbar, besonderen Fragestellungen, bspw. ob an bestimmten Chromosomen stark verkürzte Telomere auftreten, nachzugehen. In Untersuchungen der individuellen TL mithilfe des TeSLA-Verfahrens konnten bisher auch Veränderungen der TL von mononukleären Zellen des peripheren Blutes innerhalb eines Jahres, also innerhalb eines relativen kurzen Zeitintervalls, sensitiv erfasst werden [89]. Dies könnte Potenzial für Untersuchungen bei Patienten mit MS bieten, um Veränderungen der TL über relativ kurze Zeiträume sensitiv zu erfassen, bspw. im Rahmen des Therapie-Monitorings. In zukünftigen longitudinalen Studien könnten aufgrund dieser Möglichkeiten verschiedene Aspekte der Assoziation zwischen der TL und der MS untersucht werden, wodurch das Verständnis der molekularen Prozesse, die der Entstehung und Progression der MS zugrunde liegen, verbessert werden könnte.

5.3. Einordnung der TL-Messergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext

Die im ersten Schwerpunkt dieser Arbeit beschriebene Messung der Telomere (Kap. 4.1.) ergab, dass die Patienten mit RRMS der „Rostocker Kohorte“ im Durchschnitt signifikant kürzere LTL (mittlere T/S Ratio: 0,92) im Vergleich zu den Kontrollprobanden (mittlere T/S-Ratio: 1,12; t -Test: $p=4,2 \times 10^{-04}$) und den Patienten mit PPMS (mittlere T/S-Ratio: 1,16; t -Test: $p=0,01$) hatten. Die LTL von Patienten mit PPMS unterschied sich von der der Kontrollen nicht signifikant ($p=0,70$).

Dies deckt sich zum Teil mit Ergebnissen vorangegangener Studien anderer Forschungsgruppen, wie die im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit erläuterte systematische Literaturrecherche ergab. In den Studien von Guan *et al.* [127,128] hatten Patienten mindestens einer MS-Verlaufsform (sofern unterteilt) signifikant kürzere Telomere als die jeweilige gesunde Kontrollgruppe. In einer der beiden Studien konnten kürzere Telomere bei Patienten mit MS generell gefunden werden [128], was den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie entspricht (Kap. 4.1.). Allerdings wurden im Rahmen der anderen Studie der Arbeitsgruppe [127] kürzere Telomere vor allem bei Patienten mit PPMS im Vergleich zu Kontrollen identifiziert, was den in Kap. 4.1. dargestellten Ergebnissen der Studie zur „Rostocker Kohorte“ widerspricht. In der hier durchgeführten Studie zeigten Patienten mit PPMS nicht signifikant kürzere Telomere verglichen mit den Kontrollprobanden. In der Studie von Habib *et al.* [141] zeigten Patienten jeder Verlaufsform (RRMS, SPMS und PPMS) signifikant kürzere Telomere als die Referenzgruppe. Im Gegensatz zu den LTL-Messergebnissen der „Rostocker Kohorte“ konnten bei Patienten mit PPMS einerseits kürzere LTL im Vergleich zu Kontrollen gemessen werden, zudem hatten jene Patienten auch signifikant kürzere LTL als die Patienten mit RRMS [141].

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Messergebnisse zwischen den Arbeitsgruppen könnte primär in den unterschiedlich großen Kohorten und der heterogenen Anzahl der eingeschlossenen Patienten mit verschiedenen Verlaufsformen liegen (Kap. 4.2.1.1, Tab. 3, S. 39). So waren in der Studie von Habib *et al.* [141] nur fünf Patienten mit PPMS, jedoch 102 Patienten mit RRMS eingeschlossen. Dahingegen umfassten sowohl die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie als auch eine Studie von Guan *et al.* [127] jeweils 20 Patienten mit PPMS sowie 40 bzw. 19 Patienten mit RRMS. Weiterhin könnten die Unterschiede im unterschiedlichen mittleren Alter der Kohorten in den Studien begründet liegen. So lag das Durchschnittsalter der Patienten mit MS in der hier durchgeführten Studie rund neun Jahre über dem der Kohorte von Habib *et al.* [141] sowie ca. 15 Jahre über dem der beiden Kohorten von Guan *et al.* [127,128]. Außerdem waren die Kontrollen in der Studie von Habib *et al.* [141] im Mittel etwa fünf Jahre älter als die Patienten, weiterhin waren die Patienten mit PPMS durchschnittlich fast 15 Jahre älter als die Patienten mit RRMS (durchschnittliches Alter: 49 Jahre bzw. 35,2 Jahre). Da die (L)TL mit höherem Lebensalter kürzer wird [69], schränken die Unterschiede hinsichtlich des Alters der Patienten und Kontrollen zwischen den Studien die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ein. Aus diesem Grund müssen die Messergebnisse stets unter Berücksichtigung des Patientenhintergrunds interpretiert werden.

Aufgrund der verwendeten Methoden (qPCR und *Southern Blot*) sind die Ergebnisse der TL-Messungen nicht direkt miteinander vergleichbar. Daher wurde im Rahmen der systematischen Literaturrecherche eine Metaanalyse (Kap. 4.2.1.5.) durchgeführt, in die die Ergebnisse der im

ersten Schwerpunkt dieser Arbeit durchgeführten Studie sowie jene der Studien von Guan *et al.* [127,128] und Habib *et al.* [141] integriert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MS hinsichtlich der TL eine standardisierte Mittelwertdifferenz von $-0,66$ im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p=0,003$) haben. Die aktuelle Studienlage zur (L)TL bei MS ist dennoch heterogen (Kap. 4.2.1.5, Abb. 15, S. 44), weshalb weitere Studien mit größeren Kohorten notwendig sind, um die beschriebenen Ergebnisse weiter zu validieren. Trotz der identifizierten Assoziationen der TL mit der MS ist bisher nicht klar, ob die TL pathophysiologische Einflüsse auf die Erkrankung hat, das Resultat jener ist oder möglicherweise auch beides.

Eine kürzere TL im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Individuen ist zudem kein spezifisches Kennzeichen für Patienten mit MS, sondern tritt auch bei verschiedenen anderen metabolischen, neurologischen und immunvermittelten Erkrankungen auf [95,99,100,109,310-315]. Kota *et al.* [315] konnten in Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit Chorea Huntington, M. Alzheimer oder Ataxia teleangiectatica, welche zu den neurodegenerativen Krankheiten gezählt werden, eine kürzere TL im Vergleich zu Kontrollen identifizieren. Die rheumatoide Arthritis (RA), die ähnlich der MS eine immunmedierte Genese aufweist und sowohl Assoziationen mit genetischen Faktoren als auch mit Umwelt- und Lebensstilfaktoren zeigt, ist ebenfalls in der Literatur mit verkürzten Telomeren assoziiert [310,311]. Zeng *et al.* [310] zeigten in einer Metaanalyse, dass Patienten mit RA signifikant kürzere Telomere haben als vergleichbare Kontrollen. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit RA, ähnlich zu Untersuchungen bei Patienten mit MS, im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Last an oxidativem Stress, objektiviert mit Hilfe von Markern, im Serum identifiziert werden [316]. Außerdem korrelierte die Krankheitsaktivität positiv mit höheren Markern für oxidativen Stress sowie Markern für eine beschleunigte Telomerverkürzung. Vergleichbar hierzu konnte in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie bei Patienten mit RRMS mit relativ kurzen Telomeren ($T/S\text{-Ratio} < 1$) ein erhöhtes Risiko für eine Konversion zu SPMS identifiziert werden (HR: 8,284; $p=0,016$; Kap. 4.1.5.). Ein weiteres Beispiel für eine Erkrankung mit immunologischen Hintergrund ist der systematische Lupus erythematoses. Auch für dieses Krankheitsbild konnte in einer Metaanalyse eine signifikant kürzere TL in Zellen des peripheren Blutes identifiziert werden [312]. Darüberhinaus konnten u. a. sowohl bei Patienten mit DM Typ 1 als auch DM Typ 2 signifikant kürzere Telomere im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden [99,100].

Insgesamt konnten bisher bei zahlreichen Krankheiten, die mit einer verkürzten TL einhergehen, erhöhte Level an oxidativem Stress identifiziert werden. Es wäre denkbar, dass ein erhöhtes Level an oxidativem Stress, das bspw. im Rahmen von Entzündungsreaktionen entsteht, zur konsekutiven Verkürzung der Telomere führt, wodurch wiederum Zellseneszenz und Entzündungsaltern verstärkt werden und somit die Krankheitsprogression beschleunigen. Die Zusammenschau und der Vergleich der Ergebnisse bezüglich der TL bei Patienten mit MS einerseits sowie Patienten anderer Erkrankungen andererseits lässt die Vermutung zu, dass Erkrankungen mit entzündlicher Komponente eine relevante Assoziation mit der TL aufweisen. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle der TL im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, bspw. als diagnostischen oder prognostischen Marker, zu evaluieren.

Die Assoziation verschiedener Erkrankungen neben der MS mit der TL sollte auch bei der Interpretation der Studie von Redondo *et al.* [139] berücksichtigt werden, da die Kontrollgruppe dort aus nicht aus gesunden Kontrollen, sondern aus Patienten mit Arthrose bestand. In einer

Metaanalyse konnten Xie *et al.* [313] zeigen, dass das Vorliegen einer Arthrose bei Patienten ebenfalls mit einer kürzeren LTL im Vergleich zu Gesunden einhergeht, was den nicht signifikanten Unterschied der TL zwischen Patienten mit MS und Kontrollen in der Studie von Redondo *et al.* [139] zumindest im Ansatz erklären könnte. Außerdem verglichen Redondo *et al.* [139] die MSC-TL, also die TL von Zellen im Knochenmark von Patienten mit MS mit derer von Kontrollen. Es wird allerdings vermutet, dass die MS u. a. durch eine periphere Aktivierung von Immunzellen beginnt [21,22], weshalb es denkbar wäre, dass die TL der Immunzellen erst nach der Ausschleusung aus dem KM und der peripheren Aktivierung durch verschiedene Prozesse abnimmt. Dies ist allerdings die einzige Studie, in der die TL von Knochenmarkszellen bei Patienten mit MS bestimmt wurde, weshalb in weiteren Studien mögliche TL-Differenzen zwischen Zellen des Knochenmarks und peripheren Immunzellen untersucht werden sollten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der LTL bei Patienten mit MS und gesunden Kontrollen ergab eine signifikante negative Assoziation zwischen Alter und LTL (Pearson-Korrelationskoeffizient: $r=-0,222$; $p=0,015$; Kap. 4.1.3.). Als Besonderheit der hier durchgeführten Studie ist zu erwähnen, dass eine erneute Messung der LTL bei zehn Patienten mit MS nach über zehn Jahren durchgeführt wurde. Die durchschnittliche jährliche Abnahme der T/S-Ratio lag bei $0,014\pm 0,008$. In fünf weiteren Studien, die im Rahmen der durchgeführten Literaturrecherche identifiziert wurden, konnte ebenfalls eine negative Assoziation zwischen Alter und TL bei Patienten mit MS und Kontrollen nachgewiesen werden [127,138-141] (Kap. 4.2.1.2., Tab. 4, S. 40). Die TL wird als Biomarker des biologischen Alters angesehen, da die Telomere physiologischerweise im Laufe des Lebens kürzer werden und der Großteil der menschlichen Zellen keine Telomerase zur Verlängerung der TL exprimiert (Kap. 1.2.) [71,317]. Die TL ist eine komplexes Charakteristikum kernhaltiger Zellen bzw. der Chromosomen, auf welches in vielfältiger Weise potenziell Einfluss genommen werden kann (Kap. 4.2.2.). Aufgrund dessen sollte in zukünftigen Studien zur TL sowohl bei Patienten mit MS als auch bei anderen Erkrankungen darauf geachtet werden, dass potenzielle Einflussfaktoren des Lebensstils (bspw. Raucherstatus oder sportliche Aktivität) und der Umwelt (u. a. Exposition gegenüber verschmutzter Luft) bzw. genetische Prädispositionen, die bei den Individuen vorliegen, erhoben und in den statistischen Analysen als *Confounder* berücksichtigt oder die untersuchten und verglichenen Gruppen für bestimmte Merkmale *gematcht* werden. So können die größtmögliche Reliabilität und Validität erreicht werden, um die Ergebnisse später im klinischen Alltag anwenden zu können.

Sowohl in der Studie zur „Rostocker Kohorte“ als auch in den durch die systematische Literaturrecherche identifizierten Studien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern bezüglich der TL festgestellt werden (Kap. 4.1.3., 4.2.1.3). Nichtsdestotrotz sind Telomere im Mittel nach aktueller Studienlage bei erwachsenen Frauen länger als bei Männern (Kap. 4.2.2.1.) [153]. In einer Studie von Okuda *et al.* [152] wurde ein geringer, nicht signifikanter Unterschied in der TL zwischen weiblichen und männlichen Neugeborenen festgestellt. Unterschiede der TL im Erwachsenenalter könnten also auf eine unterschiedlich starke Telomerverkürzung mit fortschreitendem Alter hinweisen. Ein möglicher Erklärungsansatz für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der TL ist der durchschnittlich größere Körper bei Männern, für den eine höhere Anzahl an Zellteilungen als für den durchschnittlich kleineren Körper von Frauen notwendig ist [143]. In diesem Zusammenhang konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein höheres Körpergewicht nicht nur mit einer kürzeren TL im Vergleich zu Normalgewichtigen

einhergeht [248] (Kap. 4.2.2.3.), sondern auch mit einer stärkeren Unterdrückung der Telomeraseaktivität [318]. Signifikant längere Telomere konnten außerdem bei Individuen mit afrikanischer Herkunft im Vergleich zu Weißen festgestellt werden (Kap. 4.2.2.1.), wenngleich sich die TL in Blutzellen bei Neugeborenen verschiedener Ethnien in einer anderen Studie nicht signifikant unterschied [152]. Dies lässt auf verschiedene Mechanismen und Einflüsse schließen, die eine potenzielle Auswirkung auf Verkürzungsraten der TL haben und in zukünftigen Untersuchungen identifiziert werden sollten.

Es ist fraglich, inwieweit die TL ein gemeinsamer Faktor hinsichtlich der Pathogenese verschiedener Erkrankungen ist, jedoch könnte die zelluläre Seneszenz ein allgemeiner Wegbereiter pathologischer Zustände sein. Weitere Studien zur TL bei der MS und verschiedenen Krankheitsbildern sind notwendig, um zukünftig die mögliche pathogenetische Rolle der TL für die MS und potenzielle pathophysiologische Überschneidungen mit anderen Erkrankungen besser einzuordnen und Schlüsse für die praktische ambulante und klinische Anwendung ziehen zu können.

5.4. TL als möglicher Prädiktionsmarker des Krankheitsverlaufes

In der hier durchgeführten Studie (Kap. 4.1.) wurde die Assoziation der LTL mit dem klinischen Verlauf der Patienten mit MS über zehn Jahre nach der Blutentnahme geprüft. Die Analyse aller Patienten mit RRMS konnte zwar keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zeit bis zum nächsten Schub oder der jährlichen Anzahl an Schüben zwischen Patienten mit relativ langer LTL (*T/S-Ratio* >1) und Patienten mit relativ kurzer LTL (*T/S-Ratio* <1) nachweisen, allerdings konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit RRMS und einer relativ kurzen LTL ein erhöhtes Risiko für eine Konversion in eine SPMS bestand. Bei den zehn Patienten mit MS, denen jeweils zu Studienbeginn und nach über zehn Jahren eine Blutprobe entnommen wurde, konnten zum zweiten Zeitpunkt signifikant kürzere Telomere festgestellt werden, wobei die jährliche Abnahme des T/S-Verhältnisses um 0,01 mit einem nicht signifikanten Anstieg des EDSS-Scores innerhalb von zehn Jahren um 0,29 einherging (*F-Test: p=0,182*). Aufgrund des limitierten Stichprobenumfangs ist die Aussagekraft dieser Analysen jedoch eingeschränkt.

Auch in zwei weiteren Studien, die durch die systematische Literatursuche identifiziert werden konnten [140,141], wurde die LTL auf Assoziation mit Krankheitsverläufen analysiert. Eine Assoziation zwischen kürzerer LTL und längerer Krankheitsdauer, geringerem Hirnvolumen im MRT, schwererer Behinderung (mithilfe der EDSS beurteilt) und erhöhter Schubrate konnte durch Krysko *et al.* [140] aufgezeigt werden. Eine negative Assoziation zwischen LTL und EDSS-Scores wurde auch von Habib *et al.* [141] beschrieben. Da es bisher nur wenige Studien gibt, die einen Zusammenhang zwischen der TL und dem klinischen Verlauf der MS untersucht haben, ist die Beurteilung des Nutzens einer TL-Bestimmung in Blutzellen als potenzieller Biomarker für die Progression der MS aktuell schwer einzuschätzen. Dennoch scheinen Patienten mit kürzeren Telomeren eher einen ungünstigeren Krankheitsverlauf zu haben. So wäre die Integration der LTL als mutmaßlich prädiktiver Marker für das Konversionsrisiko zur SPMS eine mögliche Erweiterung der paraklinischen Diagnostik. Es sind zunächst weitere Langzeitstudien notwendig, in denen die Assoziation zwischen Krankheitsverlauf und TL untersucht wird, um die potenzielle Rolle der Telomere als Biomarker bei MS zu bestätigen.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es nur die Studie von Krysko *et al.* [140], in der ein Zusammenhang zwischen LTL und MRT-Befunden analysiert wurde. In der Studie zur „Rostocker Kohorte“ (Kap. 4.1.) wurden die MRT-Befunde der Patienten mit MS aufgrund der heterogenen Datenlage (u. a. Nutzung verschiedener MRT-Geräte und uneinheitliche Zeitabstände zwischen den Bildgebungen in Routine-Verlaufskontrollen) nicht in der Analyse berücksichtigt, wodurch keine Korrelation mit der LTL untersucht werden konnte. In einer populationsbasierten Studie von King *et al.* [319] korrelierte die LTL signifikant mit dem durch die MRT bestimmten Gesamthirnvolumen sowie den Volumina einzelner Hirnabschnitte (bspw. Hippocampus und Amygdala). Bisher wurde das Verhältnis der TL in Zellen des peripheren Blutes zu MRT-Befunden auch in anderen neurologischen Erkrankungen nur wenig untersucht. Weitere Studien, in denen die Korrelation zwischen TL und Befunden in der paraklinischen Bildgebung, bspw. die Bestimmung des Hirnvolumens durch die MRT, sowohl bei Patienten mit MS als auch bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen untersucht wird, sind daher wünschenswert. Außerdem sind weitere Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen typischen Befunden bei Patienten mit MS und der TL in verschiedenen Zellpopulationen notwendig. So wurden in bisherigen Studien weder Anzahl und Volumen von ZNS-Läsionen noch Veränderungen der Sehnerven oder häufige MS-typische Symptome im Hinblick auf die TL der Patienten mit MS ausgewertet. Auch die Veränderung dieser Parameter über bestimmte Zeiträume im Vergleich zur Veränderung der TL wurden bisher nicht untersucht. Eine weitere interessante Fragestellung wäre zudem, ob es eine Veränderung der TL während eines Schubereignisses gibt, bzw., ob sich die LTL oder TL in bestimmten Zellen vor und nach einem Schubereignis signifikant unterscheiden. Es sind auch weitere Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen TL und EDSS-Score notwendig, da die bisherigen Ergebnisse zwar vielversprechend, aber nicht ausreichend validiert sind, was u. a. an der Größe der durchgeführten Studien liegt. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Auftreten von OKBs im Liquor der Patienten mit MS mit einer bestimmten kritischen TL peripherer Immunzellen korreliert, um die Funktion der TL als möglichen Marker zur Früherkennung der MS zu evaluieren. Die Assoziation der TL mit verschiedenen Parametern der Krankheitsaktivität sollte in zukünftigen Studien näher untersucht werden, um Erkenntnisse für die Etablierung prognostischer Marker zu gewinnen.

