

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Sektion Neuroimmunologie

Leiter: Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl

Antikörperprofiling in Liquor cerebrospinalis und Serum bei Multipler Sklerose unter Verwendung hochdichter Microarrays



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Matthias Wendt

geboren am 22.07.1990 in Kiel

Rostock, 2024

Dekan: Prof. Dr. med. B. J. Krause

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl
Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Nervenheilkunde
Klinik und Poliklinik für Neurologie, Sektion Neuroimmunologie

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Klemens Ruprecht
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Imke Metz
Universitätsmedizin Göttingen
Institut für Neuropathologie

Datum der Einreichung: 03.01.2025

Datum der Verteidigung: 28.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Multiple Sklerose (MS).....	5
1.1.1.	Epidemiologie	5
1.1.2.	Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie	6
1.1.2.1.	Genetische Faktoren.....	6
1.1.2.2.	Umweltfaktoren und Lebensstil	7
1.1.2.3.	Histopathologische Veränderungen	8
1.1.2.4.	Rolle des Immunsystems bei MS	9
1.1.3.	Klinik.....	10
1.1.3.1.	Symptome und Verlaufsformen	10
1.1.3.2.	Diagnosekriterien	12
1.1.3.3.	Therapie.....	14
1.1.3.4.	Prognose.....	15
1.2.	B-Zellen, Antikörper und Epitope.....	16
1.3.	Messung von Antikörperreaktivitäten.....	21
1.3.1.	Antikörper als molekulare Biomarker bei MS	21
1.3.2.	Nachweis mit ELISA	22
1.3.3.	Peptid-Microarrays.....	23
2.	Fragestellungen	26
3.	Material und Methoden	28
3.1.	Studiendesign	28
3.2.	Patientenkollektiv	29
3.3.	Peptid-Microarrays.....	33
3.3.1.	Auswahl der Peptide	33
3.3.2.	Herstellung der Microarrays	36
3.3.3.	Versuchsablauf.....	36
3.3.4.	Datenvorverarbeitung.....	37
3.3.5.	Filtern spezifischer Peptid-Antikörper-Reaktivitäten	38
3.4.	Validierungsexperiment mit ELISA	41
4.	Ergebnisse	44
4.1.	Datenqualität und -verteilung.....	44
4.2.	Individuelle Muster im Antikörperprofil	46
4.3.	MS-spezifische Antikörperreaktivitäten	51
4.4.	Validierung ausgewählter Reaktivitäten mittels ELISA	58
5.	Diskussion	62
5.1.	Einordnung der Daten aus dem Antikörperscreening	62
5.2.	Antikörper gegen humane Proteine.....	65
5.2.1.	Myelin-Basisches Protein (MBP)	65

5.2.2.	2',3'-Cyclonukleotid-3'-Phosphodiesterase (CN37)	66
5.2.3.	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)	67
5.2.4.	Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG).....	69
5.2.5.	Alpha-Crystallin B (CRYAB).....	69
5.2.6.	Alpha-II Spektrin (SPTAN1)	72
5.2.7.	Aquaporin 4 (AQP4)	72
5.2.8.	Beta- und Gamma-Aktin (ACTB/ACTG).....	73
5.2.9.	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i> (DPYL2)	74
5.2.10.	Glutamat-Decarboxylase 2 (GAD2)	74
5.2.11.	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	75
5.2.12.	Leichte Kette des Neurofilaments (NFL).....	75
5.2.13.	Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1).....	76
5.2.14.	Protein S100A1	76
5.2.15.	Saures Gliafaserprotein (GFAP)	77
5.2.16.	Thyreoperoxidase (TPO).....	78
5.2.17.	Transaldolase (TALDO1)	78
5.2.18.	Tubulin-beta-1-Kette (TUBB1)	79
5.3.	Antikörper gegen Peptide des Epstein-Barr-Virus.....	79
5.4.	Antikörper gegen Mimotope	81
5.5.	Ausblick	82
6.	Zusammenfassung.....	85
7.	Literaturverzeichnis.....	88
8.	Anhang	108
8.1.	Abbildungsverzeichnis	108
8.2.	Tabellenverzeichnis.....	109
8.3.	Abkürzungsverzeichnis	110
8.4.	Thesen	113
8.5.	Danksagung.....	116
8.6.	Lebenslauf.....	117
8.7.	Eidesstattliche Erklärung	118

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose (MS)

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die in der westlichen Welt eine führende Ursache von nichttraumatischen Behinderungen im jungen und mittleren Lebensalter einnimmt [1]. Daher ist die Verbesserung von Parametern für frühzeitige Diagnosesicherung, Prognoseabschätzung und eine adäquate Therapie von großer Bedeutung. Schwerpunkt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die Suche nach MS-spezifischen Antikörperreaktivitäten als potentielle molekulare Biomarker bei MS.

1.1.1. Epidemiologie

Mit ungefähr 2,9 Millionen weltweit Erkrankten und über 200.000 in Deutschland lebenden Erkrankten ist MS eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen [2–4]. Frauen sind mit in den letzten Jahrzehnten gestiegenem Anteil ca. doppelt so häufig betroffen wie Männer, wobei es einige Länder mit deutlich höherem Anteil an erkrankten Frauen gibt [2]. Der überwiegende Anteil der Patienten erkrankt im Alter zwischen 20 und 40 Jahren an MS [5]. Es existieren jedoch auch Fälle von an MS erkrankten Kindern und im höheren Lebensalter an MS erkrankten Menschen [6,7]. Die Prävalenz der MS korreliert mit geografischen Faktoren: Die Prävalenzrate nimmt vom Äquator in Richtung der Pole in der Regel zu [8]. Es scheint einen Zusammenhang zwischen dem sozioökonomischen Status und der MS-Prävalenz innerhalb einer Gesellschaftsgruppe zu geben [9,10]. Außerdem scheinen ethnische Zugehörigkeiten das Risiko, an MS zu erkranken, ebenso wie den Verlauf und die Schwere der Erkrankung zu beeinflussen [11,12]. Die Migration von einem Hoch- in ein Niedrigrisikogebiet und umgekehrt beeinflusst das Erkrankungsrisiko insbesondere dann, wenn die Migration in der Kindheit und frühen Jugend stattfindet, sodass sich das Risiko des Migranten dem Risiko der dortigen Bevölkerung annähert [8,13]. Bei Migration im Erwachsenenalter ändert sich das Risiko hingegen kaum oder nicht [8,13]. In einigen Fällen wurde das Auftreten von MS als Epidemie oder Cluster beobachtet. So finden sich bspw. auf den Färöer-Inseln, in Island und auf den Orkney-

Einleitung

Inseln Hinweise auf epidemische Ausbrüche, was einen bisher unbekannten Umweltfaktor nahelegt [14].

1.1.2. Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie

Trotz vieler umfangreicher Forschungsbemühungen ist die Ätiologie der MS noch nicht eindeutig aufgeklärt. Vermutet wird eine multikausale Genese aus Genetik, Umwelteinflüssen und Lebensstil, die zu einer Dysregulation des Immunsystems führt [15].

1.1.2.1. Genetische Faktoren

Als Indiz für genetische Komponenten, die die Pathogenese der MS beeinflussen, dienen Verwandtschaftsstudien, da mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad das Erbgut ungleicher wird. Das Risiko eines monozygoten Zwillingsgeschwisters eines MS-Erkrankten, ebenfalls an MS zu erkranken, beträgt etwa 20% [15]. Unter Verwandten ersten Grades ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit generell größer als unter Verwandten zweiten Grades [16]. Die mit ca. 20% relativ moderate Konkordanzrate unter eineiigen Zwillingen legt die Vermutung nahe, dass neben genetischen Faktoren auch andere Einflüsse eine Rolle spielen [16].

Bisher sind über 200 genetische Varianten bekannt, die mit dem MS-Erkrankungsrisiko assoziiert sind [17]. Gene aus der Gruppe der humanen Leukozytenantigene (HLA) üben dabei den größten genetischen Effekt aus, was in verschiedenen Populationen weltweit bestätigt wurde [18]. Die Mehrzahl der genetischen Risikovarianten findet sich jedoch außerhalb des HLA-Systems. Das Allel HLA-DRB1*15:01 impliziert die stärkste Risikoerhöhung (*Odds Ratio*: OR) um den Faktor 4 [18], wohingegen andere Gen-Loci meist mit einer deutlich niedrigeren OR (meist zwischen 1,1 und 2,0) verbunden sind [17]. In der 2019 publizierten internationalen genomweiten Assoziationsstudie zu MS wurde die erste genetische Risikovariante in einem Geschlechtschromosom, dem X-Chromosom, gefunden [17].

1.1.2.2. Umweltfaktoren und Lebensstil

Infektionen wurden immer wieder im Zusammenhang mit MS diskutiert [19]. Im Fokus stehen meist virale Infektionen, insbesondere mit den beiden Herpesviren Epstein-Barr-Virus (EBV) [20–22] und Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) [23]. Während die Seropositivität für EBV in der Gesamtbevölkerung bei etwa 90% liegt, scheint sie bei MS-Patienten 100% zu betragen [24,25]. In einer aktuellen 20-jährigen Längsschnittstudie mit über zehn Millionen Mitarbeitern des US-Militärs wurde nach EBV-Infektion ein 32-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MS festgestellt, nur einer der 801 untersuchten MS-Patienten war seronegativ [26]. Schon vorher war bekannt, dass nach einer infektiösen Mononukleose, eine durch EBV ausgelöste Erkrankung, in der Kindheit oder Jugend die Erkrankungswahrscheinlichkeit für MS erhöht ist [27,28]. EBV wechselt im menschlichen Körper zwischen einer lytischen Phase und einer latenten Phase [29]. In der lytischen Phase vermehrt sich das Virus stark und lysiert die Wirtszelle [30]. In der latenten Phase, in der etwa 70 EBV-Gene durch Methylierung abgeschaltet sind, befindet sich EBV in einem Ruhezustand und vermehrt sich nicht [29]. EBV persistiert dabei in B-Zellen des Immunsystems und könnte das Überleben autoreaktiver B-Zellen und damit die Bildung von autoreaktiven Antikörpern (AK) bewirken [21]. HHV-6 könnte über seinen Neurotropismus oder den Befall von T-Helferzellen eine Rolle bei MS spielen [31]. Bei über 95% der Erwachsenen sind AK gegen HHV-6 nachweisbar, das heißt, sie sind seropositiv [32]. Eine Studie konnte zeigen, dass AK gegen ein HHV-6A-Protein im Serum signifikant häufiger bei MS-Patienten gefunden wurden (OR=1,55), während AK gegen das HHV-6B-Protein seltener bei MS-Patienten vorhanden waren (OR=0,74) [33]. Da Infektionen die MS-Aktivität erhöhen können und Impfungen zu einem geringeren Risiko für die jeweilige Erkrankung führen, senken Impfungen in der Regel das MS-Risiko [34,35].

Vitamin D wird im menschlichen Körper unter Einfluss von ultravioletter (UV) Strahlung gebildet. Ein geringer Vitamin D-Spiegel im Serum und auch eine geringe UV-Strahlenexposition korrelieren mit einem erhöhten Risiko, an MS zu erkranken [36,37]. Dies wird unter anderem durch einen Einfluss von Vitamin D und UV-Strahlung auf die Zytokinausschüttung sowie auf T- und B-Zellen erklärt [37,38].

Sowohl Aktiv- als auch Passivrauchen beeinflusst nicht nur die Erkrankungswahrscheinlichkeit, sondern hat dazu negative Effekte auf den Verlauf

Einleitung

der MS sowie das Ansprechen auf Medikamente [39–42]. Bei Aktivrauchern, die über zehn Jahre durchschnittlich eine Schachtel Zigaretten täglich konsumiert haben, ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit fast dreifach erhöht (OR=2,7) [39].

Ein zu hohes Körpergewicht im Jugendalter erhöht das Risiko für MS (OR ca. 2) [43]. Für weitere Umweltfaktoren, bspw. Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln oder bakterielle Infektionen, sei an dieser Stelle auf folgende Übersichtsartikel verwiesen [15,19,44,45]. Der Effekt der Umwelteinflüsse ist teilweise deutlich verstärkt, wenn ein negativer Umweltfaktor oder Lebensstil mit einem Suszeptilitätsgen kombiniert ist. So erhöht sich bspw. die OR durch das Tragen bestimmter HLA-Merkmale bei EBV-seropositiven Menschen im Vergleich zu EBV-Seronegativen ohne die entsprechenden genetischen Risikovarianten um etwa das Fünfzehnfache, ebenso wie bei Übergewichtigen im Vergleich zu Nicht-Übergewichtigen, und bei Aktivrauchern im Vergleich zu Nichtrauchern um das Vierzehnfache [44].

1.1.2.3. Histopathologische Veränderungen

MS führt zu zahlreichen Läsionen im ZNS, die mit Demyelinisierung, Axonschäden, Synapsenverlust und Gliose einhergehen [46]. Historisch gesehen wurde die MS als Erkrankung der weißen Substanz betrachtet. Nach neueren Erkenntnissen nehmen jedoch Schäden der grauen Substanz ebenfalls eine wichtige Rolle ein [46,47], wobei das Ausmaß der Schädigung auch mit kognitiven Einschränkungen korrelieren kann [48]. Neben den klassischen fokalen Plaques in der weißen Substanz, die schon in frühen Stadien erkennbar sind, kommt es insbesondere im Verlauf der Erkrankung zu einer diffusen Schädigung der sogenannten normal erscheinenden weißen Substanz und diffusen Neurodegeneration der grauen Substanz, die sich in einer Atrophie des gesamten Hirn- und Rückenmarkgewebes zeigen kann [49,50].

Eine weit verbreitete Hypothese in der Ätiologie von MS besteht darin, dass autoreaktive T- und B-Zellen in der Peripherie aktiviert werden, ins ZNS migrieren und dort reaktiviert werden [21,51]. Die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ist bei MS beeinträchtigt, sodass Immunzellen sowie nicht-zelluläre Bestandteile des Bluts einfacher ins ZNS gelangen [52,53]. Perivaskulär und in den Plaques sowie um Läsionen herum findet man hauptsächlich CD8+-T-Zellen sowie Makrophagen und

Einleitung

Mikroglia, aber auch CD4+-T-Zellen und vornehmlich perivaskulär B-Zellen und Plasmazellen [54]. In den progressiven MS-Verlaufsformen (siehe Kapitel 1.1.3.1) finden sich dagegen vermehrt Plasmazellen in den Läsionen und in der normal erscheinenden weißen Substanz [54]. Die Inflammation der Meningen mit sogenannten ektopischen B-Zell-Follikeln (siehe Kapitel 1.2) scheint für die Pathophysiologie ebenfalls bedeutend zu sein [55]. Oxidativer Stress, welcher in aktiven Läsionen und chronischen MS-Stadien besonders hoch ist, trägt entscheidend zur Läsionierung bei [46,56]. In frühen Läsionen findet noch eine hohe Rate an Remyelinisierung statt, die in chronischen Läsionen abnimmt [57]. Ältere Läsionen zeigen eine stärkere Gliose, welche nicht nur die Narbenbildung ausmacht, sondern auch die Remyelinisierung behindert [58].

1.1.2.4. Rolle des Immunsystems bei MS

Die genaue Bedeutung des Immunsystems bei der Entstehung der MS ist weiterhin in Diskussion. Hinweise für eine kausale Rolle gibt die experimentelle autoimmune (früher auch: allergische) Enzephalomyelitis (EAE), ein abstraktes Tiermodell der MS. Die EAE-Pathologie mit perivaskulären Infiltraten und Demyelinisierung ähnelt der MS [59]. Während den Tieren anfangs unspezifisch Hirngewebe injiziert worden war, entwickelten sich rasch vielfältige spezifischere Ansätze, bspw. die Injektion von für die Myelinscheiden wichtigen Proteinen, wie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), dem Proteolipid-Protein (PLP) und dem Myelin-Basischen Protein (MBP), oder der adoptive Transfer von autoreaktiven T-Zellen, die gegen diese Myelin-Antigene reagieren [59].

Eine zentrale Rolle des Immunsystems wird dadurch deutlich, dass alle für die MS zugelassenen Therapien immunsuppressiv oder immunmodulierend wirken (siehe auch Kapitel 1.1.3.3). Moderne, effektive MS-Medikamente wirken vorrangig über eine Depletion von B-Zellen, weshalb B-Zellen stark in den Fokus der MS-Forschung gerückt sind [60,61]. Als weiteres Indiz für eine zentrale Rolle des Immunsystems dient die Tatsache, dass die identifizierten Risikogene für MS meist auch in Bezug auf das Immunsystem eine Rolle spielen (siehe Kapitel 1.1.2.1.). Eine 2022 publizierte Studie konnte die führende Rolle von TH17-Zellen und B-Gedächtniszellen in der Pathogenese der MS bestätigen [62].

Einleitung

Mehrere Effekte stellen für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung mögliche Ausgangspunkte dar. Unter dem *Bystander*-Effekt versteht man die unspezifische Aktivierung von T- und B-Zellen durch proinflammatorische Stimulanzen, bspw. im Rahmen einer Infektion. Bei der molekularen Mimikry ähneln oder gleichen Antigene eines Erregers körpereigenen Strukturen des Infizierten, wodurch sich im Rahmen der Infektionsabwehr eine Autoimmunerkrankung entwickeln kann. Im Laufe einer Erkrankung kann es zum „*epitope spreading*“ kommen. Das heißt, dass das Immunsystem zunehmend neue Strukturen als Antigene erkennt und somit die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung gefördert wird [63]. Es ist allerdings nach wie vor ungeklärt, inwieweit das Immunsystem gemäß einer Autoimmunerkrankung ursächlich für die Entwicklung von MS ist [64].

1.1.3. Klinik

1.1.3.1. Symptome und Verlaufsformen

MS ist eine Krankheit mit einer Vielzahl an möglichen Symptomen („Krankheit mit tausend Gesichtern“). Dies erklärt sich dadurch, dass es je nach Lokalisationsort der Läsionen zu verschiedensten Störungen und Ausfällen in allen Systemen des ZNS kommen kann. Typische Symptome sind Störungen der Motorik und Koordination (wie Spastik, Muskelschwäche, Ataxie und Tremor), Störungen der Hirnnervenfunktionen (wie Augenbewegungsstörungen, Dysphagie, Dysarthrie), vegetative Funktionsstörungen (wie Blasen- und Darmentleerungsstörungen, Störungen der Sexualität), neuropsychologische Symptome (wie Fatigue, Depression, kognitive Defizite) sowie Schmerzen und paroxysmale Symptome einschließlich epileptischer Anfälle [65,66]. Als Frühsymptome treten häufig unter anderem Neuritis nervi optici (NNO), Paresen, Sensibilitätsstörungen, Kopfschmerzen und Fatigue auf [66,67]. Im Laufe der Erkrankung bleibt Fatigue das häufigste Symptom, hinzu kommen Spastiken sowie Blasenfunktionsstörungen [65,68].

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Verlaufsformen der MS (Abbildung 1). Grundsätzlich wird ein schubförmig remittierender Verlauf (*relapsing-remitting multiple sclerosis*: RRMS) von einem progredienten Verlauf unterschieden [69]. Als Schub werden neue oder wiederkehrende vom Patienten berichtete Symptome oder objektive typische Zeichen einer akuten inflammatorischen Demyelinisierung

Einleitung

definiert. Die Dauer muss dabei mindestens 24 Stunden betragen [70]. Ein vorangegangener Schub muss mindestens 30 Tage her sein und es darf kein Infekt oder Fieber vorliegen [70], um durch eine Infektion und eine erhöhte Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen) ausgelöste Pseudoschübe abzugrenzen [70,71]. Die RRMS kann mit oder ohne eine komplette Remission der neurologischen Behinderung verlaufen, wobei die erste klinische Erscheinung der MS als klinisch isoliertes Syndrom (*clinically isolated syndrome*: CIS) bezeichnet wird, das noch nicht die MS-Diagnose-Kriterien der zeitlichen und räumlichen Dissemination erfüllt (siehe Kapitel 1.1.3.2). Die RRMS kann in einen chronischen Verlauf mit oder ohne aufgesetzte Schübe übergehen, der dann als sekundär progrediente MS (*secondary progressive multiple sclerosis*: SPMS) bezeichnet wird. Die primär progrediente MS (*primary progressive multiple sclerosis*: PPMS) verläuft bereits direkt zu Beginn der Erkrankung nicht schubförmig [69]. Vorrübergehende Plateaus und Remissionen sind jedoch möglich [69]. Das Vorliegen von MS-typischen Läsionen im MRT ohne klinische oder anamnestische MS-typische Symptome wird radiologisch isoliertes Syndrom genannt [72].

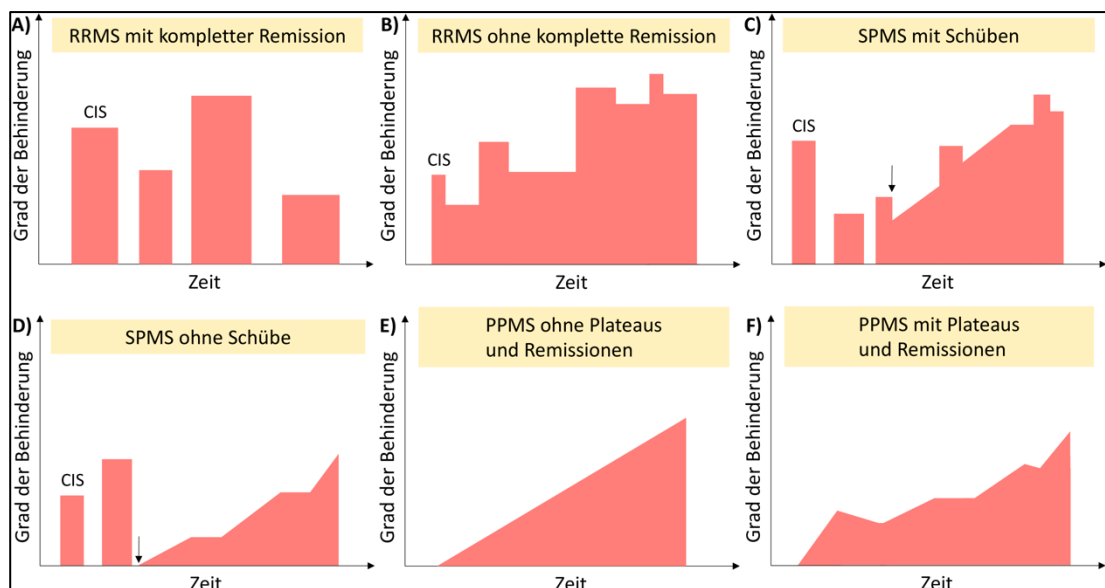


Abbildung 1: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

Die RRMS kann mit (A) oder ohne (B) vollständige Erholung von Schäden ablaufen, aber auch in eine progrediente Form (C+D) übergehen (Beginn gekennzeichnet mit schwarzem Pfeil), welche wiederum in einen Verlauf mit (C) oder ohne (D) aufgesetzte Schübe unterschieden werden kann. Der erste Schub wird als CIS definiert. Bei der PPMS (E+F) kommt es schon zu Beginn der Krankheit zu einer stetigen Verschlechterung der Symptome ohne klinische Schübe, wobei inkomplette Remissionen (F) möglich sind. Modifiziert nach [69]. CIS=klinisch isoliertes Syndrom; MS=Multiple Sklerose; PPMS=primär progrediente MS; RRMS=schubförmig remittierende MS; SPMS=sekundär progrediente MS

Nach neueren Erkenntnissen besteht auch bei der RRMS ein schleichender, schubunabhängiger Krankheitsprogress (*progression independent of relapse activity*: PIRA) [73]. Etwa 75-85% aller Patienten leiden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung an einer RRMS [5,74], von denen ohne verlaufsmodifizierende Therapie (*disease-modifying therapies*: DMT) ca. 67% im Laufe von 30 Jahren in eine SPMS übergehen [75].

1.1.3.2. Diagnosekriterien

Aufgrund der Mannigfaltigkeit an möglichen Symptomen ist die Diagnosestellung oft recht schwierig [76]. Im Jahr 2001 wurden die McDonald-Kriterien zur Diagnose der MS eingeführt, welche 2005, 2010 und 2017 überarbeitet wurden [77–80]. Sie beziehen sich auf die klinische Präsentation der Patienten unter Einbeziehung erforderlicher und zusätzlicher Diagnostik in Form von positiven Magnetresonanztomographie (MRT)-Befunden und dem Labornachweis von oligoklonalen Banden (*oligoclonal bands*: OCB) im Liquor cerebrospinalis (*cerebrospinal fluid*: CSF) [80–82]. Die aktuellen McDonald-Kriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Die Testung auf OCB erfolgt, indem die Proteine jeweils einer Serum- und einer CSF-Probe eines Patienten durch isoelektrische Fokussierung in Banden aufgespaltet werden. Wenn es Banden gibt, die nur in der CSF auftreten, spricht dies für eine intrathekale AK-Synthese. Mittels MRT lassen sich akute und alte MS-Läsionen im ZNS darstellen. Die MRT spielt daher eine zentrale Rolle in der MS-Diagnostik [83] und führte zu einer schnelleren Diagnosestellung [84]. Auch asymptomatische Läsionen gelten, um die Kriterien für räumliche (mehrere T2-Läsionen) und zeitliche (akute plus ältere T2-Läsionen oder neue T2-Läsionen in Verlaufs-MRTs) Dissemination zu erfüllen [80]. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die meisten Läsionen ohne entsprechende klinische Präsentation ablaufen, was man als klinisch-radiologisches Paradox bezeichnet [85]. Ein RIS geht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer MS einher [72]. Visuell evozierte Potentiale (VEP) wurden aus den McDonald-Kriterien gestrichen, da sie nicht mit einer verbesserten diagnostischen Sensitivität und Spezifität der McDonald-Kriterien einhergingen [80]. Sie sind jedoch weiterhin ein wichtiger Bestandteil zur Detektion einer NNO, einem Frühzeichen der MS [86].

Einleitung

Eine MS kann nach den McDonald-Kriterien auch allein anhand der Klinik diagnostiziert werden. Sobald die Kriterien erfüllt sind und es keine bessere Erklärung für die Klinik gibt, darf die Diagnose MS gestellt werden. Falls während der Diagnosefeststellung eine andere Krankheit erkannt wird, welche die Klinik besser erklärt, ist die Diagnose „keine MS“ zu stellen [80]. Aufgrund der hohen Fehldiagnoserate bei MS (bis zu 30-67%) ist die Beachtung differentialdiagnostischer Warnzeichen essentiell [87,88].

Tabelle 1: McDonald-Kriterien zur Diagnose der Multiplen Sklerose von 2017 [80]

Klinische Präsentation	Zusätzliche erforderliche Befunde
≥ 2 Schübe + objektive klinische Evidenz für ≥ 2 Läsionen	Nicht erforderlich
≥ 2 Schübe + objektive klinische Evidenz für ≥ 1 Läsion (+ 1 Schub in der Anamnese, der auf eine andere anatomische Lokalisation zurückzuführen ist)	Nicht erforderlich
≥ 2 Schübe + objektive klinische Evidenz für 1 Läsion	Räumliche Dissemination: MRT (≥ 2 T2-Läsion in verschiedenen MS-typischen Läsionsorten*) <i>oder</i> Schub, welcher einen neuen Läsionsort impliziert
1 Schub + objektive klinische Evidenz für 2 Läsionen	Zeitliche Dissemination: MRT (gleichzeitige Präsenz von Gadolinium anreichernden und nichtanreichernden Läsionen <i>oder</i> neue T2-Läsion im Verlauf) <i>oder</i> Zweiter Schub <i>oder</i> Oligoklonale Banden im Liquor cerebrospinalis
1 Schub + objektive klinische Evidenz für 1 Läsion (klinisch isoliertes Syndrom)	Räumliche und zeitliche Dissemination (wie oben definiert)
Schleichende neurologische Progression, Verdacht auf PPMS	Behinderungsprogress über 1 Jahr (prospektiv oder retrospektiv bestimmt) + 2 von 3 der folgenden Kriterien: Räumliche Dissemination MRT Gehirn (≥ 1 typische* T2-Läsion) <i>oder</i> Räumliche Dissemination MRT Rückenmark (≥ 2 T2-Läsionen) <i>oder</i> Oligoklonale Banden im Liquor cerebrospinalis

*cerebral (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell), spinal

Die gebräuchlichste Skala zur Quantifizierung neurologischer Defizite ist aktuell die *Expanded Disability Status Scale* (EDSS, übersetzt: erweiterte Behinderungsstatus-Skala), welche den Schweregrad der Behinderung angibt [89,90]. Sie basiert auf der

Einleitung

Beurteilung von acht Funktionssystemen (Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorik, Blasen- und Mastdarmfunktion, Sehfunktion und Sonstiges), deren einzelne Scores am Ende eine Gesamtbewertung ergeben, wobei bei höheren EDSS-Werten insbesondere die Gehfähigkeit beurteilt wird. Der Beginn der Skala liegt bei 0,0 und das Ende bei 10,0, wobei 0,0 eine normale neurologische Untersuchung und 10,0 den Tod durch MS angibt [90]. Daneben gibt es noch zahlreiche weitere Skalen wie den *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) [91].

1.1.3.3. Therapie

Da die MS bis heute nicht heilbar ist, besteht das Ziel der Behandlung in der Schubratenreduktion bzw. einer verringerten Krankheitsprogression, der Vermeidung neuer Läsionen sowie in der Linderung bestehender Symptome und dem Erhalt der Lebensqualität. Die Immuntherapie der MS umfasst die verlaufsmodifizierende Dauertherapie und die akute Schubtherapie. Hinzu kommen symptomatische Therapien, Psychotherapie und sozialmedizinische Unterstützung [66,92].

Als Standardtherapie des akuten Schubes gilt die Behandlung mit Glukokortikosteroiden (GKS) (meist 500-1000 mg Methylprednisolon pro Tag über 3-5 Tage) [93]. Bei einem therapierefraktären Schub wird die GKS-Therapie in höherer Dosis wiederholt (bis 2000 mg Methylprednisolon pro Tag über 3-5 Tage) [93]. In der Regel dient bei deren Versagen die Plasmapherese als mögliche Therapieoption [93–95]. Die Immunadsorption scheint eine gute Alternative zur Plasmapherese zu sein [93,96,97].

Die Therapie mit DMT ist mittlerweile durch die zahlreichen zugelassenen Präparate vielfältiger als noch vor einigen Jahren und wird ständig erweitert [64,93,98,99]. DMT wirken über die Depletion von Lymphozyten (z. B. Alemtuzumab und Ocrelizumab), die Beeinflussung der Migration von Lymphozyten (z. B. Fingolimod und Natalizumab) oder die Immunmodulation mit zum Teil unvollständig geklärtem Wirkmechanismus (z. B. Interferon- β (IFN- β) und Dimethylfumarat) [64,100]. Die meisten Präparate stehen nur zur RRMS-Therapie zur Verfügung [93,99]. Patienten mit CIS können sowohl mit IFN- β als auch mit Glatirameracetat behandelt werden [93]. Zur verlaufsmodifizierenden Therapie der SPMS können IFN- β , Ocrelizumab, Ofatumumab, Rituximab (*off-label use*), Cladribin, Siponimod und Ponesimod genutzt

Einleitung

werden [93,99]. Für Patienten mit PPMS stehen mittlerweile zumindest die CD20-Antikörper Ocrelizumab sowie *off-label* Rituximab und Ofatumumab als (Leitlinien-) Therapie zur Verfügung [93,99].

Die Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe kommt in ihrem Leitlinien-Kommentar [101] und im eigenen Positionspapier [99] zur Therapie der MS teils zu anderen Schlüssen als die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) [93] und empfiehlt bspw. nicht den Ansatz einer eskalativen verlaufsmodifizierenden Therapie, sondern befürwortet die Möglichkeit, mit einer hochaktiven Therapie zu starten.

Eine weitere, weitestgehend experimentelle Behandlungsoption stellt eine autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation dar, die in den Studien oft mit einem langen bis dauerhaften Stopp der Progression einhergeht, jedoch auch mit großen Risiken verbunden ist [93,98,99,102]. B-Zell-Depletion mittels autologer T-Zellen, die chimäre Antigenrezeptoren exprimieren (CAR-T-Zell-Therapie), sind ein aktuelles Forschungsfeld zur Behandlung neuroimmunologischer Erkrankungen wie MS [103–105].

Aufgrund der bisher fehlenden Heilungschancen sind symptomatische Therapien für viele MS-Erkrankte essentiell. Einen wichtigen Baustein bilden hierbei nicht-medikamentöse Therapien wie Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie, Rehabilitationsbehandlungen, psychologische Komponenten wie Bewältigungsstrategien (*Coping*) und sozialmedizinische Unterstützung [93]. Die Anzahl eingesetzter symptomatischer Medikamente ist aufgrund der Mannigfaltigkeit an MS-Symptomen riesig. Unter anderem werden Antispastika (Baclofen, Tizanidin), Fampridin zur Verbesserung einer Gangstörung, Antidepressiva (vor allem selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren) und seit wenigen Jahren Cannabinoide gegen zahlreiche Symptome wie Spastik, Schmerzen, Schlafstörung und Dranginkontinenz eingesetzt [93,106].

1.1.3.4. Prognose

Von großem Interesse für den Patienten ist die Prognose seines individuellen Krankheitsverlaufs. Insgesamt ist die individuelle Prognoseabschätzung eines MS-Patienten noch sehr schwierig [1]. Deshalb ist ein wichtiges Feld die Forschung zu

Einleitung

molekularen Biomarkern (siehe Kapitel 1.3.1). Zur Abschätzung dienen prognostisch günstige und prognostisch ungünstige Kriterien, von denen eine Auswahl in Tabelle 2 dargestellt wird. Für weitere Informationen sei auf folgende (Übersichts-)Arbeiten verwiesen [107–110]. Der Nachweis von OCB oder oligoklonalen IgM-Banden in der CSF sowie erhöhte Konzentrationen der leichten Kette des Neurofilaments (*Neurofilament light chain*: NFL) und *chitinase 3-like-1* während eines CIS gehen mit einem erhöhten Risiko einher, eine MS zu entwickeln [82].

Tabelle 2: Prognosefaktoren bei MS

Prognostisch ungünstig	Prognostisch günstig
Männliches Geschlecht	Weibliches Geschlecht
Hohes Alter	Niedriges Alter
Rauchen	
Progressiver Beginn	Schubförmiger Beginn
Multifokaler Beginn	Monofokaler Beginn
Beginn mit pyramidalen oder zerebellären Symptomen	Beginn mit Neuritis nervi optici
Hohe Schubfrequenz in den ersten Jahren	
Unvollständige Erholung nach einem Schub in den ersten Jahren	
Hoher EDSS-Wert bei Diagnosestellung	
Hohe Läsionslast im MRT	
Infratentorielle und spinale Läsionen	
Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor cerebrospinalis	
Hohe Konzentration der leichten Kette des Neurofilaments	
Hohe Antikörperkonzentration im Liquor cerebrospinalis	
Hoher Index der freien Leichtketten Typ Kappa im Liquor cerebrospinalis	

1.2. B-Zellen, Antikörper und Epitope

Das Immunsystem kann grob unterteilt werden in eine angeborene, unspezifische Komponente und eine erworbene, spezifische, adaptive Komponente, wobei beide Teile nicht unabhängig agieren, sondern ineinandergreifen. Zu dem unspezifischen Immunsystem, welches oft schneller reagiert, gehören phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen sowie eine unspezifische humorale Säule der Immunantwort, das Komplementsystem. B-Zellen und T-Zellen sind zelluläre Bestandteile des spezifischen Immunsystems. Ihre Aufgabe besteht darin, Krankheitserreger, infizierte Wirtszellen und Tumorzellen zu erkennen und zu

Einleitung

beseitigen. Hierfür stehen ihnen verschiedene Mittel zur Verfügung. Eine sehr effektive Maßnahme ist die Bildung von AK, welche auch Immunglobuline (Ig) genannt werden [111,112]. Ein humaner AK besteht aus zwei antigenbindenden Fab-Fragmenten und einem Fc-Fragment (Abbildung 2), an das z. B. Proteine des Komplementsystems oder eine phagozytierende Zelle binden kann.

