

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann**

**Evaluation von Beta-2-Mikroglobulin, Laktat und
Angiotensin-Converting Enzyme im Liquor als Biomarker
der Multiplen Sklerose**

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Luzia Maria Hähnel
aus Mühldorf am Inn**

Würzburg, August 2021



Referent: Priv.- Doz. Dr. med. Mathias Buttman

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose</i>	<i>1</i>
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiopathogenese.....	2
1.1.4	Verlaufsformen und Klinik der MS	5
1.2	<i>Diagnostik</i>	<i>8</i>
1.3	<i>Stellenwert von Biomarkern in der MS-Diagnostik</i>	<i>10</i>
1.3.1	Allgemeines	10
1.3.2	β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE als liquordiagnostische Parameter bei MS.....	13
1.4	<i>Zielsetzung.....</i>	<i>16</i>
2	Material und Methoden.....	18
2.1	<i>Ethik</i>	<i>18</i>
2.2	<i>Liquoranalytik.....</i>	<i>18</i>
2.3	<i>Diagnosegruppen</i>	<i>19</i>
2.3.1	Untersuchungsgruppe	19
2.3.2	Kontrollgruppe	22
2.4	<i>Gruppenzusammensetzung nach Umsetzung</i>	<i>26</i>
2.5	<i>Statistische Analyse.....</i>	<i>28</i>
3	Ergebnisse.....	29
3.1	<i>Demographische und klinische Charakterisierung der Kollektive</i>	<i>29</i>
3.2	<i>Altersabhängigkeit der Liquorspiegel von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE.....</i>	<i>30</i>
3.3	<i>Vergleich der Liquorspiegel von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei MS- und NIND-Fällen</i>	<i>33</i>

3.4	<i>Korrelation der alterskorrigierten β2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel innerhalb der MS- und Kontrollgruppe</i>	35
3.5	<i>Liquorspiegel von alterskorrigiertem β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei verschiedenen Verlaufsformen der MS</i>	37
3.6	<i>Einfluss von klinischen Schüben auf die Liquormarker</i>	39
3.7	<i>Korrelation von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor mit der Dauer und dem Schweregrad der MS</i>	41
4	Diskussion	43
4.1	<i>Altersabhängigkeit von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor von MS- und NIND-Fällen</i>	43
4.2	<i>Vergleich der β2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel im Liquor von MS- und NIND-Fällen</i>	45
4.3	<i>Potentielle Korrelationen zwischen den Liquorspiegeln von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei MS- und NIND-Fällen</i>	47
4.4	<i>Eignung von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor zur Differenzierung unterschiedlicher MS-Verlaufsformen</i>	48
4.5	<i>Einfluss von MS-Schüben auf die Liquorspiegel von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE</i>	50
4.6	<i>Eignung der Liquorspiegel von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE als Biomarker zur Beurteilung der Dauer und des Schweregrades der MS-Erkrankung</i>	53
4.7	<i>Limitationen und Stärken der Studie</i>	54
4.8	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>	56
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	58

- I** **Abkürzungsverzeichnis**
- II** **Abbildungsverzeichnis**
- III** **Tabellenverzeichnis**
- IV** **Danksagung**
- V** **Lebenslauf**
- VI** **Eigene Veröffentlichung**

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose

1.1.1 Definition

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch fokale Entmarkungsherde (Demyelinisierung) im Gehirn und Rückenmark charakterisiert ist. Weiter findet sich oftmals bereits früh im Erkrankungsverlauf ein Axon- und Neuronenverlust, der auch unabhängig von einer Demyelinisierung auftreten kann. Histopathologisch zeigen sich mit fortschreitender Erkrankungsdauer vorzugsweise periventrikulär und juxtakortikal gelegene gliotische Narben, die makroskopisch derb-sklerotisch imponieren und der Erkrankung ihren Namen gaben [1, 2].

1.1.2 Epidemiologie

Die MS ist der häufigste Grund für eine körperliche Behinderung nicht traumatischer Genese im jungen Erwachsenenalter und hat daher eine hohe sozioökonomische Bedeutung [3]. Bei klinischer Erstmanifestation sind die Betroffenen meist zwischen 20 und 40 Jahre alt. Schubförmige und sekundär progrediente Verlaufsformen stellen die häufigsten klinischen Verlaufstypen dar; Frauen sind hiervon sowie insgesamt von MS zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer [1, 4].

Weltweit sind über zwei Millionen Menschen an MS erkrankt [5], was einen Anstieg der Diagnosehäufigkeit von etwa 10 % seit 1990 bedeutet [6]. Dem globalen Trend entsprechend ist auch in Deutschland die Prävalenz der MS in den vergangenen Jahrzehnten kontinuierlich angestiegen. 2017 wurde die kumulative Inzidenz gemäß Krankenkassendaten auf etwa 18/100.000 EinwohnerInnen geschätzt, was für Deutschland im internationalen Vergleich eine Spitzenposition bedeutet [5, 7]. Mögliche Gründe für diese Zunahme sind unter anderem die im Verlauf liberalisierten Diagnosekriterien, der bessere Zugang zu einer hochauflösenden Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und die insgesamt steigende Lebenserwartung [6, 7].

1.1.3 Ätiopathogenese

Als gesichert gilt, dass es sich bei der MS um eine Erkrankung multifaktorieller Genese handelt. Nach aktueller Auffassung führt ein komplexes Zusammenspiel diverser Umwelt- und Lebensstilfaktoren vor dem Hintergrund einer genetischen Disposition zum Ausbruch der Erkrankung [1, 8].

Gene im humanen Leukozytenantigen (engl. Human Leukocyte Antigen, HLA)-Komplex, einer Region auf Chromosom 6 mit bedeutenden und zahlreichen für die Immunfunktion zuständigen Genen, sind die stärksten genetischen Risikofaktoren für MS [8–10]. Im HLA-Komplex sind die Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC)-II-Gene für die Antigenpräsentation gegenüber Cluster of Differentiation (CD) 4⁺-T-Lymphozyten und MHC-I-Gene für die Präsentation gegenüber CD8⁺-T-Lymphozyten lokalisiert. Die MHC-II-Variante HLA-DRB1*15:01 ist mit einem dreifach erhöhten MS-Risiko assoziiert [9].

Daneben wurden auf Basis von genomweiten Assoziationsstudien auch abseits der MHC-Lokusse über 200 Suszeptibilitätsgene identifiziert, die bei immunologischen Signalkaskaden eine Rolle spielen [3, 10, 11]. So wurden zahlreiche HLA-unabhängige Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphisms) ausgemacht, die nahe an den Genlokussen zur Regulation von Funktionen des angeborenen oder erworbenen Immunsystems liegen [9, 10].

Weiter weisen Migrationsstudien auf einen starken Einfluss von Umweltfaktoren hin. Bei Kindern von MigrantInnen aus Gebieten mit niedrigem MS-Risiko, die in Ländern mit hohem MS-Risiko aufwachsen, entspricht das individuelle Risiko dem des Geburtslandes. Eine wechselseitige Beeinflussung genetischer und umgebungsbedingter Risikofaktoren ist somit wahrscheinlich [8, 9].

Die MS tritt in industrialisierten Ländern gehäuft auf. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die „Hygienehypothese“. Danach schützt eine Exposition gegenüber Krankheitserregern in der frühen Kindheit, wie sie eher in Entwicklungsländern gegeben ist, vor der Entwicklung von Allergien und Autoimmunerkrankungen [8]. Generell wird

unter dem Schlagwort „Hygienehypothese“ die Exposition gegenüber Mikroorganismen und Viren als ein risikomodulierender Faktor bei MS diskutiert [8, 12].

Das Mikrobiom des Darmes ist grundsätzlich in der Lage, pro- und antiinflammatorische Immunantworten zu generieren. Segmentierte filamentöse Bakterienstämme induzieren einen bestimmten Typ von T-Helferzellen (Th-Zellen). Diese Th17-Zellen spielen bei chronischen Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Dagegen begünstigen Clostridien-Stämme und *Bacteroides fragilis* eine Differenzierung in regulatorische T-Zellen, die die Immunantwort bremsen. Zudem enthält das Mikrobiom einen Pool von Antigenen, die durch molekulares Mimikry Autoimmunreaktionen auslösen können. Eine pathophysiologische Relevanz dieser Mechanismen bei der MS liefern tierexperimentelle und humane Daten. Beispielsweise beeinflusst eine Modulation des Mikrobioms den Verlauf einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis in Mäusen. Das Mikrobiom von MS-PatientInnen zeigt gegenüber Gesunden eine Dysbiose [12–14].

Ein weiterer Risikofaktor für eine MS-Erkrankung ist die späte Infektion mit dem B-lymphotropen Epstein-Barr-Virus, das in Memory-B-Zellen überdauert und auch in B-Zellen tertiärer lymphatischer Organe (siehe unten) nachgewiesen werden kann, wo es mit einem aktivierten B-Zell-Phänotyp und einer erhöhten Antigen-Präsentation assoziiert ist. Zudem entziehen sich die Zellen durch von dem Epstein-Barr-Virus eingebrachte Transkriptionsfaktoren (Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA) 3A/3C) der Plasmazelldifferenzierung und der Kontrolle durch T-Zellen [15, 16].

Als weiterer Risikofaktor erhöht ein Nikotinabusus die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer MS, die Konversion eines klinisch isolierten Syndroms (engl. Clinically Isolated Syndrome, CIS) in eine manifeste MS sowie die Krankheitsaktivität [17–19]. Als Ursachen werden eine Verschiebung der Immunzellpopulationen zu einem proinflammatorischen Phänotyp, eine direkte Wirkung von Nikotin auf die Endothelbarriere der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und eine vermehrte Autoantigen-Exposition durch die zytotoxische Wirkung diskutiert [20]. Auch Adipokine haben eine direkte proinflammatorische Wirkung, was die Assoziation von MS mit Übergewichtigkeit erklärt [21]. Vitamin-D moduliert bei Bindung an den Vitamin-D-

Rezeptor als Transkriptionsfaktor eine Reihe antiinflammatorischer Gene, wodurch eine Verschiebung in Richtung eines weniger entzündlichen Milieus mit einer erhöhten Zahl regulatorischer T-Zellen und einer niedrigeren Th1- und Th17-Aktivität ausgelöst wird. Zudem wird die B-Zell-Proliferation gehemmt, was die Antikörper-Produktion reduziert. Dies könnte erklären, weshalb ein Vitamin-D-Mangel mit einem erhöhten MS-Erkrankungsrisiko in Verbindung steht [22].

Nach aktueller Auffassung führt ein komplexes Zusammenspiel aus T-Zellen, B-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere der ortsständigen Mikroglia, bei der MS zur Ausbildung entzündlicher Läsionen. Diese Plaques zeigen eine fokale Störung der BHS mit begleitender Infiltration vor allem von CD8⁺-T-Zellen und Makrophagen, aber auch von Plasmazellen und reifen B-Zellen. Die daraus folgende Demyelinisierung und reaktive Astroglieose führt zur axonalen Schädigung und Neurodegeneration mit den MS-typischen klinischen Ausfallerscheinungen. Betroffen ist vor allem die weiße Substanz mit Prädilektionsstellen periventrikulär, spinal und am Nervus opticus [2, 23–25].

Das krankheitsauslösende Antigen der MS ist nicht bekannt. Zudem ist nicht geklärt, ob die Erkrankung primär durch eine Immunreaktion von T-Zellen gegen ein ZNS-Autoantigen und anschließender ZNS-Migration der T-Zellen ausgelöst wird oder ob die Entzündungsreaktion ein Epiphänomen unabhängiger neurodegenerativer Prozesse ist, die ZNS-Antigene demaskieren und sekundär zu einer Immunreaktion führen. Für die erste Hypothese spricht die früh im Krankheitsverlauf detektierbare Störung der BHS in nicht läsional veränderter weißer Substanz. Die zweite Hypothese würde die bereits im frühen Krankheitsstadium detektierbare kortikale Atrophie erklären [2, 23, 24, 26, 27].

Die Konfiguration der entzündlichen Läsionen ändert sich im Krankheitsverlauf. Die Zahlen ortsständiger Makrophagen (Mikroglia) und B-Zellen nehmen zu. Meningeal können sich tertiäre lymphatische Organe (B-Lymphozyten-Nester) ausbilden, in denen intrathekal Lymphozyten aktiviert werden. Klinische Korrelate der B-Zellen sind neben dem Nachweis oligoklonaler Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis auch erhöhte Antikörper-Indizes gegen neurotrope Viren. Die exzellente Wirksamkeit B-Zell-

gerichteter Therapien bestätigt die Bedeutung dieser Mechanismen für die MS [3, 8, 23, 24, 28–30].

Ob die Kompartimentierung der Entzündung oder die primär neurodegenerative Genese der Erkrankung Ursache für den Verlust der Wirksamkeit antiinflammatorischer Therapien ist, bleibt unklar. Auch unter therapeutischen Gesichtspunkten ist die detaillierte Aufklärung der Pathomechanismen von Bedeutung. Beispielhaft ist die mitochondriale Dysfunktion zu nennen, die laut einigen AutorInnen maßgeblich an der Entstehung neuroaxonaler Schäden bei der MS beteiligt ist. Die axonale Informationsleitung toleriert nur geringe Schwankungen in der Energiezufuhr. Die mitochondriale Energiesynthese reagiert wiederum empfindlich auf oxidativen Stress, der bei der MS durch das Milieu einer chronischen Inflammation entsteht [3, 24, 26, 27].

1.1.4 Verlaufsformen und Klinik der MS

Die schubförmig remittierende MS (engl. Relapsing Remitting MS, RRMS), an der 85 % der MS-PatientInnen leiden, ist die häufigste Verlaufsform. Hierbei treten neurologische Defizite im Rahmen von Schüben auf, die sich vollständig oder unvollständig zurückbilden [31, 32]. Unter einem Schub sind entweder neu auftretende oder sich klinisch verschlechternde MS-Symptome zu verstehen, die für mindestens 24 Stunden anhalten und einen zeitlichen Abstand von mindestens 30 Tagen zum Beginn eines vorangegangenen Schubes aufweisen [32, 33].

Die sekundär progrediente MS (engl. Secondary Progressive MS, SPMS) geht definitionsgemäß aus einer RRMS hervor. Dabei kommt es zu einer kontinuierlichen, schubunabhängigen Zunahme der Behinderung (mit oder ohne aufgesetzte Schübe) nach zuvor schubförmigem Verlauf [27, 32].

Die primär progrediente MS (engl. Primary Progressive MS, PPMS) ist durch das Fehlen von Schüben und eine progrediente Behinderungszunahme von Krankheitsbeginn an charakterisiert. Bei aufgelagerten Schüben spricht man von einer progredient schubförmigen MS [31, 32].

Beim CIS handelt es sich um eine klinische Manifestation einer möglichen MS, ohne dass die MS-Diagnosekriterien erfüllt sind. Häufig entspricht ein CIS einem frühen MS-Krankheitsstadium, wobei nicht jedes CIS in eine manifeste MS übergeht [31, 34].

In einer MRT-Untersuchung auftretende Läsionen bei asymptomatischen Personen, die die bildmorphologischen Kriterien einer MS erfüllen, werden als radiologisch isoliertes Syndrom (engl. Radiologically Isolated Syndrome) klassifiziert [32, 34].

Zudem wird die MS nach Lublin [35] in aktive (im Sinne klinisch oder paraklinisch nachweisbarer autoimmun-entzündlicher Aktivitäten) und nicht aktive Erkrankungsstadien eingeteilt, wobei eine Behinderungsprogression unabhängig von einer aktiven Erkrankung auftreten kann [8, 29].

Eine Klassifizierung der Verlaufsformen ist sinnvoll, da sich hieraus therapeutische Konsequenzen ergeben. Die aktuellen Behandlungsoptionen wirken trotz unterschiedlicher Mechanismen letztlich immunmodulatorisch und sind damit in erster Linie bei Verläufen mit entzündlicher Krankheitsaktivität (z. B. klinische Schübe, Läsionslastzunahme, Kontrastmittel-anreichernde Läsionen) wirksam [3, 29, 36]. Progrediente Verläufe ohne aufgelagerte entzündliche Krankheitsaktivität lassen sich durch aktuell verfügbare Medikamente schlecht modifizieren. Daher wird immer häufiger vereinfachend zwischen schubförmiger und progredienter Erkrankung unterschieden, wobei das Ausmaß der Gemeinsamkeiten des Pathomechanismus bei der SPMS und PPMS unklar ist. Insbesondere bleibt die Frage für die Gründe des subklinischen Verlaufes der PPMS bis zur Progression offen [8, 29, 36].

Prädiktiv für einen früheren Übergang in eine progrediente MS-Verlaufsform sind neben dem männlichen Geschlecht, dem Alter bei Erstmanifestation und der Myelonbeteiligung auch potentiell modifizierbare Faktoren wie Nikotinabusus, Übergewicht und reduzierte Vitamin-D3-Serumspiegel [29]. Prognostisch günstig ist eine gute Rückbildung von Schubsymptomen im frühen Krankheitsverlauf [37].

Da sich entzündliche Läsionen prinzipiell im ganzen ZNS manifestieren können, zeichnet sich die MS durch eine heterogene Symptomatik und individuell unterschiedliche Verläufe aus. Eine Prädilektionsstelle ist der Nervus opticus. Daher ist die Optikusneuritis (Retrobulbärneuritis) ein häufiges Frühsymptom, das weiteren MS-Schüben um Jahre vorausgehen kann und das in der Ophthalmoskopie, zumindest in der Akutphase, meist einen unauffälligen Befund ergibt [2, 31, 32].

Daneben finden sich Störungen der Okulomotorik mit Auftreten von Doppelbildern, teils auch in Form komplexer Ausfälle, wie der gelegentlich beidseitigen internukleären Ophthalmoplegie durch Schädigung der mittelliniennahen Fasciculi longitudinales mediales [32, 38].

Weitere klinische MS-Leitsymptome sind zentral verteilte Sensibilitätsstörungen, die alle Qualitäten betreffen können, und sich anders als motorische Defizite häufig nur langsam und inkomplett zurückbilden. Letztere können in unterschiedlicher Schwere bis hin zur Plegie auftreten und im Verlauf zu einer spastischen Tonuserhöhung mit entsprechender Reflexsteigerung, Kloni und positiven Pyramidenbahnzeichen führen [2, 32].

Ebenfalls häufig und oft schwer behindernd sind zerebelläre Symptome mit Ataxie, Dysarthrie, Störungen der Diadochokinese und Tremor. Unter dem Begriff „Charcot-Trias“ wird das kombinierte Auftreten eines Intentionstremors, eines Nystagmus sowie einer skandierenden Sprache zusammengefasst [2, 32, 38].

Die entzündlichen Läsionen können nicht nur zu Ausfällen, sondern auch zu Reizerscheinungen führen. Bei dem „Lhermitte-Zeichen“ handelt es sich um eine mechanisch provozierte ephaptische Erregung aufgrund einer Demyelinisierung bei zervikaler Myelitis. Die PatientInnen verspüren beim Beugen des Nackens elektrisierende Missempfindungen entlang der Wirbelsäule mit Ausstrahlung in die Extremitäten [2, 32, 38].

MS-PatientInnen leiden weiter häufig unter vegetativen Einschränkungen, wie Blasen- und Mastdarmstörungen sowie Störungen der Sexualfunktion. Hinzutreten können eine reduzierte körperliche Belastbarkeit und eine gesteigerte Ermüdbarkeit, die unabhängig oder in Kombination mit kognitiven Defiziten auftreten können [32, 39].

Die Quantifizierung der Behinderung von MS-PatientInnen erfolgt meist mittels der Kurtzke-Skala (engl. Expanded Disability Status Scale, EDSS), die als numerische Skala von 0 (keine klinischen Zeichen) bis 10 (Tod der/des Patientin/Patienten) reicht. Der Punktwert ergibt sich aus der Summe von Defiziten in verschiedenen Funktionssystemen gemäß einem komplexen Regelwerk. Ab einem EDSS von 6 wird fast ausschließlich die Mobilität gewertet [40].

Der zeitliche Verlauf der MS-Erkrankung wird durch den Progressionsindex (Quotient aus EDSS-Wert und klinischer Krankheitsdauer in Jahren) ausgedrückt.

Zur Bestimmung des Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) wird der individuelle EDSS-Wert mit den EDSS-Werten eines PatientInnenkollektivs mit gleicher Erkrankungsdauer in Relation gesetzt und dann als Perzentil (als Score zwischen 0 und 10) berechnet [41–44].

1.2 Diagnostik

Passend zum unvollständigen Verständnis der MS-Pathophysiologie steht kein pathognostischer Biomarker zur Verfügung. Die Diagnosestellung erfolgt entsprechend klinisch, bildgebend und liquordiagnostisch anhand diverser komplementärer Untersuchungen, die zusammen die diagnostische Sicherheit erhöhen sollen. Hierfür wurden unter anderem die regelmäßig aktualisierten und zuletzt 2017 revidierten sogenannten McDonald-Kriterien erstellt [8, 31].