Es gibt derzeit nur wenige Biomarker, die in der Literatur zur Abschätzung der weiteren Prognose bei Patienten mit MS genutzt werden können. Gasperi *et al.* [320] zeigten bspw. in einer Studie, dass eine intrathekale IgG-Synthese bei Patienten mit MS mit einem höheren Risiko für eine Verschlechterung des EDSS-Scores innerhalb von vier Jahren einhergeht. Außerdem trat eine Verschlechterung des EDSS-Scores bei Patienten mit intrathekaler IgG-Synthese früher auf [320]. Des Weiteren assoziieren hohe Level an Neurofilament-Leichtketten im Serum mit einer Entwicklung von T2-Läsionen im ZNS [321]. Dennoch gibt es bisher keine MS-spezifischen Marker. An diese Stelle könnten potenziell Telomere treten, die sich bspw. gegenüber Markern, die im Liquor nachweisbar sind, vor allem durch ihre komplikationsarme Gewinnung sowie preiswerte und schnelle Messung auszeichnen.

Der größte Teil der Patienten mit RRMS (85%) in der in dieser Arbeit durchgeführten Studie erhielt nach der damaligen Standardtherapie ein DMD zur Behandlung der MS, entweder Glatirameracetat (10%) oder ein Interferonpräparat (75%) zum Zeitpunkt der BE. Dahingegen erhielten 12 Patienten mit PPMS und eine Patientin mit RRMS eine gepulste

Kortikosteroidtherapie. Die Untersuchung der Assoziation zwischen Therapie und LTL erreichte keine Signifikanz ($p=0,713$), was sich mit dem Ergebnis einer Analyse von Krysko *et al.* [140] deckt, die ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen Therapie und LTL identifizierten [140]. Aufgrund der heutigen Vielfalt an Therapiemöglichkeiten der MS sind die in diesen Studien untersuchten Kohorten jedoch nicht oder nur bedingt mit der aktuellen Situation vergleichbar. Heute stehen zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS mehr als 15 Medikamente zur Verfügung, die je nach Verlaufsform und weiteren Kriterien angewendet werden können (Tab. 1, S. 14) [58]. Die DMDs haben unterschiedliche Angriffspunkte und Wirkungsweisen und können Auswirkungen auf die Zellzahl und -zusammensetzung im Blut haben, bspw. eliminiert der Wirkstoff Ocrelizumab durch Bindung an das CD20-Antigen auf B-Zellen diese aus dem Körperkreislauf [322]. Durch solche und ähnliche Veränderungen auf zellulärer oder molekularer Ebene ist es denkbar, dass immunmodulierende Therapien u. a. eine Veränderung der (L)TL in peripheren Immunzellen bewirken und somit Messergebnisse vor diesem Hintergrund betrachtet werden sollten. Außerdem würde dies die Möglichkeit erschließen, Telomere als Marker für Therapieerfolge oder aber auch -misserfolge zu verwenden, sofern Änderungen der TL durch Therapien in zukünftigen Studien beobachtet werden. Denkbar wäre auch die Integration der (L)TL als zusätzlicher Marker für die Indikation verschiedener Medikamente, sodass ein Kriterium für den Beginn einer bestimmten bspw. medikamentösen Therapie die Über- oder Unterschreitung einer gewissen TL ist, sofern sich daraus prognostische Unterschiede ergeben.

Die Therapie der MS unterliegt ständigen Veränderungen und besonders in den letzten Jahren kamen neue potente Medikamente und Therapieansätze zur Behandlung der MS hinzu [58,323,324]. Besonders wegen neuer Therapieoptionen sollten in zukünftigen Studien mögliche Beziehungen zwischen unterschiedlichen immunmodulierenden Therapien und der TL näher untersucht werden, um daraus mögliche pathophysiologische Erkenntnisse über den Zusammenhang von MS und Telomeren zu gewinnen. Es wäre außerdem denkbar, dass sich die TL bestimmter Gewebe, bspw. jene peripherer B- oder T-Zellen im Blut, als Biomarker für patientenspezifisches Therapiemonitoring und Marker für den Therapieerfolg oder -misserfolg nutzen lässt und mögliche Nebenwirkungen frühzeitig erkannt werden können [325]. Diese Ansätze erfordern jedoch zukünftig Studien und Forschungen, da es hierzu bisher keine Daten gibt.

5.5. Potenzielle Einflussfaktoren auf MS und TL

Im zweiten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit erfolgte neben einer systematischen Literatursuche eine klassische Literaturrecherche. Im Rahmen dieser sollten gemeinsame potenzielle Einflussfaktoren identifiziert werden, die sowohl mit dem Risiko und/oder der Schwere der MS, aber auch mit der TL assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl genetische Prädispositionen als auch Faktoren des Lebensstils und Umwelteinflüsse zum einen mit einem veränderten Risiko einer MS bzw. der Schwere der Erkrankung, aber zum anderen auch mit der TL korrelieren (Kap. 4.2.2.). Allgemein ist dabei zu erwähnen, dass die Assoziation eines Faktors mit der MS und/oder der TL nicht zwangsläufig einen kausalen Zusammenhang darstellt und weitere Studien notwendig sind, um mögliche Zusammenhänge zu erforschen. Unter anderem sind eine europäische Herkunft sowie bestimmte virale Infektionen, Rauchen, Übergewicht, Luftverschmutzung und eine Vitamin D-Insuffizienz mit einem erhöhten Risiko einer MS sowie kürzeren Telomeren assoziiert (Kap. 4.2.2.). Mit einem geringeren MS-Risiko sowie längeren

Telomeren wurden vor allem sportliche Aktivität und mediterrane Ernährung in Verbindung gebracht.

Die Prävalenz der MS zeigt eine heterogene geographische Verteilung (Kap. 1.1.1.; Abb. 1; S. 7), bspw. ist in Ländern in höheren Breitengraden eine höhere Prävalenz der MS zu verzeichnen [4]. Ein häufig diskutierter Grund hierfür ist ein durch zu wenig Sonnenstrahlung bedingter Vitamin D-Mangel in Bereichen nördlich des 33. Breitengrades [4,326]. Des Weiteren ist die genetische Komposition der jeweiligen Population mitunter ein Grund für die globalen Unterschiede in der Prävalenz [327]. Bei der Geburt unterscheidet sich die TL zwischen Neugeborenen unterschiedlicher Herkunft nicht signifikant [152], jedoch wurde in Studien gezeigt, dass Erwachsene afrikanischer Herkunft längere Telomere haben als Europäer [74,173]. Dies legt nahe, dass es verschiedene potenzielle Einflussfaktoren im Leben der Individuen gibt, die eine mögliche Veränderung der Verkürzungsrate der TL bewirken und die es zukünftig näher zu erforschen gilt. Für die Untersuchung des Zusammenhangs von genetischen, Umwelt- und Lebensstilfaktoren mit der TL wurde in bisherigen Studien vor allem die LTL herangezogen. Zwar korreliert die LTL mit der TL verschiedener Gewebe [74], dennoch wären Analysen der Assoziationen zwischen Faktoren und der TL in anderen Geweben sinnvoll, um mögliche spezifische Zusammenhänge zu identifizieren. Es ist zu beachten, dass in diese Übersichtsarbeit nur Faktoren aufgenommen wurden, bei denen sowohl eine Assoziation mit der MS als auch der TL vorliegt. Es sind weitere Faktoren bekannt, für die jedoch bislang entweder nur ein Zusammenhang mit der MS oder nur mit der TL beschrieben wurde, bspw. korrelierte das Risiko an MS zu erkranken mit der Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln [328].

Ein besonders kritisches Alter für das Risiko einer MS scheint die Adoleszenz zu sein. Vor allem Übergewicht, Schichtarbeit und mangelnde Exposition gegenüber Sonnenlicht in diesem Alter führen zu einem erhöhten Risiko einer späteren Erkrankung an MS [218,245,250]. Auch die Telomere werden in diesem Alter kritisch beeinflusst, da die Verkürzung der LTL im Kindesalter verstärkt auftritt und somit vor dem Erwachsenenalter maßgeblich determiniert wird, ob eher eine relativ lange oder eine relativ kurze LTL vorliegt [187,329]. Besonders der potenzielle Einfluss von Faktoren vor und während der Pubertät auf die MS und die TL muss daher in weiteren, longitudinalen Studien eruiert werden. Folglich könnten Maßnahmen zur Risikominimierung für eine MS, insbesondere bei Verwandten von Patienten mit MS, sowie zum Schutz vor übermäßigem Telomerverlust bei Kindern und Jugendlichen getroffen werden. Es muss beachtet werden, dass bislang die meisten Assoziationen nicht mit der pädiatrischen Form der MS (Erstmanifestation vor dem 18. Lebensjahr), sondern mit der adulten MS beschrieben wurden. Untersuchungen über spezielle Faktoren, die das Risiko einer pädiatrischen MS, wie sie in ca. drei bis fünf Prozent der Fälle vorkommt [8], beeinflussen, sind in der Zukunft notwendig.

Neben dem Zusammenhang mit dem Risiko der Entwicklung einer MS korrelieren einige der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Faktoren auch mit der Schwere bzw. dem Verlauf der MS. Genetische Faktoren, wie bspw. Geschlecht und Produktion der Sexualhormone, sind mit Unterschieden im Krankheitsverlauf assoziiert (Kap. 4.2.2.1.). Diese sind allerdings nicht oder nur begrenzt beeinflussbar, bspw. durch Östrogenpräparate [160]. Faktoren des Lebensstils, die in Zusammenhang mit veränderter Krankheitsschwere stehen, stellen eine Möglichkeit zur nichtmedikamentösen und individualisierten Therapieerweiterung dar. So sollten Patienten u. a.

zum Rauchstopp, mehr körperlicher Aktivität, Gewichtsreduktion im Falle von Übergewicht und mediterraner Ernährung motiviert und dabei unterstützt werden. Damit könnte nicht nur der Verlauf der MS abgemildert, sondern auch das Risiko weiterer Erkrankungen, wie kardiovaskulärer Erkrankungen, gesenkt werden [330]. In einer Studie von Zrzavy *et al.* [331] konnte gezeigt werden, dass Ausdauersport, besonders unter hypoxischen Bedingungen, eine Besserung der Fatigue, der Spastik und der Gehfähigkeit bewirkt. Eine andere Arbeitsgruppe konnte einen positiven Effekt von Training mit hoher Intensität auf das verbale Gedächtnis aufzeigen [332].

Eine relevante Rolle in der MS-Pathogenese könnte auch das Mikrobiom im Verdauungstrakt der Patienten aufgrund der Verbindung zum Immunsystem spielen [333]. Eine „westliche“ Diät (viel Fleisch, gesättigte Fettsäuren und Zucker) kann zu einem Ungleichgewicht der Darmflora führen, wodurch u. a. eine niedriggradige systemische Entzündungsreaktion begünstigt wird, die zur MS-Pathogenese beitragen könnte [334] und die TL potenziell beeinflusst [69]. Bei Patienten mit MS wurde im Vergleich zu Gesunden eine vermehrte intestinale Besiedlung an proinflammatorischen und eine verringerte Besiedlung an anti-inflammatorischen Mikroorganismen festgestellt [335]. Solche Dysregulationen des intestinalen Mikrobioms können Länge und Funktion der Telomere negativ beeinflussen und so zum beschleunigten biologischen Altern beitragen [336]. In zukünftigen Studien sollte die Assoziation der MS und der TL mit weiteren, vor allem den Lebensstil betreffenden Faktoren untersucht werden, um diese im Rahmen von Therapien mit einzubeziehen. So könnten Erkenntnisse um Zusammenhänge zwischen Ernährung und MS den Patienten nichtmedikamentöse Behandlungserweiterungen ermöglichen, bspw. Ernährungspläne mit Lebensmitteln, die anti-inflammatorische physiologische Mikroorganismen im Darm fördern und proinflammatorische hemmen. Außerdem könnte die Erforschung des potenziellen Einflusses des Mikrobioms auf die TL wichtige Erkenntnisse darüber liefern, wie Prozesse des Alterns ablaufen und möglicherweise verlangsamt werden könnten. Neben der pharmakologischen sollte daher auch die nicht-pharmakologische Therapie von Patienten mit MS im Fokus der Behandlung stehen. Mit Trainings- und Ernährungsplänen, die individuell an die Patienten angepasst sind und in das Behandlungskonzept integriert werden können, wäre so eine Therapieoptimierung möglich.

Oxidativer Stress und Entzündungen, wie sie typisch für die MS sind [18,129], führen u. a. zu einer Verkürzung der Telomere [69]. Als Folge kann es zur Zellseneszenz und dem SASP kommen (Kap. 1.2.1., 1.3.) [71,121]. Es wäre denkbar, dass bestimmte Zellen im SASP zur Neuroinflammation bei Patienten mit MS beitragen und möglicherweise die Pathophysiologie der MS entscheidend modulieren. In beiden Studien von Guan *et al.* [127,128], die in die systematische Übersichtsarbeit integriert werden konnten, wurde eine erhöhte Last an oxidativem Stress bei Patienten mit MS festgestellt. Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel sowie Exposition gegenüber verschmutzter Luft sind sowohl mit der MS als auch mit einer verkürzten TL assoziiert (Kap. 4.2.2.) und führen zu vermehrtem oxidativem Stress im Körper sowie teilweise zu Veränderungen des Immunsystems [31,229,337-340]. In zukünftigen Studien, sowohl zur MS als auch zur TL, sind Untersuchungen hinsichtlich oxidativem Stress unabdingbar und könnten das Verständnis der Krankheitsentstehung und -dynamik erweitern und möglicherweise neue Therapieoptionen zur Behandlung von Patienten mit MS eröffnen. In einem bisherigen Versuch einer antioxidativen Vitamin E-Therapie bei Patienten mit MS konnte durch die Einnahme des Vitamin E-Präparats über drei Monate die Last an oxidativem Stress im Vergleich zur Gruppe ohne Einnahme dieses Präparats signifikant verringert werden [128]. Jedoch konnte keine Assoziation

zwischen der Veränderung der Marker für oxidativen Stress und der TL bzw. dem EDSS-Score identifiziert werden, was allerdings laut der Autoren auf das kurze *Follow-up* zurückzuführen sein könnte. Als Folge von oxidativem Stress kann es zur Seneszenz von Zellen kommen (Kap. 1.3.). In Therapieversuchen mit *Senolytics* (Medikamente zur Entfernung seneszenten Zellen) an Mäusen wurde gezeigt, dass das Entfernen seneszenten Zellen, bspw. aus Fettgewebe, Fehlfunktionen des Gewebes verzögern oder sogar verhindern kann [341]. Dies stellt einen neuen, vielversprechenden Therapieansatz für Patienten mit MS dar, bei denen durch gezieltes Entfernen bestimmter Zellen, u. a. Gliazellen Zellen im SASP oder Zellen innerhalb von Läsionen, möglicherweise eine Verbesserung der Langzeitprognose sowie eine Abmilderung der durch die MS verursachten Behinderung bewirkt werden könnte. Daher sollte diesem Therapieansatz in Zukunft viel Aufmerksamkeit zukommen [125].

5.6. Interaktionen zwischen Faktoren mit möglicher Auswirkung auf MS und TL

In den meisten Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einzelner Faktoren und der MS bzw. der TL untersucht. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass vor allem genetische Faktoren und Faktoren des Lebensstils miteinander interagieren und diese Interaktionen die Effekte, bspw. auf das MS-Risiko, verstärken [342]. Beispielsweise haben Raucher, die Träger des HLA-DRB1*15-Allels (Risiko-Allel) sind, nicht jedoch des HLA-A*02-Allels (protektives Allel), ein fast 13-fach erhöhtes Risiko für MS (OR: 12,7) [343]. In einer Übersichtsarbeit von Olsson *et al.* [342] wurden außerdem Interaktionen zwischen HLA-Allelen und Übergewicht, einer EBV-Infektion und passivem Rauchen beschrieben, wodurch sich das Risiko einer MS jeweils stark erhöht (OR: ~15 für Übergewicht und EBV-Infektion; ~6 für passives Rauchen). Außerdem zeigten Hedström *et al.* [338] eine Interaktion zwischen aktivem Rauchen und hohem Anti-EBNA1-IgG-Leveln im Serum auf das Risiko einer MS (OR: 4,4). In einer weiteren Arbeit identifizierten Hedström *et al.* [339] darüber hinaus eine Interaktion zwischen Übergewicht (BMI >25 kg/m²), einer durchgemachten infektiösen Mononukleose (durch EBV verursacht) und Vorliegen des HLA-DRB1*15:01-Allels, die das Risiko einer MS auf das über 20-fache (OR: 22,2) im Vergleich zu Individuen, bei denen diese Risikofaktoren nicht vorlagen, erhöhte. Das Vorliegen hoher Anti-EBNA1-IgG-Spiegel im Serum interagierte in dieser Studie ebenfalls mit Übergewicht und dem HLA-Status und führte bei Trägern dieser Risikofaktoren zu einem erhöhten Risiko für MS (OR: 13,5) im Vergleich zu jenen, die keinen dieser Risikofaktoren aufwiesen. Das gleichzeitige Vorliegen einer starken Antikörperreaktionen gegen HHV-6A und EBV war außerdem mit einem höheren MS-Risiko assoziiert (OR: ~3) [202].

Die TL unterliegt komplexen Regulierungsmechanismen und zeigt Korrelationen mit verschiedenen potenziellen Einflussfaktoren (Kap.1.2., Kap. 4.2.3.). Daher sind Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren naheliegend. In einer Studie wurde gezeigt, dass u. a. die Ethnie und das Geschlecht den Zusammenhang zwischen einem potenziellen Einflussfaktor und der TL beeinflussen können [344]. Beispielsweise war die Assoziation zwischen kürzerer TL und starkem Rauchen sowie täglichem Alkoholkonsum bei schwarzen Frauen am stärksten. Die Assoziation zwischen sportlicher Aktivität und der TL wiederum ging bei der ausschließlichen Betrachtung von *Hispanics* verloren [344]. Außerdem zeigten Dowd *et al.*, dass eine gleichzeitige Infektion mit vier Herpesviren mit einer stärkeren Verkürzung der LTL assoziiert ist als eine Infektion mit nur einem

Virus, und dass eine Koinfektion mit CMV und HHV-6 stärker mit einer Verkürzung der LTL korreliert als die jeweils einzelnen Infektionen [200]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein hoher Konsum von Salz mit der Nahrung bei Übergewichtigen mit einer kürzeren LTL einhergeht, nicht jedoch bei Normalgewichtigen [345]. Diese Daten lassen vermuten, dass bisher unbekannte Faktoren einen möglichen Einfluss auf Assoziationen mit der TL haben, welche in zukünftigen Studien durch gezielte Befragung und Erhebungen der Lebensumstände der Patienten näher evaluiert werden sollten. Auch genetische Untersuchungen, bspw. für Polymorphismen in Genen mit Assoziation zur Regulation der TL, könnten in der Zusammenschau mit weiteren Faktoren Aufschlüsse über Interaktionen und möglicherweise Präventions- oder Therapieansätze ermöglichen.

Es bleibt weitestgehend ungeklärt, auf welche Weise die einzelnen Faktoren die MS und die TL kausal beeinflussen. Ebenfalls ist ungeklärt, weshalb Interaktionen zu einem höheren Risiko als der additive Effekt von zwei Faktoren führen. Bislang gibt es keine ausreichenden Erkenntnisse über Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren. Es ist daher notwendig, das Zusammenspiel von genetischen Faktoren und deren Genprodukten mit weiteren Faktoren, bspw. mit Infektionen oder der Ernährung, sowie die Auswirkung von kritisch kurzen Telomeren auf die Expression von Genen, bspw. durch TPE-OLD, näher zu erforschen.

