

Aus der Neurologischen Universitätsklinik
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

**Nachweis von Virus-spezifischen (Masern, Röteln und Zoster)
oligoklonalen IgG-Banden im Liquor von Multiple Sklerose-
Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG**



INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2010

von Jakob Elias Kluge
geboren in Breisach am Rhein

Dekan: Prof. Dr. Dr. hc. mult. Hubert Erich Blum

Erstgutachter: Prof. Dr. Sebastian Rauer

Zweitgutachter: PD Dr. Jens Langosch

Jahr der Promotion: 2010

**Nachweis von Virus-spezifischen (Masern, Röteln und Zoster)
oligoklonalen IgG-Banden im Liquor von Multiple Sklerose-
Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG**

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Verlauf.....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.3 Diagnose und Behandlung.....	5
1.2 Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose.....	8
1.2.1 Intrathekale oligoklonale Immunglobulin G (IgG) – Synthese bei Patienten mit MS.....	8
1.2.2 Intrathekale Synthese von Antikörpern gegen Masern, Röteln und Varicella Zoster (MRZ-Reaktion).....	11
1.3 Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden im Liquor cerebrospinalis.....	13
1.4 Fragestellung.....	15
2 Patienten, Material und Methoden.....	17
2.1 Probandenkollektiv.....	17
2.1.1 MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG.....	18
2.1.2 Kontrollgruppen.....	18
2.2 Versuchsmaterialien.....	19
2.2.1 Antigene.....	19
2.2.2 Chemikalien.....	19
2.2.3 Gebrauchsmaterialien.....	21
2.2.4 Geräte.....	21
2.3 Versuchsdurchführung.....	21
2.3.1 Prinzip der isoelektrischen Fokussierung mit Affinitätsblot.....	21

2.3.2	Versuchsablauf.....	23
2.3.3	Spezifitätskontrollen.....	25
2.3.4	Auswertung.....	25
2.3.5	Statistische Methoden.....	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Demographische Daten.....	27
3.2	Etablierung der Methode.....	29
3.3	Nachweis der Spezifität der Methode.....	30
3.4	Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden.....	31
3.4.1	Positivkontrollen.....	31
3.4.2	Negativkontrollen.....	32
3.4.3	MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG.....	32
3.4.4	Verteilung des Nachweises spezifischer OKB auf die drei untersuchten viralen Antigene.....	37
3.5	Assoziation zwischen der MRZ-Reaktion und dem Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden.....	38
3.5.1	Gesamtzahl der Multiple Sklerose-Patienten.....	38
3.5.2	Positivkontrollen.....	39
3.5.2	MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG.....	40
4	Diskussion.....	43
4.1	Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden.....	43
4.1.1	Methodische Aspekte.....	43
4.1.2	Pathophysiologische Aspekte.....	44
4.1.3	Klinisch-diagnostische Aspekte.....	50
4.2	Assoziation zwischen der MRZ-Reaktion und dem Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden.....	54
4.3	Synthese und Ausblick.....	55
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis.....	58
7	Publikationen.....	70

8	Danksagung	71
9	Lebenslauf	72
10	Anhang	74

Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AI	Antikörperindex
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Aqua dest.	Aqua destillata
ASI	Antikörper-Synthese-Index
AUC	area under the curve
C	Celsius
CIS	clinically isolated syndrome
CD	Cluster of differentiation
CL	Chemilumineszenz
CMV	Cytomegalievirus
CTLA	Cytotoxic T lymphocyte antigen
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii, et aliae oder et alia
GAD	Glutamat-Decarboxylase
HLA	Human Leukocyte Antigen
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ifn	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Isoelektrischer Punkt
Kap.	Kapitel
Liq	Liquor

LP	Lumbalpunktion
M	molar
m	männlich
mA	Milliampère
MR	Magnet-Resonanz
MRI	magnetic resonance imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
MRZ	Masern, Röteln und Varicella zoster
MS	Multiple Sklerose
N	Negativkontrolle
NC	Nitrozellulose
No.	numero
OKB	Oligoklonale Banden
OND	other neurological diseases
P	Positivkontrolle
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PNS	Paraneoplastisches neurologisches Syndrom
POD	Peroxidase
PPMS	Primary progressive Multiple Sclerosis
PTC	Pseudotumor cerebri
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RRMS	Relapsing remitting Multiple Sclerosis
S.	Seite
sek.	sekundär
Ser	Serum
SPMS	Secondary progressive Multiple Sclerosis

VIII

TH	T-Helfer
TNF	tumor necrosis factor
VEP	Visuell evozierte Potentiale
w	weiblich
[w/v]	weight per volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmun-vermittelte Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie ist die häufigste Ursache für neurologische Defizite im jungen Erwachsenenalter [17].

1.1.1 Epidemiologie und Verlauf

Die Häufigkeit der Erkrankung beträgt in Deutschland 83-127/100.000 [70], so dass hierzulande Hochrechnungen zufolge ca. 122.000 Betroffene leben [38]. Die jährliche Neuerkrankungsrate liegt bei etwa 4/100.000 [70]. Mehrheitlich manifestiert sich die Erkrankung zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, dabei sind Frauen etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer [28].

Auffällig ist die geographische Verteilung der Multiplen Sklerose. So ist die Krankheit in äquatornahen Gebieten ausgesprochen selten, während die Prävalenz auf beiden Halbkugeln in Richtung der Pole zunimmt [48].

Bei bis zu 90 % der Betroffenen beginnt die Erkrankung mit einem schubförmigen Verlauf (engl.: Relapsing remitting Multiple Sclerosis, RRMS). Ein Schub ist eine innerhalb von Stunden bis Tagen subakut auftretende zentrale neurologische Symptomatik, die für mindestens 24 Stunden anhält und sich innerhalb von Tagen bis Wochen spontan zurückbildet, wobei Residuen bestehen bleiben können.

Häufige Symptome sind dabei Hautempfindungsstörungen, einseitiges Verschwommensehen, Doppelbilder, Gangunsicherheit sowie eine belastungsabhängige Schwäche der Gliedmaßen. Auch kann es bei Nackenbeugung zu Parästhesien an den Extremitäten oder am Rumpf kommen (Lhermitte-Zeichen) [64].

Weitere Symptome, die im Verlauf der Erkrankung auftreten können, sind unter anderem Lähmungserscheinungen, Gangataxie, neurogene Blasen- und Mastdarmstörungen, Fatigue sowie Dysarthrie [64].

Neben dem Krankheitsbild ist auch der klinische Verlauf der MS sehr variabel. Nach einer internationalen Übereinkunft [53] werden neben der schubförmigen Verlaufsform eine primär chronisch-progrediente Verlaufsform (engl.: Primary progressive Multiple Sclerosis, PPMS), von der initial etwa 10 % der Patienten

betroffen sind [90], sowie eine sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform (engl.: Secondary progressive Multiple Sclerosis, SPMS) unterschieden. Nach zehn Jahren zeigen etwa 50 % der Patienten mit einer initial schubförmigen Symptomatik eine SPMS [100]. Bei beiden chronischen Verlaufsformen erleben die Patienten eine kontinuierliche Zunahme ihrer Beschwerden.

Bei einem erstmaligen demyelinisierenden Ereignis mit Präsentation einer hinsichtlich MS verdächtigen Symptomatik spricht man von einem klinisch isolierten Syndrom (engl.: clinically isolated syndrome, CIS).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bislang ungeklärt. Heute wird angenommen, dass sich die MS in genetisch empfänglichen Individuen nach einem Kontakt zu einem oder mehreren Umweltfaktoren, die noch nicht identifiziert sind, manifestieren kann [18, 23].

Die genetische Komponente der Krankheitsentstehung konnte dadurch belegt werden, dass Blutsverwandte von MS-Patienten ein gegenüber der Normalbevölkerung erhöhtes Risiko haben, selbst an MS zu erkranken. So beträgt das Lebenszeitrisko in der Normalbevölkerung 0,2 %, wohingegen das von erstgradig Verwandten Betroffener 15 bis 25-fach und das für den eineiigen weiblichen Zwilling einer MS-Patientin 170-fach erhöht ist [23]. Auch weiter entfernte Verwandte zeigen ein erhöhtes Risiko [77]. Eine weitere Untermauerung des genetischen Einflusses und gleichzeitig dessen Abgrenzung zu Umwelteinflüssen durch ein ähnliches Lebensumfeld innerhalb der Familie konnte durch Zwillingsstudien [102], Adoptionsstudien [24] und Studien an Halbgeschwistern [78] erbracht werden.

Ein weiterer Punkt ist die unterschiedliche Empfänglichkeit von Angehörigen verschiedener ethnischer Abstammung für MS. So sind zum Beispiel dunkelhäutige Menschen seltener betroffen als Hellhäutige und einige ethnische Gruppierungen (z.B. Maori, Eskimos) scheinen quasi resistent gegen die Erkrankung zu sein [48].

Genomstudien führten zu der Ansicht, dass es bei der MS wohl keinen prädisponierenden Hauptgenlocus gibt, jedoch konnten mehrere Gene (z.B. Human Leukocyte Antigen [HLA] Klasse I und II, T-Zell Rezeptor β , Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 [CTLA4]) identifiziert werden, die mit MS assoziiert zu sein scheinen [23].

Dennoch muss konstatiert werden, dass selbst eine eineiige Schwester einer MS-Patientin nur ein Risiko von 34 % besitzt, selbst an Multipler Sklerose zu erkranken [23]. Somit muss neben der genetischen Komponente mindestens ein weiterer Faktor Einfluss auf die Krankheitsentstehung nehmen.

Hinweise für die Hypothese, dass Umweltfaktoren mitursächlich für die Krankheitsentstehung sind, ergeben sich zum einen aus der auffälligen geographischen Verteilung der Prävalenz (siehe Kap. 1.1.1) und zum anderen aus Migrationsstudien. Diese zeigen auf, dass offenbar die stattgehabte oder fehlende Exposition gegenüber einem Umweltfaktor im Kindesalter bzw. bis zum 15. Lebensjahr maßgebend für das Risiko ist, mit dem es später zu einer Krankheitsentwicklung kommt, unabhängig vom späteren Wohnort [48].

Pathophysiologisch betrachtet stellt die Multiple Sklerose eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) mit einer degenerativen Komponente dar.

Ihr Kennzeichen sind die multifokalen sklerotischen Plaques, die das Endstadium eines Prozesses verkörpern, der Inflammation, Demyelinisierung und Remyelinisierung, Oligodendrozytenverlust, Astrozytose sowie neuronale und axonale Degeneration beinhaltet [18]. Prädilektionsstellen sind die Sehnerven, der Hirnstamm, das Rückenmark und die periventrikuläre weiße Substanz.

Aus dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wurde die Folgerung gezogen, dass es sich bei der MS hauptsächlich um eine durch autoreaktive T-Helfer (TH) 1-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion mit einer Dominanz von Makrophagen handelt, bei der die Destruktion der Myelinscheiden im Vordergrund steht [36]. In jüngerer Zeit wurde jedoch aufgedeckt, dass die Immunpathogenese der MS komplizierter ist und wesentlich mehr Faktoren, darunter auch Gewebefaktoren des ZNS, pathogenetisch beteiligt sind. Hierzu zählen Cluster of differentiation (CD) 8- und CD4-positive T-Lymphozyten, B- und Plasma-Zellen, Antikörper, Mastzellen, das Komplementsystem, eine starke Makrophagen-/Mikroglia-Aktivierung, eine Reihe von Zytokinen wie Interleukin (IL) 1, IL 2, IL 12, IL 23, Interferon (Ifn) γ und Tumor Nekrose Faktor (TNF) α , Sauerstoff- und Stickstoff-Radikale sowie aktivierte Endothelzellen [67, 86].

Bei der Inflammation werden zunächst potentiell autoreaktive T-Zellen in der Peripherie aktiviert. Die Ursache hierfür ist unklar, jedoch geschieht dies vermutlich in einem proinflammatorischen Milieu. Diese wandern dann durch die Blut-Hirn-Schranke ins zentrale Nervensystem ein, wo diejenigen T-Zellen, die mit ihrem T-Zellrezeptor ein präsentiertes Antigen erkennen, eine Entzündungsreaktion auslösen. Durch proinflammatorische Zytokine (Ifn γ , IL 23, TNF α , Leukotriene) und Chemokine werden anschließend ortsständige Zellen wie Mikroglia und Astrozyten aktiviert, gleichzeitig werden andere Immunzellen, insbesondere Makrophagen, angelockt. Die entzündliche Läsion ist charakterisiert durch eine dysfunktionale Blut-Hirn-Schranke und durch ein Gewebsödem. Schon in dieser frühen inflammatorischen Phase kommt es zur Schädigung von Myelinscheiden, Oligodendrozyten und Axonen [8, 21]. Dieser Vorgang dauert einige Tage bis zwei Wochen [61, 86].

Die pathologische Morphologie der MS-Plaques ist heterogen. Dabei wird postuliert, dass die Plaques intraindividuell ein identisches Bild zeigen, während sich interindividuell, auf dem Boden einer ähnlichen inflammatorischen Reaktion mit Überwiegen von T-Lymphozyten und Makrophagen, vier verschiedene Muster der Demyelinisierung unterscheiden lassen [55]:

- I. Makrophagen-assoziierte Entmarkung
 - II. Makrophagen-assoziierte Entmarkung mit Nachweis von Immunglobulinen und aktivierten Komplementkomponenten (Antikörper-medierte Entmarkung)
 - III. Entmarkung mit distaler Oligodendroglieopathie und Oligodendrozytenapoptose
 - IV. Primäre Oligodendrozytendegeneration in der periplaque-weißen Substanz
- (nach [11])

Daraus kann auf unterschiedliche pathogenetische Mechanismen rückgeschlossen werden, ebenso bieten die verschiedenen Muster der Demyelinisierung eine mögliche Erklärung für die sehr unterschiedlich ausgeprägte Ansprechrate auf die heute gebräuchlichen Therapieverfahren. In einer neueren Publikation wurde allerdings in einem Kollektiv von Patienten mit bekannter MS nur ein uniformes Muster der Demyelinisierung gefunden [9].

Die Remission der Beschwerden beim schubförmigen Verlauf wird erklärt durch die Auflösung der Inflammation mit Verschwinden des Ödems, der Remyelinisierung

und/oder der Reorganisation von Natrium-Kanälen entlang der demyelinisierten Axone [67]. Die Remyelinisierung ist wohl von der Verfügbarkeit von Oligodendrocyten oder ihren Vorläuferzellen abhängig, welche bei verschiedenen Patienten unterschiedlich gegeben zu sein scheint [54], allerdings könnten auch axonale Faktoren eine Rolle spielen [12].

Eine Reihe von Publikationen sehen mittlerweile in der axonalen Schädigung den Schlüsselfaktor für die fortschreitende Behinderung im Krankheitsverlauf [7, 14, 18, 20, 32, 93, 94].

Insbesondere bei der chronisch-progredienten MS werden auch kortikale Läsionen und Schäden in der normal erscheinenden weißen Substanz verdächtigt, zur Krankheitsprogression beizutragen [67].

1.1.3 Diagnose und Behandlung

Die Diagnose stützt sich auf die Anamnese und die klinische Präsentation sowie auf paraklinische Untersuchungen wie MRI (magnetic resonance imaging), evozierte Potentiale und Befunde im Liquor cerebrospinalis.

Entscheidend für die Diagnosestellung ist dabei die örtliche und zeitliche Dissemination der Befunde. Andere Ursachen für die Symptomatik müssen ausgeschlossen werden.

Die 2001 von McDonald et al. [58] publizierten Diagnosekriterien wurden 2005 überarbeitet [68]. Demnach kann die Diagnose einer Multiplen Sklerose erst nach einem zweiten klinisch gesicherten Schubereignis oder bereits beim Nachweis einer neu aufgetretenen T2-Läsion in einer kernspintomographischen Verlaufskontrolle gestellt werden.

Tabelle 1.1 auf der folgenden Seite zeigt die Diagnosekriterien im Überblick.

<i>Klinische Symptomatik</i>	<i>Zusätzliche Parameter für die MS-Diagnose</i>
2 oder mehr Schübe, objektivierbare klinische Evidenz von 2 oder mehr Läsionen	Keine
2 oder mehr Schübe, objektivierbare klinische Evidenz einer Läsion	Disseminierung im Raum, gegeben durch: - MRT oder - 2 oder mehr in der MRT entdeckte MS-bedingte Läsionen plus positiver Liquorbefund oder - Abwarten eines weiteren klinischen Schubs, der durch eine andere Läsion verursacht ist
Ein Schub, objektivierbare klinische Evidenz von 2 oder mehr Läsionen	Disseminierung in der Zeit, Nachweis durch: - MRT oder - Zweiter klinischer Schub
Ein Schub, objektivierbare klinische Evidenz einer Läsion (CIS)	Disseminierung im Raum, Nachweis durch: - MRT oder - 2 oder mehr in der MRT entdeckte MS-bedingte Läsionen plus positiver Liquorbefund und Disseminierung in der Zeit, Nachweis durch: - MRT oder - Zweiter klinischer Schub
Schleichende neurologische Progression (PPMS)	Kontinuierliche klinische Progression (retrospektiv oder prospektiv bestimmt) über ein Jahr und 2 der folgenden 3 Punkte treffen zu: - positive MRT des Gehirns (9 T2-Läsionen oder 4 oder mehr T2-Läsionen mit pathologischen visuell evozierten Potentialen (VEP)) - positive MRT des Rückenmarks (2 fokale T2-Läsionen) - positiver Liquorbefund

Tabelle 1.1: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose [101]

Dabei müssen für den Nachweis der Dissemination im Raum im MRT (Magnetresonanztomographie) drei der folgenden vier Punkte zutreffen (Kriterien nach Barkhof und Tintoré [68]):

- Eine gadoliniumanreichernde Läsion oder 9 T2-hyperintense Läsionen, wenn keine gadoliniumanreichernde Läsion vorliegt

- Mindestens eine infratentorielle Läsion
- Mindestens eine juxtakortikale Läsion
- Mindestens drei periventrikuläre Läsionen

Dabei kann man eine Rückenmarksläsion mit einer infratentoriellen Läsion gleichsetzen; eine anreichernde Rückenmarksläsion wird mit einer anreichernden Hirnläsion gleichgesetzt, und einzelne Rückenmarksläsionen können zusammen mit einzelnen Hirnläsionen die zur Erfüllung der MR-Kriterien benötigte Anzahl von 9 T2-Läsionen ausmachen.

Der Nachweis der zeitlichen Dissemination mittels MRT kann auf zwei Arten erbracht werden:

- Mindestens drei Monate nach dem ersten klinischen Ereignis Nachweis einer Gadoliniumanreicherung, jedoch nicht an der gleichen Stelle wie beim ersten klinischen Ereignis.
- Eine neue T2-Läsion, zu einem beliebigen Zeitpunkt nach einer Referenz-MRT-Aufnahme, die mindestens 30 Tage nach dem ersten klinischen Ereignis erfolgte.

Ein positiver Liquorbefund wird in diesem Zusammenhang charakterisiert durch Nachweis oligoklonaler Banden mittels etablierter Methoden (isoelektrische Fokussierung) oder durch einen erhöhten Immunglobulin G (IgG) – Index (siehe Kapitel 1.2) [101].

Für die Multiple Sklerose gibt es keine kurative Therapie. Die Therapie der Wahl im Schub ist die Steroid-Hochdosistherapie über drei bis fünf Tage. Für die verlaufsmodifizierende Behandlung stehen immunmodulatorische und immunsuppressive Verfahren zur Verfügung.

Die Erkenntnis, dass es schon früh während der Erkrankung zu den die Behinderung maßgeblich verursachenden Axonschädigungen kommt (siehe Kapitel 1.1.2), verdeutlichte in den letzten Jahren, dass insbesondere ein rechtzeitiger Behandlungsbeginn und damit eine frühe Diagnosestellung wichtig für den Behandlungserfolg sind [14]. Aufgrund positiver Studiendaten [15, 16, 40, 47] erfolgte vor diesem Hintergrund die Zulassung von Interferon beta-1a (Avonex®), Interferon

beta-1b (Betaferon®, Extavia®) und Glatirameracetat (Copaxone®) für die schubprophylaktische Behandlung bereits nach einem ersten Schub (CIS) bei entsprechendem Nachweis einer örtlichen Dissemination des Krankheitsprozesses im kraniellen Kernspintomogramm.