Diese fordern für die Diagnose einer schubförmigen MS das Vorliegen von Hinweisen für eine mehrphasige (zeitliche Dissemination) und multilokulär das ZNS betreffende (räumliche Dissemination) Erkrankung. Diese Bedingungen können a) klinisch, beispielsweise durch das Auftreten von mindestens zwei Schüben in verschiedenen Funktionsbereichen, b) MRT-morphologisch durch den Nachweis entzündungstypischer T2-hyperintenser Läsionen in zwei von vier definierten Regionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell, spinal) mit oder ohne Kontrastmittel-Aufnahme oder Zunahme der Anzahl über die Zeit als Floriditätsnachweis, oder c) liquordiagnostisch durch den Nachweis von OKB als Hinweis auf einen chronischen Prozess erfüllt werden. Grundvoraussetzung für die Diagnosestellung bleibt aktuell eine mindestens einmalige klinische Symptomatik. Durch eine Kombination der Methoden ist häufig bereits mit der ersten klinischen Episode eine Diagnosestellung möglich. Bei MS-Verdacht sollten daher neben der ausführlichen Untersuchung und Anamnese zur gezielten Identifikation möglicher früherer Krankheitsepisoden eine Bildgebung der Neuroachse mittels MRT und eine Lumbalpunktion erfolgen [31, 32, 45].

Durch den fortlaufenden Versuch, über die Implementierung weiterer (para-)klinischer Marker die diagnostische Sensitivität zu erhöhen, sollen PatientInnen möglichst früh einer verlaufsmodifizierenden Behandlung zugeführt werden. Kürzlich wurde in einer großen Kohorte von CIS-PatientInnen gezeigt, dass der elektrophysiologische Nachweis

einer Beteiligung des Nervus opticus als Zeichen der räumlichen Dissemination die diagnostische Sensitivität erhöht [45].

Der Stellenwert der Liquordiagnostik wurde bei der letzten Revision der McDonald-Kriterien im Vergleich zu den vorangehenden Versionen wieder stärker betont, wenn auch nur, um durch den Liquor eine zeitliche Dissemination der Erkrankung belegen zu können und nicht etwa wegen des differentialdiagnostischen Werts der Liquoruntersuchung [3, 8, 45].

Die meisten Liquorbefunde bei MS-PatientInnen sind nicht spezifisch. Es gibt aber typische Konstellationen wie eine lymphozytäre Pleozytose (insbesondere im Schub), eine intrathekale Immunglobulin (Ig)-G-Synthese sowie den Nachweis von OKB [31, 32, 39]. Zudem sind Liquorbefunde für den geforderten Ausschluss von Differentialdiagnosen essentiell. Die intrathekale IgG-Synthese, die bei der MS anders als bei deren Differentialdiagnosen während des gesamten Krankheitsverlaufs feststellbar ist, gilt als der entscheidende laborchemische Befund bei der MS. Lässt sich kein intrathekal gebildetes IgG nachweisen, sollte die Verdachtsdiagnose MS zumindest kritisch hinterfragt werden [46].

Die Ig-Synthese im Liquor durch Plasmazellen ist Ausdruck einer chronischen Entzündung im ZNS [47]. Insbesondere der qualitative Nachweis der intrathekalen IgG-Produktion anhand von liquorspezifischen OKB in der isoelektrischen Fokussierung ist eine hocheffektive Methode [46, 47]. OKB finden sich bei bis zu 95 % aller MS-PatientInnen. Trotz ihres möglichen Auftretens im Rahmen anderer neurologischer Erkrankungen besitzen sie in der MS-Diagnostik, insbesondere als Ergänzung zur MRT, einen hohen Stellenwert. Bei einem CIS geht das Vorkommen von OKB mit einer deutlich erhöhten Wahrscheinlichkeit für einen Übergang in eine gesicherte MS einher [47, 48].

Neben dem qualitativen Nachweis liquorspezifischer OKB ist eine quantitative Bestimmung des prozentualen Anteils intrathekal synthetisierten IgGs am Gesamt-IgG im Liquor möglich. Hierzu werden der Liquor/Serum-Albuminquotient und der Liquor/Serum-IgG-Quotient in Quotienten-Diagrammen eingetragen. Ein im Verhältnis zum Albumin-Liquor/Serum-Quotient größerer IgG-Liquor/Serum-Quotient deutet auf eine intrathekale IgG-Synthese hin, die zwar immer als pathologisch einzustufen ist, aber

nur in Zusammenschau mit der Anamnese und weiteren Befunden eingeordnet werden kann. Insgesamt ist der quantitative Nachweis zwar weniger sensitiv als die isoelektrische Fokussierung, erlaubt jedoch eine zusätzliche Testung des Liquors auf eine (bei MS ebenfalls mögliche) intrathekale IgA- und/oder IgM-Synthese, was insbesondere für differentialdiagnostische Überlegungen hilfreich sein kann. Klassische Differentialbefunde zur MS sind eine IgM-Dominanz bei Neuroborreliose oder eine IgA-Dominanz bei Neurotuberkulose und Hirnabszessen [46, 49].

Die Bestimmung von freien Kappa-Leichtketten (engl. Kappa Free Light Chains, KFLC) im Liquor, die für den Nachweis einer klonalen B-Zellvermehrung eine ähnliche Sensitivität besitzen wie OKB, hat sich bisher in der Routinediagnostik nicht durchgesetzt [50].

Während sich bei einer Infektionskrankheit die intrathekal produzierten Antikörper in erster Linie gegen den Erreger richten, findet sich bei der MS eine polyspezifische Immunantwort auch gegen virale Antigene mit erhöhten virusspezifischen Antikörper-Indizes. Bei der MS sind die Antikörper-Indizes der neurotrophen Masern-, Röteln-, Varizella-Zoster- und Herpes-simplex-Viren (MRZH-Reaktion) relevant. Ein erhöhter Antikörper-Index für mindestens ein Virus aus dieser Gruppe findet sich bei etwa 90 % aller MS-PatientInnen, gegen mindestens zwei Viren bei etwa zwei Dritteln. Im Fall einer intrathekalen Antikörpersynthese gegen mindestens zwei neurotrope Viren spricht man von einer positiven MRZH-Reaktion. Bei OKB-negativen PatientInnen kann eine positive MRZH-Reaktion die Diagnose einer MS stützen. Eine unauffällige isoelektrische Fokussierung und MRZH-Reaktion hat einen hohen negativen prädiktiven Wert hinsichtlich des Vorliegens einer MS [46, 51–53].

1.3 Stellenwert von Biomarkern in der MS-Diagnostik

1.3.1 Allgemeines

Biomarker sind messbare und biologisch plausible Parameter eines zugrunde liegenden Krankheitsmechanismus. Im Idealfall sollte ein Biomarker ohne großen Aufwand bestimmbar sowie möglichst sensitiv und spezifisch für eine Erkrankung sein. Außerdem sollten seine Spiegel mit dem Fortschreiten der Erkrankung und/oder dem Therapieansprechen korrelieren, um den klinischen Verlauf abzubilden [54–56].

Bei der MS hat die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis im Vergleich zur Untersuchung anderer Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin die Vorteile, dass entzündliche und neuronale Marker aufgrund der räumlichen Nähe in hoher Konzentration vorliegen und dass das Kompartiment vor störenden systemischen Einflüssen geschützt ist. Nachteilig ist die invasive Gewinnung der Probe, die PatientInnen für Monitoring-Zwecke nicht regelmäßig zumutbar ist [55, 56].

Entsprechend sind Liquormarker primär prognostisch hinsichtlich des Krankheitsverlaufs und der Krankheitsaktivität sowie bei der Diagnosestellung wertvoll oder sind speziellen Fragestellungen klinischer Studien vorbehalten. Durch hochsensitive Verfahren (z. B. Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) etabliert sich zunehmend auch der Nachweis von ZNS-spezifischen Analyten im Serum, was perspektivisch ein erweitertes Therapie-Monitoring bei MS erlauben könnte [54, 56, 57].

Rezente vielversprechende Ansätze sind Liquor- und Serummarker für die Mikroglia-Aktivierung (z. B. sTREM2 (engl. Secreted Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2), Chitinase3-like-1-Protein (CHI3L1)) [56, 57], Marker für axonale Schäden (z. B. Neurofilament-Leichtketten (engl. Neurofilament Light Chain, NfL)) sowie Marker für eine Astrogliose (z. B. saures Gliafaserprotein (engl. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP)) [56, 58] und B-Zell-Aktivierung wie KFLC [55, 59, 60].

Das von dendritischen Zellen, Makrophagen und Mikroglia-Zellen auf der Oberfläche exprimierte Rezeptorprotein sTREM2 ist im Liquor von MS-PatientInnen in erhöhter Konzentration nachweisbar. Nach einer Therapie mit Natalizumab oder Mitoxantron normalisiert sich die sTREM2-Konzentration. Eine Bestimmung der sTREM2-Spiegel in Serum oder Plasma gelang bis heute nicht [57, 61].

Das Glykoprotein CHI3L1 besitzt anders als verwandte Chitinasen keine katalytische Aktivität für Chitin. Seine Konzentration ist bei einer Reihe inflammatorischer Erkrankungen im Serum erhöht. Im Liquor korreliert die CHI3L1-Konzentration mit dem Risiko des Überganges eines CIS in eine manifeste MS und bei MS-PatientInnen mit einer Zunahme der Behinderung. Als mögliche Quelle wird die erhöhte CHI3L1-Expression durch reaktive Astrozyten, aktivierte Mikroglia und Monozyten im Liquor diskutiert. Hohe CHI3L1-Spiegel im Liquor sind nicht MS-spezifisch, sondern ein

allgemeiner Ausdruck einer Neuroinflammation. Bei inflammatorischen Krankheitsbildern mit infektiöser Komponente (z. B. Enzephalitis und Meningitis) sind die Werte teilweise noch höher [62].

In einer rezenten Studie von Oldoni et al. mit 143 MS-PatientInnen korrelierte der Mikroglia-assoziierte Biomarker Chitotriosidase (Chitinase 1, CHIT1) im Liquor mit der klinischen Krankheitsaktivität und Läsionslast in der MRT. Ein solcher Zusammenhang bestand weder für sTREM2 noch für CHI3L1 [63].

Die im Axoplasma vorkommenden Neurofilamente sind die am besten untersuchten Marker für den Neuronenuntergang [46, 57]. Nach axonaler Schädigung werden diese Strukturproteine freigesetzt und sind im Liquor und in erheblich niedrigerer Konzentration auch im Blut nachweisbar [46, 57, 64]. In einer retrospektiven Untersuchung mit mehr als 500 PatientInnen mit RRMS aus klinischen Phase-III-Studien korrelierte der NfL-Plasmaspiegel mit klinischen (EDSS) und MR-tomographischen (T2-Läsionslast, T1-Kontrastmittel-Aufnahme) Parametern und bildete zudem das Therapieansprechen ab. Die Höhe des NfL-Blutspiegels bei der Diagnosestellung könnte zukünftig der Risikostratifizierung dienen. Höhere Spiegel waren mit einer erhöhten Rate an Schüben, neuen T2-Läsionen und einer Hirnatrophie vergesellschaftet [65]. Ein bei PatientInnen im CIS-Stadium erhöhtes Serum-NfL geht weiterhin mit einem höheren Risiko einer Konversion des CIS in eine manifeste MS einher [66]. Darüber hinaus konnte eine Studie von Matute-Blanch et al. 2017 belegen, dass ein erhöhtes Liquor-NfL ebenso wie die OKB bereits im Stadium des radiologisch isolierten Syndroms eine prognostische Bedeutung für ein zukünftiges CIS bzw. eine nach den McDonald-Kriterien gesicherte MS-Diagnose besitzt [67].

GFAP ist ein etablierter Marker für eine Astrogliose. Ähnlich wie NfL ist GFAP mittels Einzelmolekül-ELISA auch im Serum nachweisbar. Anders als NfL war in einer Studie von Abdelhak et al. GFAP insbesondere bei PatientInnen mit progredienter MS erhöht und korrelierte mit der klinischen und MR-tomographischen Krankheitsschwere [58].

Von B-Zellen produzierte Antikörper bestehen aus schweren und leichten Ketten, von denen letztere auch solitär als freie Leichtketten in Körperflüssigkeiten vorkommen. MS-PatientInnen zeigen eine erhöhte intrathekale Synthese von KFLC, die als Index (Liquor/Serum) oder KFLC/IgG-Ratio ähnlich sensitiv und spezifisch wie OKB eine MS

anzeigen und wahrscheinlich vergleichbar zuverlässig die Konversion von einem CIS in eine MS prognostizieren [59, 60].

Problematisch an den genannten Biomarkern ist, dass sie im klinischen Alltag auf absehbare Zeit nicht standardmäßig und flächendeckend als Laborparameter zur Verfügung stehen werden [44, 55].

Da die Diagnosestellung, die Einschätzung von Verlauf und Prognose sowie die rechtzeitige und optimal auf den Einzelfall abgestimmte Therapie noch immer große Herausforderungen darstellen, wären verlässliche, einfach bestimmbare Biomarker ein großer Fortschritt. Daher scheint es sinnvoll, laborchemische Parameter, die standardmäßig im klinischen Alltag bei der Betreuung von MS-PatientInnen bestimmt werden, auf ihre Tauglichkeit als Biomarker zu prüfen, sofern diese noch nicht ausreichend evaluiert wurden [1, 44, 55].

Bei einem Verdacht auf eine MS wird eine Liquoranalyse (bzw. eines korrespondierenden Liquor-/Serum-Paares) mit Bestimmung von Zellzahl, Zelldifferenzierung, Gesamtprotein und Albuminquotient, intrathekaler IgA-, IgG- und IgM-Synthese, OKB, Glukosequotient, MRZH-Reaktion sowie Borrelien-Antikörpern empfohlen [46, 49].

Neben diesen Parametern existieren weitere potentielle Biomarker, die häufig im Rahmen der Liquordiagnostik bestimmt werden, deren Aussagekraft in Bezug auf die MS aber noch unklar ist und die daher im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden. Dazu zählen Beta-2-Mikroglobulin (β 2-Mikroglobulin) [44, 68], Laktat [44, 69] und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) im Liquor [44, 70].

1.3.2 β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE als liquordiagnostische Parameter bei MS

Als kleinere Untereinheit des MHC-I wird β 2-Mikroglobulin von allen kernhaltigen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Das lösliche β 2-Mikroglobulin wird auch als Proliferationsmarker genutzt. Bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie der MS könnten erhöhte Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegel den vermehrten Immunzellumsatz anzeigen. In früheren Untersuchungen konnte eine Assoziation des Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegels mit dem Ansprechen auf eine Interferon-beta-Therapie gezeigt werden [68, 71]. Bereits 1987 fanden Alvarez-Cermeño et al. im Liquor von 16 MS-PatientInnen im akuten Schub ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhtes β 2-

Mikroglobulin, was sie als mögliches Korrelat eines Untergangs von (Nerven-) Gewebe und einer T-Zell-Aktivierung anführten [72].

Ein Jahr später wies eine Studie moderat erhöhte Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegel bei sechs von 33 untersuchten MS-PatientInnen nach, die mit einer schwerwiegenderen neurologischen Behinderung nach dem EDSS einhergingen. Die β 2-Mikroglobulin-Erhöhung im Liquor wurde als Ausdruck eines gesteigerten Immunzellumsatzes und einer daraus folgenden vermehrten Entstehung entzündlicher ZNS-Läsionen und klinischen Verschlechterung gewertet [73].

Eine weitere Arbeit aus diesem Zeitraum hielt das β 2-Mikroglobulin zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung einer MS für ungeeignet, da sich weder die Serum- noch die Liquorspiegel signifikant von denen bei anderen neurologischen Krankheitsbildern unterschieden [74].

Auch eine umfangreiche Studie an 2.674 MS-PatientInnen fand lediglich leichtgradig erhöhte Werte für Liquor- β 2-Mikroglobulin bei MS, zog jedoch eine mögliche Eignung des Proteins als Marker für Krankheitsaktivität und Krankheitsprogression bei MS in Betracht [71].

Insgesamt ist die Studienlage zu β 2-Mikroglobulin bei der MS als uneinheitlich zu bewerten; abschließende Aussagen zur Eignung dieses Parameters für die Diagnostik, Prognose und Verlaufsbeobachtung sind bislang nicht möglich [44].

Laktat ist das Endprodukt der anaeroben Glykolyse und gilt als vielversprechender Biomarker in zahlreichen Bereichen der Medizin [75].

Erhöhte Laktat-Spiegel im Liquor kennzeichnen einen anaeroben Glukose-Stoffwechsel, der durch Hypoxie, bakterielle Stoffwechselprozesse oder einen erhöhten Zellumsatz bei Blutungen oder Malignomen des ZNS auftreten kann [49, 76]. Erhöhte Laktat-Konzentrationen im Liquor sind möglicherweise auch Ausdruck einer mitochondrialen Dysfunktion im ZNS, die als pathophysiologischer Mechanismus der MS diskutiert wird. Wenngleich der exakte Mechanismus nicht bekannt ist, wird angenommen, dass eine mitochondriale Dysfunktion und die hieraus folgende chronische Hypoxie insbesondere bei progredienten MS-Verlaufsformen zum Axon-Untergang beiträgt [28].

In mehreren größeren Studienkollektiven zeigten MS-PatientInnen erhöhte Liquor-Laktat-Spiegel im Vergleich zu Kontrollpersonen [69, 77, 78]; lediglich eine kleine Studie kam zu einem gegenteiligen Ergebnis [76].

In einer 2017 veröffentlichten Studie wiesen Abdelhak et al. bei einer Gruppe von 254 PPMS-PatientInnen eine Korrelation des Liquor-Laktat-Spiegels mit der Progressionsrate (Veränderung des EDSS-Wertes über die Zeit) der MS nach [28].

Eine weitere Studie fand bei 118 RRMS-PatientInnen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Liquor-Laktat-Spiegel. Die Laktat-Spiegel im Liquor korrelierten mit dem PatientInnenalter zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion, dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (Progressionsindex und MSSS-Werte) und mit etablierten Biomarkern für eine axonale Schädigung (Tau-Protein, NfL) [69].

ACE konvertiert Angiotensin-I zu Angiotensin-II. Zusammen mit Renin, das Angiotensinogen in Angiotensin-I umwandelt, gehört es zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), dem neben der Blutdruckregulation auch pleiotrope Effekte auf das ZNS zugeschrieben werden [79, 80].

Angiotensinogen wird im ZNS von Astrozyten sezerniert. Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ I (AT1-Rezeptor) wird wiederum von Endothelzellen und T-Zellen exprimiert, was für eine Bedeutung des RAAS bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen spricht. Eine inflammatorisch bedingte Abnahme der Angiotensin-II-Sekretion durch Astrozyten und eine ausgeprägte Hochregulation von AT1-Rezeptor erhöhen die Permeabilität der BHS und wurden in MS-Läsionen nachgewiesen. Eine eingeschränkte BHS-Funktion gilt bei MS-PatientInnen als ein zentrales pathophysiologisches Muster für Schädigungen des ZNS-Parenchyms [81, 82].

Weiter identifizierten Živkovic et al. im Rahmen einer Studie mit 470 MS-PatientInnen und 478 Kontrollen eine signifikante Überrepräsentation bestimmter ACE-Polymorphismen bei MS-PatientInnen und damit genetische Risikofaktoren für das Auftreten einer MS [80].

Die Datenlage zu Enzymen und Metaboliten des RAAS im Liquor von MS-PatientInnen ist insgesamt widersprüchlich. In Studien, die bei MS-PatientInnen deutlich erniedrigte Angiotensin-II-Spiegel im Liquor beschrieben, erfolgte keine Untersuchung einer Korrelation mit den ACE-Spiegeln; teils waren diese sogar signifikant erhöht [79, 83, 84].

Belastbare Daten zu Liquor-ACE-Spiegeln bei verschiedenen Verlaufsformen sowie zur Krankheitsdauer und Schubaktivität der MS existieren bisher nicht [44, 70, 81].

1.4 Zielsetzung

Bei den im Rahmen der Liquor-Routinediagnostik leicht zu erhebenden Parametern β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE wird eine Assoziation mit verschiedenen MS-Pathomechanismen angenommen. Bisher ist bei schlechter und teils widersprüchlicher Datenlage aber nicht klar, ob diese Analyten zur Beurteilung der Verlaufsform, des Schweregrades oder der Krankheitsaktivität einer MS geeignet sind [44, 68, 69, 73, 79].

Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation in 6.310 Liquorpunktaten von MS-PatientInnen β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE mit den klinischen Charakteristika retrospektiv erfasst und explorativ in Beziehung gesetzt werden. Die Daten sollten weiter mit den Daten einer Kontrollgruppe von PatientInnen mit nicht inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (engl. Non Inflammatory Neurological Disorders, NIND) verglichen werden.