5.7. Limitierungen und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie unterliegt einigen Limitierungen. Obwohl die „Rostocker Kohorte“ der Größe der Kohorten von vergleichbaren Studien ähnelte und sich die TL von Patienten mit MS und Kontrollen signifikant unterschieden, war die untersuchte Kohorte für die Identifizierung von moderaten Effekten, bspw. der Assoziation zwischen BMI und LTL, die mehrfach in der Literatur beschrieben wurden (Kap. 4.2.2.3., S.52), zu klein. Außerdem wurden in die „Rostocker Kohorte“ keine Patienten mit SPMS aufgenommen, wodurch kein Vergleich der LTL zwischen Patienten mit RRMS oder PPMS oder Kontrollen und Patienten mit SPMS möglich war. Außerdem betrug das Geschlechterverhältnis in der „Rostocker Kohorte“ 1:1 (weiblich : männlich), wohingegen in der Literatur ein Verhältnis von 2-3:1 beschrieben ist, was allerdings aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit zwischen Frauen und Männern gewählt wurde. Darüber hinaus wurden die Patienten zwischen den Jahren 2003 und 2010 im Rahmen einer vorherigen Forschungsarbeit rekrutiert und die Blutproben eingelagert (Kap. 3.1.2. und 3.1.4). In den letzten Jahren konnten verschiedene neue DMDs etabliert werden [58], weshalb die damalige DMT der Patienten möglicherweise nicht mehr der heutigen Empfehlung entspricht. Folglich kann die nicht-signifikante Assoziation zwischen LTL und DMT in der vorliegenden Arbeit nicht unbedingt auf heutige Situationen übertragen werden. Daher sind weitere Studien mit einer repräsentativen Patientenkohorte, die eine aktuelle leitliniengerechte DMT erhält, notwendig, um einen möglichen Einfluss der DMT auf die LTL erneut zu evaluieren. Des Weiteren wurde in der hier durchgeführten Studie ein qPCR-Verfahren [85,132] zur Messung der LTL verwendet. Die Messung der LTL ergibt hierbei relative Werte im Verhältnis zu einem Einzelkopiegen, wodurch eine Vergleichbarkeit der TL mit den Ergebnissen anderer Studie, die bspw. die *Southern Blot*-Methode verwendeten, nicht möglich war. Hinzu kommt, dass durch die mögliche Verwendung unterschiedlicher Einzelkopiegene bei der qPCR-Methode der Vergleich der TL-Messergebnisse zwischen Laboren nur eingeschränkt möglich ist.

Die Bedeutung der Telomere bei Patienten mit MS ist bisher nicht ausreichend erforscht, jedoch zeigen die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit das große Potenzial der Telomerforschung. Es ergeben sich neue Ansätze, mit deren Hilfe in Zukunft weitere Erkenntnisse über Entstehung und Progression der MS gewonnen werden könnten, was u. a. den Weg für neue potenzielle Therapieansätze und -konzepte bereiten könnte. In der Diagnostik, der Prognosestellung und der Therapieüberwachung von Patienten mit MS stellt die Messung der TL einen vielversprechenden Ansatz dar, der möglicherweise auch bei anderen Erkrankungen relevant sein könnte [136]. Das Wissen um Assoziationen verschiedener genetischer, Umwelt- und Lebensstilfaktoren mit der MS und der TL sowie deren Zusammenspiel ermöglicht es potenziell, für gefährdete Menschen Präventionsmaßnahmen, u. a. Änderungen des Lebensstils, zu treffen sowie Maßnahmen zu ergreifen, um die Krankheitsprogression bei Patienten mit MS zu reduzieren und das biologische Altern zu verlangsamen.

Die Rolle der Telomere in der Ätiologie der MS sollte weiterhin im Fokus zukünftiger Forschungen stehen. Gezielte TL-Messungen in bestimmten Zelltypen könnten dazu beitragen, einen potenziellen pathophysiologischen Einfluss spezifischer Zellen zu erkennen und nach Möglichkeit zelltypspezifische Therapien einzuleiten. Beispielsweise könnte in weiteren Studien die TL gezielt in regulatorischen T-Zellen, aber auch in B-Zellen, Mikroglia und Neuronen bestimmt werden, um einen möglichen Einfluss der TL auf die Regulations- und Inflammationsvorgänge zu untersuchen. Daraus könnten sich neue diagnostische und prognostische Möglichkeiten ergeben, aber auch neue Erkenntnisse, bspw. über die nicht ausreichende Remyelinisierung im ZNS von Patienten mit MS, gewonnen werden. Die Aufklärung über Zusammenhänge der TL mit der Krankheitsentstehung und -progression könnte zukünftig dazu beitragen, bereits früh und kausal auf die Entwicklung einer MS Einfluss zu nehmen und Neuerkrankungen zu vermeiden bzw. durch gezielte Therapie die Krankheitsprogression abzumildern.

Die TL gilt als einer der Marker des biologischen Alters von Individuen. Daneben gibt es weitere Methoden, um das biologische Alter von Individuen abzuschätzen und beschleunigtes Altern zu identifizieren [346-350]. Unter anderem wurde von Steve Horvath die epigenetische Uhr (*epigenetic clock*) entwickelt, bei der die Methylierung der DNA an bestimmten Stellen gemessen wird. Infolgedessen kann ein Rückschluss auf das Alter bzw. beschleunigtes Altern in verschiedenen Zellen und Geweben gezogen werden (auch als *intrinsic epigenetic age acceleration* bezeichnet) [346]. Weitere Methoden zur Bestimmung des biologischen Alters sind das sogenannte DNAm PhenoAge [347] sowie die *extrinsic epigenetic age acceleration* [348]. In einer vergleichenden Studie dieser Methoden wurde gezeigt, dass Patienten mit MS ein beschleunigtes Altern im DNAm PhenoAge im Vergleich zu gesunden Kontrollen hatten [349]. Mithilfe des biologischen Alters könnten Ansätze entwickelt werden, um interindividuelle Unterschiede der Krankheitsprogression zwischen chronologisch gleichaltrigen Patienten nachzuvollziehen. Gleichzeitig wird eventuell in Zukunft mithilfe des biologischen Alters durch objektivierbare Parameter wie der TL auch eine klinische Messbarkeit des Ansprechens von Therapien ermöglicht. Eine Messung der Immunprozessaktivität könnte sich bei autoimmun-vermittelten Erkrankungen wie der MS als ein wertvoller Parameter herausstellen, um bspw. noch vor Einsetzen von Schüben (bei RRMS) oder Symptomen (bei SPMS oder PPMS) bei steigender Immunprozessaktivität therapeutische frühzeitig einschreiten zu können und somit die Progression abzumildern. Überdies könnten solche Messungen eine wertvolle Erweiterung für die Erstellung von Prognosen sein. Des

Weiteren wurde festgestellt, dass sich das epigenetische Alter zwischen Immunzelltypen unterscheidet, was weiterhin Bestandteil zukünftiger Forschungen sein könnte, um bspw. schneller alternde Zellen zu identifizieren und zu eliminieren [349]. Die Integration verschiedener Methoden zur Bestimmung des biologischen Alters könnte in Zukunft profunde Einblicke in die Pathophysiologie und vor allem die mögliche Beteiligung bestimmter Zelltypen bei der MS bringen, da die verschiedenen Methoden unterschiedliche pathologische Aspekte der MS erfassen [349]. Das epigenetische Alter ist zudem mit einigen Faktoren korreliert, die auch mit der MS und der TL korrelieren, u. a. sportliche Aktivität, Alkoholkonsum und Rauchen [351]. Es ist denkbar, dass Zusammenhänge zwischen diesen und weiteren assoziierten Faktoren, bspw. oxidativem Stress, und der MS bzw. der TL mithilfe weiterer Untersuchungen des epigenetischen Alters erklärt werden könnten.

Ziel zukünftiger Bemühungen sollte es sein, die Bedeutung der TL als Biomarker sowie die Rolle des biologischen Alterns und zellulärer Seneszenz hinsichtlich der MS weiter zu untersuchen. Vor allem neue Therapieansätze wie *Senolytics* (Kap. 5.5.) könnten in naher Zukunft entscheidende Veränderungen in der Therapie der MS bringen. Die TL könnte hierbei möglicherweise auch als Biomarker des Therapieansprechens genutzt werden, um die Effektivität gegenüber möglicher Nebenwirkungen abzuwägen. Außerdem sollte die TL zukünftig hinsichtlich ihres prognostisches Wertes bezüglich der Krankheitsprogression bei Patienten mit MS näher untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische immunmedierte Erkrankung des ZNS, die durch Demyelinisierung und Untergang von Neuronen gekennzeichnet ist. Weltweit gibt es rund 2,8 Millionen Patienten mit MS, wobei Prävalenz sowie Inzidenz steigen. Frauen sind bis zu drei Mal häufiger von der MS betroffen als Männer. Die MS wird in drei Hauptverlaufsformen eingeteilt: die schubförmig-remittierende MS (RRMS), welche mit ca. 85% der initialen Diagnosen die häufigste Form ist, die sekundär progrediente MS (SPMS) und die primär progrediente MS (PPMS). Die Symptomatik der MS variiert stark und es ist schwierig, den weiteren individuellen Verlauf der Erkrankung zu prognostizieren. Die Ätiologie der MS ist trotz intensiver Forschung nicht vollständig geklärt, jedoch spielen vermutlich altersassoziierte Veränderungen eine entscheidende Rolle. Die Länge der Telomere dient als Biomarker für das biologische Alter und zeigt Assoziationen mit verschiedenen neurologischen und autoimmunen Erkrankungen. Bislang stand die Telomerlänge (TL) bei Patienten mit MS wenig im Fokus der Forschung.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Leukozyten-Telomerlänge (LTL) bei Patienten mit MS in der „Rostocker Kohorte“ zu messen und diese mit der LTL von gesunden Kontrollen zu vergleichen sowie den Zusammenhang der LTL mit klinischen Parametern der Patienten mit MS zu untersuchen. Zur Analyse der TL bei Patienten mit MS in der „Rostocker Kohorte“ wurde die LTL in gelagerten DNA-Proben von 40 Patienten mit RRMS und 20 Patienten mit PPMS aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock sowie von 60 gesunden Kontrollen aus Nordbrandenburg mittels eines qPCR-Verfahrens gemessen und miteinander verglichen. Nach einem *Follow-up* von mehr als zehn Jahren konnte von zehn Patienten mit MS erneut die LTL gemessen werden.

Ein weiteres Ziel war, die bisherigen Ergebnisse aus Studien zur TL bei Patienten mit MS im Rahmen einer systematischen Literaturrecherche zusammenzutragen und zu vergleichen. Die systematische Literaturrecherche wurde mit dem Suchterminus „*multiple sclerosis*“ [AND] *telome**“ in der Literaturdatenbank PubMed sowie in den beiden *PrePrint*-Datenbanken medRxiv und bioRxiv im November 2020 durchgeführt. Anschließend wurden die zuvor festgelegten Kriterien zum Einschluss von Studien in die Übersichtsarbeit auf die Publikationen angewendet und irrelevante Arbeiten ausgeschlossen. Die Ergebnisse der eingeschlossenen Studien wurden ausgewertet, miteinander verglichen und eine Metaanalyse von vier Studien durchgeführt.

Im Rahmen einer klassischen Literaturrecherche wurde außerdem nach mit der MS und der TL assoziierten Faktoren gesucht, mit dem Ziel, gemeinsame Faktoren mit potenziellem Einfluss sowohl auf das MS-Risiko und/oder die Schwere der Erkrankung als auch auf die TL zu identifizieren. Hierzu wurde in PubMed mithilfe verschiedener Suchtermini nach mit der MS und der TL assoziierten Faktoren gesucht, die anschließend in drei Tabellen, sortiert nach genetischen, Umwelt- und Lebensstilfaktoren, erfasst wurden. Darauf folgend wurde der Evidenzgrad der Zusammenhänge u. a. anhand der Anzahl der Publikationen und der Konsistenz der Studienergebnisse semiquantitativ bestimmt.

Im Ergebnis war die LTL der eingeschlossenen Patienten mit RRMS der „Rostocker Kohorte“ signifikant kürzer als die der Patienten mit PPMS bzw. die der Kontrollen. Außerdem war das Alter

in allen drei Gruppen negativ mit der LTL korreliert. Bei den Patienten, von denen nach über zehn Jahren erneut die LTL gemessen werden konnte, verkürzte sich die LTL signifikant. Unterschiede in der LTL in Abhängigkeit des Geschlechts oder der medikamentösen Therapie konnten nicht identifiziert werden. Es zeigte sich jedoch, dass Patienten mit MS mit kürzeren Telomeren einen ungünstigeren Krankheitsverlauf zu haben scheinen. So ergaben die Daten, dass Patienten mit RRMS mit kürzeren Telomere ein signifikant höheres Risiko für eine Konversion zur SPMS haben als jene mit einer längeren LTL.

Das Ergebnis der systematischen Literatursuche stand im Einklang mit dem Ergebnis der hier durchgeführten Untersuchung der LTL von Patienten mit MS. In sechs von sieben Studien, von denen eine die im ersten Schwerpunkt dieser Arbeit beschriebene Studie ist, korrelierten Alter und TL der Studienteilnehmer negativ miteinander. In vier von sechs Studien, in denen die TL von Patienten mit MS mit der von Kontrollen verglichen wurde, konnten signifikant kürzere Telomere bei Patienten mit MS identifiziert werden. Eine Metaanalyse dieser vier Studien ergab eine standardisierte Mittelwertdifferenz von -0,66. Außerdem war in zwei Studien eine kürzere LTL mit einem höheren Behinderungsgrad assoziiert sowie in einer dieser Studien zusätzlich mit einer erhöhten Schubrate, längerer Krankheitsdauer und geringerem Hirnvolumen. Es konnte in keiner der Studien ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der TL zwischen Frauen und Männern identifiziert werden.

Durch die klassische Literatursuche konnte eine Vielzahl genetischer, Umwelt- und Lebensstilfaktoren identifiziert werden, die sowohl mit der MS als auch mit der TL assoziiert sind. Ein Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für MS und kürzerer TL konnte für eine europäische Herkunft, Übergewicht bzw. Fettleibigkeit, Rauchen, Luftverschmutzung, psychologischen Stress und Nacht- bzw. Schichtarbeit identifiziert werden. Für Frauen wurden ein bis zu dreimal höheres Risiko für MS und längere Telomere im Vergleich zu Männern beschrieben. Das Risiko einer MS sowie die TL ist zu einem gewissen Teil vererbbar und wird durch Einzelnukleotidpolymorphismen (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) beeinflusst. Die Konstellation der humanen Leukozytenantigene (HLA) einer Person spielt nachweislich eine große Rolle für das Risiko an MS zu erkranken, jedoch ist der potenzielle Einfluss von HLA-Allelen auf die TL nicht ausreichend belegt. Infektionen sind ebenfalls, abhängig vom Erreger, mit einem veränderten Risiko bzw. der Schwere der MS und der TL korreliert. Vor allem steht eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) in einem starken Zusammenhang mit dem MS-Risiko. Die Einhaltung einer mediterranen Diät, eine ausreichende Versorgung mit Vitaminen, vor allem Vitamin D, Kaffeekonsum und moderate sportliche Aktivität sind mit einem geringeren Risiko einer MS bzw. einer geringeren Schwere der Erkrankung und einer längeren TL assoziiert. Zum potenziellen Einfluss von Alkohol auf die MS liegen kontroverse Daten vor, jedoch war hoher Alkoholkonsum mit einer kürzeren TL assoziiert. Exposition gegenüber Sonnenlicht hängt mit einem geringeren Risiko einer MS und einer geringeren Schwere der Erkrankung zusammen. Die Datenlage zum möglichen Zusammenhang mit der TL ist hingegen Kontext-abhängig, wobei u. a. zwischen lokalen und systemischen Auswirkungen unterschieden werden muss.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass die LTL bei Patienten mit MS signifikant kürzer ist als bei gesunden Kontrollen und mit klinischen Parametern der Patienten mit MS korreliert. Außerdem konnte eine Vielzahl an potenziellen Einflussfaktoren aus den Bereichen Genetik, Umwelt und

Lebensstil identifiziert werden, die sowohl mit der MS als auch der TL assoziiert sind. Die Aufklärung der diesen Zusammenhängen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und die Suche nach weiteren möglichen Einflussfaktoren und deren Interaktionen sollte in den nächsten Jahren eines der zentralen Themen der MS- und Telomer-Forschung sein, um eine personalisierte Medizin zu ermöglichen, in der Diagnostik, Therapie und Prognoseeinschätzung individuell auf den Patienten abgestimmt sind. Der Fokus zukünftiger Forschungen sollte zudem auf die mögliche Funktion der Telomere in der Pathogenese der MS bzw. die potenzielle Rolle der Telomere als Biomarker in der Diagnostik, Verlaufs- und Therapieüberwachung und Prognostik der MS gerichtet werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43.
- [2] Flachenecker P, Zettl UK. Epidemiologie. In: Schmidt RM, Hoffmann F, Faiss JH, Köhler W, Zettl UK (Hrsg.). Multiple Sklerose. 8. Auflage. München: Elsevier - Urban & Fischer. 2022;9-16.
- [3] Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020;26(14):1816-1821.
- [4] Simpson S Jr, Wang W, Otahal P, Blizzard L, van der Mei IAF, Taylor BV. Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(11):1193-1200.
- [5] Bhigjee AI, Moodley K, Ramkissoon K. Multiple sclerosis in KwaZulu Natal, South Africa: an epidemiological and clinical study. *Mult Scler*. 2007;13(9):1095-1099.
- [6] Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J*. 1971;3(5777):725-729.
- [7] Munk Nielsen N, Corn G, Frisch M, Stenager E, Koch-Henriksen N, Wohlfahrt J, Magyari M, Melbye M. Multiple sclerosis among first- and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study. *Brain*. 2019;142(6):1587-1597.
- [8] Broła W, Steinborn B. Pediatric multiple sclerosis - current status of epidemiology, diagnosis and treatment. *Neurol Neurochir Pol*. 2020;54(6):508-517.
- [9] Lotti CBC, Oliveira ASB, Bichuetti DB, Castro I, Oliveira EML. Late onset multiple sclerosis: concerns in aging patients. *Arq Neuropsiquiatr*. 2017;75(7):451-456.
- [10] Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*. 2013;13:128.
- [11] Golden LC, Voskuhl R. The importance of studying sex differences in disease: The example of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 2017;95(1-2):633-643.
- [12] Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA, Attfield KE, Baranzini SE, Barrett J, Binder TMC, Booth D, Buck D, Celius EG, Cotsapas C, D'Alfonso S, Dendrou CA, Donnelly P, Dubois B, Fontaine B, Fugger L, Goris A, Gourraud PA, Graetz C, Hemmer B, Hillert J; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Kockum I, Leslie S, Lill CM, Martinelli-Boneschi F, Oksenberg JR, Olsson T, Oturai A, Saarela J, Søndergaard HB, Spurkland A, Taylor B, Winkelmann J, Zipp F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Spencer CCA, Stewart G, Hafler DA, Ivinson AJ, Harbo HF, Hauser SL, De Jager PL, Compston A, McCauley JL, Sawcer S, McVean G. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2015;47(10):1107-1113.
- [13] Ghareghani M, Reiter RJ, Zibara K, Farhadi N. Latitude, Vitamin D, Melatonin, and Gut Microbiota Act in Concert to Initiate Multiple Sclerosis: A New Mechanistic Pathway. *Front Immunol*. 2018;9:2484.
- [14] Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015;14(3):263-273.
- [15] Degelman ML, Herman KM. Smoking and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis using the Bradford Hill criteria for causation. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;17:207-216.
- [16] Krumbholz M, Meinl E. Immunpathogenese. In: Schmidt RM, Hoffmann F, Faiss JH, Köhler W, Zettl UK (Hrsg.). Multiple Sklerose. 8. Auflage. München: Elsevier - Urban & Fischer.