1.2 Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose

Die Liquordiagnostik spielt in der Diagnostik der Multiplen Sklerose eine zentrale Rolle. Einerseits dient sie der Abgrenzung gegenüber erreggerbedingten Erkrankungen, andererseits hat sie wesentliche Bedeutung in der Bestätigung der Verdachtsdiagnose MS und liefert zudem Parameter zur Prognoseabschätzung [92, 95].

Standardmäßige Untersuchungen sind Bestimmung von Zellzahl und Zytologie (typischerweise leichte lymphozytäre Pleozytose bis max. 50/μl), Albumin- sowie IgG-, IgA- und IgM-Bestimmungen nach dem Quotienten-Schema (Reiber-Felgenhauer-Diagramm), der Nachweis oligoklonaler IgG-Banden (IgG-OKB) im Liquor und gegebenenfalls Antikörper-Synthese-Indizes (ASI) für neurotrope Viren wie Masern, Röteln und Varicella zoster (sog. MRZ-Reaktion).

1.2.1 Intrathekale oligoklonale Immunglobulin G (IgG) – Synthese bei Patienten mit MS

Die Beobachtung, dass im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose erhöhte Mengen an Immunglobulinen zu finden sind, wurde erstmals 1950 publiziert [45]. Die Ursache dieser Erhöhung ist eine lokale, oligoklonale Produktion von Antikörpern überwiegend der Klasse Immunglobulin G (IgG), seltener auch IgM und IgA. Diese intrathekale Immunglobulin-Synthese gilt als Hinweis auf einen chronisch entzündlichen Prozess im zentralen Nervensystem.

Ihr Nachweis mittels isoelektrischer Fokussierung oder IgG-Index wurde 1983 in die Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose aufgenommen [69] und wird in den heute gültigen Kriterien [68] weiterhin in bestimmten Fällen verlangt (siehe Kapitel 1.1.3).

Die intrathekale oligoklonale IgG-Synthese wird bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) in einem charakteristischen Bandenmuster, den sogenannten oligoklonalen IgG-Banden (IgG-OKB), sichtbar gemacht.

Nach den Empfehlungen einer internationalen Expertengruppe [31] sollte die

Untersuchung auf oligoklonale Banden durch eine isoelektrische Fokussierung auf Agarose-Gel, gefolgt von einem Immunoblot-Verfahren zur Visualisierung der IgG-Banden, durchgeführt werden.

Von positiven OKB spricht man, wenn im Liquor gegenüber dem in derselben IgG-Konzentration parallel fokussierten Serum exklusive oder zusätzliche Banden zu sehen sind. Die Festlegung eines Grenzwertes für eine positive oligoklonale Reaktion wird, auch je nach angewandeter Methode, unterschiedlich gehandhabt. In der Regel werden mindestens zwei bis drei Banden, die im Liquor, nicht aber im Serum sichtbar sind, gefordert [103].

In einem europäischen Konsensuspapier [2] werden fünf unterschiedliche Muster von oligoklonalen Banden definiert:

Typ 1: Normal. Keine OKB im Serum und keine OKB im Liquor.

Typ 2: OKB positiv. OKB nur im Liquor aber nicht im Serum. Intrathekale IgG-Synthese.

Typ 3: OKB positiv. OKB nur im Liquor und zusätzlich identische OKB in Liquor und Serum. Intrathekale IgG-Synthese.

Typ 4: Identische OKB in Serum und Liquor. Systemische IgG-Synthese.

Typ 5: Monoklonale Banden (Paraprotein) in Serum und Liquor.

(Vergleiche [103])

Der Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor cerebrospinalis korreliert mit der Anzahl der Leukozyten im Liquor sowie mit anderen, quantitativen Verfahren des IgG-Nachweises (IgG im Liquor und IgG-Index) [84].

Die Sensitivität dieser Untersuchung bei der Multiplen Sklerose beträgt 95-100 % [2, 51, 59]. Bei einer Spezifität von 85-86 % [6, 66] wird aber deutlich, dass oligoklonale IgG-Banden auch bei einer Reihe anderer inflammatorischer neurologischer Erkrankungen vorliegen können.

Auftreten und Muster der OKB sind bei einem an Multipler Sklerose leidenden Patienten über die Zeit konstant [98]. Da ein Großteil der Antikörper im ZNS produziert wird, Antikörper aber nur eine Halbwertszeit von einigen Wochen haben, scheinen die Antikörper-produzierenden B- und Plasma-Zellen über einen langen Zeitraum im ZNS von MS-Patienten zu persistieren. Sie tun dies insbesondere in den MS-Läsionen [103]. Außerdem wurden bei Patienten mit sekundär chronisch-

progredienter MS ektope B-Zell Follikel in den Hirnhäuten beschrieben [56, 82].

Analysen der variablen Regionen der Immunglobuline deuten darauf hin, dass die B-Zellen im ZNS durch ein spezifisches Antigen selektiert wurden [71]. Zusätzlich zeigt der oligoklonale Aspekt der Antikörper an, dass nur eine begrenzte Anzahl an B-Zell-Klonen im ZNS persistiert.

Die B-Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper können auf verschiedenen Wegen zur Pathogenese der MS beitragen. Hervorzuheben sind die Wechselwirkung mit autoreaktiven T-Zellen und die direkte oder indirekte demyelinisierende Wirkung einiger Antikörper-Subtypen [86]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass Antikörper genauso zur Remyelinisierung beitragen können [4].

Zur Erklärung der Antigenreaktivitäten der Immunglobuline im ZNS wurden bereits erhöhte Antikörpertiter gegen zahlreiche antigene Strukturen beschrieben, unter anderem gegen Myelinkomponenten, Oligodendrocytenproteine, Viren, Zellkerne, Endothelzellen, Fettsäuren, Ganglioside und Bestandteile des Axolemm [3]. All diese Antikörperreaktivitäten verursachen aber vermutlich nur einen Bruchteil der oligoklonalen Banden bei der MS, sodass die Frage nach der Spezifität der OKB weiterhin als ungelöst betrachtet werden muss.

Beim klinisch isolierten Syndrom (CIS) sind IgG-OKB weniger häufig nachzuweisen als bei Patienten mit klinisch sicherer MS [13, 27, 33, 66, 79, 85, 91]. Allerdings besitzen sie hier eine prognostische Bedeutung, denn ihr Nachweis ist mit einer hohen Wahrscheinlichkeit verbunden, dass sich eine klinisch sichere Multiple Sklerose entwickeln wird [10, 13, 27, 33, 57, 66, 79, 85, 91, 92].

Das Fehlen von oligoklonalen Banden bei Patienten mit Verdacht auf eine demyelinisierende Erkrankung sollte immer Anlass sein, die Verdachtsdiagnose MS zu überprüfen [52, 104]. Bei einem sehr geringen Anteil der MS-Patienten (< 5 %) gelingt jedoch kein Nachweis von oligoklonalen Banden [39, 44, 84, 87, 104]. Hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft einer nicht nachweisbaren oligoklonalen IgG-Synthese bezüglich des Krankheitsverlaufs liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. Eine Reihe von Studien berichten von einem eher gutartigen Krankheitsverlauf bei diesen Patienten [1, 44, 87, 104] und eine autopsische Studie zeigte eine geringere oder keine Plasmazell-Infiltration der MS-Plaques oder der Meningen gegenüber MS-Patienten mit positivem Nachweis von IgG-OKB [25]. Dagegen konnten einige neuere Studien keine Unterschiede in der

Behinderungsprogression gegenüber MS-Patienten mit Nachweis von IgG-OKB feststellen [39, 50, 84, 92, 99].

In Ländern, deren Bevölkerung einen anderen genetischen Hintergrund besitzt als die europäische und nordamerikanische, werden oligoklonale IgG-Banden bei MS-Patienten teilweise deutlich seltener gefunden. So gelang der Nachweis von IgG-OKB in einer japanischen Studie nur bei 55 % der Patienten [62]. Damit einher gehen die Ergebnisse mehrerer Studien, die immungenetische Unterschiede sowohl bei europäischen als auch bei asiatischen MS-Patienten mit bzw. ohne Nachweis von IgG-OKB ausmachen konnten [39, 49]. Übereinstimmend konnte eine Prädominanz des HLA –DRB1*04 Allels bei MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG gefunden werden, wohingegen die häufige Assoziation des Allels HLA-DRB1*15 mit der MS auf Patienten mit positivem OKB-Nachweis beschränkt zu sein scheint [39].

Nach den neuen Diagnosekriterien [68] kann die Diagnose MS nun bereits frühzeitig nach Auftreten einer erstmaligen Symptomatik (CIS) gestellt werden, wenn sich in einem Verlaufs-MRT Hinweise auf eine disseminierte Krankheitsaktivität ergeben. Sollten dabei die sog. Barkhof-Kriterien [68] zur örtlichen Dissemination im initialen MRT nicht komplett erfüllt sein, ist zur Diagnosestellung allerdings der Nachweis von IgG-OKB im Liquor erforderlich. Entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird der Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese in diesem Fall sogar unbedingt gefordert, um eine immunmodulatorische Behandlung bereits bei CIS beginnen zu können [22].

Somit erfolgt bei Patienten, bei denen der Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor nicht gelingt, die Diagnosestellung und somit auch die Behandlung unter Umständen protrahiert.

1.2.2 Intrathekale Synthese von Antikörpern gegen Masern, Röteln und Varicella Zoster (MRZ-Reaktion)

Ein weiteres Charakteristikum der intrathekalen Immunantwort bei der Multiplen Sklerose ist ihre Polyspezifität. Diese zeigt sich in der sog. MRZ-Reaktion. Hierbei werden durch einen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Antikörper gegen die neurotrophen Viren Masern, Röteln und Varicella zoster im äquilibrierten Liquor

und Serum von Patienten bestimmt.

Es wird der Quotient aus dem Verhältnis der spezifischen Antikörper in Liquor und Serum (Q_{spec}) und dem Verhältnis des Gesamt-IgG in beiden Kompartimenten (Q_{IgG}) gebildet: Antikörperindex (AI) = $Q_{\text{spec}}/Q_{\text{IgG}}$ [73].

Ein erhöhter Wert dieses Antikörper-Synthese-Indices (AI $\geq 1,5$) zeigt demnach die intrathekale Synthese dieser Antikörper an.

In einer Studie wurde die Häufigkeit einer erhöhten Virus-spezifischen intrathekalen Synthese bei der Multiplen Sklerose für Masern mit 78 %, für Röteln mit 65 % und für Zoster mit 55 % angegeben. In ca. 90 % der Fälle ist mindestens einer der drei AI-Werte erhöht [72]. In Populationen mit einer niedrigeren Seroprävalenz für diese drei Viren zeigt auch die MRZ-Reaktion bei MS-Patienten seltener einen positiven Ausfall [75].

Ihre diagnostische Wertigkeit bezieht die MRZ-Reaktion daraus, dass sie schon zum Zeitpunkt der ersten klinischen Symptome einen chronisch entzündlichen Prozess im zentralen Nervensystem anzeigen kann und damit einen Hinweis auf MS oder Autoimmunerkrankungen mit Beteiligung des ZNS gibt [72]. Im Unterschied zur diagnostisch sehr sensitiven, jedoch weniger spezifischen Untersuchung auf oligoklonale Banden des Gesamt-IgG zeichnet sich die MRZ-Reaktion durch eine hohe Spezifität für die Multiple Sklerose aus [41].

Der Nachweis von Masern-, Röteln- und Zoster-spezifischen Antikörpern bei der Multiplen Sklerose durch die MRZ-Reaktion oder mittels anderer Verfahren erlaubt hingegen keine Aussage über den ursächlichen Zusammenhang der Erkrankung mit diesen Viren. Schon vor Jahren konnte gezeigt werden, dass im Gehirngewebe von MS-Patienten keine viralen Genomsequenzen nachweisbar sind [34]. Vielmehr werden bei der MS im Verlauf des chronischen Immunprozesses im ZNS Antikörper-sezernierende B-Gedächtniszellen stimuliert, die eine ortsständige Synthese der erregerspezifischen Antikörper auslösen. Die polyspezifische intrathekale IgG-Antwort spiegelt somit die B-Zell-stimulierende Umgebung während der intrathekalen Immunreaktion wider. Außerdem scheint sie die individuelle Geschichte früherer Infektionen und Immunisierungen zu reflektieren [10, 60].

Der Nachweis dieser antiviralen Antikörper ist somit im Kontext der polyspezifischen humoralen Immunreaktion zu verstehen, wie sie für chronisch entzündliche

Erkrankungen des ZNS, insbesondere die MS, typisch ist [74]. Man spricht von einer polyspezifischen, oligoklonalen Immunreaktion.

Die MRZ-Reaktion korreliert sowohl in der Anzahl der verschiedenen intrathekal synthetisierten Antikörperspezies als auch in deren Menge (Höhe der mittleren AI-Werte) mit der Gesamt-IgG-Synthese im ZNS. Allerdings machen die MRZ-Antikörper zusammen nur etwa 2 % des intrathekal synthetisierten IgG aus [74].

In einem europäischen Konsensuspapier wird die Durchführung der MRZ-Reaktion zur Bestätigung der Diagnose MS empfohlen [2].

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte belegt werden, dass die MRZ-Reaktion auch für eine prognostische Aussage über die Konversion eines klinisch isolierten Syndroms (CIS) in eine klinisch gesicherte MS von Nutzen ist. Bei den CIS-Patienten war die MRZ-Reaktion mit 37 % zu einem deutlich geringeren Anteil positiv als bei MS-Patienten. Jedoch hatten die CIS-Patienten, die eine positive MRZ-Teil- oder Gesamtreaktion zeigten, ein signifikant höheres Risiko, im Beobachtungszeitraum von zwei Jahren die Kriterien für eine klinisch sichere MS zu erfüllen als diejenigen mit Antikörperindex-Werten im Normbereich [10].

1.3 Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden im Liquor cerebrospinalis

Neben der Untersuchung auf oligoklonale IgG-Banden, die zur Routinediagnostik bei Verdacht auf Multiple Sklerose gehört, können mit dem Verfahren der isoelektrischen Fokussierung weitere Liquorbestandteile bzw. Antigen-spezifische Immunglobuline in Form von oligoklonalen Banden nachgewiesen werden.

So können bei der MS freie kappa- und lambda-Leichtketten von Immunglobulinen nachgewiesen werden, die ebenfalls einen intrathekalen Immunprozess anzeigen. Der Nachweis von freien kappa-Leichtketten oligoklonalen Banden gelingt etwa so häufig wie der von Gesamt-IgG OKB, darüber hinaus wurden Fälle beschrieben, in denen sie auch bei fehlenden Gesamt-IgG OKB auftraten [35].

Des Weiteren können, analog zur MRZ-Reaktion, spezifische oligoklonale Antikörper gegen neurotrope Erreger mittels isoelektrischer Fokussierung nachgewiesen werden. Sindic und Kollegen beschreiben für Masern-, Röteln- und Zoster (MRZ)-spezifische Banden bei der MS ähnliche Häufigkeiten wie die MRZ-Reaktion durch

ELISA sie erreicht [83]. Im Gegensatz zu den Antigen-spezifischen- und Gesamt-IgG OKB bei erregerbedingten Erkrankungen, die weitgehend deckungsgleich sind, zeigen die MRZ-spezifischen Banden im Falle der chronischen, polyspezifischen Immunreaktion bei MS ein anderes Muster als die Gesamt-IgG Banden [63, 83, 97].

Derselben Arbeitsgruppe gelang der Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden auch bei zwei Patienten, Vandvik et al. bei einem Patienten mit Neuritis nervi optici trotz Abwesenheit von Gesamt-IgG OKB [30, 96].

Ähnliches wird von Franciotta und Kollegen berichtet, die bei an Cytomegalievirus (CMV)- oder Toxoplasmen-Encephalitis leidenden AIDS-Patienten, bei denen keine oligoklonalen IgG-Banden im Liquor auffällig waren, spezifische Banden gegen CMV und Toxoplasmen nachweisen konnten [29].

Somit konnte in diesen Fällen durch den Nachweis spezifischer Banden trotz Abwesenheit von oligoklonalen Gesamt-IgG Banden eine intrathekale Antikörper-Synthese nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass in bestimmten Fällen durch den Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden eine weitere Erhöhung der Sensitivität hinsichtlich einer intrathekalen Immunreaktion gegenüber der alleinigen Untersuchung von Gesamt-IgG OKB erreicht werden kann.

In unserer Arbeitsgruppe gelang die Detektion Antigen-spezifischer oligoklonaler Banden bei verschiedenen paraneoplastischen neurologischen Syndromen (PNS) [42, 88, 89]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten eine höhere Sensitivität der spezifischen OKB hinsichtlich des Nachweises einer intrathekalen entzündlichen Reaktion gegenüber den unspezifischen Gesamt-IgG OKB in der Routinediagnostik.

Beim Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden müssen einige Unterschiede zum Nachweis von oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG beachtet werden.

Die spezifischen Antikörper machen bei polyspezifischen Reaktionen – im Gegensatz zur intrathekalen Synthese bei erregerbedingten Erkrankungen - gewöhnlich nur einen sehr geringen Anteil der gesamten Immunglobuline vom Isotyp G aus (zum Beispiel Masern-spezifische Antikörper bei der MS nur 0,54 % des Gesamt-IgG [74]). Masern-, Röteln- und Zoster-spezifische Antikörper können des Weiteren nur in solchen Individuen nachgewiesen werden, die zuvor einen immunologischen Kontakt mit dem jeweiligen Antigen hatten [75]. Dieser kann entweder in einer durchgemachten Infektion oder in einer Immunisierung durch Impfung bestehen. In unseren Breiten besitzt der weit überwiegende Teil der Erwachsenen einen positiven

Immunisierungsstatus gegen diese drei Viren [75].

Hatte ein Individuum Kontakt mit dem betreffenden Virus/Antigen, bildet es langlebige B-Gedächtniszellen, die eine fortwährende Produktion von spezifischen Antikörpern aufrechterhalten. Diese Gedächtniszellen zirkulieren im Blut und in den anderen Kompartimenten wie dem Liquor cerebrospinalis und können – wie bei der Multiplen Sklerose – im Rahmen einer sog. Bystander-Reaktion stimuliert werden.

Ein weiterer wichtiger Unterschied besteht hinsichtlich der zu erwartenden Bandenmuster bei Gesamt-IgG- und Virus-spezifischen oligoklonalen Banden. Während eine systemische Antikörperproduktion, wenn auch nur in sehr geringem quantitativen Ausmaß, für die spezifischen Antikörper wie oben beschrieben in unseren Breiten die Regel ist, ist deren Nachweis durch die Routineverfahren der isoelektrischen Fokussierung für das Gesamt-IgG die Ausnahme, denn das Gesamt-IgG erscheint nur bei starken Veränderungen der IgG-Menge durch einige B-Zell-Klone in einem oligoklonalen Aspekt. Dies ist zum Beispiel in manchen Fällen beim Guillain-Barré-Syndrom der Fall [105].

Somit muss für die spezifischen oligoklonalen Banden neben dem Bandenmuster vom Typ 1 auch das Bandenmuster vom Typ 4 als Normalbefund gelten, während dieses für die Gesamt-IgG OKB in vielen Fällen einen pathologischen Vorgang anzeigt [103] (Vergleiche Kap. 1.2.1).

Eine entscheidene Gemeinsamkeit der Gesamt-IgG- und der Virus-spezifischen oligoklonalen Banden vom Typ 2 und 3 nach Wurster [103] ist hervorzuheben: Beide weisen auf eine intrathekale oligoklonale Immunantwort und damit auf einen entzündlichen ZNS-Prozess hin.