Es wurden zwei Haupt-Forschungsfragen (FF1 und FF2) mit jeweils drei Neben-Forschungsfragen entwickelt, die nachfolgend grafisch dargestellt sind (Abbildung 1):

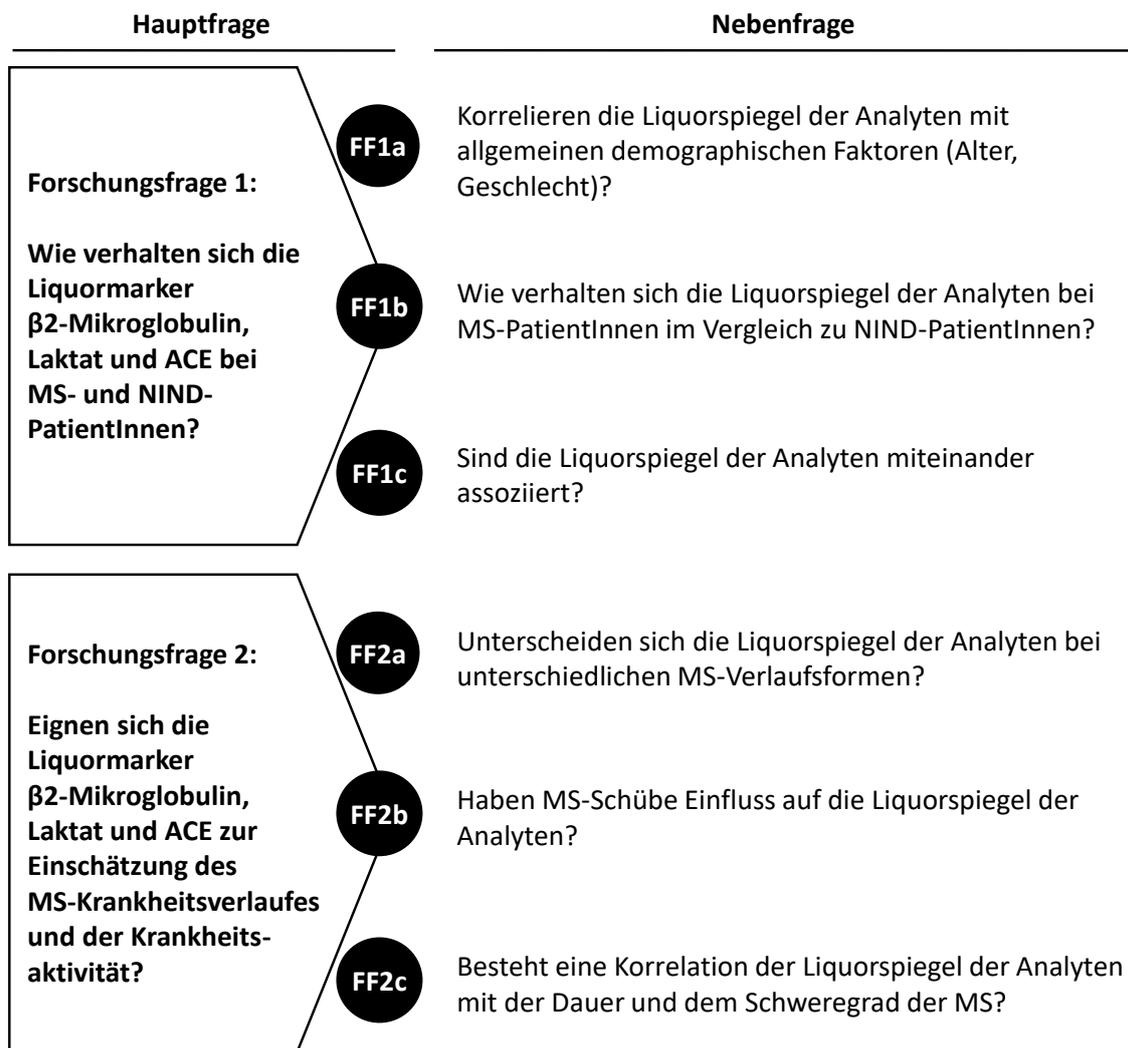


Abbildung 1: Forschungsfragen der Dissertation

ACE: Angiotensin-Converting Enzyme; β 2-Mikroglobulin: Beta-2-Mikroglobulin; FF: Forschungsfrage; MS: Multiple Sklerose.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik

Das Vorhaben wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg zur Prüfung vorgelegt. Einwände bestanden nicht (Aktenzeichen 20170124-01). Für die Arbeit wurden ausschließlich im Rahmen klinischer Routineverfahren gewonnene Daten retrospektiv in anonymisierter Form analysiert. Daher war eine Zustimmung der in die Analyse eingeschlossenen Personen nach gültiger deutscher Rechtslage nicht erforderlich.

2.2 Liquoranalytik

Für die vorliegende retrospektive Studie wurden die Krankheitsgeschichten aller PatientInnen ausgewertet, die sich von Januar 2005 bis einschließlich Dezember 2012 in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg mindestens einer Lumbalpunktion unterzogen hatten.

Durch eine automatisierte computergestützte Analyse der Labordatenbank der Neurologischen Klinik wurden alle Liquorproben identifiziert, in denen routinediagnostisch β 2-Mikroglobulin und/oder Laktat und/oder ACE bestimmt worden war.

Die Bestimmung der Analyten war nach zugelassenen Verfahren der Firmen Siemens (β 2-Mikroglobulin), Roche (Laktat) und Mast Diagnostica (ACE) nach den Richtlinien der Hersteller und unter konstantem methodischen Vorgehen im Labor der Neurologischen Klinik erfolgt.

Bei dieser Datenerhebung wurden 6.310 Lumbalpunktionen identifiziert. Jede Punktion wurde einem Fall und über die PatientInnen-Nummer einer/einem Patientin/Patienten zugeordnet.

Bei der Mehrzahl der PatientInnen war im Zeitraum 2005–2012 mehr als eine Untersuchung des Liquor cerebrospinalis durchgeführt worden, sodass mit diesen PatientInnen-Nummern zwei oder mehr Fallnummern verknüpft waren. Bei Mehrfachuntersuchungen wurden wiederholte Erfassungen nicht berücksichtigt.

2.3 Diagnosegruppen

An die computergestützte Durchsuchung der Labordatenbank schloss sich eine manuell durchgeführte Sichtung des Fallnummern-Kollektivs zur Identifikation einer Untersuchungs- und Kontrollgruppe an.

2.3.1 Untersuchungsgruppe

Die Untersuchungsgruppe rekrutierte sich aus Fällen mit gesicherter MS-Erkrankung gemäß der zum Zeitpunkt der Auswertung aktuellen Form der McDonald-Diagnosekriterien für MS in der revidierten Fassung von 2010.

RRMS-Kriterien

Die Diagnose RRMS wurde ohne weitere Zusatzdiagnostik bei anamnestisch mindestens zwei Schub-Ereignissen in Kombination mit dem Nachweis von mindestens zwei ZNS-Läsionen oder aber einem objektivierbaren Nachweis einer Läsion in Kombination mit einer anamnestischen Evidenz für ein stattgehabtes Schubereignis gestellt.

Bei minimal zwei Schubereignissen und einem klinisch objektivierbaren Nachweis einer Läsion war zusätzlich der Nachweis einer räumlichen Dissemination (MRT-morphologisch mindestens eine T2-Läsion in mindestens zwei der MS-typischen Regionen periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell bzw. spinal oder ein sicherer Nachweis einer weiteren klinischen Manifestation in einer anderen Läsion) erforderlich. Bei einem einzelnen anamnestischen Schubereignis in Kombination mit einem klinisch objektivierbaren Nachweis mindestens zweier Läsionen war für die Diagnose einer RRMS der Beleg einer zeitlichen Dissemination notwendig. Eine zeitliche Dissemination galt als erwiesen, wenn gleichzeitig asymptotische Gadolinium-anreichernde und nicht anreichernde Läsionen oder eine neue T2- und/oder Gadolinium-anreichernde Läsion im follow-up-MRT oder ein zweites klinisches Ereignis nachgewiesen wurden. Zudem mussten Differentialdiagnosen ausgeschlossen sein [85, 86].

SPMS-Kriterien

Die Klassifikation einer Fallnummer als SPMS erfolgte, wenn bei einem ursprünglich als RRMS klassifizierten Fall keine Schübe mehr auftraten und sich eine langsame,

schubunabhängige Zunahme neurologischer Defizite zeigte. Dabei wurde berücksichtigt, dass auch bei einer SPMS noch Schübe auftreten und den langsam fortschreitenden Verlauf zusätzlich negativ beeinflussen können [32, 87].

CIS-Kriterien

Als CIS wurden Ereignisse klassifiziert, die eine entzündliche demyelinisierende Läsion im ZNS vermuten ließen, aber die Diagnosekriterien der MS nicht erfüllten. Dabei handelte es sich um zum Zeitpunkt der Diagnosestellung monophasische Verläufe mit aufgetretenem Schubereignis und Vorliegen einer klinisch objektivierbaren Läsion, die nicht die Kriterien der zeitlichen und/oder räumlichen Dissemination erfüllten [34, 86].

PPMS-Kriterien

Als PPMS wurden Fälle klassifiziert, bei denen die PatientInnen keine Schübe, sondern von Beginn an eine schleichende Progression der neurologischen Defizite ohne Rückbildung für mindestens ein Jahr aufwiesen. Zudem mussten mindestens zwei der folgenden drei Kriterien erfüllt sein: 1) Nachweis einer zerebralen räumlichen Dissemination anhand mindestens einer T2-Läsion in den MS-typischen Bereichen periventrikulär, juxtakortikal oder infratentoriell, 2) Nachweis einer spinalen räumlichen Dissemination durch mindestens zwei spinale T2-Läsionen oder 3) Vorliegen eines positiven Liquorbefundes mit Nachweis von OKB in der isoelektrischen Fokussierung und/oder einer autochthonen IgG-Synthese [32, 85].

Die der Identifikation der Untersuchungsgruppe zugrunde gelegten McDonald-Kriterien in der Revision von 2010 zeigt Tabelle 1 [85, 86].

Tabelle 1: McDonald-Kriterien (Revision 2010)

CIS: klinisch isoliertes Syndrom; MRT: Magnetresonanztomographie; MS: Multiple Sklerose; OKB: oligoklonale Banden; PPMS: primär progrediente MS; RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS.

≥ 2 Schübe	Objektivierbarer Nachweis von ≥ 2 Läsionen		Diagnose: RRMS
	Objektivierbarer Nachweis von 1 Läsion	Räumliche Dissemination nachgewiesen durch <ul style="list-style-type: none"> • MRT <u>oder</u> • Abwarten eines weiteren klinischen Schubes, der eine weitere Lokalisation betrifft 	
1 Schub	Objektivierbarer Nachweis von ≥ 2 Läsionen	Zeitliche Dissemination nachgewiesen durch <ul style="list-style-type: none"> • MRT <u>oder</u> • 2. klinischen Schub 	
	Objektivierbarer klinischer Nachweis von 1 Läsion (monosymptomatisches Ereignis; CIS)	Räumliche Dissemination nachgewiesen durch MRT <u>und</u> Zeitliche Dissemination nachgewiesen durch <ul style="list-style-type: none"> • MRT <u>oder</u> • 2. klinischen Schub 	
Neurologische Progression, die auf eine MS hinweist		<ul style="list-style-type: none"> • 1 Jahr Krankheitsprogression (retro- oder prospektiv) <u>und</u> • 2 von 3 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> ○ Nachweis einer zerebralen räumlichen Dissemination (mind. 1 T2-Läsion periventrikulär, juxtakortikal oder infratentoriell) ○ Nachweis einer spinalen räumlichen Dissemination (mind. 2 spinale T2-Läsionen) ○ Nachweis eines positiven Liquorbefundes (OKB und/oder autochthone IgG-Synthese) 	Diagnose: PPMS
Ursprüngliche RRMS mit langsamer, schubunabhängiger Behinderungszunahme			Diagnose: SPMS

Zusätzlich zu einer gesicherten MS-Diagnose mussten die Fälle zum Einschluss in die Untersuchungsgruppe folgende vorab festgelegte Charakteristika erfüllen:

1. Die klinische Erstmanifestation der MS war dokumentiert.
2. Spätestens drei Tage vor der Lumbalpunktion hatte eine vollständige Erhebung des neurologischen Status inklusive Bestimmung des EDSS stattgefunden.
3. Zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion erhielten die Fälle keine verlaufsmodifizierende Therapie. Dabei galten folgende Fristen: Therapiepause nach Interferon-Präparaten oder Glatirameracetat mindestens 30 Tage. Therapiepause nach Natalizumab, Fingolimod, Azathioprin, Mitoxantron oder Cyclophosphamid mindestens drei Monate. Therapiepause nach Rituximab mindestens sechs Monate.

4. Innerhalb des 30-tägigen Zeitraums vor der Lumbalpunktion hatten die Fälle keine Therapie mit einem Glukokortikoid (unabhängig vom Präparat und der Verabreichungsform) erhalten.
5. Zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion bestand keine Therapie mit einem ACE-Hemmer.

Die 438 MS-Fälle der Untersuchungsgruppe wurden hinsichtlich des Geschlechts, des Alters, der Krankheitsdauer in Monaten und des EDSS-Wertes zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion charakterisiert. Die vorhandenen EDSS-Werte wurden anhand der Quelldokumente gemäß dem Standard klinischer Studien geprüft und gegebenenfalls präzisiert. Zusätzlich wurde nachverfolgt, ob in den 30 Tagen vor der Lumbalpunktion ein Schubereignis aufgetreten war.

2.3.2 *Kontrollgruppe*

Analog wurde der vorliegende Datensatz zur Gewinnung einer NIND-Kontrollgruppe auf die Diagnosen idiopathische intrakranielle Hypertension, idiopathischer Normaldruckhydrozephalus (iNPH), Liquorunterdruck-Syndrom und Migräne hin durchsucht.

Bei der Auswahl der Fälle für die Kontrollgruppe sollte im Rahmen der verfügbaren Auswahl angestrebt werden, dass die demographischen Daten (Alter, weibliche Prädominanz) denen der Untersuchungsgruppe ähneln, um die Vergleichbarkeit zu erhöhen.

Im Folgenden werden die verwendeten Diagnosekriterien für die Kontrollgruppe beschrieben.

Idiopathische intrakranielle Hypertension

Fälle des Datenkollektivs wurden als idiopathische intrakranielle Hypertension (Pseudotumor cerebri) klassifiziert, wenn sie nach Ausschluss von Differentialdiagnosen sowie bei typischer Klinik der PatientInnen (insbesondere Kopfschmerzen, Sehstörungen (z. B. Visusminderung, Obskurationen, Gesichtsfeldausfälle, Doppelbilder), Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, pulsatiler Tinnitus, Nackenschmerzen, radikulärer Schmerz,

Hirnnervenausfälle, jedoch in der Regel keine Bewusstseinsstörung) die zuletzt 2013 modifizierten Dandy-Kriterien erfüllten:

- A. Nachweis eines Papillenödems,
- B. Vorliegen eines normalen neurologischen Untersuchungsbefundes mit Ausnahme etwaiger Hirnnervenpathologien,
- C. normale Darstellung des Hirnparenchyms (insbesondere kein Nachweis eines Hydrozephalus, einer intrakraniellen Raumforderung, einer strukturellen Läsion, einer pathologischen Kontrastmittel-Anreicherung oder einer Sinusvenenthrombose) in der cranialen MRT oder Kontrastmittel-gestützten cranialen Computertomographie (CT) sowie der MR-Venographie,
- D. unauffällige Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis,
- E. Erhöhung des Liquoröffnungsdrucks auf über 25 cm Wassersäule bei einer Lumbalpunktion in Seitlage.

Die Diagnose einer idiopathischen intrakraniellen Hypertension wurde bei nicht nachweisbarem Papillenödem dann gestellt, wenn die Kriterien B–E erfüllt waren und in der Krankengeschichte eine uni- oder bilaterale Abduzensparese dokumentiert war [88–90].

Idiopathischer Normaldruckhydrozephalus (iNPH)

Die Diagnose eines iNPH wurde in Zusammenschau eines typischen klinischen Bildes, einer plausiblen Bildgebung sowie passender Befunde in der diagnostischen Lumbalpunktion gestellt.

In der neurologischen Untersuchung war das Vorhandensein von mindestens zwei der drei Komponenten der Hakim-Trias (progrediente Gangstörung, Demenz, Urininkontinenz) erforderlich [2, 91].

Zu den iNPH-typischen Gangstörungen gehörten eine außenrotierte Fußstellung, ein verlangsamter, breitbasiger und kleinschrittiger Gang mit vermindertem Abrollen der Füße und eine im Verlauf zunehmende Instabilität und erhöhte Fallneigung und Stürze.

Für das Kriterium subkortikale Demenz waren mindestens zwei der folgenden Merkmale erforderlich: Antriebsmangel, psychomotorische Verlangsamung, Aufmerksamkeits- und Konzentrationsdefizite, Verlangsamung und reduzierte Präzision bei feinmotorischen

Aufgaben, Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses sowie im Spätstadium Auftreten von Apathie, Gleichgültigkeit, Bradyphrenie oder akinetischem Mutismus.

Die Blasenstörung wurde in den Epikrisen als initial erhöhte Miktionsfrequenz mit im Verlauf auftretender Dranginkontinenz und schließlich permanenter Urininkontinenz beschrieben [91, 92].

Bei einem Vorliegen dieser klinischen Pathologien wurde das Vorhandensein von iNPH-typischen Befunden in der CT und in der MRT, die ebenso wie die Klinik und die Liquordiagnostik keine eindeutige Diagnose erlauben, jedoch diagnoseunterstützend wirken, überprüft. Als iNPH-typische Befunde der Schnittbildgebung wurden eine symmetrische Erweiterung der inneren Liquorräume bei normalen oder engen äußeren Liquorräumen mit positivem Evans-Index (Quotient der weitesten Strecke der lateralen Ausdehnung der Vorderhörner und Hirnausdehnung), periventrikuläre Druckkämpchen als Zeichen der Liquoradiapedese, niedrige Corpus callosum-Winkel, abgerundete und ballonierete Vorder- und Temporalhörner sowie eine fehlende Obstruktion des Liquorabflusses gewertet [32, 91–93].

Ergänzend zur klinisch-neurologischen Untersuchung und CT- bzw. MRT-Bildgebung wurde zur Diagnosestellung die Liquordiagnostik herangezogen. Hierbei sicherten ein positiver Spinal-Tap-Test mit Besserung der Symptome nach Lumbalpunktion mit Drainage von 30–70 ml Liquor bei ansonsten unauffälliger Liquordiagnostik die Diagnose [91, 92].

Liquorunterdruck-Syndrom

Ein Liquorunterdruck-Syndrom kann postpunktionell nach Lumbalpunktion, als Liquor-fistel traumatischer Genese oder als idiopathisches Liquorleck auftreten.

Zur Diagnosestellung wurden die Internationale Klassifikation von Kopfschmerzerkrankungen (engl. International Classification of Headache Disorders, ICHD)-3-Kriterien in der Beta-Version von 2013 herangezogen. Hiernach wurde ein typischerweise durch Orthostase verstärkter Kopfschmerz (oftmals begleitet von Symptomen wie Nackensteifigkeit, Hörstörungen, Tinnitus, Photophobie und Übelkeit) als Liquorunterdruck-Syndrom gewertet, wenn er folgende Kriterien erfüllte:

- A. Vorliegen eines beliebigen Kopfschmerzes, der das Kriterium C erfüllt,

- B. Vorhandensein eines Liquorunterdrucks (unter 60 mm Wassersäule) und/oder Nachweis eines Liquorlecks in der Bildgebung,
- C. Entwicklung des Kopfschmerzes in zeitlichem Zusammenhang mit dem Liquorunterdruck bzw. Liquorleck oder Detektion eines dieser Befunde infolge des Kopfschmerzes,
- D. keine bessere Erklärung durch eine andere ICHD-3-Diagnose [32, 94].

Migräne

Folgende diagnostische Kriterien nach den ICHD-3-Kriterien in der Beta-Version von 2013 wurden zur Identifikation von Migräne-Fällen mit und ohne Aura herangezogen:

Migräne ohne Aura

- A. Mindestens fünf Attacken, die die Kriterien B–D erfüllen,
- B. Kopfschmerzattacken, die (unbehandelt oder erfolglos behandelt) 4–72 Stunden anhalten,
- C. Kopfschmerzen, die mindestens zwei der folgenden vier Charakteristika aufweisen:
 1. einseitige Lokalisation,
 2. pulsierender Charakter,
 3. mittlere oder starke Schmerzintensität,
 4. Verstärkung durch körperliche Routineaktivitäten (z. B. Gehen oder Treppensteigen) oder daraus resultierende Vermeidung solcher Aktivitäten,
- D. Kopfschmerzen mit mindestens einer der folgenden Begleiterscheinungen:
 1. Übelkeit und/oder Erbrechen,
 2. Photophobie und Phonophobie,
- E. Fehlen einer ICHD-3-Diagnose, die die Symptomatik besser erklärt.

Migräne mit Aura

- A. Mindestens zwei Attacken, die das Kriterium B und C erfüllen,
- B. Eines oder mehrere der folgenden vollständig reversiblen Aura-Symptome:
 1. visuell,

2. sensorisch,
3. Sprechen und/oder Sprache,
4. motorisch,
5. Hirnstamm,
6. retinal,

C. Mindestens zwei der folgenden vier Charakteristika:

1. allmähliche Entwicklung von mindestens einem Aura-Symptom über mindestens fünf Minuten hinweg und/oder Auftreten von zwei oder mehr Aura-Symptomen nacheinander,
2. Anhalten der Aura-Symptome für fünf bis 60 Minuten,
3. einseitiges Auftreten von mindestens einem Aura-Symptom,
4. Begleitung der Aura von Kopfschmerzen oder Auftreten der Kopfschmerzen innerhalb von 60 Minuten danach,

D. Fehlen einer ICHD-3-Diagnose, die die Symptomatik besser erklärt und Ausschluss einer transienten ischämischen Attacke [94].