- 2022;43-53.
- [17] Stadelmann-Nessler C, van der Meer F, Brück W. Pathologie und Pathophysiologie. In: Schmidt RM, Hoffmann F, Faiss JH, Köhler W, Zettl UK (Hrsg.). Multiple Sklerose. 8. Auflage. München: Elsevier - Urban & Fischer. 2022;36-42.
- [18] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-558.
- [19] Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a028936.
- [20] Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009;66(6):739-753.
- [21] Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(4):a029025.
- [22] Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2018;19(7):696-707.
- [23] Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, Hernández-Navarro VE, Sánchez-López AL, Alatorre-Jiménez MA. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res*. 2014;45(8):687-697.
- [24] Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol*. 2006;59(6):880-892.
- [25] Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-487.
- [26] Rommer PS, Eichstädt K, Ellenberger D, Flachenecker P, Friede T, Haas J, Kleinschnitz C, Pöhlau D, Rienhoff O, Stahmann A, Zettl UK. Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry. *Mult Scler*. 2019;25(12):1641-1652.
- [27] Rommer PS, Eichstädt K, Ellenberger D, Flachenecker P, Friede T, Haas J, Kleinschnitz C, Pöhlau D, Rienhoff O, Stahmann A, Zettl UK. Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry. *Mult Scler*. 2019;25(12):1641-1652.
- [28] Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-286.
- [29] Marcus JF, Waubant EL. Updates on clinically isolated syndrome and diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurohospitalist*. 2013;3(2):65-80.
- [30] Blaschke SJ, Ellenberger D, Flachenecker P, Hellwig K, Paul F, Pöhlau D, Kleinschnitz C, Rommer PS, Rueger MA, Zettl UK, Stahmann A, Warnke C. Time to diagnosis in multiple sclerosis: Epidemiological data from the German Multiple Sclerosis Registry. *Mult Scler*. 2022;28(6):865-871.
- [31] Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. *Handb Clin Neurol*. 2016;138:173-206.
- [32] Hemmer B, et al. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2021. Online: https://dgn.org/wp-content/uploads/2021/04/030050_LL-

- Report_Multiple_Sklerose_2021.pdf (abgerufen am 01.04.2022)
- [33] Guthrie TC, Nelson DA. Influence of temperature changes on multiple sclerosis: critical review of mechanisms and research potential. *J Neurol Sci.* 1995;129(1):1-8.
- [34] Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173.
- [35] Confavreux C, Vukusic S. The clinical course of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:343-369.
- [36] Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, Muraro PA, Ebers GC. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014;85(1):67-75.
- [37] Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 1983;13(3):227-231.
- [38] McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-127.
- [39] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005;58(6):840-846.
- [40] Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69(2):292-302.
- [41] Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:726.
- [42] Solomon AJ, Naismith RT, Cross AH. Misdiagnosis of multiple sclerosis: Impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology.* 2019;92(1):26-33.
- [43] Solomon AJ. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneap Minn).* 2019;25(3):611-635.
- [44] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33(11):1444-1452.
- [45] van Munster CE, Uitdehaag BM. Outcome Measures in Clinical Trials for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs.* 2017;31(3):217-236.
- [46] Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J, Syndulko K, Weinshenker BG, Antel JP, Confavreux C, Ellison GW, Lublin F, Miller AE, Rao SM, Reingold S, Thompson A, Willoughby E. Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain.* 1999;122(Pt 5):871-882.
- [47] Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. *Mult Scler.* 1999;5(4):244-250.
- [48] Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, le Page E, Edan G, McDonnell GV, Hawkins S, Trojano M, Liguori M, Cocco E, Marrosu MG, Tesser F, Leone MA, Weber A, Zipp F, Mitterski B, Epplen JT, Oturai A, Sørensen PS, Celius EG, Lara NT, Montalban X, Villoslada P, Silva

- AM, Marta M, Leite I, Dubois B, Rubio J, Butzkueven H, Kilpatrick T, Mycko MP, Selmaj KW, Rio ME, Sá M, Salemi G, Savettieri G, Hillert J, Compston DA. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144-1151.
- [49] Manouchehrinia A, Westerlind H, Kingwell E, Zhu F, Carruthers R, Ramanujam R, Ban M, Glaser A, Sawcer S, Tremlett H, Hillert J. Age Related Multiple Sclerosis Severity Score: Disability ranked by age. *Mult Scler*. 2017;23(14):1938-1946.
- [50] Langer-Gould A, Popat RA, Huang SM, Cobb K, Fontoura P, Gould MK, Nelson LM. Clinical and demographic predictors of long-term disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol*. 2006;63(12):1686-1691.
- [51] Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*. 2003;126(Pt 4):770-782.
- [52] Vukusic S, Confavreux C. Prognostic factors for progression of disability in the secondary progressive phase of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2003;206(2):135-137.
- [53] Rommer PS, Ellenberger D, Hellwig K, Haas J, Pöhlau D, Stahmann A, Zettl UK; Scientific Advisory Group of the German MS-Register by the German MS Society. Relapsing and progressive MS: the sex-specific perspective. *Ther Adv Neurol Disord*. 2020;13:1756286420956495.
- [54] Lunde HMB, Assmus J, Myhr KM, Bø L, Grytten N. Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(8):621-625.
- [55] Wattjes MP, Rovira À, Miller D, Yousry TA, Sormani MP, de Stefano MP, Tintoré M, Auger C, Tur C, Filippi M, Rocca MA, Fazekas F, Kappos L, Polman C, Barkhof F, Montalban X; MAGNIMS study group. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis--establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(10):597-606.
- [56] Fitzner B, Hecker M, Zettl UK. Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmun Rev*. 2015;14(10):903-913.
- [57] Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(3):a029058.
- [58] Wiendl H, Gold R, Berger T, Derfuss T, Linker R, Mäurer M, Stangel M, Aktas O, Baum K, Berghoff M, Bittner S, Chan A, Czaplinski A, Deisenhammer F, Di Pauli F, Du Pasquier R, Enzinger C, Fertl E, Gass A, Gehring K, Gobbi C, Goebels N, Guger M, Haghikia A, Hartung HP, Heidenreich F, Hoffmann O, Hunter ZR, Kallmann B, Kleinschnitz C, Klotz L, Leussink V, Leutmezer F, Limmroth V, Lünemann JD, Lutterotti A, Meuth SG, Meyding-Lamadé U, Platten M, Rieckmann P, Schmidt S, Tumani H, Weber MS, Weber F, Zettl UK, Ziemssen T, Zipp F; die Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG). Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG): Positionspapier zur verlaufsmodifizierenden Therapie der Multiplen Sklerose 2021 (White Paper). *Nervenarzt*. 2021;92(8):773-801.
- [59] Rommer PS, Eichstädt K, Ellenberger D, Flachenecker P, Friede T, Haas J, Kleinschnitz C, Pöhlau D, Rienhoff O, Stahmann A, Zettl UK. Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry. *Mult Scler*. 2019;25(12):1641-1652.
- [60] Rommer PS, Sühnel A, König N, Zettl UK. Coping with multiple sclerosis-the role of social support. *Acta Neurol Scand*. 2017;136(1):11-16.
- [61] Momsen AH, Ørtenblad L, Maribo T. Effective rehabilitation interventions and participation among people with multiple sclerosis: An overview of reviews. *Ann Phys Rehabil Med*. 2022;65(1):101529.
- [62] Blechinger S, Ehler J, Bsteh G, Winkelmann A, Leutmezer F, Meister S, Santer A, Hecker M, Berger T, Rommer P, Zettl UK. Therapeutic plasma exchange in steroid-refractory multiple sclerosis relapses. A retrospective two-center study. *Ther Adv Neurol Disord*. 2021;14:1756286420975642.

- [63] Muiola L, Rommer PS, Zettl UK. Prevention and management of adverse effects of disease modifying treatments in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2020;33(3):286-294.
- [64] Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med*. 2020;133(12):1380-1390.e2.
- [65] Zrzavy T, Daniels E, Stuka N, Weber D, Winkelmann A, Rauschka H, Hecker M, Aboulenein-Djamshidian F, Meister S, Leutmezer F, Berger T, Bsteh G, Zettl UK, Rommer P. Rituximab *versus* mitoxantrone: comparing effectiveness and safety in advanced relapsing multiple sclerosis.
- [66] Ellenberger D, Eichstädt K, Flachenecker P, Friede T, Haas J, Kleinschnitz C, Pöhlau D, Rienhoff O, Stahmann A, Zettl UK, Rommer PS. Decreasing longitudinal use of glucocorticosteroids in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;25:173-174.
- [67] Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*. 1978;120(1):33-53.
- [68] Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6622-6626.
- [69] Saretzki G. Telomeres, Telomerase and Ageing. *Subcell Biochem*. 2018;90:221-308.
- [70] de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-2110.
- [71] von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(7):339-344.
- [72] Müezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):509-519.
- [73] Marioni RE, Harris SE, Shah S, McRae AF, von Zglinicki T, Martin-Ruiz C, Wray NR, Visscher PM, Deary IJ. The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *Int J Epidemiol*. 2018;45(2):424-432.
- [74] Demanelis K, Jasmine F, Chen LS, Chernoff M, Tong L, Delgado D, Zhang C, Shinkle J, Sabarinathan M, Lin H, Ramirez E, Oliva M, Kim-Hellmuth S, Stranger BE, Lai TP, Aviv A, Ardlie KG, Aguet F, Ahsan H; GTEx Consortium, Doherty JA, Kibriya MG, Pierce BL. Determinants of telomere length across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):eaaz6876.
- [75] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
- [76] Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*. 2019;8(1):73.
- [77] Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173-179.
- [78] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- [79] Nittis T, Guittat L, Stewart SA. Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection? *Biochimie*. 2008;90(1):5-12.
- [80] Zhang JM, Zou L. Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell Biosci*. 2020;10:30.
- [81] Gaspar TB, Sá A, Lopes JM, Sobrinho-Simões M, Soares P, Vinagre J. Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes (Basel)*. 2018;9(5):241.
- [82] Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999;97(4):503-514.
- [83] Kimura M, Stone RC, Hunt SC, Skurnick J, Lu X, Cao X, Harley CB, Aviv A. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths.

- Nat Protoc.* 2010;5(9):1596-1607.
- [84] Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
- [85] Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.
- [86] Slijepcevic P. Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods Cell Sci.* 2001;23(1-3):17-22.
- [87] Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet.* 2003;33(2):203-207.
- [88] Bendix L, Horn PB, Jensen UB, Rubelj I, Kolvraa S. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell.* 2010;9(3):383-397.
- [89] Lai TP, Zhang N, Noh J, Mender I, Tedone E, Huang E, Wright WE, Danuser G, Shay JW. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues. *Nat Commun.* 2017;8(1):1356.
- [90] Luo Y, Viswanathan R, Hande MP, Loh AHP, Cheow LF. Massively parallel single-molecule telomere length measurement with digital real-time PCR. *Sci Adv.* 2020;6(34):eabb7944.
- [91] Miga KH, Koren S, Rhie A, Vollger MR, Gershman A, Bzikadze A, Brooks S, Howe E, Porubsky D, Logsdon GA, Schneider VA, Potapova T, Wood J, Chow W, Armstrong J, Fredrickson J, Pak E, Tigyi K, Kremitzki M, Markovic C, Maduro V, Dutra A, Bouffard GG, Chang AM, Hansen NF, Wilfert AB, Thibaud-Nissen F, Schmitt AD, Belton JM, Selvaraj S, Dennis MY, Soto DC, Sahasrabudhe R, Kaya G, Quick J, Loman NJ, Holmes N, Loose M, Surti U, Risques RA, Graves Lindsay TA, Fulton R, Hall I, Paten B, Howe K, Timp W, Young A, Mullikin JC, Pevzner PA, Gerton JL, Sullivan BA, Eichler EE, Phillippy AM. Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature.* 2020;585(7823):79-84.
- [92] Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020;21(10):597-614.
- [93] Kahl VFS, Allen JAM, Nelson CB, Sobinoff AP, Lee M, Kilo T, Vasireddy RS, Pickett HA. Telomere Length Measurement by Molecular Combing. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:493.
- [94] Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1741):20160451.
- [95] Anitha A, Thanseem I, Vasu MM, Viswambharan V, Poovathinal SA. Telomeres in neurological disorders. *Adv Clin Chem.* 2019;90:81-132.
- [96] Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine.* 2017;21:29-36.
- [97] Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb).* 2019;29(3):030501.
- [98] Hamczyk MR, Nevado RM, Baretino A, Fuster V, Andrés V. Biological Versus Chronological Aging: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(8):919-930.
- [99] Opstad TB, Berg TJ, Holte KB, Arnesen H, Solheim S, Seljeflot I. Reduced leukocyte telomere lengths and sirtuin 1 gene expression in long-term survivors of type 1 diabetes: A Dialong substudy. *J Diabetes Investig.* 2021;12(7):1183-1192.
- [100] Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, Dozio N, Hughes DA. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29(2):283-289.
- [101] Tesovnik T, Kovac J, Hovnik T, Dovc K, Bratina N, Battelino T, Trebušak Podkrajšek K. Association of Glycemic Control and Cell Stress With Telomere Attrition in Type 1 Diabetes. *JAMA Pediatr.* 2018;172(9):879-881.
- [102] Gebreab SY, Manna ZG, Khan RJ, Riestra P, Xu R, Davis SK. Less Than Ideal Cardiovascular Health Is Associated With Shorter Leukocyte Telomere Length: The

- National Health and Nutrition Examination Surveys, 1999-2002. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(2):e004105.
- [103] Kark JD, Nassar H, Shaham D, Sinnreich R, Goldberger N, Aboudi V, Bogot NR, Kimura M, Aviv A. Leukocyte telomere length and coronary artery calcification in Palestinians. *Atherosclerosis.* 2013;229(2):363-368.
- [104] Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ; West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet.* 2007;369(9556):107-114.
- [105] Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol.* 2007;165(1):14-21.
- [106] Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, Akdemir KC, Seth S, Song X, Wang Q, Lichtenberg T, Hu J, Zhang J, Zheng S, Verhaak RG. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet.* 2017;49(3):349-357.
- [107] Hou L, Zhang X, Gawron AJ, Liu J. Surrogate tissue telomere length and cancer risk: shorter or longer? *Cancer Lett.* 2012;319(2):130-135.
- [108] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-2015.
- [109] Thanseem I, Viswambharan V, Poovathinal SA, Anitha A. Is telomere length a biomarker of neurological disorders? *Biomark Med.* 2017;11(9):799-810.
- [110] Polho GB, De-Paula VJ, Cardillo G, dos Santos B, Kerr DS. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophr Res.* 2015;165(2-3):195-200.
- [111] Li Z, Tang J, Li H, Chen S, He Y, Liao Y, Wei Z, Wan G, Xiang X, Xia K, Chen X. Shorter telomere length in peripheral blood leukocytes is associated with childhood autism. *Sci Rep.* 2014;4:7073.
- [112] Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, Lindqvist D, Penninx BW, Delucchi KL, Wolkowitz OM, Mathews CA. The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom Med.* 2016;78(7):776-787.
- [113] Schutte NS, Malouff JM. The association between depression and leukocyte telomere length: a meta-analysis. *Depress Anxiety.* 2015;32(4):229-238.
- [114] Ridout KK, Ridout SJ, Price LH, Sen S, Tyrka AR. Depression and telomere length: A meta-analysis. *J Affect Disord.* 2016;191:237-247.
- [115] Verhoeven JE, van Oppen P, Révész D, Wolkowitz OM, Penninx BW. Depressive and Anxiety Disorders Showing Robust, but Non-Dynamic, 6-Year Longitudinal Association With Short Leukocyte Telomere Length. *Am J Psychiatry.* 2016;173(6):617-624.
- [116] Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17312-17315.
- [117] Armando RG, Mengual Gomez DL, Maggio J, Sanmartin MC, Gomez DE. Telomeropathies: Etiology, diagnosis, treatment and follow-up. Ethical and legal considerations. *Clin Genet.* 2019;96(1):3-16.
- [118] AISabbagh MM. Dyskeratosis congenita: a literature review. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2020;18(9):943-967.
- [119] Bhala S, Best AF, Giri N, Alter BP, Pao M, Gropman A, Baker EH, Savage SA. CNS manifestations in patients with telomere biology disorders. *Neurol Genet.* 2019;5(6):370.
- [120] Kim W, Shay JW. Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD). *Differentiation.* 2018;99:1-9.

- [121] Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015;21(12):1424-1435.
- [122] Xu Z, Duc KD, Holcman D, Teixeira MT. The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence. *Genetics*. 2013;194(4):847-857.
- [123] Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, Witkowski JM, Franceschi C. Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol*. 2018;8:1960.
- [124] Müller L, Di Benedetto S, Pawelec G. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. *Subcell Biochem*. 2019;91:21-43.
- [125] Oost W, Talma N, Meilof JF, Laman JD. Targeting senescence to delay progression of multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2018;96(11):1153-1166.
- [126] Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*. 2015;96(Pt A):29-41.
- [127] Guan JZ, Guan WP, Maeda T, Guoqing X, GuangZhi W, Makino N. Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening. *Mol Cell Biochem*. 2015;400(1-2):183-187.
- [128] Guan JZ, Guan WP, Maeda T. Vitamin E administration erases an enhanced oxidation in multiple sclerosis. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(11):1181-1183.
- [129] Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, Gascón F, Túnez I. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem*. 2012;45(6):440-444.
- [130] Blaschke P. Bestimmung von Suszeptilitätsgenen der Multiplen Sklerose – Charakterisierung prädisponierender genetischer Faktoren einer autoimmunologischen Erkrankung des Zentralnervensystems (Dissertation, Humanmedizin). Rostock: 2016.
- [131] Blaschke J. Genotypisierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen bei Multipler Sklerose: Eine regionale Fall-Kontroll-Studie (Dissertation, Humanmedizin). Rostock: 2017.
- [132] Neuner B, Lenfers A, Kelsch R, Jäger K, Brüggmann N, van der Harst P, Walter M. Telomere Length Is Not Related to Established Cardiovascular Risk Factors but Does Correlate with Red and White Blood Cell Counts in a German Blood Donor Population. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139308.
- [133] Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000100.
- [134] Hecker M, Fitzner B, Jäger K, Bühring J, Schwartz M, Hartmann A, Walter M, Zettl UK. Leukocyte Telomere Length in Patients with Multiple Sclerosis and Its Association with Clinical Phenotypes. *Mol Neurobiol*. 2021;58(6):2886-2896.
- [135] Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-911.
- [136] Bühring J, Hecker M, Fitzner B, Zettl UK. Systematic Review of Studies on Telomere Length in Patients with Multiple Sclerosis. *Aging Dis*. 2021;12(5):1272-1286.
- [137] Hecker M, Bühring J, Fitzner B, Rommer PS, Zettl UK. Genetic, Environmental and Lifestyle Determinants of Accelerated Telomere Attrition as Contributors to Risk and Severity of Multiple Sclerosis. *Biomolecules*. 2021;11(10):1510.
- [138] Hug A, Korporal M, Schröder I, Haas J, Glatz K, Storch-Hagenlocher B, Wildemann B. Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Immunol*. 2003;171(1):432-437.
- [139] Redondo J, Sarkar P, Kemp K, Virgo PF, Pawade J, Norton A, Emery DC, Guttridge MG, Marks DI, Wilkins A, Scolding NJ, Rice CM. Reduced cellularity of bone marrow in multiple

- sclerosis with decreased MSC expansion potential and premature ageing in vitro. *Mult Scler.* 2018;24(7):919-931.
- [140] Krysko KM, Henry RG, Cree BAC, Lin J; University of California, San Francisco MS-EPIC Team, Caillier S, Santaniello A, Zhao C, Gomez R, Bevan C, Smith DL, Stern W, Kirkish G, Hauser SL, Oksenberg JR, Graves JS. Telomere Length Is Associated with Disability Progression in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2019;86(5):671-682.
- [141] Habib R, Ocklenburg S, Hoffjan S, Haghikia A, Epplen JT, Arning L. Association between shorter leukocyte telomeres and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020;341:577187.
- [142] Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012;11(6-7):A377-A385.
- [143] Barrett EL, Richardson DS. Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell.* 2011;10(6):913-921.
- [144] Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010;9(5):520-532.
- [145] Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology.* 2008;71(2):129-135.
- [146] Bove R, Chitnis T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol.* 2013;149(2):201-210.
- [147] Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, Lechner-Scott J, Trojano M, Izquierdo G, Lugaesi A, Grand'maison F, Hupperts R, Oreja-Guevara C, Bergamaschi R, Iuliano G, Alroughani R, Van Pesch V, Amato MP, Slee M, Verheul F, Fernandez-Bolanos R, Fiol M, Spitaleri DL, Cristiano E, Gray O, Cabrera-Gomez JA, Shaygannejad V, Herbert J, Vucic S, Needham M, Petkovska-Boskova T, Sirbu CA, Duquette P, Girard M, Grammond P, Boz C, Giuliani G, Rio ME, Barnett M, Flechter S, Moore F, Singhal B, Bacile EA, Saladino ML, Shaw C, Skromne E, Poehlau D, Vella N, Spelman T, Liew D, Kilpatrick TJ, Butzkueven H; MSBase Study Group. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain.* 2013;136(Pt 12):3609-3617.
- [148] Ribbons KA, McElduff P, Boz C, Trojano M, Izquierdo G, Duquette P, Girard M, Grand'Maison F, Hupperts R, Grammond P, Oreja-Guevara C, Petersen T, Bergamaschi R, Giuliani G, Barnett M, van Pesch V, Amato MP, Iuliano G, Fiol M, Slee M, Verheul F, Cristiano E, Fernandez-Bolanos R, Saladino ML, Rio ME, Cabrera-Gomez J, Butzkueven H, van Munster E, Den Braber-Moerland L, La Spitaleri D, Lugaesi A, Shaygannejad V, Gray O, Deri N, Alroughani R, Lechner-Scott J. Male Sex Is Independently Associated with Faster Disability Accumulation in Relapse-Onset MS but Not in Primary Progressive MS. *PLoS One.* 2015;10(6):e0122686.
- [149] Voskuhl RR, Patel K, Paul F, Gold SM, Scheel M, Kuchling J, Cooper G, Asseyer S, Chien C, Brandt AU, Meyer CE, MacKenzie-Graham A. Sex differences in brain atrophy in multiple sclerosis. *Biol Sex Differ.* 2020;11(1):49.
- [150] Ysraaelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology.* 2019;156(1):9-22.
- [151] Ebers GC. Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2004;10 Suppl 1:S8-S15.
- [152] Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, Skurnick J, Awad G, Aviv A. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res.* 2002;52(3):377-381.
- [153] Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol.* 2014;51:15-27.