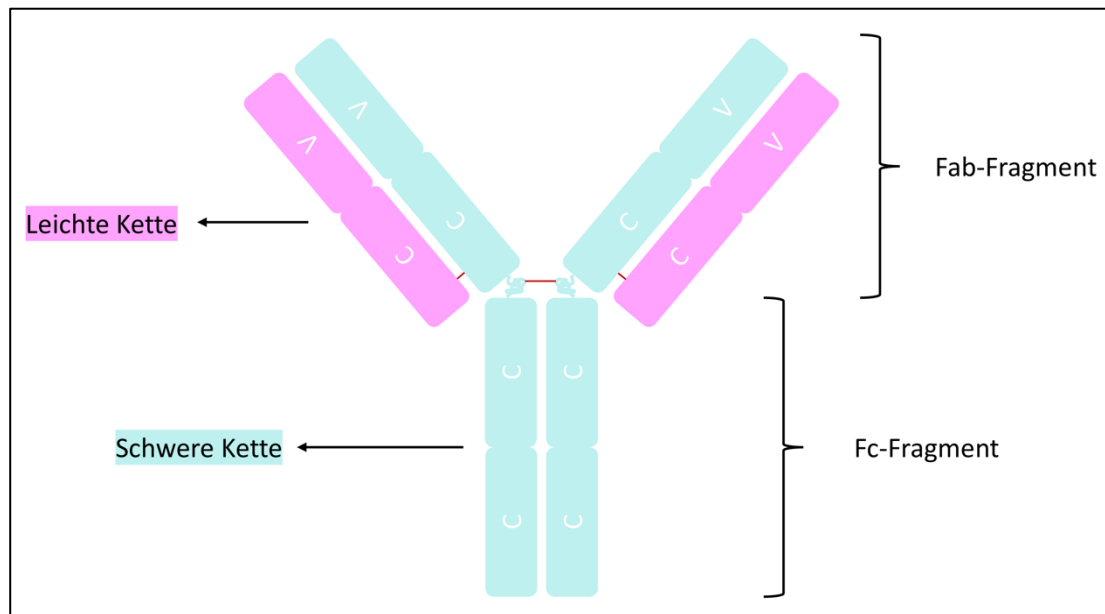


Abbildung 2: Struktur eines humanen Antikörpers

Ein menschlicher Antikörper setzt sich aus je zwei identischen leichten Ketten (magenta) und zwei identischen schweren Ketten (türkis) zusammen, die durch Disulfid-Brücken (dünne rote Linien) verbunden sind. Die leichten Ketten wiederum bestehen aus einer konstanten Domäne (C) und einer variablen Domäne (V), die schweren Ketten aus je nach Antikörperklasse drei bzw. vier konstanten Domänen und einer variablen Domäne. Die leichten Ketten bilden zusammen mit den oberhalb der Scharnierregion (türkise Linie) gelegenen Abschnitten der schweren Ketten die beiden Fab-Fragmente. Die Anteile der schweren Ketten unterhalb der Scharnierregion werden als Fc-Fragment bezeichnet. Die variablen Domänen einer leichten Kette und einer schweren Kette bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle, Paratop genannt.

Die Entwicklung der B-Zellen beginnt im Knochenmark (primäres lymphatisches Gewebe) aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese differenzieren sich über Pro-B-Zellen und Prä-B-Zellen, welche beide noch keine reifen AK als B-Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen, zu unreifen B-Zellen. Diese präsentieren IgM auf ihrer Oberfläche. Nach Selektion zur Selbsttoleranz entwickeln sich die unreifen B-Zellen zu reifen, naiven B-Zellen mit zusätzlicher IgD-Präsentation. Die naive B-Zelle verlässt das Knochenmark und wandert in die B-Zellzone (entspricht B-

Einleitung

Zellfollikel) peripherer Lymphorgane wie Milz oder Lymphknoten (sekundäre lymphatische Gewebe), wo sie aktiviert werden kann [113].

Erkennt eine phagozytierende Zelle, z. B. eine dendritische Zelle, ein Antigen, kann dieses phagozytiert werden. Als Antigen ist eine Struktur definiert, an die AK oder Lymphozytenrezeptoren binden können. Antigene können aus Peptiden, Lipiden, Kohlenhydraten oder anderen komplexen Molekülen bestehen. Die phagozytierende Zelle präsentiert einen Teil des phagozytierten Antigens über MHC (*major histocompatibility complex*; übersetzt: Haupthistokompatibilitätskomplex)-II-Moleküle, welche ein wichtiger Bestandteil des HLA-Systems sind, an ihrer Oberfläche. Eine T-Helferzelle mit dem passenden Rezeptor kann nun in der T-Zellzone sekundärer lymphatischer Organe spezifisch die präsentierte Aminosäuresequenz erkennen. Durch zusätzliche Interaktionen co-stimulatorischer Moleküle beider Zellen kommt es zur Aktivierung und Proliferation der T-Helferzelle. Die B-Zelle benötigt zur Aktivierung im Gegensatz zur T-Helferzelle keine Antigen-Präsentation über MHC-Moleküle, sondern ist selbst zur Phagozytose fähig und wird durch diese aktiviert. Die aktivierte B-Zelle verlässt die B-Zellzone des lymphatischen Organs und tritt mit der T-Helferzelle, die das gleiche Antigen erkannt und sich der B-Zellzone genähert hat, in Kontakt. Die beiden Zelltypen interagieren und es kommt zur Ausbildung von kurzlebigen Plasmazellen und deren AK-Antwort mit Bildung von IgM. Einige B-Zellen kehren zurück in die B-Zellzone und bilden dort den Primärfollikel, in dem die Keimzentrumsreaktion stattfindet [112]. Die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung ist in Abbildung 3 dargestellt. B-Zell-Follikel können in entzündetem Gewebe auch außerhalb von klassischem lymphatischem Gewebe vorkommen [113]. So lassen sich solche ektopischen B-Zell-Follikel in den Meningen von MS-Patienten feststellen [55]. Im Keimzentrum der Follikel verdoppelt sich die Anzahl an B-Zellen innerhalb von wenigen Stunden, wobei sich insbesondere die Zellen vermehren, die eine höhere Affinität zum Antigen aufweisen. Im Laufe der Keimzentrumsreaktion kommt es auch zur Ausbildung weiterer AK-Klassen, wobei IgG der häufigste AK-Typ des Menschen ist, auf Schleimhäuten findet sich vornehmlich IgA. Die B-Zellen können sich zu Plasmablasten entwickeln, die dann zurück ins Knochenmark zirkulieren und sich dort zu langlebigen Plasmazellen differenzieren, welche dann mehrere Jahre lang antigenunabhängig AK sezernieren.

Einleitung

Geschätzt soll ungefähr die Hälfte aller AK im Blut von Menschen von solchen langlebigen Plasmazellen stammen [112].

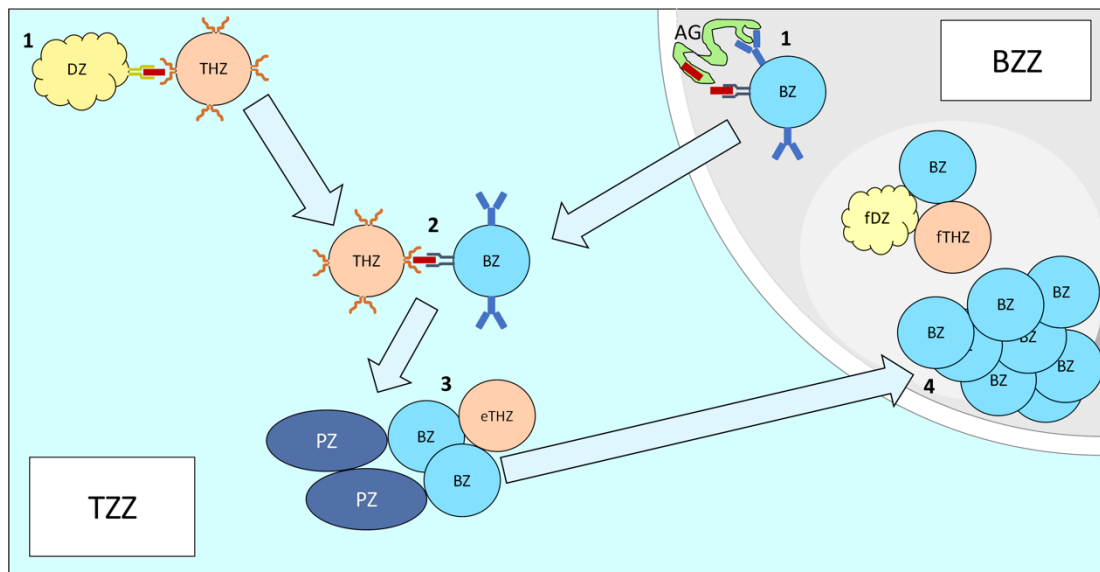


Abbildung 3: B-Zell-Aktivierung in sekundären lymphatischen Organen

1) Die THZ wird durch eine DZ aktiviert. Die BZ phagozytiert ein AG. 2) Die aktivierten Zellen interagieren, was zur Proliferation von BZ führt. 3) Durch andauernde Stimulation entwickeln sich kurzlebige PZ sowie fTHZ. 4) Schließlich kommt es zur Keimzentrumsreaktion mit der Entwicklung von hochaffinen langlebigen PZ sowie B-Gedächtniszellen. AG=Antigen; BZ=B-Zelle; BZZ=B-Zell-Zone; DZ=dendritische Zelle; eTHZ=extrafollikuläre THZ; fDZ=follikuläre DZ; fTHZ=follikuläre THZ; PZ=Plasmazelle; THZ=T-Helfer-Zelle; TZZ=T-Zell-Zone. Adaptiert nach [112].

Die Region eines Antigens, an die ein AK bindet, wird Epitop genannt. Diese bestehen bei Peptiden aus etwa sechs bis neun Aminosäuren [112,114]. Man kann grundsätzlich verschiedene Arten von Epitopen unterscheiden, die in Abbildung 4 illustriert werden. Proteine bilden in ihrem natürlichen Zustand *in vivo* dreidimensionale Sekundär- (wie α -Helix und β -Schleife), Tertiär- und Quartärstrukturen aus. Wird ein Epitop auf einem Protein nur durch diesen natürlich gefalteten Zustand gebildet, spricht man von einem Konformationsepitop. Wird ein Epitop jedoch von einem AK allein aufgrund seiner Primärstruktur, also seiner Aminosäuresequenz, erkannt, nennt man es lineares Epitop. Durch Denaturierung von Proteinen können auch zuvor verborgene lineare Epitope zugänglich werden. Durch Proteolyse, Ubiquitinierung oder andere chemische Modifikationen können neue Epitope entstehen, welche man als Neoepitope bezeichnet [112]. Aufgrund der Länge der verwendeten Peptide werden in Microarrayexperimenten vornehmlich lineare Epitope erkannt. Mimotope sind kurze

Einleitung

Peptide, die natürliche B-Zell-Epitope strukturell imitieren [115]. Dabei werden zufällige Peptide aus großen Molekülbibliotheken z. B. auf Bakteriophagen präsentiert und durch AK-Bindung diejenigen Peptide selektiert, die ein natürliches Epitop nachahmen.

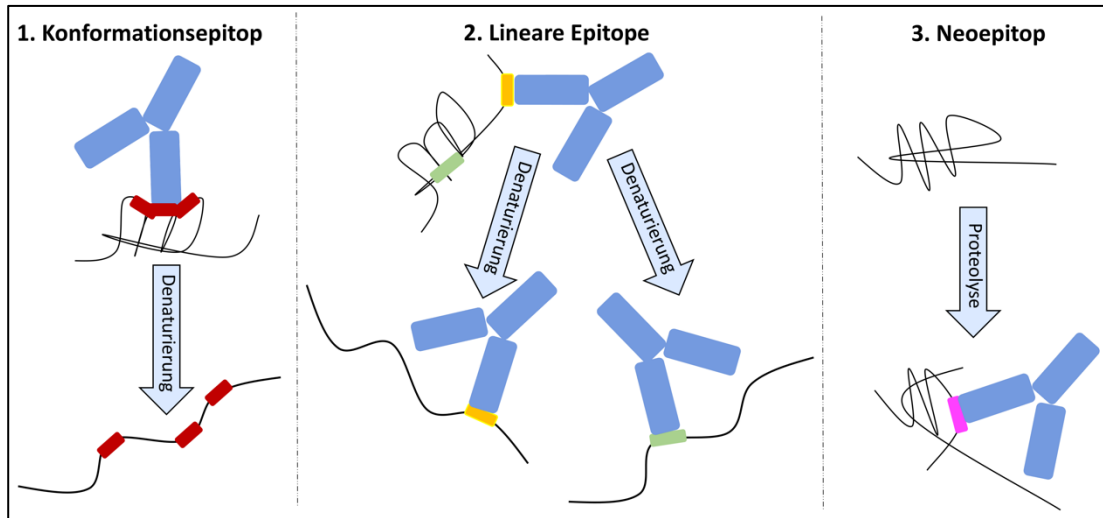


Abbildung 4: Verschiedene Epitopvarianten

Die Epitope (rot, gelb, grün und magenta) sind auf den Proteinen (schwarze Linien), dargestellt als Aminosäurekette, markiert. Antikörper (blaue Rechtecke) sind als Y-Form visualisiert. 1. Das Epitop existiert nur in der natürlichen Protein-Konformation. 2. Während das ursprünglich zugängliche lineare Epitop (gelb) erhalten bleibt, wird das andere Epitop (grün) erst durch Denaturierung freigelegt. Vornehmlich lineare Epitope werden bei Peptid-Microarrayexperimenten erkannt. 3. Durch Proteolyse oder andere Modifikationen kann ein neues Epitop, Neoepitop genannt, entstehen. Adaptiert nach [112].

1.3. Messung von Antikörperreaktivitäten

1.3.1. Antikörper als molekulare Biomarker bei MS

Aufgrund der Vielfältigkeit der Symptome, Verlaufsformen und Therapiemöglichkeiten der MS werden Parameter zur genaueren, individuelleren und frühzeitigen Diagnostik sowie Prognose und Verlaufsbeurteilung benötigt. Hierfür eignen sich Biomarker als objektiv messbare und beurteilbare Indikatoren eines physiologischen oder pathologischen Vorganges oder einer therapeutischen Intervention. Sie können unter anderem für die Einschätzung der Krankheitsschwere und -prognose, Therapieauswahl sowie Therapieüberwachung verwendet werden [116]. Biomarker können Untersuchungsergebnisse bildgebender Verfahren wie MRT oder Befunde von Laboranalysen biologischer Materialien wie CSF, Blut und Urin sein. In den biologischen Materialien werden bspw. zelluläre oder molekulare Bestandteile untersucht [82,117]. Die Spezifität eines diagnostischen Tests gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Gesunde auch tatsächlich als solche durch den Test ausgewiesen werden. Die Sensitivität hingegen gibt die Prozentzahl an, mit welcher der Test Erkrankte als solche identifiziert.

Während regelmäßige MRT-Untersuchungen kosten- und zeitintensiv sind, sind Urin- und Blutproben schnell und einfach zu gewinnen. Ein wichtiges Feld der aktuellen Forschung zur Risikoabschätzung, an MS zu erkranken, bilden bspw. genetische Polymorphismen, deren Erforschung helfen soll, die Entstehung von MS besser zu verstehen [118]. Die Gruppe der diagnostischen molekularen Biomarker im Sinne von AK-Reaktivitäten ist von großer Bedeutung für die frühzeitige Differentialdiagnostik [88,117]. Hierzu zählen die OCB, welche bei 90-95% der MS-Patienten positiv, aber nicht spezifisch für MS sind [82,117]. Außerdem weisen OCB auf ein um mehr als doppelt so hohes Risiko hin, nach einem CIS in eine MS zu konvertieren [82]. Auch der IgG-Index, welcher auf eine intrathekale AK-Synthese hinweist, und der Nachweis von AK gegen Masern, Röteln und Zoster, genannt MRZ-Reaktion, in der CSF gehören zu den etablierten, die MS-Diagnostik unterstützenden Biomarkern [117]. Ein wichtiger Bestandteil der Differentialdiagnostik sind Auto-AK gegen den körpereigenen Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4), die bei etwa 80% der Patienten mit einer Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung (*Neuromyelitis optica spectrum disorder*: NMOSD) vorkommen [119] und für die Abgrenzung zur MS eine Spezifität von bis zu 100% erreichen [120]. AK gegen MOG werden zur

Differentialdiagnostik gegenüber MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen (MOGAD) genutzt [121]. Vielversprechende Biomarker aus der aktuellen Forschung sind AK gegen nukleäre EBV-Antigene (EBNA), die sich für die MS-Diagnostik, Krankheitsaktivität und Bestimmung des Erkrankungsrisikos eignen könnten [21,117,122]. So ist das MS-Erkrankungsrisiko 16-fach erhöht, wenn eine Person das genetische Merkmal HLA-DRB1*15, jedoch nicht das genetische Merkmal HLA-A*02, besitzt und gleichzeitig ein bestimmter Anti-EBV-AK vorhanden ist [123].

Im klinischen Alltag gibt es momentan keine etablierten molekularen Biomarker zur Bestimmung der Krankheitsaktivität. Prinzipiell geeignet könnten AK gegen Myelinbestandteile als Indikator einer ablaufenden Demyelinisierung sein. Hierzu zählen bspw. Auto-AK gegen MBP, wobei sie nicht spezifisch für MS, sondern auch bei anderen ZNS-Schädigungen zu finden sind [117]. Zunehmend wird auch die Rolle der NFL-Konzentration in der Bestimmung der Krankheitsaktivität und Prognose diskutiert [124–126].

Therapierelevante Biomarker sind neutralisierende AK gegen Natalizumab und IFN- β sowie AK gegen das JC-Virus und das Varizella-Zoster-Virus [117]. Darüber hinaus wurden zahlreiche weitere potentielle Biomarker postuliert, deren Praxisrelevanz aber bisher noch nicht in unabhängigen Studien validiert wurde [117]. Auf die einzelnen Autoantigene (bspw. oligodendrozytär MOG und MBP oder astrozytär AQP4) wird in Kapitel 5.2 näher eingegangen. Zur Messung von AK-Reaktionen gibt es zahlreiche Verfahren, von denen in den nächsten Kapiteln die zwei in dieser Arbeit verwendeten Verfahren vorgestellt werden.

1.3.2. Nachweis mit ELISA

Als *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bezeichnet man eine AK-basierte analytische Methode zum Nachweis verschiedener Antigene, bei der ein mit einem Enzym gekoppelter AK an das relevante Antigen bindet und es zu einer Farbreaktion kommt.

Beim direkten ELISA bindet der spezifische, enzymgekoppelte AK direkt an das auf einer Oberfläche fixierte Antigen. Hingegen wird beim indirekten ELISA zunächst ein Gemisch polyklonaler AK, welche auch primäre AK genannt werden und z. B. aus Speichel-, Serum- oder CSF-Proben stammen, zum fixierten Antigen hinzugegeben.

Einleitung

Erst im nächsten Schritt binden spezifische, enzymgekoppelte sekundäre AK an die primären AK. Da ein primärer AK von mehreren sekundären AK gebunden werden kann, kommt es hierdurch auch zu einer Signalverstärkung. Für den Nachweis der AK-Bildung wird ein Substrat hinzugegeben, welches von dem gekoppelten Enzym in einer Farbreaktion umgesetzt wird. Zwischen den einzelnen Schritten müssen die nicht gebundenen AK mittels einer Spüllösung entfernt werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Um das Antigen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nachzuweisen, kann die optische Dichte nach einer festgelegten Zeit mit einem Photometer gemessen werden. Das Prinzip eines indirekten ELISA ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

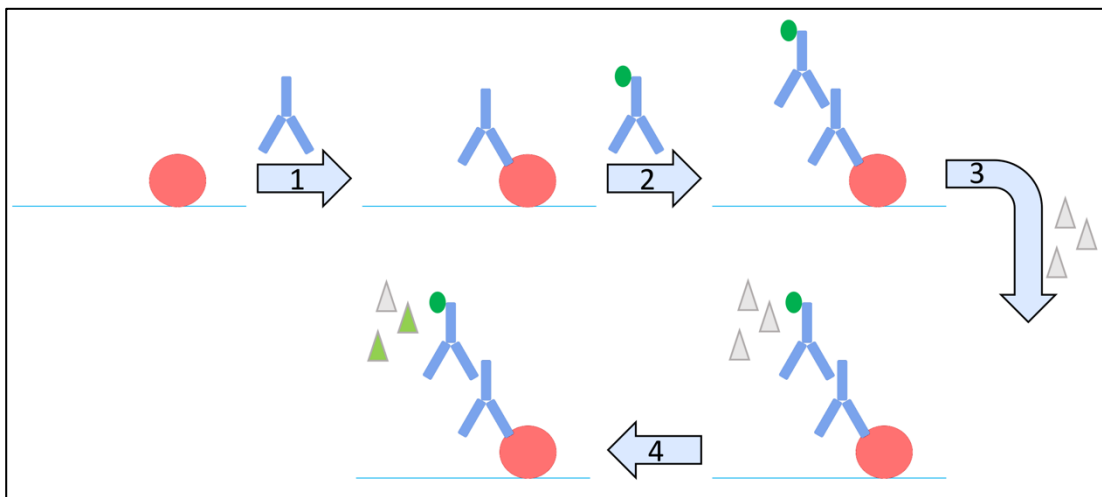


Abbildung 5: Prinzip eines indirekten ELISA

Zu einem an einer Oberfläche fixierten Antigen (roter Kreis) wird ein primärer Antikörper aus einem Gemisch polyklonaler Antikörper, z. B. Serum oder Liquor cerebrospinalis, hinzugegeben (1). Folgend wird ein sekundärer Antikörper (2) hinzugegeben. Antikörper sind als Y-Form visualisiert (zusammengesetzt aus blauen Rechtecken). Das Substrat (graue Dreiecke) (3) wird von einem am sekundären Antikörper gekoppelten Enzym (grünes Oval) umgesetzt, was zu einem Farbumschlag führt (4).

1.3.3. Peptid-Microarrays

Mit Microarrays, auch Biochips genannt, lassen sich tausende Merkmale auf kleinster Fläche zeitgleich untersuchen, weshalb sie zu den Hochdurchsatztechnologien zählen. Als Zielstruktur dienen bspw. Sequenzen von Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder Proteinen bzw. Peptiden. DNS-Microarrays werden vorwiegend für Genom- und Genexpressionsanalysen verwendet [127]. Protein- und Peptid-Microarrays eignen

Einleitung

sich hingegen insbesondere zur Analyse von AK-Reaktivitäten gegen Proteine und Peptide und damit zur Identifikation von Antigenen bzw. Epitopen und zur Bestimmung von individuellen AK-Profilen. Aufgrund der Möglichkeit, tausende potentielle Autoantigene gleichzeitig untersuchen zu können, wurde das Verfahren für diese Arbeit ausgewählt.

Im ersten Schritt zur Herstellung von Peptid-Microarrays wird eine Oberfläche, bspw. ein Objektträger, chemisch so modifiziert, dass funktionelle Gruppen entstehen. Diese werden benötigt, um die Peptide chemoselektiv kovalent zu binden und somit zu immobilisieren. Es gibt verschiedene Arten, die Peptide herzustellen. Sie können direkt auf dem Array synthetisiert werden, was als *In-situ*-Synthese bezeichnet wird, oder in einem vorherigen Schritt synthetisiert und dann im Ganzen bspw. durch Roboter auf die Oberfläche transferiert werden. Der Vorgang des Peptidaufbringens auf die Oberfläche wird als *Spotting* oder Spotten bezeichnet. Die Methode der externen Peptidsynthese hat den Vorteil, dass die Peptide konventionell in großer Anzahl hergestellt werden können und somit kostengünstiger sind [128]. Hochdichte Peptid-Microarrays können tausende Peptide pro Array tragen. Bei ultrahochdichten Arrays sind sogar hunderttausende Peptide möglich [129]. In einem sogenannten *Spot* befindet sich eine Vielzahl gleichartiger Peptide. Im nächsten Schritt wird ein Gemisch polyklonaler AK, wie bspw. Speichel, Serum oder CSF erkrankter Personen, auf den Microarray gebracht und inkubiert. Diese AK werden analog zum ELISA primäre AK genannt. Der Nachweis der AK-Bindung erfolgt durch Zugabe eines markierten sekundären AK. Meistens werden hierfür fluoreszenzmarkierte AK benutzt (siehe Abbildung 6). Nach Gabe der primären und sekundären AK muss jeweils nach einer bestimmten Inkubationszeit mit einer Pufferlösung gespült werden. Das Fluoreszenzsignal des markierten sekundären AK kann mit einem Scanner ausgelesen werden, um die Signalstärke zu bestimmen. Die Stärke des Signals hängt von der Konzentration der primären AK und deren Affinität zum Peptid ab. Wird ein Peptid nicht von AK gebunden, entsteht kein spezifisches Signal.

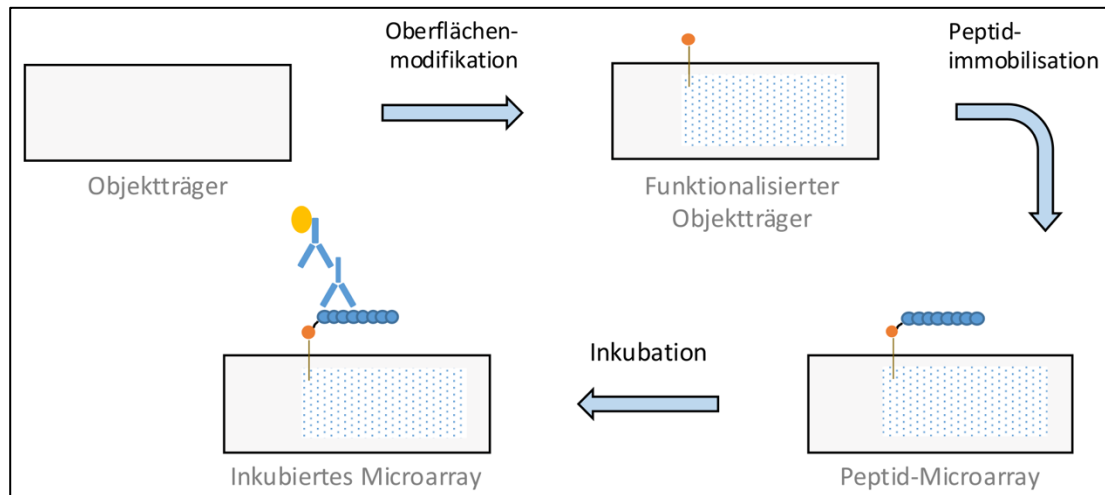


Abbildung 6: Herstellung und Prinzip von Peptid-Microarrays

Im ersten Schritt erfolgt eine chemische Oberflächenmodifizierung des Objekträgers zur Erzeugung spezifischer funktioneller Gruppen. Beispielhaft ist dies nur für einen Spot dargestellt. Die zugegebenen Peptide werden dann chemoselektiv kovalent immobilisiert. Über einen hydrophilen Linker zur Vermeidung sterischer Störungen werden die Peptide an die Glasoberfläche gebunden. Nach der Inkubation mit primären Antikörpern aus einem Gemisch polyklonaler Antikörper, z. B. Serum oder Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Multipler Sklerose, erfolgt die Detektion, hier über einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper.

In den bisherigen Kapiteln wurden die bekannten Daten über die Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik der MS dargelegt. Es wurde eine Übersicht über den aktuellen Wissensstand zu molekularen Biomarkern bei MS geliefert, welche einen wichtigen Beitrag für die Diagnostik, Prognose und Therapie der MS leisten könnten. Obwohl bisher viele potentielle Autoantigene untersucht und postuliert wurden, konnten bisher keine spezifischen Auto-AK zur Abgrenzung einer MS von anderen ZNS-Erkrankungen oder gar gesunden Probanden sicher nachgewiesen werden [122]. Solche zur Diagnosefindung etablierten molekularen Biomarker existieren bspw. bei der klinisch MS-verwandten NMOSD (Anti-AQP4-AK) [130]. Die vorliegende Studie war die erste Arbeit, in der hochdichte Peptid-Microarrays zum AK-Screening verwendet wurden. Hierdurch konnten AK-Reaktivitäten gegen fast 4000 Peptide gleichzeitig untersucht werden, um MS-spezifische lineare Epitope zu finden. Paarige Serum- und CSF-Proben von MS-Patienten wurden verwendet, um eine mögliche intrathekale Immunreaktion von einer peripheren Immunreaktion unterscheiden zu können. In den folgenden Kapiteln werden die Fragestellungen dieser Arbeit benannt, die verwendeten Methoden zur Analyse von Antigen-AK-Reaktionen erläutert, die Ergebnisse der bioinformatischen Datenauswertung präsentiert und schließlich die potentielle Bedeutung ausgewählter Epitope diskutiert.

2. Fragestellungen

Das Immunsystem ist in der Pathophysiologie der MS von zentraler Bedeutung. Es mehren sich Hinweise darauf, dass den AK-produzierenden B-Zellen eine entscheidende Rolle zukommt. Virale Infektionen, insbesondere mit EBV, wurden immer wieder in Zusammenhang mit der Entstehung von MS gebracht. Verschiedene hirneigene Strukturen wurden als Angriffsziele von Auto-AK bei MS postuliert, wobei jedoch keine Auto-AK gegen ein bestimmtes Antigen sicher etabliert werden konnten. Die bisherigen Studien konzentrierten sich meist auf nur wenige Antigene. Insbesondere gab es bis dato keine Studie, die AK-Reaktivitäten gegen eine größere Anzahl an Antigenen parallel in CSF und Serum geprüft hat. In dieser Arbeit wurden unter Verwendung paarweiser Serum- und CSF-Proben von RRMS-, PPMS- und Kontrollpatienten etwa 4000 Peptide potentieller Antigene gleichzeitig analysiert. Dabei wurden unter anderem folgende Fragen untersucht:

- Wie unterscheiden sich die AK-Profile von MS-Patienten und von Kontrollpatienten?
- Welche Unterschiede gibt es in den AK-Profilen von RRMS- und PPMS-Patienten?
- Wie unterscheiden sich die individuellen IgG-Signaturen der Patienten im Allgemeinen?
- Für welche zuvor als mögliche MS-Autoantigene beschriebene Proteine finden sich lineare Epitope, die häufiger durch IgG von MS-Patienten als durch IgG von Kontrollpatienten gebunden werden?
- Gibt es Peptide, die von IgG aller Proben gebunden werden?
- Lassen sich MS-spezifische Epitope von Antigenen durch überlappende Peptidsequenzen näher eingrenzen?
- Wo liegen die als MS-spezifisch identifizierten linearen Epitope in der Proteinstruktur?
- Gibt es MS-spezifische AK-Reaktivitäten, die in der CSF, aber nicht im Serum detektiert werden können, und somit eine intrathekale AK-Synthese nahelegen?

Fragestellungen

- Können MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen virale Peptide gemessen werden?
- Existieren Hinweise auf mögliche Kreuzreaktivitäten zwischen viralen Antigenen und Autoantigenen?
- Lassen sich die Microarray-Ergebnisse durch Messungen mit dem Standardverfahren ELISA bestätigen?

3. Material und Methoden

Im Nachfolgenden werden zuerst das Studiendesign und das Patientenkollektiv vorgestellt. Anschließend werden die Inhalte des Peptid-Microarray-Versuchs dargelegt und abschließend das Validierungsexperiment mittels ELISA beschrieben.

3.1. Studiendesign

Für diese Studie wurden paarig gewonnene Serum- und CSF-Proben von insgesamt 30 Patienten verwendet, um potentiell MS-spezifische AK-Reaktivitäten zu identifizieren. Jeweils zehn dieser Patienten litten an RRMS, PPMS bzw. an nichtentzündlichen neurologischen Erkrankungen. Die klinisch-demographischen Daten zum Patientenkollektiv sowie die vor dieser Arbeit im Rahmen der Routine-Diagnostik erhobenen laborchemischen Informationen werden im Kapitel 3.2 vorgestellt. Die Daten der Messungen aus diesem Projekt werden im Kapitel 4 „Ergebnisse“ präsentiert.

Zur Analyse wurden hochdichte Peptid-Microarrays verwendet, für die nach Literatur- und Datenbankrecherche etwa 4000 Peptide ausgewählt wurden (siehe Kapitel 3.3.1). Die Herstellung der Peptide und der Microarrays geschah durch die Firma *JPT Peptide Technologies* GmbH (siehe Kapitel 3.3.2). Die experimentellen Messungen fanden im Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock statt. Nach einer Datenvorverarbeitung (siehe Kapitel 3.3.4) und anschließendem Filtern spezifischer Peptid-AK-Reaktivitäten (siehe Kapitel 3.3.5) erfolgte eine Kartierung möglicher MS-spezifischer Epitope auf den Antigenen, was man als Epitopmapping oder Epitopkartierung bezeichnet. Abschließend wurde via ELISA untersucht, ob sich die Resultate für vier exemplarisch ausgewählte Peptide bestätigen lassen (siehe Kapitel 3.4). Der Studienablauf ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

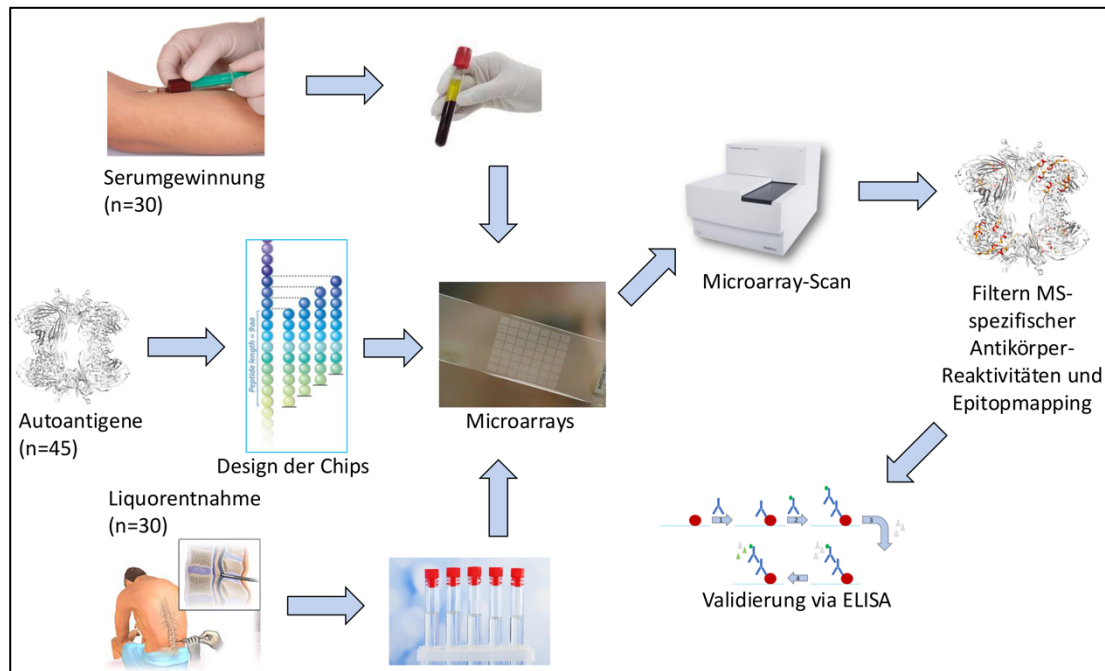


Abbildung 7: Übersicht des Arbeitsablaufs dieser Studie

Als Autoantigene bei MS beschriebene Proteine und Peptide wurden nach Literatur- und Datenbankrecherche ausgewählt. Alle Proteinsequenzen wurden durch überlappende Peptide repräsentiert, um lineare Epitope möglichst vollständig abzubilden. Serum und Liquorproben von 20 MS-Patienten und 10 Kontrollen wurden analysiert. Die Proben wurden aus einem Archiv entnommen und stammten ursprünglich von Patienten, denen bei klinischen Routineuntersuchungen Serum- und Liquor cerebrospinalis entnommen worden war. Nach dem Scannen der mit Liquor bzw. mit Serum inkubierten Microarrays erfolgte die bioinformatische Analyse der Antikörperreaktivitäten und die Visualisierung der möglichen Epitope. Abschließend wurden die Ergebnisse für ausgewählte Peptide via ELISA validiert. ELISA= *enzyme-linked immunosorbent assay*; MS=Multiple Sklerose

3.2. Patientenkollektiv

Für die Peptid-Microarray-Analysen dieser Arbeit wurden Probenpaare von insgesamt 30 Patienten ausgewählt. Die klinisch-demographischen Daten der einzelnen Patienten sind in Tabelle 3 aufgeschlüsselt. Zehn dieser Patienten waren an der Verlaufsform RRMS erkrankt und werden im Folgenden RRMS_01 bis RRMS_10 genannt. Zehn Patienten waren an der Verlaufsform PPMS erkrankt, folgend als PPMS_01 bis PPMS_10 bezeichnet, und zehn Patienten mit anderen, nichtentzündlichen neurologischen Erkrankungen dienten als Kontrollen, CTR_01 bis CTR_10. Sowohl Serum- als auch CSF-Proben wurden am gleichen Tag im Rahmen der Diagnostik von Patienten an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock gewonnen und Überschussmaterial bei -80°C pseudonymisiert gelagert.