Die 276 NIND-Fälle umfassende Kontrollgruppe setzte sich aus elf Fällen mit iNPH, 53 Fällen mit idiopathischer intrakranieller Hypertension, 33 Fällen mit Liquorunterdruck-Syndrom sowie 179 Migräne-Fällen zusammen. Wie beim MS-Kollektiv waren die NIND-Fälle in den 30 Tagen vor der Lumbalpunktion nicht mit einem Glukokortikoid oder ACE-Hemmer therapiert worden.

2.4 Gruppenzusammensetzung nach Umsetzung

Aus den 6.310 Fällen, bei denen im Rahmen ihrer Vorstellung(en) in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg Spiegel für β 2-Mikroglobulin und/oder Laktat und/oder ACE bestimmt worden waren, wurden zwei Gruppen gebildet.

Die Untersuchungsgruppe bestand aus 438 Fällen mit einer gesicherten MS-Diagnose. Die Diagnose einer MS-Erkrankung basierte auf den McDonald-Kriterien von 2010 und war das Ergebnis einer umfangreichen Einzelfallprüfung, der ärztliche, laborchemische und radiologische Untersuchungen zugrunde lagen.

Die 276 NIND-Fälle der Kontrollgruppe wurden im Sinne einer optimalen Vergleichbarkeit von Untersuchungs- und Kontrollgruppe selektioniert.

Das Vorgehen bei der Gruppenselektion und die Zusammensetzung der Gruppen fasst die folgende Abbildung 2 zusammen.

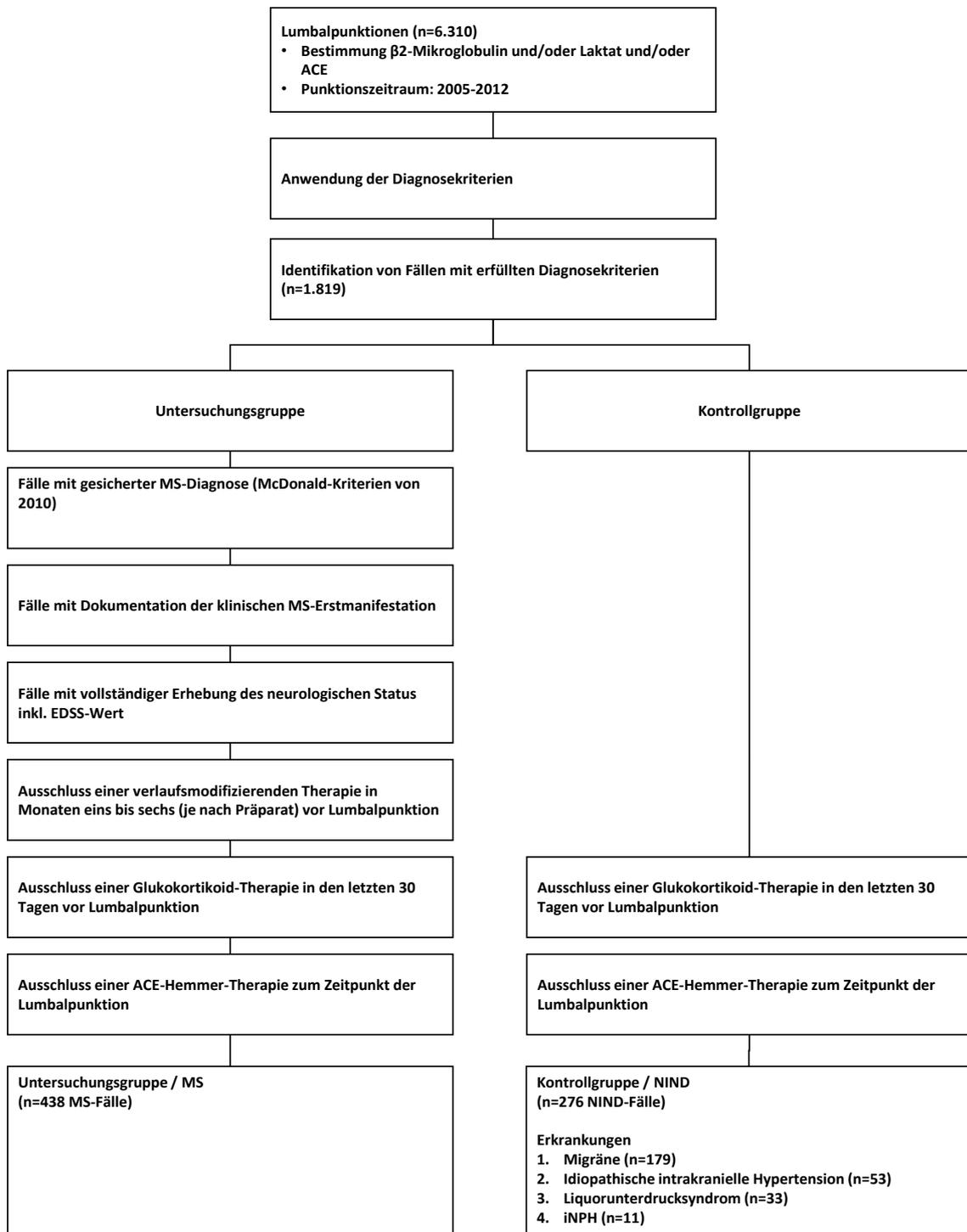


Abbildung 2: Zusammenfassung des Gruppenselektionsprozesses

ACE: Angiotensin-Converting Enzyme; EDSS: Expanded Disability Status Scale; iNPH: idiopathischer Normaldruckhydrozephalus; MS: Multiple Sklerose; NIND: nicht inflammatorische neurologische Erkrankungen; n: Anzahl der Fälle.

2.5 Statistische Analyse

Der Progressionsindex MS-Erkrankter wurde berechnet, indem der EDSS-Wert der Fälle zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion durch die Krankheitsdauer in Jahren dividiert wurde. Zur Bestimmung des Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) wurde der individuelle EDSS-Wert mit den EDSS-Werten eines PatientInnenkollektivs mit gleicher Erkrankungsdauer in Relation gesetzt und dann als Perzentil (als Score zwischen 0 und 10) berechnet [41–44]. Der MSSS wurde mittels der Software R mit Hilfe des Plugins „ms.sev“ von Helga Westerlind und Ali Manouchehrinia berechnet [44, 95, 96].

Da die Liquorspiegel für β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE nach dem D’Agostino & Pearson-Omnibus-Test nicht der Normalverteilung folgten, kamen nicht parametrische Testverfahren für die statistische Analyse zum Einsatz.

Die Geschlechts-Verteilung der Fälle wurde mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft.

Der Vergleich konstanter Variablen zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, während bei mehreren zu vergleichenden Gruppen der Kruskal-Wallis-Test herangezogen wurde, gefolgt vom Dunn-Post-Test zum Vergleich aller Gruppen.

Korrelations-Berechnungen wurden unter Anwendung des Spearman-Korrelation-Tests durchgeführt.

Zur Korrektur beim multiplen Testen wurde die Bonferroni-Korrektur benutzt.

Die Gesamtheit der statistischen Analysen inklusive der Bestimmung der linearen Regression wurde mit GraphPad Prism 5 (La Jolla, Kalifornien, USA) berechnet.

Ein Signifikanzwert (engl. Probability Value, *p*-Wert) unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet [44, 97, 98].

Die Autorin wurde bei der statistischen Auswertung durch die Co-Autoren unterstützt. Auch die nachfolgende Tabelle sowie die Abbildungen des folgenden Kapitels „Ergebnisse“ sind Bestandteil einer 2018 gemeinsam publizierten Studie. Die Co-Autoren hatten zur weiteren Verwendung und Modifikation dieser Inhalte in dieser Dissertation ihr Einverständnis erteilt [44].

3 Ergebnisse

3.1 Demographische und klinische Charakterisierung der Kollektive

Verlaufsform-übergreifend wurden 438 MS-Fälle analysiert. Die Kontrollgruppe umfasste 276 NIND-Fälle.

In der Kontrollgruppe war der Anteil der Frauen signifikant größer als in der MS-Gruppe (77,2 % vs. 64,4 %; $p=0,0002$).

Es fand sich erwartungsgemäß ein deutlich ausgeglicheneres Geschlechterverhältnis bei primär progredienten MS-Verläufen (40,5 % weiblich) im Vergleich zu initial schubförmigen Verläufen (65,2 % weiblich).

Das Alter der MS-Fälle und der Kontrollen zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion unterschied sich nicht signifikant ($p=0,9658$).

Erwartungsgemäß bestanden aber Unterschiede zwischen den unterschiedlichen MS-Verlaufsformen (Mediane: CIS 30 Jahre, RRMS 35 Jahre, PPMS / SPMS 48 Jahre). PPMS- und SPMS-Fälle zeigten keine Unterschiede in der Altersverteilung ($p>0,05$).

Die Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der meist bei der Diagnosestellung stattfindenden Lumbalpunktion betrug bei der RRMS 25 Monate und bei der PPMS 83 Monate (Median). Die lange Krankheitsdauer bei der SPMS resultierte aus dem vorangegangenen schubförmigen Verlauf.

Die RRMS-Fälle (EDSS = 2,0) waren überwiegend leicht, die SPMS-Fälle (EDSS = 6,0) hingegen mehrheitlich schwer körperlich eingeschränkt. Die klinischen Merkmale von MS- und NIND-Fällen sind in Tabelle 2 gegenübergestellt.

Tabelle 2: Demographische / klinische Merkmale der MS- und NIND-Fälle bei der Lumbalpunktion

Angaben in Prozent oder Median (Interquartilsabstand; Gesamtintervall) * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ versus CIS. CIS: klinisch isoliertes Syndrom; EDSS: Expanded Disability Status Scale; k. A.: keine Angabe; MS: Multiple Sklerose; n: Anzahl der Fälle; p : p -Wert; PPMS: primär progrediente MS; RRMS: schubförmig remittierende MS; SPMS: sekundär progrediente MS. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

Variable	Diagnose-Gruppen					
	Kontrollen n=276	MS gesamt n=438	CIS n=102	RRMS n=207	SPMS n=92	PPMS n=37
% weiblich	77,2	64,4	68,6	66,2	65,2	40,5
Alter in Jahren	38 (28–47, 15–83)	38 (28–47, 16–69)	30 (23–40, 17–58)	35 (27–44, 16–65)*	48 (44–57, 25–67)**	48 (44–59, 23–69)**
Krankheitsdauer in Monaten	k. A.	26 (0–119, 0–520)	0 (0–0, 0–58)	25 (4–70, 0–422)	200 (120–274, 6–520)	83 (29–137, 12–255)
EDSS	k. A.	2,0 (1,5–4,0; 0–9,0)	1,5 (1,0–2,0; 1,0–5,0)	2,0 (1,5–3,0; 0–9,0)	6,0 (5,5–7,5; 1,0–9,0)	4,0 (2,5–6,0; 1,0–8,0)

3.2 Altersabhängigkeit der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE

Aufgrund der signifikanten Altersunterschiede der Fälle mit unterschiedlichen MS-Verlaufsformen zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion sollte geprüft werden, ob das Alter in der vorliegenden Population die Liquorparameter β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE beeinflusst.

Zunächst wurde die Altersabhängigkeit der β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Liquorspiegel in der Kontrollgruppe (NIND) analysiert. Die Voraussetzungen für die Nutzung einer linearen Regression zur Bestimmung der Altersabhängigkeit waren gegeben.

Alle drei potentiellen Biomarker zeigten eine Altersabhängigkeit. Dabei korrelierten die β 2-Mikroglobulin-Spiegel am deutlichsten mit dem Alter der Fälle ($r_s=0,3908$; $p < 0,0001$), gefolgt von Laktat ($r_s=0,2354$; $p=0,0001$) und ACE ($r_s=0,1581$; $p=0,0232$).

In allen Fällen bestand eine positive Korrelation, mit steigendem Alter nahmen also die Biomarker-Konzentrationen zu.

Die anschließende Analyse der linearen Regression zeigte einen altersabhängigen linearen Anstieg des Liquor- β 2-Mikroglobulins (y-Achsenabschnitt 0,7046; Steigung 0,01269), Liquor-Laktats (y-Achsenabschnitt 1,430; Steigung 0,005684) und Liquor-ACE (y-Achsenabschnitt 0,1355; Steigung 0,0008141) (Abbildung 3 A-C).

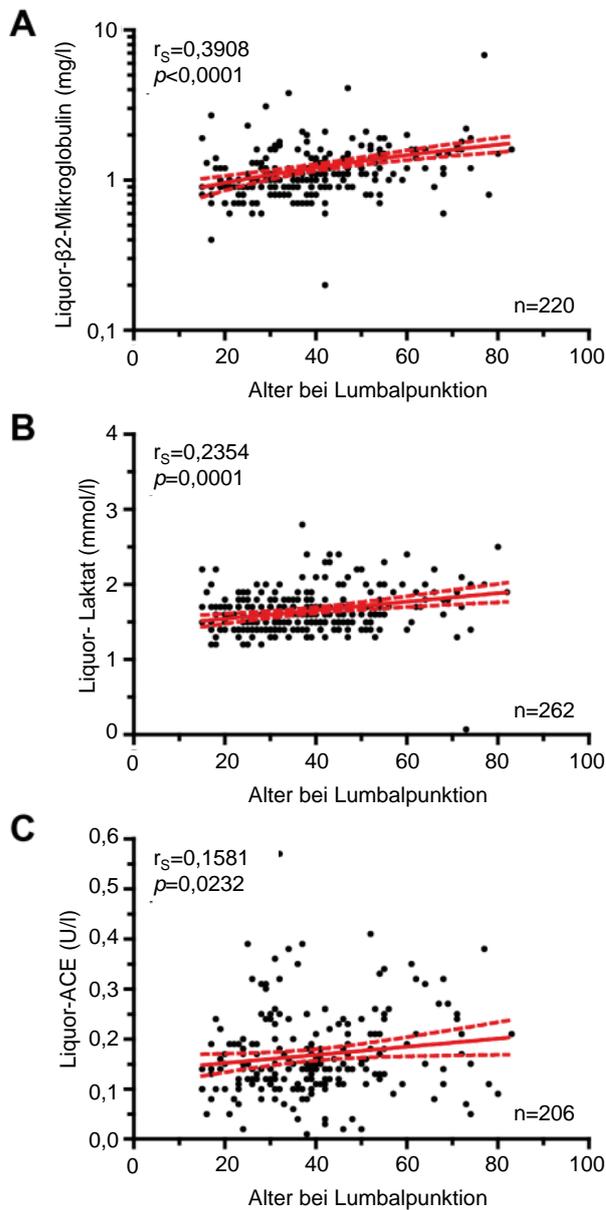


Abbildung 3: Altersabhängigkeit der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei Fällen der NIND-Gruppe

Die Punkte repräsentieren individuelle Liquorwerte für Beta-2-Mikroglobulin (β 2-Mikroglobulin) (A), Laktat (B) und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (C) von Fällen mit nicht inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (NIND). Die roten Linien entsprechen den linearen Regressionsgeraden mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Die ermittelten Spearman-Koeffizienten mit p -Werten (r_s , p) sind rechts der y-Achse aufgetragen. Die Anzahl der Lumbalpunktionen (n), bei denen β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bestimmt wurde, ist jeweils rechts oberhalb der x-Achse aufgetragen. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

3.3 Vergleich der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei MS- und NIND-Fällen

Der Vergleich der β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel im Liquor von MS- (alle MS-Verlaufsformen) und NIND-Fällen ergab einen signifikant höheren β 2-Mikroglobulin-Wert für die MS-Fälle (Median: 1,2 mg/l vs. 1,1 mg/l; $p=0,0007$; Abbildung 4 A). Ebenso zeigte sich das Liquor-Laktat bei MS-Fällen signifikant erhöht (Median: 1,7 mmol/l vs. 1,6 mmol/l; $p=0,0075$; Abbildung 4 B).

Dagegen lag der Liquor-ACE-Spiegel bei MS- im Vergleich zu NIND-Fällen (Median: 0,14 U/l vs. 0,15 U/l; $p=0,0039$; Abbildung 4 C) signifikant niedriger.

Die vorliegende Studie sah weitere Vergleiche zwischen NIND- und MS-Fällen mit unterschiedlichen Verlaufsformen und eine Überprüfung der Eignung von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE als Marker des MS-Schweregrades vor.

Da signifikante Altersunterschiede zwischen den MS-Gruppen bestanden (siehe Tabelle 2), waren vor dem Hintergrund der gezeigten Altersabhängigkeit der Liquoranalyten Korrekturmaßnahmen erforderlich.

Zur Eliminierung des Alterseinflusses wurden die gemessenen Liquorspiegel bei allen MS- und NIND-Fällen (unter Nutzung der Ergebnisse der in der Kontrollgruppe erfolgten Analyse der linearen Regression, siehe Abbildung 3) an das Median-Alter von 38 Jahren angepasst.

Daher wurden alle Liquor-Spiegel von Fällen, deren Alter vom medianen Alter abwich, mittels der Steigung der linearen Regressionsgraden alterskorrigiert. Daraus ergab sich je Altersjahr Abweichung vom Median eine mittlere Anpassung von $\pm 0,149$ (Standardabweichung, engl. Standard Deviation, SD 0,117) mg/l für β 2-Mikroglobulin, $\pm 0,063$ (SD 0,048) mmol/l für Laktat und $\pm 0,010$ (SD 0,008) U/l für ACE.

Der Vergleich zwischen dem MS- und NIND-Kollektiv wurde anschließend mit den alterskorrigierten Liquor-Werten wiederholt. Auch unter diesen Bedingungen zeigten MS-Fälle im Vergleich zu NIND-Fällen signifikant höhere β 2-Mikroglobulin- und Laktat- sowie signifikant niedrigere ACE-Spiegel im Liquor. Die statistischen Tests ergaben ähnliche p -Werte (Abbildung 4 D-F).

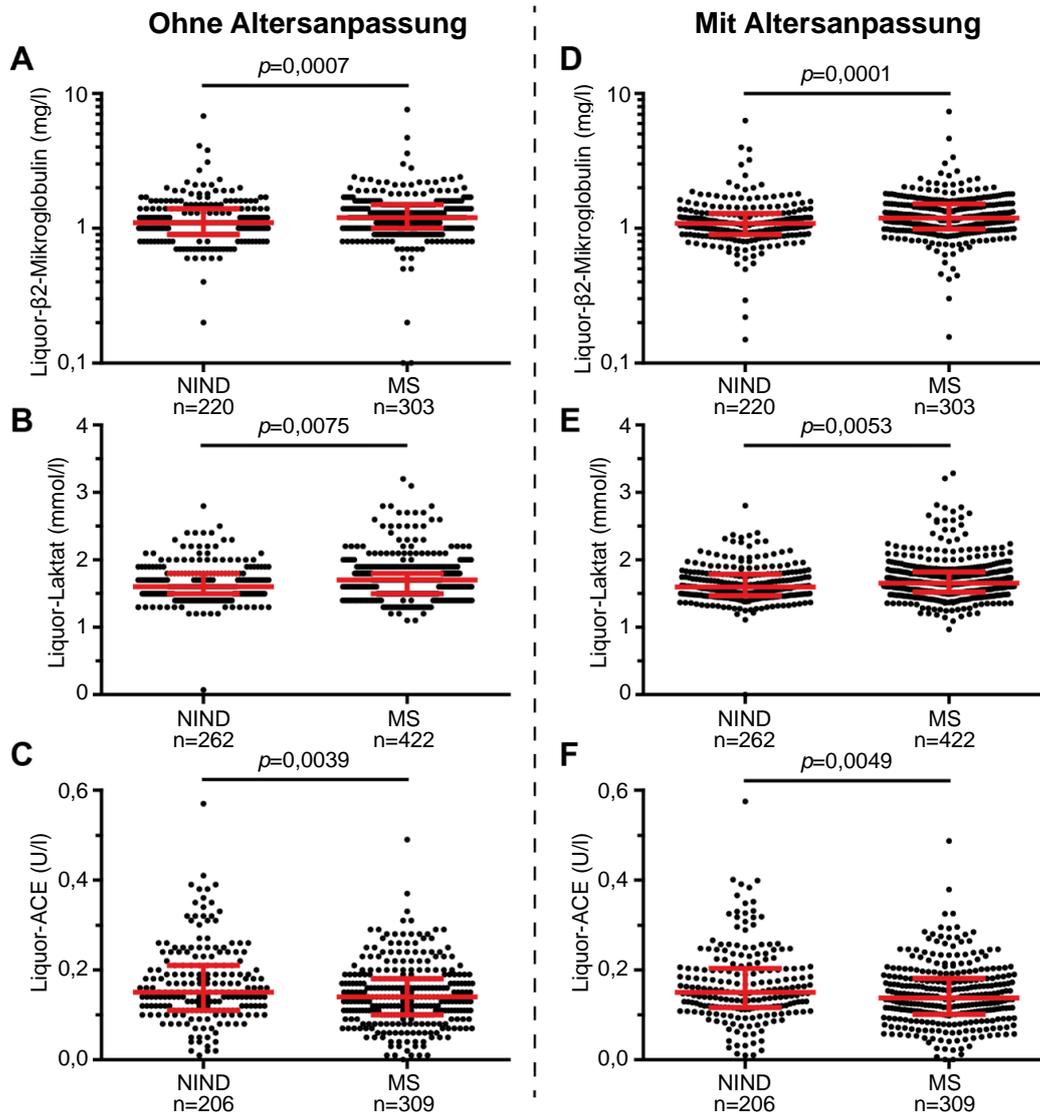


Abbildung 4: Liquorspiegel von β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei Fällen mit MS und NIND mit und ohne Alterskorrektur

A–C: Vergleich der nicht alterskorrigierten Liquorspiegel von Beta-2-Mikroglobulin (β2-Mikroglobulin) (A), Laktat (B) und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (C) bei Fällen mit Multipler Sklerose (MS) (unabhängig von der MS-Verlaufsform) und Fällen mit nicht inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (NIND).