1.4 Fragestellung

Der fehlende Nachweis von Gesamt-IgG OKB kann Diagnose und Therapie bei einer Subgruppe von MS-Patienten verzögern. In der vorliegenden Arbeit sollte, aufbauend auf den Arbeiten von Vandvik [96], Sindic [83] und Frederiksen [30], in einem größeren Kollektiv von Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose ohne Nachweis von Gesamt-IgG OKB deren Liquor auf die Prävalenz von Masern-, Röteln- und Zoster-spezifischen oligoklonalen Banden (MRZ-OKB) untersucht werden. Als Methode wird hierfür die isoelektrische Fokussierung mit nachfolgendem Affinitätsblot und Entwicklung durch die hochsensitive Chemilumineszenz-Technik verwendet.

In den zitierten Arbeiten von Vandvik [96], Frederiksen und Sindic [30] sowie

Franciotta [29] war es gelungen, spezifische oligoklonale Banden trotz Abwesenheit von Gesamt-IgG Banden nachzuweisen. Im Mittelpunkt unseres Interesses steht daher die Frage, ob der Nachweis von Masern-, Röteln- und Zoster-spezifischen oligoklonalen Banden auch bei MS-Patienten, die keine Gesamt-IgG OKB in der Routinediagnostik zeigen, möglich ist.

In einem zweiten Schritt soll die Stärke der methodischen Assoziation zwischen dem Nachweis von Masern-, Röteln- und Zoster-spezifischen oligoklonalen Banden via isoelektrischer Fokussierung und der MRZ-Reaktion durch ELISA untersucht werden.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv

Auf der Basis von Krankenakten und der Befunddokumentation im klinischen Labor (Liquorlabor) des Neurozentrums Freiburg wurde retrospektiv ein Kollektiv von 17 Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose entsprechend den revidierten McDonald Kriterien [68], jedoch ohne Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden im Liquor (< 2 Banden) in der Routinediagnostik zusammengestellt. Diese Gruppe wird im Folgenden „Studienpatienten“ genannt.

Als Kontrollen dienten die Liquor- und Serumpaare von 36 MS-Patienten mit Nachweis von IgG-OKB, sowie von 12 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (engl.: other neurological diseases, OND).

Die Entnahme von Liquor und Serum war jeweils während eines ambulanten/stationären Aufenthalts in der Neurologischen Universitätsklinik Freiburg in der Zeit von September 2000 bis März 2008 im Rahmen der Routinediagnostik erfolgt. Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -80°C tiefgefroren. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur diagnostischen Liquorpunktion. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Freiburg genehmigt (Antragsnummer 368/07; Votum vom 19. Dezember 2007).

Die Ergebnisse der Routine-Untersuchung auf oligoklonale Gesamt-IgG Banden und der MRZ-Reaktion lagen vor. Sie wurden jeweils im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt. Die Untersuchung auf oligoklonale Gesamt-IgG Banden erfolgte mit dem Hydragel Isofocusing-System (sebia, Frankreich) im Liquorlabor des Neurozentrums des Universitätsklinikums Freiburg. Die ELISA-Untersuchungen zur Ermittlung der MRZ-Reaktion wurden in der Virologie des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt. Die Berechnung des AI-Wertes erfolgte mit der Formel nach Reiber und Lange [73]. Eine erregerspezifische intrathekale Synthese wurde bei AI-Werten $\geq 1,5$ angenommen. Es waren keine Informationen zum Immunisierungsstatus der Patienten verfügbar.

2.1.1 MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

Der Literatur sind nur uneinheitliche Angaben über die Mindestanzahl von oligoklonalen Banden für eine positive Bewertung zu entnehmen [103]. Wir setzten als Voraussetzung für den Befund einer intrathekalen IgG-Synthese im Liquor gegenüber dem Serum mindestens zwei nachweisbare zusätzliche oder exklusive Banden voraus.

Von zunächst 19 Patienten mit gesicherter MS, aber fehlenden oligoklonalen Banden in der Routinediagnostik, lag bei Zweien kein vollständiges Liquor-/Serumpaar vor, so dass das Kollektiv der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG (Studienpatienten) schließlich 17 Patienten zwischen 21 und 60 Jahren umfasste. Von diesen Patienten lagen insgesamt 22 Liquor-/Serumpaare zur Untersuchung vor (bei wiederholter Liquordiagnostik im Verlauf bei fünf der 17 Patienten).

Einschlusskriterien:

- 1) Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose (klinisch oder kernspintomographisch gemäß den revidierten McDonald-Kriterien von 2005 [68]) und zugleich ohne Nachweis einer intrathekalen oligoklonalen IgG-Synthese in der Routinediagnostik.
- 2) Vorhandensein einer Liquor- und Serumprobe, welche im Rahmen des stationären/ambulanten Aufenthaltes gewonnen und in der Liquor-/Serumbank des klinischen Labors des Neurozentrums asserviert wurde.
- 3) Schriftliches Einverständnis des/der Patienten/in zur diagnostischen Liquorpunktion.

2.1.2 Kontrollgruppen

Positivkontrollen

Das Kollektiv der Positivkontrollen bestand aus insgesamt 36 MS-Patienten mit gesichertem Nachweis von Gesamt-IgG oligoklonalen Banden in der Routinediagnostik. Dieses Kollektiv beinhaltete sowohl MS-Patienten mit (teil-)positiver als auch solche mit (teil-)negativer MRZ-Reaktion.

Negativkontrollen

Das Kollektiv der Negativkontrollen setzte sich aus insgesamt 12 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND), darunter 10 Patienten mit Pseudotumor cerebri (PTC), zusammen. Keiner der Patienten zeigte in der

Routinediagnostik entzündliche Liquorveränderungen (Zellzahl, IgG-Index und quantitative intrathekale IgG-, IgA- und IgM-Synthese im Referenzrahmen sowie kein Nachweis von oligoklonalen Banden). Für jedes Antigen wurden 11 Liquor-/Serumpaare untersucht.

2.2 Versuchsmaterialien

2.2.1 Antigene

Es wurden kommerziell erhältliche, hochgereinigte und hochspezifische Antigene der Virusspezies Masern (Bestellnummer BA102VS), Röteln (Bestellnummer BA129G2VS) und Varicella zoster (Bestellnummer BA104VSG) von der Firma Virion/Serion, Würzburg verwendet.

2.2.2 Chemikalien

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien unter Angabe der Lieferfirmen bzw. der Mischverhältnisse zusammengestellt.

<u>Produkt</u>	<u>Firma bzw. Mischverhältnis</u>
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
IEF-Agarose	GE Healthcare, Uppsala/Schweden
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P40	Roche, Mannheim
Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare, Uppsala/Schweden
Pharmalyte pH 8-10,5	Amersham, Uppsala/Schweden
Magermilchpulver Sucofin	TSI, Zeven
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Merck, Darmstadt
NaOH (Natronlauge)	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Luminol	Sigma-Aldrich, München

Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
TRIZMA® Base	Sigma-Aldrich, München
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ 30 % (Wasserstoffperoxid)	Merck, Darmstadt
Developer	AGFA, Mortsel/Belgien
Rapid Fixer	AGFA, Mortsel/Belgien
Peroxidase-konjugiertes anti-human-IgG von der Ziege	Dianova, Hamburg
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	JT Baker, Deventer/Niederlande
Stocklösung	150 mg 4-Chloro-1-Naphthol Ad 50 ml Äthanol
(4-Chloro-1-Naphthol-Methode)	Na ₂ HPO ₄ : 5,52 g
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	NaH ₂ PO ₄ : 0,96 g NaCl: 32 g Ad 4000 ml Aqua dest.
Waschpufferlösungen	- PBS 0,05 % Tween [v/v] - PBS 0,1 % Tween [v/v] - PBS 0,05 % Tween[v/v] 0,2 % Triton X-100 [v/v]
Blocklösung	3 % Magermilchpulver in PBS [w/v]
Inkubationslösung für sek. Antikörper	PBS 0,05 % Tween [v/v] 1 % Magermilchpulver [w/v]
TRIS-Puffer pH 8,5	TRIZMA® Base: 4,844 g Ad 40 ml Aqua dest. + HCl zur pH-Wert Einstellung
Substratlösung	- Chemilumineszenz (CL) 1: 250 mM Luminol: 250 µl 90 mM p-Cumarinsäure: 111 µl 1 M TRIS pH 8,5: 2,5 ml Ad 22,5 ml Aqua dest.

- Chemilumineszenz (CL) 2:
- 30 % H₂O₂: 15,35 µl
- 1 M TRIS pH 8,5: 2,5 ml
- Ad 22,5 ml Aqua dest.

2.2.3 Gebrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Nitrozellulose Protran®	Whatman, Dassel
GelBond Film	Cambrex, Rockland/USA
Chromatographiepapier	Macherey-Nagel, Düren
Elektrodenstreifen	GE Healthcare, Uppsala/Schweden
Filterpapierchen	GE Healthcare, Uppsala/Schweden
Celluloseacetatfolien	Sartorius, Göttingen
Chromatographiepapier	Whatman, Dassel
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Uppsala/Schweden

2.2.4 Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
LKB Multiphor II Elektrophoreseeinheit	Pharmacia, Freiburg
LKB Power Supply	Pharmacia, Freiburg
Reisefön silencio 1000	Braun, Kronberg

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Prinzip der isoelektrischen Fokussierung mit Affinitätsblot

Durch die isoelektrische Fokussierung (IEF) kann der qualitative Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese erbracht werden (siehe Kap. 1.2.1).

Bei der IEF wird durch Anlegen einer Spannung ein pH-Gradient im Gel erzeugt. Dadurch wandern im Gel alle in den aufgetragenen Proben enthaltenen Proteine,

also auch die Immunglobuline, gemäß ihrem isoelektrischen Punkt (IP). Der IP ist der spezifische pH, bei dem die Summe aller Ladungen des ampholytischen Proteins Null beträgt. Hat ein Protein diesen pH-Wertbereich im Gel und damit eine ausgeglichene Nettoladung erreicht, verweilt es an diesem Punkt, man spricht von „Fokussierung“. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ergibt sich aus dessen Aminosäurezusammensetzung, somit werden identische Proteine am gleichen Punkt fokussiert.

Im Anschluss an die Fokussierung wird eine mit Antigen beschichtete Membran auf das Gel aufgelegt und beschwert (Blotting). Durch Wanderung der Proteine auf die Membran entsteht eine Kopie des IEF-Gels, es können jedoch nur jene Immunglobuline fest an der Membran haften, die mit dem dort gebundenen Antigen eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung eingehen können (Affinitätsblot).

Durch Waschen der Membran werden nun die nur unspezifisch gebundenen Antikörper wieder entfernt. Anschließend können die verbliebenen, spezifisch gegen das untersuchte Antigen gerichteten Antikörper mit Hilfe eines anderen Antikörpers, der gegen humanes Immunglobulin G (IgG) gerichtet ist, nachgewiesen werden. Dieser Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt, durch das es bei Zugabe eines Substrats zur Lichtemission kommt (siehe Abb. 2.1). Diese kann durch Auflegen eines Chemilumineszenzfilmes detektiert werden.

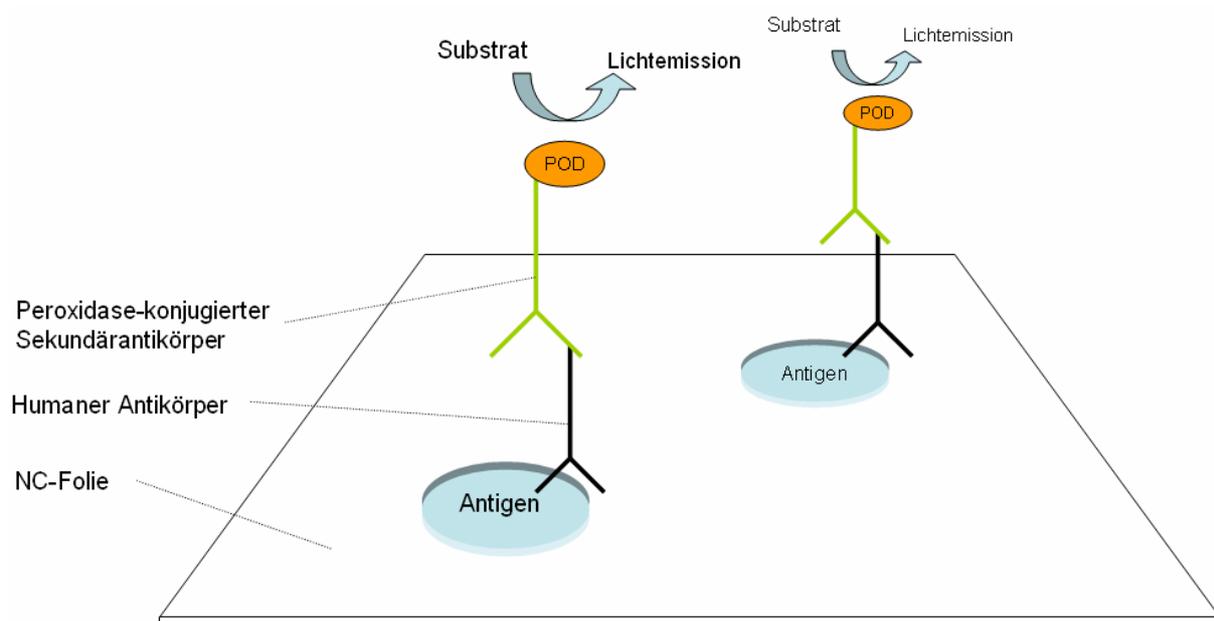


Abbildung 2.1: Situation auf der Trägermembran beim Nachweis der spezifischen Immunglobuline

2.3.2 Versuchsablauf

Elektrophorese

In einem Erlenmeyerkolben werden zu 50 ml destilliertem Wasser 6 g Sorbitol und 0,5 g IEF-Agarose gegeben. Die Lösung wird auf 100°C erhitzt. Wenn keine Schlieren mehr sichtbar sind, erfolgt die Abkühlung auf 75°C. Für zwei Gele werden 19 ml der Lösung in einen anderen Kolben pipettiert, dazu werden 200 µl Nonidet P40, 1 ml Pharmalyte pH 3-10 und 200 µl Pharmalyte pH 8-10,5 gegeben. Jedes Gel wird auf die hydrophile Seite eines GelBond Films zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert.

Am Folgetag wird die Elektrophoreseeinheit auf 18°C gekühlt, zwischen Platte und GelBond Film werden jeweils 450 µl Kerosin pipettiert. Elektrodenstreifen (5x105 mm) werden in 0,5 M NaOH bzw. 0,005 M H₂SO₄ getränkt, um eine Kathode und eine Anode zu erhalten. Die Elektrodenstreifen werden an den jeweiligen Rand des Gels gelegt. Ca. 2 cm links der Anode werden Filterpapierchen aufgelegt, auf die jeweils 10 µl Probenmaterial, immer nebeneinander die auf dieselbe Gesamt-IgG-Konzentration äquilibrierten Liquor- und Serumproben eines Patienten, aufgetragen werden. Die Fokussierung läuft für 70 Minuten bei 14 Watt, die Stromstärke beträgt 100 mA, die maximale Spannung 1600 Volt.

Affinitätsblot

Es werden 7,0 x 10,5 cm große Nitrozellulosefolien (NC-Folien) ausgeschnitten und anschließend mit in PBS verdünntem Antigen über Nacht auf dem Wipptisch im Kühlschrank passiv beschichtet. Vor und während der isoelektrischen Fokussierung werden die Nitrozellulosefolien zunächst für eine Stunde zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 3 % Magermilchpulver in PBS geblockt. Anschließend erfolgt nach kurzem Spülen mit PBS das Waschen der NC-Folien für 2x10 Minuten in PBS 0,05 % Tween und für 1x10 Minuten in PBS 0,1 % Tween. Zuletzt werden sie noch einmal für ca. 10 Minuten bis zum Ende der Fokussierung in PBS inkubiert. Nach dem Ende der Fokussierung werden die NC-Folien auf die Gele aufgelegt, darüber folgen eine feuchte Celluloseacetatfolie, drei Lagen Chromatographiepapier sowie drei Lagen Papierhandtücher (siehe Abb. 2.2). Der Blot erfolgt für 30 Minuten unter einem Gewicht von 2 kg bei Raumtemperatur.

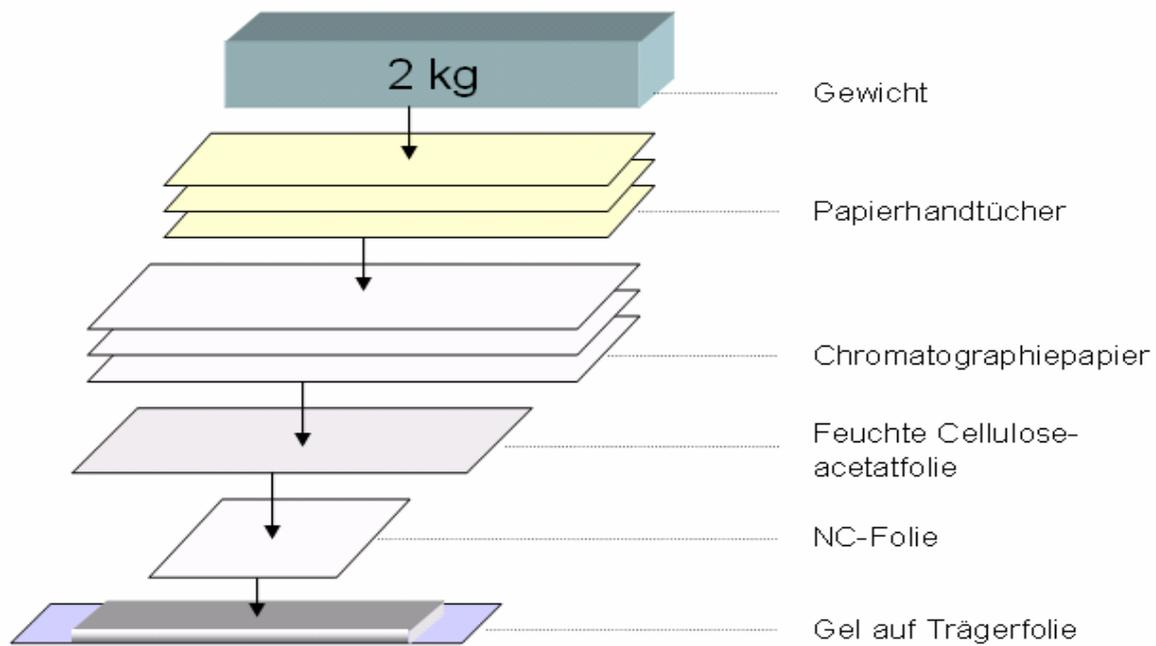


Abbildung 2.2: Abfolge der verschiedenen Schichten beim Blotting

Immunodetektion

Im Anschluss an das Blotting-Verfahren werden die NC-Folien in mehreren Schritten für insgesamt 50 Minuten gewaschen: Zunächst zweimaliges Spülen und anschließend dreimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten in PBS 0,05 % Tween 0,2 % Triton X-100 und anschließend zweimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten in PBS 0,1 % Tween. Dann erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten anti-human-IgG von der Ziege (Verdünnung 1:2083 [w/v]) erneut auf dem Wipptisch im Kühlschrank.

Am nächsten Tag werden die Nitrozellulosefolien zunächst 10x für jeweils 10 Minuten gewaschen (4x in PBS 0,05 % Tween 0,2 % Triton X-100, dann 4x in PBS 0,1 % Tween und zuletzt 2x in PBS) und anschließend 10 Minuten mit der Substratlösung inkubiert, sodass es zur enzymatischen Umsetzung des Detektionsreagents kommt. Die Substratlösung erhält man durch Vermischen der Lösungen CL 1 und CL 2 zu gleichen Teilen unmittelbar zuvor. Nach intensivem Trocknen der NC-Folien zwischen mehreren Lagen Chromatographiepapier sowie durch kühle Luft werden in einer Röntgenfilm-Kassette für eine Minute die hochsensitiven Chemilumineszenzfilme aufgelegt.