- [154] Stindl R. Tying it all together: telomeres, sexual size dimorphism and the gender gap in life expectancy. *Med Hypotheses*. 2004;62(1):151-154.
- [155] Voskuhl R, Momtazee C. Pregnancy: Effect on Multiple Sclerosis, Treatment Considerations, and Breastfeeding. *Neurotherapeutics*. 2017;14(4):974-984.
- [156] Chitnis T. Role of puberty in multiple sclerosis risk and course. *Clin Immunol*. 2013;149(2):192-200.
- [157] Jiang X, Olsson T, Alfredsson L. Age at Menarche and Risk of Multiple Sclerosis: Current Progress From Epidemiological Investigations. *Front Immunol*. 2018;9:2600.
- [158] Azimi A, Hanaei S, Sahraian MA, Mohammadifar M, Ramagopalan SV, Ghajarzadeh M. Age at menarche and risk of multiple sclerosis (MS): a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*. 2019;19(1):286.
- [159] Varytė G, Zakarevičienė J, Ramašauskaitė D, Laužikienė D, Arlauskienė A. Pregnancy and Multiple Sclerosis: An Update on the Disease Modifying Treatment Strategy and a Review of Pregnancy's Impact on Disease Activity. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(2):49.
- [160] Voskuhl RR, Wang H, Wu TC, Sicotte NL, Nakamura K, Kurth F, Itoh N, Bardens J, Bernard JT, Corboy JR, Cross AH, Dhib-Jalbut S, Ford CC, Frohman EM, Giesser B, Jacobs D, Kasper LH, Lynch S, Parry G, Racke MK, Reder AT, Rose J, Wingerchuk DM, MacKenzie-Graham AJ, Arnold DL, Tseng CH, Elashoff R. Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(1):35-46.
- [161] Sicotte NL, Liva SM, Klutch R, Pfeiffer P, Bouvier S, Odesa S, Wu TC, Voskuhl RR. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol*. 2002;52(4):421-428.
- [162] Lin J, Kroenke CH, Epel E, Kenna HA, Wolkowitz OM, Blackburn E, Rasgon NL. Greater endogenous estrogen exposure is associated with longer telomeres in postmenopausal women at risk for cognitive decline. *Brain Res*. 2011;1379:224-231.
- [163] Bayne S, Li H, Jones ME, Pinto AR, van Sinderen M, Drummond A, Simpson ER, Liu JP. Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. *Protein Cell*. 2011;2(4):333-346.
- [164] Yeap BB, Knuijan MW, Divitini ML, Hui J, Arscott GM, Handelsman DJ, McLennan SV, Twigg SM, McQuillan B, Hung J, Beilby JP. Epidemiological and Mendelian Randomization Studies of Dihydrotestosterone and Estradiol and Leukocyte Telomere Length in Men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):1299-1306.
- [165] Pakpoor J, Goldacre R, Schmierer K, Giovannoni G, Goldacre MJ. Testicular hypofunction and multiple sclerosis risk: a record-linkage study. *Ann Neurol*. 2014;76(4):625-628.
- [166] Bove R, Musallam A, Healy BC, Raghavan K, Glanz BI, Bakshi R, Weiner H, De Jager PL, Miller KK, Chitnis T. Low testosterone is associated with disability in men with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(12):1584-1592.
- [167] Albor C, du Sautoy T, Kali Vanan N, Turner BP, Boomla K, Schmierer K. Ethnicity and prevalence of multiple sclerosis in east London. *Mult Scler*. 2017;23(1):36-42.
- [168] Smestad C, Sandvik L, Holmoy T, Harbo HF, Celius EG. Marked differences in prevalence of multiple sclerosis between ethnic groups in Oslo, Norway. *J Neurol*. 2008;255(1):49-55.
- [169] Kister I, Chamot E, Bacon JH, Niewczyk PM, De Guzman RA, Apatoff B, Coyle P, Goodman AD, Gottesman M, Granger C, Jubelt B, Krupp L, Lenihan M, Lublin F, Mihai C, Miller A, Munschauer FE 3rd, Perel AB, Teter BE, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Herbert J. Rapid disease course in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;75(3):217-223.
- [170] Marrie RA, Cutter G, Tyry T, Vollmer T, Campagnolo D. Does multiple sclerosis-associated disability differ between races? *Neurology*. 2006;66(8):1235-1240.
- [171] Ly K, Walker C, Berry S, Snell R, Marks E, Thayer Z, Atatoa-Carr P, Morton S. Telomere length in early childhood is associated with sex and ethnicity. *Sci Rep*. 2019;9(1):10359.

- [172] Selvaraju V, Phillips M, Fouty A, Babu JR, Geetha T. Telomere Length as a Biomarker for Race-Related Health Disparities. *Genes (Basel)*. 2021;12(1):78.
- [173] Benetos A, Aviv A. Ancestry, Telomere Length, and Atherosclerosis Risk. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10(3):e001718.
- [174] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019;365(6460):eaav7188.
- [175] Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;20:43-47.
- [176] O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*. 2013;40(1):1-12.
- [177] Hensiek AE, Seaman SR, Barcellos LF, Oturai A, Eraksoi M, Cocco E, Vecsei L, Stewart G, Dubois B, Bellman-Strobl J, Leone M, Andersen O, Bencsik K, Booth D, Celius EG, Harbo HF, Hauser SL, Heard R, Hillert J, Myhr KM, Marrosu MG, Oksenberg JR, Rajda C, Sawcer SJ, Sørensen PS, Zipp F, Compston DA. Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;68(5):376-383.
- [178] De Silvestri A, Capittini C, Mallucci G, Bergamaschi R, Rebuffi C, Pasi A, Martinetti M, Tinelli C. The Involvement of HLA Class II Alleles in Multiple Sclerosis: A Systematic Review with Meta-analysis. *Dis Markers*. 2019;2019:1409069.
- [179] Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;64:13-25.
- [180] Yates RL, Esiri MM, Palace J, Mittal A, DeLuca GC. The influence of HLA-DRB1*15 on motor cortical pathology in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015;41(3):371-384.
- [181] Pan G, Simpson S Jr, van der Mei I, Charlesworth JC, Lucas R, Ponsonby AL, Zhou Y, Wu F, Taylor BV. Role of genetic susceptibility variants in predicting clinical course in multiple sclerosis: a cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(11):1204-1211.
- [182] Zhang YJ, Zhang L, Chen SY, Yang GJ, Huang XL, Duan Y, Yang LJ, Ye DQ, Wang J. Association between VDR polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Neurol Sci*. 2018;39(2):225-234.
- [183] Mamutse G, Woolmore J, Pye E, Partridge J, Boggild M, Young C, Fryer A, Hoban PR, Rukin N, Alldersea J, Strange RC, Hawkins CP. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with reduced disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14(9):1280-1283.
- [184] Delgado DA, Zhang C, Gleason K, Demanelis K, Chen LS, Gao J, Roy S, Shinkle J, Sabarinathan M, Argos M, Tong L, Ahmed A, Islam T, Rakibuz-Zaman M, Sarwar G, Shahriar H, Rahman M, Yunus M, Doherty JA, Jasmine F, Kibriya MG, Ahsan H, Pierce BL. The contribution of parent-to-offspring transmission of telomeres to the heritability of telomere length in humans. *Hum Genet*. 2019;138(1):49-60.
- [185] Nordfjäll K, Larefalk A, Lindgren P, Holmberg D, Roos G. Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16374-16378.
- [186] Prescott J, Du M, Wong JY, Han J, De Vivo I. Paternal age at birth is associated with offspring leukocyte telomere length in the nurses' health study. *Hum Reprod*. 2012;27(12):3622-3631.
- [187] Hjelmborg JB, Dalgård C, Möller S, Steenstrup T, Kimura M, Christensen K, Kyvik KO, Aviv A. The heritability of leucocyte telomere length dynamics. *J Med Genet*. 2015;52(5):297-302.
- [188] Faul JD, Mitchell CM, Smith JA, Zhao W. Estimating Telomere Length Heritability in an Unrelated Sample of Adults: Is Heritability of Telomere Length Modified by Life Course Socioeconomic Status? *Biodemography Soc Biol*. 2016;62(1):73-86.
- [189] Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fischer K, Esko T, Surakka I, Broer L, Nyholt DR, Mateo Leach I, Salo P, Hägg S, Matthews MK,

- Palmen J, Norata GD, O'Reilly PF, Saleheen D, Amin N, Balmforth AJ, Beekman M, de Boer RA, Böhringer S, Braund PS, Burton PR, de Craen AJ, Denniff M, Dong Y, Douroudis K, Dubinina E, Eriksson JG, Garlaschelli K, Guo D, Hartikainen AL, Henders AK, Houwing-Duistermaat JJ, Kananen L, Karssen LC, Kettunen J, Klopp N, Lagou V, van Leeuwen EM, Madden PA, Mägi R, Magnusson PK, Männistö S, McCarthy MI, Medland SE, Mihailov E, Montgomery GW, Oostra BA, Palotie A, Peters A, Pollard H, Pouta A, Prokopenko I, Ripatti S, Salomaa V, Suchiman HE, Valdes AM, Verweij N, Viñuela A, Wang X, Wichmann HE, Widen E, Willemsen G, Wright MJ, Xia K, Xiao X, van Veldhuisen DJ, Catapano AL, Tobin MD, Hall AS, Blakemore AI, van Gilst WH, Zhu H; CARDIoGRAM consortium, Erdmann J, Reilly MP, Kathiresan S, Schunkert H, Talmud PJ, Pedersen NL, Perola M, Ouwehand W, Kaprio J, Martin NG, van Duijn CM, Hovatta I, Gieger C, Metspalu A, Boomsma DI, Jarvelin MR, Slagboom PE, Thompson JR, Spector TD, van der Harst P, Samani NJ. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.* 2013;45(4):422-427.
- [190] Schönland SO, Lopez C, Widmann T, Zimmer J, Bryl E, Goronzy JJ, Weyand CM. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13471-13476.
- [191] Codd V, Wang Q, Allara E, Musicha C, Kaptoge S, Stoma S, Jiang T, Hamby SE, Braund PS, Bountziouka V, Budgeon CA, Denniff M, Swinfield C, Papakonstantinou M, Sheth S, Nanus DE, Warner SC, Wang M, Khera AV, Eales J, Ouwehand WH, Thompson JR, Di Angelantonio E, Wood AM, Butterworth AS, Danesh JN, Nelson CP, Samani NJ. Polygenic basis and biomedical consequences of telomere length variation. *Nat Genet.* 2021;53(10):1425-1433.
- [192] Jacobs BM, Giovannoni G, Cuzick J, Dobson R. Systematic review and meta-analysis of the association between Epstein-Barr virus, multiple sclerosis and other risk factors. *Mult Scler.* 2020;26(11):1281-1297.
- [193] Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;67(6):824-830.
- [194] Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi MM, Aly L, Luessi F, Groppa S, Klotz L, Meuth SG, Schroeder C, Grüter T, Tackenberg B, Paul F, Then-Bergh F, Kümpfel T, Weber F, Stangel M, Bayas A, Wildemann B, Heesen C, Zettl U, Warnke C, Antony G, Hessler N, Wiendl H, Bittner S, Hemmer B, Gold R, Salmen A, Ruprecht K; German Competence Network Multiple Sclerosis (KKNMS); Other members of the KKNMS that acted as collaborators in this study. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;91(7):681-686.
- [195] Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296-301.
- [196] Farrell RA, Antony D, Wall GR, Clark DA, Fisniku L, Swanton J, Khaleeli Z, Schmierer K, Miller DH, Giovannoni G. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology.* 2009;73(1):32-38.
- [197] Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, Caballero E, Münz C, Montalban X, Comabella M. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;67(2):159-169.
- [198] Dolcetti R, Giunco S, Dal Col J, Celegghin A, Mastorci K, De Rossi A. Epstein-Barr virus and telomerase: from cell immortalization to therapy. *Infect Agent Cancer.* 2014;9(1):8.
- [199] Kamranvar SA, Masucci MG. Regulation of Telomere Homeostasis during Epstein-Barr virus Infection and Immortalization. *Viruses.* 2017;9(8):217.
- [200] Dowd JB, Bosch JA, Steptoe A, Jayabalasingham B, Lin J, Yolken R, Aiello AE. Persistent Herpesvirus Infections and Telomere Attrition Over 3 Years in the Whitehall II Cohort. *J Infect Dis.* 2017;216(5):565-572.
- [201] Keyvani H, Zahednasab H, Aljanabi HAA, Asadi M, Mirzaei R, Esghaei M, Karampoor S. The role of human herpesvirus-6 and inflammatory markers in the pathogenesis of multiple

- sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2020;346:577313.
- [202] Engdahl E, Gustafsson R, Huang J, Biström M, Lima Bomfim I, Stridh P, Khademi M, Brenner N, Butt J, Michel A, Jons D, Hortlund M, Alonso-Magdalena L, Hedström AK, Flamand L, Ihira M, Yoshikawa T, Andersen O, Hillert J, Alfredsson L, Waterboer T, Sundström P, Olsson T, Kockum I, Fogdell-Hahn A. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:2715.
- [203] Simpson S Jr, Taylor B, Dwyer DE, Taylor J, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Dwyer T, van der Mei I. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012;18(6):799-806.
- [204] Kaufer BB, Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Curr Opin Virol.* 2014;9:111-118.
- [205] Grut V, Biström M, Salzer J, Stridh P, Jons D, Gustafsson R, Fogdell-Hahn A, Huang J, Brenner N, Butt J, Bender N, Lindam A, Alonso-Magdalena L, Gunnarsson M, Vrethem M, Bergström T, Andersen O, Kockum I, Waterboer T, Olsson T, Sundström P. Cytomegalovirus seropositivity is associated with reduced risk of multiple sclerosis-a presymptomatic case-control study. *Eur J Neurol.* 2021;28(9):3072-3079.
- [206] Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Ness J, Chabas D, Strober J, McDonald J, Belman A, Milazzo M, Gorman M, Weinstock-Guttman B, Rodriguez M, Oksenberg JR, James JA; US Pediatric MS Network. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology.* 2011;76(23):1989-1995.
- [207] Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafin M, Bratina A, Ukmar M, Pirko I, Johnson AJ, Furlan C, Pozzi-Mucelli RS, Monti-Bragadin L, Grop A, Zambon M, Antonello RM, Cazzato G, Zorzon M. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol Res.* 2006;28(3):262-269.
- [208] Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Tyblova M, Bergsland N, Hussein S, Willis L, Krasensky J, Vaneckova M, Seidl Z, Lelkova P, Dwyer MG, Zhang M, Yu H, Duan X, Kalincik T, Ramanathan M. Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center SET study. *PLoS One.* 2013;8(1):e53996.
- [209] Yao G, Wang P, Luo XD, Yu TM, Harris RA, Zhang XM. Meta-analysis of association between *Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2016;620:1-7.
- [210] Jaruvongvanich V, Sanguankeo A, Jaruvongvanich S, Upala S. Association between *Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2016;7:92-97.
- [211] Kountouras J, Papaefthymiou A, Gavalas E, Polyzos SA, Boziki M, Kyriakou P, Katsinelos P, Zavos C, Liatsos C, Tzivras D, Tziritidou-Chatzopoulou M, Dardiotis E, Deretzi G, Vardaka E, Doulberis M. *Helicobacter pylori* infection as a potential risk factor for multiple sclerosis. *Med Hypotheses.* 2020;143:110135.
- [212] Cook KW, Crooks J, Hussain K, O'Brien K, Braitch M, Kareem H, Constantinescu CS, Robinson K, Gran B. *Helicobacter pylori* infection reduces disease severity in an experimental model of multiple sclerosis. *Front Microbiol.* 2015;6:52.
- [213] Huang JW, Xie C, Niu Z, He LJ, Li JJ. The relation between *Helicobacter pylori* immunoglobulin G seropositivity and leukocyte telomere length in US adults from NHANES 1999-2000. *Helicobacter.* 2020;25(6):e12760.
- [214] Kazemi Moghadam V, Dickerson AS, Shahedi F, Bazrafshan E, Seyedhasani SN, Sarmadi M. Association of the global distribution of multiple sclerosis with ultraviolet radiation and air pollution: an ecological study based on GBD data. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28(14):17802-17811.
- [215] Hedström AK, Olsson T, Kockum I, Hillert J, Alfredsson L. Low sun exposure increases multiple sclerosis risk both directly and indirectly. *J Neurol.* 2020;267(4):1045-1052.
- [216] Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan S. The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*

- 2013;84(4):427-432.
- [217] Grytten N, Torkildsen Ø, Aarseth JH, Benjaminsen E, Celius EG, Dahl OP, Holmøy T, Løken-Amsrud K, Midgard R, Myhr KM, Risberg G, Vatne A, Kampman MT. Month of birth as a latitude-dependent risk factor for multiple sclerosis in Norway. *Mult Scler*. 2013;19(8):1028-1034.
- [218] Magalhaes S, Pugliatti M, Riise T, Myhr KM, Ciampi A, Bjornevik K, Wolfson C. Shedding light on the link between early life sun exposure and risk of multiple sclerosis: results from the EnvIMS Study. *Int J Epidemiol*. 2019;48(4):1073-1082.
- [219] D'hooghe MB, Haentjens P, Nagels G, Garmyn M, De Keyser J. Sunlight exposure and sun sensitivity associated with disability progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(4):451-459.
- [220] Ostkamp P, Salmen A, Pignolet B, Görlich D, Andlauer TFM, Schulte-Mecklenbeck A, Gonzalez-Escamilla G, Bucciarelli F, Gennero I, Breuer J, Antony G, Schneider-Hohendorf T, Mykicki N, Bayas A, Then Bergh F, Bittner S, Hartung HP, Friese MA, Linker RA, Luessi F, Lehmann-Horn K, Mühlau M, Paul F, Stangel M, Tackenberg B, Tumani H, Warnke C, Weber F, Wildemann B, Zettl UK, Ziemann U, Müller-Myhsok B, Kumpfel T, Klotz L, Meuth SG, Zipp F, Hemmer B, Hohlfeld R, Brassat D, Gold R, Gross CC, Lukas C, Groppa S, Loser K, Wiendl H, Schwab N; German Competence Network Multiple Sclerosis (KKNMS) and the BIONAT Network. Sunlight exposure exerts immunomodulatory effects to reduce multiple sclerosis severity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(1):e2018457118.
- [221] Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol*. 2015;91(1):140-155.
- [222] Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019:278-284.
- [223] Yin B, Jiang X. Telomere shortening in cultured human dermal fibroblasts is associated with acute photodamage induced by UVA irradiation. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013;30(1):13-18.
- [224] Ikeda H, Aida J, Hatamochi A, Hamasaki Y, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Kuroiwa M, Matsuura M, Sanada Y, Kawano Y, Arai T, Takubo K. Quantitative fluorescence in situ hybridization measurement of telomere length in skin with/without sun exposure or actinic keratosis. *Hum Pathol*. 2014;45(3):473-480.
- [225] Lotfi F, Mansourian M, Mirmoayyeb O, Najdaghi S, Shaygannejad V, Esmaeil N. Association of Exposure to Particulate Matters and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroimmunomodulation*. 2022;29(1):21-27.
- [226] Noorimotlagh Z, Azizi M, Pan HF, Mami S, Mirzaee SA. Association between air pollution and Multiple Sclerosis: A systematic review. *Environ Res*. 2021;196:110386.
- [227] Oikonen M, Laaksonen M, Laippala P, Oksaranta O, Lilius EM, Lindgren S, Rantio-Lehtimäki A, Anttinen A, Koski K, Erälinna JP. Ambient air quality and occurrence of multiple sclerosis relapse. *Neuroepidemiology*. 2003;22(1):95-99.
- [228] Angelici L, Piola M, Cavalleri T, Randi G, Cortini F, Bergamaschi R, Baccarelli AA, Bertazzi PA, Pesatori AC, Bollati V. Effects of particulate matter exposure on multiple sclerosis hospital admission in Lombardy region, Italy. *Environ Res*. 2016;145:68-73.
- [229] Li Z, Liu Q, Xu Z, Guo X, Wu S. Association between short-term exposure to ambient particulate air pollution and biomarkers of oxidative stress: A meta-analysis. *Environ Res*. 2020;191:110105.
- [230] Miri M, Nazarzadeh M, Alahabadi A, Ehrampoush MH, Rad A, Lotfi MH, Sheikhha MH, Sakhvidi MJZ, Nawrot TS, Davvand P. Air pollution and telomere length in adults: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Environ Pollut*. 2019;244:636-647.
- [231] Zhao B, Vo HQ, Johnston FH, Negishi K. Air pollution and telomere length: a systematic review of 12,058 subjects. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2018;8(4):480-492.