D–F: Vergleich der alterskorrigierten Liquorspiegel (Beschreibung des Korrekturprinzips im Fließtext) von β2-Mikroglobulin (D), Laktat (E) und ACE (F) von MS- und NIND-Fällen.

Die Punkte repräsentieren individuelle Liquorwerte. Die roten Balken entsprechen dem Medianwert sowie dem Interquartilsabstand. n: Anzahl der Fälle; p: p-Wert. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

Für alle weiteren Analysen wurden die alterskorrigierten Werte genutzt. Trotz numerisch tendenziell niedrigerer Spiegel von β 2-Mikroglobulin und ACE (nicht jedoch von Laktat) im Liquor von Fällen weiblichen Geschlechts konnten für das alterskorrigierte Liquor- β 2-Mikroglobulin ($p=0,1532$), -Laktat ($p=0,7894$) oder -ACE ($p=0,2157$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet werden.

3.4 Korrelation der alterskorrigierten β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel innerhalb der MS- und Kontrollgruppe

Laut Analysen korrelierten in der MS-Kohorte im Liquor weder Laktat und β 2-Mikroglobulin ($r_s=-0,01792$; $p=0,7596$) noch Laktat und ACE ($r_s=-0,08259$; $p=0,1578$) miteinander.

Die Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin und ACE zeigten hingegen einen hochsignifikant positiven Zusammenhang ($r_s=0,4439$; $p<0,0001$) (Abbildung 5 A-C). Diese Korrelation zwischen β 2-Mikroglobulin und ACE ($r_s=0,4549$; $p<0,0001$) wurde auch in der Kontrollgruppe beobachtet (Abbildung 5 D).

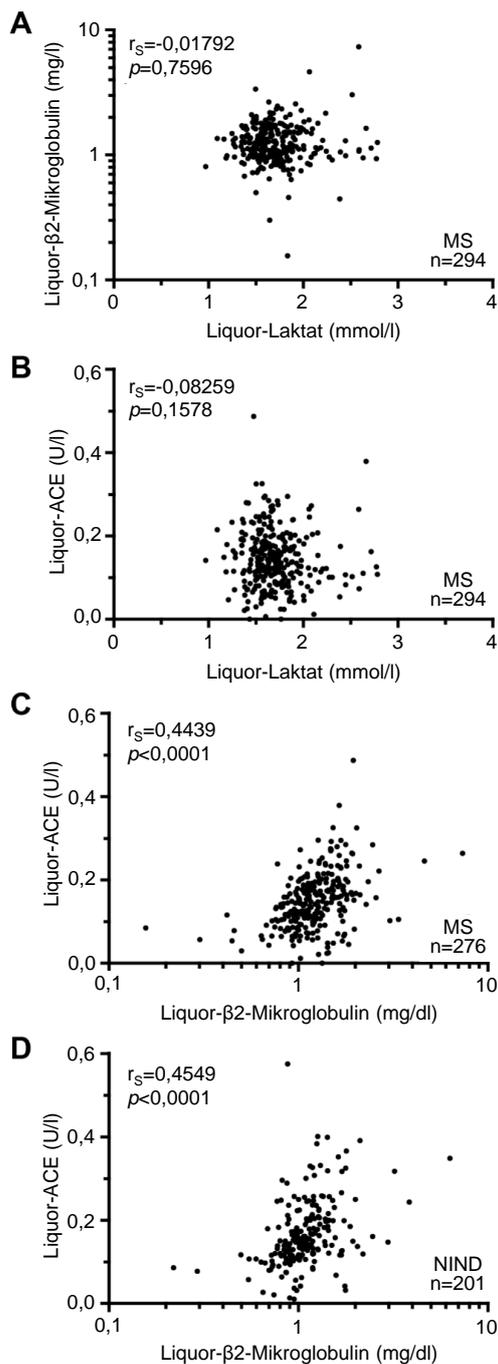


Abbildung 5: Korrelation der alterskorrigierten β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel bei Fällen mit MS und NIND

Die Punkte repräsentieren individuelle, parallel bestimmte Liquor-Werte für Laktat und Beta-2-Mikroglobulin (β 2-Mikroglobulin) (A), Laktat und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (B) sowie β 2-Mikroglobulin und ACE (C, D) bei Fällen mit Multipler Sklerose (MS; A–C) und Fällen mit nicht inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (NIND; D).

Die ermittelten Spearman-Koeffizienten mit p -Werten (r_s , p) sind rechts der y-Achse aufgetragen. Die Anzahl der Lumbalpunktionen (n), bei denen β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bestimmt wurde, ist rechts oberhalb der x-Achse aufgetragen. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

3.5 Liquorspiegel von alterskorrigiertem β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei verschiedenen Verlaufsformen der MS

Der nächste Untersuchungsschritt bestand aus dem Vergleich der Liquorspiegel der drei Biomarker bei Fällen mit verschiedenen MS-Verlaufsformen und NIND-Fällen.

Die β 2-Mikroglobulin-Spiegel waren bei Fällen mit CIS (Median: 1,248 mg/l; $p < 0,05$) und bei Fällen mit RRMS (Median: 1,187 mg/l; $p < 0,05$) signifikant höher als bei den NIND-Kontrollen (Median: 1,086 mg/l).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die β 2-Mikroglobulin-Spiegel von SPMS- (Median: 1,159 mg/l; $p > 0,05$) und PPMS-Fällen (Median: 1,222 mg/l; $p > 0,05$) nicht signifikant von den Kontrollen (Abbildung 6 A).

Ein gepoolter Vergleich rein schubförmiger (CIS + RRMS, Median: 1,190 mg/l; $p < 0,001$) oder chronisch progredienter Verläufe (SPMS + PPMS, Median: 1,210 mg/l; $p > 0,05$) mit den Kontrollen änderte trotz der numerisch höchsten Median-Werte in der relativ kleinen Gruppe von Fällen mit chronisch progredienten Verläufen nichts an diesem Ergebnis (Abbildung 6 B).

Die Liquor-Laktat-Spiegel lagen bei CIS-Fällen signifikant höher (Median: 1,690 mmol/l; $p < 0,01$) als bei NIND-Fällen (Median: 1,599 mmol/l), während sich das Liquor-Laktat bei RRMS- (Median: 1,651 mmol/l), SPMS- (Median: 1,649 mmol/l) und PPMS-Fällen (Median: 1,598 mmol/l) nicht signifikant von den Kontrollen unterschied (Abbildung 6 C).

Der Vergleich rein schubförmiger (CIS + RRMS, Median: 1,660 mmol/l; $p < 0,01$) oder chronisch progredienter Verläufe (SPMS + PPMS, Median: 1,642 mmol/l; $p > 0,05$) mit den Kontrollen ergab nur für die schubförmigen Verläufe einen signifikanten Unterschied (Abbildung 6 D).

Die Liquor-ACE-Spiegel von CIS-, RRMS-, SPMS-, PPMS- und NIND-Fällen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,0746$) (Abbildung 6 E). Bei der Zusammenfassung schubförmiger (CIS + RRMS) und progredienter (SPMS + PPMS) Verläufe zeigten Fälle mit rein schubförmigen Verläufen signifikant niedrigere Liquor-ACE-Spiegel (Median: 0,141 U/l; $p < 0,05$) im Vergleich zu den NIND-Fällen. Der Unterschied war trotz numerisch noch niedrigerer Werte bei der viel kleineren Gruppe chronisch progredienter Krankheitsverläufe im Vergleich zu den NIND-Kontrollen nicht signifikant (Median: 0,122 U/l vs. 0,150 U/l; $p > 0,05$) (Abbildung 6 F).

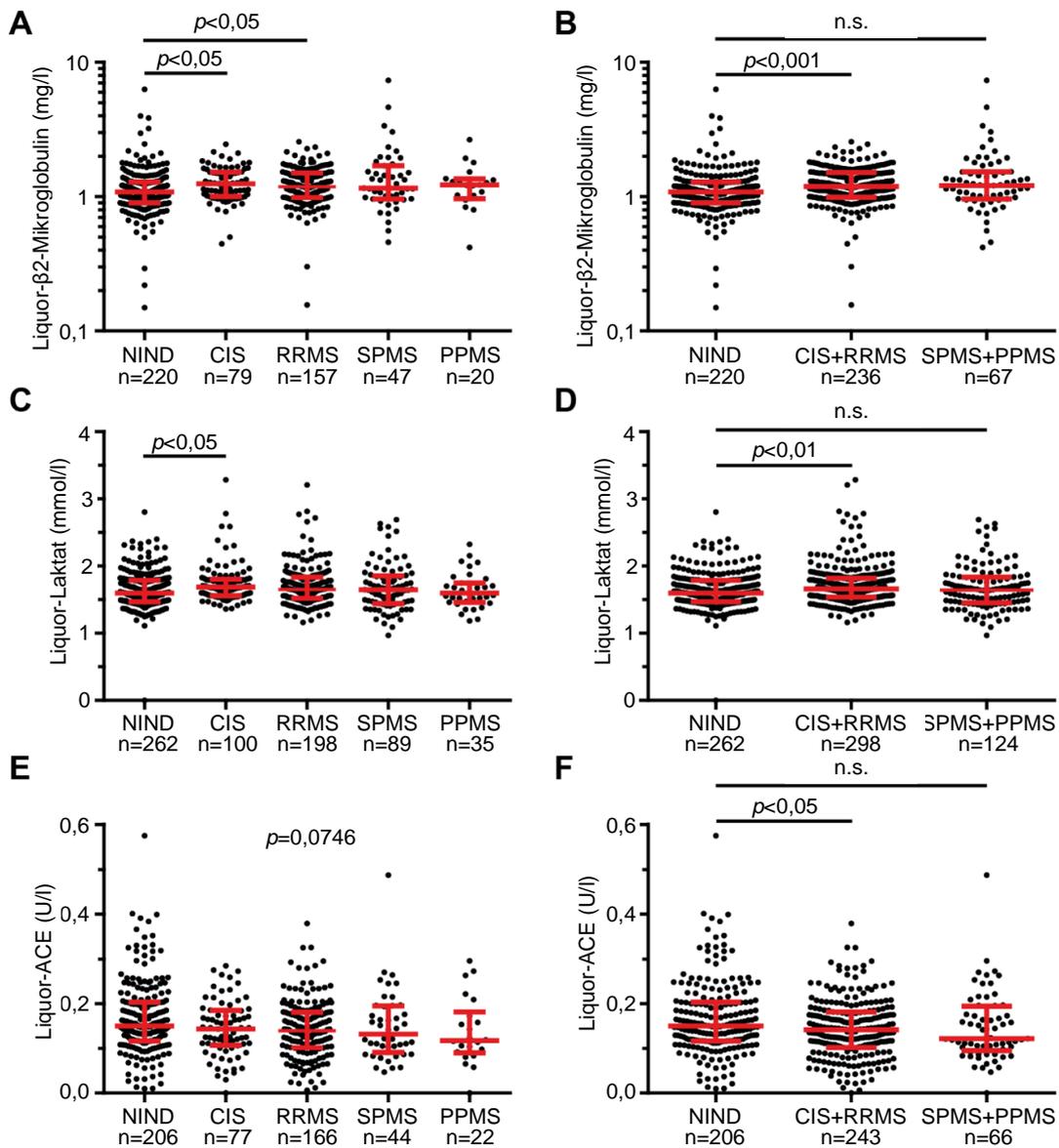


Abbildung 6: Liquorspiegel von alterskorrigiertem β2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei verschiedenen Verlaufsformen der MS sowie bei NIND

Vergleich der alterskorrigierten Liquorspiegel von Beta-2-Mikroglobulin (β2-Mikroglobulin) (A), Laktat (C) und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (E) von Fällen mit nicht inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (NIND) sowie Fällen mit unterschiedlichen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (MS): klinisch isoliertes Syndrom (CIS), schubförmig remittierende MS (RRMS), sekundär progrediente MS (SPMS), primär progrediente MS (PPMS).

Zudem erfolgte ein gepoolter Vergleich der Liquorspiegel von β2-Mikroglobulin (B), Laktat (D) und ACE (F) bei NIND-Fällen und Fällen mit rein schubförmiger MS (CIS und RRMS) sowie bei NIND-Fällen und Fällen mit chronisch progredienter MS (SPMS und PPMS). Die Punkte repräsentieren individuelle Liquorwerte. Die roten Balken kennzeichnen den Median und Interquartilsabstand. n. s. = nicht signifikant. n: Anzahl der Fälle; p: p-Wert. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

3.6 Einfluss von klinischen Schüben auf die Liquormarker

Um β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor als potentielle Biomarker für die akute entzündliche Krankheitsaktivität beurteilen zu können, wurden 243 MS-Fälle mit einem Schub in den vorangegangenen vier Wochen mit 195 MS-Fällen ohne aktuell erkennbare akute klinische Verschlechterung verglichen.

Die Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegel zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den MS-Fällen mit (Median: 1,190 mg/l) und ohne (Median: 1,197 mg/l; $p=0,7481$) Schub (Abbildung 7 A).

Dagegen waren die Liquor-Laktat-Spiegel bei MS-Fällen mit Schub etwas höher (Median: 1,666 mmol/l) als bei MS-Fällen mit stabiler Erkrankung (Median: 1,643 mmol/l; $p=0,0284$) (Abbildung 7 B).

Dieser Unterschied war nach Korrektur allerdings nicht mehr signifikant. Auch bei der gemeinsamen Betrachtung von Fällen mit CIS und RRMS zeigte sich kein Unterschied in den Liquor-Laktat-Spiegeln in Abhängigkeit vom Auftreten von Schüben (Median: Fälle mit Schüben: 1,661 mmol/l; stabile Fälle: 1,648 mmol/l; $p=0,3719$) (Abbildung 7 C).

Auch die Liquor-ACE-Spiegel unterschieden sich zwischen MS-Fällen mit Schubaktivität (Median: 0,1416 U/l) und aktuell stabilen MS-Fällen nicht (Median: 0,1330 U/l; $p=0,7195$) (Abbildung 7D).

Zusammenfassend ließ sich, obwohl zunächst für Laktat ein gewisser Trend zu höheren Liquorspiegeln in der Schubphase beobachtet werden konnte, kein eindeutiger Effekt von klinischen Schüben auf die Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE nachweisen.

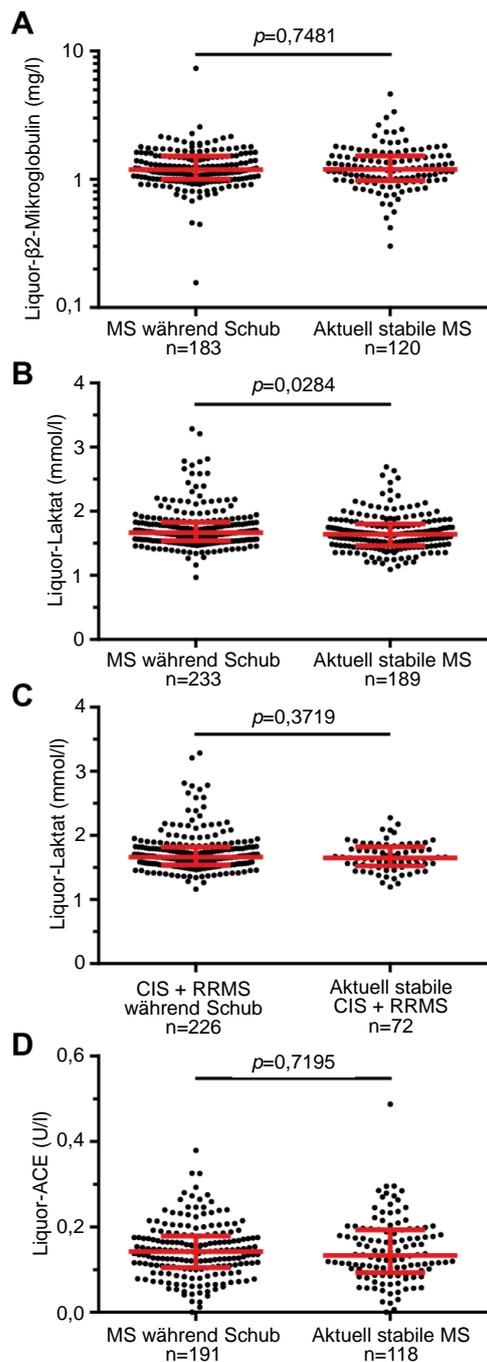


Abbildung 7: Einfluss von klinischen Schüben auf die Liquormarker β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE

Vergleich der alterskorrigierten Liquorspiegel von Beta-2-Mikroglobulin (β 2-Mikroglobulin) (A), Laktat (B) und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (D) von Fällen mit Multipler Sklerose (MS), die innerhalb der zurückliegenden vier Wochen einen Schub erlitten hatten, und MS-Fällen ohne akute klinische Verschlechterung. Subgruppen-Analyse (C) für das Verhalten von Liquor-Laktat bei Fällen mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und schubförmig remittierender MS (RRMS) mit und ohne aktuelle Schübe. Die Punkte repräsentieren individuelle Liquorwerte, die roten Balken kennzeichnen den Median sowie den Interquartilsabstand. n: Anzahl der Fälle; p: p-Wert. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

3.7 Korrelation von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor mit der Dauer und dem Schweregrad der MS

Als Marker für die Schwere der Erkrankung wurde neben dem EDSS-Wert der Progressionsindex, definiert als Quotient des EDSS-Wertes und der Krankheitsdauer in Jahren, verwendet.

Da die Untersuchungskohorte zahlreiche Fälle im Frühstadium der Erkrankung einschloss, wurde die Analyse auf die 258 MS-Fälle begrenzt, die zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion eine Krankheitsdauer von mehr als einem Jahr aufwiesen.

Weder das Liquor- β 2-Mikroglobulin ($r_s=0,08915$; $p=0,2548$) noch das Liquor-Laktat ($r_s=-0,07196$; $p=0,2580$) oder das Liquor-ACE ($r_s=0,07934$; $p=0,3023$) korrelierte mit dem EDSS-Wert zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion.

Für das Liquor- β 2-Mikroglobulin ($r_s=-0,06092$; $p=0,4370$) und Liquor-ACE ($r_s=0,01447$; $p=0,8510$) ließ sich auch kein Zusammenhang mit der Krankheitsdauer herstellen. Das Liquor-Laktat zeigte dagegen eine negative Korrelation zur Krankheitsdauer ($r_s=-0,2336$; $p=0,0002$) (Abbildung 8 A, B und C).

Die Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegel korrelierten nicht mit dem Progressionsindex ($r_s=0,07019$; $p=0,3703$). Auch für das Liquor-ACE ließ sich keine Korrelation mit dem Progressionsindex nachweisen ($r_s=-0,04620$; $p=0,5485$). Dagegen zeigte das Liquor-Laktat ($r_s=0,2064$; $p=0,0011$) eine signifikant positive Korrelation mit dem Progressionsindex (Abbildung 8 D, E und F).