2.3.3 Spezifitätskontrollen

Zur Kontrolle der Spezifität der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden kamen zwei Verfahren zur Anwendung.

Zum einen wurde der Versuchsaufbau zum Ausschluss unspezifischer Matrixeffekte mit einer unbeschichteten, nur in Pufferlösung inkubierten und anschließend wie oben beschrieben geblockten Nitrozellulose-Folie durchgeführt.

Zum anderen wurden zuvor als sicher MRZ-OKB-positiv gewertete, äquilibrierte Liquor- und Serumproben vor der Fokussierung mit Antigen versetzt, um die in den Proben vorhandenen spezifischen Antikörper zu adsorbieren. Anschließend wurden diese Proben, gemeinsam mit den nicht-adsorbierten, äquilibrierten Liquor- und Serumproben derselben Patienten fokussiert und auf die mit Masern-, Röteln bzw. Zoster-Antigen beschichtete NC-Folie geblottet.

In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die oligoklonalen Banden Antigen-spezifisch sind, erwarteten wir deren Nichtauftreten in beiden Spezifitätskontrollen.

2.3.4 Auswertung

Das Vorliegen von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden wurde durch drei unabhängige Untersucher bewertet. Dies geschah in Unkenntnis der Diagnose und des Status der Gesamt-IgG OKB. Zwei oder mehr spezifische oligoklonale Banden exklusiv im Liquor oder eine deutlich stärkere Intensität der Banden im Liquor im Vergleich zu der korrespondierenden Serumprobe wurden als Evidenz einer intrathekalen Synthese von MRZ-spezifischem Immunglobulin G angenommen.

Zusätzlich wurde der Versuch einer semiquantitativen Auswertung der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden mit der Software ImageJ unternommen. Bei dieser Auswertung zeigte sich jedoch eine starke Artefaktanfälligkeit der Methode, sodass die Ergebnisse nicht zur endgültigen Bewertung der Bandenmuster verwendet wurden.

Die semiquantitative Auswertung durch ImageJ wird im Anhang (S. 74-76) im Detail vorgestellt.

2.3.5 Statistische Methoden

Zur Darstellung der qualitativen Merkmale (Testergebnis positiv/negativ) der einzelnen Kollektive diente der Chi-Quadrat Test mit Yates-Korrektur sowie bei

kleineren Stichproben der exakte Test nach Fisher, jeweils unter Verwendung einer Vierfeldertafel. Für beide statistischen Tests galt das übliche Signifikanzniveau (Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 0,05$).

Die Stärke der Assoziation zwischen zwei dichotomen Merkmalen (MRZ-Reaktion durch ELISA positiv/negativ und MRZ-spezifische oligoklonale Banden positiv/negativ) wurde neben der Feststellung der Signifikanz durch den Chi-Quadrat Test mit Yates-Korrektur bzw. den exakten Test nach Fisher durch den Phi-Koeffizienten (Φ) (mögliche Werte: -1,00 bis +1,00) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Es wurden insgesamt 65 Patienten auf das Vorliegen von spezifischen oligoklonalen Banden untersucht. Die 17 MS-Patienten ohne Nachweis von Gesamt-IgG OKB (Studienpatienten) wurden auf alle drei Antigenreaktivitäten (Masern, Röteln und Varicella zoster) hin untersucht, aus dem 36 Patienten umfassenden Positivkontrollkollektiv wurden jeweils, je nach Ergebnis des Antikörperindex durch ELISA, entsprechende Kontrollen ausgewählt, um die spezifischen Banden zu evaluieren. 12 Negativkontrollpatienten komplettierten das Gesamtkollektiv.

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die untersuchten Patientengruppen.

	<i>Anzahl</i>	<i>Alter (a) Durchschnitt</i>	<i>Alter (a) Streuung</i>	<i>Geschlechter- verteilung</i>
Studienpatienten	17	38,5	21 / 60	w:m = 13:4
Positivkontrollen	36	42,0	17 / 67	w:m = 25:11
Negativkontrollen	12	46,1	23 / 64	w:m = 8:4

Tabelle 3.1: Anzahl, Alter und Geschlechterverteilung der Studienpatienten und Kontrollgruppen

MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

Von fünf der 17 MS-Patienten ohne Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden in der Routinediagnostik (Studienpatienten) lagen zwei zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Proben zur Untersuchung vor.

Dreizehn dieser 17 Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Liquorentnahme eine schubförmige Verlaufsform (RRMS), drei Patienten einen primär chronisch-progredienten- (PPMS) und eine Patientin einen sekundär chronisch-progredienten (SPMS) Verlauf.

Die Analyse der oligoklonalen Gesamt-IgG Banden ergab in allen 22 Fällen ein Bandenmuster vom Typ 1 nach Wurster [103], d.h. es konnten keine Gesamt-IgG OKB in der Routinediagnostik detektiert werden. Bei dem Patienten Nr. 4 waren ein

bis zwei schwache Banden im Liquor, bei den Patienten Nr. 10 und 15 war jeweils eine monoklonale Bande im Liquor gegenüber dem Serum zu sehen. Somit lag liquordiagnostisch keine ausreichende Evidenz für die Annahme einer intrathekalen oligoklonalen Synthese bei diesen Patienten vor (siehe Kap. 1.2.1 und 2.1.1).

Tabelle 3.2 zeigt das Kollektiv der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG im Detail.

<i>Patientennr.</i>	<i>Alter bei LP</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Verlaufsform</i>	<i>OKB-Typ</i>
1	33 bzw. 39	w	jeweils RRMS	1 bzw. 1
2	37 bzw. 38	w	jeweils RRMS	1 bzw. 1
3	40 bzw. 43	w	jeweils RRMS	1 bzw. 1
4	21	w	RRMS	1
5	28	m	RRMS	1
6	46 bzw. 48	w	jeweils RRMS	1 bzw. 1
7	33	w	RRMS	1
8	30	w	RRMS	1
9	59	w	RRMS	1
10	35	w	RRMS	1
11	24 bzw. 24	m	jeweils RRMS	1 bzw. 1
12	30	w	RRMS	1
13	60	w	SPMS	1
14	50	m	PPMS	1
15	48	m	PPMS	1
16	45	w	PPMS	1
17	37	w	RRMS	1

Tabelle 3.2: Überblick über die MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG (Studienpatienten)

Positivkontrollen

Für jedes Antigen wurden sowohl MS-Patienten mit positiver MRZ- Teil- bzw.

Gesamtreaktion (Positivkontrollen im engeren Sinne), als auch Patienten mit negativem Teil- bzw. Gesamtergebnis in der MRZ-Reaktion (Positivkontrollen im weiteren Sinne) untersucht.

Tabelle 3.3 zeigt die Zusammensetzung des Positivkontrollkollektivs.

<i>Anzahl Positivkontrollen</i>	<i>Masern- Antigen</i>	<i>Röteln- Antigen</i>	<i>Zoster- Antigen</i>	<i>gesamt</i>
AI \geq 1,5	17	19	18	54
AI $<$ 1,5	10	11	10	31
gesamt	27	30	28	85

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Positivkontrollen

3.2 Etablierung der Methode

Zur Etablierung der Methode wurde zunächst der Nachweis von Masern-spezifischen oligoklonalen Banden durch Farbumschlag mit 4-Chloro-1-Naphthol [46] durchgeführt (Abb. 3.1 im Anhang S. 77).

Im Anschluss wurde dieser Nachweis mit der sensitiveren Chemilumineszenz-Technik geführt. Die Chemilumineszenz-Technik wurde in unserer Arbeitsgruppe in einer früheren Studie zum Nachweis von oligoklonalen IgM-Banden etabliert [81] und in einer Studie zu GAD-spezifischen oligoklonalen Banden bei Patienten mit stiff-person-Syndrom auf IgG angewendet [43].

Im Zuge der Etablierung dieser Methode mussten die folgenden Variablen eingestellt werden: Inkubationsvolumina der verschiedenen Lösungen, Coating-Konzentration des Antigens, Konzentration des Gesamt-IgG der Proben, Einwirkzeit und Konzentration der Blocklösung, Waschen der NC-Folien, Konzentration des sekundären Antikörpers, Volumen und Einwirkzeit der Substratlösung, Trocknen der NC-Folien, Belichtungszeit der Chemilumineszenz-Filme.

Als Beispiel sind in Abb. 3.2 a) und b) (Anhang S. 78) die Masern-spezifischen oligoklonalen IgG-Banden einer Positiv- und einer Negativkontrolle abgebildet. Die Ergebnisse unterscheiden sich in ihrem Zustandekommen hinsichtlich der Coating-Konzentration des Masern-Antigens sowie der Einwirkzeit der Substratlösung. Zudem wurde die Positivkontrolle jeweils in zwei verschiedenen Verdünnungskonzentrationen aufgetragen.

Die oben aufgeführten Variablen wurden schließlich unter Berücksichtigung des besten Ergebnisses bei der Etablierung auf die folgenden Standardwerte eingestellt:

Inkubationsvolumina der verschiedenen Lösungen	10 ml
Coating-Konzentration des Antigens	5 µg/ml
Gesamt-IgG-Konzentration der Proben	8 mg/l
Konzentration der Blocklösung	3 % Magermilchpulver in PBS [w/v]
Einwirkzeit der Blocklösung	60 Minuten
Waschen der NC-Folien	Insgesamt ca. 220 Minuten in PBS, PBS 0,05 % Tween, PBS 0,1 % Tween und PBS 0,05 % Tween 0,2 % TTX 100
Konzentration des sekundären Antikörpers	0,48 µg/ml in 20 ml PBS 0,05 % Tween 1 % Milchpulver
Volumen der Substratlösung	4 ml
Einwirkzeit der Substratlösung	10 Minuten
Trocknen der NC-Folien	Insgesamt ca. 3 Minuten zwischen Chromatographiepapier sowie durch kühle Luft
Belichtungszeit der Chemilumineszenzfilme	1 Minute

Diese Einstellungen bewährten sich in der Folge ebenfalls für die Röteln- und Zoster-spezifischen oligoklonalen IgG-Banden.

3.3 Nachweis der Spezifität der Methode

Ausschluss unspezifischer Matrixeffekte

Der Ausschluss unspezifischer Matrixeffekte konnte erbracht werden durch Blotten der fokussierten Antikörper auf eine unbeschichtete Nitrozellulose-Folie. Dieser Versuch wurde jeweils getrennt für Masern-, Röteln- und Zoster-Banden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3 bis 3.5 (Anhang S. 78-81) dargestellt.

Das Blotting der fokussierten Proteine auf die unbeschichtete NC-Folie mit anschließender Behandlung durch den Sekundärantikörper resultiert in einer nur sehr schwachen Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster. Dabei stellen sich die Serumspuren etwas kräftiger dar. Somit ist eine unspezifische Adhäsion der fokussierten Antikörper unwahrscheinlich.

Adsorption der MRZ-Antikörper

Die Spezifität konnte zudem durch Vorinkubation der Proben mit dem jeweiligen Antigen und anschließendes Blotting auf eine mit dem jeweiligen Antigen beschichtete NC-Folie gezeigt werden. Parallel wurden die Proben des gleichen Patienten ohne Vorinkubation fokussiert. Auch dieser Versuch erfolgte für alle drei Antigene. Die Vorinkubation der Liquor- und Serumproben wurde mit jeweils 36 µg (Röteln) bzw. 50 µg (Masern und Zoster) Antigen für 30 Minuten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3 bis 3.5 (Anhang S. 78-81) gezeigt.

Die im Anhang aufgeführten Abbildungen der Spezifitätskontrollen zeigen für alle drei Antigene eindrücklich den Effekt des modifizierten Versuchsablaufs bei der Kontrolle der Spezifität der Methode, indem abhängig von der Menge des zugegebenen Antigens aufgrund der Adsorption der spezifischen Antikörper entweder ein Bandenmuster in abgeschwächter Intensität resultiert oder das Bandenmuster vollständig verschwindet. Gleichzeitig zeigen sich in den parallel fokussierten nicht-adsorbierten Proben unverändert starke IgG-Banden. Dadurch wird deutlich, dass durch Vorinkubation der Proben mit dem entsprechenden Antigen tatsächlich eine Adsorption der Antikörper stattfindet und somit im herkömmlichen Versuchsablauf genau diese Antikörper nachgewiesen werden.

3.4 Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden

Alle Bandenmuster der Studienpatienten sowie repräsentative Bandenmuster aus den Kontrollgruppen sind im Anhang (S. 82-90) auf Spezialpapier aufgedruckt.

3.4.1 Positivkontrollen

Das Kollektiv der Positivkontrollen setzte sich aus insgesamt 36 Patienten mit Multipler Sklerose gemäß den revidierten McDonald-Kriterien [68] zusammen.

Von diesen 36 Patienten wurden 27 auf Masern-, 30 auf Röteln- und 28 auf Zoster-spezifische oligoklonale Banden untersucht, sodass insgesamt 85 untersuchte Fälle resultierten.

Ein Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden gelang in 53/85 Fällen (62,4 %) ($p < 0,0001$ gegenüber den Negativkontrollen).

Das Kollektiv der Positivkontrollen lässt sich weiter aufteilen in Fälle mit positivem Antikörperspezifitätsindex (Positivkontrollen im engeren Sinne, $AI \geq 1,5$) und in Fälle mit negativem Antikörperspezifitätsindex (Positivkontrollen im weiteren Sinne, $AI < 1,5$) (siehe Kap. 3.1).

Das Kollektiv der Positivkontrollen im engeren Sinne umfasste 54 Fälle, dabei gelang der Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden in 45/54 Fällen (83,3 %). Das Kollektiv der Positivkontrollen im weiteren Sinne umfasste 31 Fälle. Der Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden gelang in 8/31 Fällen (25,8 %). Dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p < 0,0001$; siehe Kap. 3.5.2).

Im Gesamtkollektiv der Positivkontrollen gelang der Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden gegen die drei einzelnen Antigene mit den folgenden Häufigkeiten: Masern 66,7 % (18/27 Fällen), Röteln 56,7 % (17/30 Fällen) und Varicella zoster 64,3 % (18/28 Fällen).

Im Anhang (S. 82-83) sind für jedes Antigen fünf repräsentative Bandenmuster abgebildet.

3.4.2 Negativkontrollen

Das Kollektiv der Negativkontrollen setzte sich aus 12 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND) zusammen. Für jedes der drei Antigene wurden 11 Patienten aus dieser Gruppe untersucht, sodass sich insgesamt 33 Fälle ergaben. Dabei trat nur in einem Fall (Negativkontrolle 9) eine schwache oligoklonale Reaktion gegen Varicella zoster-Antigen auf (1/33 entspricht 3,0 %).

Im Anhang (S. 83-84) sind für jedes Antigen drei repräsentative Negativkontrollen abgebildet, zusätzlich ist die als positiv gewertete Negativkontrolle gezeigt.

3.4.3 MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

Das Kollektiv der Patienten mit Multipler Sklerose ohne Nachweis von oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG umfasste 17 Patienten, entsprechend 51 Fälle. Von den 17

Patienten wurden insgesamt 22 Proben untersucht, sodass sich bezogen auf die Anzahl der Proben 66 Fälle ergaben.

Der Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden gelang bei 8/17 Patienten (47,1 %) für mindestens eines der drei untersuchten Antigene. Patient Nr. 15 zeigte spezifische oligoklonale Banden gegen alle drei untersuchten Antigene, Patient Nr. 16 Masern- und Röteln-spezifische oligoklonale Banden und 6 weitere Patienten jeweils spezifische OKB gegen eines der drei untersuchten Antigene. Bezogen auf die untersuchte Anzahl von Fällen resultiert somit eine Häufigkeit von 16,7 % (Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden in 11/66 Fällen).

Tabelle 3.4 auf der folgenden Seite gibt einen Überblick über den Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden in diesem Patientenkollektiv. Im Anhang (S. 85-90) sind die Abbildungen aller Bandenmuster der MS-Patienten ohne Nachweis von Gesamt-IgG OKB nach Patienten geordnet aufgeführt.

<i>Patientennr.</i>	<i>Masern-spezif. OKB</i>	<i>Röteln-spezif. OKB</i>	<i>Zoster-spezif. OKB</i>
1a	negativ	negativ	negativ
1b	negativ	negativ	positiv
2a	negativ	negativ	negativ
2b	negativ	negativ	negativ
3a	negativ	negativ	negativ
3b	negativ	negativ	negativ
4	negativ	negativ	positiv
5	negativ	negativ	negativ
6a	negativ	negativ	negativ
6b	negativ	negativ	negativ
7	negativ	negativ	negativ
8	negativ	negativ	positiv
9	negativ	negativ	negativ
10	negativ	negativ	negativ
11a	negativ	negativ	negativ
11b	negativ	negativ	negativ
12	positiv	negativ	negativ
13	positiv	negativ	negativ
14	negativ	negativ	positiv
15	positiv	positiv	positiv
16	positiv	positiv	negativ
17	negativ	negativ	negativ

Tabelle 3.4: Überblick über den Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden im Kollektiv der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

Tabelle 3.5 zeigt die Vierfeldertafel für den Vergleich Negativkontrollen (OND-Patienten) versus MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

(Studienpatienten) hinsichtlich des Nachweises spezifischer oligoklonaler Banden.

	OKB pos.	OKB neg.	Summe
OND-Pat.	1	32	33
Studienpat.	11	40	51
Summe	12	72	84

Tabelle 3.5: Vierfeldertafel

Exakter Test nach Fisher: $p = 0,0153$; signifikant

Die Abbildungen 3.6 bis 3.8 auf den folgenden Seiten zeigen repräsentative MRZ-spezifische oligoklonale Banden.