- [232] Martens DS, Cox B, Janssen BG, Clemente DBP, Gasparrini A, Vanpoucke C, Lefebvre W, Roels HA, Plusquin M, Nawrot TS. Prenatal Air Pollution and Newborns' Predisposition to Accelerated Biological Aging. *JAMA Pediatr.* 2017;171(12):1160-1167.
- [233] Moslem A, Rad A, de Prado Bert P, Alahabadi A, Ebrahimi Aval H, Miri M, Gholizadeh A, Ehrampoush MH, Sunyer J, Nawrot TS, Miri M, Dadvand P. Association of exposure to air pollution and telomere length in preschool children. *Sci Total Environ.* 2020;722:137933.
- [234] Poorolajal J, Bahrami M, Karami M, Hooshmand E. Effect of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Public Health (Oxf).* 2017;39(2):312-320.
- [235] Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2011;17(7):788-793.
- [236] Heydarpour P, Manouchehrinia A, Beiki O, Mousavi SE, Abdolalizadeh A, Moradi-Lakeh M, Sahraian MA. Smoking and worsening disability in multiple sclerosis: A meta-analysis. *Acta Neurol Scand.* 2018;138(1):62-69.
- [237] van der Vuurst de Vries RM, Mescheriakova JY, Runia TF, Siepman TAM, Wokke BHA, Samijn JPA, Hintzen RQ. Smoking at time of CIS increases the risk of clinically definite multiple sclerosis. *J Neurol.* 2018;265(5):1010-1015.
- [238] Ramanujam R, Hedström AK, Manouchehrinia A, Alfredsson L, Olsson T, Bottai M, Hillert J. Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. *JAMA Neurol.* 2015;72(10):1117-1123.
- [239] Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Hashmi K, Abdelrahman N, Stosic M, Dwyer M, Hussein S, Durfee J, Ramanathan M. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73(7):504-510.
- [240] Babizhayev MA, Savel'yeva EL, Moskvina SN, Yegorov YE. Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior. *Am J Ther.* 2011;18(6):e209-e226.
- [241] Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W; PILAR Research Network. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res.* 2017;158:480-489.
- [242] Ip P, Chung BH, Ho FK, Chan GC, Deng W, Wong WH, Lee SL, Chan PY, Ying D, Wong WL, Tung KT, Lau YL. Prenatal Tobacco Exposure Shortens Telomere Length in Children. *Nicotine Tob Res.* 2017;19(1):111-118.
- [243] Xu Y, Hiyoshi A, Brand JS, Smith KA, Bahmanyar S, Alfredsson L, Olsson T, Montgomery S. Higher body mass index at ages 16 to 20 years is associated with increased risk of a multiple sclerosis diagnosis in subsequent adulthood among men. *Mult Scler.* 2021;27(1):147-150.
- [244] Marrodan M, Farez MF, Balbuena Aguirre ME, Correale J. Obesity and the risk of Multiple Sclerosis. The role of Leptin. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021;8(2):406-424.
- [245] Harroud A, Mitchell RE, Richardson TG, Morris JA, Forgetta V, Davey Smith G, Baranzini SE, Richards JB. Childhood obesity and multiple sclerosis: A Mendelian randomization study. *Mult Scler.* 2021;27(14):2150-2158.
- [246] Fitzgerald KC, Salter A, Tyry T, Fox RJ, Cutter G, Marrie RA. Measures of general and abdominal obesity and disability severity in a large population of people with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2020;26(8):976-986.
- [247] Bove R, Musallam A, Xia Z, Baruch N, Messina S, Healy BC, Chitnis T. Longitudinal BMI trajectories in multiple sclerosis: Sex differences in association with disease severity. *Mult Scler Relat Disord.* 2016;8:136-140.
- [248] Gielen M, Hageman GJ, Antoniou EE, Nordfjäll K, Mangino M, Balasubramanyam M, de Meyer T, Hendricks AE, Giltay EJ, Hunt SC, Nettleton JA, Salpea KD, Diaz VA, Farzaneh-Far R, Atzmon G, Harris SE, Hou L, Gilley D, Hovatta I, Kark JD, Nassar H, Kurz DJ, Mather KA, Willeit P, Zheng YL, Pavanello S, Demerath EW, Rode L, Bunout D, Steptoe A,

- Boardman L, Marti A, Needham B, Zheng W, Ramsey-Goldman R, Pellatt AJ, Kaprio J, Hofmann JN, Gieger C, Paolisso G, Hjelmborg JBH, Mirabello L, Seeman T, Wong J, van der Harst P, Broer L, Kronenberg F, Kollerits B, Strandberg T, Eisenberg DTA, Duggan C, Verhoeven JE, Schaakxs R, Zannolli R, Dos Reis RMR, Charchar FJ, Tomaszewski M, Mons U, Demuth I, Iglesias Molli AE, Cheng G, Krasnienkov D, D'Antono B, Kasielski M, McDonnell BJ, Ebstein RP, Sundquist K, Pare G, Chong M, Zeegers MP; TELOMAAS group. Body mass index is negatively associated with telomere length: a collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2018;108(3):453-475.
- [249] Azcona-Sanjulian MC. Telomere Length and Pediatric Obesity: A Review. *Genes (Basel)*. 2021;12(6):946.
- [250] Hedström AK, Åkerstedt T, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011;70(5):733-741.
- [251] Hedström AK, Åkerstedt T, Olsson T, Alfredsson L. Shift work influences multiple sclerosis risk. *Mult Scler*. 2015;21(9):1195-1199.
- [252] Gustavsen S, Søndergaard HB, Oturai DB, Laursen B, Laursen JH, Magyari M, Ullum H, Larsen MH, Sellebjerg F, Oturai AB. Shift work at young age is associated with increased risk of multiple sclerosis in a Danish population. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;9:104-109.
- [253] Ledda C, Loreto C, Rapisarda V. Telomere Length as a Biomarker of Biological Aging in Shift Workers. *Applied Sciences*. 2020;10(8):2764.
- [254] Jiang X, Olsson T, Hillert J, Kockum I, Alfredsson L. Stressful life events are associated with the risk of multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2020;27(12):2539-2548.
- [255] Abdollahpour I, Nedjat S, Mansournia MA, Eckert S, Weinstock-Guttman B. Stress-full life events and multiple sclerosis: A population-based incident case-control study. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;26:168-172.
- [256] Li J, Johansen C, Brønnum-Hansen H, Stenager E, Koch-Henriksen N, Olsen J. The risk of multiple sclerosis in bereaved parents: A nationwide cohort study in Denmark. *Neurology*. 2004;62(5):726-729.
- [257] Buljevac D, Hop WC, Reedeker W, Janssens AC, van der Meché FG, van Doorn PA, Hintzen RQ. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis: prospective study. *BMJ*. 2003;327(7416):646.
- [258] Spitzer C, Bouchain M, Winkler LY, Wingenfeld K, Gold SM, Grabe HJ, Barnow S, Otte C, Heesen C. Childhood trauma in multiple sclerosis: a case-control study. *Psychosom Med*. 2012;74(3):312-318.
- [259] Schutte NS, Malouff JM. The Relationship Between Perceived Stress and Telomere Length: A Meta-analysis. *Stress Health*. 2016;32(4):313-319.
- [260] de la Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol*. 2014;127(1):71-90.
- [261] Pakpoor J, Goldacre R, Disanto G, Giovannoni G, Goldacre MJ. Alcohol misuse disorders and multiple sclerosis risk. *JAMA Neurol*. 2014;71(9):1188-1189.
- [262] Andersen C, Søndergaard HB, Bang Oturai D, Laursen JH, Gustavsen S, Larsen NK, Magyari M, Just-Østergaard E, Thørner LW, Sellebjerg F, Ullum H, Oturai AB. Alcohol consumption in adolescence is associated with a lower risk of multiple sclerosis in a Danish cohort. *Mult Scler*. 2019;25(12):1572-1579.
- [263] Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Factors affecting the risk of relapsing-onset and progressive-onset multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021;92(10):1096-1102.
- [264] Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. The increased risk of multiple sclerosis associated with HLA-DRB1*15:01 and smoking is modified by alcohol consumption. *Sci Rep*. 2021;11(1):21237.
- [265] D'hooghe MB, Haentjens P, Nagels G, De Keyser J. Alcohol, coffee, fish, smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2012;19(4):616-624.

- [266] Diaz-Cruz C, Chua AS, Malik MT, Kaplan T, Glanz BI, Egorova S, Guttmann CRG, Bakshi R, Weiner HL, Healy BC, Chitnis T. The effect of alcohol and red wine consumption on clinical and MRI outcomes in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;17:47-53.
- [267] Navarro-Mateu F, Husky M, Cayuela-Fuentes P, Álvarez FJ, Roca-Vega A, Rubio-Aparicio M, Chirlaque MD, Cayuela ML, Martínez S, Sánchez-Meca J. The association of telomere length with substance use disorders: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Addiction*. 2021;116(8):1954-1972.
- [268] Maugeri A, Barchitta M, Magnano San Lio R, La Rosa MC, La Mastra C, Favara G, Ferlito M, Giunta G, Panella M, Cianci A, Agodi A. The Effect of Alcohol on Telomere Length: A Systematic Review of Epidemiological Evidence and a Pilot Study during Pregnancy. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(9):5038.
- [269] Hedström AK, Mowry EM, Gianfrancesco MA, Shao X, Schaefer CA, Shen L, Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. High consumption of coffee is associated with decreased multiple sclerosis risk; results from two independent studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(5):454-460.
- [270] Liu JJ, Crous-Bou M, Giovannucci E, De Vivo I. Coffee Consumption Is Positively Associated with Longer Leukocyte Telomere Length in the Nurses' Health Study. *J Nutr*. 2016;146(7):1373-1378.
- [271] Dorans KS, Massa J, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. Physical activity and the incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2016;87(17):1770-1776.
- [272] Wesnes K, Myhr KM, Riise T, Cortese M, Pugliatti M, Boström I, Landtblom AM, Wolfson C, Bjørnevik K. Physical activity is associated with a decreased multiple sclerosis risk: The EnvIMS study. *Mult Scler*. 2018;24(2):150-157.
- [273] Langeskov-Christensen M, Grøndahl Hvid L, Nygaard MKE, Ringgaard S, Jensen HB, Nielsen HH, Petersen T, Stenager E, Eskildsen SF, Dalgas U. Efficacy of High-Intensity Aerobic Exercise on Brain MRI Measures in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2021;96(2):e203-e213.
- [274] Grover SA, Aubert-Broche B, Fetco D, Collins DL, Arnold DL, Finlayson M, Banwell BL, Motl RW, Yeh EA. Lower physical activity is associated with higher disease burden in pediatric multiple sclerosis. *Neurology*. 2015;85(19):1663-1669.
- [275] Marck CH, Hadgkiss EJ, Weiland TJ, van der Meer DM, Pereira NG, Jelinek GA. Physical activity and associated levels of disability and quality of life in people with multiple sclerosis: a large international survey. *BMC Neurol*. 2014;14:143.
- [276] Negareh R, Gharakhanlou R, Sahraian MA, Abolhasani M, Motl RW, Zimmer P. Physical activity may contribute to brain health in multiple sclerosis: An MR volumetric and spectroscopy study. *J Neuroimaging*. 2021;31(4):714-723.
- [277] Arsenis NC, You T, Ogawa EF, Tinsley GM, Zuo L. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. *Oncotarget*. 2017;8(27):45008-45019.
- [278] Borghini A, Giardini G, Tonacci A, Mastorci F, Mercuri A, Mrakic-Spota S, Moretti S, Andreassi MG, Pratali L. Chronic and acute effects of endurance training on telomere length. *Mutagenesis*. 2015;30(5):711-716.
- [279] Hernando B, Gil-Barrachina M, Tomás-Bort E, Martínez-Navarro I, Collado-Boira E, Hernando C. The effect of long-term ultra-endurance exercise and SOD2 genotype on telomere shortening with age. *J Appl Physiol (1985)*. 2020;129(4):873-879.
- [280] Bjørnevik K, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. Polyunsaturated fatty acids and the risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(14):1830-1838.
- [281] Sedaghat F, Jessri M, Behrooz M, Mirghotbi M, Rashidkhani B. Mediterranean diet adherence and risk of multiple sclerosis: a case-control study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25(2):377-384.
- [282] Black LJ, Hetherington S, Forkan M, Gonzales EG, Smith JB, Daly A, Lucas RM, Langer-Gould A. An exploratory study of diet in childhood and young adulthood and adult-onset multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2021;27(10):1611-1614.

- [283] Hedström AK, Olsson T, Kockum I, Hillert J, Alfredsson L. Low fish consumption is associated with a small increased risk of MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(3):e717.
- [284] Esposito S, Sparaco M, Maniscalco GT, Signoriello E, Lanzillo R, Russo C, Carmisciano L, Cepparulo S, Lavorgna L, Gallo A, Trojsi F, Brescia Morra V, Lus G, Tedeschi G, Saccà F, Signori A, Bonavita S. Lifestyle and Mediterranean diet adherence in a cohort of Southern Italian patients with Multiple Sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;47:102636.
- [285] Galiè S, Canudas S, Muralidharan J, García-Gavilán J, Bulló M, Salas-Salvadó J. Impact of Nutrition on Telomere Health: Systematic Review of Observational Cohort Studies and Randomized Clinical Trials. *Adv Nutr*. 2020;11(3):576-601.
- [286] Canudas S, Becerra-Tomás N, Hernández-Alonso P, Galiè S, Leung C, Crous-Bou M, De Vivo I, Gao Y, Gu Y, Meinilä J, Milte C, García-Calzón S, Marti A, Boccardi V, Ventura-Marra M, Salas-Salvadó J. Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2020;11(6):1544-1554.
- [287] Navarro-Ibarra MJ, Hernández J, Caire-Juvera G. Diet, physical activity and telomere length in adults. *Nutr Hosp*. 2019;36(6):1403-1417.
- [288] Munger KL, Hongell K, Åivo J, Soilu-Hänninen M, Surcel HM, Ascherio A. 25-Hydroxyvitamin D deficiency and risk of MS among women in the Finnish Maternity Cohort. *Neurology*. 2017;89(15):1578-1583.
- [289] Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;62(1):60-65.
- [290] Munger KL, Åivo J, Hongell K, Soilu-Hänninen M, Surcel HM, Ascherio A. Vitamin D Status During Pregnancy and Risk of Multiple Sclerosis in Offspring of Women in the Finnish Maternity Cohort. *JAMA Neurol*. 2016;73(5):515-519.
- [291] Martínez-Lapiscina EH, Mahatnan R, Lee CH, Charoenpong P, Hong JP. Associations of serum 25(OH) vitamin D levels with clinical and radiological outcomes in multiple sclerosis, a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2020;411:116668.
- [292] Oliveira SR, Simão ANC, Alfieri DF, Flauzino T, Kallaur AP, Mezzaroba L, Lozovoy MAB, Sabino BS, Ferreira KPZ, Pereira WLCJ, Kaimen-Maciel DR, Dichi I, Reiche EMV. Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *J Neurol Sci*. 2017;381:213-219.
- [293] Vetter VM, Spira D, Banszerus VL, Demuth I. Epigenetic Clock and Leukocyte Telomere Length Are Associated with Vitamin D Status but not with Functional Assessments and Frailty in the Berlin Aging Study II. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(11):2056-2063.
- [294] Liu JJ, Prescott J, Giovannucci E, Hankinson SE, Rosner B, Han J, De Vivo I. Plasma vitamin D biomarkers and leukocyte telomere length. *Am J Epidemiol*. 2013;177(12):1411-1417.
- [295] Yang T, Wang H, Xiong Y, Chen C, Duan K, Jia J, Ma F. Vitamin D Supplementation Improves Cognitive Function Through Reducing Oxidative Stress Regulated by Telomere Length in Older Adults with Mild Cognitive Impairment: A 12-Month Randomized Controlled Trial. *J Alzheimers Dis*. 2020;78(4):1509-1518.
- [296] Kim JH, Kim GJ, Lee D, Ko JH, Lim I, Bang H, Koes BW, Seong B, Lee DC. Higher maternal vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomeres in newborns. *Matern Child Nutr*. 2018;14(1):e12475.
- [297] Daneels L, Martens DS, Arredouani S, Billen J, Koppen G, Devlieger R, Nawrot TS, Ghosh M, Godderis L, Pauwels S. Maternal Vitamin D and Newborn Telomere Length. *Nutrients*. 2021;13(6):2012.
- [298] Corina A, Rangel-Zúñiga OA, Jiménez-Lucena R, Alcalá-Díaz JF, Quintana-Navarro G, Yubero-Serrano EM, López-Moreno J, Delgado-Lista J, Tinahones F, Ordovás JM, López-Miranda J, Pérez-Martínez P. Low Intake of Vitamin E Accelerates Cellular Aging in Patients With Established Cardiovascular Disease: The CORDIOPREV Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(6):770-777.