Tabelle 3: Klinisch-demographische Angaben zu den untersuchten Patienten

ID	Diagnose	Geschlecht	Alter (in Jahren)	Krankheitsdauer (in Monaten)	Intrathekale IgG-Synthese	OCB	Serum-IgG in g/l	Liquor-IgG in mg/l
RRMS_01	RRMS	weiblich	47	1	nein	negativ	7	15
RRMS_02	RRMS	männlich	50	0	nein	positiv	13	43
RRMS_03	RRMS	männlich	43	0	ja	positiv	8	44
RRMS_04	RRMS	weiblich	28	0	ja	positiv	8	22
RRMS_05	RRMS	männlich	35	78	ja	positiv	7	52
RRMS_06	RRMS	weiblich	45	112	nein	positiv	8	51
RRMS_07	RRMS	weiblich	54	324	ja	positiv	10	60
RRMS_08	RRMS	männlich	36	0	ja	positiv	9	103
RRMS_09	RRMS	weiblich	53	132	nein	positiv	8	16
RRMS_10	RRMS	männlich	46	130	nein	positiv	11	34
PPMS_01	PPMS	weiblich	46	4	ja	positiv	7	31
PPMS_02	PPMS	männlich	44	18	nein	positiv	14	76
PPMS_03	PPMS	männlich	44	0	nein	positiv	11	49
PPMS_04	PPMS	weiblich	28	3	nein	negativ	13	70
PPMS_05	PPMS	männlich	37	7	ja	positiv	9	81
PPMS_06	PPMS	weiblich	50	21	nein	negativ	10	37
PPMS_07	PPMS	weiblich	52	0	ja	positiv	10	126
PPMS_08	PPMS	männlich	37	37	nein	positiv	9	32
PPMS_09	PPMS	weiblich	48	0	ja	positiv	8	98
PPMS_10	PPMS	männlich	48	155	nein	positiv	18	230
CTR_01	Migräne	weiblich	41	Ø	nein	negativ	11	18
CTR_02	Migräne	männlich	46	Ø	nein	negativ	8	11
CTR_03	Migräne	männlich	44	Ø	nein	negativ	6	16
CTR_04	Spannungs- kopfschmerz	weiblich	29	Ø	nein	Ø	11	19
CTR_05	Paroxysmale Hemikranie	männlich	40	Ø	nein	negativ	10	57
CTR_06	Migräne	weiblich	48	Ø	nein	Ø	12	34
CTR_07	Spannungs- kopfschmerz	weiblich	57	Ø	nein	negativ	13	22
CTR_08	Migräne	männlich	37	Ø	nein	Ø	12	50
CTR_09	Migräne	weiblich	48	Ø	nein	negativ	13	25
CTR_10	Krampfanfall	männlich	49	Ø	nein	negativ	10	67
Zusammenfassung RRMS		5 m / 5 w	$\bar{x}=43,7$; SD=8,4	$\bar{x}=78$; SD=104	5 erhöht	9 positiv	$\bar{x}=9$; SD=2	$\bar{x}=44$; SD=26
Zusammenfassung PPMS		5 m / 5 w	$\bar{x}=43,4$; SD=7,4	$\bar{x}=25$; SD=47	4 erhöht	8 positiv	$\bar{x}=11$; SD=3	$\bar{x}=83$; SD=60
Zusammenfassung CTR		5 m / 5 w	$\bar{x}=43,9$; SD=7,7	Ø	0 erhöht	0 positiv	$\bar{x}=10$; SD=2	$\bar{x}=32$; SD=19

CTR=Kontrolle; ID=Identifikator; IgG=Immunglobulin G; m=männlich; OCB=oligoklonale Banden; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose; SD=Standardabweichung; w=weiblich; Ø=nicht bestimmt; $\bar{x}$ =arithmetisches Mittel

Bei der Auswahl der archivierten Serum- und CSF-Proben wurde darauf geachtet, dass die Patientengruppen nach Alter und Geschlecht gematcht sind. Das Durchschnittsalter in allen Gruppen lag in etwa bei 43 Jahren und es waren jeweils fünf weibliche und fünf männliche Patienten pro Gruppe vertreten. Alle Patienten waren westeuropäischer Abstammung. Die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug in der RRMS-Gruppe 78 Monate und in der PPMS-Gruppe 25 Monate, wobei die individuelle Krankheitsdauer innerhalb beider Gruppen zwischen 0 und über 150

Monaten stark schwankte. Die Diagnose der MS-Patienten wurde anhand der revidierten McDonald-Kriterien von 2010 bestätigt [77]. Kein Patient litt an einer anderen Autoimmunerkrankung. Die Patienten wurden unabhängig von der Studie den Leitlinien der DGN entsprechend routinemäßig behandelt. Bis auf zwei Patienten mit RRMS, die mit Glatirameracetat behandelt wurden (RRMS_05 und RRMS_06), erhielten die übrigen MS-Patienten zum Zeitpunkt der Blut- und CSF-Entnahme keine immunmodulatorische oder immunsuppressive Therapie. Die mittlere Konzentration an IgG im Serum war mit neun (RRMS) bis elf (PPMS) Gramm pro Liter in allen Gruppen ähnlich. In der CSF bestanden deutlichere Unterschiede mit im Mittel 32 (CTR), 44 (RRMS) und 83 (PPMS) Milligramm pro Liter.

Die Patienten wurden über einen Nachbeobachtungszeitraum von zwölf Monaten anhand der EDSS (siehe Kapitel 1.1.3.2) und dem Auftreten von Schüben neurologisch beurteilt (Tabelle 4). Der durchschnittliche Behinderungsgrad nach der EDSS lag zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der PPMS-Gruppe mit 4,1 über dem der RRMS-Gruppe mit 2,4 und veränderte sich nach einem Jahr mit einem EDSS-Score von 4,4 in der PPMS-Gruppe und 2,0 in der RRMS-Gruppe kaum. Bei drei RRMS-Patienten kam es innerhalb eines Jahres zu mindestens einem dokumentierten Schub.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock votiert (Registriernummer A 2014-0112) und der Deklaration von Helsinki entsprechend durchgeführt [131]. Alle Patienten gaben nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis für die Verwendung von Überschussmaterial aus Routineuntersuchungen für Forschungszwecke.

Tabelle 4: Klinische Verlaufsdaten der MS-Patienten

ID	Diagnose	EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme	EDSS nach 1 Jahr	Schübe nach 1 Jahr
RRMS_01	RRMS	2,5	2,5	2
RRMS_02	RRMS	1,5	1,5	0
RRMS_03	RRMS	3,0	2,0	1
RRMS_04	RRMS	2,0	0,0	0
RRMS_05	RRMS	2,0	1,5	0
RRMS_06	RRMS	4,0	3,0	0
RRMS_07	RRMS	2,0	4,5	0
RRMS_08	RRMS	1,5	2,0	1
RRMS_09	RRMS	3,0	unbekannt	unbekannt
RRMS_10	RRMS	2,0	1,0	0
PPMS_01	PPMS	4,0	6,0	entfällt
PPMS_02	PPMS	4,5	4,5	entfällt
PPMS_03	PPMS	3,0	2,0	entfällt
PPMS_04	PPMS	2,0	2,0	entfällt
PPMS_05	PPMS	2,0	2,5	entfällt
PPMS_06	PPMS	3,0	4,0	entfällt
PPMS_07	PPMS	5,5	6,0	entfällt
PPMS_08	PPMS	5,5	6,0	entfällt
PPMS_09	PPMS	3,0	2,0	entfällt
PPMS_10	PPMS	8,0	8,5	entfällt
Zusammenfassung RRMS		$\bar{x}=2,4$; SD=0,8	$\bar{x}=2,0$; SD=1,3	$\bar{x}=0,4$; SD=0,7
Zusammenfassung PPMS		$\bar{x}=4,1$; SD=1,9	$\bar{x}=4,4$; SD=2,2	entfällt

EDSS=*Expanded Disability Status Scale*; ID=Identifikator; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose; SD=Standardabweichung; $\bar{x}$ =arithmetisches Mittel

Die Erhebung der Laborwerte erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik. Von den 20 MS-Patienten wiesen 17 OCB in der CSF auf, neun davon mit RRMS und acht mit PPMS, jedoch keine der sieben Kontrollpersonen, bei denen OCB bestimmt wurden. Eine intrathekale IgG-Produktion war insgesamt bei neun MS-Patienten anhand des Reiber-Diagramms [132] nachweisbar, davon fünf Patienten mit RRMS und vier Patienten mit PPMS, jedoch bei keiner Kontrollperson (Abbildung 8). Mit Hilfe eines Reiber-Diagramms lässt sich bestimmen, ob ein Patient einen Normalbefund aufweist, eine intrathekale IgG-Synthese vorliegt, AK durch Diffusion aus dem Blut in die CSF im Sinne einer Schrankenstörung gelangt sind oder eine kombinierte Störung vorhanden ist. Die für diese Arbeit gesondert erhobenen Messwerte werden im Kapitel 4 „Ergebnisse“ vorgestellt.

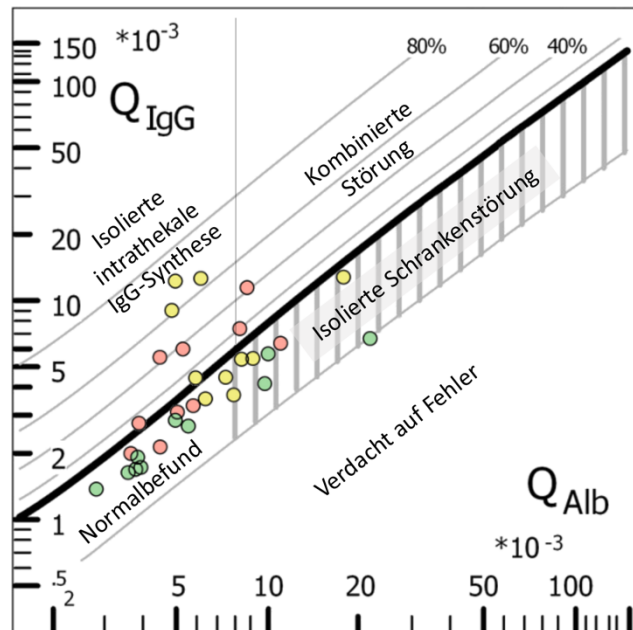


Abbildung 8: Reiber-Schema zur Visualisierung der intrathekalen Antikörpersynthese

In dem Diagramm wurden die Quotienten aus der Konzentration von IgG im Liquor und im Serum (Q_{IgG}) sowie von Albumin im Liquor und im Serum (Q_{Alb}) jedes Patienten aufgetragen. Die Grenze zwischen einer intrathekalen IgG-Synthese und einer Störung der Blut- Liquor-Schranke bzw. einem Normalbefund ist durch die dicke schwarze Linie gekennzeichnet. Die Grenze zwischen einer isolierten intrathekalen IgG-Synthese und einer kombinierten Störung stellt die feine graue, vertikal gezogene Linie dar. Eine isolierte Schrankenstörung wird durch die mit fetten grauen vertikalen Linien schraffierte Fläche gekennzeichnet. Fünf von zehn MS-Patienten mit schubförmig remittierendem Verlauf (rote Kreise) und vier von zehn MS-Patienten mit primär progredientem Verlauf (gelbe Kreise) wiesen eine intrathekale IgG-Synthese auf, während bei keiner Kontrollperson (grüne Kreise) eine intrathekale IgG-Synthese vorlag.

3.3. Peptid-Microarrays

3.3.1. Auswahl der Peptide

Die Auswahl der Peptide und das Chip-Design erfolgte durch die Arbeitsgruppe Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock. Insgesamt wurden für die Microarray-Analysen 3991 Peptide ausgewählt. Die größte Anzahl davon, nämlich 3747 Peptide, stammte von 45 menschlichen Proteinen mit insgesamt 81 Isoformen, die nach einer Literaturrecherche von Übersichts- und Originalarbeiten potentielle MS-Autoantigene darstellten (Tabelle 5) [133–136]. Als Isoformen bezeichnet man die verschiedenen Varianten eines Proteins, die bspw. durch alternatives Spleißen von prä-mRNA entstehen. Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Proteinisoformen

wurden der UniProt-Datenbank [137] entnommen. Für die Microarrays wurden die Proteinsequenzen in 15-mer lange Peptide unterteilt, wobei darauf geachtet wurde, dass sie sich jeweils mit mindestens neun Aminosäuren überlappen, da Epitope in der Regel sechs bis neun Aminosäuren lang sind und somit keine Epitope verpasst werden sollten [112,114].

Weitere 244 Peptide wurden aus der manuell gepflegten Datenbank *Immune Epitope Database* (IEDB) zusammengetragen, in der Epitope öffentlich gesammelt werden [138]. Die Sucheinstellung „*Linear Epitope*“, „*B Cell Response*“ und „*multiple sclerosis*“ wurde für die Suche verwendet. Einige der so gefundenen Peptide gehörten zu den 45 bereits ausgewählten Proteinen wie MOG, MBP und PLP. Andere Peptide stammten von Mimotopen (siehe Kapitel 1.2). Durch diese Sucheinstellungen wurden 137 Peptidsequenzen aus der IEDB [138] für die Microarray-Analyse gewonnen.

Die IEDB [138] wurde auch verwendet, um lineare B-Zell-Epitope von EBV und HHV-6 ausfindig zu machen, da diese Viren, wie im Kapitel 1.1.2.2 beschrieben, in der Literatur häufig in Verbindung mit MS gebracht wurden. Insgesamt konnten auf diese Weise 107 Peptide viralen Ursprungs gefunden werden, von denen EBV mit 103 Peptiden die Mehrzahl und HHV-6 mit vier Peptiden einen kleinen Anteil ausmachten. Von diesen insgesamt 244 Peptiden enthielten zehn Peptide die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin. Von citrullinierten Peptiden ist bekannt, dass diese als Autoantigen dienen können und somit für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wesentlich sein können [139,140]. Alle ausgewählten Peptide bestanden aus zehn bis 20 Aminosäuren.

Tabelle 5: Für das Antikörperscreening berücksichtigte humane Proteine

UniProt-Name	UniProt-Eintrag	Gensymbol	Protein	Isoformen
A4_HUMAN	P05067	APP	Beta-Amyloid 42	1
ACTB_HUMAN	P60709	ACTB	Aktin, zytoplasmatisch (1)	1
ACTG_HUMAN	P63261	ACTG1	Aktin, zytoplasmatisch (2)	1
ACTZ_HUMAN	P61163	ACTR1A	Alpha-Centractin	1
ALDOC_HUMAN	P09972	ALDOC	Fructose-Bisphosphat-Aldolase C	1
AQP4_HUMAN	P55087	AQP4	Aquaporin-4	2
ARRS_HUMAN	P10523	SAG	S-Arrestin	1
CH60_HUMAN	P10809	HSPD1	60-kDa-Hitzeschockprotein (HSP60)	1
CLD11_HUMAN	O75508	CLDN11	Claudin-11	1
CN37_HUMAN	P09543	CNP	2',3'-Cyclonukleotid-3'-Phosphodiesterase	2
CRYAA_HUMAN	P02489	CRYAA	Alpha-Crystallin A-Kette	1
CRYAB_HUMAN	P02511	CRYAB	Alpha-Crystallin B-Kette	1
DCE2_HUMAN	Q05329	GAD2	Glutamat-Decarboxylase 2	1
DPYL2_HUMAN	Q16555	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-verwandtes Protein 2	1
ENOA_HUMAN	P06733	ENO1	Alpha-Enolase	2
ENOB_HUMAN	P13929	ENO3	Beta-Enolase	3
ENOG_HUMAN	P09104	ENO2	Gamma-Enolase	1
G3P_HUMAN	P04406	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	1
GFAP_HUMAN	P14136	GFAP	Saures Gliafaserprotein	3
HS90B_HUMAN	P08238	HSP90AB1	90-kDa-Hitzeschockprotein-beta (Hsp90-beta)	1
HSP71_HUMAN	P08107	HSPA1A	70-kDa-Hitzeschockprotein 1A/1B (Hsp70-1A/B)	1
HSP7C_HUMAN	P11142	HSPA8	Hitzeschock-verwandtes 71 kDa Protein (Hsc71)	2
IFNB_HUMAN	P01574	IFNB1	Interferon beta	1
KCRB_HUMAN	P12277	CKB	Kreatinkinase Typ B	1
KPYM_HUMAN	P14618	PKM	Pyruvatkinase M	2
MAG_HUMAN	P20916	MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein	1
MBP_HUMAN	P02686	MBP	Basisches Myelinprotein	7
MOBP_HUMAN	Q13875	MOBP	Basisches Myelin-Oligodendrozyten-Protein	3
MOG_HUMAN	Q16653	MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	10
MYP2_HUMAN	P02689	PMP2	Myelinprotein P2	1
MYPR_HUMAN	P60201	PLP1	Proteolipid-Protein	2
NFL_HUMAN	P07196	NEFL	Leichte Kette des Neurofilaments	1
PERT_HUMAN	P07202	TPO	Thyreoperoxidase	8
PGAM_HUMAN	P18669	PGAM1	Phosphoglyceratmutase 1	1
RTN4R_HUMAN	Q9BZR6	RTN4R	Reticulon-4-Rezeptor	1
S100B_HUMAN	P04271	S100B	Protein S100B	1
S10A1_HUMAN	P23297	S100A1	Protein S100A1	1
SPTA2_HUMAN	Q13813	SPTAN1	Alpha-II Spektrin	3
TALDO_HUMAN	P37837	TALDO1	Transaldolase	1
TBB1_HUMAN	Q9H4B7	TUBB1	Tubulin-beta-1-Kette	1
TBB3_HUMAN	Q13509	TUBB3	Tubulin-beta-3-Kette	1
TBB4A_HUMAN	P04350	TUBB4A	Tubulin-beta-4A-Kette	1
TBB4B_HUMAN	P68371	TUBB4B	Tubulin-beta-4B-Kette	1
TBB5_HUMAN	P07437	TUBB	Tubulin-beta-5-Kette	1
TKT_HUMAN	P29401	TKT	Transketolase	1

Nach einer Literaturrecherche wurden 45 menschliche Proteine ausgewählt. Ihre Identifikationsnummern und die Anzahl der Isoformen wurden der Datenbank UniProt [137] entnommen.

3.3.2. Herstellung der Microarrays

Die Peptidsynthese sowie die Produktion der hochdichten Microarrays erfolgte durch die Firma *JPT Peptide Technologies* GmbH. Die Synthese der Peptide fand anhand des „*SPOT synthesis*“-Verfahrens statt, bei dem viele Peptide parallel auf einer Membran synthetisiert werden können [141]. Aus technischen Gründen tragen dabei die Peptide ein zusätzliches Glycin am C-Terminus. Über einen flexiblen Linker am N-Terminus wurden die Peptide auf einem 76 × 26 mm großen funktionalisierten Objektträger aus Glas chemoselektiv und kovalent gebunden und in Folge immobilisiert. Die Peptide wurden nach dem Spotten mit bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt. Nähere Informationen zur Peptidsynthese und Microarrayproduktion sind einer vorherigen Publikation der Arbeitsgruppe des Instituts für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock zu entnehmen [142]. Die Microarrays bestanden aus drei Subarrays, sodass für jedes Peptid jeweils drei Spots pro Array vorlagen. Jeder Microarray enthielt somit etwa 12.000 Spots mit einem Durchmesser von jeweils etwa 150 µm.

3.3.3. Versuchsablauf

Insgesamt wurden 62 Peptid-Microarrays verwendet. Jeweils 30 Microarrays wurden dabei mit den paarigen Serum- bzw. CSF-Proben untersucht. Zwei Microarrays wurden als Negativkontrollen verwendet. Der experimentelle Ablauf erfolgte nach einem vorherigen Protokoll, welches von Mitarbeitern der Sektion Neuroimmunologie und des Instituts für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock etabliert wurde [133,142,143]. Im ersten Schritt wurden 100 µl der verdünnten Serum- bzw. CSF-Proben den Microarrays hinzugefügt und anschließend vier Stunden inkubiert. Die Verdünnung der Serumproben betrug wie vom Hersteller empfohlen 1:100 und die Verdünnung der CSF-Proben nur 1:5, da AK in der CSF deutlich niedriger konzentriert sind. Diese CSF-Verdünnung wurde in einem Vorexperiment als geeignet angesehen. Die Verdünnung erfolgte mit Waschpuffer, der aus 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 und 0,1% BSA bestand. Nach der Inkubation wurden die Microarrays mit dem Waschpuffer gewaschen und die Restflüssigkeit wurde durch Zentrifugation entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des sekundären AK mit folgender Inkubation im Dunkeln bei einer Dauer von zwei Stunden. Als sekundärer AK dienten 100 µl polyklonale Zenon Ziege-Anti-Human-IgG-Fab-

Fragmente, die mit Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, eine Charge von Katalognummer Z-25408) konjugiert waren, was durch Anregung mit Laserstrahlen im roten Farbspektrum bei einer Wellenlänge von 635 nm zu einem Fluoreszenzsignal führt und sich somit zur Detektion von gebundenen primären IgG-AK aus dem Serum bzw. CSF eignet. Die Konzentration des sekundären AK betrug 0,8 µg/ml im Waschpuffer. Danach wurden die Microarrays erneut gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem Agilent G2565 Scanner detektiert. Die Scans wurden bei 10 µm Auflösung mit 16 bit Farbtiefe durchgeführt.

Zwei zusätzliche Microarrays wurden als Negativkontrollen nur mit Waschpuffer plus sekundärem AK inkubiert, um bspw. direkte Interaktionen zwischen dem sekundären AK und den Peptiden zu identifizieren. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur im Institut für Immunologie in Zusammenarbeit mit der Sektion Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock. Zur Vermeidung von Fehlerquellen fanden die Versuchsreihen mit den CSF- und Serumproben an jeweils demselben Tag sowie mit derselben Labortechnikerin statt.

3.3.4. Datenvorverarbeitung

Die Datenvorverarbeitung erfolgte entsprechend dem Protokoll von Hecker *et al.* 2012 [133], welcher auch führend an diesem Projekt beteiligt war. Jedes Microarray-Bild wurde mit der kommerziellen Software GenePix Pro 6.1 (Molecular Devices) verarbeitet, um für jeden Spot die mediane Fluoreszenzintensität und seinen jeweiligen lokalen Hintergrund zu berechnen. Der Hintergrund ist der Bereich um den jeweiligen Spot. Die Software wies außerdem jedem Spot, dessen Intensität im Vergleich zum Hintergrund ungewöhnlich niedrig war, eine Markierung (*flag*) zu. Dabei wurden auch Spots markiert, die eine ungewöhnliche, nicht-zirkuläre Form hatten. Die Rohdaten wurden in die Datenbank einer Webanwendung, genannt EpiMap, des Proteom-Zentrums Rostock (Leiter: Prof. Dr. Glocker) hochgeladen (<http://epimap.pzr.uni-rostock.de>).

Die weitere Datenverarbeitung erfolgte mithilfe des am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock entwickelten lokalen Webservers NETBInf (<http://zeta.pzr.uni-rostock.de>), der von Felix Steinbeck sowie Michael Kreutzer

technisch betreut wird. Für jeden Spot wurde zunächst die Hintergrundintensität von der Spotintensität subtrahiert, um die Signale der Spots untereinander vergleichbarer zu machen, da höhere unspezifische Signalintensitäten im Spot mit höheren Signalintensitäten im Hintergrund einhergehen [133]. Wenn die Intensität im Hintergrund höher als in dem Spot war, wurde die Signalintensität auf Eins gesetzt (Trunkierung). Ausreißer, also unnormale hohe Signalintensitäten eines Peptidspots in nur einem Subarray, wurden für jedes Triplikate durch Berechnung des Variationskoeffizienten ermittelt. Triplikate mit einem größeren Variationskoeffizienten als 1,685 zeigten Ausreißer an. Jeder Ausreißer wurde dann geflaggt und korrigiert, indem die Spotintensität auf die mittlere Intensität der beiden zugehörigen Spots der anderen beiden Subarrays gesetzt wurde. Schließlich wurde für die weiteren Analysen für jedes Triplikate der Mittelwert der Signalintensitäten der gemessenen Peptid-AK-Reaktivitäten gebildet.

Da Verunreinigungen der Microarrays während des Experiments nicht auszuschließen sind, wurde noch ein Schritt zur Qualitätssicherung eingeführt. Daher folgte nach Hintergrundkorrektur und Trunkierung eine Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman für alle paarweisen Kombinationen der drei Subarrays mit den Spots, die zuvor nicht geflaggt wurden. Abschließend wurde aus den so errechneten Korrelationskoeffizienten ein Mittelwert, *Consistency Score* genannt [133], für jeden Microarray gebildet, wobei Werte kleiner als 0,7 für eine schlechte Qualität der einzelnen Microarrays sprechen.

3.3.5. Filtern spezifischer Peptid-Antikörper-Reaktivitäten

Zur Bestimmung von Peptiden, die spezifisch von AK der MS-Patienten gebunden werden, wurde ein zweistufiges Filterverfahren angewendet, welches in Abbildung 9 schematisch dargestellt ist. Damit ein Peptid den ersten Filterschritt übersteht, musste es ein deutlich höheres Signal für mindestens einen mit Serum bzw. CSF inkubierten Microarray als für den Negativkontrollarray aufweisen. Zur Suche nach gruppenspezifischen AK-Reaktivitäten wurden im zweiten Schritt die Daten der drei Patientengruppen direkt miteinander verglichen.

Zunächst wurde zur Filterung patientenspezifischer Signale ein Verfahren namens MAID (*MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion*) angewendet

[144]. Das Besondere an MAID ist, dass es sowohl das Verhältnis zweier gemessener Signale als auch die Signalintensität für ein Peptid berücksichtigt. Würde man lediglich die Signalintensität als Kriterium verwenden, wäre es bspw. möglich, dass ein Peptid gefiltert wird, das auch in der Negativkontrolle ein hohes Signal allein durch den sekundären AK zeigt. Wäre das Verhältnis, genannt *Fold-Change* (x-fache Änderung), zwischen den Signalen eines Serum-/CSF-inkubierten Microarrays und der Negativkontrolle das einzige Kriterium, würde man vernachlässigen, dass aufgrund von Messungenauigkeiten niedrigere Signalintensitäten mit größeren zufälligen Schwankungen des Verhältnisses einhergehen [145]. Bei einer niedrigeren Signalintensität sollte folglich eine höhere *Fold-Change* gefordert werden. Das Resultat der Berechnung eines signalintensitätsabhängigen *Fold-Change* wird MAID-Wert genannt [133,144]. Wenn sich für ein Peptid im Negativkontrollarray keine Reaktivität zeigte, also das vorverarbeitete Signal gleich eins war, lag der von MAID abgeleitete Schwellenwert zur Evaluierung, ob eine Patienten-spezifische AK-Reaktivität vorliegt oder nicht, bei einer Signalintensität ≥ 400 für den Serum-/CSF-inkubierten Peptid-Microarray. Der Schwellenwert war umso höher, je stärker das Signal für das jeweilige Peptid in der Negativkontrolle war. Um den ersten Filterschritt zu überstehen, durfte darüber hinaus nicht mehr als ein Spot pro Triplikat in der Datenvorverarbeitung durch ein *flag* markiert worden sein (siehe Kapitel 3.3.4).

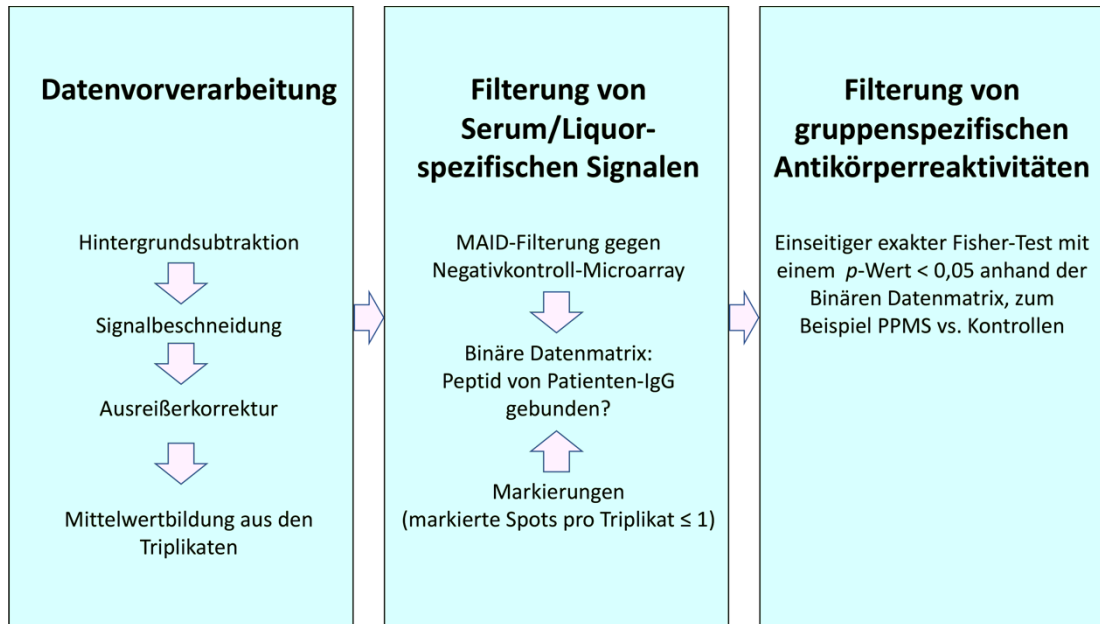


Abbildung 9: Filtern MS-spezifischer Peptid-Antikörper-Reaktivitäten

Zunächst wurden die gescannten Signale für die weitere Analyse vorverarbeitet. Im darauffolgenden Filterschritt wurde mit einem Verfahren namens MAID [144] geschaut, ob Peptide spezifisch durch Antikörper einer der 30 Serum- bzw. Liquorproben gebunden wurden. Der zweite Filterschritt basierte auf den Daten des ersten Filterschrittes und diente dem Aufspüren von MS-spezifischen Antikörperreaktivitäten. IgG=Immunglobulin G; MAID=*MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion*; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose

Der zweite Schritt diente dazu, AK-Reaktivitäten aufzuspüren, die für eine Patientengruppe spezifisch sind. Hierfür wurden die RRMS- bzw. PPMS-Patienten mit der Kontrollgruppe verglichen, indem der einseitige exakte Fisher-Test verwendet wurde. Als Grundlage dienten die Ergebnisse des ersten Filterverfahrens. Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde so für jedes Peptid ermittelt, ob es signifikant häufiger von Patienten in der RRMS- bzw. PPMS-Gruppe als von Patienten in der Kontrollgruppe gebunden wurde.

Die Filter-Berechnungen wurden in der Statistikumgebung R unter Verwendung des NETBInf-Webservers durchgeführt. Für Weiteres zur Datenvorverarbeitung und zum Filtern von Peptid-AK-Reaktivitäten bei Experimenten mit Peptid-Microarrays siehe auch Hecker *et al.* 2012 [133]. Korrelationen wurden anhand der Pearson-Korrelation berechnet. Die tabellarische Aufarbeitung der Ergebnisse der Auswertungen sowie Listenvergleiche erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel. Für die Erstellung von Abbildungen wurden in der Regel Microsoft PowerPoint und GIMP verwendet. Für Abbildung 11 wurde zur Erstellung der Boxplots die Webanwendung

<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/> benutzt. Die Anordnung der Peptidsequenzen innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur in Abbildung 17 wurde mit der Software UCSF Chimera (Version 1.13.1) visualisiert.

3.4. Validierungsexperiment mit ELISA

Zur technischen Validierung wurden die AK-Reaktivitäten gegen vier exemplarisch ausgewählte Peptide aus der Microarray-Analyse mittels ELISA erneut untersucht, indem die gleichen Serum- und CSF-Proben für den ELISA wie für das Peptid-Microarray-Experiment verwendet wurden. Die Peptide wurden im Vorfeld mit einem zusätzlichen C-terminalen Glycin hergestellt und über einen zweifachen PEG2 (8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid)-Linker am N-Terminus mit Biotin gekoppelt. Sie wurden von der Firma BIOSYNTAN GmbH synthetisiert, auf über 95% Reinheit konzentriert und als lyophilisiertes Pulver geliefert.

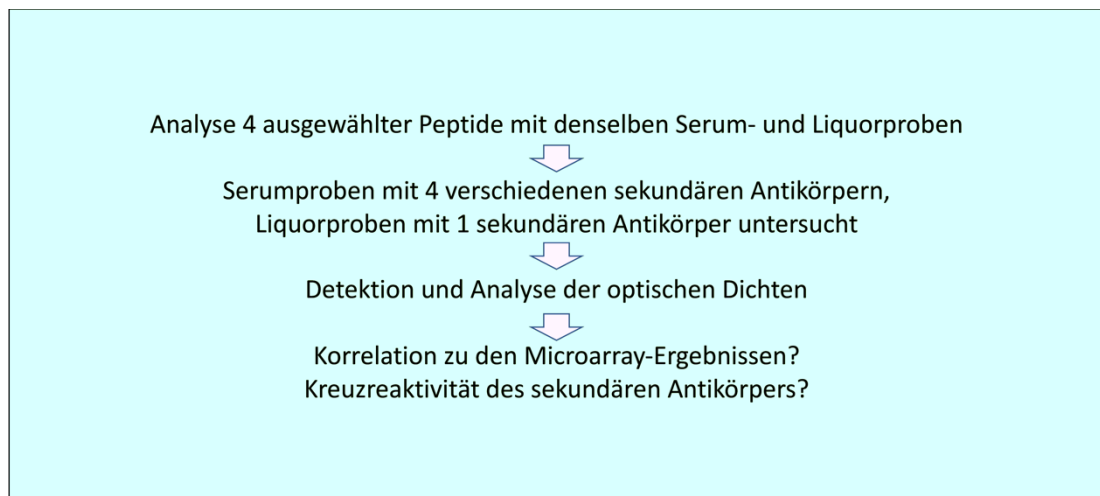


Abbildung 10: Validierung der Ergebnisse via ELISA

Zur Validierung der Messwerte des Microarray-Experiments wurden exemplarisch vier Peptide ausgewählt und diese Daten mit den ELISA-Daten verglichen.

Um Serum- bzw. CSF-IgG, welche diese Peptide binden, zu markieren, wurden als sekundärer AK polyklonale Ziege-Anti-Human-IgG-Fab-Fragmente verwendet. Diese waren mit Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase*: HRP) gekoppelt (Thermo Fisher Scientific, Katalog Nr. Z-25454, 1:3000 in Waschpuffer verdünnt). Dieser sekundäre AK ähnelt dem für die Peptid-Microarraymessungen verwendeten sekundären AK. Außerdem wurden die Peptid-AK-Reaktivitäten in den Serumproben

mit drei weiteren sekundären AK, die ebenfalls Anti-Human-IgG-Fc-Fragment-spezifisch und mit HRP gekoppelt waren, evaluiert. Hierbei handelte es sich um einen polyklonalen Maus-AK (Jackson Immuno, Research Katalognummer 209-035-098, 1:6500 Verdünnung) und zwei monoklonale Maus-AK (clone HP6017: Thermo Fisher Scientific, Katalognummer 05-4220, 1:250 Verdünnung; clone H2: Abcam, Katalognummer ab99765, 1:8000 Verdünnung). Diese zusätzliche Testung mit den drei weiteren sekundären AK erfolgte aufgrund der begrenzten Probenmenge nicht mit den CSF-Proben. Die vier verschiedenen sekundären AK wurden verwendet, weil ihre jeweilige Spezifität durch die unterschiedliche Herstellung und Beschaffenheit divergieren kann. Die Spezifität ist unter anderem von dem genutzten Wirtstier, der Klonalität der AK und ihrer Struktur als Fab-Fragmente oder Gesamt-IgG-Moleküle abhängig. Daraus ergeben sich möglicherweise Kreuzreaktivitäten gegen bestimmte Peptidsequenzen, die sich zwischen den verschiedenen AK unterscheiden.

Die ELISA-Messungen wurden mit Pierce NeutrAvidin beschichteten *High Capacity* Platten (Clear, 96-Well; Thermo Fisher Scientific) für alle Peptide und Proben durchgeführt. Diese Platten weisen eine hohe Bindungskapazität für die biotinylierten Peptide auf. Jede Platte wurde zuerst mit Tris-gepufferter Salzlösung (*Tris-buffered saline*: TBS), die aus 50 mM Tris-HCl pH 7,4 und 150 mM NaCl bestand, gewaschen. Die lyophilisierten Peptide wurden in TBS mit 5% Dimethylsulfoxid gelöst und verdünnt, bis sie eine Konzentration von 0,5 mM (50 pmol in 100 µl) aufwiesen. Anschließend wurden 100 µl der Peptidlösung in jedes Well (Vertiefung der Platte) gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten mit Waschpuffer, welcher aus TBS, 0,05% Tween 20 und 0,1% BSA bestand, gewaschen. 100 µl der Serumproben, die 1:100 in Waschpuffer verdünnt wurden, bzw. 100 µl der CSF-Proben, 1:2,75 verdünnt, wurden in jedes Well hinzugegeben. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Platten wurden sie für eine Stunde mit den jeweiligen verdünnten sekundären AK inkubiert (100 µl/Well) und wieder mit Waschpuffer gewaschen. Die Waschungen erfolgten jeweils zur Entfernung ungebundener AK. Im letzten Schritt wurde 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz (ABTS) (Sigma-Aldrich) als chromogenes Substrat hinzugefügt. Dafür wurden in jedes Well 100 µl von 1,74 mM ABTS in Pufferlösung (39,8 mM Zitronensäure, 3,25 mM NaBO₃, 60 mM Na₂HPO₄, pH 4,4) gegeben. Aus ABTS wird durch die Peroxidase der sekundären AK bei erfolgreicher Bindung ein grünes Radikal

gebildet. Die Extinktion wurde nach zehn Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Anthos 2010 ELISA-Readers mit der Software ADAP Basic (Anthos Labtec Instruments) photometrisch gemessen. Auf die gleiche Art und Weise wurden zudem Negativkontrollmessungen durchgeführt, um zu testen, ob die Peptide direkt von den sekundären AK gebunden werden.