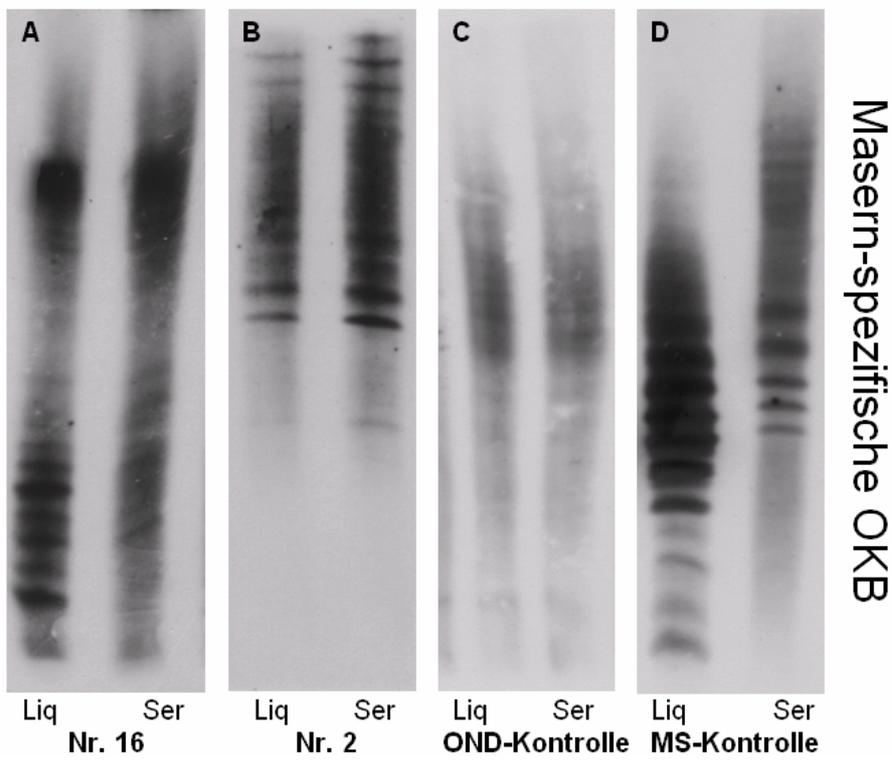


Abbildung 3.6

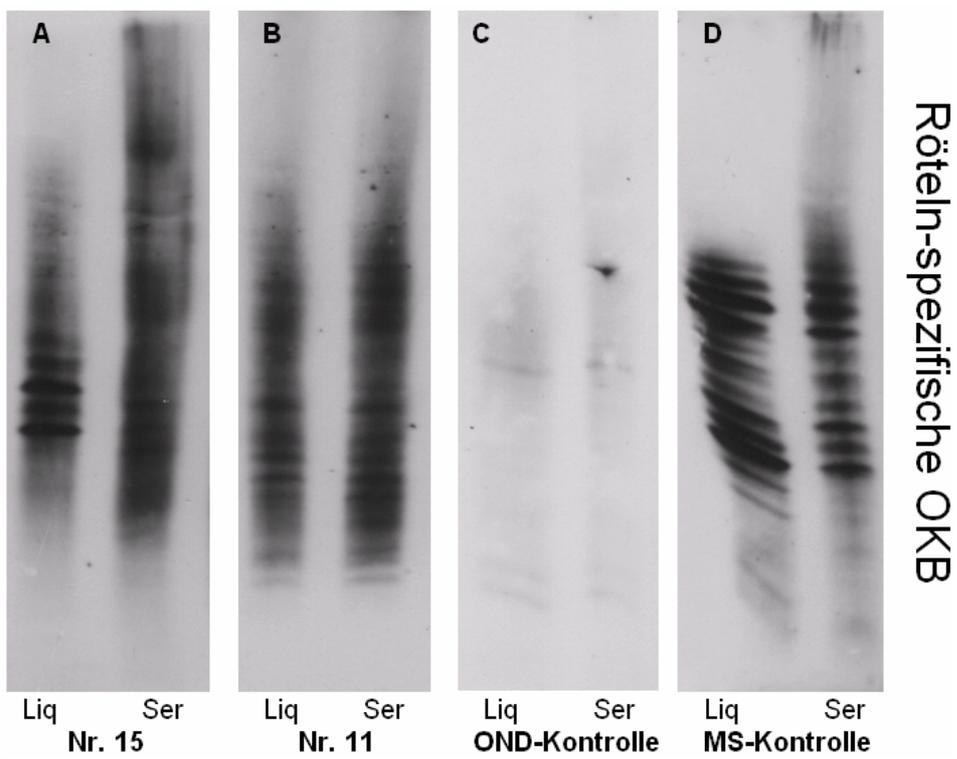


Abbildung 3.7

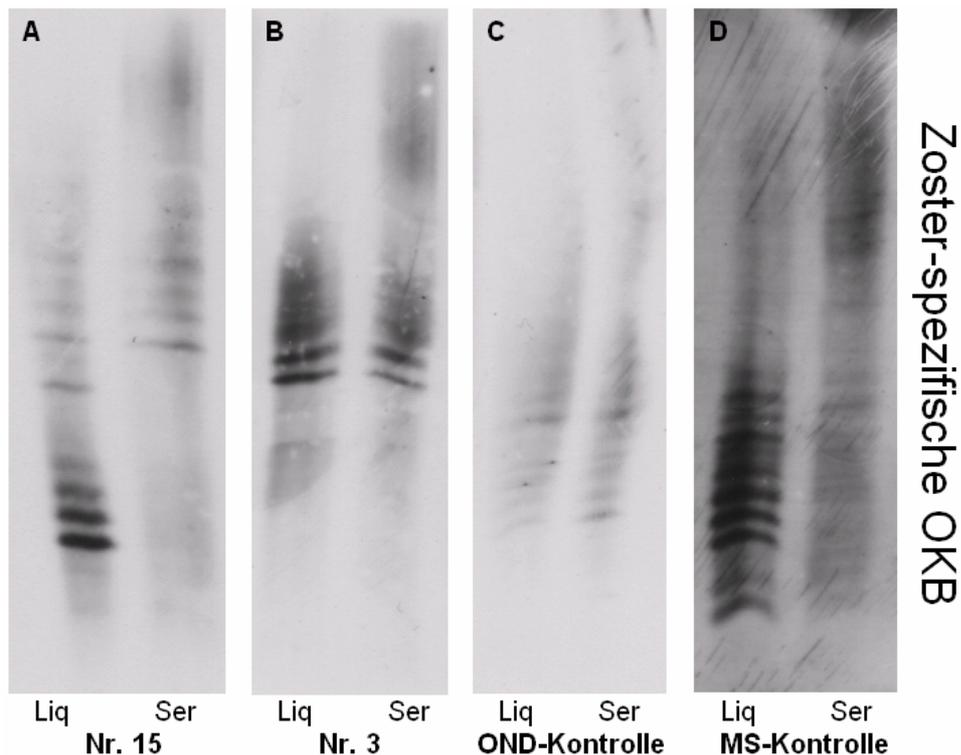


Abbildung 3.8

Abb. 3.6-3.8: Repräsentative Beispiele von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden (MRZ-OKB). **Abb. 3.6:** Masern-spezifische OKB. **Abb. 3.7:** Röteln-spezifische OKB. **Abb. 3.8:** Varicella zoster-spezifische OKB.

A: Nachweis von spezifischen OKB die im Liquor überwiegen bei einem MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG. **B:** Kein Nachweis einer spezifischen intrathekalen Synthese bei einem Patienten aus derselben Gruppe. **C:** Proben eines OND-Patienten. Schwaches, in Liquor und Serum spiegelbildliches Muster **D:** Positivkontrollproben eines MS-Patienten mit erfolgreichem Nachweis von Gesamt-IgG oligoklonalen Banden. Kräftige Darstellung eines im Liquor überwiegenden Bandenmusters.

3.4.4 Verteilung des Nachweises spezifischer OKB auf die drei untersuchten viralen Antigene

Tabelle 3.6 zeigt, wie sich der Nachweis der Virus-spezifischen oligoklonalen Banden in insgesamt 184 Fällen (85 Positivkontroll- + 33 Negativkontroll- + 66 Studienpatientenfälle) auf die drei verschiedenen Antigene verteilt.

<i>positiver Nachweis</i>	<i>Masern-OKB</i>	<i>Röteln-OKB</i>	<i>Zoster-OKB</i>	<i>gesamt</i>
Positivkontrollen	18	17	18	53
Negativkontrollen	0	0	1	1
Studienpatienten	4	2	5	11
gesamt	22	19	24	65

Tabelle 3.6: Verteilung des Nachweises von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden auf die drei Antigene

3.5 Assoziation zwischen der MRZ-Reaktion und dem Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden

Die beiden Untersuchungen wurden für die Positivkontrollen (85 Fälle, s. o.) und die MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG (51 Fälle, s. o.) durchgeführt, sodass insgesamt 136 vergleichbare Fälle vorlagen.

3.5.1 Gesamtzahl der Multiple Sklerose-Patienten

Tabelle 3.7 zeigt die Vierfeldertafel für die Assoziation der Ergebnisse der MRZ-Reaktion durch ELISA sowie des Nachweises von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden für alle 136 vergleichbaren Fälle.

	OKB pos.	OKB neg.	Summe
AI pos.	49	17	66
AI neg.	15	55	70
Summe	64	72	136

Tabelle 3.7: Vierfeldertafel

Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur: $p < 0,0001$; hochsignifikant

Für die Berechnung des Phi-Koeffizienten (Φ) wurden ein positiver Nachweis durch die MRZ-Reaktion ($AI \geq 1,5$) sowie ein positiver Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden gleich 1 gesetzt. Ein negatives Testergebnis wurde jeweils

gleich 0 gesetzt.

Phi-Koeffizient: $\Phi = 0,5288$; ordentliche Assoziation

Es wurde ebenfalls eine Analyse der Assoziation der beiden Testverfahren bezogen auf die drei einzelnen Antigene durchgeführt. Die Werte wurden für das Gesamtkollektiv der Multiple Sklerose-Patienten erhoben, da bei Betrachtung der einzelnen Kollektive aufgrund der relativ niedrigen Fallzahl der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG unzuverlässige Werte resultierten.

Es zeigten sich signifikante Übereinstimmungen der beiden Testverfahren für alle drei untersuchten Antigene, dabei streuten die Phi-Werte um den für alle drei Antigene gemeinsam berechneten Phi-Wert. Die beste Assoziation ergab sich für Röteln ($p = 0,0001$; $\Phi = 0,6175$), gefolgt von Zoster ($p = 0,0017$; $\Phi = 0,5119$) und Masern ($p = 0,0067$; $\Phi = 0,4545$).

3.5.2 Positivkontrollen

Tabelle 3.8 zeigt die Vierfeldertafel für die Assoziation der Ergebnisse der MRZ-Reaktion durch ELISA mit dem Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden für das Kollektiv der Positivkontrollen.

	OKB pos.	OKB neg.	Summe
AI pos.	45	9	54
AI neg.	8	23	31
Summe	53	32	85

Tabelle 3.8: Vierfeldertafel

Chi-Quadrat-Test mit Yates-Korrektur : $p < 0,0001$; hochsignifikant

Für die Berechnung des Phi-Koeffizienten (Φ) wurden ein positiver Nachweis durch die MRZ-Reaktion ($AI \geq 1,5$) sowie ein positiver Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden gleich 1 gesetzt. Ein negatives Testergebnis wurde jeweils gleich 0 gesetzt.

Phi-Koeffizient: $\Phi = 0,5715$; ordentliche Assoziation

Die Vierfeldertafel zeigt weiterhin, dass trotz der unvollständigen Assoziation der beiden Untersuchungsverfahren der Nachweis eines positiven Testergebnisses jeweils mit beinahe der gleichen Häufigkeit gelingt. Dies gilt auch bei jeweils isolierter Betrachtung der drei untersuchten Antigene (Daten nicht abgebildet).

3.5.3 MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

Tabelle 3.9 auf der folgenden Seite zeigt eine Gegenüberstellung der MRZ-Reaktion mittels ELISA und der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden für das Kollektiv der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG.

<i>N = 17</i>	<i>Antikörperindex</i>			<i>spezifische OKB</i>		
<i>Nr.</i>	<i>M</i>	<i>R</i>	<i>Z</i>	<i>M</i>	<i>R</i>	<i>Z</i>
1	-	-	Z	-	-	Z
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	Z
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	M	R	Z	-	-	-
8	M	R	Z	-	-	Z
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	M	R	-	-	-	-
12	-	-	-	M	-	-
13	-	-	-	M	-	-
14	-	-	-	-	-	Z
15	-	-	Z	M	R	Z
16	M	-	-	M	R	-
17	M	-	-	-	-	-

Tabelle 3.9: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Antikörperindexwert und MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden

Tabelle 3.10 zeigt die zugehörige Vierfeldertafel.

	OKB pos.	OKB neg.	Summe
AI pos.	4	8	12
AI neg.	7	32	39
Summe	11	40	51

Tabelle 3.10: Vierfeldertafel

Exakter Test nach Fisher: $p = 0,9331$; nicht signifikant

Für die Berechnung des Phi-Koeffizienten (Φ) wurden ein positiver Nachweis durch die MRZ-Reaktion ($AI \geq 1,5$) sowie ein positiver Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden gleich 1 gesetzt. Ein negatives Testergebnis wurde jeweils gleich 0 gesetzt.

Phi-Koeffizient: $\Phi = 0,1587$; geringe Assoziation

Die Vierfeldertafel zeigt auch hier, entsprechend dem Ergebnis bei den typischen MS-Patienten, dass trotz der nur geringen Assoziation der beiden Untersuchungsverfahren der Nachweis eines positiven Testergebnisses jeweils mit beinahe der gleichen Häufigkeit gelingt. Wiederum gilt dies auch bei jeweils isolierter Betrachtung der drei untersuchten Antigene (Daten nicht abgebildet).

4 Diskussion

4.1 Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir im bisher größten Kollektiv von Multiple Sklerose-Patienten das Vorliegen von Virus-spezifischen (Masern, Röteln und Varicella zoster) oligoklonalen IgG-Banden.

Ziel der Arbeit war es, nach Etablierung eines geeigneten Versuchsaufbaus auch bei MS-Patienten ohne detektierbare oligoklonale Banden des Gesamt-IgG in der Routinediagnostik, durch den Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden dennoch eine intrathekale Synthese nachzuweisen.

4.1.1 Methodische Aspekte

Für den Nachweis der Virus-spezifischen oligoklonalen Banden verwendeten wir die auch für den Nachweis der Gesamt-IgG OKB in der Routinediagnostik übliche Technik der isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit anschließendem Blotting-Verfahren. Um nur die spezifischen Antikörper gegen das untersuchte Antigen zu detektieren, fand dieses als Affinitätsblot auf eine mit dem jeweiligen Antigen beschichtete Membran statt. Da jedoch die Virus-spezifischen Antikörper nur in sehr geringer Konzentration vorliegen (siehe Kap. 1.3) musste für ihren Nachweis auf der Nitrozellulosefolie ein anderes, sensitiveres Verfahren gewählt werden als für den der unspezifischen Immunglobuline vom Isotyp G. Dem trugen wir durch die Anwendung der hochsensitiven Chemilumineszenz-Technik Rechnung, die in unserem Labor bereits zum Nachweis von in wesentlich geringerer Konzentration als IgG vorliegendem IgM [81] sowie zum Nachweis von Glutamat-Decarboxylase (GAD)-Antikörpern vom Isotyp IgG bei Patienten mit stiff-person-Syndrom [43] angewendet wurde.

Der Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden wurde ebenfalls mittels IEF von Sindic et al. 1994 für MS-Patienten mit erbrachtem Nachweis von Gesamt-IgG OKB in der Routinediagnostik etabliert [83]. Durch die Anwendung einer Antigen-vermittelten Blot-Technik (Affinitätsblot) konnte diese Arbeitsgruppe erstmals auf eine Konzentrierung der Proben, welche potentielle Fehlerquellen birgt, verzichten. Von

dem von Sindic et al. beschriebenen Versuchsablauf unterscheidet sich unserer im Wesentlichen durch die Verwendung von Nitrozellulose-Folien anstatt PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen sowie durch unser Nachweisverfahren mittels der hochsensitiven Chemilumineszenz-Technik, die weitere Unterschiede beim vorhergehenden Waschen der NC-Folien und der Inkubation mit dem sekundären Antikörper bedingte. Zudem trugen Sindic et al. die Liquorproben unverdünnt neben dem auf dieselbe IgG-Konzentration äquilibrierten Serum auf, während wir alle Proben in einer uniformen Verdünnung von 8 mg/l Gesamt-IgG auftrugen.

Diese Unterschiede im methodischen Ablauf führten zu einer höheren Empfindlichkeit unserer Untersuchung gegenüber der von Sindic et al., hierauf wird im nachfolgenden Abschnitt 4.1.2 näher eingegangen.

Die hohe Spezifität unseres Nachweisverfahrens konnten wir durch das komplette Verschwinden bzw. die deutliche Abschwächung der spezifischen Banden nach Präadsorption der Proben mit dem jeweiligen Antigen zeigen. Hinzu kommen die negativen Resultate und damit der Ausschluss unspezifischer Matrixeffekte bei Verwendung unbeschichteter Nitrozellulose-Folien.

4.1.2 Pathophysiologische Aspekte

Der Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden wurde für insgesamt 65 Patienten der drei Kollektive Negativkontrollen, Positivkontrollen und MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG geführt.

Für das Kollektiv der Negativkontrollen mit fehlenden entzündlichen Liquorveränderungen konnten wir in vielen Fällen ein Virus-spezifisches, relativ schwaches oligoklonales Bandenmuster nachweisen.

Im Einzelnen gelang der Nachweis eines solchen Musters für die jeweils 11 Patienten in 25/33 Fällen. Bei diesen Kontrollpatienten hatten die Banden jedoch eine deutlich schwächere Intensität als bei den Multiple Sklerose-Patienten. Zudem zeigten die Banden in diesem Kollektiv bis auf die einer Patientin für Varicella Zoster ein in Liquor und Serum identisches Muster. Dies zeigt zwar einen immunologischen Kontakt mit dem jeweiligen Antigen an, spricht aber bei fehlender Prädominanz der spezifischen Banden im Liquor gegen eine intrathekale Synthese dieser Antikörper. Vielmehr erklärt sich dieser Befund dadurch, dass in den industrialisierten Ländern

durch Infektionen während der Kindheit sowie durch Impfungen eine hohe Seroprävalenz für die drei Viren Masern, Röteln und Varicella zoster besteht [75]. Die die spezifischen Antikörper gegen diese Viren synthetisierenden B-Gedächtniszellen zirkulieren nach der Immunisierung in den verschiedenen Körperkompartimenten, u.a. dem Liquor cerebrospinalis. Beim Nachweis mittels IEF ergibt sich ein spiegelbildliches Muster von Liquor und Serum. Somit ist ein solches Bandenmuster, wie in Kapitel 1.3 ausgeführt, für die Virus-spezifischen oligoklonalen Banden als Normalbefund anzusehen.

Auch Sindic und Kollegen konnten in ihrer Arbeit von 1994 ein in Liquor und Serum identisches Bandenmuster bei einem Teil der Negativkontrollpatienten ohne entzündliche Affektion des ZNS feststellen [83]. Sie werteten dies ebenfalls nicht als Hinweis auf eine intrathekale Synthese. Ihnen gelang der Nachweis eines solchen Bandenmusters in 15/36 Fällen für die interessierenden Antigene Masern, Röteln und Varicella zoster und damit seltener als uns in der vorliegenden Arbeit. Dies ist vermutlich auf die höhere Sensitivität der von uns angewendeten Chemilumineszenz-Technik gegenüber der konventionellen Färbung bei Sindic et al. zurückzuführen. Allerdings führt diese Steigerung der Sensitivität nicht zu einer Verminderung der Spezifität der Methode, genau wie bei Sindic et al. zeigte sich eine intrathekale Virus-spezifische Synthese (d.h. ein Überwiegen der spezifischen Banden im Liquor gegenüber dem Serum) lediglich bei einer Patientin für Varicella zoster (1/33 Fällen, entspricht 3,0 %). Hierbei handelte es sich um eine Patientin, die an einem Ganzkörperschmerz und einer Depression mit psychotischen Anteilen litt.

Das Kollektiv der Positivkontrollen setzte sich aus insgesamt 36 Multiple Sklerose-Patienten mit Nachweis von Gesamt-IgG oligoklonalen Banden in der Routinediagnostik zusammen. Es wurde nicht jeder Patient auf das Vorliegen von oligoklonalen Banden gegen jedes der drei Antigene untersucht, sondern pro Antigen wurde anhand der MRZ-Reaktion eine gewisse Anzahl an Patienten aus diesem Kollektiv ausgewählt, darunter sowohl solche mit einem positiven Antikörperindexwert ($AI \geq 1,5$) für das untersuchte Antigen, als auch solche mit einem negativen Testergebnis in dieser Untersuchung ($AI < 1,5$). Es resultierten 85 untersuchte Fälle, dabei gelang der Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden in 53/85 Fällen (62,4 %, $p < 0,0001$ gegenüber den OND-Patienten). Interessanterweise gelang dieser Nachweis für die Positivkontrollen, die zusätzlich

ein positives Ergebnis in der MRZ-Reaktion für das spezifische Antigen aufwiesen, hochsignifikant häufiger als für jene MS-Patienten mit negativer korrespondierender MRZ-Teilreaktion (83,3 % vs. 25,8 %) ($p < 0,0001$). Zur Assoziation der beiden Verfahren siehe Kapitel 4.2.

Sindic und Kollegen gelang der Nachweis von spezifischen oligoklonalen Banden gegen mindestens eines der vier in ihrer Studie untersuchten Viren (Masern, Röteln, Varicella zoster und Mumps) in 18/20 MS-Fällen (90 %) [83]. Aus ihrer Arbeit lässt sich auch die auf die Fallzahl bezogene Häufigkeit des Nachweises Virus-spezifischer oligoklonaler Banden berechnen. Bei 20 untersuchten MS-Patienten und drei betrachteten Antigenen (Masern, Röteln, Varicella zoster) ergibt sich eine Gesamtzahl von 60 Fällen. Sindic et al. gelang der Nachweis von spezifischen Banden dabei in 34 Fällen (56,7 %). Die etwas größere Häufigkeit in unserer Untersuchung ist wahrscheinlich wiederum auf die höhere Sensitivität der Chemilumineszenz-Technik zurückzuführen.