- [299] Zhu Y, He ZY, Liu HN. Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B₁₂, folate, and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2011;18(7):933-938.
- [300] Weih M, Roßnagel F, Dikow H, Wehrle K, Braune S, Bergmann A. Daten zur Multiplen Sklerose in Deutschland und ihre Abbildung im Register des ambulanten Netzwerkes NeuroTransData (NTD). *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2020;88(6):379-385.
- [301] https://www.msregister.de/fileadmin/user_upload/MS-Registeruebersicht_2021.pdf
- [302] Laakso SM, Viitala M, Kuusisto H, Sarasoja T, Hartikainen P, Atula S, Tienari PJ, Soilu-Hänninen M. Multiple sclerosis in Finland 2018-Data from the national register. *Acta Neurol Scand*. 2019;140(5):303-311.
- [303] Trojano M, Bergamaschi R, Amato MP, Comi G, Ghezzi A, Lepore V, Marrosu MG, Mosconi P, Patti F, Ponzio M, Zaratin P, Battaglia MA; Italian Multiple Sclerosis Register Centers Group. The Italian multiple sclerosis register. *Neurol Sci*. 2019;40(1):155-165.
- [304] Thomas P, O' Callaghan NJ, Fenech M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(4):183-190.
- [305] Dweck A, Maitra R. The advancement of telomere quantification methods. *Mol Biol Rep*. 2021;48(7):5621-5627.
- [306] Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res*. 2012;730(1-2):59-67.
- [307] Codd V, Denniff M, Swinfield C, Warner SC, Papakonstantinou M, Sheth S, Nanus DE, Budgeon CA, Musicha C, Bountziouka V, Wang Q, Bramley R, Allara E, Kaptoge S, Stoma S, Jiang T, Butterworth AS, Wood AM, Di Angelantonio E, Thompson JR, Danesh JN, Nelson CP, Samani NJ. Measurement and initial characterization of leukocyte telomere length in 474,074 participants in UK Biobank. *Nat Aging*. 2022;2:170-179.
- [308] Romaine SPR, Denniff M, Codd V, Nath M, Koekemoer A, Anker SD, Cleland JG, Filippatos G, Levin D, Metra M, Mordi IR, Ouwerkerk W, Ter Maaten JM, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Ng LL, van der Harst P, Lang CC, Voors AA, Nelson CP, Samani NJ. Telomere length is independently associated with all-cause mortality in chronic heart failure. *Heart*. 2022;108(2):124-129.
- [309] Zheng Y, Zhang N, Wang Y, Wang F, Li G, Tse G, Liu T. Association between leucocyte telomere length and the risk of atrial fibrillation: An updated systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2022;81:101707.
- [310] Zeng Z, Zhang W, Qian Y, Huang H, Wu DJH, He Z, Ye D, Mao Y, Wen C. Association of telomere length with risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis and Mendelian randomization. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(5):940-947.
- [311] Zaccardelli A, Friedlander HM, Ford JA, Sparks JA. Potential of Lifestyle Changes for Reducing the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis: Is an Ounce of Prevention Worth a Pound of Cure? *Clin Ther*. 2019;41(7):1323-1345.
- [312] Lee YH, Jung JH, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between shortened telomere length and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus*. 2017;26(3):282-288.
- [313] Xie H, Ma Y, Shao M, Kong J, Zhou T, Wang F, Cai G, Xu S, Pan F. Telomere length in patients with osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Clin Exp Res*. 2022;34(3):495-503.
- [314] Xia K, Zhang L, Zhang G, Wang Y, Huang T, Fan D. Leukocyte telomere length and amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study. *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):508.
- [315] Kota LN, Bharath S, Purushottam M, Moily NS, Sivakumar PT, Varghese M, Pal PK, Jain S. Reduced telomere length in neurodegenerative disorders may suggest shared biology. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2015;27(2):e92-e96.
- [316] Gamal RM, Hammam N, Zakary MM, Abdelaziz MM, Razek MRA, Mohamed MSE, Emad Y, Elnaggar MG, Furst DE. Telomere dysfunction-related serological markers and oxidative

- stress markers in rheumatoid arthritis patients: correlation with diseases activity. *Clin Rheumatol*. 2018;37(12):3239-3246.
- [317] Fasching CL. Telomere length measurement as a clinical biomarker of aging and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(7):443-465.
- [318] Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, Austad SN, Venditti C, Pagel M, Shay JW, Wright WE. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*. 2011;10(5):761-768.
- [319] King KS, Kozlitina J, Rosenberg RN, Peshock RM, McColl RW, Garcia CK. Effect of leukocyte telomere length on total and regional brain volumes in a large population-based cohort. *JAMA Neurol*. 2014;71(10):1247-1254.
- [320] Gasperi C, Salmen A, Antony G, Bayas A, Heesen C, Kümpfel T, Linker RA, Paul F, Stangel M, Tackenberg B, Bergh FT, Warnke C, Weber F, Wiendl H, Wildemann B, Zettl UK, Ziemann U, Zipp F, Tumani H, Gold R, Hemmer B; German Competence Network of Multiple Sclerosis. Association of Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis With Disability Worsening in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2019;76(7):841-849.
- [321] Ziemssen T, Arnold DL, Alvarez E, Cross AH, Willi R, Li B, Kukkaro P, Kropshofer H, Ramanathan K, Merschhemke M, Kieseier B, Su W, Häring DA, Hauser SL, Kappos L, Kuhle J. Prognostic Value of Serum Neurofilament Light Chain for Disease Activity and Worsening in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis: Results From the Phase 3 ASCLEPIOS I and II Trials. *Front Immunol*. 2022;13:852563.
- [322] Fernández-Velasco JI, Kuhle J, Monreal E, Meca-Lallana V, Meca-Lallana J, Izquierdo G, Gascón-Giménez F, Sainz de la Maza S, Walo-Delgado PE, Maceski A, Rodríguez-Martín E, Roldán E, Villarrubia N, Saiz A, Blanco Y, Sánchez P, Carreón-Guarnizo E, Aladro Y, Brieva L, Íñiguez C, González-Suárez I, Rodríguez de Antonio LA, Masjuan J, Costa-Frossard L, Villar LM. Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(2):e940.
- [323] Margoni M, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Anti-CD20 therapies for multiple sclerosis: current status and future perspectives. *J Neurol*. 2022;269(3):1316-1334.
- [324] Winkelmann A, Loebermann M, Barnett M, Hartung HP, Zettl UK. Vaccination and immunotherapies in neuroimmunological diseases. *Nat Rev Neurol*. 2022;18(5):289-306.
- [325] Moiola L, Rommer PS, Zettl UK. Prevention and management of adverse effects of disease modifying treatments in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2020;33(3):286-294.
- [326] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-1930.
- [327] Patsopoulos NA. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(7):a028951.
- [328] Gerhardsson L, Hou L, Pettersson K. Work-related exposure to organic solvents and the risk for multiple sclerosis-a systematic review. *Int Arch Occup Environ Health*. 2021;94(2):221-229.
- [329] Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet*. 2012;8(5):e1002696.
- [330] Tsao CW, Aday AW, Almarazooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, Boehme AK, Buxton AE, Carson AP, Commodore-Mensah Y, Elkind MSV, Evenson KR, Eze-Nliam C, Ferguson JF, Generoso G, Ho JE, Kalani R, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Levine DA, Lewis TT, Liu J, Loop MS, Ma J, Mussolino ME, Navaneethan SD, Perak AM, Poudel R, Rezk-Hanna M, Roth GA, Schroeder EB, Shah SH, Thacker EL, VanWagner LB, Virani SS, Voecks JH, Wang NY, Yaffe K, Martin SS. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153-e639.

- [331] Zrzavy T, Pfitzner A, Flachenecker P, Rommer P, Zettl UK. Effects of normobaric hypoxic endurance training on fatigue in patients with multiple sclerosis: a randomized prospective pilot study. *J Neurol.* 2021;268(12):4809-4815.
- [332] Zimmer P, Bloch W, Schenk A, Oberste M, Riedel S, Kool J, Langdon D, Dalgas U, Kesselring J, Bansi J. High-intensity interval exercise improves cognitive performance and reduces matrix metalloproteinases-2 serum levels in persons with multiple sclerosis: A randomized controlled trial. *Mult Scler.* 2018;24(12):1635-1644.
- [333] Gerdes LA, Yoon H, Peters A. Mikrobiota und Multiple Sklerose. *Nervenarzt.* 2020;91(12):1096-1107.
- [334] Riccio P, Rossano R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2018;15(1):75-91.
- [335] Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. The Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: An Overview of Clinical Trials. *Cell Transplant.* 2019;28(12):1507-1527.
- [336] Bana B, Cabreiro F. The Microbiome and Aging. *Annu Rev Genet.* 2019;53:239-261.
- [337] Mundstock E, Sarria EE, Zatti H, Mattos Louzada F, Kich Grun L, Herbert Jones M, Guma FT, In Memoriam JM, Epifanio M, Stein RT, Barbé-Tuana FM, Mattiello R. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23(11):2165-2174.
- [338] Hedström AK, Huang J, Brenner N, Butt J, Hillert J, Waterboer T, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis development. *Sci Rep.* 2020;10(1):10960.
- [339] Hedström AK, Brenner N, Butt J, Hillert J, Waterboer T, Olsson T, Alfredsson L. Overweight/obesity in young adulthood interacts with aspects of EBV infection in MS etiology. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;8(1):e912.
- [340] Qiu F, Liang CL, Liu H, Zeng YQ, Hou S, Huang S, Lai X, Dai Z. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget.* 2017;8(1):268-284.
- [341] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479(7372):232-236.
- [342] Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(1):25-36.
- [343] Hedström AK, Katsoulis M, Hössjer O, Bomfim IL, Oturai A, Sondergaard HB, Sellebjerg F, Ullum H, Thørner LW, Gustavsen MW, Harbo HF, Obradovic D, Gianfrancesco MA, Barcellos LF, Schaefer CA, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. The interaction between smoking and HLA genes in multiple sclerosis: replication and refinement. *Eur J Epidemiol.* 2017;32(10):909-919.
- [344] Vyas CM, Ogata S, Reynolds CF, Mischoulon D, Chang G, Cook NR, Manson JE, Crous-Bou M, De Vivo I, Okereke OI. Telomere length and its relationships with lifestyle and behavioural factors: variations by sex and race/ethnicity. *Age Ageing.* 2021;50(3):838-846.
- [345] Zhu H, Bhagatwala J, Pollock NK, et al. High sodium intake is associated with short leukocyte telomere length in overweight and obese adolescents. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(8):1249-1253.
- [346] Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
- [347] Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, Hou L, Baccarelli AA, Stewart JD, Li Y, Whitsel EA, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Lohman K, Liu Y, Ferrucci L, Horvath S. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY).* 2018;10(4):573-591.
- [348] Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.*

2013;49(2):359-367.

- [349] Theodoropoulou E, Alfredsson L, Piehl F, Marabita F, Jagodic M. Different epigenetic clocks reflect distinct pathophysiological features of multiple sclerosis. *Epigenomics*. 2019;11(12):1429-1439.
- [350] Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine*. 2017;21:29-36.
- [351] Oblak L, van der Zaag J, Higgins-Chen AT, Levine ME, Boks MP. A systematic review of biological, social and environmental factors associated with epigenetic clock acceleration. *Ageing Res Rev*. 2021;69:101348.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i> , alternative Verlängerung der Telomere
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ARMSS	<i>Age-Related Multiple Sclerosis Severity</i>
BE	Blutentnahme
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	<i>body mass index</i> , Körpermasseindex
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIS	<i>clinically isolated syndrome</i> , klinisch isoliertes Syndrom
CMV	<i>cytomegalovirus</i> , Zytomegalievirus
Cq	Schwellenwertzyklus in der qPCR
DDR	<i>DNA damage response</i> , DNA-Schadensantwort
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DM	Diabetes mellitus
DMD	<i>disease-modifying drug</i> , verlaufsmodifizierende Medikamente
DMSG	Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft
DMT	<i>disease-modifying treatment</i> , verlaufsmodifizierende Immuntherapie
DNA	<i>deoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
D-Loop	<i>displacement loop</i> , Verdrängungsschleife
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i> , nukleäres Antigen des EBV
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
FS	funktionelles System
GWAS	<i>genome-wide association study</i> , genomweite Assoziationsstudie

HHV	humanes Herpesvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HR	<i>hazard ratio</i>
hTERC	<i>telomerase RNA component</i> , RNA-Komponente der hTERT
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
k.K.	keine Kontrollgruppe
LTL	Leukozyten-Telomerlänge
m	Meter
M.	Morbus
mm ³	Kubikmillimeter
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
MSC	<i>mesenchymal stromal cells</i> , mesenchymale Stromazellen
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MSSS	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i>
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
<i>n</i>	Anzahl
OKB	oligoklonale Banden
OR	<i>odds ratio</i> , Chancenverhältnis
PM	<i>particular matter</i> , Feinstaub
PPMS	<i>primary progressive MS</i> , primär progrediente MS
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
PMID	PubMed-Identifikationsnummer
p-Arm	kurzer Arm des Chromosoms
Q-FISH	quantitative Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
q-Arm	langer Arm des Chromosoms

RA	rheumatoide Arthritis
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RR	relatives Risiko
RRMS	<i>relapsing remitting MS</i> , schubförmig remittierende MS
S	Einzelkopiegen-Signal
S.	Seite
SASP	seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotidpolymorphismus
SPMS	<i>secondary progressive MS</i> , sekundär progrediente MS
STAR	<i>single telomere absolute-length rapid</i>
STELA	<i>Single Telomere Length Analysis</i> , Einzel-Telomer-Längen-Analyse
T/S-Ratio	Telomer-Einzelkopiegen-Verhältnis
Tab.	Tabelle
TeSLA	<i>Telomere Shortest Length Assay</i>
T	Telomer-Signal
TL	Telomerlänge
TPE-OLD	<i>telomere position effect over long distances</i> , Telomer-Positions-Effekt über lange Distanzen
TRFL	Telomerrestriktionsfragmentlänge
T-Loop	<i>telomere loop</i> , Telomereschleife
u. a.	unter anderem
U-STELA	universale STELA
UV	ultraviolett
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Globale Prävalenz der MS.....	7
Abb. 2: Schematischer Verlauf der drei Hauptverlaufsformen der MS.....	11
Abb. 3: Lokalisation der Telomere am Chromosom.....	16
Abb. 4: Überblick über die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeiten.....	22
Abb. 5: <i>Workflow</i> des ersten Schwerpunktes dieser Arbeit.....	23
Abb. 6: <i>Workflows</i> des zweiten Schwerpunktes dieser Arbeit.....	27
Abb. 7: Korrelation der Duplikate zur technischen Validierung der LTL-Messung.....	31
Abb. 8: Korrelation der LTL und des Alters.....	32
Abb. 9: Unterschiede in der LTL zwischen den Gruppen.....	33
Abb. 10: Chancenverhältnisse für relativ lange Telomere in der multiplen Regression.....	33
Abb. 11: Veränderung der LTL bei Patienten mit MS nach über zehn Jahren.....	34
Abb. 12: Konversionsrisiko der Patienten mit RRMS in Abhängigkeit der LTL.....	35
Abb. 13: Veränderung des Behinderungsgrades der Patienten in Abhängigkeit der Baseline-LTL.....	36
Abb. 14: Flussdiagramm der systematischen Literatursuche und -auswahl.....	38
Abb. 15: <i>Forest-Plot</i> der Metaanalyse der vier Studien.....	44
Abb. 16: <i>Funnel-Plot</i> der Metaanalyse der vier Studien.....	45
Abb. 17: Übersicht über die mit der MS und der TL assoziierten Faktoren.....	55

8.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schubtherapie und verlaufsmodifizierende Therapie der MS.....	14
Tab. 2: Charakteristika der Rostocker Kohorte.....	31
Tab. 3: Allgemeine Informationen zu den sieben eingeschlossenen Studien.....	39
Tab. 4: Methoden und Ergebnisse der sieben eingeschlossenen Studien.....	40
Tab. 5: Genetische Faktoren mit Assoziation zur MS und TL.....	46
Tab. 6: Umweltfaktoren mit Assoziation zur MS und TL.....	49
Tab. 7: Lebensstilfaktoren mit Assoziation zur MS und TL.....	52
Tab. S1: Erläuterung der EDSS-Scores.....	102
Tab. S2: Studien, die in der systematischen Literaturrecherche begutachtet wurden.....	103

8.4. Supplementäre Tabellen

Tab. S1: Erläuterung der EDSS-Scores

EDSS-Score	funktionelle Beeinträchtigung
0	Patient zeigt normale neurologische Funktion ohne Einschränkung
1	Patient zeigt keine Behinderung, es gibt minimale pathologische Zeichen in einem FS
1,5	Patient zeigt keine Behinderung, es gibt minimale pathologische Zeichen in mehr als einem FS
2	Patient zeigt minimale Behinderungen in einem FS
2,5	Patient zeigt minimale Behinderungen in zwei FS
3	Patient zeigt moderate Behinderung in einem FS ODER milde Behinderung in drei oder vier FS
3,5	Patient zeigt moderate Behinderungen in einem FS UND in ein oder zwei FS milde ODER in zwei FS moderate ODER in fünf FS milde Einschränkungen
4	Patient ist fähig, 500m ohne Hilfe oder Pause zu gehen und ist trotz schwerer Behinderung in einem FS circa 12 Stunden am Tag selbständig
4,5	Patient ist fähig, 300m ohne Hilfe oder Pause zu gehen und hat eine schwere Behinderung in einem FS. Patient kann einen vollen Arbeitstag leisten, kann aber etwas eingeschränkt sein und benötigt geringe Unterstützung
5	Patient kann circa 200m ohne Hilfe oder Pause gehen und kann aufgrund der schweren Behinderung keinen vollen Arbeitstag oder ähnliche ganztägliche Aktivität ausführen
5,5	Patient kann circa 100m ohne Hilfe oder Pause gehen, Vollzeit-Aktivitäten sind aufgrund der Behinderung nicht möglich
6	Patient ist für eine Strecke von 100m mit oder ohne Pause dauerhaft auf eine Gehhilfe angewiesen
6,5	Patient benötigt dauerhaft Gehhilfen auf beiden Seiten, um eine Strecke von 20m ohne Pause zu gehen
7	Patient kann auch mit Hilfe nicht mehr als 5m gehen, ist auf den Rollstuhl angewiesen, der jedoch mit eigener Kraft angetrieben werden kann
7,5	Patient ist auf einen Rollstuhl angewiesen, kann dabei jedoch Hilfe benötigen (motorisierter Rollstuhl kann erwogen werden). Dem Patient ist es unmöglich, mehr als ein paar Schritte zu machen
8	Patient ist an den Rollstuhl oder das Bett gebunden, verbringt aber den Großteil des Tages außerhalb des Bettes. Patient kann die Arme effektiv einsetzen und übernimmt viele Aspekte der eigenen Pflege
8,5	Patient ist den Großteil des Tages im Bett. Der Einsatz der Arme ist teilweise möglich und einige Aspekte der eigenen Pflege können selbständig durchgeführt werden
9	Bettlägeriger Patient, der sich nicht selbst helfen kann. Nahrungsaufnahme und Kommunikation sind möglich.
9,5	Patient ist vollständig auf Hilfe angewiesen und bettlägerig. Kommunikation, Nahrungsaufnahme und Schluckakt sind nicht mehr möglich
10	Patient infolge der MS-Erkrankung verstorben

Diese Tabelle zeigt den jeweiligen EDSS-Score [44] und die entsprechenden funktionellen Einschränkungen. Die Grade beschreiben die Abstufung des Funktionsverlusts des jeweiligen FS.

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; FS: funktionelles System, beispielsweise die Pyramidenbahn; m: Meter; MS: Multiple Sklerose.