Die mittleren gemessenen optischen Dichten der untersuchten Antigen-AK-Reaktionen wurden verglichen. Um als spezifisch gebunden eingestuft zu werden, wurde festgelegt, dass die optische Dichte für die AK-Reaktivität gegen ein Peptid im Serum über oder gleich 0,610 und aufgrund der stärkeren Verdünnung in der CSF über oder gleich 0,065 liegen muss. Die Pearson-Korrelation wurde bestimmt, um zu ermitteln, ob die Microarray-Daten mit den ELISA-Daten korrelieren. Mit dem einseitigen exakten Fisher-Test wurde berechnet, ob sich spezifische Unterschiede in den AK-Reaktivitäten für eine MS-Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen lassen. Die Berechnungen wurden in der Statistikumgebung R durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Datenqualität und -verteilung

Zur Qualitätssicherung wurde der *Consistency Score* gemäß Hecker *et al.* 2012 berechnet [133]. Für jede paarweise Kombination der drei Subarrays eines Microarrays erfolgte dazu nach Hintergrundsubtraktion, Trunkierung und Ausreißerkorrektur die Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman. Der aus den Mittelwerten dieser Korrelationskoeffizienten berechnete *Consistency Score* lag bei fast allen Microarrays über 0,7, was auf eine gute Qualität hinweist. Lediglich für drei mit CSF von Kontrollpatienten (CTR_03, CTR_09 und CTR_10) inkubierte Arrays lag der *Consistency Score* knapp unter 0,7 (0,66, 0,60 bzw. 0,60). Dennoch fanden auch diese Microarrays Berücksichtigung bei der weiteren Auswertung. Für die weiteren Analysen wurde stets die Negativkontrolle „Puffer_02“, die etwas höhere Intensitätswerte, aber ein qualitativ ähnliches Signalintensitätsmuster wie „Puffer_01“ aufwies (Korrelationskoeffizient nach Pearson $r = 0,828$), verwendet.

Nach Mitteln der Messwerte der drei Subarrays gab es eine große Streubreite der prozessierten Signalintensitäten, wobei die allermeisten Werte im unteren Bereich lagen (Abbildung 11). Weniger als 19% der Werte lagen im Serumdatensatz über 100 und etwa 91% lagen im Bereich unter 400. Für den CSF-Datensatz gab es ein ähnliches Bild. Hier lagen nur etwa 10% der Werte über 100 und fast 96% befanden sich unter 400. Das bedeutet, dass nur ein kleiner Teil der 3991 Peptide tatsächlich von Patientenspezifischen AK gebunden wurde. Bemerkenswert ist, dass es auch 35 Peptide gab, für die in beiden Negativkontroll-Microarrays ein mittleres Signal über 400 gemessen wurde, was am ehesten durch die Affinität des verwendeten sekundären AK gegen diese Peptide erklärt werden kann.

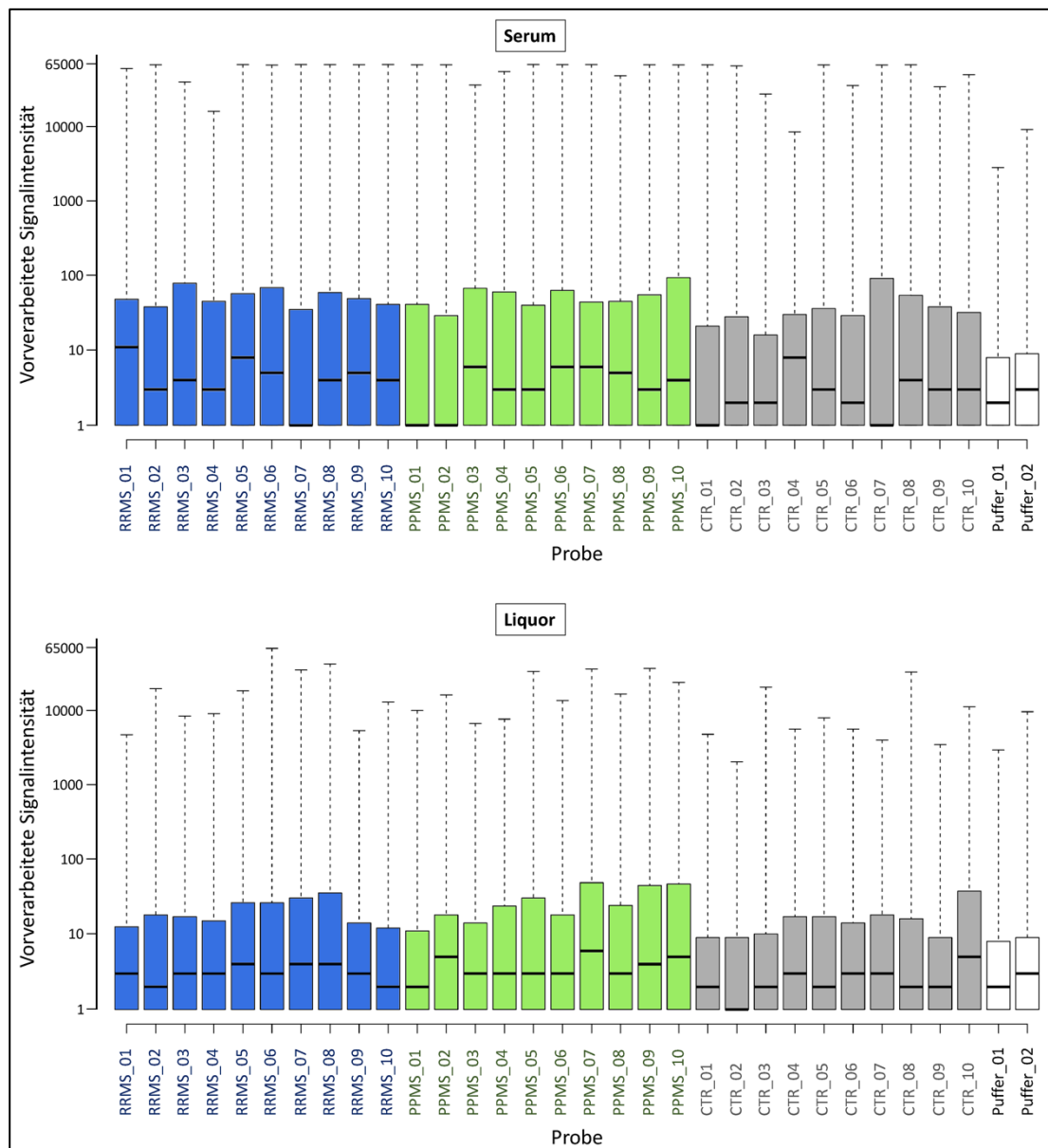


Abbildung 11: Boxplots der Signalintensitäten aller 62 Peptid-Microarrays

Dargestellt ist die Verteilung der vorverarbeiteten Signalintensitäten (siehe Kapitel 3.3.4) für die jeweils zehn RRMS- und PPMS-Patienten, die zehn Kontrollpersonen sowie die beiden Negativkontroll-Microarrays, hier als "Puffer" bezeichnet, als Boxplots. Die Signalintensitäten der beiden Puffer sind identisch in beiden Teilabbildungen. Die Serumprobe eines Patienten zeigte meist höhere Werte als die jeweilige Liquorprobe. Aufgrund der schiefen Verteilung der Daten sind die Signalintensitäten logarithmisch skaliert aufgetragen. Die *Whisker* (Deutsch: Antennen) kennzeichnen jeweils das Maximum pro Array, wobei die Detektionsgrenze bei 65000 liegt. Es gab somit einige starke Antikörperreaktivitäten, welche die Detektionsgrenze erreichten. Das Minimum liegt bei eins, da die Spots, deren Signalintensitäten niedriger als die Hintergrundintensität waren, auf eins trunziert wurden. Die farbigen Boxen sind jeweils durch das obere bzw. untere Quartil begrenzt, es liegen also 50% aller Daten pro Array in einer Box. Der schwarze Strich innerhalb einer Box kennzeichnet den Median. CTR=Kontrollpersonen; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

Ergebnisse

Insgesamt wiesen die mit CSF inkubierten Microarrays meist eine niedrigere Signalintensität als die mit Serum inkubierten Microarrays auf. Für 93% der Patienten (28/30; außer PPMS_07 und PPMS_09) lag die mittlere Signalintensität im Serumdatensatz über der mittleren Signalintensität im CSF-Datensatz. Betrachtet man die Signalintensitäten für jedes der 3991 Peptide einzeln, war für etwa 83% der Peptide (3300/3991) der Mittelwert im Serumdatensatz größer als der Mittelwert im CSF-Datensatz.

4.2. Individuelle Muster im Antikörperprofil

Der erste Filterschritt diente dazu, serum- bzw. CSF-spezifische Signale zu erkennen. Hierzu wurden die Serum- bzw. CSF-Daten mit den Daten des Negativkontroll-Microarrays Puffer_02 verglichen, indem ein Verfahren namens MAID [144] benutzt wurde. Exemplarisch ist das Filterergebnis für einen mit Serum inkubierten Microarray in Abbildung 12 visualisiert.

Für die meisten Peptide konnten in keiner einzigen Patientenprobe daran bindende AK nachgewiesen werden (Abbildung 13). In vielen Fällen war entweder das Signal zu niedrig, um als IgG-spezifisch gefiltert zu werden, oder es wurde durch die Aktivität des sekundären AK hervorgerufen. Im Serumdatensatz gab es 16 Peptide, die für jede Probe als spezifisch von AK gebunden identifiziert wurden. Hingegen wies kein Peptid ein IgG-spezifisches Signal in jeder CSF-Probe auf.

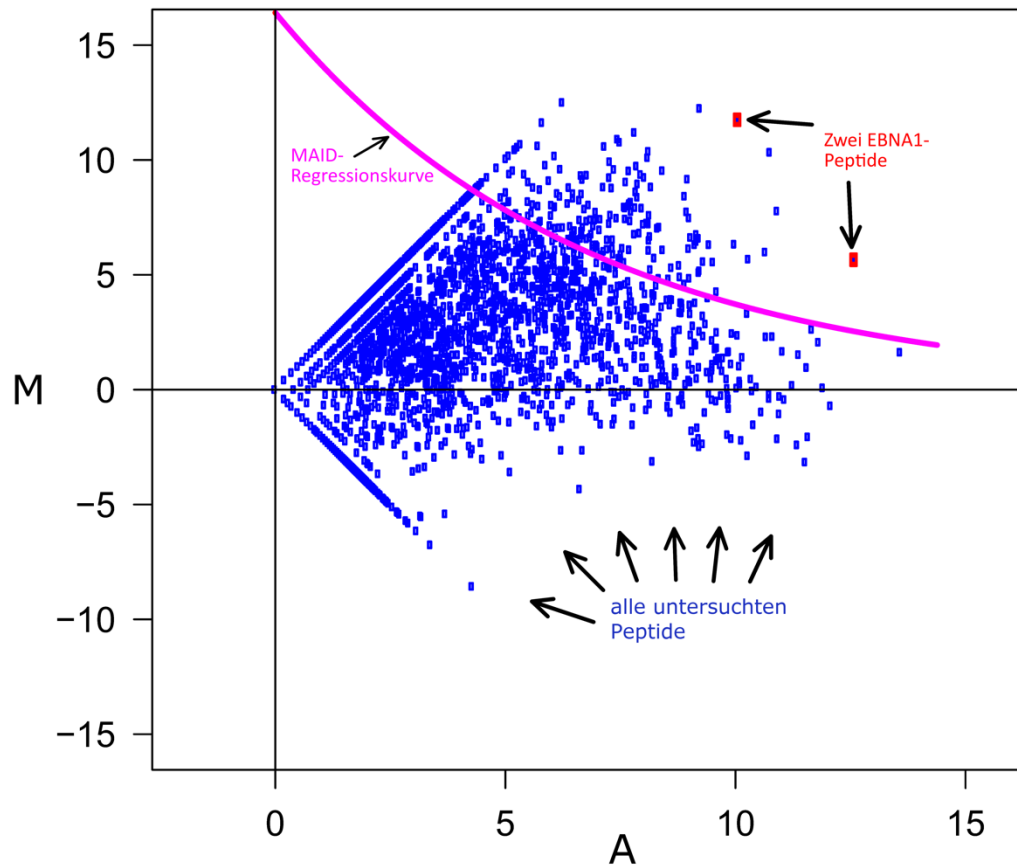


Abbildung 12: Exemplarisches MAID-Filterergebnis im MA-Plot

Das Ergebnis des ersten Filterschrittes unter Verwendung von MAID [144] ist hier exemplarisch anhand der Daten für die Serumprobe von RRMS_06 veranschaulicht. Der mit diesem Serum inkubierte Microarray wurde in diesem Schritt mit dem Negativkontroll-Microarray verglichen (Puffer_02). Das Besondere am MAID-Verfahren ist, dass es für jedes Peptid sowohl die Signalintensität als auch das Intensitätsverhältnis der beiden Microarrays berücksichtigt. A ist das arithmetische Mittel der binären Logarithmen der gemessenen Signale für ein auf beiden Microarrays gespottetes Peptid. Somit bedeutet ein höherer A-Wert eine höhere Signalintensität. M ist der binäre Logarithmus des Verhältnisses der Signalintensitäten eines Peptids auf beiden Arrays. Ein M-Wert von 5 bedeutet also, dass das Signal des Serum-Microarrays 32-mal höher war als das Signal des Negativkontrollarrays. Bei einem M-Wert von 10 ist es bereits 1024-mal höher. Zur Erkennung von Peptiden, die spezifisch von IgG in Serum- oder Liquorproben gebunden wurden, diente die an die Daten gefittete exponentielle MAID-Regressionskurve. Gefiltert wurden letztlich alle Peptide, die über der Kurve liegen. Exemplarisch sind hier zwei überlappende EBNA1-Peptide (GSPRRPPPGRRPFFHPVGE und GRRPFFHPVGEADYFEYHQE) markiert, die die Filterung deutlich überstanden haben. EBNA1=Epstein-Barr nuclear antigen 1; MAID=MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion

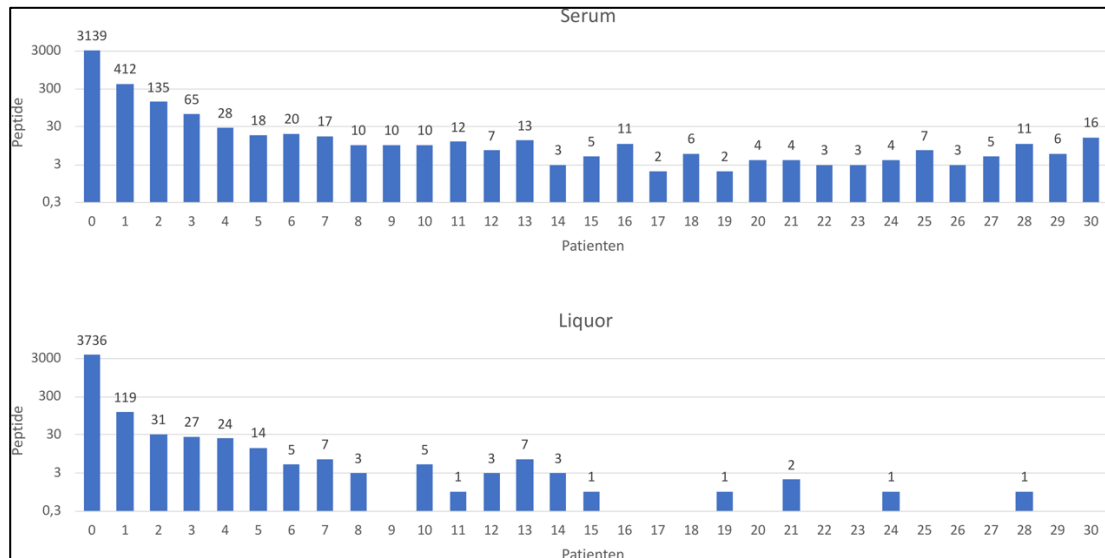


Abbildung 13: Histogramm IgG-spezifischer Reaktivitäten

Diese Abbildung zeigt in logarithmischer Darstellung die Anzahl der Peptide, die für 0, 1, 2, ..., alle 30 Patienten mit deutlichen Antikörperreaktivitäten gefiltert wurden. Die meisten Peptide wurden für keine einzige Serum- bzw. CSF-Patientenprobe als spezifisch gebunden gefiltert. Im Serumdatensatz zeigten circa 21% der Peptide (852/3991) ein Immunglobulin-G-spezifisches Signal in mindestens einer Probe, im Liquordatensatz waren es etwa 6% (255/3991).

Im Serumdatensatz überstanden letztlich etwa 21% der Peptide (852/3991) die erste Filterung und etwa 11% der Peptide (440/3991) wurden als von AK mehr als einer Patientenprobe gebunden identifiziert. Im CSF-Datensatz überstanden nur etwas mehr als 6% der Peptide (255/3991) den ersten Filterschritt und nur etwa 3% der Peptide (136/3991) wurden durch IgG von mehr als einer Patientenprobe spezifisch erkannt. Zwischen identifizierten Peptid-AK-Reaktivitäten der beiden Datensätze (CSF, Serum) gab es eine recht große Überschneidung von 218 Peptiden, sodass in beiden Datensätzen zusammen 889 verschiedene Peptide als spezifisch von IgG gebunden gefiltert wurden. Für 425 dieser 889 Peptide gab es eine signifikante Korrelation zwischen den Serum- und CSF-Daten (Pearson-Korrelation p-Wert < 0,05). Die interindividuelle Variabilität der AK-Reaktivitäten kann in Abbildung 14 nachvollzogen werden.

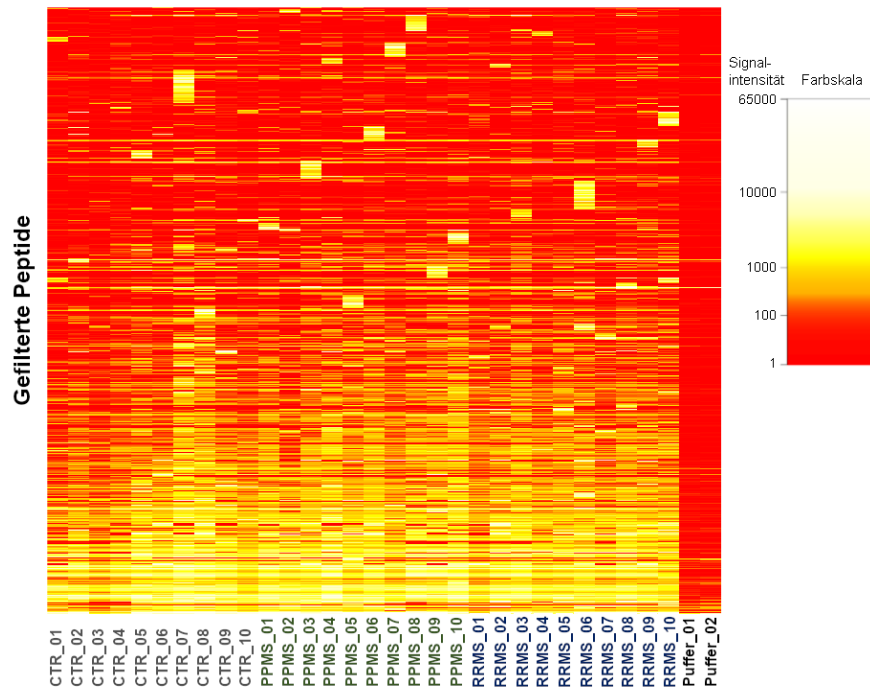


Abbildung 14: Heatmap der individuellen Antikörperprofile

Die Signalintensitäten der Antikörperreaktivitäten für alle 852 anhand der Serumproben gefilterten Peptide sind für die Serumproben aller 30 Patienten sowie für die beiden Negativkontrollen (Puffer) als Heatmap dargestellt. Die Peptide wurden als von IgG spezifisch gebunden gefiltert, wenn für mindestens eine der Serumproben der jeweils zehn RRMS-Patienten, PPMS-Patienten oder Kontrollpersonen, hier mit „CTR“ bezeichnet, spezifische Antikörperreaktivitäten nachgewiesen werden konnten. Es ist deutlich zu erkennen, wie variabel die Stärke der Antikörperreaktivitäten zwischen den Patientenproben ist. Im unteren Abschnitt der Heatmap ist zu sehen, dass für einige Peptide Antikörperreaktivitäten in mehreren Patientenproben gemessen wurden. Hingegen ist im oberen Bereich zu sehen, dass einige Peptide jeweils nur in einer einzigen Patientenprobe deutliche Antikörperreaktivitäten zeigten. Adaptiert nach [146]. CTR=Kontrollpersonen; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

Die Anzahl der pro Probe spezifisch IgG-gebundenen Peptide korrelierte dabei mit der Menge an Gesamt-IgG im Serum bzw. in der CSF (Pearson-Korrelation p-Wert $< 0,05$). Für die Serumprobe jedes Patienten gab es stets mehr gefilterte Peptide als für die paarige CSF-Probe. Für die einzelnen Patienten ist die Anzahl der gefilterten Peptide in Abbildung 15 visualisiert. Unter den untersuchten Peptiden befanden sich 107 Peptide viralen Ursprungs, die der IEDB [138] entnommen wurden, nämlich 103 für EBV und vier für HHV-6 (siehe Kapitel 3.3.1). Während kein von HHV-6 abgeleitetes Peptid im Serum- oder CSF-Datensatz gefiltert wurde, zeigten sich AK-Reaktivitäten gegen 61 der 103 von EBV-Proteinen abgeleiteten Peptide.

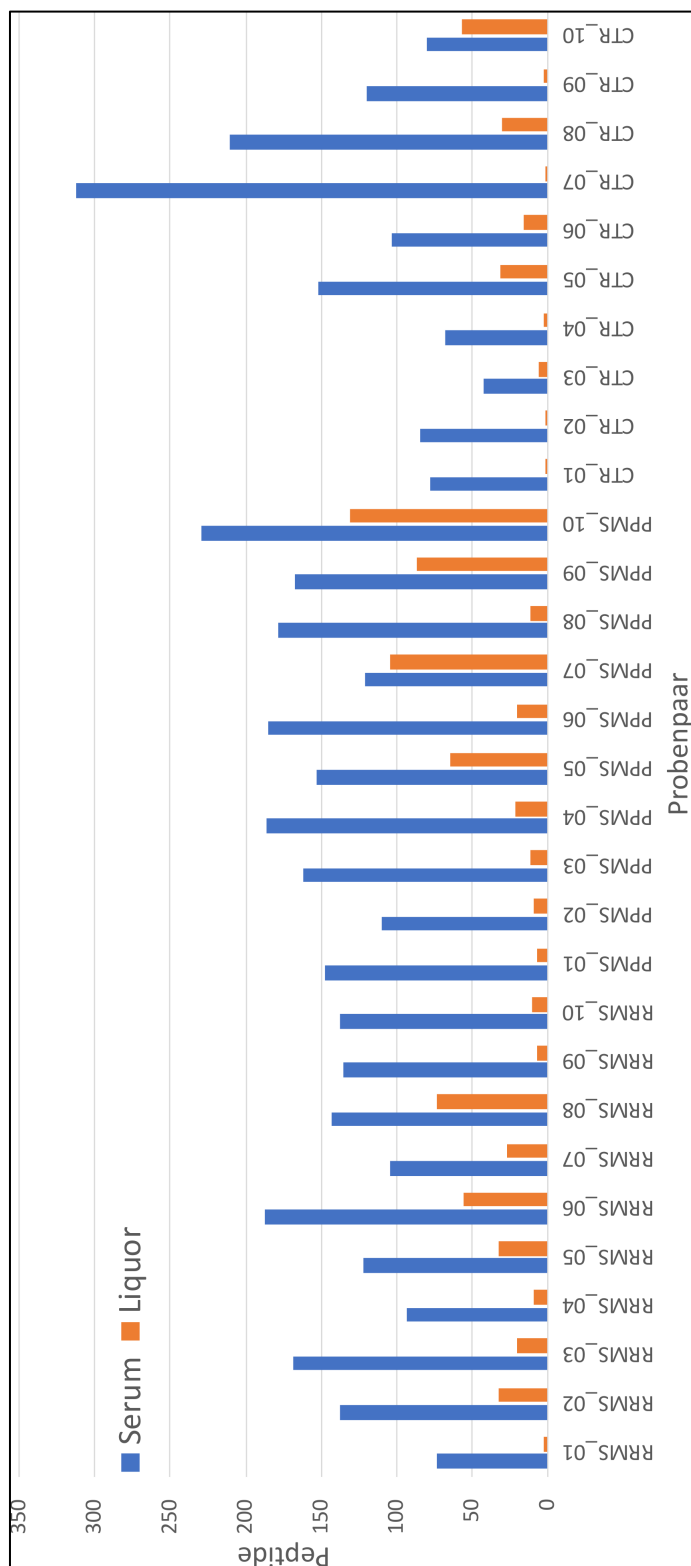


Abbildung 15: Anzahl IgG-gebundener Peptide pro Patient und Probe

Dargestellt ist für die jeweils zehn RRMS-, PPMS- und Kontroll-Patienten die Anzahl der spezifisch von IgG gebundenen Peptide sowohl für die Serumprobe (blaue Balken) als auch für die paarige Liquorprobe (orange Balken). Für die Serumprobe jedes Patienten wurden mehr Peptide gefiltert als für die jeweilige Liquorprobe. CTR=Kontrollpersonen; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

4.3. MS-spezifische Antikörperreaktivitäten

MS-spezifische AK-Reaktivitäten wurden im zweiten Selektionsschritt ermittelt, indem der einseitige exakte Fisher-Test auf die MAID-Ergebnisse des vorherigen Abschnitts angewandt wurde. Hierzu erfolgte der Vergleich der MS-Patientengruppen jeweils getrennt für die CSF- und Serumproben mit der Kontrollgruppe, um gruppenspezifische Unterschiede im AK-Profil festzustellen. Die Peptide wurden als MS-spezifisch klassifiziert, wenn sie in einer Gruppe der Patienten mit der Erkrankung MS signifikant häufiger von IgG gebunden wurden als in der Kontrollgruppe.

Aus dem Datensatz zu den Serumproben ergaben sich bei der Analyse der RRMS-Patienten gegenüber den Kontrollpatienten 13 MS-spezifische Peptide. Bei der Analyse der PPMS-Patienten gegen die Kontrollpatienten wurden 26 Peptide als MS-spezifisch von IgG gebunden gefiltert. Sechs Peptide wurden in beiden Vergleichen gefiltert, sodass für die Serumproben insgesamt 33 verschiedene MS-spezifische Peptid-AK-Reaktivitäten gefiltert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 ausführlich aufgelistet. IgG-Reaktivitäten gegen zwei dieser Peptide wurden auch in den CSF-Proben als MS-spezifisch erkannt, nämlich zum einen für die Aminosäuresequenz „YEDGFSQPRGWNPGE“ der Thyreoperoxidase (TPO) und zum anderen für die Sequenz „PIYEGYALPHAILRL“ von Beta-Aktin (ACTB) bzw. Gamma-Aktin (ACTG). Für Alpha-Crystallin B (CRYAB) wurde gegen die Sequenz CRYAB 1-15 auch für die Negativkontroll-Microarrays, die nur mit dem sekundären AK inkubiert wurden, außergewöhnlich hohe Signalintensitäten festgestellt, was die Frage nach möglichen Kreuzreaktivitäten aufwirft.

Tabelle 6: Ermittelte MS-spezifische Reaktivitäten im Serum

	Peptid	zugehöriges Protein	Serum			Liquor			mittlere Signalintensität			
			RRMS	PPMS	CTR	RRMS	PPMS	CTR	RRMS	PPMS	CTR	Puffer
humane Proteine	KRGILT LKYPTEHGI	ACTB / ACTG (61-75)	4	8	2	0	0	0	451	862	451	2
	LKYPTEHGI VTNWDD	ACTB / ACTG (67-81)	1	7	0	0	0	0	244	440	169	2
	PIYEGYALPHAILRL	ACTB / ACTG (164-178)	3	8	2	0	4	0	1478	8479	1457	48
	SLSTFQQMWISKQY	ACTB / ACTG (348-362)	2	6	1	0	0	0	876	1135	703	21
	AVLAGGLYEYVFCPD	AQP4 (241-255)	10	10	4	1	4	1	1329	2057	975	8
	AGQVFLEELGNHKAF	CN37 (205-219)	0	6	1	0	0	0	218	861	271	3
	MDIAIHHPWIRRPFF	CRYAB (1-15)	3	7	0	1	1	0	25948	40751	10885	4451
	IDFLIEEIERLGQDL	DCE2 (571-585)	1	4	0	0	1	0	430	697	326	5
	DQWREWADSKSCCDY	DPYSL2 (121-135)	0	4	0	0	0	0	278	560	89	10
	SWYDNEFGYSNRVVD	GAPDH (312-326)	9	8	4	0	3	0	1207	1257	595	6
	MHEAEWYRSKFADL	GFAP (250-264)	4	6	0	0	0	0	710	1148	398	6
	DEMARHLQEYQDLLN	GFAP (340-354)	6	4	1	0	0	0	929	659	207	5
	RGQYSRASWEHWS	GFAP Isoform 2 (390-404)	5	7	1	0	1	0	1593	1852	877	48
	ELRPVVHGVWYFNS	MAG (49-63)	9	10	6	0	1	0	1371	1790	1152	15
	LLSNVSPELGGKYYF	MAG (103-117)	2	5	0	0	0	0	414	600	399	3
	CQASFPNTTLQFEGY	MAG (217-231)	2	8	3	0	1	0	707	1391	857	9
	YEDGFSQPRGWNPGF	TPO (181-195)	7	9	4	3	4	0	1570	2122	1607	37
	YSNISKDRRYADLTE	PGAM1 (133-147)	4	7	1	0	0	0	534	1089	337	7
	ELDENGDEVDQFQY	S100A1 (61-75)	5	3	0	1	0	0	2931	1017	176	7
	VAAALTVACNNFFWEN	S100A1 (79-93)	2	5	0	0	0	0	480	717	225	9
	AALTVACNNFFWENS	S100A1 (80-94)	4	8	0	0	1	0	637	1313	400	10
	QQQQFNRRNVEDIELW	SPTAN1 (679-693)	4	2	0	0	0	0	1048	429	54	5
	FFMPGFAPLTAQGSQ	TUBB1 (265-279)	1	8	3	0	1	0	496	1219	679	10
EBV-Proteine	ETFTETWNRFITHE	EAR (63-77)	3	7	0	0	0	0	657	804	239	10
	GRPGAPGGS GSGPRHRDGV	EBNA1 (52-71)	6	4	1	1	2	0	3551	1938	2991	44
	GSGPRHRDGVRRPQKRPSCI	EBNA1 (61-80)	3	7	2	1	1	0	4149	8767	2020	22
	RPQKRPSGICGCKGTHGGTGA	EBNA1 (72-91)	6	7	2	0	0	0	5604	2428	852	36
	GCKGTHGGTGA GAGAGGAGA	EBNA1 (81-100)	4	0	0	1	0	0	772	288	174	18
	SGSPRRPPPPGRRPFFHPVG	EBNA1 (391-410)	5	6	0	0	0	0	11092	11408	1964	565
	PPAAGPPAAGPPAAGPPAAG	EBNA6 (566-595)	8	5	3	1	0	0	9645	1616	1351	26
	QVSLESVDVYFQDVFGTMWC	GP350 (122-141)	10	10	6	4	3	3	8552	7649	7556	13
Mimotope	HTQPYAYEARDH		8	8	1	1	2	0	5688	1382	434	13
	VPQKYWWLSDHT		6	9	3	1	3	1	915	1559	1058	17

Diese Tabelle zeigt die Peptide, die verglichen mit den Proben der Kontrollpersonen signifikant häufiger spezifisch von IgG aus den Serumproben der PPMS- oder der RRMS-Patienten gebunden wurden. In der zweiten Spalte angegeben ist der Identifikator für die Datenbank UniProt sowie die Position der Aminosäuresequenz in der Hauptisoform des Proteins nach Angabe in UniProt [137]. Die Peptide sind unterteilt in humane Proteine, Proteine des Epstein-Barr-Virus und Mimotope. Innerhalb dieser Gruppen sind die Peptide alphabetisch nach Gensymbol („zugehöriges Protein“) sortiert. Fett und kursiv markiert sind überlappende Peptidsequenzen und die zugehörigen Proteine. Für jedes Peptid ist angegeben, wie viele Patienten innerhalb einer Gruppe Serum- bzw. CSF-spezifische Antikörper aufwiesen. Die Zahlen, die etwas größer und fett markiert sind, markieren die jeweilige MS-Patientengruppe, innerhalb der das Peptid signifikant häufiger gebunden wurde. Dies wurde mit dem exakten Fisher-Test berechnet (p -Wert $< 0,05$). Insgesamt wurden 33 Peptide als MS-spezifisch gefiltert. ACTB und ACTG stehen in denselben Zellen, da die jeweilige Peptidsequenz in beiden Proteinen vorkommt. Im rechten Tabellenabschnitt ist die mittlere Signalintensität der Antikörperreaktivitäten in den Serumproben für das jeweilige Peptid aufgeführt. CTR=Kontrollpersonen; EBV=Epstein-Barr-Virus; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

Im CSF-Datensatz wurden AK-Reaktivitäten gegen 23 verschiedene Peptide als MS-spezifisch gefiltert, davon gegen zwei Peptide für den Vergleich RRMS- gegen Kontrollgruppe und gegen 23 Peptide für den Vergleich PPMS- gegen Kontrollgruppe. Somit gab es zwei Peptide, die für beide MS-Gruppen als signifikant häufiger gebunden ermittelt wurden. Die ermittelten Peptide sind in Tabelle 7 mit der Angabe, bei wie vielen Patienten pro Patientengruppe das jeweilige Peptid durch IgG in der jeweiligen CSF-Probe gebunden wurde, und mit der jeweiligen mittleren Signalintensität aufgelistet. Alle 23 Peptide wurden von IgG aus den CSF-Proben von vier PPMS-Patienten (PPMS_05, PPMS_07, PPMS_09, PPMS_10) gebunden. Für diese vier Patienten wurden auch relativ hohe Gesamt-IgG-Konzentrationen (> 80 mg/l) in der CSF-Diagnostik nachgewiesen (siehe Tabelle 3 und Abbildung 8).

Dadurch, dass AK-Reaktivitäten gegen zwei Peptide sowohl im CSF- als auch im Serumdatensatz als MS-spezifisch erkannt wurden, gab es insgesamt 54 verschiedene als MS-spezifisch klassifizierte Peptid-IgG-Reaktivitäten (33 Peptide für die Serumproben, 23 Peptide für die CSF-Proben). AK-Reaktivitäten gegen acht Peptide wurden sowohl in der RRMS- als auch in der PPMS-Gruppe gefiltert (6 im Serum, 2 in der CSF). Die Ergebnisse der einzelnen Schritte des zweistufigen Filterverfahrens sind in Abbildung 16 übersichtlich dargestellt. Es gab kein Peptid, das die Gruppe der MS-Patienten mit 100%iger Sensitivität und Spezifität von den Kontrollpersonen trennte. Das heißt, nur ein Teil der MS-Patienten zeigte AK-Reaktivitäten oder auch Kontrollpatienten zeigten Reaktivitäten gegen die einzelnen Peptide.