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Kollektiv der Positivkontrollen in unserer Studie nicht zufällig zusammengestellt wurde, da für jedes Antigen eine angemessene Zahl von Patienten mit negativer MRZ-Teilreaktion untersucht werden sollte. Dadurch sind die Patienten mit negativer MRZ-Teilreaktion für Masern anteilig überproportional häufig vertreten, während diejenigen mit negativer MRZ-Teilreaktion für Varicella zoster anteilig unterrepräsentativ vertreten sind. Bei rein zufälliger Zusammenstellung des Kollektivs hätte sich vermutlich sogar eine noch etwas größere Häufigkeit des Nachweises MRZ-spezifischer OKB bei den Positivkontrollen zeigen können.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die spezifischen Banden bei chronischen, polyspezifischen Immunreaktionen nicht dem Muster der unspezifischen Gesamt-IgG oligoklonalen Banden entsprechen [63, 83, 97]. Dennoch legt der Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden bei einem Großteil der MS-Patienten mit ebenfalls erfolgtem Nachweis von Gesamt-IgG OKB die Vermutung nahe, dass die MRZ-spezifischen OKB eine Subgruppe der Gesamt-IgG OKB bei den typischen MS-Patienten repräsentieren. Vorstellbar wäre, dass die MRZ-spezifischen OKB als potentiell vorhandene oligoklonale Banden vom polyklonalen Muster des Gesamt-IgG bei der konventionellen IEF maskiert werden. Dies wird verständlich, wenn man beachtet, dass die intrathekalen MRZ-spezifischen Antikörper nur etwa 2 % des Gesamt-IgG ausmachen [74].

Erstmals untersuchten wir auch systematisch MS-Patienten ohne Nachweis einer intrathekalen oligoklonalen IgG-Synthese auf das Vorhandensein von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden. Von diesem 17 Patienten umfassenden Kollektiv wurden 22 Proben auf spezifische oligoklonale Banden gegen alle drei Antigene untersucht. Somit ist für dieses Kollektiv auch eine Angabe von Häufigkeiten bezogen auf Patienten möglich. Der Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden gelang in 11/66 Fällen oder bei 8/17 Patienten (47,1 %, $p = 0,0153$ gegenüber den OND-Patienten) für mindestens eines der drei untersuchten Antigene.

Damit erfolgte der Nachweis Virus-spezifischer oligoklonaler Banden in diesem Kollektiv deutlich seltener als bei den typischen MS-Patienten (Positivkontrollen).

Dieser Befund muss im Kontext anderer Liquorbefunde der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG gesehen werden.

Bei diesen Patienten sind auch andere Liquorparameter, die eine entzündliche Reaktion zeigen, wie die Zahl der Leukozyten im Liquor, die IgG-Menge im Liquor und der IgG-Index häufig nicht oder weniger stark erhöht [84]. Und auch für die MRZ-Reaktion wird in der Literatur eine geringere Frequenz eines positiven Ausfalls beschrieben [10]. Bei den von uns untersuchten Patienten war sie nur bei 7/17 Patienten in mindestens einer Teilreaktion positiv (41,2 %), während der Nachweis von mindestens einer positiven MRZ-Teilreaktion ($AI \geq 1,5$) im Allgemeinen bei 90 % der MS-Patienten gelingt [72].

Sowohl aufgrund unserer Ergebnisse als auch aufgrund derer der genannten Arbeiten ist davon auszugehen, dass bei MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG ein insgesamt niedrigeres Inflammationsniveau im Liquorkompartiment vorliegt.

Bei diesem geringeren Inflammationsniveau liegt offenbar auch die polyspezifische Aktivierung von B-Gedächtniszellen und somit die intrathekale Synthese von Virus-spezifischen Antikörpern seltener vor oder ist schwächer ausgeprägt.

Dennoch konnten wir durch die MRZ-spezifischen OKB bei fast der Hälfte der Patienten eine intrathekale Immunantwort trotz Fehlens von Gesamt-IgG OKB nachweisen.

Der Nachweis von oligoklonalen Banden gegen spezifische Antigene trotz fehlendem Nachweis von Gesamt-IgG OKB ist ein bekanntes Phänomen. So konnten bereits freie Kappa-Leichtketten-OKB bei MS-Patienten [35] sowie spezifische Banden gegen Toxoplasma und CMV bei AIDS-Patienten [29] nachgewiesen werden, jeweils trotz Abwesenheit von Gesamt-IgG OKB. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten spezifische oligoklonale IgG-Banden gegen onkoneurale Antigene bei Patienten mit paraneoplastischen neurologischen Syndromen nachgewiesen werden, obwohl in der Routinediagnostik keine Gesamt-IgG OKB auffällig waren [42, 88, 89]. Vandvik et al. konnten erstmals das Vorkommen von Virus-spezifischen Banden bei einem Patienten mit einer Neuritis nervi optici trotz Abwesenheit von Gesamt-IgG OKB zeigen [96]. Frederiksen et al. bestätigten diesen Befund bei zwei weiteren Patienten mit Optikusneuritis [30].

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis von MRZ-spezifischen Banden bei MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG nun in einem größeren Kollektiv systematisch verifiziert werden.

Da die oligoklonalen Banden ihrer Natur nach eine Entzündungsreaktion und die MRZ-Reaktion relativ spezifisch für die Multiple Sklerose [41] einen chronisch entzündlichen Prozess im zentralen Nervensystem anzeigen, kann postuliert werden, dass durch die MRZ-spezifischen OKB der Nachweis einer chronischen intrathekalen Immunreaktion auch bei jenen MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG erbracht wird.

Der Nachweis der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden erlaubt dagegen nicht den Rückschluss auf eine ätiologische Verknüpfung dieser Viren mit der Multiplen Sklerose [10, 34, 60, 74] (siehe Kap. 1.2.2).

Die Verteilung des Nachweises Virus-spezifischer oligoklonaler Banden auf die drei untersuchten Antigene zeigt für die insgesamt 184 untersuchten Fällen die höchste Nachweisfrequenz für Zoster- (24 Fälle), noch vor Masern- (22 Fälle) und Röteln- (19 Fälle) spezifische OKB. Eine Prädominanz des Nachweises Masern- und Zoster-spezifischer OKB und eine geringere Häufigkeit des Nachweises Röteln-spezifischer oligoklonaler Banden zeigt sich auch bei isolierter Betrachtung ihrer prozentualen

Nachweishäufigkeit bei den typischen MS-Patienten (Positivkontrollen) (Masern 66,7 %, Röteln 56,7 % und Zoster 64,3 %). Zu beachten ist allerdings, dass das Kollektiv der Positivkontrollen auch entsprechend dem Ergebnis der MRZ-Reaktion zusammengestellt wurde und das Kollektiv der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG aufgrund der relativ niedrigen Fallzahl ebenfalls keine zufällige Verteilung bezüglich des Ergebnisses der MRZ-Reaktion aufweist. Ferner gibt es eine Assoziation zwischen der MRZ-Reaktion und dem Nachweis der spezifischen oligoklonalen Banden, hierauf wird im Kapitel 4.2 näher eingegangen. Aus den genannten Gründen waren MS-Patienten, die eine positive MRZ-Teilreaktion für Zoster aufwiesen, anteilig überproportional vertreten, sodass die Verteilung des Nachweises Virus-spezifischer OKB auf die drei Antigene in unserer Untersuchung mutmaßlich verzerrt ist. Zudem steht dieser Befund im Widerspruch zur aktuellen Literatur. Diese beschreibt sowohl für die MRZ-Reaktion [72] als auch für den Nachweis der Virus-spezifischen oligoklonalen Banden [83] bei der MS die höchste Nachweisfrequenz für Masern-spezifische Antikörper, noch vor Röteln- und Zoster-spezifischen Antikörpern.

Bei der Bewertung unserer Ergebnisse muss diese Verzerrung berücksichtigt werden. So lässt sich beispielsweise aus unserer Arbeit nicht eine geringere Aktivierbarkeit etwa der Röteln- als der Zoster-spezifischen B-Zellen hinsichtlich einer klonalen Expansion im Rahmen der polyspezifischen Immunreaktion bei der MS ableiten.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Verlaufsuntersuchungen beim Nachweis von oligoklonalen Banden.

Walsh und Tourtellotte zeigten, dass Auftreten und Muster der Gesamt-IgG oligoklonalen Banden bei an MS erkrankten Personen über die Zeit konstant sind [98]. Rudick et al. erweiterten diese Erkenntnis darum, dass auch eine etwaige immunmodulatorische Therapie keinen Effekt auf die oligoklonalen Banden hat [76]. Das Auftreten von oligoklonalen Banden im Verlauf der Erkrankung nach einem initial negativen Ergebnis ist dagegen ein bekannter Befund [104].

In unserer Studie lagen von fünf der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG zwei zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Liquor- und Serumproben vor. Diese wurden im Mittel in einem Abstand von 30 Monaten

(Streubreite: 4-69 Monate) entnommen. Korrespondierend zu den Ergebnissen von Walsh und Tourtellotte sowie Rudick konnten wir in 14 von 15 (5 Patienten x 3 Antigene) dieser Fälle ein identisches Muster der spezifischen Banden für beide Probenpaare zeigen. Nur Patientin Nummer 1 zeigte für die Zoster-spezifischen OKB in den 2002 bzw. 2007 entnommenen Proben zwei verschiedene Muster. Während in der Probe von 2002 eine einzelne, Zoster-spezifische monoklonale Bande im Liquor imponierte, zeigte sich in der Probe von 2007 ein oligoklonales Zoster-spezifisches Bandenmuster in der Liquorprobe und somit der Nachweis einer spezifischen intrathekalen Immunreaktion. Dagegen erbrachte die routinemäßige Liquorverlaufsuntersuchung sowohl bei dieser Patientin als auch bei den übrigen vier Patienten weiterhin keinen Nachweis von oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG. Dieser Befund der Entwicklung einer monoklonalen Bande zu einem oligoklonalen Muster wird entsprechend von Davies et al. für die Gesamt-IgG oligoklonalen Banden beschrieben [19]. In ihrer Untersuchung zur klinischen Signifikanz einer monoklonalen Bande im Liquor cerebrospinalis zeigten 9/27 Patienten in einer zweiten Liquor-/Serumprobe, die im Mittel 174 Tagen nach dem Befund einer monoklonalen Liquorbande entnommen worden war, ein oligoklonales Muster. Ein großer Anteil dieser neun Patienten hatte eine demyelinisierende Erkrankung wie CIS oder MS. Erstmals konnten wir diese Entwicklung nun auch bei Virus-spezifischen Banden bei der MS zeigen.

4.1.3 Klinisch-diagnostische Aspekte

Für die Evidenz einer intrathekalen Immunreaktion, eines der wichtigsten pathophysiologischen Korrelate der Multiplen Sklerose, ist der Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden im Liquor cerebrospinalis nach wie vor der Goldstandard [2, 31, 80]. Die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung zum Nachweis von oligoklonalen Banden gehört daher zur Standarddiagnostik bei klinisch oder kernspintomographisch geäußertem Verdacht auf MS.

Von einem positiven Nachweis von oligoklonalen Banden spricht man im Allgemeinen bei mindestens zwei bis drei zusätzlichen Banden im Liquor gegenüber dem in der gleichen Gesamt-IgG-Konzentration aufgetragenen Serum [103]. Allerdings gibt es keine einheitlichen Bewertungskriterien. Zum einen liegt das an weiterhin unterschiedlichen gebräuchlichen Methoden (Silberfärbung vs. Immunofixation vs. Immunoblot), zum anderen ist die Benutzung von

unterschiedlichen Bewertungskriterien auch bei anderen qualitativen Verfahren (z. B. MRT) üblich und hat sich für OKB in der Praxis über viele Jahre bewährt [103].

In der vorliegenden Arbeit werteten wir zwei oder mehr spezifische oligoklonale Banden exklusiv im Liquor oder eine deutlich stärkere Intensität der Banden im Liquor im Vergleich zu der korrespondierenden Serumprobe als Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden.

Für die Virus-spezifischen Banden gilt, wie in Kapitel 1.3 ausgeführt, dass neben dem Bandenmuster vom Typ 1 auch der Typ 4 als Normalbefund gelten muss (Vergleiche auch Kap. 1.2.1).

Gelingt der Nachweis von Gesamt-IgG oligoklonalen Banden in der Routinediagnostik nicht, lässt dies beim Kliniker Zweifel an der gestellten Verdachtsdiagnose MS aufkommen. In der Tat stellen sich viele Fälle einer mutmaßlichen Multiplen Sklerose mit fehlenden oligoklonalen Banden als andere Krankheitsbilder heraus [26, 104]. Essentiell ist der Nachweis von OKB zur Abgrenzung der Multiplen Sklerose von Differentialdiagnosen, insbesondere nicht-entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems.

Gerade aufgrund der Erkenntnis, dass es bei der MS schon zu Beginn des Krankheitsverlaufs zu den folgeschweren axonalen Schädigungen kommt (siehe Kap. 1.1.2), und da der Nutzen einer frühzeitig im Krankheitsverlauf einsetzenden Behandlung erwiesen ist [37, 65], erfolgt die Einleitung einer immunmodulatorischen Behandlung heute bei vielen Patienten rasch nach der Diagnosestellung. Dies unterbleibt allerdings häufig bei fehlendem Nachweis von oligoklonalen Banden, insbesondere nach einem erstmaligen demyelinisierenden Ereignis (CIS) und nachgewiesener örtlicher Dissemination im kraniellen Kernspintomogramm oder sogar, wenn die Diagnosekriterien bereits erfüllt sind.

Auf der anderen Seite ist bei fehlenden oligoklonalen Banden auch deshalb Vorsicht geboten, die Diagnose MS zu stellen, weil die immunmodulatorische Behandlung potentiell nebenwirkungsreich ist. Besonders grippeähnliche Symptome und lokale Reaktionen an der Medikamenteninjektionsstelle treten gehäuft auf, es kann aber auch zu lebensbedrohlichen anaphylaktoiden Reaktionen kommen [5, 15, 16, 40, 47].

Da Virus-spezifische oligoklonale Banden, analog zu den Gesamt-IgG OKB, bei der MS den Hinweis auf eine chronisch entzündliche Immunreaktion im zentralen Nervensystem ergeben, kann ihr Nachweis den der Gesamt-IgG OKB ergänzen und in der Aussage möglicherweise ersetzen, falls diese negativ ausfallen. Somit kann der Nachweis MRZ-spezifischer oligoklonaler Banden ein wichtiges Instrument sein, um die Verdachtsdiagnose MS in unsicheren Fällen ohne Nachweis von Gesamt-IgG OKB zu stützen.

Weiterhin wird bei der MS nach prognostischen Markern über den Krankheitsprogress gesucht. Neben ihrer Rolle in der Diagnosestellung kommt den Liquoranalyseverfahren auch hier eine besondere Bedeutung zu. Wie in den Kapiteln 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben, herrscht weitgehende Einigkeit in der Fachliteratur über die prognostische Aussage sowohl des Nachweises der Gesamt-IgG oligoklonalen Banden als auch neuerdings der MRZ-Reaktion hinsichtlich der Konversion eines klinisch isolierten Syndroms (CIS) in eine klinisch sichere MS [10, 13, 27, 33, 57, 66, 79, 85, 91, 92]. Dadurch liefern beide Verfahren wichtige Anhaltspunkte bei der Entscheidung über eine frühzeitige Therapieeinleitung bei CIS oder MS. Eine uneinheitliche Studienlage besteht bezüglich einer prognostischen Bedeutung der oligoklonalen Banden für den Krankheitsverlauf bei bereits gesicherter Multipler Sklerose (siehe Kap. 1.2.1, [1, 25, 39, 44, 50, 84, 87, 92, 99, 104]).

Die Virus-spezifischen Antikörper können mittels der MRZ-Reaktion bereits bei einem großen Teil der CIS-Patienten detektiert werden [10]. Es kann also angenommen werden, dass die immunologischen Veränderungen mit intrathekaler Synthese von Virus-spezifischen Antikörpern bereits früh im Krankheitsprozess der Multiplen Sklerose auftreten [10]. Somit liegt es nahe, auch ihrem hochsensitiven Nachweis als spezifische oligoklonale Banden durch die isoelektrische Fokussierung eine prognostische Bedeutung zuzuschreiben. Tatsächlich lässt ein Befund von Frederiksen und Sindic [30] vermuten, dass auch Virus-spezifische oligoklonale Banden unter Umständen eine prognostische Aussage über die Konversion von CIS zu MS machen können. Von insgesamt 27 untersuchten Patienten mit akuter monosymptomatischer Optikusneuritis zeigten sechzehn Patienten Virus-spezifische oligoklonale Banden. Im Beobachtungszeitraum von einem Jahr entwickelten fünf Patienten eine klinisch sichere MS, bei all diesen waren beim initialen Ereignis Virus-

spezifische oligoklonale Banden im Liquor nachgewiesen worden.

Für unser Patientenkollektiv wurden keine Daten bezüglich der Krankheitsprogression erhoben, es wäre aber wünschenswert, dass in der Zukunft größere, prospektive Studien zu diesem vielversprechenden Marker durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir in knapp der Hälfte der Fälle (47,1 %) der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG Virus-spezifische oligoklonale Banden nachweisen und dadurch eine intrathekale Immunreaktion auch bei diesen Patienten beweisen (siehe Kap. 4.1.2).

Daneben können die Virus-spezifischen OKB bei diesen Patienten als Biomarker der autoimmunen Reaktion gegen das ZNS angesehen werden.

Aus diesem Ergebnis ergibt sich weiterhin die Frage, ob der Nachweis der spezifischen OKB gegenüber dem der Gesamt-IgG OKB eine höhere Sensitivität aufweist. In der Tat findet man in der Literatur einige Berichte über den Nachweis von spezifischen OKB trotz Abwesenheit von oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG. Diese Berichte umfassen, wie in Kapitel 4.1.2 ausgeführt, sowohl oligoklonale Banden gegen das ursächliche Antigen bei infektiösen Erkrankungen als auch OKB gegen onkoneurale Antigene bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen und OKB aus freien Immunglobulinbestandteilen bei der Multiplen Sklerose. Der Nachweis von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden bei MS trotz fehlendem Nachweis von Gesamt-IgG OKB gelang ausser in der vorliegenden Arbeit bislang nur Vandvik et al. sowie Frederiksen und Sindic in insgesamt drei Fällen von Patienten mit einer akuten monosymptomatischen Optikusneuritis [30, 96].

Diese Befunde sprechen zusammen mit dem Nachweis von Virus-spezifischen Banden bei Multiple Sklerose-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG in der vorliegenden Arbeit für eine in manchen Fällen höhere Sensitivität des Nachweises der spezifischen Banden gegenüber dem der Gesamt-IgG OKB. Sie sprechen aber in jedem Fall für eine weitere Steigerung der Sensitivität des Nachweises einer intrathekalen oligoklonalen Immunreaktion durch die Untersuchung auf spezifische oligoklonale Banden in jenen MS-Fällen, in denen der Nachweis von Gesamt-IgG OKB nicht erbracht werden konnte.

4.2 Assoziation zwischen der MRZ-Reaktion und dem Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden

In der vorliegenden Arbeit prüften wir erstmals die Assoziation des Nachweises MRZ-spezifischer oligoklonaler Banden mit der MRZ-Reaktion durch ELISA. Beide Verfahren weisen durch unterschiedliche Methoden die gleichen Virus-spezifischen Immunglobuline vom Isotyp G nach.

Wir fanden eine ordentliche Assoziation ($\Phi = 0,5288$) der beiden Verfahren für das Gesamtkollektiv der 53 untersuchten Multiple Sklerose-Patienten (136 Fälle). Diese Assoziation spiegelt sich auch in der für alle drei untersuchten Antigene beinahe identischen Häufigkeit wider, mit der durch die beiden Verfahren ein positiver Nachweis gelang (siehe Kapitel 3.5).