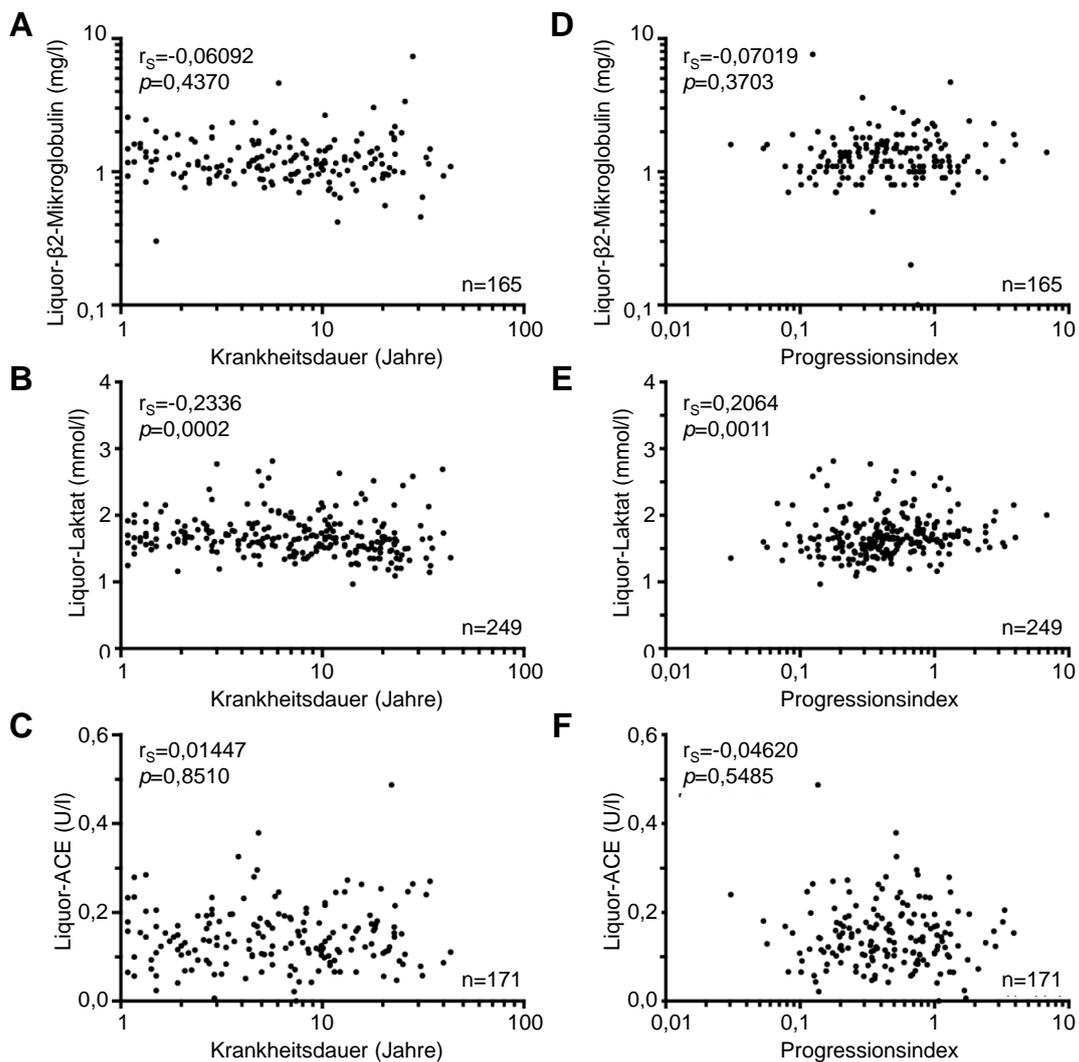


Abbildung 8: Korrelation von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor mit der Dauer und dem Schweregrad der MS

Spearman-Korrelationen mit p -Werten (r_s , p) zwischen klinischer Krankheitsdauer (A–C) bzw. MS-Schweregrad (Progressionsindex; D–F) und den alterskorrigierten Liquorspiegeln wurden für Beta-2-Mikroglobulin (β 2-Mikroglobulin) (A + D), Laktat (B + E) und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) (C + F) ermittelt.

In die Analyse eingeschlossen wurden ausschließlich MS-Fälle mit einer Erkrankungsdauer von mindestens einem Jahr. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. n : Anzahl der Fälle. Modifiziert nach Haarmann et al. [44]. Druckerlaubnis nach Verlagsaussage nicht erforderlich; Einverständniserklärung der Co-Autoren vorliegend.

4 Diskussion

Aus den vorliegenden Analysen lassen sich folgende Hauptkenntnisse ableiten:

- Die β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel im Liquor korrelieren positiv mit dem Alter der Untersuchten. Alterskorrigierte Konzentrationen von β 2-Mikroglobulin und Laktat sind bei MS- im Vergleich zu NIND-Fällen erhöht, während die alterskorrigierte ACE-Konzentration erniedrigt ist.
- Die β 2-Mikroglobulin- und ACE-Spiegel im Liquor korrelieren bei MS- und NIND-Fällen jeweils miteinander. Ein entsprechender Zusammenhang zum Liquor-Laktat besteht nicht.
- Das Liquor-Laktat korreliert im Gegensatz zum Liquor- β 2-Mikroglobulin und Liquor-ACE mit der Erkrankungsdauer und dem Schweregrad der MS. Klinische Schübe weisen keinen signifikanten Einfluss auf die drei genannten Liquormarker auf.

4.1 Altersabhängigkeit von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor von MS- und NIND-Fällen

Frühere Studien zur Altersabhängigkeit der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen inflammatorischer und nicht inflammatorischer Genese hatten widersprüchliche Ergebnisse ergeben, sodass eine erneute Untersuchung dieser Fragestellung in den vorliegenden Kollektiven aus MS- und NIND-Fällen sinnvoll erschien (FF1a).

Kepplinger et al. fanden 2005 bei 27 Kopfschmerz-PatientInnen eine signifikante positive Korrelation des β 2-Mikroglobulin-Liquorspiegels mit dem Alter. Die AutorInnen werteten diesen Befund als möglichen Ausdruck einer allgemein gesteigerten Aktivierung des Immunsystems während des Alterungsprozesses [99].

Bereits 1980 stellten Löffberg et al. bei der Analyse von Liquorproben von 64 Personen ohne Zeichen einer hirnrnorganischen Störung eine signifikante Altersabhängigkeit des β 2-Mikroglobulin-Liquorspiegels fest. Die von den AutorInnen geforderte Altersanpassung bei der Untersuchung von Liquorparametern [100] wurde auch in der vorliegenden Dissertation berücksichtigt.

Eine weitere Studie zur intrathekalen Synthese von β 2-Mikroglobulin bei PatientInnen mit MS und aseptischer Meningoenzephalitis als Untersuchungsgruppe sowie Spannungskopfschmerz-PatientInnen als Kontrollgruppe konnte keine signifikante Altersabhängigkeit der β 2-Mikroglobulin-Liquorspiegel innerhalb der Kontrollgruppe bestätigen. Eine gesonderte Betrachtung der Altersabhängigkeit der β 2-Mikroglobulin-Liquorspiegel bei MS erfolgte nicht. Die Studie distanzierte sich jedoch insgesamt von β 2-Mikroglobulin als Biomarker der Immunzellaktivierung bei MS [101].

Eine große Studie aus dem Jahr 2012 mit 7.614 Liquorproben, in denen Laktat bestimmt worden war, ergab eine klare Altersabhängigkeit der Laktat-Spiegel. Die Liquorproben stammten aus dem Zeitraum 1993–2008. Eine strikt getrennte Betrachtung von Liquorproben gesunder ProbandInnen und Personen mit neurologischen Krankheitsbildern wurde zwar angestrebt, konnte allerdings nicht durchgehend gewährleistet werden [102].

Albanese et al. stellten in ihrer 2016 veröffentlichten Studie mit einem MS-Kollektiv aus 118 RRMS-PatientInnen eine signifikante Korrelation zwischen dem Liquor-Laktat und dem PatientInnenalter fest. Dies galt auch für die Kontrollgruppe, die sich aus 157 Personen rekrutierte, bei denen eine neurologische Untersuchung, eine craniale MRT und eine Lumbalpunktion keinen Anhalt für das Vorliegen einer entzündlichen oder degenerativen Erkrankung des Nervensystems ergeben hatte, was die Annahme einer grundsätzlichen Altersabhängigkeit von Laktat im Liquor stützt [69].

Die bisherige Datenlage zur Altersabhängigkeit von Liquor-ACE ist ebenfalls unklar. Eine Arbeit aus dem Jahr 2000 fand bei 56 an Schizophrenie erkrankten PatientInnen keine Korrelation zwischen dem ACE im Liquor oder Serum und dem PatientInnenalter. Eine Diskussion dieses Befundes erfolgte nicht [103].

15 Jahre zuvor hatte eine andere Forschungsgruppe bei Erwachsenen ohne bekannte neurologische Erkrankung eine positive Korrelation zwischen der Liquor-ACE-Aktivität und dem PatientInnenalter ermittelt [104].

Die vorliegende Untersuchung erlaubt eindeutige Aussagen bezüglich der drei untersuchten Liquormarker. In dem großen Kollektiv von 276 NIND-Fällen bestand eine Altersabhängigkeit der Liquor- β 2-Mikroglobulin-, -Laktat- und -ACE-Spiegel.

Weiter ist der Nachweis der Altersabhängigkeit der Liquormarker bei MS-Fällen besonders hervorzuheben. Möglicherweise können Altersunterschiede zwischen den MS-Fällen und den Kontrollen die teils widersprüchlichen Ergebnisse in den publizierten Analysen erklären. In Untersuchungen, die bei der Gegenüberstellung von MS- und Kontroll-PatientInnen keine signifikant unterschiedlichen Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegel nachweisen konnten oder sich grundsätzlich von β 2-Mikroglobulin als Liquormarker bei MS distanzieren, unterschied sich das Medianalter der Vergleichskollektive teilweise um bis zu 20 Jahre [58, 101, 105].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen, dass eine unzureichende Berücksichtigung demographischer Parameter wie des Alters, die sich möglicherweise erst bei größeren Gruppengrößen demaskieren, bei Biomarker-Untersuchungen zu Fehlschlüssen führen können. Für die in dieser Dissertation untersuchten Analyten sollten nur Untersuchungen mit alterskorrigierten Parametern durchgeführt werden, um einer Verzerrung der Ergebnisse entgegenzuwirken. Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden daher alterskorrigierte Analysen durchgeführt.

4.2 Vergleich der β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel im Liquor von MS- und NIND-Fällen

Da es sich bei β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE um etablierte Liquoranalyten handelt, wurde nachfolgend ihr Stellenwert für die Diagnosestellung einer MS und für die Beurteilung des Erkrankungsverlaufes geprüft [44]. Es wurde hierzu zunächst analysiert, ob β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor von MS-Fällen im Vergleich zu Kontrollen erhöht bzw. erniedrigt vorliegen und somit als erste Orientierungspunkte in der MS-Diagnostik dienen können (FF1b).

Bis auf eine Studie von Albanese et al. aus dem Jahr 2016 zu Liquor-Laktat-Spiegeln lagen nach bestem Wissen der Autorin zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden

Studie keine Daten mit alterskorrigierten Werten zur Konzentration dieser Biomarker im Liquor von MS-PatientInnen vor.

Die Laktat-Spiegel zeigten sich in dem alterskorrigierten Kollektiv bei MS-Fällen im Vergleich zu NIND-Fällen erhöht. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der großen Studie von Albanese et al. aus 2016 [69].

Laktat wird seit den frühen 1990er Jahren nicht mehr ausschließlich als Endprodukt des zellulären Stoffwechsels, sondern auch als Immunmodulator betrachtet. Laktat behindert die Motilität von T-Zellen, fördert die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu Th17-Zellen und schränkt die zytotoxischen Fähigkeiten von CD8⁺-T-Zellen ein. CD4⁺-T-Zellen sind Laktat-sensitiv über ihren Natrium-Laktat-Transporter SLC5A12, CD8⁺-T-Zellen über ihren SLC16A1-Transporter. Die resultierende Akkumulation der Immunzellen geht mit einer gesteigerten Produktion von Interleukin-17 in begrenzten Kompartimenten einher, was zur Entstehung tertiärer lymphatischer Organe mit vermehrter ektopter Sekretion von Autoantikörpern führen könnte. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der bei Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom und MS eine Rolle spielt, und der immunmodulatorischen Therapien schwer zugänglich ist [30, 106]. Ein bei MS erhöhtes Liquor-Laktat könnte als Ausdruck dieser Prozesse interpretiert werden. Die weitere Erforschung der Rolle des Liquor-Laktats bei MS könnte zum Verständnis der Pathophysiologie und damit zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

Zudem belegt die vorliegende Arbeit, dass auch β 2-Mikroglobulin im Liquor von MS-PatientInnen erhöht ist. Bereits 1988 werteten Bjerrum et al. einen erhöhten β 2-Mikroglobulin-Spiegel im Liquor von MS-PatientInnen als Ausdruck zellreicher Prozesse, die zu den entzündlichen MS-Läsionen führen. Grundsätzlich spiegeln erhöhte Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin einen erhöhten Zellumsatz wider [73].

Daher stellt sich die Frage, warum in der vorliegenden Studie keine signifikante Erhöhung dieses Proteins während eines Schubs auftrat. Hierbei könnte die Überlegung berücksichtigt werden, dass die entzündlichen MS-Läsionen bei Auftreten außerhalb des liquoranalytischen Gehirns nicht unbedingt zu einer Liquor-Pleozytose (analog zur bekannten Korrelation der Höhe des Albuminquotienten mit der Nähe von Läsionen zum lumbalen Liquorraum) führen müssen [32, 46].

Eine Korrelation bildgebender Befunde mit einer Änderung des Liquor- β 2-Mikroglobulins könnte im Rahmen zukünftiger Forschungsprojekte zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

Der dritte Biomarker ACE zeigte im vorliegenden Kollektiv im Liquor von MS-Fällen im Vergleich zu NIND-Fällen erniedrigte Werte. Damit widersprechen die Daten zwei 2008 und 2009 von Kawajiri et al. publizierten Arbeiten, in denen bei MS-PatientInnen ein erhöhter ACE-Liquorspiegel sowie reduzierte Angiotensin-II- und ACE2-Konzentrationen nachgewiesen wurden. Ihre Ergebnisse werteten Kawajiri et al. als Ausdruck einer gesteigerten Aktivität des RAAS bei MS [79, 83]. Die Studien von 2008 bzw. 2009 umfassten aber lediglich 21 bzw. 20 MS-PatientInnen, was deren Aussagekraft in Anbetracht der geringen Spiegelunterschiede zwischen MS-Fällen und NIND-Kontrollen stark einschränkt.

Das RAAS bietet angesichts dieser widersprüchlichen Befunde im Kontext entzündlicher ZNS-Erkrankungen zahlreiche Ansatzpunkte für zukünftige Forschungsprojekte. Insbesondere die mehrfach gefundene Angiotensin-II-Erniedrigung bei MS scheint als prognostischer Marker vielversprechend zu sein. Nach derzeitigem Wissensstand bewirkt Angiotensin-II über eine Interaktion mit dem von Endothelzellen der BHS exprimierten AT1-Rezeptor eine vermehrte Expression des Proteins Occludin. Die so begünstigte Ausbildung von Tight Junctions ist maßgeblich für die Barrierefunktion der BHS verantwortlich. Bei einer MS scheint die Bildung von Angiotensin-II aufgrund des inflammatorischen Milieus mit konsekutivem Untergang perivaskulärer Astrozyten vermindert zu sein, wodurch sich die Schäden der BHS in den MS-Läsionen erklären ließen [79, 82]. Das in der vorliegenden Arbeit nicht analysierte Angiotensin-II dürfte damit noch besser als ACE geeignet sein, den Verlust perivaskulärer Astrozyten und die schädigenden Vorgänge bei MS abzubilden.

4.3 Potentielle Korrelationen zwischen den Liquorspiegeln von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei MS- und NIND-Fällen

In einem weiteren Schritt untersuchte die vorliegende Arbeit die Abhängigkeit der drei analysierten Liquormarker voneinander (FF1c).

Es bestand eine robuste positive Korrelation zwischen β 2-Mikroglobulin und ACE bei NIND- und MS-Fällen. Die Laktat-Spiegel zeigten keine Assoziation mit den beiden anderen Liquormarkern.

Das β 2-Mikroglobulin im Serum spiegelt vermutlich den Umsatz lymphatischer Zellen wider. Als Bestandteil des MHC-I ist β 2-Mikroglobulin maßgeblich an der Antigen-Präsentation gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten beteiligt. Erhöhte Serumspiegel wurden bei diversen Autoimmunerkrankungen und Neoplasien beschrieben [107].

Aus der beobachteten Korrelation von β 2-Mikroglobulin und ACE im Liquor von MS-Fällen ließe sich folgern, dass auch ACE Ausdruck einer vermehrten Immunzellaktivität ist oder weitere Immunzellen anstelle der untergehenden Astrozyten die ACE-Freisetzung übernehmen. Der in MS-Läsionen nachgewiesene zunehmende Verlust perivaskulärer Astrozyten sollte zu einer verminderten intrathekalen ACE-Freisetzung im Laufe der MS-Erkrankung und konsekutiv zu erniedrigtem Liquor-ACE führen. Diese Entwicklung wird möglicherweise aber teilweise durch eine gesteigerte ACE-Freisetzung aus akkumulierenden meningealen Immunzellen im Sinne eines sich entwickelnden tertiären lymphatischen Systems bei MS kompensiert. Mit einem solchen Geschehen ließen sich auch die nur moderat erniedrigten Liquor-ACE-Spiegel bei den MS-Fällen der vorliegenden Studie erklären [44, 82, 108].

4.4 Eignung von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor zur Differenzierung unterschiedlicher MS-Verlaufsformen

Nach bestem Wissen der Autorin existierten zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Studie keine vergleichenden Untersuchungen zu den drei Biomarkern β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei unterschiedlichen MS-Verlaufsformen.

In der vorliegenden Untersuchung wiesen Fälle mit differenten MS-Verlaufsformen unterschiedliche β 2-Mikroglobulin- und Laktat-Liquorspiegel auf. Beide Marker waren bei CIS-Fällen erhöht; RRMS-Fälle zeigten dagegen ausschließlich erhöhte β 2-Mikroglobulin-Spiegel. Die Liquor-ACE-Konzentrationen waren dagegen bei allen MS-Verlaufsformen vergleichbar.

Bei der getrennten Analyse chronischer und schubförmiger Verläufe zeigten Fälle mit schubförmiger MS, nicht aber solche mit chronischen Verläufen, eine erhöhte Liquorkonzentration von β 2-Mikroglobulin und Laktat. Das Liquor-ACE war bei Fällen mit schubförmiger MS im Vergleich zu NIND-Fällen erniedrigt; der Unterschied erreichte jedoch erst in dieser gepoolten Gegenüberstellung eine statistische Signifikanz.

Nach den Befunden dieser Arbeit eignen sich β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor alleine nicht zur Differenzierung von verschiedenen MS-Verlaufsformen (FF2a). Die abweichenden Konzentrationen bei chronischen und schubförmigen Verläufen legen jedoch nahe, dass den Verlaufsformen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen, was einen relevanten Ausgangspunkt für zukünftige Forschungsprojekte darstellt. Ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie chronischer MS-Verläufe ist auch für die Weiterentwicklung von Therapien für betroffene PatientInnen von immenser Bedeutung. Erst 2019 kritisierten Dobson und Giovannoni in einer Übersichtsarbeit die mangelhafte Versorgung von PatientInnen mit chronischen MS-Verläufen. Laut den Londoner ForscherInnen erschwert die unzureichende Abbildung des Therapieansprechens die Behandlung dieser PatientInnen. Weiter waren sie der Meinung, dass die strikte Differenzierung nach unterschiedlichen MS-Verlaufsformen im klinischen Alltag nicht immer zielführend ist [3].

Unstrittig ist, dass MS-PatientInnen umgehend nach Diagnosestellung eine individuelle Therapie erhalten sollten [109]. Dafür ist eine zeitnahe und zuverlässige Identifikation der Verlaufsform wichtig. Die Relevanz von Biomarkern, die zwischen MS-Verlaufsformen unterscheiden und damit zu einem sofortigen Therapiebeginn beitragen, spiegelt sich in zahlreichen Studien zu dieser Thematik wider.

Kroksveen et al. fanden 2012 bei einer RRMS im Vergleich zu anderen neurologischen Krankheitsbildern signifikant erhöhte bzw. erniedrigte Liquorspiegel von 32 Proteinen. Die 17 RRMS-PatientInnen zeigten erwartungsgemäß erhöhte Werte für diverse IgG-Subklassen als Ausdruck einer quantitativen intrathekalen IgG-Synthese. Zu den bei RRMS signifikant erniedrigten Proteinen zählten Contactin-1, Kallikrein-6, der neuronale Pentraxin-Rezeptor, Dickkopf-3 und interessanterweise auch das Vitamin-D-bindende Protein [110]. Letzteres spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von

Makrophagen. Erniedrigte Spiegel des Vitamin-D-bindenden Proteins begünstigen möglicherweise ein inflammatorisches Milieu im Liquor. Diese Effekte passen zu dem erhöhten MS-Erkrankungsrisiko bei Vitamin-D-Mangel und unterstreichen die potentielle Bedeutung des Vitamin-D-bindenden Proteins als MS-Biomarker [110, 111]. Avsar et al. untersuchten die potentielle Eignung von möglichen Autoantigenen (z. B. Basisches Myelinprotein, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), NfL) und neurodegenerativen Markern (z. B. Gesamt-Tau, GFAP) zur Vorhersage der MS-Verlaufsform und ihrer Prognose. Hierzu verglichen die AutorInnen die Liquor- und Serumspiegel der genannten Proteine bei 135 MS-PatientInnen (46 CIS, 67 RRMS, 22 PPMS) und bei 22 NIND-PatientInnen. Die Gesamt-Tau-, GFAP-, MOG- und NfL-Spiegel waren im Liquor von MS-PatientInnen signifikant erhöht. Weiter zeichneten sich CIS-Fälle, die später in eine RRMS übergingen, durch signifikant erhöhte Gesamt-Tau- und MOG-Werte aus. Bei progredienten MS-Verläufen, RRMS und CIS fielen erhöhte NfL-, Gesamt-Tau- und GFAP-Werte auf. Laut den AutorInnen sind insbesondere Gesamt-Tau, MOG und NfL im Liquor geeignet, den Übergang eines CIS in eine RRMS abzubilden und den MS-Verlauf zu prognostizieren [112].