Tabelle 7: Ermittelte MS-spezifische Reaktivitäten im Liquor cerebrospinalis

	Peptid	zugehöriges Protein	Serum			Liquor			mittlere Signalintensität			
			RRMS	PPMS	CTR	RRMS	PPMS	CTR	RRMS	PPMS	CTR	Puffer
humane Proteine	PIYEGYALPHAILRL	ACTB / ACTG (164-178)	3	8	2	0	4	0	692	2539	397	48
	PLYFGWFLTKKSET	CN37 (187-201)	4	7	5	0	4	0	370	842	235	21
	LFPTST SLSPFYLRP*	CRYAB (37-51)	0	1	3	2	4	0	4118	7240	2761	593
	SLSPFYLRPP SFLRA*	CRYAB (43-57)	0	0	0	0	4	0	4585	7860	2469	1367
	EGSGRYIPRKPFPDF*	DPYSL2 (463-477)	1	0	0	0	4	0	2512	4700	1143	573
	VHGVWFNSPYPKNY	MAG (55-69)	1	4	4	1	4	0	1354	1977	814	126
	YYFRGDLGGYNQYTF	MAG (115-129)	1	1	1	3	4	0	2395	2418	860	134
	PGFGYGGRASDYKSAHKGFK	MBP (257-276)	1	1	1	0	4	0	597	1564	523	144
	RNVRFSDGGFTCCFF*	MOG (115-129)	0	0	0	0	4	0	140	392	49	2
	ELLVLRQKHSEPSRF	NFL (121-135)	0	2	1	0	4	0	809	1514	336	94
	FFPFISRGKELLWGK	TPO (19-33)	2	5	4	1	4	0	637	1640	558	123
	YEDGFSQPRGWNPGF	TPO (181-195)	7	9	4	3	4	0	905	1305	414	37
	DDRYSDLLMAWQQYI	TPO (223-237)	9	10	10	4	4	0	431	704	67	3
	LTSTVICRWRVLGWK	TPO Isoform 3 (865-879)	0	0	1	0	4	0	260	716	117	75
	QALRDAGYEFDICFT	PGAM1 (43-57)	1	1	1	1	4	0	252	472	143	7
	RQKLEDSEYRFQFFQR*	SPTAN1 (37-51)	0	1	0	0	4	0	1868	3854	1131	576
	YNYKKFSYKTIVMG	TALDO1 (221-235)	0	0	0	0	4	0	683	1567	547	138
EBV-Proteine	GSPPRRPPGRRPFFHPVGE	EBNA1 (392-411)	8	10	8	5	8	2	14490	15898	4074	543
Mimotope	ARWELNLEPLYGPY		10	10	10	8	10	3	3805	4726	1627	34
	EPMTPHQWITLYRSY		1	0	1	1	4	0	1483	1976	588	163
	SCNYHGRTLTCW		4	5	4	2	4	0	1468	2115	741	119
	WHAPQTPYWASM		10	10	10	5	6	1	4637	2137	426	27
	WHIPPNIIGRTFS		4	7	5	1	4	0	1602	2025	496	97

Diese Tabelle zeigt die Peptide, die verglichen mit den Proben der Kontrollpersonen signifikant häufiger spezifisch von IgG aus den Liquorproben der PPMS- oder der RRMS-Patienten gebunden wurden. Der Aufbau der Tabelle folgt der Struktur von Tabelle 6. Zu ergänzen ist, dass im rechten Tabellenabschnitt die mittleren Signalintensitäten der Antikörperreaktivitäten in den Liquorproben angegeben ist und diejenigen Peptide, die ein höheres durchschnittliches Signal in den Liquorproben als in den Serumproben aufwiesen, mit * gekennzeichnet sind. Insgesamt wurden 23 Peptide als MS-spezifisch im Liquor cerebrospinalis gefiltert. CTR=Kontrollpersonen; EBV=Epstein-Barr-Virus; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

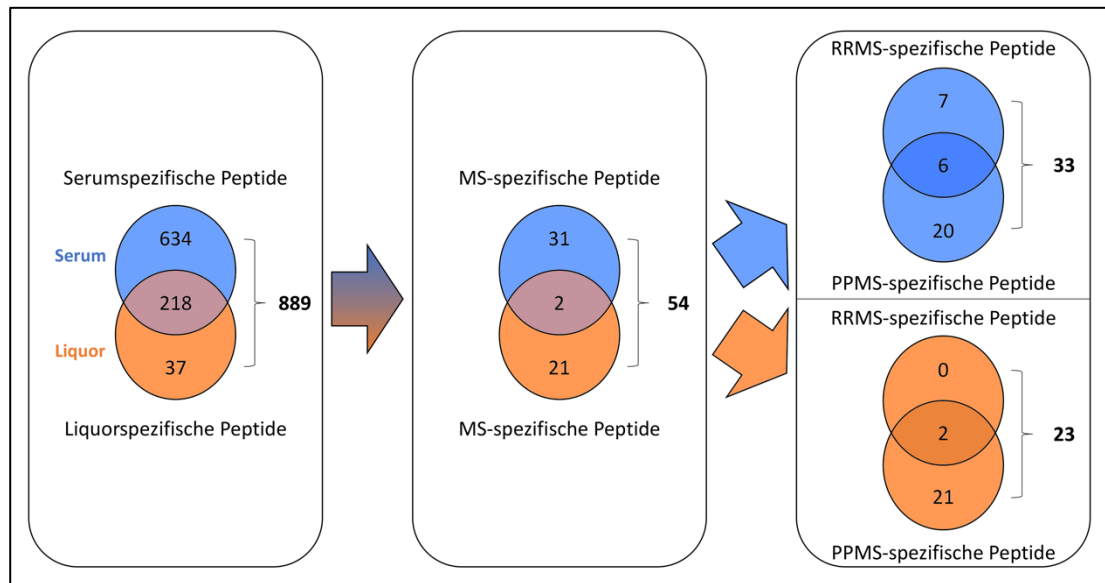


Abbildung 16: Zusammenfassung der Filterergebnisse des Antikörperprofilings

Diese Grafik zeigt in Form von Venn-Diagrammen das Ergebnis des zweistufigen Filterverfahrens zur Suche nach MS-spezifischen Peptid-Antikörper-Reaktivitäten. Es ist zu sehen, wie viele Peptid-Antikörper-Reaktivitäten in den beiden Analyseschritten gefiltert wurden. Den ersten Filterschritt überstanden Peptide nur, wenn sie von Antikörpern von mindestens einer der 60 Proben gebunden wurden. Dies schafften 889 Peptide. Der zweite Filterschritt, in dem nach MS-spezifischen Peptid-Antikörper-Reaktivitäten gesucht wurde, lieferte 54 Peptide. PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

Von diesen 54 Peptiden entstammen 38 Peptide insgesamt 19 unterschiedlichen humanen Proteinen und ihren Isoformen (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Neun weitere Peptide leiten sich von EBV-Proteinen ab. Die restlichen sieben Peptide sind Mimotope, für die in der IEDB [138] angegeben war, dass sie in der Literatur als MS-spezifisch beschrieben wurden. Kein gefiltertes Peptid stammte von einem HHV-6-Protein und keines enthielt die nichtproteinogene Aminosäure Citrullin. Die Ergebnisse der Microarray-Analyse der vorliegenden Arbeit erhielten infolge der Publikation [146] Eingang in die IEDB [138,147].

Bei vier humanen Proteinen, nämlich ACTB, ACTG, S100A1 und CRYAB, wurden überlappende Sequenzen unter den 54 gefilterten Peptid-AK-Reaktivitäten gefunden, wodurch sich in der Epitopsuche die 15-mer-Sequenzen potentiell auf weniger Aminosäuren für die Epitopsuche eingrenzen lassen. So kann bspw. das mutmaßliche Epitop zweier überlappender Peptide von CRYAB (CRYAB 37-51 und CRYAB 43-57) innerhalb der Aminosäuresequenz „SLSPFYLRP“ lokalisiert werden. Das zweite Peptid von CRYAB (CRYAB 1-15), gegen das MS-spezifische AK-Reaktivitäten

Ergebnisse

ermittelt wurden, besitzt die Sequenz „MDIAIHHPWIRRPFF“. „RRPFF“ ist nicht nur eine Teilsequenz von CRYAB 1-15, sondern kommt auch in den ebenfalls als MS-spezifisch gefilterten Peptiden EBNA1 391-410 bzw. EBNA1 392-411 vor. Die Lage der Peptidsequenzen innerhalb der dreidimensionalen Struktur des CRYAB-Proteins ist in Abbildung 17 visualisiert.

Für das EBV-Protein EBNA1 wurden AK-Reaktivitäten gegen überlappende Aminosäuresequenzen gefiltert. Für den Bereich EBNA1 52-100 wurden vier Peptide (EBNA1 52-71, EBNA1 61-80, EBNA1 72-91, EBNA1 81-100) im Serumdatensatz als MS-spezifisch durch IgG gebunden gefiltert. Außerdem war zum einen das EBNA1-Peptid mit der Sequenz „SGSPRRPPPGRRPFFHPVG“ (EBNA1 391-410) signifikant häufiger durch IgG der Serumproben von RRMS- und PPMS-Patienten gebunden und zum anderen ergab die Analyse der AK-Reaktivitäten in der CSF das um lediglich eine Aminosäure nach hinten versetzte Peptid „GSPRRPPPGRRPFFHPVGE“ (EBNA1 392-411) für die PPMS-Gruppe. Insgesamt zeigte jede der 30 Serumproben für mindestens ein EBNA1-Peptid AK-Reaktivitäten.

Nur 54 der 889 IgG-reaktiven Peptide, die den ersten Filterschritt überstanden, wurden im zweiten Filterschritt als MS-spezifisch erkannt. Hieraus wird deutlich, dass zwar prinzipiell gegen viele Peptide AK-Reaktivitäten gemessen werden konnten, diese jedoch meist nicht MS-spezifisch waren. Des Weiteren wird aus den Ergebnissen des zweiten Schritts deutlich, dass AK-Reaktionen auch bei den als MS-spezifisch gefilterten Peptiden nicht immer allein auf die MS-Patienten begrenzt sind. Gegen 20 der 33 Peptide, die im Serumdatensatz ermittelt wurden, zeigte jeweils mindestens eine Kontrollprobe IgG-Reaktivitäten. Für die CSF-Proben war dies bei drei von 23 Peptiden der Fall. Lediglich 18 der 54 verschiedenen gefilterten Peptide wurden nur von IgG der MS-Patientenproben und somit von keiner Kontrollprobe gebunden. Die kompletten Microarray-Daten können in der ergänzenden Datei 4 der MCP-Publikation [146] abgerufen werden.

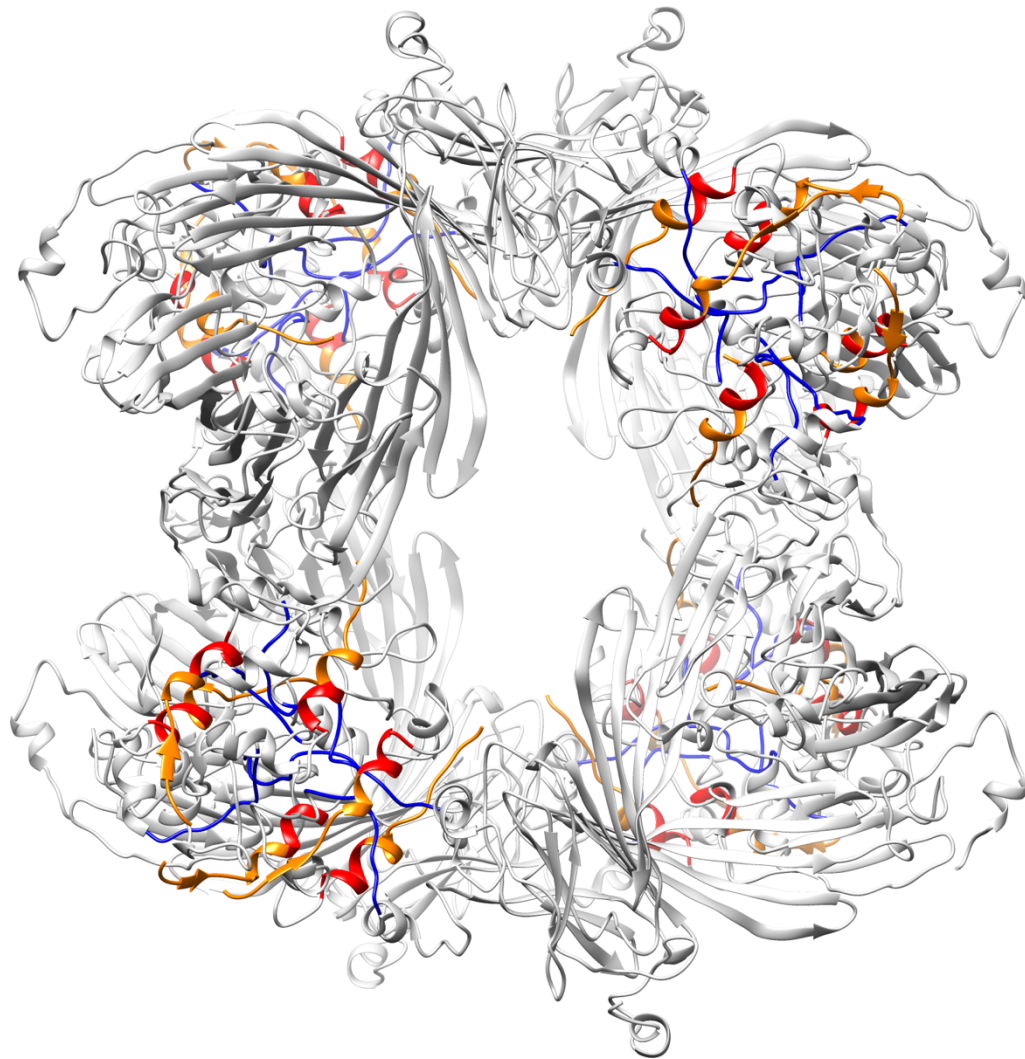


Abbildung 17: Identifizierte Epitope innerhalb von CRYAB

Das Protein CRYAB ist ein Hitzeschockprotein, das unter anderem im ZNS des Menschen exprimiert wird [148]. Die Abbildung zeigt das Protein bestehend aus 24 CRYAB-Untereinheiten, weshalb alle gefärbten Aminosäuresequenzen 24-mal vorkommen. Das Protein ist dargestellt im dreidimensionalen Bändermodell, also inklusive der Sekundärstrukturen wie α -Helix und β -Faltblatt sowie der Quartärstruktur. MS-spezifische Peptid-Antikörper-Reaktivitäten wurden im zweiten Filterschritt gesucht. Dabei konnten zwei mutmaßliche Epitope von CRYAB ermittelt werden. Das als MS-spezifisch gefilterte Peptid von CRYAB (CRYAB 1-15) besitzt die Sequenz „MDIAIHHPWIRRPFF“ und ist hier orange gefärbt. Da die Teilsequenz "RRPFF" ebenfalls innerhalb eines gefilterten EBNA1-Peptids vorkommt, ist der Teilabschnitt hier rot markiert. Das zweite MS-spezifische Epitop mit der Aminosäuresequenz „SLSPFYLRP“, hier blau gekennzeichnet, wird innerhalb zweier überlappender Peptide von CRYAB (CRYAB 37-51 und CRYAB 43-57) vermutet. Die Abbildung wurde mit der Software UCSF Chimera (Version 1.13.1) erstellt. Hier wurde die Vorauswahl „Publication 3“ mit Tiefenansicht und abgerundeten Bändern ausgewählt sowie die Farbe für einen besseren Kontrast auf hellgrau gestellt. PDB-Eintragsnummer 2YGD. CRYAB=Alpha-Crystallin B; EBNA1=Epstein-Barr nuclear antigen 1

4.4. Validierung ausgewählter Reaktivitäten mittels ELISA

Zur Validierung der Ergebnisse des Microarrayexperiments wurden vier Peptide ausgewählt, für die MS-spezifische Peptid-AK-Reaktivitäten gefiltert wurden (CRYAB 1-15, EBNA1 52-71, EBNA1 391-410 und EBNA1 392-411). Hierfür wurde das AK-basierte Standardnachweisverfahren ELISA benutzt (siehe Kapitel 3.4). Die AK-Reaktivitäten gegen diese vier Peptide wurden für die Serumproben mit vier verschiedenen HRP-gekoppelten Anti-Human-IgG-AK überprüft, um mögliche Kreuzreaktivitäten zwischen den sekundären AK und den Peptiden zu detektieren. Für die CSF-Proben wurden nur die aus Anti-IgG-Fab-Fragmenten bestehenden sekundären AK verwendet, welche im Microarrayexperiment mit einem fluoreszierenden Farbstoff und im ELISA-Experiment mit HRP gekoppelt waren.

Die Messwerte des ELISA korrelierten mit den Messwerten der Microarrays für die Serum- und CSF-Proben und auch für alle verwendeten sekundären AK, wobei der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen 0,477 und 0,913 lag (Tabelle 8). Die Korrelation der Daten kann für die Messungen mit dem sekundären AK Zenon in Abbildung 18 graphisch nachvollzogen werden. Die Peptide EBNA1 391-410, EBNA1 392-411 und CRYAB 1-15 enthalten die Aminosäuresequenz „RRPFF“. Zwischen diesen Peptiden korrelierten die ELISA-Messwerte mit den Microarray-Messwerten deutlich und signifikant (p -Werte $< 0,05$). Im Vergleich der gemessenen Peptid-AK-Reaktivitäten dieser drei Peptide mit den gemessenen Werten von EBNA1 52-71 korrelierten die Daten hingegen kaum und nicht signifikant. Die einzelnen Korrelationskoeffizienten für die mit dem sekundären AK Zenon gemessenen AK-Reaktivitäten sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Die in Kapitel 4 beschriebenen Ergebnisse erhielten Eingang in eine Publikation, die im Journal *Molecular & Cellular Proteomics* (MCP) veröffentlicht wurde [146].

Tabelle 8: Korrelation der ELISA- und Microarray-Messwerte

Serum		Microarray			
		CRYAB 1-15	EBNA1 391-410	EBNA1 392-411	EBNA1 52-71
ELISA	CRYAB 1-15	0,601	0,413	0,736	0,064
	EBNA1 391-410	0,715	0,790	0,733	-0,066
	EBNA1 392-411	0,614	0,664	0,652	-0,106
	EBNA1 52-71	0,162	-0,080	0,120	0,588
Liquor		Microarray			
		CRYAB 1-15	EBNA1 391-410	EBNA1 392-411	EBNA1 52-71
ELISA	CRYAB 1-15	0,745	0,715	0,691	0,139
	EBNA1 391-410	0,662	0,705	0,906	0,176
	EBNA1 392-411	0,670	0,718	0,913	0,192
	EBNA1 52-71	0,358	0,146	0,224	0,477

Diese Tabellen zeigen die Pearson-Korrelationskoeffizienten für den Vergleich der optischen Dichten der Validierung mittels ELISA mit den gemessenen Signalintensitäten im Microarray-Experiment. Die Messwerte korrelierten für den Vergleich des gleichen Peptids sowohl für den Serum- als auch für den Liquordatensatz stark und signifikant (p -Werte $< 0,01$). Auch unter den Peptiden CRYAB 1-15, EBNA1 391-410 und EBNA1 392-411, welche die gemeinsame Aminosäuresequenz „RRPFF“ aufweisen, korrelierten die Daten stark und signifikant (p -Werte $< 0,05$). Für EBNA1 52-71 hingegen korrelierten die gemessenen Antikörperreaktivitäten meist kaum und nicht signifikant mit den drei anderen Peptiden. Die hier gezeigten Daten basieren auf den Messungen mit den Zenon-Fab-Fragmenten als sekundäre Antikörper. CRYAB=Alpha-Crystallin B; EBNA1=Epstein-Barr nuclear antigen 1

Wie schon bei den Ergebnissen der Microarrayanalyse wurden die Peptide CRYAB 1-15 und EBNA1 391-410 signifikant häufiger von IgG der Serumproben der PPMS-Patienten gebunden (p -Werte nach dem einseitigen exakten Fisher-Test $< 0,05$) (Tabelle 9). Im CSF-Datensatz wurden alle untersuchten Peptide häufiger durch IgG der PPMS-Patientenproben als durch IgG der Kontrollpersonen gebunden (in der Microarrayanalyse nur EBNA 392-411). Im Gegensatz zum Microarrayexperiment gab es keine Kreuzreaktionen der sekundären AK mit den untersuchten Peptiden (optische Dichte $\leq 0,040$ für 19 von 20 Negativkontroll-Messungen). Für die vollständigen ELISA-Daten sei auf die ergänzende Datei 7 der MCP-Publikation [146] verwiesen.

Tabelle 9: Ergebnisse des ELISA-Validierungsexperiments

Peptid	zugehöriges Protein	Serum			mittlere OD (Serum)		
		RRMS	PPMS	CTR	RRMS	PPMS	CTR
MDIAIHHPWIRRPFF	CRYAB (1-15)	1	6	1	0,313	0,731	0,400
SGSPRRPPPGRPPFFHPVG	EBNA1 (391-410)	6	9	4	0,945	0,929	0,635
GSPPRRPPPGRPPFFHPVGE	EBNA1 (392-411)	3	3	1	0,485	0,491	0,369
GRPGAPGGSGSGPRHRDGVR	EBNA1 (52-71)	3	4	3	0,492	0,508	0,473

Peptid	zugehöriges Protein	Liquor			mittlere OD (Liquor)		
		RRMS	PPMS	CTR	RRMS	PPMS	CTR
MDIAIHHPWIRRPFF	CRYAB (1-15)	5	9	3	0,086	0,205	0,061
SGSPRRPPPGRPPFFHPVG	EBNA1 (391-410)	5	9	3	0,129	0,163	0,074
GSPPRRPPPGRPPFFHPVGE	EBNA1 (392-411)	5	9	4	0,144	0,173	0,077
GRPGAPGGSGSGPRHRDGVR	EBNA1 (52-71)	3	6	1	0,049	0,076	0,045

Diese Tabellen zeigen die ELISA-Daten für die vier Peptide, die im Microarray-Experiment als MS-spezifisch gefiltert wurden und zur Validierung mittels ELISA ausgewählt wurden. Die Anzahl der Patienten mit Serum- bzw. Liquor-spezifischen Antikörperreaktivitäten ist für jedes Peptid angegeben. Als Toleranzgrenze, um als spezifisch gebunden klassifiziert zu werden, diente hier eine optische Dichte von 0,610 für die Serumproben und eine optische Dichte von 0,065 für die Liquorproben. Mit dem einseitigen exakten Fisher-Test wurde berechnet, ob die Peptide verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant häufiger von IgG der PPMS- bzw. RRMS-Patienten gebunden wurden. Die Zahlen für MS-spezifische Peptid-Antikörper-Reaktivitäten sind etwas größer und fett markiert. Im rechten Abschnitt der Tabelle ist die jeweilige mittlere optische Dichte für jede Patientengruppe angegeben. Die hier gezeigten Daten basieren auf den Messungen mit den Zenon-Fab-Fragmenten als sekundäre Antikörper. CTR=Kontrollpersonen; OD=optische Dichte; PPMS=primär progrediente Multiple Sklerose; RRMS=schubförmig remittierende Multiple Sklerose

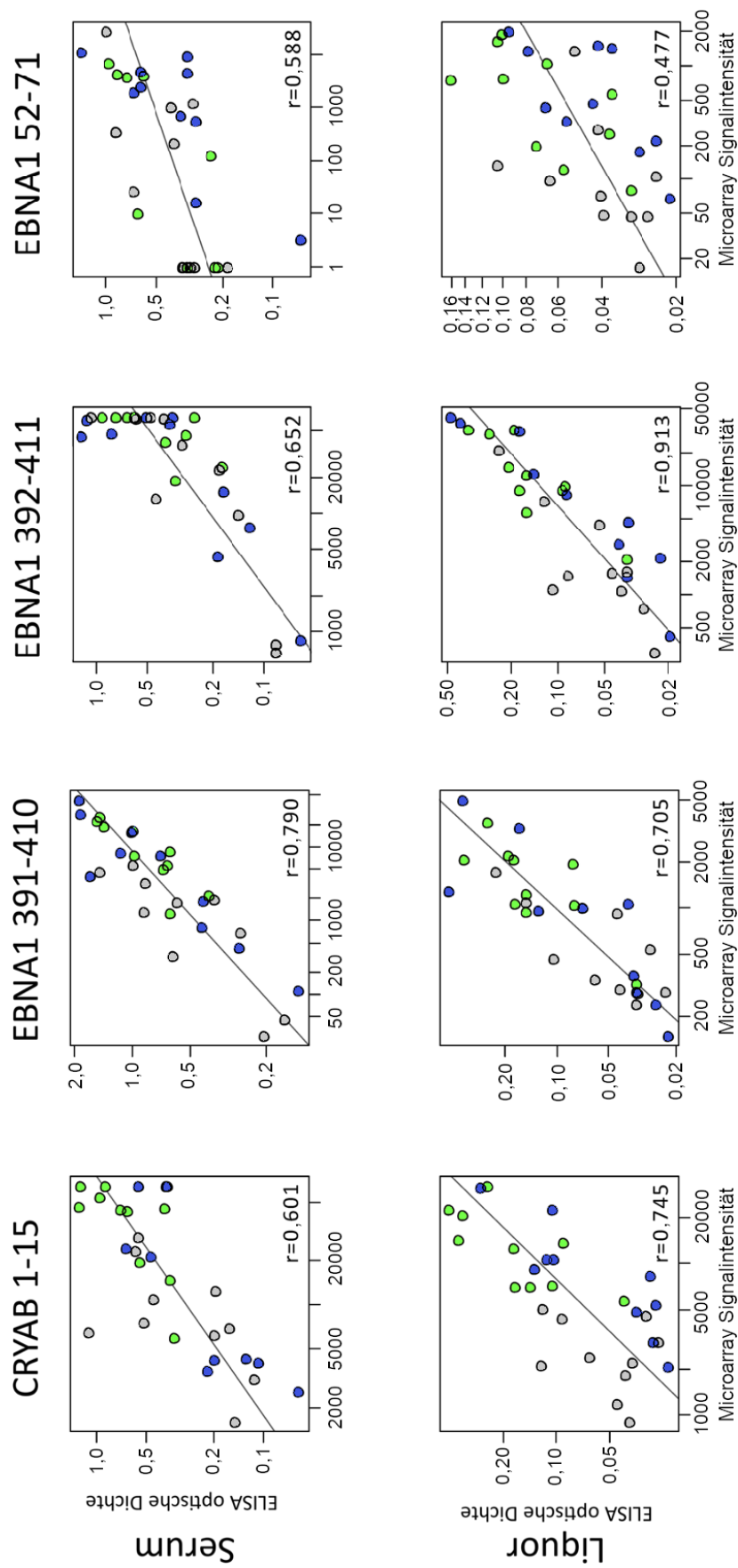


Abbildung 18: Korrelation der ELISA- und Microarraydaten

Die Gruppe der MS-Patienten zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe im Serum bzw. Liquor cerebrospinalis signifikant häufiger Antikörperreaktivitäten gegen Peptide von CRYAB und EBNA1. Die Microarray-Daten für vier Peptide dieser Proteine wurden mit ELISA validiert, nämlich CRYAB 1-15, EBNA1 391-410, EBNA1 392-411 und EBNA1 52-71. Der verwendete sekundäre Antikörper war in beiden Messverfahren bis auf das konjugierte Markierungsmolekül identisch. Für alle vier Peptide korrelierten die Daten mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen 0,477 und 0,913. Die graue Linie kennzeichnet jeweils die orthogonale lineare Regressionsgerade. Die Achsen sind logarithmisch eingeteilt. Blau gefärbt sind die Datenpunkte für die RRMS-Patienten, grün die Datenpunkte für die PPMS-Patienten und grau die Datenpunkte der Kontrollpersonen. CRYAB=Alpha-Crystallin B; EBNA1=Epstein-Barr nuclear antigen 1

5. Diskussion

5.1. Einordnung der Daten aus dem Antikörperscreening

In einer Vielzahl von Studien wurde bereits nach MS-spezifischen AK-Reaktivitäten gesucht, die als Biomarker hilfreich sein könnten [82,117,149]. Zunehmend sind dabei AK-Profiling-Ansätze von Interesse [150]. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe hochdichter Peptid-Microarrays AK-Reaktivitäten gegen 3991 Peptide gleichzeitig analysiert. Es wurden paarige Serum- und CSF-Proben von zehn RRMS-, zehn PPMS- und zehn Kontrollpatienten verwendet, um nicht nur Unterschiede zwischen den AK-Profilen der Patientengruppen, sondern auch zwischen den beiden Kompartimenten ermitteln zu können. Das Design der Microarrays erfolgte durch die Arbeitsgruppe Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock. Sie sind in der Form somit nicht direkt kommerziell erwerbbar. Etwa 94% der Peptide stammten von 45 menschlichen Proteinen mit allen Isoformen, welche mit überlappenden Peptidsequenzen vollständig abgebildet waren. Weitere 107 Peptide waren viralen Ursprungs. Die Auswahl der Proteine erfolgte, da sie in der Literatur zuvor als MS-spezifische Autoantigene beschrieben wurden. Die Untersuchung von IgG-Reaktivitäten gegen eine so große Anzahl an humanen und viralen Peptidsequenzen parallel in der CSF und Serum ist ein wesentliches Alleinstellungsmerkmal dieser Arbeit. In den nachfolgenden Absätzen werden die angewandte Methodik sowie Grundsätzliches zu den Ergebnissen der beiden Filterschritte diskutiert, bevor in den Kapiteln 5.2 bis 5.4 MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen einzelne Peptide analysiert und abschließend ein Ausblick über die mögliche Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt wird.

Nur wenige der getesteten Peptide wurden durch IgG von mehr als einer Patientenprobe gebunden (etwa 11% im Serumdatsatz, etwa 3% im CSF-Datsatz). Das verdeutlicht, dass das individuelle AK-Repertoire sehr unterschiedlich ist, da es sowohl von genetischen Faktoren als auch von Umwelteinflüssen (z. B. durchlebte Infektionen und Impfungen) geprägt wird [151]. Die Individualität des Immunglobulin-Repertoires konnte schon in vorherigen Studien gezeigt werden [133]. Von den 3991 untersuchten Peptiden überstanden den ersten Filterschritt nur 889 Peptide, was ein typisches Ergebnis für solch eine Analyse ist [133]. Schlussendlich fanden sich MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen 54 Peptide. Dabei existierten

einige Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Kompartimenten Blut und CSF. Im Serumdatensatz wurden AK-Reaktivitäten gegen 33 Peptide als MS-spezifisch klassifiziert, im CSF-Datensatz waren es 23 Peptide, sodass es nur zwei für beide Datensätze als MS-spezifisch gefilterte Peptide gab. Bei MS, aber auch bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie Infektionen, Kollagenosen und Autoimmunenzephalitiden sind unterschiedliche Immunreaktionen in beiden Kompartimenten bekannt, was die Ursache von OCB ist [152–154]. Es ist zudem zu bedenken, dass die erhobenen Daten unterschiedlichen Einflussgrößen unterliegen (wie Konzentration und Affinität der AK, Reaktivität der sekundären AK oder technische Ungenauigkeiten). Auch kann die Konzentration bestimmter AK in der CSF erniedrigt sein, wenn sie vor Ort an entsprechende Antigene gebunden sind. In mehreren Studien wurden solche AK-Ablagerungen im ZNS von MS-Patienten schon beschrieben [155,156].

Gegen kein bestimmtes Peptid fanden sich AK-Reaktivitäten für alle Patienten der RRMS- bzw. PPMS-Gruppe, aber nicht in der Gruppe der Kontrollpatienten, und gegen viele Peptide waren ebenso AK-Reaktionen der Kontrollproben zu sehen. Lediglich für 18 der 54 als MS-spezifisch gefilterten Peptide war die Signalstärke bei allen Kontrollproben unterhalb der Toleranzgrenze des ersten Filterschritts. Eine mögliche Erklärung ist, dass bestimmte Immunreaktionen bei MS-Patienten zwar häufiger anzufinden sind oder stärker ablaufen, sie jedoch prinzipiell bei Nichterkrankten ebenfalls vorkommen und ihr Nachweis allein nicht hochspezifisch für die MS bzw. eine MS-Verlaufsform ist. Auto-AK, die in CSF und Serum gefunden werden können, können auch bei gesunden Probanden auftreten [157,158]. Dies konnte in einer Studie für drei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten und in der CSF nicht als MS-spezifisch gefilterten Peptide (HSPD1, HSPA8, TUBB; siehe Tabelle 5 auf Seite 35) gezeigt werden [159]. Die Relevanz physiologisch vorkommender Auto-AK ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie der Entfernung von Zelltrümmern und der Aufrechterhaltung der Homöostase dienen und an wichtigen Funktionen wie Zellreparatur oder axonalem Wachstum beteiligt sind [157,158].

Bei 93% der Patientenprobenpaare war eine höhere mittlere Signalintensität im Serumdatensatz als im CSF-Datensatz zu sehen. Dadurch, dass die Serumproben stärker verdünnt wurden als die CSF-Proben, ist der Vergleich erschwert. Dennoch

zeigten sich Hinweise für eine intrathekale IgG-Synthese. So waren die mittleren Signale der CRYAB-Peptide des zweiten Epitops (CRYAB 37-57) für die CSF-Proben stärker als für die Serumproben. Die Patientenkohorte mit jeweils zehn Patienten in jeder Gruppe war ziemlich klein. Dennoch wurden mehr als die Hälfte der Peptide, die für die RRMS-Gruppe gefiltert wurden, auch für die PPMS-Gruppe gefiltert (n=8). Die Konsistenz der Ergebnisse wird zudem dadurch unterstützt, dass für die humanen Proteine ACTB, ACTG, CRYAB und S100A1 sowie das EBV-Protein EBNA1 AK-Reaktivitäten gegen überlappende Peptidsequenzen gefunden wurden. Die deutliche Korrelation der Microarray- mit den ELISA-Daten untermauert die Qualität der Daten bzw. die Reliabilität der Erfassung individueller AK-Profile.

Insgesamt wurden MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen wesentlich mehr Peptide für die PPMS-Gruppe (n=47) als für die RRMS-Gruppe (n=15) ermittelt. Dies kann teilweise dadurch erklärt werden, dass vier PPMS-Patienten AK-Reaktivitäten gegen alle Peptide aufwiesen, für die in der CSF MS-spezifische AK-Reaktivitäten nachgewiesen wurden. Diese vier Patienten wiesen einen hohen IgG-Spiegel in der CSF auf, was auf eine intrathekale Immunglobulinsynthese hindeutet. In vorherigen Studien konnte schon gezeigt werden, dass eine erhöhte intrathekale IgG-Produktion mit einer stärkeren Progression der Erkrankung einhergeht [107]. Aber auch für die Serumproben der PPMS-Gruppe wurden AK-Reaktivitäten gegen mehr Peptide als für die Serumproben der RRMS-Gruppe als MS-spezifisch ermittelt. Die breitere Immunantwort gegen körpereigene Proteine könnte mit dem Grad der Behinderung korrelieren: In der PPMS-Gruppe war der EDSS mit 4,1 wesentlich höher als in der RRMS-Gruppe mit 2,4. Im Laufe der Erkrankung könnte es zu einem *epitope spreading* (siehe Kapitel 1.1.2.4) kommen, woraufhin Auto-AK gegen mehrere Peptidsequenzen gebildet werden [63]. Möglich ist, dass die bei PPMS eher diffus ablaufende Entzündungsreaktion der grauen und weißen Substanz [46] sich in einer breiteren Immunantwort widerspiegelt. Bei RRMS hingegen läuft die Entzündung insbesondere fokal ab [46].

Obwohl die analysierten 45 humanen Proteine mit 3747 überlappenden Peptiden deshalb auf den Microarrays abgebildet waren, da andere Studien sie zuvor als Autoantigene bei MS identifizierten, wurden AK-Reaktivitäten gegen lediglich 38 Peptide von 19 dieser menschlichen Proteine gefiltert. Dass AK-Reaktivitäten gegen so wenige Peptide gefiltert wurden, liegt insbesondere daran, dass ein Antigen meist

nur eine geringe Dichte an Epitopen besitzt und die immundominanten B-Zell-Regionen von nur wenigen Epitopen gebildet werden [160]. Außerdem ist die MS klinisch eine sehr heterogene Erkrankung. Wenn AK gegen bestimmte Proteine nur bei einer Subgruppe ($\leq 3/10$) an MS-Patienten vorkamen, war die geringe Größe des untersuchten Patientenkollektivs nicht dafür geeignet, diese mit statistischer Signifikanz zu identifizieren. Bedingt durch das Studiendesign waren überlappende Teilsequenzen der Proteine auf den Arrays abgebildet. Daher konnten nur lineare Epitope gefunden werden. Sollten für die untersuchten Proteine Konformationsepitope eine Rolle spielen (wie in Kapitel 5.2.3 für Epitope in MOG-Schleifen geschildert), blieben sie in dieser Studie unauffindbar. Allerdings konnten Epitope entdeckt werden, die sonst in der natürlichen Konformation verborgen und bspw. erst durch Denaturierung zugänglich sind (wie in Kapitel 5.2.7 für ein intrazelluläres AQP4-Epitop dargelegt). Daher ist die pathologische Bedeutsamkeit der hier ermittelten AK-Reaktivitäten *in vivo* ungeklärt und bedarf weiterer Forschungsbemühungen.

5.2. Antikörper gegen humane Proteine

In dieser Studie wurden die Peptidsequenzen von 45 Proteinen mit all ihren Isoformen für das AK-Screening berücksichtigt. AK-Reaktivitäten gegen Peptide von 19 dieser Proteine wurden als MS-spezifisch gefiltert. Auf diese potentiellen Autoantigene wird in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit im Myelin des ZNS [161] und folgend alphabetisch näher eingegangen.

5.2.1. Myelin-Basisches Protein (MBP)

AK-Reaktivitäten gegen das Peptid MBP 257-276 mit der Aminosäuresequenz „PGFGYGGRASDYKSAHKGFK“ wurden als MS-spezifisch in den CSF-Proben der PPMS-Patienten gefiltert.