Bei jeweils isolierter Betrachtung der beiden Kollektive, einmal das der MS-Patienten, bei denen in der Routinediagnostik der Nachweis von Gesamt-IgG oligoklonalen Banden gelungen war (Positivkontrollen), und auf der anderen Seite das der MS-Patienten ohne Nachweis von oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG (Studienpatienten), ergab sich jedoch ein differenzierteres Bild.

Während die Assoziation für die typischen MS-Patienten ordentlich war ($\Phi = 0,5715$), zeigte sich für die 17 MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG nur eine geringe, nicht signifikante Assoziation ($\Phi = 0,1587$).

Die ordentliche Assoziation der beiden Verfahren bei den typischen MS-Patienten wird auch im hochsignifikanten Unterschied der Nachweisfrequenz der MRZ-spezifischen Banden bei den Patienten mit positiver korrespondierender MRZ-Teilreaktion und bei jenen mit einem negativen Teil- oder Gesamtergebnis deutlich ($p < 0,0001$, siehe Kap. 4.1.2). Die ordentliche Assoziation gilt also sowohl für den positiven Nachweis der spezifischen Antikörper, als auch für ein negatives Ergebnis in beiden Untersuchungen. Dies deutet auf eine hohe Validität beider Testverfahren hin.

Dagegen ist die geringe Assoziation der beiden Verfahren bei den MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG auf den ersten Blick überraschend. Dieser Befund ist jedoch folgerichtig, denn diese letzteren MS-Patienten zeigen insgesamt eine schwächere Immunreaktion. Neben dem fehlenden Nachweis von

oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG sind typischerweise bei dieser Patientengruppe auch andere entzündliche Parameter wie die Anzahl der Leukozyten im Liquor und die IgG-Menge im Liquor sowie der IgG-Index häufig nicht oder nur leicht erhöht (siehe Kapitel 4.1.2, [84]). Auch die MRZ-Reaktion zeigt zu einem deutlich geringeren Anteil einen positiven Ausfall (37 % vs. 90 % bei den typischen MS-Patienten [10] [72], in unserem Kollektiv bei 7/17 Patienten, entspricht 41,2 %).

Somit muss davon ausgegangen werden, dass auch die MRZ-spezifischen Antikörper im Immungeschehen bei diesen Patienten häufig nicht oder nur in geringem Maße intrathekal synthetisiert werden, sodass ihr Nachweis durch eines der beiden oder durch beide Verfahren zu einem höheren Anteil als bei den typischen MS-Patienten nicht gelingt.

Dennoch ist bemerkenswert, dass der Nachweis der Virus-spezifischen Antikörper durch die beiden unterschiedlichen Verfahren auch für dieses Kollektiv für alle drei untersuchten Antigene trotz der geringen Assoziation in beinahe identischer Häufigkeit gelang. Dies zeigt zwar, dass sowohl die MRZ-Reaktion durch ELISA als auch der Nachweis der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden durch die isoelektrische Fokussierung mit nachfolgendem Affinitätsblot eine begrenzte Sensitivität besitzen. Eine wesentliche Schlussfolgerung ist jedoch, dass die Sensitivität hinsichtlich Detektion einer intrathekalen Immunreaktion durch die Kombination beider Verfahren gesteigert wird. Somit kommt der Kombination beider Verfahren möglicherweise eine Wertigkeit zu bei der Identifikation von wirklich an MS erkrankten Personen aus einem Pool von Patienten, die eine auf MS verdächtige klinische Symptomatik, aber keine Gesamt-IgG oligoklonalen Banden im Liquor zeigen. In dem von uns untersuchten Kollektiv der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG ist dies bei 11/17 MS-Patienten (64,7 %) der Fall.

4.3 Synthese und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals in einem größeren Kollektiv von Multiple Sklerose-Patienten das Vorliegen von Virus-spezifischen oligoklonalen Banden trotz Abwesenheit von Gesamt-IgG OKB zeigen. Damit haben wir die Möglichkeit aufgezeigt, auch bei diesen MS-Patienten den liquordiagnostischen Nachweis einer intrathekalen Synthese erbringen zu können. Von pathophyso-

logischer Seite können somit die MRZ-spezifischen OKB als Biomarker einer autoimmunen Reaktion mit polyspezifischem und zugleich oligoklonalem Aspekt im zentralen Nervensystem bei Patienten mit einer auf MS verdächtigen Symptomatik, aber fehlenden Gesamt-IgG OKB bei offenbar niedrigem intrathekalen Inflammationsniveau fungieren.

Die bereits in der MS-Diagnostik etablierte MRZ-Reaktion mittels ELISA erbringt den Nachweis der für die MS typischen, polyspezifischen Immunantwort und deutet durch einen positiven Befund oft schon zum Zeitpunkt der ersten klinischen Symptome auf eine Immunreaktion im zentralen Nervensystem hin. Der Nachweis der Virus-spezifischen OKB mittels IEF vereint diesen Aspekt mit dem Nachweis einer intrathekalen oligoklonalen Entzündungsreaktion, welcher das Charakteristikum einer für die MS typischen chronisch-entzündlichen Konstellation ist.

Der Nachweis einer chronischen intrathekalen Entzündungsreaktion stellt einen wichtigen Baustein bei der Diagnosestellung der Multiplen Sklerose dar. Mittlerweile ist bekannt, dass es schon früh im Krankheitsverlauf zu axonalen Schädigungen kommt, die wesentlich für den Grad der Behinderung sind. Daher wird in vielen Fällen eine frühzeitige immunmodulatorische Behandlung angestrebt, allerdings kann ein fehlender Nachweis von oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG diese verzögern. Hier eröffnet der Nachweis der Virus-spezifischen oligoklonalen Banden weitere diagnostische Möglichkeiten.

Dies wird durch die in dieser Arbeit aufgedeckte geringe Assoziation des Nachweises der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden mit der MRZ-Reaktion durch ELISA bei den MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG weiter verdeutlicht, denn die methodisch deutlich einfachere MRZ-Reaktion fällt – wie hier gezeigt werden konnte - bei einem Teil der MRZ-OKB positiven Patienten falsch negativ aus. Somit erbringt erst die Kombination der beiden Verfahren eine größere diagnostische Sicherheit über das Vorliegen einer intrathekalen Immunreaktion. In unserer Untersuchung gelang mittels dieser Kombination bei 64,7 % der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG der Nachweis einer für die MS typischen intrathekalen oligoklonalen Immunreaktion.

Somit kann diese Untersuchung wertvolle Hinweise für Diagnostik und therapeutische Entscheidung bei MS-Patienten liefern. Jedoch werden größere und prospektive Studien die diagnostische Wertigkeit der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden und deren mögliche prognostische Bedeutung weiter untersuchen müssen.

5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Der Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) des Gesamt-IgG und die MRZ-Reaktion sind hierbei wesentliche und gut etablierte diagnostische Marker. Jedoch gelingt bei einem kleinen Teil der MS-Patienten (< 5 %) der Nachweis von Gesamt-IgG OKB nicht. Wir untersuchten ein Kollektiv von 17 solcher MS-Patienten auf das Vorliegen von MRZ-spezifischen (Masern, Röteln und Varicella zoster) oligoklonalen Banden. Zudem prüften wir die Assoziation zwischen dem Nachweis der MRZ-spezifischen OKB und der MRZ-Reaktion mittels ELISA.

Wir verwendeten die isoelektrische Fokussierung mit nachfolgendem Affinitätsblot auf eine mit Virus-Antigen beschichtete Membran. Als Kontrollen dienten 36 MS-Patienten mit erfolgtem Nachweis von Gesamt-IgG OKB und 12 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND).

Es zeigte sich nur bei einer der Negativkontrollen eine schwache oligoklonale Reaktion gegen Varicella Zoster, dagegen gelang der Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden in 53/85 Positivkontrollfällen (62,4 %) ($p < 0,0001$ gegenüber den OND-Patienten) und bei 8/17 (47,1 %; $p = 0,0153$) der MS-Patienten ohne Nachweis von Gesamt-IgG OKB. Die Assoziation zwischen dem Nachweis der Virus-spezifischen Banden und der MRZ-Reaktion durch ELISA war für die Positivkontrollen hochsignifikant ($\Phi = 0,5715$; $p < 0,0001$), nicht jedoch in der Subgruppe der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG ($\Phi = 0,1587$; $p = 0,933$).

Die Detektion von MRZ-spezifischen OKB bei nahezu der Hälfte der MS-Patienten ohne Gesamt-IgG OKB erlaubt in dieser Subgruppe die Annahme einer chronischen intrathekalen Immunreaktion. Somit scheint hier die Bestimmung der Virus-spezifischen OKB als möglicher Biomarker der MS eine höhere Sensitivität aufzuweisen als die der Gesamt-IgG OKB. Aufgrund der geringen Assoziation zwischen der MRZ-Reaktion und dem Nachweis der MRZ-spezifischen OKB bei dieser MS-Subgruppe sollten beide Verfahren in Kombination eingesetzt werden, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Damit gelang in der vorliegenden Studie der Nachweis einer intrathekalen Immunantwort sogar bei 64,7 % der MS-Patienten trotz Fehlens der oligoklonalen Banden des Gesamt-IgG.

6 Literaturverzeichnis

1. Amato M., Ponziani G. (2000) A prospective study on the prognosis of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 21:831-8
2. Andersson M., Alvarez-Cermeno J., Bernardi G., Cogato I., Fredman P., Frederiksen J., Fredrikson S., Gallo P., Grimaldi L., Grønning M. (1994) Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:897-902
3. Archelos J., Storch M., Hartung H. (2000) The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47:694-706
4. Asakura K., Rodriguez M. (1998) A unique population of circulating autoantibodies promotes central nervous system remyelination. *Mult Scler* 4:217-21
5. Baumgartner A., Stich O., Rauer S. (2009) Anaphylaktoide und anaphylaktische Reaktionen unter Behandlung mit Glatirameracetat bei sechs MS-Patienten. In: DGN 2009. Poster Multiple Sklerose 3
6. Beer S., Rösler K., Hess C. (1995) Diagnostic value of paraclinical tests in multiple sclerosis: relative sensitivities and specificities for reclassification according to the Poser committee criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59:152-9
7. Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S., Kuhlmann T., Brück W. (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123:1174-83
8. Bjartmar C., Wujek J., Trapp B. (2003) Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 206:165-71
9. Breij E., Brink B., Veerhuis R., van den Berg C., Vloet R., Yan R., Dijkstra C., van der Valk P., Bö L. (2008) Homogeneity of active demyelinating lesions in

- established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63:16-25
10. Brettschneider J., Tumani H., Kiechle U., Muche R., Richards G., Lehmsiek V., Ludolph A., Otto M. (2009) IgG Antibodies against Measles, Rubella, and Varicella Zoster Virus Predict Conversion to Multiple Sclerosis in Clinically Isolated Syndrome. In: PLoS ONE, www.plosone.org.
 11. Brück W., Stadelmann-Nessler C. (2006) Pathologie und Pathophysiologie. In: Schmidt R., Hoffmann F. (Hg.) Multiple Sklerose. Elsevier, Urban&Fischer, München; Jena, S. 33-42
 12. Chang A., Tourtellotte W., Rudick R., Trapp B. (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:165-73
 13. Cole S., Beck R., Moke P., Kaufman D., Tourtellotte W. (1998) The predictive value of CSF oligoclonal banding for MS 5 years after optic neuritis. Optic Neuritis Study Group. *Neurology* 51:885-7
 14. Comi G. (2003) From inflammation to degeneration: the lessons of clinical trials. *Neurol Sci* 24:295-7
 15. Comi G., Filippi M., Barkhof F., Durelli L., Edan G., Fernández O., Hartung H., Seeldrayers P., Sörensen P., Rovaris M., Martinelli V., Hommes O., Group E.T.o.M.S.S. (2001) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357:1576-82
 16. Comi G., Martinelli V., Rodegher M., Moiola L., Bajenaru O., Carra A., Elovaara I., Fazekas F., Hartung H., Hillert J., King J., Komoly S., Lubetzki C., Montalban X., Myhr K., Ravnborg M., Rieckmann P., Wynn D., Young C., Filippi M., group P.s. (2009) Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 374:1503-11
 17. Compston A., Coles A. (2002) Multiple Sclerosis. *Lancet* 359:1221-31
 18. Compston A., Coles A. (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-17

19. Davies G., Keir G., Thompson E., Giovannoni G. (2003) The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: A follow-up study. *Neurology* 60:1163-6
20. De Stefano N., Matthews P., Fu L., Narayanan S., Stanley J., Francis G., Antel J., Arnold D. (1998) Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121:1469-77
21. De Stefano N., Narayanan S., Mortilla M., Guidi L., Bartolozzi M., Federico A., Arnold D. (2000) Imaging axonal damage in multiple sclerosis by means of MR spectroscopy. *Neurol Sci* 21:883-7
22. DGN (2008) Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. In: www.dgn.org.
23. Dymment D., Ebers G., Sadovnick A. (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104-10
24. Ebers G., Sadovnick A., Risch N. (1995) A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377:150-1
25. Farrell M., Kaufmann J., Gilbert J., Noseworthy J., Armstrong H., Ebers G. (1985) Oligoclonal bands in multiple sclerosis: clinical-pathologic correlation. *Neurology* 35:212-8
26. Fieschi C., Gasperini C., Ristori G., Bastianello S., Girmenia F., Leuzzi V., Buttinelli C., Rasura M. (1995) Patients with clinically definite multiple sclerosis, white matter abnormalities on MRI, and normal CSF: if not multiple sclerosis, what is it? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:255-6
27. Filippini G., Comi G., Cosi V., Bevilacqua L., Ferrarini M., Martinelli V., Bergamaschi R., Filippi M., Citterio A., D'Incerti L., Campi A., Sberna M., Riti F., Avanzini G., Colombo N., Zappoli F., Scotti G., Savoiardo M. (1994) Sensitivities and predictive values of paraclinical tests for diagnosing multiple sclerosis. *J Neurol* 241:132-7

28. Flachenecker P., Zettl U. (2006) Epidemiologie. In: Schmidt R., Hoffmann F. (Hg.) Multiple Sklerose. Elsevier, Urban&Fischer, München; Jena, S. 11-18
29. Franciotta D., Zardini E., Bono G., Brustia R., Minoli L., Cosi V. (1996) Antigen-specific oligoclonal IgG in AIDS-related cytomegalovirus and toxoplasma encephalitis. *Acta Neurol Scand* 94:215-8
30. Frederiksen J., Sindic C. (1998) Intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG, and free kappa and free lambda oligoclonal bands in acute monosymptomatic optic neuritis. Comparison with brain MRI. *Mult Scler* 4:22-6
31. Freedman M., Thompson E., Deisenhammer F., Giovannoni G., Grimsley G., Keir G., Ohman S., Racke M., Sharief M., Sindic C., Sellebjerg F., Tourtellotte W. (2005) Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 62:865-70
32. Frohman E., Filippi M., Stuve O., Waxman S., Corboy J., Phillips J., Lucchinetti C., Wilken J., Karandikar N., Hemmer B., Monson N., De Keyser J., Hartung H., Steinman L., Oksenberg J., Cree B., Hauser S., Racke M. (2005) Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions. *Arch Neurol* 62:1345-56
33. Ghezzi A., Martinelli V., Torri V., Zaffaroni M., Rodegher M., Comi G., Zibetti A., Canal N. (1999) Long-term follow-up of isolated optic neuritis: the risk of developing multiple sclerosis, its outcome, and the prognostic role of paraclinical tests. *J Neurol* 246:770-5
34. Godec M., Asher D., Murray R., Shin M., Greenham L., Gibbs C., Gajdusek D. (1992) Absence of measles, mumps, and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Ann Neurol* 32:401-4
35. Goffette S., Schlupe M., Henry H., Duprez T., Sindic C. (2004) Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:308-10

36. Gold R., Linington C., Lassmann H. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129:1953-71
37. Goodin D., Bates D. (2009) Review: Treatment of early multiple sclerosis: the value of treatment after a first clinical episode. *Mult Scler* 15:1175-82
38. Hein T., Hopfenmüller W. (2000) Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71:288-94
39. Imrell K., Landtblom A., Hillert J., Masterman T. (2006) Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology* 67:1062-4
40. Jacobs L., Beck R., Simon J., Kinkel R., Brownschidle C., Murray T., Simonian N., Slasor P., Sandrock A. (2000) Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 343:898-904
41. Jarius S., Eichhorn P., Jacobi C., Wildemann B., Wick M., Voltz R. (2009) The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? *J Neurol Sci* 280:98-100
42. Jarius S., Stich O., Rasiach C., Voltz R., Rauer S. (2008) Qualitative evidence of Ri specific IgG-synthesis in the cerebrospinal fluid from patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Sci* 268:65-8
43. Jarius S., Stich O., Speck A., Rasiach C., Wildemann B., Meinck H., Rauer S. (derzeit in "major revision") Qualitative and quantitative evidence of anti-glutamic acid decarboxylase-specific intrathecal antibody synthesis in patients with stiff person syndrome. *J Neuroimmunol*
44. Joseph F., Hirst C., Pickersgill T., Ben-Shlomo Y., Robertson N., Scolding N. (2009) CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:292-6
45. Kabat E., Freedman D., Murray J., Knaub V. (1950) A study of the crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of 100

- cases of multiple sclerosis and in other diseases. *Am J Med Sci* 219:55-64
46. Kaiser R. (1991) Affinity immunoblotting: rapid and sensitive detection of oligoclonal IgG, IgA and IgM in unconcentrated CSF by agarose isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 103:216-25
 47. Kappos L., Polman C., Freedman M., Edan G., Hartung H., Miller D., Montalban X., Barkhof F., Bauer L., Jakobs P., Pohl C., Sandbrink R. (2006) Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 67:1242-9
 48. Kesselring J. (2005) Epidemiologie. In: Brandt T., Cohen R., Helmchen H., Schmidt L. (Hg.) *Multiple Sklerose*. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart, S. 79-86
 49. Kikuchi S., Fukazawa T., Niino M., Yabe I., Miyagishi R., Hamada T., Hashimoto S., Tashiro K. (2003) HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* 60:647-51
 50. Koch M., Heersema D., Mostert J., Teelken A., De Keyser J. (2007) Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 14:797-800
 51. Kostulas V., Link H., Lefvert A. (1987) Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* 44:1041-4
 52. Link H., Huang Y. (2006) Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 180:17-28
 53. Lublin F., Reingold S. (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907-11
 54. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H. (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis

- lesions. A study in 113 cases. *Brain* 122:2279-95
55. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-17
56. Magliozzi R., Howell O., Vora A., Serafini B., Nicholas R., Puopolo M., Reynolds R., Aloisi F. (2007) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130:1089-104
57. Masjuan J., Alvarez-Cermeno J., García-Berragán N., Díaz-Sánchez M., Espino M., Sádaba M., González-Porqué P., Martínez San Millán J., Villar L. (2006) Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 66:576-6
58. McDonald W., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H., Lublin F., McFarland H., Paty D., Polman C., Reingold S., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., van den Noort S., Weinshenker B., Wolinsky J. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-7
59. McLean B., Luxton R., Thompson E. (1990) A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications. *Brain* 113:1269-89
60. Meinl E., Krumbholz M., Hohlfeld R. (2006) B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 59:880-92
61. Meinl E., Voltz R. (2006) Immunpathogenese. In: Schmidt R., Hoffmann F. (Hg.) *Multiple Sklerose*. Elsevier, Urban&Fischer, München; Jena, S. 43-51
62. Nakashima I., Fujihara K., Misu T., Fujimori J., Sato S., Takase S., Itoyama Y. (2002) A comparative study of Japanese multiple sclerosis patients with and without oligoclonal IgG bands. *Mult Scler* 8:459-62