Tab. S2: Studien, die in der systematischen Literaturrecherche begutachtet wurden

Nummer	Informationen zur Studie			Einschlusskriterien				Einschluss
	Erster Autor	Jahr	PMID oder <i>Preprint</i>	Original	Englisch/Deutsch	Patienten mit MS	Telomerlängenmessung	
1	Olerup	1990	1978948	ja	ja	ja	nein	-
2	Charmley	1991	1674514	ja	ja	ja	nein	-
3	Spurkland	1994	8071104	ja	ja	ja	nein	-
4	Roth	1995	7499175	ja	ja	nein	nein	-
5	Torelli	1995	7561787	ja	ja	ja	nein	-
6	Pham-Dinh	1995	7590972	ja	ja	nein	nein	-
7	Roth	1995	7593547	ja	ja	ja	nein	-
8	Encinas	1996	8757345	ja	ja	nein	nein	-
9	De Boer	1998	9637494	ja	ja	nein	ja	-
10	Morris	1999	10223549	ja	ja	nein	nein	-
11	Bihl	1999	10224268	ja	ja	nein	nein	-
12	Allcock	1999	10369924	ja	ja	nein	nein	-
13	Steffler	1999	10384097	ja	ja	nein	nein	-
14	Kalman	1999	10554670	nein	ja	ja	nein	-
15	Allcock	1999	10626741	ja	ja	ja	nein	-
16	Oksenberg	2000	11164900	nein	ja	ja	nein	-
17	Encinas	2001	11222494	ja	ja	nein	nein	-
18	Jawaheer	2001	11254450	ja	ja	nein	nein	-
19	Marrosu	2001	11741834	ja	ja	ja	nein	-
20	Storch	2002	12146797	ja	ja	nein	nein	-
21	Mellai	2003	12559630	ja	ja	ja	nein	-
22	Hug	2003	12817027	ja	ja	ja	ja	✓
23	Duvefelt	2003	14651518	ja	ja	ja	nein	-
24	Rubio	2004	15014978	ja	ja	ja	nein	-
25	Jagodic	2005	15634914	ja	ja	nein	nein	-
26	Muhallab	2005	15748954	ja	ja	nein	nein	-
27	Vyskhina	2005	16078049	ja	ja	ja	nein	-
28	Weksler	2005	16141364	ja	ja	nein	nein	-
29	Thewissen	2005	16154497	ja	ja	ja	nein	-
30	Marrosu	2006	16096810	ja	ja	ja	nein	-
31	Saarela	2006	16596167	ja	ja	ja	nein	-
32	Lamoury	2006	16793732	ja	ja	nein	nein	-
33	Rubio	2007	17256150	ja	ja	ja	nein	-
34	Caillier	2008	18832704	ja	ja	ja	nein	-
35	Ordóñez	2009	19421224	ja	ja	ja	nein	-
36	Baecher-Allan	2011	21300823	ja	ja	ja	nein	-
37	Montoya	2012	22770640	ja	ja	nein	nein	-
38	Oksenberg	2013	24289837	n	ja	ja	nein	-
39	Westerlind	2015	25159868	ja	ja	ja	nein	-
40	Guan	2015	25424527	ja	ja	ja	ja	✓
41	Reddy	2017	28253983	nein	ja	nein	nein	-
42	Cebrián-Silla	2017	28648897	ja	ja	nein	nein	-
43	Redondo	2018	28548004	ja	ja	ja	ja	✓
44	Guan	2018	30092167	ja	ja	ja	ja	✓
45	Liu	2019	31294790	ja	ja	ja	nein	-
46	Din	2019	31407831	ja	ja	ja	nein	-
47	Krysko	2019	31486104	ja	ja	ja	ja	✓
48	Habib	2020	32050150	ja	ja	ja	ja	✓
49	Carraro	2020	32499887	nein	ja	nein	ja	-
50	Liu	2020	bioRxiv 2019.12.19.882522	ja	ja	nein	nein	-
51	Hecker	2021	medRxiv 2020.11.17.20232975	ja	ja	ja	ja	✓

Diese Tabelle zeigt die Anwendung der zuvor festgelegten Kriterien zur Auswahl der Studien in der systematischen Literatursuche. Die gefundenen Publikationen sind nach dem Erscheinungsjahr geordnet. Es wurden vier verschiedene Kriterien zum Einschluss angewandt. Die sieben Studien, die alle vier geforderten Kriterien erfüllten (✓), wurden in die systematische Übersichtsarbeit aufgenommen.

ja: Studie erfüllte Kriterium; nein: Studie erfüllte Kriterium nicht; ✓: Studie erfüllte alle Kriterien und wurde in die systematische Übersichtsarbeit aufgenommen; -: Studie erfüllte mindestens ein Kriterium nicht und wurde daher nicht in die Übersichtsarbeit aufgenommen; PMID: PubMed-Identifikationsnummer.

8.5. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jan Bühring, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen, Hilfen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus anderen Werken inhaltlich oder sinngemäß übernommenen Textstellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Promotionsarbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form an einer deutschen oder einer ausländischen Fakultät oder Hochschule zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt.

Datum, Ort

Unterschrift

8.6. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, durch deren Unterstützung und Beistand die vorliegende Arbeit ermöglicht wurde.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U. K. Zettl, Leiter der Sektion Neuroimmunologie der Klinik und Poliklinik für Neurologie an der Universitätsmedizin Rostock, für die Möglichkeit der Promotion, das Überlassen der Thematik, seine allzeit zur Verfügung stehende Unterstützung sowie für die wissenschaftlichen Ratschläge bedanken, die diese Arbeit in diesem Rahmen erst möglich machten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. M. Hecker von der Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock für seine hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Dr. Hecker stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und konnte mich stets durch ausführliche Erklärungen sowie Diskussionen und konstruktive Gespräche in meiner wissenschaftlichen Arbeit fördern und fordern. Ihm gilt auch mein Dank für die Unterstützung bei der Bewältigung der statistischen Auswertung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, sowie für Anregungen zur Visualisierung der Ergebnisse. Außerdem möchte ich Dr. B. Fitzner für die wissenschaftlichen Diskussionen und Denkanstöße danken. Mein Dank gilt des Weiteren Dr. M. Schwartz für die Recherche der klinischen Daten der Patienten mit MS sowie Prof. Dr. P. S. Rommer für seine konstruktive Unterstützung bei der Verwirklichung der Recherche nach mit der MS assoziierten Faktoren.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. J. Blaschke, Dr. P. Blaschke, Dr. F. Blaschke, Dr. E. Piontek und Dr. M. Wick für die Rekrutierung der Patienten und Kontrollprobanden. Außerdem möchte ich mich bei allen Patienten mit Multipler Sklerose und allen Kontrollprobanden bedanken, die sich zur wissenschaftlichen Analyse ihrer gespendeten Blutproben bereit erklärt haben.

Ich danke außerdem der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Walter des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin an der Universitätsmedizin Rostock für die Messung der Telomerlängen, wodurch das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir in schwierigen Zeiten die nötige Motivation und Unterstützung gaben. Ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin P. Bachmann, die mir jederzeit mit einem guten Rat zur Seite stand und mich stets durch Denkanstöße, Inspirationen sowie Diskussionen und neue Blickwinkel in meiner Arbeit voranbrachte.

8.7. Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Jan Bühring
 Geburtsdatum: 12.08.1999
 Geburtsort: Neuruppin, Brandenburg
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

06/2017 Abitur/Fachhochschulreife (1,2)
 2009 – 2017 Evangelisches Gymnasium Neuruppin
 2005 – 2009 Astrid – Lindgren – Grundschule Wusterhausen/Dosse

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

10/2022 Zweites Staatsexamen der ärztlichen Prüfung
 09/2019 Erstes Staatsexamen der ärztlichen Prüfung (2,0)
 09/2017 Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der
 Universität Rostock

FAMULATUREN

08/2021 – 08/2021 Praxis für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Dr. Tödtmann,
 Dr. Herzog, Dr. Öri, Rostock
 02/2021 – 03/2021 Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Rostock
 08/2020 – 08/2020 Klinik und Poliklinik für Neurologie, MS-Station, Rostock
 07/2020 – 08/2020 Anästhesiologie, KMG Klinikum, Kyritz
 02/2020 – 03/2020 Praxis für Allgemeinmedizin, Dres. Kannenberg, Kyritz

WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

seit 01/2020 Promotion an der Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für
 Neurologie, Sektion Neuroimmunologie, Leiter: Prof. Dr. U. K. Zettl

PUBLIKATIONEN

Hecker M, Fitzner B, Jäger K, **Bühring J**, Schwartz M, Hartmann A, Walter M, Zettl UK. Leukocyte Telomere Length in Patients with Multiple Sclerosis and Its Association with Clinical Phenotypes. Mol Neurobiol. 2021;58(6):2886-2896. doi: 10.1007/s12035-021-02315-y.

Bühring J*, Hecker M*, Fitzner B, Zettl UK. Systematic Review of Studies on Telomere Length in Patients with Multiple Sclerosis. Aging Dis. 2021;12(5):1272-1286. doi: 10.14336/AD.2021.0106.

Hecker M*, **Bühring J***, Fitzner B, Rommer PS, Zettl UK. Genetic, Environmental and Lifestyle Determinants of Accelerated Telomere Attrition as Contributors to Risk and Severity of Multiple Sclerosis. Biomolecules. 2021;11(10):1510. doi: 10.3390/biom11101510.

*: geteilte Erstautorenschaft

POSTERBEITRÄGE

Hecker M, Fitzner B, Jäger K, **Bühning J**, Schwartz M, Walter M, Zettl UK. Association of average blood cell telomere length with the clinical course of MS over a 10-year period. ECTRIMS, 09.09.2020 - 12.09.2020, online.

Fitzner B, Hecker M, Jäger K, **Bühning J**, Schwartz M, Walter M, Zettl UK. Der schubförmige Verlauf bei Multiple Sklerose Patienten ist mit verkürzten Telomeren assoziiert. DGN-Kongress, 04.11.2020 - 07.11.2020, online.

Datum, Ort

Unterschrift

9. Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine häufige chronische immunmedierte Erkrankung des ZNS, gekennzeichnet durch Degeneration und Verlust von Axonen und Synapsen sowie reaktiver Astroglie. Weltweit sind rund 2,8 Millionen Menschen an der MS erkrankt, wobei die Prävalenz zunimmt. Die MS kann in drei Hauptverlaufsformen unterschieden werden: die schubförmig remittierende MS (RRMS), die sekundär progrediente MS (SPMS) und die primär progrediente MS (PPMS).
2. Mit den bisher im klinischen Alltag genutzten Biomarkern ist eine schnelle und sensitive Diagnose der MS nur bedingt möglich. Biomarker, die spezifisch für die MS sind oder gut mit dem Krankheitsverlauf und/oder dem Therapieansprechen korrelieren, gibt es bisher nicht. Diesen Platz könnten potenziell Telomere einnehmen.
3. Telomere bilden die Endkappen der Chromosomenarme. Sie bestehen bei Wirbeltieren aus repetitiven Sequenzen des nicht-kodierenden Hexanukleotids „TTAGGG“ und sind beim Menschen zwischen fünf und 15 Kilobasen lang. Die Hauptaufgabe liegt vor allem im Schutz des Erbguts, bspw. vor Degradation und interchromosomaler Fusion.
4. Telomere sind Marker für das biologische Alter. Physiologischerweise werden Telomere in somatischen Zellen aufgrund von Zellteilungsprozessen, u. a. aufgrund des Endreplikationsproblems, und anderen Mechanismen, wie oxidativem Stress, im Laufe des Lebens kürzer. Beschleunigter Telomerverlust wurde bei verschiedenen altersassoziierten Erkrankungen sowie bei Autoimmunkrankheiten nachgewiesen.
5. Die Leukozyten-Telomerlänge (LTL) von 40 Patienten mit RRMS bzw. 20 Patienten mit PPMS und 60 Gesunden wurde im ersten Schwerpunkt dieser Arbeit gemessen und miteinander verglichen. Zusätzlich wurde auf Assoziationen der LTL mit klinischen Parametern der Patienten sowie mit Veränderungen dieser in einer Subgruppe von zehn Patienten mit RRMS innerhalb eines Zeitraumes von zehn Jahren untersucht.
6. Die mittlere relative LTL wurde in DNA aus peripheren Vollblutproben der 120 Individuen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) gemessen. Dabei wurden Telomer-Signale (T) und Einzelkopieigen-Signale (S) bestimmt und in ein Verhältnis gesetzt. Ein $T/S\text{-Ratio} > 1$ zeigt relativ lange Telomere, während ein $T/S\text{-Ratio} < 1$ für relativ kurze Telomere steht.
7. Die Patientengruppe und die Kontrollgruppe der Studie des ersten Schwerpunktes dieser Arbeit wiesen jeweils ein Geschlechtsverhältnis von 1:1 (weiblich : männlich) und ein ähnliches Durchschnittsalter (48,0 Jahre bzw. 48,1 Jahre) auf. Der durchschnittliche *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) - Score, der zur Beurteilung des Behinderungsgrades der Patienten dient, betrug bei den Patienten mit RRMS im Mittel 2,9 und bei den Patienten mit PPMS durchschnittlich 4,7. Patienten mit RRMS litten im Durchschnitt seit 6,1 Jahren (Spannweite: 0-27 Jahre) an der Krankheit, die PPMS-Patienten seit durchschnittlich 3,0 Jahren (Spannweite: 0-15 Jahre).
8. In allen drei Gruppen (RRMS-Patienten, PPMS-Patienten und Kontrollen) war das Alter signifikant negativ mit der LTL korreliert (Pearson's Korrelationskoeffizient: $r = -0,222$; $p = 0,015$).

9. Die Patienten mit RRMS zeigten eine signifikant kürzere LTL (mittlere T/S-Ratio: $0,92 \pm 0,19$) als die Patienten mit PPMS (mittlere T/S-Ratio: $1,16 \pm 0,35$; $p=0,010$) und die gesunden Kontrollen (mittlere T/S-Ratio: $1,12 \pm 0,35$; $p=4,2 \times 10^{-04}$), wohingegen sich die relative LTL zwischen den Patienten mit PPMS und den Kontrollen nicht signifikant unterschied ($p=0,700$).
10. Bei Patienten mit RRMS mit relativ kurzen Telomeren ($n=24$), definiert als T/S-Ratio <1 , konnte ein signifikant höheres Risiko (*hazard ratio*: 8,28) für eine Konversion in eine SPMS als bei jenen mit relativ langen Telomeren ($n=16$), definiert als T/S-Ratio >1 , identifiziert werden. Bei 11 RRMS-Patienten mit kurzen Telomeren, jedoch nur bei einem Patienten mit langen Telomeren, konvertierte die Erkrankung innerhalb von zehn Jahren zur SPMS. Die Zeit bis zum ersten dokumentierten Schub unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant, ebenso wie die jährliche Anzahl an Schüben während des Nachbeobachtungszeitraums von zehn Jahren. Obwohl es statistisch nicht signifikant war, schienen Patienten mit RRMS und relativ langen Telomeren einen milderen Krankheitsverlauf, gemessen am EDSS-Score, zu haben.
11. Im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit sollten durch eine systematische Literaturrecherche Studien, im Rahmen derer die Telomerlänge (TL) bei Patienten mit MS gemessen wurde, zusammengetragen und verglichen werden. Außerdem sollten genetische Faktoren sowie Faktoren der Umwelt und des Lebensstils identifiziert werden, die nach aktuellem Stand der Literatur einen potenziellen Einfluss sowohl auf das MS-Erkrankungsrisiko bzw. den individuellen Schweregrad der Erkrankung als auch auf die TL haben.
12. Die Literaturrecherchen wurden mithilfe der elektronischen Datenbanken PubMed, medRxiv und bioRxiv durchgeführt. Für die systematische Übersichtsarbeit wurde mit dem Suchterminus „*multiple sclerosis*“ [AND] *telomer**“ nach relevanten Studien gesucht. Daraufaufend wurde nach sowohl mit MS als auch TL assoziierten Faktoren gesucht.
13. Die systematische Literaturrecherche des zweiten Schwerpunktes dieser Arbeit ergab 51 Publikationen, von denen sieben Studien, einschließlich der in dieser Arbeit durchgeführten Studie zur „Rostocker Kohorte“, durch Auswahlkriterien in die Betrachtung eingeschlossen wurden. Im Rahmen dieser sieben Publikationen wurde die TL bei Patienten mit MS gemessen. In sechs dieser Studien wurden Kontrollen als Vergleichskohorte integriert. Abgesehen von einer Studie wurden alle innerhalb der letzten sieben Jahre publiziert.
14. In sechs von sieben Studien wurde eine negative Assoziation zwischen chronologischem Alter und der TL identifiziert. In sechs Studien wurde die TL in Zellen des peripheren Blutes gemessen. Zur Bestimmung der TL wurde in vier der sieben Studien das *Southern-Blot*-Hybridisierungsverfahren, in den anderen drei Studien ein qPCR-Assay verwendet.
15. In vier Studien wurden die LTL von Patienten mit MS mit der von gesunden Kontrollen verglichen. Eine Metaanalyse dieser vier Studien ergab, dass Patienten mit MS im Vergleich zu Gesunden eine signifikant geringere LTL haben (standardisierte Mittelwertdifferenz: $-0,66$; $p=0,003$). Weiterhin korrelierte bei Patienten mit MS in einer Studie eine kürzere LTL mit einem geringeren Hirnvolumen und einer höheren Schubrate sowie in zwei Studien eine kürzere LTL mit höheren EDSS-Scores.
16. In einer umfangreichen Übersichtsarbeit mit dem Ziel, gemeinsame potenzielle Einflussfaktoren auf die MS und die TL zu identifizieren, konnte gezeigt werden, dass verschiedene genetische, Umwelt- und Lebensstilfaktoren sowohl mit der MS als auch der TL assoziiert sind.

17. Frauen sind zwei- bis dreimal häufiger von MS betroffen als Männer, jedoch zeigen männliche Patienten oftmals eine raschere Zunahme an Behinderungen. Bezüglich der TL fanden sich in Metaanalysen längere Telomere bei Frauen als bei Männern.
18. Der stärkste Risikofaktor für eine Erkrankung an MS ist eine Infektion mit EBV (OR): 4,5). EBV-infizierte B-Zellen können, u. a. durch Aktivierung der Telomerase, unsterblich werden und zur Bildung von Autoantikörpern beitragen. Eine Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV) hingegen ist mit einem geringeren Risiko für MS assoziiert (OR: 0,7). Für die Infektion mit CMV ist eine negative Assoziation mit der LTL beschrieben, wobei als möglicher Grund die vermehrte Proliferation von T-Zellen vermutet wird.
19. Bezüglich des Lebensstils haben die folgenden Faktoren die größte Evidenz: Rauchen erhöht das Risiko für MS um das ca. Anderthalbfache und Fettleibigkeit erhöht das Risiko um das ungefähr Zweifache. Des Weiteren begünstigt Rauchen die Konversion von RRMS zu SPMS (*hazard ratio*: 1,8). Studien fanden bei Rauchern und Individuen mit einem höheren Körpergewicht kürzere Telomere in Blutzellen als bei Nichtrauchern und Normalgewichtigen. Als möglicher Grund hierfür wird oxidativer Stress, bedingt durch Rauchen und Übergewicht, diskutiert.
20. Individuen mit hoher sportlicher Aktivität bzw. einem hohen Serum-Vitamin-D-Level zeigten ein geringeres Risiko für MS (OR: ~0,7 bzw. ~0,5) und längere Telomere als Individuen mit geringer sportlicher Aktivität bzw. niedrigen Serum-Vitamin-D-Leveln.
21. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass Patienten mit MS durchschnittlich eine kürzere LTL aufweisen als (gesunde) Kontrollen. Zudem wurde aufgezeigt, dass es gemeinsame Faktoren aus den Bereichen Genetik, Umwelt und Lebensstil gibt, die sowohl mit der MS als auch mit der TL assoziiert sind.
22. In zukünftigen Studien sollte neben Blutzellen auch in anderen Zellen und Geweben, u. a. bestimmten Immunzellsubtypen, Gliazellen des ZNS sowie aus Zellen in Läsionen im ZNS, die TL bestimmt werden. Zudem sollten neue Messverfahren zur TL-Messung genutzt werden, um nicht nur die durchschnittliche relative TL, sondern bspw. auch die Verteilung der Länge einzelner Telomere in einer Zellpopulation zu bestimmen. Weiterhin sollten größer angelegte Studien durchgeführt werden, die einerseits die TL bei Patienten mit MS und alters-*gematchten* Gesunden zelltypspezifisch vergleichen, aber andererseits auch Faktoren des Lebensstils und der Umwelt sowie genetische Prädispositionen berücksichtigen, um mögliche Rückschlüsse auf die molekularen Pathomechanismen der MS ziehen zu können.