MBP ist mit 30% das zweithäufigste Protein des Myelins im ZNS [161]. Es hat zahlreiche Aufgaben wie die Strukturierung der Myelinscheide durch Interaktionen mit anderen Proteinen und Molekülen wie den Lipiden des Myelins [162]. MBP wurde als eines der ersten Proteine zur Auslösung einer EAE im Tiermodell verwendet und initiiert dort eine T- und B-Zell-Reaktion, welche pathologische Prozesse im ZNS hervorruft, die viele weitere Gemeinsamkeiten mit MS aufweisen [59]. Die in dieser

Arbeit gefilterte Sequenz dieses Peptids überlappt mit drei Peptiden, die in einer anderen Studie von Belogurov *et al.* untersucht wurden [163]. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit zeigte in deren Studie die Patientengruppe mit einer progressiven MS-Verlaufsform (PPMS bzw. SPMS) signifikant stärkere AK-Reaktionen gegen diese Peptide; allerdings verwendete die Forschergruppe nur Serumproben [163]. Außerdem findet man AK gegen Abschnitte dieser MBP-Sequenz (MBP 257-276) ebenfalls bei anderen Erkrankungen. So wurden Serum-AK-Reaktivitäten gegen das MBP-Peptid „**HKGFKGVD**“ auch bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, Sjögren-Syndrom und rheumatoider Arthritis beobachtet [164]. In anderen Studien wurde die Sequenz „**LSRFSWGAEGQKPGFGYGG**“ als immundominante MBP-Region und als Angriffspunkt für katalytische AK (Abzyme) bei MS beschrieben [165]. Solche AK gegen dieses Epitop wurden jedoch ebenfalls bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses identifiziert [166]. Bei einer Autoimmunenzephalitis, die als Nebenwirkung einer veralteten Form der Tollwutprophylaxe mit einem Nervengewebsimpfstoff (Semple-Impfung) entstehen kann [167], finden sich bei fast einem Drittel der Erkrankten AK gegen die MBP-Sequenz „**SAHKGFKGVDAQGTLSKIFK**“ im Serum [168]. Jog *et al.* identifizierten im Serum MS-spezifische AK gegen EBNA1 411–426, welche isoliert wurden und anschließend MBP 205–224 banden [169]. Die Autoren postulierten daher eine Kreuzreaktivität nach EBV-Infektion [169]. Beide Peptide wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht als MS-spezifisch identifiziert. Die pathologische Relevanz von AK gegen MBP ist auch nach neueren Untersuchungen nach wie vor ungeklärt und diese AK finden sich nicht nur bei Patienten mit anderen Erkrankungen, sondern auch bei Gesunden [117,170]. Während einige Studien ein erhöhtes Risiko für den Übergang eines CIS zur manifesten MS bei Vorhandensein von AK gegen MBP und MOG zeigten [171], konnten andere Studien diese Ergebnisse nicht reproduzieren [172]. AK gegen MBP könnten somit als Begleitphänomen bei Autoimmunerkrankungen angesehen werden und scheinen nicht spezifisch für MS zu sein.

5.2.2. 2',3'-Cyclonukleotid-3'-Phosphodiesterase (CN37)

In der hier vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen das Peptid CN37 (2',3'-Cyclonukleotid-3'-Phosphodiesterase) 187-201 als PPMS-spezifisch in den

CSF-Proben und gegen das daneben liegende Peptid CN37 205-219 als PPMS-spezifisch in den Serumproben gefiltert.

CN37 ist das dritthäufigste Enzym des Myelins im ZNS (n=5%) [161], dessen Funktionen noch nicht gänzlich geklärt sind [173]. Das Protein wurde für diese Arbeit ausgewählt, da Lovato *et al.* zuvor spezifische AK-Reaktivitäten bei fast der Hälfte der in die Analyse eingeschlossenen MS-Patienten feststellten [174]. Die Suche in der IEDB [138] nach weiteren Studien zu Anti-CN37-AK bei MS lieferte jedoch keinen weiteren Treffer (Stand Dezember 2024). Somit ist weitergehende Forschung zur Funktion von CN37 sowie zu Anti-CN37-AK bei MS notwendig. Das Vorhandensein von Anti-CN37-AK in Serum und CSF von MS-Patienten sollte in weiteren Studien validiert und die Möglichkeit einer frühzeitigen Einordnung in eine PPMS genauer untersucht werden.

5.2.3. Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)

AK-Reaktivitäten gegen das Peptid MOG 115-129 mit der Aminosäuresequenz „RNVRFSDGGFTCFF“ wurden in der vorliegenden Arbeit als MS-spezifisch gefiltert. Wenngleich dieses Peptid nur von AK aus den vier CSF-Proben der PPMS-Patientengruppe (PPMS_05, PPMS_07, PPMS_09, PPMS_10) gebunden wurde, die CSF-spezifische AK-Reaktivitäten gegen alle 23 in der CSF gefilterten Peptide zeigten, kann dies ein Hinweis auf eine Anti-MOG-spezifische intrathekale AK-Synthese bei einer Untergruppe von MS-Patienten sein.

MOG macht etwa 1% der Myelinproteine im ZNS aus und ist somit ein relativ kleiner Bestandteil des Myelins im ZNS [161] und wird nur dort sowie auf Oligodendrozyten exprimiert [175]. Wie MBP wurde seine Rolle bei der MS schon früh diskutiert und es wurde deshalb auch im Tiermodell dafür benutzt, um eine EAE auszulösen [59]. In einer Studie verwendeten Haase *et al.* Serumproben von 17 MS-Patienten [176]. Zwar waren AK gegen die beiden Peptidsequenzen „IGEGKVTLRIRNVRFSDGGFTCFF“ und „RFSDEGGFTCFRDRHYSYQEEAAMEL“ unter den MS-Patienten häufiger zu finden, jedoch ergab sich kein so deutlicher Unterschied zwischen schubförmig (70% bzw. 50% der jeweiligen Patientenproben wiesen spezifische AK auf) und progressiv Erkrankten (57% bzw. 71%) wie in der hier vorliegenden Arbeit [176]. In einer

weiteren Studie untersuchten Guggenmos *et al.* Kreuzreaktivitäten zwischen MOG und dem Milchprotein Butyrophilin, um festzustellen, ob ernährungsbedingte AK gegen Butyrophilin bzw. MOG durch molekulare Mimikry bedeutsam für die Pathogenese der MS sind [177]. Hierfür verwendeten sie paarige Serum- und CSF-Proben von 35 MS-Patienten. Für ein Peptid, welches die Aminosäuresequenz von MOG 115-129 enthält („IGEGKVTLRIRNVRFSDEGGFTCF“), fanden sie bei 60% der CSF-Proben und nur bei 9% der Serumproben der MS-Patienten spezifisch bindende AK [177]. Dies untermauert die Annahme einer intrathekalen Produktion von AK gegen das Peptid MOG 115-129. In einer anderen Studie von Khalil *et al.*, in der überlappende MOG-Peptide und Serumproben von MS-Patienten benutzt wurden, wurden AK gegen das Peptid („SGSGTLRIRNVRFSDE“) bei ca. einem Viertel der MS-Patienten festgestellt [178]. Peptide, welche die umliegende Aminosäuresequenz abdeckten, wurden hingegen von AK keiner oder sehr weniger (n=1) Patientenproben gebunden [178]. Die Literaturangaben zur Häufigkeit von Anti-MOG-AK schwanken erheblich. So liegt die angegebene Häufigkeit dieser AK bei 0-80% für MS-Patienten und bei 0-60% für Gesunde [179]. Ein 2019 publiziertes Review ermittelte je nach Analysemethode eine mittlere Häufigkeit von MOG-AK bei MS-Patienten zwischen 1,5% und 20% und bei Kontrollpersonen zwischen 0,8% und 12,8%, wobei die mittels ELISA/Immunoblot bestimmte Häufigkeit für MS-Patienten in den einzelnen Studien zwischen 1,7% und 46,9% und für Kontrollpatienten zwischen 0% und 27,8% schwankte [180]. Des Weiteren werden AK gegen MOG nicht nur bei MS, sondern auch bei anderen disseminierten ZNS-Erkrankungen (z. B. akute disseminierte Enzephalomyelitis, NMOSD, NNO oder transverse Myelitis) gefunden und sind dort im direkten Vergleich mit MS wesentlich häufiger (je nach Analyseverfahren mittlere OR zwischen 1,5 und 24,3 für eine andere demyelinisierende ZNS-Erkrankung als MS bei nachgewiesenen MOG-AK) [180]. Mayer *et al.* untersuchten Serum-AK gegen mögliche Konformationsepitope von MOG bei Patienten mit inflammatorischen ZNS-Erkrankungen (MS, akute demyelinisierende Enzephalomyelitis, Anti-AQP4-negative NMOSD, NNO, transverse Myelitis, chronische inflammatorische Optikusneuritis) [181]. Alle von Mayer *et al.* identifizierten Epitope lagen im Bereich der Schleifen von intaktem MOG, sodass diese Epitope in der hier vorliegenden Arbeit als lineare Epitope vermutlich nicht detektiert werden konnten. Solche Konformationsepitope lassen sich am besten mit zellbasierten Assays nachweisen.

5.2.4. Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG)

AK-Reaktivitäten gegen fünf Peptide des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) wurden als MS-spezifisch gefiltert, drei davon in den Serumproben und zwei in den CSF-Proben. Die hier gefilterte AK-Reaktivitäten gegen diese fünf Peptidsequenzen befinden sich in drei auseinander liegenden Regionen des Proteins (MAG 49-69, 103-129 und 217-231). Diese Streuung kann ein Hinweis auf das in Kapitel 1.1.2.4 beschriebene *epitope spreading* sein, was im Laufe einer Autoimmunerkrankung auftreten kann.

MAG ist ein weiteres Myelinprotein (0,7% der Myelinproteine im ZNS) [161] und wurde für die Analyse ausgewählt, da in einer älteren Studie von Wajgt *et al.* AK in der CSF von MS-Patienten signifikant häufiger MAG banden als AK in der CSF von Kontroll-Patienten [182]. In der IEDB [138] findet sich (Stand Dezember 2024) nur eine weitere Studie bei der Suche nach humanen AK-Reaktivitäten gegen humanes MAG: Andersson *et al.* untersuchten B- und T-Zellreaktivitäten von Patienten mit MS und Polyneuropathie verschiedener Ätiologien gegen fünf MAG-Peptide, die zwischen 17 und 23 Aminosäuren lang waren [183]. Dabei gab es keine Überschneidungen mit den in der vorliegenden Arbeit als MS-spezifisch gefilterten AK-Reaktivitäten gegen MAG-Peptide. Die Forschergruppe stellte zwar B- und T-Zellreaktivitäten beider Patientengruppen gegen alle fünf MAG-Peptide fest, jedoch beurteilten sie keine der Reaktionen als krankheitsspezifisch. Sie schlussfolgerten, dass es sich um sekundäre Immunantworten infolge von Myelinschäden handeln könnte [183].

5.2.5. Alpha-Crystallin B (CRYAB)

Zum einen wurden in der hier vorliegenden Arbeit für die Region CRYAB 37-57 AK-Reaktivitäten gegen zwei überlappende Peptide gefiltert, nämlich CRYAB 37-51 („LFPTST**SLSPFYLRP**“) und CRYAB 43-57 („**SLSPFYLRPPSFLRA**“) im CSF-Datensatz der PPMS-Gruppe. Des Weiteren wurden AK-Reaktivitäten gegen das N-terminale Peptid CRYAB 1-15 mit der Aminosäuresequenz „MDIAIHHPWIRRPFF“ als MS-spezifisch gefiltert. CRYAB 1-15, das von AK von sieben Serumproben der PPMS-Patienten, drei Serumproben der RRMS-Gruppe und keiner Probe eines Kontrollpatienten gebunden wurde, zeigte von allen untersuchten humanen Peptiden

die höchste mittlere Signalintensität. Bemerkenswerterweise war jedoch auch die mittlere Signalintensität der entsprechenden Spots für beide Negativkontrollarrays ziemlich hoch (> 1800). Dieses Peptid wurde auch im ELISA-Versuch untersucht und auch dort signifikant häufiger für die PPMS-Gruppe identifiziert. Im ELISA war jedoch keine Reaktivität der sekundären AK gegen CRYAB 1-15 festzustellen, sodass von einer Kreuzreaktivität des sekundären AK mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Alexa Fluor 647“ auszugehen ist.

CRYAB ist ein kleines Hitzeschockprotein mit Chaperon-ähnlicher Aktivität, welches im Gehirn und vielen anderen Organen exprimiert wird [148], aber auch in der Myelinscheide zu einem kleinen Anteil (0,02% der Proteine der Myelinscheide im ZNS) vorkommt [161]. Es hat eine Vielzahl an Funktionen im ZNS, unter anderem bindet es ungefaltete Proteine zur Verhinderung der Aggregation, es wirkt antiinflammatorisch und leitet nach entzündlichen Prozessen die Reparatur ein [184]. Somit konnte gezeigt werden, dass CRYAB eine wichtige Funktion in der Neuroprotektion, Neuroinflammation und in der Initiierung der Neuroregeneration zukommt [184]. Zudem konnte herausgefunden werden, dass das Transkript für CRYAB das am stärksten exprimierte Transkript in MS-Läsionen ist [185]. Bereits im Jahr 1995 wurde CRYAB als mutmaßliches Autoantigen bei MS identifiziert [186] und weitere Studien folgten, die Anti-CRYAB-AK in CSF und Serum von MS-Patienten messen konnten [187]. CRYAB wird aber nicht nur mit MS, sondern auch mit anderen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und peripheren Nervenerkrankungen, Augenerkrankungen und (neuro-)onkologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [188]. In einer 2021 publizierten Studie konnte anhand von Mäusen gezeigt werden, dass nach einer peripheren Nervenverletzung Mäuse ohne CRYAB mehr proinflammatorische Makrophagen und weniger antiinflammatorische Zytokine aufweisen [189].

In einer Studie, die die Immunreaktion von T-Helferzellen gegen überlappende Peptide des gesamten Proteins untersuchte, wurden insbesondere die Peptide CRYAB 21-40 und CRYAB 41-60 als immundominante Regionen identifiziert [190]. Beide Peptide überlappen mit der Region CRYAB 37-57, die hier gefiltert wurden. Eine weitere Forschergruppe identifizierte zuvor diese Region, da sie CSF-AK gegen CRYAB 21-40 vornehmlich bei MS-Patienten fand [191].

Die Aminosäuresequenz von CRYAB 11-15 („RRPFF“) gleicht der Sequenz von EBNA1 402-406, für die MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen zwei EBV-Peptide (EBNA1 391-410 und 392-411) gefiltert wurden. Sowohl im Microarray- als auch im ELISA-Experiment wurden beide Regionen als MS-spezifische Epitope ermittelt. Wenn AK einer Probe CRYAB 1-15 banden, wurde stets auch das mutmaßliche EBNA1-Epitop durch AK derselben Probe gebunden. Die gemeinsame Peptidsequenz „RRPFF“ könnte hierbei auf eine molekulare Mimikry hindeuten, wie für AK gegen EBNA1 und das gliale Zelladhäsionsmolekül GlialCAM, MBP und den in Gliazellen und Neuronen vorkommenden Calcium-aktivierten Chlorid-Kanal Anoctamin-2 gezeigt werden konnte [192]. In einer aktuellen Studie untersuchten Thomas *et al.* Serumproben von 713 MS-Patienten und 722 Kontrollpersonen und ermittelten ein doppelt so hohes Risiko, an MS erkrankt zu sein, bei den Probanden, die AK gegen CRYAB 3-17 aufwiesen, während CRYAB-Epitope, welche nicht die Sequenz CRYAB 9-15 vollständig umfassten, kaum gebunden wurden [193]. Durch vorherige Inkubation mit EBNA1 401-420, welches ebenfalls die Teilsequenz „RRPFF“ enthält, konnten die AK-Reaktivitäten gegen CRYAB vollständig blockiert werden, was auf eine Kreuzreaktivität zwischen EBNA1 und CRYAB hindeutet [193]. Für Personen, bei denen sowohl AK gegen CRYAB 3-17 als auch hohe AK-Reaktivitäten gegen EBNA1 393-412 nachgewiesen wurden, stieg die OR für MS auf neun an [193]. Zudem bestätigte die Forschergruppe in der Studie das Ergebnis, dass alle Probanden mit AK-Reaktivitäten gegen dieses CRYAB-Peptid ebenfalls AK-Reaktivitäten gegen jenes EBNA1-Peptid aufwiesen [193]. In einer kürzlich publizierten Studie fanden Vietzen *et al.* im Serum hohe Antikörper-Titer gegen mindestens drei der vier postulierten kreuzreaktiven EBNA1- bzw. ZNS-Peptide (EBNA1 393–412/CRYAB 2–21, EBNA1 386–405/GlialCAM 370–389, EBNA1 409–428/MBP 205–224, EBNA1 426–445/ANO2 135–154) bei 99,6% bzw. 98,5% der 270 untersuchten MS-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, jedoch nur bei 11,5% bzw. 21,5% der 270 Kontrollpatienten [194]. Für die Theorie einer Kreuzreaktivität sprechen zahlreiche Hinweise. So konnte gezeigt werden, dass CRYAB sowie EBNA1, welches in mit EBV infizierten B-Zellen exprimiert wird, über MHC-Rezeptoren präsentiert werden und T-Zellreaktivitäten hervorrufen können [195–197]. Van Sechel *et al.* fanden zudem heraus, dass eine Infektion mit EBV dazu führt, dass B-Zellen CRYAB exprimieren und CRYAB-reaktive T-Helferzellen entstehen [197]. Somit könnten latent mit EBV infizierte B-Zellen dazu führen, dass AK im Rahmen einer

autoreaktiven Immunantwort über molekulare Mimikry fälschlicherweise CRYAB binden und es an seinen wichtigen neuroprotektiven Aufgaben gehindert wird. Hierzu wird jedoch noch weitere Forschung benötigt, die diese Theorie genauer prüft. Es müsste untersucht werden, inwieweit die Funktion von CRYAB bei MS-Patienten beeinträchtigt ist und ob diese Beeinträchtigung spezifisch für die Pathogenese der MS ist. Eine Längsschnittstudie wäre interessant, um zu erfahren, wann im Verlauf der MS-Erkrankung Auto-AK gegen CRYAB auftreten und ob die Konzentration an Anti-CRYAB-AK mit dem Ausmaß der ZNS-Schädigung korreliert, sodass sich diese Auto-AK als Biomarker für den Therapieerfolg oder die Prognoseabschätzung eignen könnten.

5.2.6. Alpha-II Spektrin (SPTAN1)

Für die RRMS-Gruppe wurden AK-Reaktivitäten gegen SPTAN1 (Alpha-II Spektrin) 679-693 im Serum und gegen SPTAN1 37-51 für die PPMS-Gruppe in der CSF gefiltert.

SPTAN1 ist ein Protein des Zytoskeletts, das auch in Neuronen exprimiert wird [198]. SPTAN1-Defekte führen unter anderem zu axonaler Degeneration, was sich klinisch in neurologischen Syndromen wie Neuropathie oder zerebellärer Atrophie präsentiert [198]. De Seze *et al.* ermittelten AK-Reaktivitäten gegen SPTAN1 bei 13% der untersuchten MS-Patienten und bei 70% der Sjögren-Patienten mit neurologischer Manifestation [199]. Die Suche in der IEDB [138] lieferte kein weiteres Ergebnis für MS (Stand Dezember 2024). Zusammenfassend sind Anti-SPTAN1-AK bei MS aktuell wenig erforscht, könnten aber in einigen Fällen für die Differentialdiagnostik relevant sein.

5.2.7. Aquaporin 4 (AQP4)

In der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen das intrazelluläre Peptid AQP4 241-255 mit der Aminosäuresequenz „AVLAGGLYEYVFCPD“ für den Serumdatensatz gefiltert, hier sogar für alle zehn RRMS- und alle zehn PPMS-Patienten.

Aquaporine sind eine Gruppe von beim Menschen 13 Transmembranproteinen, die den Wassertransport durch die Zellmembran erleichtern, wobei AQP4 das am häufigsten vorkommende Aquaporin im ZNS ist [200,201]. AQP4 241-255 überlappt mit dem intrazellulären, C-terminalen Peptid AQP4 252-275 „**FCPD**VEFKRRFKEAFSKAAQQTG“, gegen das Alexopoulos *et al.* in ihrer Studie bei 13% der RRMS-Patienten Serum-AK ermittelten [202]. Die Forschergruppe fand zudem bei fast einem Viertel der Patienten mit einer NMOSD AK gegen AQP4 252-275 [203]. Da intrazelluläre Antigene im physiologischen Zustand in der Regel nicht zugänglich sind, könnte es sich hierbei um AK handeln, die erst nach vorausgehender pathologischer Zellschädigung entstehen. AQP4 hat als Biomarker bei der NMOSD eine enorme Bedeutung, da etwa 80% der NMOSD-Patienten Anti-AQP4-AK aufweisen [119] und Anti-AQP4-AK eine Spezifität von bis zu 100% zur Differentialdiagnostik zwischen MS und AQP4-positiver NMOSD erreichen [120]. Allerdings gibt es auch einige Studien, die AK gegen AQP4 bei MS-Patienten finden konnten: Bei asiatischen Patienten mit einer optikospinalen MS-Ausprägung wurden in einer Studie bei 60% der Patienten solche AK gefunden [204]. Anti-AQP4-Auto-AK binden nach aktuellem Stand der Literatur die extrazellulären Schleifen A, C und E von AQP4 und es wird angenommen, dass die Schleife E (AQP4 226-230) hierbei ein Hauptziel ist [203,205]. In den Daten der vorliegenden Arbeit wurden gegen das Peptid AQP4 223-237, welches das mutmaßliche Epitop von Schleife E (AQP4 226-230) einschließt, AK-Reaktivitäten von allen 30 Serum- und von 14 CSF-Proben detektiert. Jedoch wurden die Peptid-AK-Reaktivitäten nicht als MS-spezifisch klassifiziert, da auch Reaktivitäten der Kontrollproben festgestellt wurden.

5.2.8. Beta- und Gamma-Aktin (ACTB/ACTG)

AK-Reaktivitäten gegen vier Peptide aus drei Regionen (ACTB/ACTG 61-81, 164-178 und 348-362) wurden in den Serumproben der PPMS-Patienten als MS-spezifisch gefiltert.

ACTB und ACTG weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie von fast 99% auf, werden in den meisten Zelltypen exprimiert und fungieren dort als Komponenten des Zytoskeletts [206]. Vermutlich handelt es sich bei den AK-Reaktivitäten gegen diese Peptide der intrazellulären, fast ubiquitär vorkommenden Proteine ACTB/ACTG um

eine Immunantwort auf eine vorausgegangene Zellschädigung. Es bedarf weiterer Studien, um bspw. herauszufinden, ob AK, die als Begleitphänomen auftreten, als Biomarker für die Schwere der ZNS-Schädigung, Krankheitsaktivität und Prognose dienen können. Hierfür eignen sich Längsschnittstudien, in denen zu verschiedenen Zeitpunkten der AK-Titer untersucht und mit dem klinischen Verlauf verglichen wird.

5.2.9. *Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYL2)*

In der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten für jeweils vier Patienten der PPMS-Gruppe gegen DPYL2 (*Dihydropyrimidinase-related protein 2*) 121-135 im Serumdatensatz und DPYL2 463-477 im CSF-Datensatz gefunden, jedoch nur für einen Kontrollpatienten.

DPYL2 wird in Neuronen und Oligodendrozyten des ZNS exprimiert und ist dort unter anderem an neuronalem und axonalem Wachstum beteiligt [207]. Lovato *et al.* wiesen bei 33% der MS-Patienten AK-Reaktivitäten gegen DPYL2 in der CSF nach, aber bei keinem Kontrollpatienten [174]. Menon *et al.* fanden AK-Reaktivitäten gegen DPYL2 in der CSF ebenfalls ausschließlich bei MS-Patienten und bei keinem Kontrollpatienten [208]. Eine Schädigung von DPYL2 geht in Tierversuchen mit axonaler Degeneration einher, während eine Überexpression protektiv gegenüber einer axonalen Degeneration ist [207]. Die nachgewiesenen AK-Reaktivitäten könnten spezifisch für eine Subgruppe an (PP)MS-Patienten sein. Sie könnten aber auch reaktiv eine stärkere Neurodestruktion innerhalb der PPMS-Patienten widerspiegeln (mittlerer EDSS mit 4,1 deutlich höher als in der RRMS-Gruppe mit 2,4) und somit potentielle Biomarker für den klinischen Verlauf sein. Hierfür bedarf es allerdings einer Längsschnittstudie.

5.2.10. *Glutamat-Decarboxylase 2 (GAD2)*

MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen das C-terminale Peptid GAD2 (Glutamat-Decarboxylase 2) 571-585 wurden in der vorliegenden Arbeit signifikant häufiger für die Serumproben der PPMS-Patienten bestimmt.

GAD2 ist für die Biosynthese des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure notwendig, wird aber auch in den Inselzellen des Pankreas exprimiert [209]. AK gegen GAD2

dienen in den aktuellen Leitlinien zur Abgrenzung von Diabetes mellitus Typ 2 gegen eine spät beginnende Variante von Diabetes mellitus Typ 1 [210]. Beim Stiff-Person-Syndrom sind Anti-GAD2-AK ebenfalls in den Leitlinien etabliert [211]. Intrathekale Anti-GAD2-AK sind zudem bedeutend für neurologische Erkrankungen wie zerebelläre Ataxie und eine Form der Autoimmunenzephalitis [212]. Söhnlein *et al.* untersuchten Serumproben von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, Stiff-Person-Syndrom und polyendokrinem Autoimmunsyndrom und fanden heraus, dass die Region GAD2 535-585 ein krankheitsunspezifisches Cluster aus linearen Epitopen zu sein scheint [213].

5.2.11. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Im Serumdatensatz wurden AK-Reaktivitäten gegen das Peptid GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) 312-326 als MS-spezifisch gefiltert, wobei AK von 17 der 20 MS-Patienten, aber auch von vier der zehn Kontrollpatienten das Peptid banden.

GAPDH ist ein ubiquitär vorkommender Katalysator eines Glykolyseschritts, ist jedoch auch an weiteren Prozessen wie posttranslationalen Veränderungen und Apoptose beteiligt [214]. Kolln *et al.* wiesen in der CSF erhöhte AK-Reaktivitäten gegen GAPDH bei 60% der MS-Patienten, aber auch bei ca. 10% der Kontrollpatienten nach [215]. In anderen Studien wurden Anti-GADPH-AK für weitere Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis [216] und Rückenmarksverletzung [217] nachgewiesen. AK gegen das an der Apoptose beteiligte GAPDH gehören somit am ehesten zur physiologischen Reaktion auf einen vorherigen Zelluntergang, die Region um GAPDH 312-326 könnte hierbei ein immundominantes Epitop darstellen.

5.2.12. Leichte Kette des Neurofilaments (NFL)

In der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen NFL 121-135 in den CSF-Proben der PPMS-Gruppe als MS-spezifisch gefiltert.

Die neuronenspezifische NFL ist das häufigste Protein in Axonen von Erwachsenen und dort insbesondere für die axonale Struktur bedeutsam [218]. NFL wird aktuell als

prognostischer Biomarker (u.a. Schubvorhersage, PIRA, Schwere der Behinderung) und als Biomarker zur Bestimmung der Neurodestruktion diskutiert [124–126], wobei die Spiegel in Blut und CSF stark korrelieren [219]. Jedoch wird NFL auch als Biomarker für diverse andere neurodegenerative Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose, NMOSD, Alzheimer-Demenz und Morbus Parkinson postuliert [219,220]. AK gegen NFL stellen daher am ehesten eine Immunreaktion auf das Vorhandensein von NFL in Blut und CSF durch vorherige Neurodestruktion dar.

5.2.13. Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1)

In der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen zwei PGAM1-Peptide als MS-spezifisch ermittelt: PGAM1 133-147 für den Serumdatensatz und PGAM1 43-57 für den Liquordatensatz.

PGAM1 dient als Katalysator eines Glykolyseschritts [221] und wird meist in Verbindung mit diversen Tumoren diskutiert [222]. Kimura *et al.* wiesen AK gegen PGAM1 im Serum doppelt bis dreimal so häufig bei Patienten mit MS oder NMOSD im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder multiplen Hirninfarkten nach, sodass sie einen immunologischen Hintergrund postulierten [223]. Anti-PGAM1-AK wurden von Lu *et al.* zudem bei 70% der Patienten mit Autoimmunhepatitis gefunden [224]. Die Bedeutung von AK gegen PGAM1 ist somit aktuell ungeklärt. Eine Hypothese könnte lauten, dass AK gegen PGAM1 in geringem Umfang zum normalen AK-Repertoire gehören und bei immunologischen Erkrankungen im Rahmen einer breiteren Immunreaktion vermehrt auftreten.

5.2.14. Protein S100A1

Für den Serumdatensatz wurden AK-Reaktivitäten gegen die beiden fast vollständig überlappenden Peptide S100A1 79-93 bzw. 80-94 sowie das benachbarte Peptid S100A1 61-75 als MS-spezifisch ermittelt, während AK von lediglich zwei der 20 untersuchten CSF-Proben der MS-Patienten irgendeines dieser drei Peptide banden. Bei keinem Kontrollpatienten waren AK-Reaktivitäten gegen eines der Peptide im Serum oder in der CSF festzustellen.

Als kalziumbindendes Protein ist S100A1 an der kalziumabhängigen Signaltransduktion und Interaktion mit extra- und intrazellulären Proteinen beteiligt und wird insbesondere in Herzmuskelzellen, aber auch im ZNS exprimiert [225]. Studienergebnisse legen nahe, dass S100A1 an neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt ist [226,227]. In der Suche in der Literatur konnten jedoch keine Ergebnisse zu Anti-S100A1-AK bei MS gefunden werden und auch die Suche in der IEDB [138] lieferte kein weiteres Ergebnis (Stand Dezember 2024). Zur weiteren Interpretation der hier gefilterten AK-Reaktivitäten sollten die Funktionen von S100A1 im ZNS aufgeklärt und in Querschnittsstudien zunächst die Prävalenz von Anti-S100A1-AK bei MS validiert sowie deren Auftreten bei anderen (neuro)immunologischen Erkrankungen wie NMOSD und Kollagenosen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und amyotropher Lateralsklerose abgegrenzt werden.

5.2.15. Saures Gliafaserprotein (GFAP)

Für die Serumproben der PPMS- und der RRMS-Patienten der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen zwei Peptide der Isoform 1 des sauren Gliafaserproteins (GFAP), nämlich GFAP 250-264 und 340-354, sowie gegen das Peptid 390-404 der Isoform 2 als MS-spezifisch gefiltert. Diese Peptide wurden nur von AK jeweils maximal einer Probe der Kontrollgruppe gebunden.

GFAP ist ein intrazelluläres Protein der Gliazellen und hat bspw. eine große Bedeutung in der Entwicklung von Astrozyten, befindet sich aber auch in Schwann-Zellen um periphere Nerven und spielt eine Rolle in der Neuroregeneration [228]. Bekannt ist GFAP vor allem durch die Alexanderkrankheit, bei der es durch eine Mutation im GFAP-Gen zu Entmarkung und Störung der Myelinisierung im ZNS kommt [229]. Neue Studien zeigen aber auch, dass die Konzentration von GFAP im Serum mit dem Grad der Behinderung von MS-Patienten, der Anzahl an Läsionen im MRT und weiteren klinischen Faktoren korreliert, sodass die Konzentration von GFAP im Serum ein guter molekularer Biomarker für die Schwere der Erkrankung und Prognose (Schubvorhersage, PIRA) sein könnte, indem es die Schädigung im ZNS anzeigt [230,231]. Allerdings fanden sich ähnliche Ergebnisse auch für die AQP4-positive NMOSD, bei der eine erhöhte Serumkonzentration an GFAP mit einer höheren Schubwahrscheinlichkeit und einem schwereren Verlauf einhergeht [220].

Somit ist anzunehmen, dass AK gegen GFAP als Immunreaktion auf das Vorhandensein von GFAP im Serum nicht ausschließlich bei MS auftreten, aber sie einen guten Biomarker für Prognose, Krankheitsverlauf und Schwere der Erkrankung darstellen könnten.

5.2.16. Thyreoperoxidase (TPO)

Ein Hinweis auf unterschiedliche AK-Bindestellen innerhalb eines Autoantigens war unter anderem für TPO, MAG und ACTB bzw. ACTG festzustellen. AK-Reaktivitäten gegen vier TPO-Peptide (TPO 19-33, TPO 181-195, TPO 223-237 und TPO-Isoform 3 865-879) wurden in der vorliegenden Arbeit im CSF-Datensatz der PPMS-Gruppe als MS-spezifisch gefiltert. Im Serum fanden sich diese Anti-TPO-Reaktivitäten sehr häufig. Für das gefilterte Peptid TPO 223-237 zeigten bspw. 29 der 30 Serumproben AK-Reaktivitäten.

Das Enzym TPO wird in Zellen der Schilddrüse exprimiert und dient der Schilddrüsenhormonsynthese [232]. Anti-TPO-AK sind unspezifisch und kommen bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse vor, aber auch bei Gesunden [233,234]. Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse gehören zu den häufigsten Autoimmun-Komorbiditäten bei MS und sind bei etwa 6% der MS-Patienten feststellbar [235]. Zusammengefasst kann daher angenommen werden, dass AK gegen TPO-Peptide zum normalen AK-Spektrum gehören und dass sie bei MS in der CSF auftreten können, was bspw. durch eine Schrankenstörung, einen aktiven Transport oder eine intrathekale unspezifische AK-Synthese erklärt werden kann.

5.2.17. Transaldolase (TALDO1)

AK-Reaktivitäten gegen TALDO1 (Transaldolase) 221-235 wurden in der vorliegenden Arbeit nur durch AK der vier PPMS-Patienten mit dominantem AK-Profil (siehe Kapitel 4.3 und 5.1) in der CSF gebunden.

TALDO1 ist ein Enzym des Pentosephosphatwegs und dient dort der Synthese des Reduktionsmittels Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) [236]. In einer älteren Studie wurden AK-Reaktivitäten gegen das überlappende Peptid TALDO1 231–245 bei neun der 13 MS-Patienten mit bekannten Anti-TALDO1-AK, aber bei

keiner Kontrollperson ermittelt [237]. In einer weiteren älteren Studie zeigten sich in 25 von 87 der Serumproben und 15 von 20 CSF-Proben von Patienten mit MS AK-Reaktivitäten gegen TALDO1, aber in keiner der 145 Serumproben von Kontrollpersonen [238]. In der IEDB [138] fand sich kein weiteres Ergebnis (Stand Dezember 2024). Um die Relevanz von Anti-TALDO1-AK bei MS besser beurteilen zu können, sind weitere Studien notwendig (Untersuchung der Prävalenz bei MS-Patienten im Allgemeinen, bei den verschiedenen MS-Verlaufsformen und bei verschiedenen Schweregraden).

5.2.18. Tubulin-beta-1-Kette (TUBB1)

In der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen das Peptid Tubulin-beta-1-Kette (TUBB1) 265-279 in der für die PPMS-Gruppe im Serum als MS-spezifisch ermittelt.

TUBB1 gehört zu den zehn humanen β -Tubulinen, die ein essentieller Bestandteil des eukaryotischen Zytoskeletts sind, und wird hauptsächlich in Megakaryozyten und Thrombozyten, aber in geringerem Umfang auch im ZNS exprimiert [239,240]. Svarcová *et al.* fanden AK gegen β -Tubuline häufiger in der CSF von MS-Patienten als bei den Kontrollgruppen, jedoch nicht im Serum [241]. In einer älteren Studie wurden erhöhte AK-Reaktivitäten gegen β -Tubuline im Serum bei Patienten mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie wesentlich häufiger als bei den Kontrollpatienten (inkl. MS) nachgewiesen [242]. Kimura *et al.* untersuchten AK-Reaktivitäten in der CSF von MS-Patienten, Kontrollpatienten mit viraler Meningitis und Alzheimer-Demenz sowie von Kontrollpatienten mit somatoformen Störungen und fanden heraus, dass alle Patientengruppen AK-Reaktivitäten gegen β -Tubuline zeigten, sodass sie diese als natürlich vorkommende Autoantikörper klassifizierten [159].

5.3. Antikörper gegen Peptide des Epstein-Barr-Virus

In der vorliegenden Arbeit wurden AK-Reaktivitäten gegen 103 EBV-Peptide analysiert, die in der IEDB [138] als lineare Epitope erfasst wurden. MS-spezifische AK-Reaktivitäten wurden gegen sechs EBNA1-Peptide aus zwei verschiedenen Regionen (EBNA1 52-100 und EBNA1 391-411) als MS-spezifisch ermittelt. Zudem

Diskussion

fanden sich MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen drei weitere EBV-Peptide (EBNA6 566-595, GP350 122-141, EAR 63-77). Im Folgenden wird der Fokus der Diskussion in diesem Unterkapitel auf die EBNA1-Peptide gelegt.