MOG hat als Biomarker für die MS inzwischen keinen Stellenwert mehr. Zellbasierte Antikörper-Assays legen eine Assoziation dieses Proteins mit einer eigenen Krankheitsentität (MOG-Enzephalomyelitis) nahe [113, 114]. NfL korrelierte dagegen in rezenten Studien mit der Krankheitsschwere und dem Therapieansprechen bei einer MS und wird daher auch aktuell als vielversprechender MS-Biomarker bewertet [115].

4.5 Einfluss von MS-Schüben auf die Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE

Weiter analysierte die vorliegende Studie den potentiellen Einfluss von MS-Schüben auf die Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE (FF2b).

In der Routinediagnostik hat sich über die klinischen Studien hinaus bisher kein Biomarker zur Einschätzung der MS-Krankheitsaktivität etabliert. Zwar scheinen NfL und GFAP diesbezüglich vielversprechend; die Bestimmung im Serum ist aber, analog zu anderen potentiellen Biomarkern, aufgrund der niedrigen Konzentrationen spezialisierten Zentren vorbehalten [54, 115].

Angesichts dieser Problematik scheint die Überprüfung der Eignung leicht verfügbarer Liquormarker wie β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE sinnvoll. In der vorliegenden Studie war das Liquor-Laktat bei Fällen mit klinisch aktiver MS tendenziell erhöht und damit unter Umständen geeignet, den Übergang eines CIS in eine manifeste MS anzuzeigen. Insgesamt hatten Schubphasen aber keinen signifikanten Effekt auf die Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat oder ACE.

Studien beschäftigen sich bereits seit Jahrzehnten mit der Suche nach Biomarkern zur Beurteilung der MS-Schubaktivität. Laut einer Arbeit von Bjerrum et al. aus dem Jahr 1988 kommt es während akuter MS-Symptome zu einer mäßigen Erhöhung der Liquor- β 2-Mikroglobulin-Spiegel. Eine definitive Erklärung dieses Zusammenhangs gelang damals nicht [73].

Ein Jahr zuvor detektierte eine Studie an 30 MS-PatientInnen eine signifikante Erhöhung von β 2-Mikroglobulin im Liquor bei Schubaktivität. Als mögliche Erklärungen für diesen Befund wurden eine (gesteigerte) intrathekale β 2-Mikroglobulin-Synthese als Ausdruck untergehenden Nervengewebes während eines Schubes sowie eine gesteigerte Aktivierung von Immunzellen angenommen [72].

Dagegen kamen Bagnato et al. 2004 bei der Untersuchung von 30 RRMS-PatientInnen zu dem Schluss, dass β 2-Mikroglobulin im Serum zur Abbildung der MS-Krankheitsaktivität nicht geeignet ist, da sich die Spiegel bei PatientInnen im Schub und klinisch stabilen PatientInnen nicht signifikant unterschieden [116].

Die vorliegende Studie belegt nun an einem umfangreichen Untersuchungskollektiv ebenfalls, dass das Liquor- β 2-Mikroglobulin die Krankheitsaktivität von MS nicht verlässlich widerspiegelt, da sich zwischen MS-Fällen im Schub (n=183) und stabilen MS-Fällen (n=120) keine signifikanten Unterschiede abzeichneten.

Auch die Laktat-Spiegel wurden (wie β 2-Mikroglobulin und ACE) durch die Schubaktivität nicht beeinflusst. Im Zuge der vorliegenden Analysen imponierte jedoch eine Erhöhung des Liquor-Laktats im CIS-Stadium, während Albanese et al. 2016 erhöhte Liquor-Laktat-Spiegel bei RRMS-PatientInnen ermittelt hatten. Diese Befunde könnten die potentielle Bedeutung von Laktat zur Differenzierung zwischen einem Übergang von einem CIS in eine RRMS und einem klinisch stabilen Zustand unterstützen. Bei Albanese

et al. bestand zudem eine Korrelation von Liquor-Laktat und Liquor-NfL bei RRMS-PatientInnen [69].

NfL gilt aktuell als vielversprechender Marker für den Untergang von Axonen und damit indirekt für die Krankheitsaktivität. Damit sollte auch die Korrelation zwischen NfL und Liquor-Laktat im Rahmen zukünftiger Studien analysiert werden. Neben NfL sind schon länger OKB zur Prognose eines Übergangs von einem CIS in eine RRMS etabliert [69, 117]. Es ist anzunehmen, dass ein kombinierter Einsatz von Biomarkern die Sensitivität und Spezifität zur Abschätzung eines Übergangs von einem CIS in eine manifeste MS erhöht. Möglicherweise ließe sich die Schubaktivität, aber auch der Schweregrad und die individuelle Prognose bei MS durch die Kombination etablierter Biomarker mit neuen Markern wie Laktat besser abbilden, was letztlich auch zu neuen therapeutischen Optionen bei der Schubbehandlung und Optimierung langfristiger Therapieerfolge führen könnte [69, 112, 117].

Der dritte in der vorliegenden Studie untersuchte Liquor-Biomarker, ACE, wurde analog zu β 2-Mikroglobulin und Laktat durch MS-Schübe nicht beeinflusst. Zahlreiche Publikationen belegen den Effekt von ACE als Bestandteil des RAAS auf die Pathogenese der MS [70, 79, 81, 83]. Die Studienlage zu ACE als Liquormarker der MS-Krankheitsaktivität ist dagegen lückenhaft und bedarf einer Ergänzung, um die vorliegenden Untersuchungsergebnisse einordnen zu können.

Während eine frühere Studie eine Assoziation der Serum-ACE-Aktivität und dem MRT-morphologischen Plaque-Volumen nahelegte und zu dem Schluss kam, dass eine Analyse von ACE als Marker der MS-Krankheitsaktivität mit dem Ziel einer optimierten Pharmakotherapie auch zukünftig von Interesse sein könnte [84], ist laut den vorliegenden Ergebnissen das Liquor-ACE weder zur Abbildung der MS-Schubaktivität noch zur Beurteilung der Krankheitsdauer und -schwere geeignet.

4.6 Eignung der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE als Biomarker zur Beurteilung der Dauer und des Schweregrades der MS-Erkrankung

Abschließend untersuchte die vorliegende Studie die Eignung der Liquormarker zur Vorhersage der Dauer und des Schweregrades der MS im Sinne einer Krankheitsprogression (FF2c).

Nachdem es Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz des RAAS bei der MS gibt, liegt die Erforschung von auf Renin-Inhibitoren, ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten basierenden Therapieoptionen zur Beeinflussung des Schubgeschehens nahe. Eine Hemmung der Krankheitsprogression durch diese Wirkstoffe scheint möglich, da im Tiermodell der MS, der autoimmunen Enzephalomyelitis, die Gabe von Aliskiren (Renin-Inhibitor), Enalapril (ACE-Hemmer) oder Losartan (AT1-Rezeptor-Antagonist) zu einer Reduktion von CD11b⁺- und CD11c⁺-Antigen-präsentierenden Zellen sowie zu einer Unterdrückung autoreaktiver Th1- und Th17-Zellen mit nachfolgend abgeschwächter Entzündungsaktivität führte. Weiter traten vermehrt CD4⁺FoxP3⁺-T-Zellen auf, es wurde eine Reduktion entzündlicher ZNS-Läsionen und eine Abnahme der motorischen Defizite bei den Versuchstieren beobachtet [70, 81].

Im Rahmen der vorliegenden Studie erwies sich das Liquor-ACE allerdings, passend zu den vorliegenden Daten, als nicht mit der Krankheitsschwere korrelierend.

Die Analyse des Liquor- β 2-Mikroglobulins und seiner möglichen Assoziation mit der Krankheitsprogression erfolgte vor dem Hintergrund, dass ältere Arbeiten β 2-Mikroglobulin als Marker für das Ansprechen auf eine Interferon-beta-Therapie diskutierten [68, 118]. Basierend auf der Überlegung, dass das Therapieansprechen eng mit der Krankheitsschwere verknüpft sein dürfte, adressierte die vorliegende Dissertation die Frage, ob die Bestimmung von β 2-Mikroglobulin im Liquor eine Beurteilung dieses Faktors erlaubt. Dabei konnte allerdings keine signifikante Korrelation des β 2-Mikroglobulin-Spiegels mit dem Progressionsindex detektiert werden. Eine Ursache hierfür könnte die eher lokale Entzündungsaktivität bei MS sein. Die entzündlichen Läsionen weisen, anders als systemische Inflammationsgeschehen wie z. B. die bakterielle Meningitis [2, 119], eine gewisse räumliche Distanz zu den Liquorräumen auf. Es wäre denkbar, dass β 2-Mikroglobulin somit keine ausreichende Konzentration im

Liquor erreicht, um die Krankheitsprogression abzubilden. Änderungen der Spiegel unter Therapie wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, sodass unklar ist, ob diese ein Therapieansprechen abbilden können, wobei longitudinale Liquoruntersuchungen aufgrund der Invasivität und möglicher Komplikationen [120] ohnehin nicht geeignet wären, um mit einem solchen Verlaufsparemeter eine Therapieadhärenz sicherzustellen.

Anders als das β 2-Mikroglobulin und ACE korrelierte dagegen das Liquor-Laktat in der vorliegenden Untersuchung positiv mit dem Progressionsindex. Schon 2014 hielten Amorini et al. Laktat für einen aussichtsreichen Biomarker in der MS-Diagnostik, da sie bei 613 MS-PatientInnen, die seit mindestens einem Monat kein Schubereignis erlitten hatten, signifikant erhöhte Laktat-Spiegel sowie eine signifikante Korrelation der Laktat-Spiegel mit dem EDSS-Wert nachweisen konnten. Die Studie konzentrierte sich jedoch auf Serum-Laktat und zog anstelle des Progressionsindex lediglich den EDSS-Wert zur Beurteilung der Krankheitsschwere heran [121], wohingegen in der vorliegenden Dissertation der Zusammenhang zwischen Liquor-Laktat und der mittels Progressionsindex bestimmten Krankheitsschwere analysiert wurde.

Die bei der MS insbesondere in späteren, fortgeschrittenen Krankheitsstadien in den Vordergrund tretende neurodegenerative Komponente der Erkrankung könnte die Korrelation des Progressionsindex mit dem Laktat erklären. Vermutlich kommt es im Rahmen des fortschreitenden Untergangs von Axonen zu Kompensationsmechanismen der chronischen Demyelinisierung. Weiterhin ist denkbar, dass die aus der neuroaxonalen Schädigung resultierende Beeinträchtigung der Mitochondrien den Mechanismus der Energiebereitstellung modifiziert. Eine gesteigerte extramitochondriale Glykolyse mit fortschreitender Krankheitsdauer könnte das vermehrt anfallende Endprodukt Laktat erklären. Daher könnten bei der Entwicklung künftiger MS-Behandlungskonzepte Ansätze zur Verbesserung der mitochondrialen Funktion zielführend sein [69, 121].

4.7 Limitationen und Stärken der Studie

Die Aussagekraft der vorliegenden Studie wird vor allem durch die retrospektive Analyse klinischer Daten eingeschränkt. Damit war eine Qualitätskontrolle, wie sie bei einem prospektiven Studiendesign möglich ist, nicht realisierbar. Zur Sicherstellung der

bestmöglichen Qualität der klinischen Daten wurden sämtliche Diagnosen auf Basis der ausführlichen Krankenakten geprüft und die EDSS-Werte anhand der neurologischen Untersuchungsbefunde nach anerkannten Rating-Kriterien reevaluiert.

Um die Vergleichbarkeit bei fehlender standardisierter MRT-Bildgebung zu verbessern, wurde die Krankheitsaktivität anhand der klinischen Schübe ohne Berücksichtigung der bildgebenden Befunde (Läsionslastzunahme, Gadolinium-aufnehmende Läsionen) eingeschätzt. Der Einfluss paraklinischer Erkrankungsaktivität wurde entsprechend nicht kontrolliert.

Eine mögliche Stichprobenverzerrung resultiert daraus, dass die analysierten Daten ausschließlich von MS-Fällen stammten, die sich einer Lumbalpunktion auf der Basis einer klinischen Indikationsstellung unterzogen hatten und die zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion keine immuntherapeutische Behandlung erhielten.

Die beobachtete Altersabhängigkeit der untersuchten Biomarker könnte auf den ersten Blick als ein weiterer möglicher Kritikpunkt an der Studie erachtet werden. Zur Minimierung eines altersbedingten Verzerrungseffektes wurden alterskorrigierte Liquor-Werte verwendet. Die Altersadjustierung für die einzelnen Biomarker erfolgte mittels an der Kontrollgruppe validierter Werte und bedeutet somit eine Stärke der Studie.

Als Stärken der vorliegenden Studie sind außerdem die im Vergleich zu früheren Untersuchungen große Untersuchungskohorte und der Vergleich mit einer demographisch ähnlichen NIND-Kontrollgruppe anzuführen. Potentiell konfundierende Faktoren wie aktive Schubbehandlungen, Immuntherapien, eine medikamentöse Beeinflussung des RAAS oder Infekte wurden ausgeschlossen. Positiv hervorzuheben ist außerdem die Berücksichtigung der Altersabhängigkeit der untersuchten Biomarker und die entsprechend angepasste Interpretation der Ergebnisse.

Analytische Störfaktoren (z. B. unterschiedliche Lagerung bzw. Behandlung der Liquorproben, Unterschiede bei der Untersuchung der Biomarker) waren durch den Umstand

reduziert, dass sämtliche Untersuchungen vom selben qualifizierten Universitätslabor mit einheitlicher Methodik durchgeführt worden waren.

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend zeigten sich erhöhte Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin und Laktat bei schubförmiger MS, nicht aber bei chronischen Verläufen. Liquor-ACE war nur bei Fällen mit schubförmigen Verläufen gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt. Lediglich Liquor-Laktat korrelierte mit dem Progressionsindex. Auch wenn die untersuchten Analyten alleine als Biomarker zur Beurteilung der Verlaufsform, Krankheitsaktivität und -dauer nicht ausreichen, stützen die gefundenen Unterschiede zwischen schubförmigen und chronisch progredienten Verläufen die Hypothese unterschiedlicher vorherrschender Pathomechanismen, was im Einklang mit der Lehrmeinung ist. Wertvoll ist zudem der Nachweis des altersabhängigen Anstiegs von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor bei MS- und NIND-Fällen. Bei zukünftigen Untersuchungen dieser Analyten ist entsprechend eine Alterskorrektur zu berücksichtigen.

5 Zusammenfassung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) könnten Liquor-Biomarker über die Diagnosesicherung, Einschätzung der Krankheitsaktivität und Beurteilung des Therapieansprechens eine individualisierte Behandlung der PatientInnen ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der im Rahmen der Routinediagnostik verfügbaren, aber unzureichend charakterisierten Analyten Beta-2-Mikroglobulin (β 2-Mikroglobulin), Laktat und Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) als Biomarker untersucht. Dazu wurden 6.310 an der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg gewonnene Liquorproben analysiert. Näher analysiert wurden 276 Fälle mit nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen (NIND; Kontrollgruppe) und 438 nicht immuntherapeutisch behandelte MS-Fälle (Untersuchungsgruppe). Bei den MS-Fällen wurde die Verlaufsform und Krankheitsaktivität (klinische Schübe, Progressionsindex) dokumentiert. Es zeigte sich eine deutliche Altersabhängigkeit der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE in der MS- und Kontrollgruppe, was für die sich anschließenden weiteren Vergleichsuntersuchungen eine Korrektur erforderte und zumindest teilweise die widersprüchliche Datenlage bisheriger Studien erklären könnte. MS-Fälle zeigten im Liquor im Vergleich zu Kontrollen erhöhte β 2-Mikroglobulin- und Laktat- sowie erniedrigte ACE-Spiegel. In beiden Gruppen korrelierten die β 2-Mikroglobulin- und ACE-Spiegel positiv miteinander. Bei der getrennten Analyse der MS-Verlaufsformen zeigten Fälle mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und schubförmig remittierender MS (RRMS) erhöhte β 2-Mikroglobulin-Spiegel, Fälle mit sekundär bzw. primär progredienter MS (SPMS bzw. PPMS) dagegen nicht. Die Laktat-Spiegel waren lediglich bei CIS-Fällen erhöht. Fälle mit schubförmigen Verläufen zeigten reduzierte ACE-Spiegel. Die Krankheitsaktivität wurde durch die Parameter nicht zuverlässig abgebildet. Die Laktat-Spiegel waren tendenziell bei einem Schub erhöht, das Ergebnis war nach Korrektur aber nicht mehr signifikant. Die Laktat-Spiegel korrelierten zudem positiv mit dem Progressionsindex. Die vorliegenden Befunde belegen, dass die untersuchten Analyten alleine nicht in der Lage sind, die Verlaufsform, Krankheitsaktivität und -dauer zu beurteilen. Die deutlichen Unterschiede zwischen schubförmigen und chronisch progredienten Verläufen unterstützen jedoch die Hypothese unterschiedlicher zugrundeliegender Pathomechanismen und könnten als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol* 2018; 31: 752–759. doi:10.1097/WCO.0000000000000622
- [2] Mattle H, Mumenthaler M, Hrsg. *Neurologie*. Stuttgart: Georg Thieme; 2013
- [3] Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol* 2019; 26: 27–40. doi:10.1111/ene.13819
- [4] Martin R, Sospedra M, Rosito M, et al. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur J Immunol* 2016; 46: 2078–2090. doi:10.1002/eji.201646485
- [5] Daltrozzo T, Hapfelmeier A, Donnachie E, et al. A Systematic Assessment of Prevalence, Incidence and Regional Distribution of Multiple Sclerosis in Bavaria From 2006 to 2015. *Front Neurol* 2018; 9: 871. doi:10.3389/fneur.2018.00871
- [6] Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 2019; 18: 269–285. doi:10.1016/S1474-4422(18)30443-5
- [7] Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J. Epidemiologie der Multiplen Sklerose - eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. Im Internet: https://www.versorgungsatlas.de/fileadmin/ziva_docs/86/VA-86-Multiple%20Sklerose-Bericht-V12_1.pdf; Stand: 15.02.2021
- [8] Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, et al. Multiple sclerosis. *Lancet* 2018; 391: 1622–1636. doi:10.1016/S0140-6736(18)30481-1
- [9] Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017; 13: 25–36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
- [10] Canto E, Oksenberg JR. Multiple sclerosis genetics. *Mult Scler* 2018; 24: 75–79. doi:10.1177/1352458517737371
- [11] Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet* 2017; 33: 960–970. doi:10.1016/j.tig.2017.09.004
- [12] Kadowaki A, Quintana FJ. The Gut-CNS Axis in Multiple Sclerosis. *Trends Neurosci* 2020; 43: 622–634. doi:10.1016/j.tins.2020.06.002

- [13] Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009; 139: 485–498. doi:10.1016/j.cell.2009.09.033
- [14] Miyake S, Kim S, Suda W, et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS ONE* 2015; 10: e0137429. doi:10.1371/journal.pone.0137429
- [15] Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, et al. Transcriptional profile and Epstein-Barr virus infection status of laser-cut immune infiltrates from the brain of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 18. doi:10.1186/s12974-017-1049-5
- [16] Styles CT, Bazot Q, Parker GA, et al. EBV epigenetically suppresses the B cell-to-plasma cell differentiation pathway while establishing long-term latency. *PLoS Biol* 2017; 15: e2001992. doi:10.1371/journal.pbio.2001992
- [17] Healy BC, Ali EN, Guttman CRG, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 858–864. doi:10.1001/archneurol.2009.122
- [18] O'Gorman C, Bukhari W, Todd A, et al. Smoking increases the risk of multiple sclerosis in Queensland, Australia. *J Clin Neurosci* 2014; 21: 1730–1733. doi:10.1016/j.jocn.2014.01.009
- [19] van der Vuurst de Vries RM, Mescheriakova JY, Runia TF, et al. Smoking at time of CIS increases the risk of clinically definite multiple sclerosis. *J Neurol* 2018; 265: 1010–1015. doi:10.1007/s00415-018-8780-4
- [20] Wang Z, Xie J, Wu C, et al. Correlation Between Smoking and Passive Smoking with Multiple Sclerosis and the Underlying Molecular Mechanisms. *Med Sci Monit* 2019; 25: 893–902. doi:10.12659/MSM.912863
- [21] Guerrero-García JdJ, Carrera-Quintanar L, López-Roa RI, et al. Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 4036232. doi:10.1155/2016/4036232
- [22] Rodney C, Rodney S, Millis RM. Vitamin D and Demyelinating Diseases: Neuromyelitis Optica (NMO) and Multiple Sclerosis (MS). *Autoimmune Dis* 2020; 2020: 8718736. doi:10.1155/2020/8718736