EBV ist ein häufig vorkommendes Virus, welches Auslöser der infektiösen Mononukleose ist [25]. Abrahamyan *et al.* fanden bei 100% der 901 untersuchten Patienten mit CIS oder einem frühen RRMS-Stadium AK gegen EBV, wobei hiervon über 93% (n=839) AK gegen EBNA1 aufwiesen [24]. In einer prospektiven Studie mit Serumproben von 30 MS- und 30- Kontrollpatienten konnte gezeigt werden, dass hohe Anti-EBNA1-Titer mit einem deutlich erhöhten Risiko, an MS zu erkranken, einhergehen (Ratenverhältnis 27,6) [243]. Eine Infektion mit EBV scheint somit eine entscheidende Rolle in der Entstehung von MS zu spielen. EBV persistiert in B-Zellen [21]. Das onkogene Potential wurde schon früh entdeckt: Unter anderem das Burkitt-Lymphom und das Hodgkin-Lymphom sind in hohem Maße mit einer EBV-Infektion assoziiert [244,245]. Pender *et al.* setzten EBV-spezifische, autologe zytotoxische T-Zellen, welche unter anderem gegen EBNA1 gerichtet sind, bei Patienten mit SPMS und PPMS ein [246]. Von zehn Patienten, die die Therapie vollständig erhalten haben, profitierten sieben Patienten. Die Autoren postulierten, dass die Wirkung auf der Elimination von EBV-infizierten B-Zellen beruht [246].

Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, wurden die beiden EBV-Peptide EBNA1 391-410 („SGSPRRPPPGRPPFFHPVG“) und EBNA1 392-411 („GSPRRPPPGRPPFFHPVGE“) als MS-spezifische Epitope gefiltert, wobei die Peptidsequenzen von EBNA1 402-406 und CRYAB 11-15 identisch sind (für die Diskussion dieser gemeinsamen Peptidsequenz siehe Kapitel 5.2.5). AK gegen EBNA1 392-411 wurden als PPMS-spezifisch in den CSF-Proben gefiltert. Gegen dieses Peptid zeigten auch 26 der 30 Serumproben hohe AK-Reaktivitäten. Die bei MS immundominante Region EBNA1 385-420 wurde in mehreren Studien nachgewiesen [247]. Eine Forschergruppe bestätigte in einer späteren Studie mit hochdichten Peptid-Microarrays das in der hier vorliegenden Arbeit gefilterte Epitop EBNA1 391-410 bei RRMS- und SPMS-Patienten, allerdings verwendete die Forschergruppe nur Serum- bzw. Plasmaproben und keine CSF-Proben [248]. Eine weitere Studie, die diskordante monozygote Zwillinge in das Patientenkollektiv einschloss, bildete das gesamte EBNA1-Protein mit maximal überlappenden Oktapeptiden ab [249]. Die Forschergruppe fand heraus, dass die Alanin-Glycin-

reiche Region bei Patienten und ebenso Gesunden immundominant ist, aber dass MS-Patienten signifikant erhöhte AK-Reaktionen im Serum gegen Oktapeptide innerhalb von EBNA1 401-411 „**GRRPFF**HPVGE“ im Vergleich zu Gesunden zeigen [249]. Rand *et al.* erzeugten mittels Phagen-Display etwa 4×10^7 verschiedene Peptide zur Suche nach MS-spezifischen Epitopen [250]. Sie nutzten AK aus der CSF von MS-Patienten und fanden heraus, dass für fünf der 14 untersuchten MS-Patienten, aber nur für eine Kontrolle die Aminosäuresequenz „RRPFF“, welche in EBNA1 und CRYAB vorkommt, selektiert wurde [250]. Sundström *et al.* untersuchten die Interaktion zwischen Anti-EBNA1-AK und dem genetischen Merkmal HLA-DRB1*15:01 [251]. Sie ermittelten, dass Träger dieses Merkmals, bei denen AK gegen EBNA1 385-420 nachgewiesen werden konnten, ein 24-mal höheres Risiko für MS haben [251]. Diese Interaktion wurde in einer späteren Studie bestätigt [123]. Dort war das MS-Erkrankungsrisiko von Personen mit hohem IgG-Titer gegen EBNA1 385-420, die das genetische Merkmal HLA-DRB1*15 (dazu zählt auch DRB1*15:01), aber nicht das genetische Merkmal HLA-A*02 trugen, 16-fach erhöht im Vergleich zum MS-Erkrankungsrisiko von Personen ohne diese drei Risikofaktoren [123]. Gegen drei weitere EBNA1-Peptide, die die Sequenzen 52-91 umspannen, wurden in der vorliegenden Arbeit MS-spezifische AK-Reaktivitäten gefiltert. Diese Peptidsequenz konnte in einer aktuelleren Studie als bevorzugt von IgG von MS-Patienten gebunden bestätigt werden [169]. In zwei Microarray-Studien fand eine Forschungsgruppe anhand von Serumproben heraus, dass CIS-Patienten gegenüber gesunden Probanden generell eine deutlich stärkere AK-Produktion gegen lineare Peptide der acht untersuchten EBV-Proteine aufweisen, sich die Spezifität der Antwort jedoch insbesondere gegen EBNA1 und EBNA2 nicht wesentlich unterscheidet [252,253].

5.4. Antikörper gegen Mimotope

Für die vorliegende Studie wurden zuvor als MS-spezifisch beschriebene Mimotope (siehe Kapitel 1.2) aus der IEDB [138] ausgewählt (Kapitel 3.3.1), wovon AK-Reaktivitäten gegen sieben als MS-spezifisch bestätigt werden konnten (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7 aus Seite 52 bzw. 54). In den Serumproben wurden AK-Reaktivitäten gegen zwei Peptide („HTQPYAYEARDH“ und „VPQKYWWLSDHT“) als MS-spezifisch identifiziert. Yu *et al.* ermittelten AK-Reaktivitäten gegen diese beiden Peptide in einer vorangegangenen Studie in der CSF von MS-Patienten [254]. Zudem

finden sich im CSF-Datensatz der vorliegenden Arbeit MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen fünf Peptide, wobei zwei dieser Peptide, „ARWELNLEPLYGPY“ und „WHAPQTPYWASM“, von AK aller 30 Serumproben gebunden wurden. AK gegen diese zwei Peptide sind folglich häufig und natürlich vorkommend. Die Relevanz der ermittelten Mimotope in der Pathogenese der MS *in vivo* muss erst noch erforscht werden, da die Antigene, in dem die entsprechenden Epitope natürlicherweise vorkommen, (noch) unbekannt sind.

5.5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden MS-spezifische AK-Reaktivitäten gegen Peptide von EBNA1 und CRYAB detektiert, welche die gemeinsame Peptidsequenz „RRPFF“ aufweisen. Besonders interessant ist die weitere Erforschung der möglichen Kreuzreaktivität zwischen diesen Peptiden, und des Einflusses dieser Kreuzreaktivität auf die Pathogenese der MS. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, besser zu verstehen, ob eine mögliche EBV-Impfung, die aktuell erforscht und in der Literatur diskutiert wird [255–257], die AK-Bildung oder T-Zell-Antwort gegen diese Peptide (EBNA1 391-410 und EBNA1 392-411 sowie CRYAB 1-15) modulieren kann und welche klinischen Konsequenzen sich daraus ergeben.

IgG-Reaktivitäten gegen fast 4000 *in silico* ausgewählte Peptide wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Peptide bildeten die Aminosäuresequenz von 45 humanen Proteinen samt allen Isoformen vollständig in überlappender Weise ab. Mit ultrahochdichten Arrays lassen sich mittlerweile sogar hunderttausende bis wenige Millionen Peptide gleichzeitig untersuchen [258]. Mathematisch gesehen sind, legt man die 21 proteinogenen Aminosäuren zugrunde, bei einer Länge von 15 Aminosäuren pro Peptid etwa 68 Trillionen verschiedene Peptide möglich. Dies verdeutlicht, dass eine sorgfältige Auswahl notwendig bleibt, da immer nur ein verschwindend geringer Bruchteil aller möglichen Peptide untersucht werden kann, auch wenn die Analysetechniken immer weiter voranschreiten.

Obwohl die 45 untersuchten humanen Proteine zuvor in der Literatur als Autoantigene bei MS diskutiert wurden, konnten MS-spezifische AK-Reaktivitäten nur gegen Peptide von 19 dieser Proteine festgestellt werden. Daraus darf jedoch nicht geschlussfolgert werden, dass die anderen (26) Proteine keine MS-spezifischen

Epitope beinhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden nur AK-Reaktivitäten gegen lineare Peptide und nicht gegen Konformationsepitope untersucht. Zudem schwanken die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten von Auto-AK zum Teil stark [134]. So konnte in einem Review bspw. gezeigt werden, dass die Testergebnisse zum Nachweis von Anti-MOG-AK je nach Untersuchungsmethode stark variieren [180]. Hinzu kommt, dass die vorliegende Arbeit auf Immunglobuline der Klasse G beschränkt war. Man könnte das Spektrum erweitern, indem man auch auf AK der Klassen A und M testet. Um spezifische AK-Reaktivitäten, die nur bei einer Subgruppe von MS-Patienten vorkommen, besser zu detektieren, sollte das untersuchte Patientenkollektiv vergrößert werden. In dieser Arbeit mussten in einer Patientengruppe bspw. mindestens vier von zehn Serum- bzw. CSF-Proben Peptid-AK-Reaktivitäten zeigen, damit diese als MS-spezifisch gefiltert wurden, während dann gleichzeitig keine Kontrollprobe AK-Reaktivitäten zeigen durfte. Würde man die Anzahl von zehn auf 25 Patienten pro Gruppe erhöhen, müssten bei gleicher Teststatistik und bei gleichem Signifikanzniveau nur noch mindestens 20% (5/25) statt 40% (4/10) der Patientenproben AK-Reaktivitäten gegen ein Peptid aufweisen.

Einige der bei MS diskutierten AK sind bei anderen Erkrankungen etablierte Biomarker, z. B. Anti-GAD2 bei Diabetes mellitus Typ 1 [210] und Stiff-Person-Syndrom [211] oder Anti-TPO-AK bei Autoimmunthyreopathien [233]. Wie bei Anti-GAD2-AK beschrieben wurde, können gegen ein bestimmtes Autoantigen gerichtete AK mit verschiedenen Krankheiten in teils verschiedenen Organen assoziiert sein [210,212]. Interessant wäre daher, das Studiendesign zu verwenden, um das AK-Profil von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen direkt miteinander vergleichen zu können. Mit diesem Studiendesign könnten zudem mögliche Unterschiede in den AK-Profilen von Patienten mit SPMS, welche nicht in diese Studie eingeschlossen wurden, RRMS und PPMS identifiziert werden.

Gegen einige ermittelte Peptide (z. B. Anti-GFAP, -MBP, -MAG) wurden AK-Reaktivitäten festgestellt, die vermutlich als Begleitphänomen der MS-Erkrankung anzusehen sind. In einer Studie wurden durch Stimulation von B-Zellen bei einem Teil der MS-Patienten breite AK-Reaktivitäten gegen zerebrale Autoantigene nachgewiesen, jedoch waren die AK-Reaktivitäten gegen kein Antigen stark genug, um als spezifisch zu gelten [259]. Solche AK, welche gegen ZNS-Strukturen gerichtet sind und als Begleitphänomen auftreten, eignen sich möglicherweise gut zur

Klassifikation des Schweregrads der Erkrankung, Verlaufsbeurteilung, Therapieauswahl und -kontrolle oder Prognoseabschätzung. Für Patienten mit MOGAD konnte z. B. gezeigt werden, dass der Titer von AK gegen MOG in der CSF mit der Schwere der Erkrankung korreliert [260]. Es ist jedoch nach wie vor ungeklärt, inwieweit hohe AK-Titer gegen spezifische Antigene mit dem Ausmaß der ZNS-Schädigung und dem späteren Grad der Behinderung bei Patienten mit MS korrelieren. Um dies genauer zu untersuchen, sind Längsschnittstudien notwendig. Dieses Setting könnte ebenfalls dazu genutzt werden, die Veränderungen des AK-Profiles von MS-Patienten zu analysieren, da sich das Immunsystem im Laufe des Lebens ändert und normalerweise schwächer wird (Immunoseneszenz) [261]. In diesem Zusammenhang wäre auch interessant zu erforschen, wie genau DMT das individuelle AK-Profil von MS-Patienten beeinflussen können.

Gegen kein Peptid allein wurden zu 100% spezifische und sensitive AK-Reaktivitäten für eine MS-Gruppe festgestellt. Die Kombination mehrerer Peptide und/oder die Kombination mit weiteren Faktoren, z. B. dem genetischen Merkmal HLA-HLA-DRB1*15:01, könnte die Eignung als Biomarker für die Diagnosestellung oder für die Zuordnung zu einer MS-Verlaufsform wesentlich verbessern. So konnten in der Literatur bspw. bei ca. 99% der MS-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und nur ca. 12% bzw. 22% der Kontrollpatienten hohe Antikörpertiter gegen mindestens drei der vier postulierten kreuzreaktiven EBNA1- bzw. ZNS-Peptide (EBNA1 393–412/CRYAB 2–21, EBNA1 386–405/GlialCAM 370–389, EBNA1 409–428/MBP 205–224, EBNA1 426–445/ANO2 135–154) gefunden werden [194] oder für die Kombination der beiden Faktoren hoher AK-Titer gegen EBNA1 385–420 und Tragen von HLA-DRB1*15 ein 16-fach erhöhtes MS-Risiko gegenüber Abwesenheit dieser Risikofaktoren gezeigt werden [123]. Die Aufklärung weiterer solcher Interaktionen könnte z. B. Prognose oder die Beratung von Familienangehörigen eines MS-Patienten künftig verbessern.

6. Zusammenfassung

Die MS ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende neurologische Erkrankung, die bereits im jungen Erwachsenenalter bleibende Behinderungen verursachen kann. Es wurden bisher einige Autoantigene (wie MAG, MOG und MBP) des ZNS bei MS postuliert. Doch bisher gibt es nur wenige AK-basierte Biomarker (wie Anti-AQP4 und Anti-MOG-AK zur Differentialdiagnose), die sich für die frühzeitige Sicherung der Diagnose, Prognose oder Therapiekontrolle im klinischen Alltag etablieren konnten. Insbesondere besteht ein Bedarf an molekularen Biomarkern zur Verbesserung der Prognoseabschätzung. Diese Arbeit widmete sich der Suche nach MS-spezifischen (Auto-)AK-Reaktivitäten. Erstmals wurden für eine solche Suche paarige Serum- und CSF-Proben mit eigens designten hochdichten Peptid-Microarrays analysiert.

Nach Literatur- und Datenbankrecherche wurden 3991 Peptide ausgewählt, die zuvor als potentielle (Auto-)Antigene bei MS beschrieben wurden. In überlappender Weise wurden die Aminosäuresequenzen von 45 humanen Proteinen samt all ihren Isoformen mit 3747 Peptiden vollständig auf den Microarrays abgebildet. Zudem wurden 107 virale Peptide und 137 mutmaßlich MS-spezifische Epitope aus der IEDB [138] für die Analysen berücksichtigt. Paarige Serum- und CSF-Proben wurden von zehn RRMS-, zehn PPMS- und zehn Kontroll-Patienten verwendet. Somit konnten Unterschiede im AK-Profil sowohl zwischen den Patientengruppen als auch zwischen Blut und CSF analysiert werden. Bei der Datenauswertung wurde zur Suche nach MS-spezifischen AK-Reaktivitäten ein zweistufiges Filterverfahren angewandt. Im ersten Schritt wurden die Peptide selektiert, gegen die mindestens eine Serum- bzw. CSF-Probe eines Patienten IgG-Reaktivitäten zeigte. Im zweiten Filterschritt wurden die Daten der RRMS- bzw. PPMS-Gruppe mit den Daten der Kontrollgruppe verglichen, um MS-spezifische AK-Reaktivitäten aufzuspüren. Schließlich wurden die Microarraydaten von vier exemplarisch ausgewählten Peptiden mittels ELISA validiert.

Das AK-Profil der Patienten war sehr individuell. Lediglich gegen 54 der 3991 untersuchten Peptide bzw. nur gegen Peptide von 19 der 45 humanen Proteine wurden MS-spezifische AK-Reaktivitäten festgestellt. Wenngleich die Stichprobe mit zehn Patienten pro Gruppe relativ klein war, konnte die Reliabilität der Daten auf mehreren

Ebenen belegt werden: Für einige humane Proteine (ACTB, ACTG, CRYAB und S100A1) sowie das EBV-Protein EBNA1 wurden AK-Reaktivitäten gegen überlappende Peptidsequenzen als MS-spezifisch gefiltert. Von den 15 für die RRMS-Gruppe ermittelten Peptid-AK-Reaktivitäten wurden acht auch für die PPMS-Gruppe gefiltert. Zudem korrelierten die ELISA-Daten deutlich mit den Microarray-Daten, unabhängig von dem verwendeten sekundären AK.

AK gegen viele der in dieser Studie untersuchten Antigene (z. B. ACTG/ACTB, MAG, GFAP) spielen mutmaßlich eine Rolle bei der Beseitigung von Abbauprodukten und Detritus und können somit am ehesten als Begleitphänomen der Neurodestruktion bei MS eingestuft werden. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten AK-Signaturen, die als Begleitphänomen der Erkrankung auftreten, könnten sich als ein wichtiger Bestandteil zur Prognoseabschätzung, Auswahl der adäquaten Medikation und Therapiekontrolle etablieren, sofern sich diese AK in weiteren Validierungsmessungen bestätigen lassen. Andere interessante lineare Epitope wie in CN37 sind noch wenig erforscht oder können bisher keinem bestimmten Antigen zugeordnet werden (Mimotope). Besonders hervorzuheben ist der mögliche Zusammenhang von AK gegen das Hitzeschockprotein CRYAB, welches Aufgaben in Neuroprotektion, -inflammation und -regeneration erfüllt, und gegen das EBV-Protein EBNA1. Die als MS-spezifisch gefilterten AK-Reaktivitäten gegen die drei Peptide CRYAB 1-15, EBNA1 391-410 und EBNA1 392-411 teilen die Aminosäuresequenz „RRPFF“. Interessanterweise zeigten die Proben, für die AK-Reaktivitäten gegen CRYAB 1-15 identifiziert wurden, auch stets AK-Reaktivitäten gegen das mutmaßliche EBNA1-Epitop. Eine mögliche Kreuzreaktion als entscheidender Baustein in der Entwicklung einer MS ist hier denkbar. Für ein zweites CRYAB-Peptid (CRYAB 37-57) konnten für die CSF-Proben höhere Signalintensitäten als für die Serumproben festgestellt werden, was auf eine intrathekale AK-Synthese hindeutet. Bei der Interpretation der Daten ist jedoch zu berücksichtigen, dass die verwendete Methodik nicht geeignet ist, Konformationsepitope aufzuzeigen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse liefern somit viele interessante Informationen und Ansätze für weitere Studien, die zur wichtigen Erforschung von diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Biomarkern sowie der Pathophysiologie der MS beitragen können. Sollte eine Kreuzreaktivität zwischen

Zusammenfassung

EBNA1 und CRYAB bedeutend für die Entstehung oder Aufrechterhaltung der MS sein, ergäben sich hieraus nicht nur wertvolle Informationen zum besseren Krankheitsverständnis, sondern würde auch neue Therapiemöglichkeiten für bereits an MS Erkrankte oder zur Reduktion des MS-Erkrankungsrisikos ermöglichen. So könnte in zukünftigen Studien überprüft werden, ob die Bildung dieser kreuzreaktiven Antikörper durch eine noch ausstehende EBV-Impfung oder eine DMT unterdrückt werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, u. a. Multiple sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2018;4:1–27.
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, u. a. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler.* 2020;26:1816–21.
3. Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Göppfarth D. [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Nervenarzt* 2014;85:990–8.
4. Holstiege J, Steffen A, Bätzing J. Epidemiologie der Multiplen Sklerose - eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi). Versorgungsatlas-Bericht Nr. 17/09 [Internet]. 2018 [abgerufen am 17. Dezember 2024]; Verfügbar unter: https://www.versorgungsatlas.de/fileadmin/ziva_docs/86/VA-86-Multiple%20Sklerose-Bericht-V13_Cor..pdf
5. Ohle LM, Ellenberger D, Flachenecker P, Friede T, Haas J, Hellwig K, u. a. Chances and challenges of a long-term data repository in multiple sclerosis: 20th birthday of the German MS registry. *Sci. Rep.* 2021;11:13340.
6. Fernández Ó, Sörensen PS, Comi G, Vermersch P, Hartung HP, Leocani L, u. a. Managing multiple sclerosis in individuals aged 55 and above: a comprehensive review. *Front. Immunol.* 2024;15:1379538.
7. Margoni M, Preziosa P, Rocca MA, Filippi M. Pediatric multiple sclerosis: developments in timely diagnosis and prognostication. *Expert Rev. Neurother.* 2022;22:393–403.
8. Sabel CE, Pearson JF, Mason DF, Willoughby E, Abernethy DA, Taylor BV. The latitude gradient for multiple sclerosis prevalence is established in the early life course. *Brain J. Neurol.* 2021;144:2038–46.
9. Buchter B, Dunkel M, Li J. Multiple sclerosis: a disease of affluence? *Neuroepidemiology* 2012;39:51–6.
10. Goulden R, Ibrahim T, Wolfson C. Is high socioeconomic status a risk factor for multiple sclerosis? A systematic review. *Eur. J. Neurol.* 2015;22:899–911.
11. 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;23:36–42.
12. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Hashmi K, Abdelrahman N, Hojnacki D, Dwyer MG, u. a. Increased tissue damage and lesion volumes in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74:538–44.
13. Hawkes CH, Giovannoni G, Lechner-Scott J, Levy M, Waubant E. Multiple sclerosis and migration revisited. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2019;34:A1–2.

14. Kurtzke JF. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain J. Neurol.* 2013;136:2904–17.
15. 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;11:1510.
16. O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology* 2013;40:1–12.
17. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 2019;365:eaav7188.
18. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, u. a. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 2015;47:1107–13.
19. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol.* 2015;14:263–73.
20. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023;21:51–64.
21. Bjornevik K, Münz C, Cohen JI, Ascherio A. Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat. Rev. Neurol.* 2023;19:160–71.
22. Robinson WH, Steinman L. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Science* 2022;375:264–5.
23. Tarlinton RE, Martynova E, Rizvanov AA, Khaiboullina S, Verma S. Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses* 2020;12:643.
24. Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi MM, Aly L, Luessi F, Groppa S, u. a. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2020;91:681–6.
25. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G, u. a. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult. Scler.* 2013;19:162–6.
26. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, u. a. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* 2022;375:296–301.
27. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 2010;5:e12496.

28. Xu Y, Hiyoshi A, Smith KA, Piehl F, Olsson T, Fall K, u. a. Association of Infectious Mononucleosis in Childhood and Adolescence With Risk for a Subsequent Multiple Sclerosis Diagnosis Among Siblings. *JAMA Netw. Open* 2021;4:e2124932.
29. Kalla M, Schmeinck A, Bergbauer M, Pich D, Hammerschmidt W. AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010;107:850–5.
30. Robinson WH, Younis S, Love ZZ, Steinman L, Lanz TV. Epstein-Barr virus as a potentiator of autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2024;20:729–40.
31. Dagna L, Pritchett JC, Lusso P. Immunomodulation and immunosuppression by human herpesvirus 6A and 6B. *Future Virol.* 2013;8:273–87.
32. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015;28:313–35.
33. Engdahl E, Gustafsson R, Huang J, Biström M, Lima Bomfim I, Stridh P, u. a. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019;10:2715.
34. Winkelmann A, Loebermann M, Barnett M, Hartung HP, Zettl UK. Vaccination and immunotherapies in neuroimmunological diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 2022;18:289–306.
35. Zrzavy T, Kollaritsch H, Rommer PS, Boxberger N, Loebermann M, Wimmer I, u. a. Vaccination in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front. Immunol.* 2019;10:1883.
36. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol. Ther.* 2018;7:59–85.
37. Ostkamp P, Salmen A, Pignolet B, Görlich D, Andlauer TFM, Schulte-Mecklenbeck A, u. a. Sunlight exposure exerts immunomodulatory effects to reduce multiple sclerosis severity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2021;118:e2018457118.
38. Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener. Dis. Manag.* 2015;5:413–24.
39. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2016;22:1021–6.
40. Correale J, Farez MF. Smoking worsens multiple sclerosis prognosis: two different pathways are involved. *J. Neuroimmunol.* 2015;281:23–34.
41. Hedström AK, Ryner M, Fink K, Fogdell-Hahn A, Alfredsson L, Olsson T, u. a. Smoking and risk of treatment-induced neutralizing antibodies to interferon β -1a. *Mult. Scler.* 2014;20:445–50.

42. Petersen ER, Søndergaard HB, Laursen JH, Olsson AG, Börnsen L, Soelberg Sørensen P, u. a. Smoking is associated with increased disease activity during natalizumab treatment in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2019;25:1298–305.
43. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult. Scler.* 2012;18:1334–6.
44. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2017;13:25–36.
45. Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, u. a. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2019;6:1905–22.
46. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2018;8:a028936.
47. Cagol A, Schaedelin S, Barakovic M, Benkert P, Todea RA, Rahmanzadeh R, u. a. Association of Brain Atrophy With Disease Progression Independent of Relapse Activity in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2022;79:682–92.
48. Rudick RA, Lee JC, Nakamura K, Fisher E. Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J. Neurol. Sci.* 2009;282:106–11.
49. Hussein L, Geladaris A, Weber MS. Toward identifying key mechanisms of progression in multiple sclerosis. *Trends Neurosci.* 2024;47:58–70.
50. Kreiter D, Postma AA, Hupperts R, Gerlach O. Hallmarks of spinal cord pathology in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2024;456:122846.
51. van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front. Immunol.* 2020;11:760.
52. Schreiner TG, Romanescu C, Popescu BO. The Blood-Brain Barrier-A Key Player in Multiple Sclerosis Disease Mechanisms. *Biomolecules* 2022;12:538.
53. Zierfuss B, Larochelle C, Prat A. Blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis: causes, consequences, and potential effects of therapies. *Lancet Neurol.* 2024;23:95–109.
54. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, u. a. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain J. Neurol.* 2018;141:2066–82.
55. Pikor NB, Prat A, Bar-Or A, Gommerman JL. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front. Immunol.* 2015;6:657.

56. Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Salgado-Cámara P, García-Martín E, Agúndez JAG. Oxidative Stress Markers in Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25:6289.
57. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 2009;72:1914–21.
58. Lassmann H. Multiple sclerosis: lessons from molecular neuropathology. *Exp. Neurol.* 2014;262 Pt A:2–7.
59. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. *Prog. Neurobiol.* 2010;92:386–404.
60. Cencioni MT, Mattosio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat. Rev. Neurol.* 2021;17:399–414.
61. Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung H, Montalban X, u. a. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann. Neurol.* 2021;89:13–23.
62. Guo MH, Sama P, LaBarre BA, Lokhande H, Balibalos J, Chu C, u. a. Dissection of multiple sclerosis genetics identifies B and CD4⁺ T cells as driver cell subsets. *Genome Biol.* 2022;23:127.
63. Cornaby C, Gibbons L, Mayhew V, Sloan CS, Welling A, Poole BD. B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 2015;163:56–68.
64. Jakimovski D, Bittner S, Zivadnov R, Morrow SA, Benedict RH, Zipp F, u. a. Multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* 2024;403:183–202.
65. Skierlo S, Rommer PS, Zettl UK. Symptomatic treatment in multiple sclerosis—interim analysis of a nationwide registry. *Acta Neurol. Scand.* 2017;135:394–9.
66. Rommer PS, Eichstädt K, Ellenberger D, Flachenecker P, Friede T, Haas J, u. a. Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry. *Mult. Scler.* 2019;25:1641–52.
67. Jenkins TM, Toosy AT. Optic neuritis: the eye as a window to the brain. *Curr. Opin. Neurol.* 2017;30:61–6.
68. Patejdl R, Penner IK, Noack TK, Zettl UK. Multiple sclerosis and fatigue: A review on the contribution of inflammation and immune-mediated neurodegeneration. *Autoimmun. Rev.* 2016;15:210–20.
69. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, u. a. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014;83:278–86.

70. Galea I, Ward-Abel N, Heesen C. Relapse in multiple sclerosis. *BMJ* 2015;350:h1765.
71. Jain A, Rosso M, Santoro JD. Wilhelm Uhthoff and Uhthoff's phenomenon. *Mult. Scler.* 2020;26:1790–6.
72. Okuda DT, Lebrun-Frénay C. Radiologically isolated syndrome in the spectrum of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2024;30:630–6.
73. Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Čuklina J, u. a. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain J. Neurol.* 2022;145:3147–61.
74. Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurol. Clin.* 2016;34:919–39.
75. Inojosa H, Proschmann U, Akgün K, Ziemssen T. A focus on secondary progressive multiple sclerosis (SPMS): challenges in diagnosis and definition. *J. Neurol.* 2021;268:1210–21.
76. Kaisey M, Solomon AJ. Multiple Sclerosis Diagnostic Delay and Misdiagnosis. *Neurol. Clin.* 2024;42:1–13.
77. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, u. a. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 2011;69:292–302.
78. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, u. a. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2001;50:121–7.
79. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, u. a. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann. Neurol.* 2005;58:840–6.
80. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, u. a. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17:162–73.
81. Rommer PS, Zettl UK. Applying the 2017 McDonald diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2018;17:497–8.
82. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019;10:726.
83. Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS, Banwell B, de Stefano N, Enzinger C, u. a. 2021 MAGNIMS-CMSC-NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2021;20:653–70.

84. Blaschke SJ, Ellenberger D, Flachenecker P, Hellwig K, Paul F, Pöhlau D, u. a. Time to diagnosis in multiple sclerosis: Epidemiological data from the German Multiple Sclerosis Registry. *Mult. Scler.* 2022;28:865–71.
85. Uher T, Krasensky J, Sobisek L, Blahova Dusankova J, Seidl Z, Kubala Havrdova E, u. a. Cognitive clinico-radiological paradox in early stages of multiple sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2018;5:81–91.
86. Creel DJ. Visually evoked potentials. *Handb. Clin. Neurol.* 2019;160:501–22.
87. Solomon AJ, Naismith RT, Cross AH. Misdiagnosis of multiple sclerosis: Impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology* 2019;92:26–33.
88. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, u. a. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult. Scler.* 2008;14:1157–74.
89. Goldman MD, Motl RW, Rudick RA. Possible clinical outcome measures for clinical trials in patients with multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2010;3:229–39.
90. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–52.
91. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. *Mult. Scler. J.* 1999;5:244–50.
92. Rommer PS, Zettl UK. Multiple Sklerose und verwandte Krankheitsbilder. In: *Diagnostik und Therapie neurologischer Erkrankungen: State of the Art 2024/25*. München: Elsevier; 2024. Seite 48–100.
93. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie [Internet]. 2023 [abgerufen am 17. Dezember 2024]; Verfügbar unter: <https://dgn.org/leitlinie/diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose-neuromyelitis-optica-spektrum-erkrankungen-und-mog-igg-assoziierten-erkrankungen>
94. Blechinger S, Ehler J, Bsteh G, Winkelmann A, Leutmezer F, Meister S, u. a. Therapeutic plasma exchange in steroid-refractory multiple sclerosis relapses. A retrospective two-center study. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2021;14:1756286420975642.
95. Bunganic R, Blahutova S, Revendova K, Zapletalova O, Hradilek P, Hrdlickova R, u. a. Therapeutic plasma exchange in multiple sclerosis patients with an aggressive relapse: an observational analysis in a high-volume center. *Sci. Rep.* 2022;12:18374.

96. Lipphardt M, Wallbach M, Koziolk MJ. Plasma Exchange or Immunoabsorption in Demyelinating Diseases: A Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* 2020;9:1597.
97. Boedecker SC, Luessi F, Engel S, Kraus D, Klimpke P, Holtz S, u. a. Immunoabsorption and plasma exchange-Efficient treatment options for neurological autoimmune diseases. *J. Clin. Apheresis* 2022;37:70–81.
98. Amin M, Hersh CM. Updates and advances in multiple sclerosis neurotherapeutics. *Neurodegener. Dis. Manag.* 2023;13:47–70.
99. Wiendl H, Gold R, Berger T, Derfuss T, Linker R, Mäurer M, u. a. Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG): Positionspapier zur verlaufsmodifizierenden Therapie der Multiplen Sklerose 2021 (White Paper). *Nervenarzt* 2021;92:773–801.
100. Giovannoni G. Disease-modifying treatments for early and advanced multiple sclerosis: a new treatment paradigm. *Curr. Opin. Neurol.* 2018;31:233–43.
101. Wiendl H, Gold R, Berger T, Derfuss T, Linker R, Mäurer M, u. a. Kommentar der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) zur S2k-Leitlinie Multiple Sklerose. *DGNeurologie* 2021;4:319–26.
102. Ross LA, Stropp LM, Cohen JA. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Treat Multiple Sclerosis. *Neurol. Clin.* 2024;42:165–84.
103. Haghighi A, Schett G, Mougiakakos D. B cell-targeting chimeric antigen receptor T cells as an emerging therapy in neuroimmunological diseases. *Lancet Neurol.* 2024;23:615–24.
104. Abeles I, Palma C, Meednu N, Payne AS, Looney RJ, Anolik JH. B Cell-Directed Therapy in Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2024;42:103–26.
105. Fischbach F, Richter J, Pfeffer LK, Fehse B, Berger SC, Reinhardt S, u. a. CD19-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy in two patients with multiple sclerosis. *Med N. Y. N* 2024;5:550-558.e2.
106. Gustavsen S, Søndergaard HB, Linnet K, Thomsen R, Rasmussen BS, Sørensen PS, u. a. Safety and efficacy of low-dose medical cannabis oils in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2021;48:102708.
107. Akaishi T, Takahashi T, Fujihara K, Misu T, Nishiyama S, Takai Y, u. a. Impact of intrathecal IgG synthesis on neurological disability in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2020;45:102382.
108. Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 2019;15:287–300.
109. Rosenstein I, Axelsson M, Novakova L, Malmström C, Blennow K, Zetterberg H, u. a. Intrathecal kappa free light chain synthesis is associated with worse prognosis in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2023;270:4800–11.

110. Wurster U, Bachhuber F, Tumani H. Nachweis und Bedeutung von oligoklonalen Banden. In: Klinische Liquordiagnostik: Mit Zytologieatlas. Berlin/Boston: De Gruyter; 2024. Seite 309–61.
111. Rich RR, Chaplin DD. The human immune response. In: Clinical Immunology. Elsevier; 2019. Seite 3–17.
112. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 9. Aufl. Oxford: Elsevier; 2017.
113. Schroeder Jr HW, Radbruch A, Berek C. B-cell development and differentiation. In: Clinical immunology. Elsevier; 2019. Seite 107–18.
114. Berglund L, Andrade J, Odeberg J, Uhlén M. The epitope space of the human proteome. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 2008;17:606–13.
115. Wu CH, Liu IJ, Lu RM, Wu HC. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. J. Biomed. Sci. 2016;23:8.
116. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Clin. Pharmacol. Ther. 2001;69:89–95.
117. Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2019;9:a029058.
118. Dobson R, Ramagopalan S, Topping J, Smith P, Solanky B, Schmierer K, u. a. A Risk Score for Predicting Multiple Sclerosis. PLoS One 2016;11:e0164992.
119. Jarius S, Paul F, Weinshenker BG, Levy M, Kim HJ, Wildemann B. Neuromyelitis optica. Nat. Rev. Dis. Primer 2020;6:85.
120. Patterson SL, Goglin SE. Neuromyelitis Optica. Rheum. Dis. Clin. North Am. 2017;43:579–91.
121. Banwell B, Bennett JL, Marignier R, Kim HJ, Brilot F, Flanagan EP, u. a. Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: International MOGAD Panel proposed criteria. Lancet Neurol. 2023;22:268–82.
122. Ramanathan S, Brilot F, Irani SR, Dale RC. Origins and immunopathogenesis of autoimmune central nervous system disorders. Nat. Rev. Neurol. 2023;19:172–90.
123. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, u. a. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. Genes Immun. 2012;13:14–20.
124. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, u. a. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. Lancet Neurol. 2022;21:246–57.

125. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, u. a. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2017;81:857–70.
126. Freedman MS, Gnanapavan S, Booth RA, Calabresi PA, Khalil M, Kuhle J, u. a. Guidance for use of neurofilament light chain as a cerebrospinal fluid and blood biomarker in multiple sclerosis management. *EBioMedicine* 2024;101:104970.
127. Gonzalo R, Sánchez A. Introduction to microarrays technology and data analysis. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier; 2018. Seite 37–69.
128. Sun H, Chen GYJ, Yao SQ. Recent Advances in Microarray Technologies for Proteomics. *Chem. Biol.* 2013;20:685–99.
129. Buus S, Rockberg J, Forsström B, Nilsson P, Uhlen M, Schafer-Nielsen C. High-resolution mapping of linear antibody epitopes using ultrahigh-density peptide microarrays. *Mol. Cell. Proteomics* 2012;11:1790–800.
130. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007;6:805–15.
131. General Assembly of the World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J. Am. Coll. Dent.* 2014;81:14–8.
132. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J. Neurol. Sci.* 2001;184:101–22.
133. Hecker M, Lorenz P, Steinbeck F, Hong L, Riemekasten G, Li Y, u. a. Computational analysis of high-density peptide microarray data with application from systemic sclerosis to multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2012;11:180–90.
134. Fraussen J, Claes N, de Bock L, Somers V. Targets of the humoral autoimmune response in multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2014;13:1126–37.
135. Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, u. a. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:18889–94.
136. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, de Seze J, Dubucquoi S, Vermersch P, u. a. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics* 2004;4:2184–94.
137. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:D480–9.

138. Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, u. a. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D339–43.
139. Wu CY, Yang HY, Luo SF, Lai JH. From Rheumatoid Factor to Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Anti-Carbamylated Protein Antibodies for Diagnosis and Prognosis Prediction in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:686.
140. Valesini G, Gerardi MC, Iannuccelli C, Pacucci VA, Pendolino M, Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015;14:490–7.
141. Frank R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 1992;48:9217–32.
142. Lorenz P, Kreutzer M, Zerweck J, Schutkowski M, Thiesen HJ. Probing the epitope signatures of IgG antibodies in human serum from patients with autoimmune disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2009;524:247–58.
143. Luštrek M, Lorenz P, Kreutzer M, Qian Z, Steinbeck F, Wu D, u. a. Epitope predictions indicate the presence of two distinct types of epitope-antibody-reactivities determined by epitope profiling of intravenous immunoglobulins. *PLoS One* 2013;8:e78605.
144. Hecker M, Goertsches RH, Engelmann R, Thiesen HJ, Guthke R. Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy. *BMC Bioinformatics* 2009;10:262.
145. Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, u. a. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol.* 2002;3:research0062.
146. Hecker M, Fitzner B, Wendt M, Lorenz P, Flechtner K, Steinbeck F, u. a. High-Density Peptide Microarray Analysis of IgG Autoantibody Reactivities in Serum and Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Mol. Cell. Proteomics* 2016;15:1360–80.
147. IEDB_Reference:1030115 [Internet]. Immune Epitope Database Anal. Resour.2016 [abgerufen am 17. Dezember 2024]; Verfügbar unter: <http://www.iedb.org/reference/1030115>
148. Hayashi J, Carver JA. The multifaceted nature of α B-crystallin. *Cell Stress Chaperones* 2020;25:639–54.
149. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2014;13:113–26.
150. Singh V, Tripathi A, Dutta R. Proteomic Approaches to Decipher Mechanisms Underlying Pathogenesis in Multiple Sclerosis Patients. *Proteomics* 2019;19:e1800335.

151. Aguirre-Gamboa R, Joosten I, Urbano PCM, van der Molen RG, van Rijssen E, van Cranenbroek B, u. a. Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Rep.* 2016;17:2474–87.
152. Houen G, Trier NH, Frederiksen JL. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2020;11:587078.
153. Shamier MC, Bogers S, Yusuf E, van Splunter M, Ten Berge JCEM, Titulaer M, u. a. The role of antibody indexes in clinical virology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021;27:1207–11.
154. Jin H, Lu Q, Gao F, Hao H. Application of oligoclonal bands and other cerebrospinal fluid variables in multiple sclerosis and other neuroimmunological diseases: a narrative review. *Ann. Transl. Med.* 2023;11:282.
155. Popescu BFGH, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand? *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 2013;19:901–21.
156. O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, u. a. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2005;175:1974–82.
157. Gold M, Pul R, Bach JP, Stangel M, Dodel R. Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunol. Rev.* 2012;248:68–86.
158. Prüss H. Autoantibodies in neurological disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2021;21:798–813.
159. Kimura A, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Kobayashi Y, Kobayashi I, u. a. Identification of target antigens of naturally occurring autoantibodies in cerebrospinal fluid. *J. Proteomics* 2015;128:450–7.
160. Forsström B, Axnäs BB, Stengele KP, Bühler J, Albert TJ, Richmond TA, u. a. Proteome-wide Epitope Mapping of Antibodies Using Ultra-dense Peptide Arrays. *Mol. Cell. Proteomics* 2014;13:1585–97.
161. Jahn O, Siems SB, Kusch K, Hesse D, Jung RB, Liepold T, u. a. The CNS Myelin Proteome: Deep Profile and Persistence After Post-mortem Delay. *Front. Cell. Neurosci.* 2020;14:239.
162. Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids* 2022;54:99–109.
163. Belogurov AA, Kurkova IN, Friboulet A, Thomas D, Misikov VK, Zakharova MY, u. a. Recognition and Degradation of Myelin Basic Protein Peptides by Serum Autoantibodies: Novel Biomarker for Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 2008;180:1258–67.
164. Terzoglou AG, Routsias JG, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Linear epitopes of two different autoantigens-La/SSB and myelin basic protein—with a high degree of

- molecular similarity, cause different humoral immune responses. *J. Autoimmun.* 2003;21:47–57.
165. Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev II, Belogurov AA, Kurkova IN, Petrenko AG, u. a. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103:281–6.
 166. Bezuglova AM, Dmitrenok PS, Konenkova LP, Buneva VN, Nevinsky GA. Multiple sites of the cleavage of 17- and 19-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Peptides* 2012;37:69–78.
 167. Swaddiwudhipong W, Prayoonwiwat N, Kunasol P, Choomkasien P. A high incidence of neurological complications following Semple anti-rabies vaccine. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1987;18:526–31.
 168. Piyasirisilp S, Hemachudha T, Griffin DE. B-cell responses to myelin basic protein and its epitopes in autoimmune encephalomyelitis induced by Semple rabies vaccine. *J. Neuroimmunol.* 1999;98:96–104.
 169. Jog NR, McClain MT, Heinlen LD, Gross T, Towner R, Guthridge JM, u. a. Epstein Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1) peptides recognized by adult multiple sclerosis patient sera induce neurologic symptoms in a murine model. *J. Autoimmun.* 2020;106:102332.
 170. Hedegaard CJ, Chen N, Sellebjerg F, Sørensen PS, Leslie RGQ, Bendtzen K, u. a. Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP. *Immunology* 2009;128:e451–61.
 171. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, u. a. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:139–45.
 172. Kuhle J, Pohl C, Mehling M, Edan G, Freedman MS, Hartung HP, u. a. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2007;356:371–8.
 173. Myllykoski M, Seidel L, Muruganandam G, Raasakka A, Torda AE, Kursula P. Structural and functional evolution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Brain Res.* 2016;1641:64–78.
 174. Lovato L, Cianti R, Gini B, Marconi S, Bianchi L, Armini A, u. a. Transketolase and 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-Phosphodiesterase Type I Isoforms Are Specifically Recognized by IgG Autoantibodies in Multiple Sclerosis Patients. *Mol. Cell. Proteomics* 2008;7:2337–49.
 175. Peschl P, Bradl M, Höftberger R, Berger T, Reindl M. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front. Immunol.* 2017;8:529.

176. Haase CG, Guggenmos J, Brehm U, Andersson M, Olsson T, Reindl M, u. a. The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J. Neuroimmunol.* 2001;114:220–5.
177. Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S, Andersson M, Olsson T, Mather IH, u. a. Antibody Cross-Reactivity between Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and the Milk Protein Butyrophilin in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 2004;172:661–8.
178. Khalil M, Reindl M, Lutterotti A, Kuenz B, Ehling R, Gneiss C, u. a. Epitope specificity of serum antibodies directed against the extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein: Influence of relapses and immunomodulatory treatments. *J. Neuroimmunol.* 2006;174:147–56.
179. Berger T, Reindl M. Multiple sclerosis: Disease biomarkers as indicated by pathophysiology. *J. Neurol. Sci.* 2007;259:21–6.
180. Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2019;15:89–102.
181. Mayer MC, Breithaupt C, Reindl M, Schanda K, Rostásy K, Berger T, u. a. Distinction and Temporal Stability of Conformational Epitopes on Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Recognized by Patients with Different Inflammatory Central Nervous System Diseases. *J. Immunol.* 2013;191:3594–604.
182. Wajgt A, Górný M. CSF antibodies to myelin basic protein and to myelin-associated glycoprotein in multiple sclerosis. Evidence of the intrathecal production of antibodies. *Acta Neurol. Scand.* 1983;68:337–43.
183. Andersson M, Yu M, Söderström M, Weerth S, Baig S, Linington C, u. a. Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 2002;9:243–51.
184. Steinman L. No quiet surrender: molecular guardians in multiple sclerosis brain. *J. Clin. Invest.* 2015;125:1371–8.
185. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CCA, Rittling SR, Denhardt DT, u. a. The Influence of the Proinflammatory Cytokine, Osteopontin, on Autoimmune Demyelinating Disease. *Science* 2001;294:1731–5.
186. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, Ouagmire ME, Polman CH, Lassmann H, u. a. The small heat-shock protein α B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 1995;375:798–801.
187. Rothbard JB, Zhao X, Sharpe O, Strohmman MJ, Kurnellas M, Mellins ED, u. a. Chaperone Activity of α B-Crystallin Is Responsible for Its Incorrect Assignment as an Autoantigen in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 2011;186:4263–8.

188. Maksimiuk M, Sobiborowicz A, Tuzimek A, Deptała A, Czerw A, Badowska-Kozakiewicz AM. α B-crystallin as a promising target in pathological conditions - A review. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* 2020;27:326–34.
189. Lim EMF, Hoghooghi V, Hagen KM, Kapoor K, Frederick A, Finlay TM, u. a. Presence and activation of pro-inflammatory macrophages are associated with CRYAB expression in vitro and after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation* 2021;18:82.
190. Chou YK, Burrows GG, LaTocha D, Wang C, Subramanian S, Bourdette DN, u. a. CD4 T-cell epitopes of human α B-crystallin. *J. Neurosci. Res.* 2004;75:516–23.
191. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O’Conner K, Hafler DA, u. a. Protective and therapeutic role for α B-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007;448:474–9.
192. Thomas OG, Olsson T. Mimicking the brain: Epstein-Barr virus and foreign agents as drivers of neuroimmune attack in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2023;14:1304281.
193. Thomas OG, Bronge M, Tengvall K, Akpinar B, Nilsson OB, Holmgren E, u. a. Cross-reactive EBNA1 immunity targets alpha-crystallin B and is associated with multiple sclerosis. *Sci. Adv.* 2023;9:eadg3032.
194. Vietzen H, Kühner LM, Berger SM, Furlano PL, Bsteh G, Berger T, u. a. Accumulation of Epstein-Barr virus-induced cross-reactive immune responses is associated with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2024;134:e184481.
195. van Noort JM, Bajramovic JJ, Plomp AC, van Stipdonk MJB. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2000;105:46–57.
196. van Nierop GP, Mautner J, Mitterreiter JG, Hintzen RQ, Verjans GM. Intrathecal CD8 T-cells of multiple sclerosis patients recognize lytic Epstein-Barr virus proteins. *Mult. Scler.* 2016;22:279–91.
197. van Sechel AC, Bajramović JJ, van Stipdonk MJB, Persoon-Deen C, Geutskens SB, van Noort JM. EBV-Induced Expression and HLA-DR-Restricted Presentation by Human B Cells of α B-Crystallin, a Candidate Autoantigen in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 1999;162:129–35.
198. Lorenzo DN, Edwards RJ, Slavutsky AL. Spectrins: molecular organizers and targets of neurological disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2023;24:195–212.
199. de Seze J, Dubucquoi S, Fauchais AL, Matthias T, Devos D, Castelnovo G, u. a. Alpha-fodrin autoantibodies in the differential diagnosis of MS and Sjögren syndrome. *Neurology* 2003;61:268–9.
200. Bill RM, Hedfalk K. Aquaporins - Expression, purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2021;1863:183650.

201. Vandebroek A, Yasui M. Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:1603.
202. Alexopoulos H, Kampylafka EI, Chatzi I, Travasarou M, Karageorgiou KE, Dalakas MC, u. a. Reactivity to AQP4 epitopes in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2013;260:117–20.
203. Kampylafka EI, Routsias JG, Alexopoulos H, Dalakas MC, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Fine specificity of antibodies against AQP4: Epitope mapping reveals intracellular epitopes. *J. Autoimmun.* 2011;36:221–7.
204. Tanaka K, Tani T, Tanaka M, Saida T, Idezuka J, Yamazaki M, u. a. Anti-aquaporin 4 antibody in selected Japanese multiple sclerosis patients with long spinal cord lesions. *Mult. Scler. J.* 2007;13:850–5.
205. Son M, Kim D, Park KS, Hong S, Park TH. Detection of aquaporin-4 antibody using aquaporin-4 extracellular loop-based carbon nanotube biosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica. *Biosens. Bioelectron.* 2016;78:87–91.
206. Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.* 2015;128:2009–19.
207. Zhang JN, Koch JC. Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration. *Neural Regen. Res.* 2017;12:692–5.
208. Menon KN, Steer DL, Short M, Petratos S, Smith I, Bernard CCA. A novel unbiased proteomic approach to detect the reactivity of cerebrospinal fluid in neurological diseases. *Mol. Cell. Proteomics* 2011;10:M110.000042.
209. Kim J, Richter W, Aanstoot HJ, Shi Y, Fu Q, Rajotte R, u. a. Differential Expression of GAD65 and GAD67 in Human, Rat, and Mouse Pancreatic Islets. *Diabetes* 1993;42:1799–808.
210. Deutsche Diabetes Gesellschaft. Therapie des Typ-1-Diabetes: S3-Leitlinie, Version 5.0 [Internet]. 2023 [abgerufen am 17. Dezember 2024]; Verfügbar unter: https://www.ddg.info/fileadmin/user_upload/05_Behandlung/01_Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/2023/S3-LL-Therapie-Typ-1-Diabetes-Version-5-20230922.pdf
211. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. S1-Leitlinie Stiff-Man-Syndrom [Internet]. 2017 [abgerufen am 17. Dezember 2024]; Verfügbar unter: <https://dgn.org/leitlinien/030-080-stiff-man-syndrom-synonym-stiff-person-syndrom/>
212. Dade M, Berzero G, Izquierdo C, Giry M, Benazra M, Delattre JY, u. a. Neurological Syndromes Associated with Anti-GAD Antibodies. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:3701.

213. Söhnlein P, Müller M, Syren K, Hartmann U, Böhm BO, Meinck HM, u. a. Epitope spreading and a varying but not disease-specific GAD65 antibody response in Type I diabetes. *Diabetologia* 2000;43:210–7.
214. White MR, Garcin ED. D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Structure and Function. *Subcell. Biochem.* 2017;83:413–53.
215. Kolln J, Ren HM, Da RR, Zhang Y, Spillner E, Olek M, u. a. Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2006;177:5652–8.
216. Zheng Z, Mergaert AM, Fahmy LM, Bawadekar M, Holmes CL, Ong IM, u. a. Disordered Antigens and Epitope Overlap Between Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Rheumatoid Factor in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 2020;72:262–72.
217. Palmers I, Ydens E, Put E, Depreitere B, Bongers-Janssen H, Pickkers P, u. a. Antibody profiling identifies novel antigenic targets in spinal cord injury patients. *J. Neuroinflammation* 2016;13:243.
218. Thebault S, Booth RA, Freedman MS. Blood Neurofilament Light Chain: The Neurologist’s Troponin? *Biomedicines* 2020;8:523.
219. Palermo G, Mazzucchi S, Della Vecchia A, Siciliano G, Bonuccelli U, Azuar C, u. a. Different Clinical Contexts of Use of Blood Neurofilament Light Chain Protein in the Spectrum of Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 2020;57:4667–91.
220. Dinoto A, Sechi E, Flanagan EP, Ferrari S, Solla P, Mariotto S, u. a. Serum and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Associated Disease. *Front. Neurol.* 2022;13:866824.
221. Hitosugi T, Zhou L, Elf S, Fan J, Kang HB, Seo JH, u. a. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell* 2012;22:585–600.
222. Yang GJ, Tao F, Zhong HJ, Yang C, Chen J. Targeting PGAM1 in cancer: An emerging therapeutic opportunity. *Eur. J. Med. Chem.* 2022;244:114798.
223. Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, u. a. High prevalence of autoantibodies against phosphoglycerate mutase 1 in patients with autoimmune central nervous system diseases. *J. Neuroimmunol.* 2010;219:105–8.
224. Lu F, Xia Q, Ma Y, Yuan G, Yan H, Qian L, u. a. Serum proteomic-based analysis for the identification of a potential serological marker for autoimmune hepatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;367:284–90.
225. Wright NT, Cannon BR, Zimmer DB, Weber DJ. S100A1: Structure, Function, and Therapeutic Potential. *Curr. Chem. Biol.* 2009;3:138–45.

226. Singh P, Ali SA. Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells* 2022;11:2274.
227. Afanador L, Roltsch EA, Holcomb L, Campbell KS, Keeling DA, Zhang Y, u. a. The Ca²⁺ sensor S100A1 modulates neuroinflammation, histopathology and Akt activity in the PSAPP Alzheimer's disease mouse model. *Cell Calcium* 2014;56:68–80.
228. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 2011;93:421–43.
229. Messing A. Alexander disease. *Handb. Clin. Neurol.* 2018;148:693–700.
230. Högel H, Rissanen E, Barro C, Matilainen M, Nylund M, Kuhle J, u. a. Serum glial fibrillary acidic protein correlates with multiple sclerosis disease severity. *Mult. Scler.* 2020;26:210–9.
231. Meier S, Willemse EAJ, Schaedelin S, Oechtering J, Lorscheider J, Melie-Garcia L, u. a. Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Compared With Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Disease Progression in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2023;80:287–97.
232. Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006;445:269–77.
233. Sinclair D. Clinical and laboratory aspects of thyroid autoantibodies. *Ann. Clin. Biochem.* 2006;43:173–83.
234. Oncul A, Ates I, Arikan MF, Yilmaz N, Topcuoglu C, Yilmaz FM, u. a. The relationship between procalcitonin and thyroid autoantibodies in patients with autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2017;31:e22123.
235. Marrie RA, Cohen J, Stuve O, Trojano M, Sørensen PS, Reingold S, u. a. A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: Overview. *Mult. Scler.* 2015;21:263–81.
236. Samland AK, Sprenger GA. Transaldolase: from biochemistry to human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41:1482–94.
237. Esposito M, Venkatesh V, Otvos L, Weng Z, Vajda S, Banki K, u. a. Human Transaldolase and Cross-Reactive Viral Epitopes Identified by Autoantibodies of Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol.* 1999;163:4027–32.
238. Banki K, Colombo E, Sia F, Halladay D, Mattson DH, Tatum AH, u. a. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 1994;180:1649–63.
239. Tantry MSA, Santhakumar K. Insights on the Role of α - and β -Tubulin Isotypes in Early Brain Development. *Mol. Neurobiol.* 2023;60:3803–23.
240. Burley K, Westbury SK, Mumford AD. TUBB1 variants and human platelet traits. *Platelets* 2018;29:209–11.

241. Svarcová J, Fialová L, Bartos A, Steinbachová M, Malbohan I. Cerebrospinal fluid antibodies to tubulin are elevated in the patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 2008;15:1173–9.
242. Connolly AM, Pestronk A, Trotter JL, Feldman EL, Cornblath DR, Olney RK. High-titer selective serum anti-beta-tubulin antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 1993;43:557–62.
243. Cortese M, Leng Y, Bjornevik K, Mitchell M, Healy BC, Mina MJ, u. a. Serologic Response to the Epstein-Barr Virus Peptidome and the Risk for Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2024;81:515–24.
244. Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA. Cancer J. Clin.* 2018;68:116–32.
245. Kalisz K, Alessandrino F, Beck R, Smith D, Kikano E, Ramaiya NH, u. a. An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. *Insights Imaging* 2019;10:56.
246. Pender MP, Csurhes PA, Smith C, Douglas NL, Neller MA, Matthews KK, u. a. Epstein-Barr virus–specific T cell therapy for progressive multiple sclerosis. *JCI Insight* 2018;3:e124714.
247. Roshan HM, Valadan R, Hosseini SA, Ajami A. Specific antibodies to EBNA1 epitopes as risk factors for multiple sclerosis, a systematic review. *J. Neuroimmunol.* 2023;383:578202.
248. Zandian A, Forsström B, Häggmark-Månberg A, Schwenk JM, Uhlén M, Nilsson P, u. a. Whole-Proteome Peptide Microarrays for Profiling Autoantibody Repertoires within Multiple Sclerosis and Narcolepsy. *J. Proteome Res.* 2017;16:1300–14.
249. Mechelli R, Anderson J, Vittori D, Coarelli G, Annibali V, Cannoni S, u. a. Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 B-cell epitopes in multiple sclerosis twins. *Mult. Scler.* 2011;17:1290–4.
250. Rand K, Houck H, Denslow N, Heilman K. Molecular approach to find target(s) for oligoclonal bands in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1998;65:48–55.
251. Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2009;215:102–7.
252. Schlemm L, Giess RM, Rasche L, Pfuhl C, Wakonig K, Behrens JR, u. a. Fine specificity of the antibody response to Epstein-Barr nuclear antigen-2 and other Epstein-Barr virus proteins in patients with clinically isolated syndrome: A peptide microarray-based case-control study. *J. Neuroimmunol.* 2016;297:56–62.

253. Ruprecht K, Wunderlich B, Gieß R, Meyer P, Loebel M, Lenz K, u. a. Multiple sclerosis: the elevated antibody response to Epstein-Barr virus primarily targets, but is not confined to, the glycine-alanine repeat of Epstein-Barr nuclear antigen-1. *J. Neuroimmunol.* 2014;272:56–61.
254. Yu X, Gilden D, Schambers L, Barmina O, Burgoon M, Bennett J, u. a. Peptide reactivity between multiple sclerosis (MS) CSF IgG and recombinant antibodies generated from clonally expanded plasma cells in MS CSF. *J. Neuroimmunol.* 2011;233:192–203.
255. Escalante GM, Mutsvunguma LZ, Muniraju M, Rodriguez E, Ogembo JG. Four Decades of Prophylactic EBV Vaccine Research: A Systematic Review and Historical Perspective. *Front. Immunol.* 2022;13:867918.
256. Rühl J, Leung CS, Münz C. Vaccination against the Epstein-Barr virus. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020;77:4315–24.
257. Cohen JI. Therapeutic vaccines for herpesviruses. *J. Clin. Invest.* 2024;134:e179483.
258. Haj AK, Breitbach ME, Baker DA, Mohns MS, Moreno GK, Wilson NA, u. a. High-Throughput Identification of MHC Class I Binding Peptides Using an Ultradense Peptide Array. *J. Immunol.* 2020;204:1689–96.
259. Kuerten S, Lanz TV, Lingampalli N, Lahey LJ, Kleinschnitz C, Mäurer M, u. a. Autoantibodies against central nervous system antigens in a subset of B cell-dominant multiple sclerosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020;117:21512–8.
260. Kwon YN, Kim B, Kim JS, Mo H, Choi K, Oh SI, u. a. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Immunoglobulin G in the CSF: Clinical Implication of Testing and Association With Disability. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2022;9:e1095.
261. Wang Y, Dong C, Han Y, Gu Z, Sun C. Immunosenescence, aging and successful aging. *Front. Immunol.* 2022;13:942796.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	11
Abbildung 2: Struktur eines humanen Antikörpers	17
Abbildung 3: B-Zell-Aktivierung in sekundären lymphatischen Organen	19
Abbildung 4: Verschiedene Epitopvarianten	20
Abbildung 5: Prinzip eines indirekten ELISA	23
Abbildung 6: Herstellung und Prinzip von Peptid-Microarrays	25
Abbildung 7: Übersicht des Arbeitsablaufs dieser Studie.....	29
Abbildung 8: Reiber-Schema zur Visualisierung der intrathekalen Antikörpersynthese	33
Abbildung 9: Filtern MS-spezifischer Peptid-Antikörper-Reaktivitäten.....	40
Abbildung 10: Validierung der Ergebnisse via ELISA.....	41
Abbildung 11: Boxplots der Signalintensitäten aller 62 Peptid-Microarrays	45
Abbildung 12: Exemplarisches MAID-Filterergebnis im MA-Plot.....	47
Abbildung 13: Histogramm IgG-spezifischer Reaktivitäten.....	48
Abbildung 14: Heatmap der individuellen Antikörperprofile.....	49
Abbildung 15: Anzahl IgG-gebundener Peptide pro Patient und Probe	50
Abbildung 16: Zusammenfassung der Filterergebnisse des Antikörperprofilings	55
Abbildung 17: Identifizierte Epitope innerhalb von CRYAB.....	57
Abbildung 18: Korrelation der ELISA- und Microarraydaten.....	61

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: McDonald-Kriterien zur Diagnose der Multiplen Sklerose von 2017.....	13
Tabelle 2: Prognosefaktoren bei MS.....	16
Tabelle 3: Klinisch-demographische Angaben zu den untersuchten Patienten	30
Tabelle 4: Klinische Verlaufsdaten der MS-Patienten.....	32
Tabelle 5: Für das Antikörperscreening berücksichtigte humane Proteine	35
Tabelle 6: Ermittelte MS-spezifische Reaktivitäten im Serum.....	52
Tabelle 7: Ermittelte MS-spezifische Reaktivitäten im Liquor cerebrospinalis	54
Tabelle 8: Korrelation der ELISA- und Microarray-Messwerte.....	59
Tabelle 9: Ergebnisse des ELISA-Validierungsexperiments	60

8.3. Abkürzungsverzeichnis

ACTB/ACTG	Beta-Aktin/Gamma-Aktin
AK	Antikörper
AQP4	Aquaporin 4
BSA	Bovines Serumalbumin
CIS	<i>Clinically isolated syndrome</i> (klinisch isoliertes Syndrom)
CN37	2',3'-Cyclonukleotid-3'-Phosphodiesterase
CRYAB	Alpha-Crystallin B
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> (Liquor cerebrospinalis)
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMT	<i>Disease-modifying therapies</i> (verlaufsmodifizierende Therapien)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPYL2	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>
EAE	Experimentelle autoimmune/allergische Enzephalomyelitis
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i> (nukleäres EBV-Antigen)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (erweiterte Behinderungsstatus-Skala)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAD2	Glutamat-Decarboxylase 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GKS	Glukokortikosteroide
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)

Anhang

IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFN- β	Interferon- β
Ig	Immunglobulin
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAID	<i>MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion</i>
MBP	Myelin-Basisches Protein
MCP	<i>Molecular & Cellular Proteomics</i> (ein Journal)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOGAD	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease</i> (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Immunglobulin-G-assoziierten Erkrankungen)
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFL	<i>Neurofilament light chain</i> (leichte Kette des Neurofilaments)
NMOSD	<i>Neuromyelitis optica spectrum disorder</i> (Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung)
NNO	Neuritis nervi optici
OCB	<i>Oligoclonal bands</i> (oligoklonale Banden)
OR	<i>Odds Ratio</i> (Chancenverhältnis)
PGAM1	Phosphoglyceratmutase 1
PIRA	<i>Progression independent of relapse activity</i> (schubunabhängiger Krankheitsprogress)
PLP	Proteolipid-Protein

Anhang

PPMS	<i>Primary progressive multiple sclerosis</i> (primär progrediente Multiple Sklerose)
Py	<i>Pack years</i> (Packungsjahre)
RRMS	<i>Relapsing-remitting multiple sclerosis</i> (schubförmig remittierende Multiple Sklerose)
SPMS	<i>Secondary progressive multiple sclerosis</i> (sekundär progrediente Multiple Sklerose)
SPTAN1	Alpha-II Spektrin
TALDO1	Transaldolase
TPO	Thyreoperoxidase
TUBB1	Tubulin-beta-1-Kette
UV	Ultraviolett
VEP	Visuell evozierte Potentiale
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.4. Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, immunvermittelte und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die klinisch sehr heterogen verläuft und die häufigste Ursache für bleibende neurologische Defizite im jungen Erwachsenenalter ist.
2. Die Ätiologie und Pathogenese der MS sind trotz jahrelanger intensiver Forschung weiterhin zu großen Teilen nicht geklärt. Hierbei sind vermehrt B-Zellen in den letzten Jahren in den Fokus der MS-Forschung gerückt.
3. Es gibt bisher wenige etablierte Biomarker, die für die Diagnosesicherung (wie intrathekale Immunglobulin-G-Synthese) und differentialdiagnostische Absicherung (wie Antikörper gegen Aquaporin 4 und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein), die Prognoseabschätzung oder im Rahmen des Therapiemanagements der MS genutzt werden können.
4. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Studien, in denen Antikörper als molekulare Biomarker untersucht und verschiedenste (Auto-)Antigene postuliert wurden. Von dieser Vielzahl an potentiellen (Auto-)Antikörpern konnte sich bis jetzt jedoch keiner als molekularer Biomarker bei MS im klinischen Alltag durchsetzen.
5. Ein Problem der Identifizierung von MS-spezifischen Antikörperreaktivitäten liegt unter anderem darin, dass in bisherigen Studien meist nur Antikörperreaktivitäten gegen einige wenige Peptide oder Proteine untersucht wurden. Mit Hilfe von hochdichten Microarrays lassen sich ressourcensparend Antikörperreaktivitäten gegen tausende Peptide (lineare Epitope) gleichzeitig im Liquor cerebrospinalis (CSF) oder Serum untersuchen.
6. Ziel dieser Arbeit war es, Besonderheiten im Antikörperprofil von MS-Patienten gleichzeitig in CSF und Serum festzustellen und somit MS-spezifische Antikörpersignaturen zu identifizieren. Zudem sollten Unterschiede im Antikörperprofil zwischen Patienten mit schubförmig remittierender MS (RRMS) und Patienten mit primär-progredienter MS (PPMS) eruiert werden.

7. Zur Suche nach MS-spezifischen (Auto-)Antikörperreaktivitäten in Serum und CSF wurden erstmals hochdichte Peptid-Microarrays verwendet. Die Microarrays wurden dabei von der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie eigens designt. Die von den Proteinen abgeleiteten Peptidsequenzen waren jeweils überlappend, um kein Epitop zu verpassen. Hierfür erfolgte die Auswahl 45 humaner Proteine sowie weiterer viraler Peptide und Mimotope, die jeweils nach Literatur- und Datenbankrecherche als potentielle (Auto-)Antigene bei MS beschrieben waren. Insgesamt wurden 3991 Peptide zusammengestellt.
8. Zur Identifizierung MS-spezifischer Antikörperreaktivitäten diente ein zweistufiges Filterverfahren. Im ersten Schritt wurden diejenigen Peptide selektiert, gegen die Antikörperreaktivitäten in mindestens einer Serum- bzw. CSF-Probe detektiert werden konnten. Im zweiten Schritt wurden die Daten der beiden MS-Gruppen (10 PPMS-Patienten, 10 RRMS-Patienten) jeweils mit der Kontrollgruppe (n=10) verglichen, um potentielle MS-spezifische Antikörperreaktivitäten zu finden.
9. Im abschließenden Schritt wurden vier Peptide ausgewählt, für die mit besonders hoher statistischer Signifikanz MS-spezifische Signale festgestellt wurden, um die Daten des Microarray-Versuchs mit dem Goldstandard ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) zu validieren.
10. Die ELISA-Daten korrelierten mit den Microarray-Daten, sodass die Peptid-Microarrays als zuverlässiges Analyseverfahren bestätigt werden konnten.
11. Das Antikörperprofil der Patienten war individuell sehr unterschiedlich. Den ersten Filterschritt überstanden nur die 889 der 3991 Peptide. Gegen diese zeigte mindestens eine Serum- oder CSF-Probe Antikörperreaktivitäten.
12. Im Vergleich der RRMS- bzw. PPMS-Gruppe mit der Kontrollgruppe separat für CSF und Serum wurden IgG-Reaktivitäten gegen 54 verschiedene Peptide als MS-spezifisch identifiziert (33 Peptide für Serum, 23 Peptide für CSF).
13. Es gab 38 Peptide von 19 der untersuchten 45 humanen Proteine samt aller Isoformen, für die MS-spezifische Reaktivitäten gemessen wurden. Neun gefilterte Peptide, gegen die MS-spezifische IgG-Reaktivitäten gezeigt werden konnten, stammten von Proteinen des Epstein-Barr-Virus (EBV) und

sieben weitere Peptide entsprachen zuvor in der Literatur beschriebenen Mimotopen.

14. Für die PPMS-Gruppe wurden gegen wesentlich mehr Peptide MS-spezifische Antikörperreaktivitäten festgestellt (n=47) als für die RRMS-Gruppe (n=15). Dies könnte auf eine breitere Entzündungsaktivität bei Patienten mit PPMS hinweisen.
15. Die Immunreaktionen zwischen den beiden MS-Gruppen hatten auch Ähnlichkeiten, denn gegen acht der 15 Peptide mit MS-spezifischen Antikörperreaktivitäten in der RRMS-Gruppe wurden ebenfalls MS-spezifische Antikörperreaktivitäten für die PPMS-Gruppe festgestellt.
16. Die identifizierten MS-spezifischen Antikörperreaktivitäten gegen einige Peptide humaner Proteine (wie Beta- und Gamma-Aktin, saures Gliafaserprotein und Myelin-Basisches Protein) sind am ehesten Ausdruck der Neurodestruktion bei MS. Solche Antikörper könnten wertvolle Biomarker für Therapiekontrolle, Prognoseabschätzung und Beurteilung der Krankheitsaktivität sein.
17. Weitere MS-spezifische Antikörperreaktivitäten bspw. gegen die Phosphodiesterase CN37 oder die untersuchten Mimotope sind noch wenig erforscht.
18. Die Peptidsequenz „RRPFF“ des humanen Hitzeschockproteins Alpha-Crystallin B (CRYAB) 11-15 findet sich in der Sequenz des EBV-Proteins EBNA1 (402-406) wieder. Gegen die entsprechenden Peptide wurden MS-spezifische Antikörperreaktivitäten gefunden.
19. Interessant hierbei ist, dass Antikörperreaktivitäten gegen das CRYAB-Peptid nur in jenen Patientenproben detektiert werden konnten, die auch Antikörperreaktivitäten gegen das EBNA1-Epitop zeigten. Die Entstehung kreuzreaktiver Antikörper gegen CRYAB, welches unter anderem neuroprotektive Aufgaben erfüllt, aufgrund molekularer Mimikry nach einer EBV-Infektion könnte in der Entstehung und Aufrechterhaltung der MS bedeutend sein und sollte daher weiter erforscht werden.

8.5. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe K. Zettl aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock für die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit sowie die wertvollen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Mein größter Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit Dr. Michael Hecker, der mir von der Einarbeitung in das Thema bis zur Fertigstellung der Arbeit eine riesige Unterstützung war. Ich danke ihm für seine stets freundliche Art und Weise, für die vielen förderlichen Diskussionen, für die zahlreichen Erläuterungen, für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen und dafür, dass er jederzeit erreichbar war und ich immer mit einer raschen, hilfreichen Antwort rechnen durfte. Nicht zuletzt möchte ich mich insbesondere für sein Verständnis für schwierige persönliche Umstände sowie seine scheinbar endlose Geduld bedanken.

Ein großer Dank gebührt Frau Dr. Brit Fitzner aus der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie sowie Herrn Dr. Peter Lorenz und Frau Kristin Flechtner des Instituts für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock für die Durchführung der Laborversuche. Zudem danke ich den weiteren Mitarbeitern des Instituts für Immunologie der Universitätsmedizin Rostock, insbesondere Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Thiesen für die Mithilfe bei der Realisierung der Studie gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Uwe K. Zettl, und Herrn Felix Steinbeck für Unterstützung bei der Analyse der Daten. Auch möchte ich Frau Ina Schröder aus der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie der Universitätsmedizin Rostock danken, die mit Herrn Prof. Dr. Uwe K. Zettl für die Bereitstellung der klinischen Daten zuständig war.

Darüber hinaus möchte ich Frau Nele Retzlaff für ihre Hilfe bei der Dokumentation der klinischen Daten, Frau Elke Schade für ihre Hilfe bei der Vorverarbeitung der Microarray-Rohdaten sowie Frau Christa Tiffert für ihre allgemeine Hilfe als *Study Nurse* danken.

Mein letzter Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, die mir mit motivierenden Worten, emotionaler Unterstützung und Zuversicht insbesondere auch in schwierigen Situationen geholfen haben.

8.6. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen in der Online-Version entfernt.

8.7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Matthias Wendt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Antikörperprofiling in Liquor cerebrospinalis und Serum bei Multipler Sklerose unter Verwendung hochdichter Microarrays“ selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden von mir ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen. Die Promotionsarbeit habe ich weder in dieser noch in einer ähnlichen Form einer anderen Fakultät oder Hochschule im Inland oder Ausland zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Lübeck, 17.12.2024

Matthias Wendt