- [23] Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurol Clin* 2018; 36: 1–11. doi:10.1016/j.ncl.2017.08.002
- [24] Meltzer EI, Costello FE, Frohman EM, et al. New Ways of "Seeing" the Mechanistic Heterogeneity of Multiple Sclerosis Plaque Pathogenesis. *J Neuroophthalmol* 2018; 38: 91–100. doi:10.1097/WNO.0000000000000633
- [25] Katsara M, Apostolopoulos V. Editorial: Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Therapeutics. *Med Chem* 2018; 14: 104–105. doi:10.2174/157340641402180206092504
- [26] Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 225–238. doi:10.1038/nrneurol.2014.37
- [27] Meuth S, Bopp T. Grundlagen der Multiplen Sklerose und Einsicht in den Ablauf zweier Entzündungsprozesse. Im Internet: https://www.cme-point.de/Fortbildungen/2504_GrundlagenUndEntz%C3%BCndungsprozesse_CME_WEB.pdf; Stand: 14.03.2021
- [28] Abdelhak A, Hottenrott T, Mayer C, et al. CSF profile in primary progressive multiple sclerosis: Re-exploring the basics. *PLoS ONE* 2017; 12: e0182647. doi:10.1371/journal.pone.0182647
- [29] Kantarci OH. Phases and Phenotypes of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis)* 2019; 25: 636–654. doi:10.1212/CON.0000000000000737
- [30] Da Gago Graça C, van Baarsen LGM, Mebius RE. Tertiary Lymphoid Structures: Diversity in Their Development, Composition, and Role. *J Immunol* 2021; 206: 273–281. doi:10.4049/jimmunol.2000873
- [31] Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, et al. Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis Diagnosis: An Update. *Medicina (Kaunas)* 2019; 55. doi:10.3390/medicina55060245
- [32] Klingelhöfer J, Berthele A, Hrsg. *Klinikleitfaden Neurologie*. Klinikleitfaden. 7. Aufl. München: Elsevier; 2021
- [33] Galea I, Ward-Abel N, Heesen C. Relapse in multiple sclerosis. *BMJ* 2015; 350: h1765. doi:10.1136/bmj.h1765

- [34] Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J Autoimmun* 2014; 48-49: 134–142. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.022
- [35] Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* 2014; 72 Suppl 1: 1–5. doi:10.1159/000367614
- [36] Ontaneda D, Thompson AJ, Fox RJ, et al. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet* 2017; 389: 1357–1366. doi:10.1016/S0140-6736(16)31320-4
- [37] Novotna M, Paz Soldán MM, Abou Zeid N, et al. Poor early relapse recovery affects onset of progressive disease course in multiple sclerosis. *Neurology* 2015; 85: 722–729. doi:10.1212/WNL.0000000000001856
- [38] Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. StatPearls. Multiple Sclerosis. Treasure Island (FL); 2021
- [39] Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet* 2017; 389: 1336–1346. doi:10.1016/S0140-6736(16)30959-X
- [40] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444
- [41] Roxburgh R, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; 64: 1144–1151. doi:10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8
- [42] Pachner AR, Steiner I. The multiple sclerosis severity score (MSSS) predicts disease severity over time. *J Neurol Sci* 2009; 278: 66–70. doi:10.1016/j.jns.2008.11.020
- [43] Manouchehrinia A, Westerlind H, Kingwell E, et al. Age Related Multiple Sclerosis Severity Score: Disability ranked by age. *Mult Scler* 2017; 23: 1938–1946. doi:10.1177/1352458517690618
- [44] Haarmann A, Hähnel L, Schuhmann MK, et al. Age-adjusted CSF β 2-microglobulin and lactate are increased and ACE is decreased in patients with multiple sclerosis, but only lactate correlates with clinical disease duration and severity. *J Neuroimmunol* 2018; 323: 19–27. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.07.001

- [45] Vidal-Jordana A, Rovira A, Arrambide G, et al. Optic Nerve Topography in Multiple Sclerosis Diagnosis: The Utility of Visual Evoked Potentials. *Neurology* 2021; 96: e482-e490. doi:10.1212/WNL.00000000000011339
- [46] Ruprecht K, Tumani H. Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose. *Nervenarzt* 2016; 87: 1282–1287. doi:10.1007/s00115-016-0220-z
- [47] Halbgebauer S, Huss A, Buttmann M, et al. Detection of intrathecal immunoglobulin G synthesis by capillary isoelectric focusing immunoassay in oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol* 2016; 263: 954–960. doi:10.1007/s00415-016-8094-3
- [48] Huss AM, Halbgebauer S, Öckl P, et al. Importance of cerebrospinal fluid analysis in the era of McDonald 2010 criteria: a German-Austrian retrospective multicenter study in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol* 2016; 263: 2499–2504. doi:10.1007/s00415-016-8302-1
- [49] Petereit H-F, Sindern E, Wick M. Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie. Mit 27 Tabellen. Springer E-book Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007
- [50] Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. *Mult Scler* 2016; 22: 502–510. doi:10.1177/1352458515594044
- [51] Brecht I, Weissbrich B, Braun J, et al. Intrathecal, polyspecific antiviral immune response in oligoclonal band negative multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2012; 7: e40431. doi:10.1371/journal.pone.0040431
- [52] Jarius S, Eichhorn P, Franciotta D, et al. The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J Neurol* 2017; 264: 453–466. doi:10.1007/s00415-016-8360-4
- [53] Hottenrott T, Schorb E, Fritsch K, et al. The MRZ reaction and a quantitative intrathecal IgG synthesis may be helpful to differentiate between primary central nervous system lymphoma and multiple sclerosis. *J Neurol* 2018; 265: 1106–1114. doi:10.1007/s00415-018-8779-x

- [54] Abreu CM, Soares-Dos-Reis R, Melo PN, et al. Emerging Biosensing Technologies for Neuroinflammatory and Neurodegenerative Disease Diagnostics. *Front Mol Neurosci* 2018; 11: 164. doi:10.3389/fnmol.2018.00164
- [55] Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2014; 13: 113–126. doi:10.1016/S1474-4422(13)70233-3
- [56] Harris VK, Tuddenham JF, Sadiq SA. Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 2017; 7: 19–29. doi:10.2147/DNND.S98936
- [57] Zetterberg H. Fluid biomarkers for microglial activation and axonal injury in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2017; 136 Suppl 201: 15–17. doi:10.1111/ane.12845
- [58] Abdelhak A, Huss A, Kassubek J, et al. Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Sci Rep* 2018; 8: 14798. doi:10.1038/s41598-018-33158-8
- [59] Senel M, Tumani H, Lauda F, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2014; 9: e88680. doi:10.1371/journal.pone.0088680
- [60] Vecchio D, Bellomo G, Serino R, et al. Intrathecal kappa free light chains as markers for multiple sclerosis. *Sci Rep* 2020; 10: 20329. doi:10.1038/s41598-020-77029-7
- [61] Öhrfelt A, Axelsson M, Malmeström C, et al. Soluble TREM-2 in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis treated with natalizumab or mitoxantrone. *Mult Scler* 2016; 22: 1587–1595. doi:10.1177/1352458515624558
- [62] Cantó E, Tintoré M, Villar LM, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain* 2015; 138: 918–931. doi:10.1093/brain/awv017
- [63] Oldoni E, Smets I, Mallants K, et al. CHIT1 at Diagnosis Reflects Long-Term Multiple Sclerosis Disease Activity. *Ann Neurol* 2020; 87: 633–645. doi:10.1002/ana.25691
- [64] Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Mult Scler* 2013; 19: 436–442. doi:10.1177/1352458512458010

- [65] Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology* 2019; 92: e1007-e1015. doi:10.1212/WNL.0000000000007032
- [66] Dalla Costa G, Martinelli V, Sangalli F, et al. Prognostic value of serum neurofilaments in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2019; 92: e733-e741. doi:10.1212/WNL.0000000000006902
- [67] Matute-Blanch C, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, et al. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain* 2018; 141: 1085–1093. doi:10.1093/brain/awy021
- [68] Matejčíková Z, Mareš J, Přikrylová Vranová H, et al. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neural Transm* 2015; 122: 273–277. doi:10.1007/s00702-014-1244-9
- [69] Albanese M, Zagaglia S, Landi D, et al. Cerebrospinal fluid lactate is associated with multiple sclerosis disease progression. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 1–7. doi:10.1186/s12974-016-0502-1
- [70] Stegbauer J, Lee D-H, Seubert S, et al. Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14942–14947. doi:10.1073/pnas.0903602106
- [71] Svatoňová J, Bořecká K, Adam P, et al. Beta2-microglobulin as a diagnostic marker in cerebrospinal fluid: a follow-up study. *Dis Markers* 2014; 2014: 495402. doi:10.1155/2014/495402
- [72] Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, Roy G, et al. Increased beta 2-microglobulin in CSF of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50: 1238. doi:10.1136/jnnp.50.9.1238
- [73] Bjerrum OW, Bach FW, Zeeberg I. Increased level of cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin is related to neurologic impairment in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1988; 78: 72–75. doi:10.1111/j.1600-0404.1988.tb03622.x
- [74] Carrieri PB, Indaco A, Maiorino A, et al. Cerebrospinal fluid beta-2-microglobulin in multiple sclerosis and AIDS dementia complex. *Neurol Res* 1992; 14: 282–283. doi:10.1080/01616412.1992.11740070
- [75] Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 2018; 27: 757–785. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.008

- [76] Aasly J, Gårseth M, Sonnewald U, et al. Cerebrospinal fluid lactate and glutamine are reduced in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1997; 95: 9–12. doi:10.1111/j.1600-0404.1997.tb00060.x
- [77] Simone IL, Federico F, Trojano M, et al. High resolution proton MR spectroscopy of cerebrospinal fluid in MS patients. Comparison with biochemical changes in demyelinating plaques. *J Neurol Sci* 1996; 144: 182–190. doi:10.1016/S0022-510X(96)00224-9
- [78] Regenold WT, Phatak P, Makley MJ, et al. Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. *J Neurol Sci* 2008; 275: 106–112. doi:10.1016/j.jns.2008.07.032
- [79] Kawajiri M, Mogi M, Higaki N, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 262–265. doi:10.1177/1352458508097923
- [80] Živković M, Kolaković A, Stojković L, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms as risk factors for multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2016; 363: 29–32. doi:10.1016/j.jns.2016.02.026
- [81] Platten M, Youssef S, Hur EM, et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14948–14953. doi:10.1073/pnas.0903958106
- [82] Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, et al. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci* 2007; 27: 9032–9042. doi:10.1523/JNEUROSCI.2088-07.2007
- [83] Kawajiri M, Mogi M, Osoegawa M, et al. Reduction of angiotensin II in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: 557–560. doi:10.1177/1352458507085760
- [84] Constantinescu CS, Goodman DB, Grossman RI, et al. Serum angiotensin-converting enzyme in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1997; 54: 1012–1015. doi:10.1001/archneur.1997.00550200068012

- [85] Klotz L, Gold R, Hemmer B, et al. Diagnostik der Multiplen Sklerose 2010 Revision der McDonald-Kriterien. *Nervenarzt* 2011; 82: 1302–1309. doi:10.1007/s00115-011-3283-x
- [86] Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292–302. doi:10.1002/ana.22366
- [87] Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 647–656. doi:10.1038/nrneurol.2012.168
- [88] Evers S, Frese A, Marziniak M. Differenzialdiagnose von Kopfschmerzen. *Dtsch Arztebl* 2006; 103.45: 3040–3048
- [89] Markey KA, Mollan SP, Jensen RH, et al. Understanding idiopathic intracranial hypertension: mechanisms, management, and future directions. *Lancet* 2016; 15: 78–91. doi:10.1016/S1474-4422(15)00298-7
- [90] Wakerley BR, Tan MH, Ting EY. Idiopathic intracranial hypertension. *Cephalalgia* 2015; 35: 248–261. doi:10.1177/0333102414534329
- [91] Kiefer M, Unterberg A. The differential diagnosis and treatment of normal-pressure hydrocephalus. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109: 15-25; quiz 26. doi:10.3238/arztebl.2012.0015
- [92] Ghosh S, Lipka C. Diagnosis and prognosis in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2014; 29: 583–589. doi:10.1177/1533317514523485
- [93] Jaraj D, Rabiei K, Marlow T, et al. Prevalence of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurology* 2014; 82: 1449–1454. doi:10.1212/WNL.0000000000000342
- [94] International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33: 629–808. doi:10.1177/0333102413485658
- [95] Westerlind H, Manouchehrinia A. *ms.sev: R-Package for Calculation of ARMSS, Local MSSS and Global MSSS*; 2016
- [96] R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013

- [97] Du Prel J-B, Röhrig B, Hommel G, et al. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 343–348. doi:10.3238/arztebl.2010.0343
- [98] Schumacher M, Schulgen/Kristiansen G. *Methodik klinischer Studien. Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung. Statistik und ihre Anwendungen.* 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. doi:10.1007/978-3-540-85136-3
- [99] Kepplinger B, Baran H, Kainz A, et al. Age-related increase of kynurenic acid in human cerebrospinal fluid - IgG and beta2-microglobulin changes. *Neurosignals* 2005; 14: 126–135. doi:10.1159/000086295
- [100] Löfberg H, Grubb AO, Sveger T, et al. The cerebrospinal fluid and plasma concentrations of gamma-trace and beta2-microglobulin at various ages and in neurological disorders. *J Neurol* 1980; 223: 159–170. doi:10.1007/BF00313180
- [101] Us O, Lolli F, Baig S, et al. Intrathecal synthesis of beta-2-microglobulin in multiple sclerosis and aseptic meningo-encephalitis. *Acta Neurol Scand* 1989; 80: 598–602. doi:10.1111/j.1600-0404.1989.tb03934.x
- [102] Leen WG, Willemsen MA, Wevers RA, et al. Cerebrospinal fluid glucose and lactate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *Schizophr Res* 2012; 7: e42745. doi:10.1371/journal.pone.0042745
- [103] Wahlbeck K, Ahokas A, Nikkilä H, et al. Cerebrospinal fluid angiotensin-converting enzyme (ACE) correlates with length of illness in schizophrenia. *Schizophr Res* 2000; 41: 335–340. doi:10.1016/S0920-9964(99)00059-6
- [104] Zubenko GS, Volicer L, Direnfeld LK, et al. Cerebrospinal fluid levels of angiotensin-converting enzyme in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain Res* 1985; 328: 215–221. doi:10.1016/0006-8993(85)91032-7
- [105] Ott M, Demisch L, Engelhardt W, et al. Interleukin-2, soluble interleukin-2-receptor, neopterin, L-tryptophan and beta 2-microglobulin levels in CSF and serum of patients with relapsing-remitting or chronic-progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 1993; 241: 108–114. doi:10.1007/BF00869773

- [106] Pucino V, Bombardieri M, Pitzalis C, et al. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur J Immunol* 2017; 47: 14–21. doi:10.1002/eji.201646477
- [107] Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, et al. Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003; 24 Suppl 5: S301-4. doi:10.1007/s10072-003-0180-5
- [108] Pikor NB, Prat A, Bar-Or A, et al. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front Immunol* 2015; 6: 657. doi:10.3389/fimmu.2015.00657
- [109] Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 2016; 22: s159-70
- [110] Kroksveen AC, Gulbrandsen A, Vedeler C, et al. Cerebrospinal fluid proteome comparison between multiple sclerosis patients and controls. *Acta Neurol Scand Suppl* 2012: 90–96. doi:10.1111/ane.12029
- [111] Qin Z, Qin Y, Liu S. Alteration of DBP levels in CSF of patients with MS by proteomics analysis. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29: 203–210. doi:10.1007/s10571-008-9312-z
- [112] Avsar T, Korkmaz D, Tütüncü M, et al. Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein biomarkers in different forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012; 18: 1081–1091. doi:10.1177/1352458511433303
- [113] Jarius S, Ruprecht K, Stellmann JP, et al. MOG-IgG in primary and secondary chronic progressive multiple sclerosis: a multicenter study of 200 patients and review of the literature. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 88. doi:10.1186/s12974-018-1108-6
- [114] Salama S, Khan M, Pardo S, et al. MOG antibody-associated encephalomyelitis/encephalitis. *Mult Scler* 2019; 25: 1427–1433. doi:10.1177/1352458519837705
- [115] Aygnac X, Le Bars E, Duflos C, et al. Serum GFAP in multiple sclerosis: correlation with disease type and MRI markers of disease severity. *Sci Rep* 2020; 10: 10923. doi:10.1038/s41598-020-67934-2

- [116] Bagnato F, Zivadinov R, Cecchinelli D, et al. beta2-microglobulin serum level is not a marker of disease activity in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2004; 11: 455–460. doi:10.1111/j.1468-1331.2004.00808.x
- [117] Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011; 305: 1–10. doi:10.1016/j.jns.2011.03.026
- [118] Dingermann T, Zündorf I. Pharmakologie von Interferon beta-1b. In: Berger T, Linnebank M, Wiendl H, Hrsg. *Betaferon®. 25 Jahre Multiple Sklerose Forschung*. 2013. Aufl. Vienna: Springer Vienna; 2013: 28–38
- [119] Batista Muñoz A, Hadley S, Iriondo Sanz M, et al. Role of beta-2-microglobulin as a biomarker in very preterm and extremely preterm infants with CNS inflammation. *PLoS ONE* 2019; 14: e0216498. doi:10.1371/journal.pone.0216498
- [120] Wright BLC, Lai JTF, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol* 2012; 259: 1530–1545. doi:10.1007/s00415-012-6413-x
- [121] Amorini AM, Nociti V, Petzold A, et al. Serum lactate as a novel potential biomarker in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 1137–1143. doi:10.1016/j.bbadis.2014.04.005

I Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
AT1-Rezeptor	<i>Angiotensin-II-Rezeptor Typ I</i>
BHS	<i>Blut-Hirn-Schranke</i>
CD.....	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHI3L1	<i>Chitinase3-like-1-Protein</i>
CIS	<i>Clinically Isolated Syndrome</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA.....	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FF.....	<i>Forschungsfrage</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
ICHD	<i>International Classification of Headache Disorders</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
iNPH.....	<i>idiopathischer Normaldruckhydrozephalus</i>
KFLC	<i>Kappa Free Light Chains</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOG.....	<i>Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
MRZH-Reaktion.....	<i>Masern-, Röteln-, Varizella-Zoster- und</i> <i>Herpes-simplex-Viren-Reaktion</i>
MS	<i>Multiple Sklerose</i>
MSSS.....	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i>
NfL	<i>Neurofilament Light Chain</i>
NIND	<i>Non Inflammatory Neurological Disorders</i>
OKB.....	<i>oligoklonale Banden</i>
PPMS	<i>primär progrediente MS</i>

p-Wert.....*Probability Value*
RAAS *Renin-Angiotensin-Aldosteron-System*
RRMS*schubförmig remittierende MS*
*r*_s*Korrelationskoeffizient nach Spearman*
SD *Standard Deviation*
SPMS*sekundär progrediente MS*
sTREM2 *Secreted Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*
Th-Zellen *T-Helferzellen*
ZNS..... *Zentrales Nervensystem*
β2-Mikroglobulin *Beta-2-Mikroglobulin*

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Forschungsfragen der Dissertation	17
Abbildung 2: Zusammenfassung des Gruppenselektionsprozesses	27
Abbildung 3: Altersabhängigkeit der Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei Fällen der NIND-Gruppe	32
Abbildung 4: Liquorspiegel von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei Fällen mit MS und NIND mit und ohne Alterskorrektur	34
Abbildung 5: Korrelation der alterskorrigierten β 2-Mikroglobulin-, Laktat- und ACE-Spiegel bei Fällen mit MS und NIND	36
Abbildung 6: Liquorspiegel von alterskorrigiertem β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE bei verschiedenen Verlaufsformen der MS sowie bei NIND	38
Abbildung 7: Einfluss von klinischen Schüben auf die Liquormarker β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE.....	40
Abbildung 8: Korrelation von β 2-Mikroglobulin, Laktat und ACE im Liquor mit der Dauer und dem Schweregrad der MS.....	42

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: McDonald-Kriterien (Revision 2010)	21
Tabelle 2: Demographische / klinische Merkmale der MS- und NIND-Fälle bei der Lumbalpunktion	30

IV Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Mathias Buttmann möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die vielfältige Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Ganz besonders auch dafür, dass er die Arbeit trotz seines beruflichen Wechsels nach Bad Mergentheim und dem damit verbundenen Mehraufwand weiterhin als Doktorvater betreute.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Axel Haarmann, der mir ab 2016 als Betreuer nicht nur bei sämtlichen neurologischen Fachfragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern mich auch maßgeblich und äußerst hilfreich bei der elektronischen Datenverarbeitung sowie in sämtlichen weiteren Bereichen der Umsetzung der Arbeit unterstützte.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Dr. rer. nat. Michael Schuhmann, der als Leiter des klinischen Labors der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg ebenfalls intensiv an der Datenakquise und -analyse beteiligt war.

V Lebenslauf

Gemäß Vorgabe der Promotionsordnung ist in dieser elektronischen Fassung der Dissertation kein Lebenslauf enthalten.

VI Eigene Veröffentlichung

Haarmann A, **Hähnel L**, Schuhmann MK, et al. Age-adjusted CSF β 2-microglobulin and lactate are increased and ACE is decreased in patients with multiple sclerosis, but only lactate correlates with clinical disease duration and severity. J Neuroimmunol 2018; 323: 19–27. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.07.001

Anmerkung: Nach Anfrage beim Elsevier-Verlag ist zur Verwendung und Modifikation der in dieser Dissertation verwendeten Tabelle und Abbildungen aus oben genannter Veröffentlichung keine explizite Genehmigung erforderlich.