63. Nordal H., Vandvik B., Norrby E. (1978) Multiple Sclerosis: local synthesis of electrophoretically restricted measles, rubella, mumps and herpes simplex virus antibodies in the central nervous system. *Scand J Immunol* 7:473-9
64. Noseworthy J., Lucchinetti C., Rodriguez M., Weinshenker B. (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-52
65. Paolicelli D., Drenzo V., Trojano M. (2009) Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis. *Biologics* 3:369-76
66. Paolino E., Fainardi E., Ruppì P., Tola M., Govoni V., Casetta I., Monetti V., Granieri E., Carreras M. (1996) A prospective study on the predictive value of CSF oligoclonal bands and MRI in acute isolated neurological syndromes for subsequent progression to multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:572-5
67. Pittock S., Lucchinetti C. (2007) The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist* 13:45-56
68. Polman C., Reingold S., Edan G., Filippi M., Hartung H., Kappos L., Lublin F., Metz L., McFarland H., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A., Weinshenker B., Wolinsky J. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840-6
69. Poser C., Paty D., Scheinberg L., McDonald W., Davis F., Ebers G., Johnson K., Sibley W., Silberberg D., Tourtellotte W. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13:227-31
70. Pugliatti M., Rosati G., Carton H., Riise T., Drulovic J., Vécsei L., Milanov I. (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13:700-22
71. Qin Y., Duguet P., Zhang Y., Talbot P., Poole R., Antel J. (1998) Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 102:1045-50
72. Reiber H. (2003) Erregerspezifische Antikörper. In: Zettl U., Lehmitz R., Mix E. (Hg.) *Klinische Liquordiagnostik*. Walter De Gruyter, Berlin; New York, S. 200-

7

73. Reiber H., Lange P. (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 37:1153-60
74. Reiber H., Ungefehr S., Jacobi C. (1998) The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4:111-7
75. Robinson-Agramonte M., Reiber H., Cabrera-Gomez J., Galvizu R. (2007) Intrathecal polyspecific immune response to neurotropic viruses in multiple sclerosis: a comparative report from Cuban patients. *Acta Neurol Scand* 115:312-8
76. Rudick R., Cookfair D., Simonian N., Ransohoff R., Richert J., Jacobs L., Herndon R., Salazar A., Fischer J., Granger C., Goodkin D., Simon J., Bartoszak D., Bourdette D., Braiman J., Brownscheidle C., Coats M., Cohan S., Dougherty D., Kinkel R., Mass M., Munchsauer F., O'Reilly K., Priore R., Pullicino P., Scherokman B., Wende K., Weinstock-Guttman B., Whitham R., Group. T.M.S.C.R. (1999) Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNbeta-1a) for relapsing multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 93:8-14
77. Sadovnick A., Baird P., Ward R. (1988) Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29:533-41
78. Sadovnick A., Ebers G., Dyment D., Risch N. (1996) Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 347:1728-30
79. Sastre-Garriga J., Tintoré M., Rovira A., Grivé E., Pericot I., Comabella M., Thompson A., Montalban X. (2003) Conversion to multiple sclerosis after a clinically isolated syndrome of the brainstem: cranial magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid and neurophysiological findings. *Mult Scler* 9:39-43
80. Schmidt R., Linke E. (2006) Liquor- und Blutuntersuchungen. In: Schmidt R., Hoffmann F. (Hg.) *Multiple Sklerose*. Elsevier, Urban&Fischer, München;

- Jena, S. 117-23
81. Schneider R., Euler B., Rauer S. (2007) Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol* 14:907-11
 82. Serafini B., Rosicarelli B., Magliozzi R., Stigliano E., Aloisi F. (2004) Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14:164-74
 83. Sindic C., Monteyne P., Laterre E. (1994) The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 54:75-80
 84. Siritho S., Freedman M. (2009) The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 279:21-5
 85. Söderström M., Ya-Ping J., Hillert J., Link H. (1998) Optic neuritis: prognosis for multiple sclerosis from MRI, CSF, and HLA findings. *Neurology* 50:708-14
 86. Sospedra M., Martin R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747
 87. Stendahl-Brodin L., Link H. (1980) Relation between benign course of multiple sclerosis and low-grade humoral immune response in cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 43:102-5
 88. Stich O., Graus F., Rasiach C., Rauer S. (2003) Qualitative evidence of anti-Yo-specific intrathecal antibody synthesis in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol* 141:165-9
 89. Stich O., Rauer S. (2007) Antigen-specific oligoclonal bands in cerebrospinal fluid and serum from patients with anti-amphiphysin- and anti-CV2/CRMP5 associated paraneoplastic neurological syndromes. *Eur J Neurol* 14:650-3
 90. Thompson A., Polman C., Miller D., McDonald W., Brochet B., Filippi M., Montalban X., De Sá J. (1997) Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120:1085-96
 91. Tintoré M., Rovira A., Brieva L., Grivé E., Jardí R., Borrás C., Montalban X.

- (2001) Isolated demyelinating syndromes: comparison of CSF oligoclonal bands and different MR imaging criteria to predict conversion to CDMS. *Mult Scler* 7:359-63
92. Tintoré M., Rovira A., Río J., Tur C., Pelayo R., Nos C., Téllez N., Perkal H., Comabella M., Sastre-Garriga J., Montalban X. (2008) Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 70:1079-83
93. Trapp B., Peterson J., Ransohoff R., Rudick R., Mörk S., Bö L. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338:278-85
94. Trapp B., Ransohoff R., Rudick R. (1999) Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12:295-302
95. Tumani H., Tourtellotte W., Peter J., Felgenhauer K. (1998) Acute optic neuritis: combined immunological markers and magnetic resonance imaging predict subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *J Neurol Sci* 155:44-9
96. Vandvik B., Norrby E., Nordal H. (1979) Optic neuritis: local synthesis in the central nervous system of oligoclonal antibodies to measles, mumps, rubella, and herpes simplex viruses. *Acta Neurol Scand* 60:204-13
97. Vandvik B., Norrby E., Nordal H., Degré M. (1976) Oligoclonal measles virus-specific IgG antibodies isolated from cerebrospinal fluids, brain extracts, and sera from patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 5:979-92
98. Walsh M., Tourtellotte W. (1986) Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med* 163:41-53
99. Wang A., Bellengier L., Denève M., Zèphir H., Lacour A., Devos P., Lebrun C., Debouverie M., Ongagna J., De Sèze J., Vermersch P. (2007) Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis is not associated with less aggressive course. *Mult Scler* 13 (suppl 2):91

100. Weinshenker B., Bass B., Rice G., Noseworthy J., Carriere W., Baskerville J., Ebers G. (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112:133-46
101. Wiendl H., Kieseier B., Gold R., Hohlfeld R., Bendszus M., Hartung H. (2006) Multiple Sklerose - Revision der neuen McDonald-Diagnosekriterien. *Nervenarzt* 77:1235-45
102. Willer C., Dymont D., Risch N., Sadovnick A., Ebers G., Group C.C.S. (2003) Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12877-82
103. Wurster U. (2003) Elektrophoreseverfahren - Nachweis und Bedeutung von oligoklonalen Banden. In: Zettl U., Lehmitz R., Mix E. (Hg.) *Klinische Liquordiagnostik*. Walter De Gruyter, Berlin; New York, S. 207-36
104. Zeman A., Kidd D., McLean B., Kelly M., Francis D., Miller D., Kendall B., Rudge P., Thompson E., McDonald W. (1996) A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:27-30
105. Zettl U., Mix E., Lehmitz R. (2003) Entzündlich demyelinisierende Erkrankungen des Nervensystems. In: Zettl U., Mix E., Lehmitz R. (Hg.) *Klinische Liquordiagnostik*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, S. 404-10

7 Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits an folgender Stelle veröffentlicht:

Stich O, Kluge J, Speck J, Rauer S (2009): Detection of virus-specific (measles, rubella, zoster) oligoclonal IgG-bands in CSF from multiple sclerosis patients without oligoclonal bands of total IgG. 25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Poster No. 317.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Rauer für das freundliche Überlassen der Arbeit und die Möglichkeit der Durchführung in den Laborräumen. Ich habe durch diese Arbeit einen Einblick in das wissenschaftliche experimentelle Arbeiten bekommen und mich intensiv mit einem spannenden Teilgebiet der Neurologie beschäftigen können. Eine besondere Erfahrung war für mich auch die Teilnahme am ECTRIMS-Kongress in Düsseldorf, für deren Ermöglichung ich sehr dankbar bin.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Langosch für die Übernahme der Zweitkorrektur. Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Oliver Stich für die Einarbeitung in das experimentelle Arbeiten und die exzellente Betreuung in der Planung, Durchführung und beim Schreiben der Arbeit bedanken.

Mein Dank geht auch an Frau Janina Speck für die methodische Anleitung und die kollegiale Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt dem Team des Liquorlabors, das mich bei technischen Fragen, bei Bestellungen und bei der Nachbestimmung von Routineparametern stets unterstützt hat.

Den ehemaligen und aktuellen Doktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für die sehr gute Kollegialität.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Ermöglichung des Medizinstudiums und für die große Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit danken.

Meiner Freundin Ursula danke ich für die große Geduld und fortwährende Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit und für die vielen Verschönerungen und Anregungen beim Verfassen des Textes.

Mein Dank geht auch an Felix für die konstruktive Kritik an der Arbeit und an meinen Bruder Jonas für die Hilfsbereitschaft bei statistischen Fragen.

Allen weiteren Menschen, deren Unterstützung ich bei der Entstehung dieser Arbeit erfahren habe, gilt ebenfalls mein großes Dankeschön.

9 Lebenslauf

Die Seiten 72-73 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

10 Anhang

Zu: Kapitel 2.3.4: Auswertung

Zusätzlich zur visuellen Bewertung des Vorliegens spezifischer oligoklonaler Banden durch drei unabhängige Untersucher wurde der Versuch einer semiquantitativen Auswertung der oligoklonalen Banden mit der frei erhältlichen Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) unternommen.

Mit Hilfe dieser Software wurden zwei Werte ermittelt, die einen Vergleich der Bandenmuster erlauben sollten. Zunächst wurden die Flächen unter der Kurve (engl.: area under the curve, AUC) der Liquor- sowie der Serumspur ermittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt ($AUC[Liq] / AUC[Ser]$) (Abb. 2.3). In einem zweiten Schritt wurde durch ImageJ eine digitale Subtraktion der Serum- von der Liquorspur durchgeführt, und anschließend die Anzahl der peaks dieses resultierenden Graphs ermittelt (Abb. 2.4).

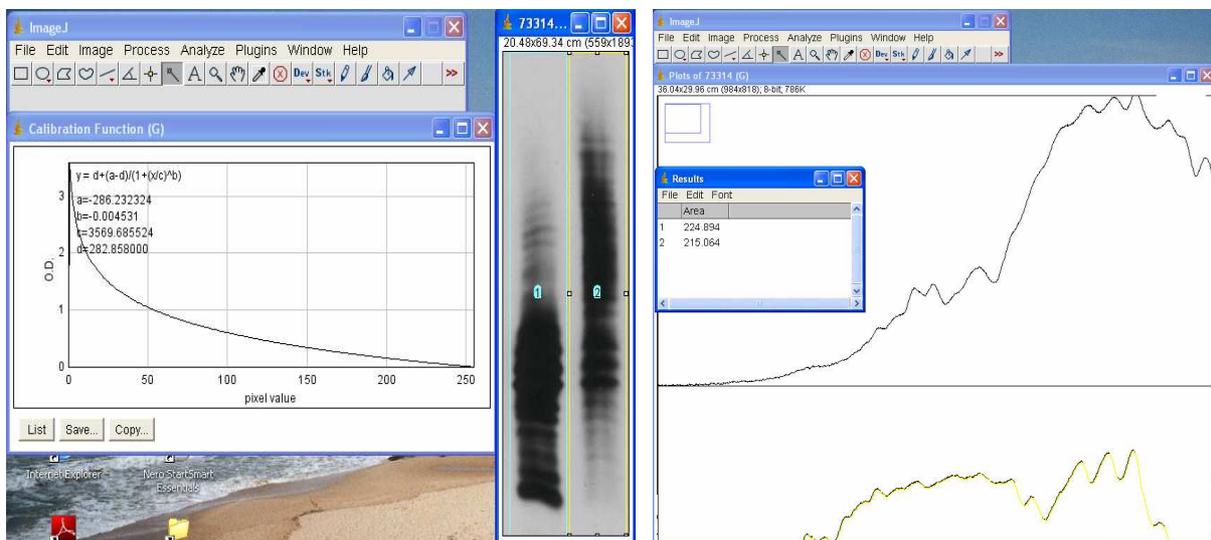


Abbildung 2.3: Auswertung mit ImageJ. Links sind das auszuwertende Bandenmuster sowie die Kalibrationskurve abgebildet. Über die Liquor- und die Serumspur wird ein Ausleseraster gelegt. ImageJ führt dann die Auswertung entsprechend der Kalibrierung durch, es resultieren zwei Graphen, rechts abgebildet, bei denen die Fläche unter der Kurve bestimmt werden kann. Aus diesen Werten wird dann der Quotient errechnet.

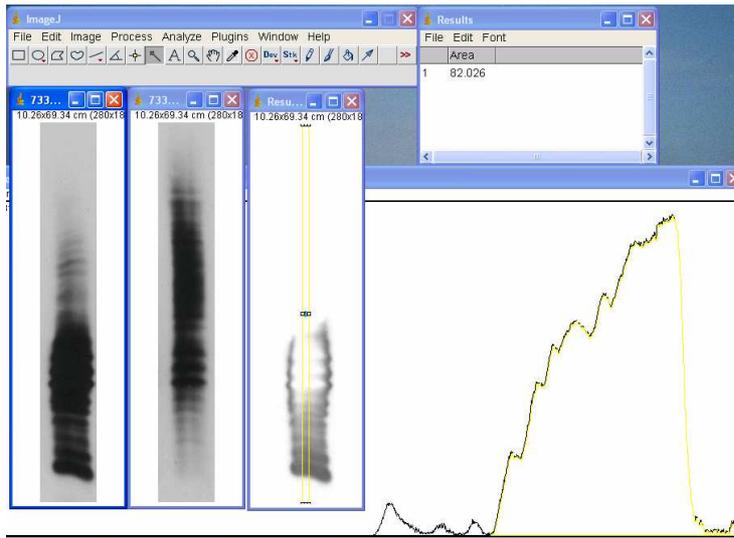


Abbildung 2.4: Auswertung mit ImageJ. Die Liquor- und Serumspur werden als getrennte Dateien geöffnet, anschließend kann ImageJ durch eine Rechenoperation die beiden Graphen voneinander abziehen, es resultiert ein Subtraktionsgraph. Bei diesem kann die Anzahl der Banden entweder visuell abgelesen werden, oder es wird mithilfe eines Ausleserasters die entsprechende Graphik erstellt.

Beide ermittelten Werte wurden unabhängig voneinander zur Bewertung der Bandenmuster herangezogen, schließlich sollte der validere der beiden Werte zur Beurteilung herangezogen werden.

Ergebnis der Auswertung mit ImageJ

Für die Auswertung durch den Quotienten der Flächen unter den Kurven wurde ein Quotient > 1 als Evidenz einer intrathekalen Synthese angenommen, für die Auswertung durch die Anzahl der peaks im Subtraktionsgraph wurden mindestens 2 peaks für die Annahme positiver oligoklonaler Banden verlangt.

Es zeigte sich eine große Artefaktanfälligkeit der digitalen Auswertung. Insbesondere erschwerten die unterschiedlich stark ausgeprägte Hintergrundaktivität der verschiedenen Entwicklungen sowie ein in manchen Fällen nicht zu verhindernder schräger Verlauf der Probenspuren einen Vergleich der Bandenmuster. Die Verkleinerung des Auswerterahmens sowie die Verschiebung der Nulllinie führten ebenfalls nicht zu einer Steigerung der Validität dieser semiquantitativen Auswertung. Im Vergleich mit dem Goldstandard, der visuellen Auswertung durch drei unabhängige Untersucher, zeigten sich mit der Auswertung durch ImageJ in 66

Fällen der MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG (22 Proben x 3 Antigene = 66 Fälle) für die Bewertung durch den Quotienten der Flächen unter den Kurven in 9,1 % falsch negative und in 18,2 % falsch positive Beurteilungen sowie für die Bewertung durch die Anzahl der peaks im Subtraktionsgraphen in 3,0 % falsch negative und in 6,1 % falsch positive Bewertungen, jeweils bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Fälle.

Somit wurde die semiquantitative Auswertung der spezifischen oligoklonalen Banden nicht für die endgültige Bewertung der Bandenmuster verwendet.

Zu: Kapitel 3.2: Etablierung der Methode



Abbildung 3.1: Masern-spezifische oligoklonale Banden von einem Patienten mit positivem Masern-Antikörperindexwert und positivem Nachweis von Gesamt-IgG oligoklonalen Banden in der Routinediagnostik (Positivkontrolle, links und Mitte) und von einem Patienten mit Pseudotumor cerebri (Negativkontrolle, rechts). Die Coating-Konzentration des Masern-Antigens betrug 10 µg/ml, die Proben wurden auf eine Gesamt-IgG-Konzentration von 40 mg/l (Positivkontrolle links) bzw. 20 mg/l (Positivkontrolle Mitte und Negativkontrolle) äquilibriert. Farbumschlag mit 4-Chloro-1-Naphthol.

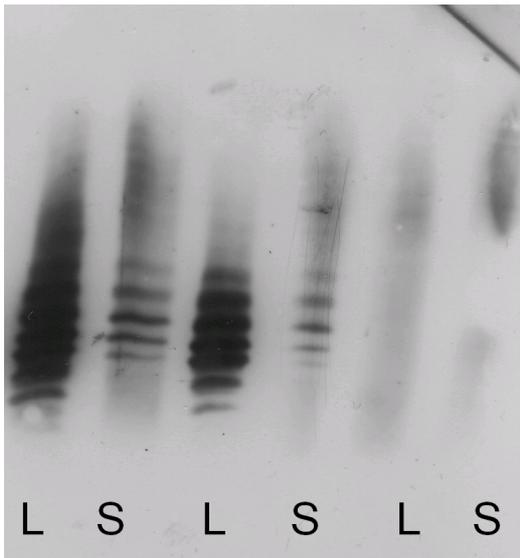


Abbildung 3.2 a)

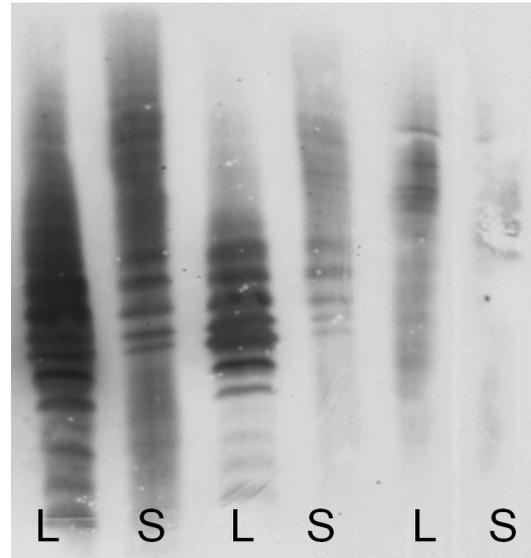


Abbildung 3.2 b)

Abbildung 3.2: Das linke und mittlere Liquor-/Serumpaar stammt jeweils von der Positivkontrolle, dabei wurden die Proben in der linken Spur jeweils auf eine Gesamt-IgG-Konzentration von 16 mg/l, die in der mittleren Spur jeweils auf 8 mg/l verdünnt. Die Negativkontrolle in der rechten Spur wurde in einer Konzentration von 16 mg/l aufgetragen.

Abbildung 3.2 a): Coating-Konzentration des Masern-Antigens: 10 µg/ml;

Einwirkzeit der Substratlösung: 7 Minuten

Abbildung 3.2 b): Coating-Konzentration des Masern-Antigens: 5 µg/ml; Einwirkzeit der Substratlösung: 15 Minuten

Zu: Kapitel 3.3: Nachweis der Spezifität der Methode

Abbildungen 3.3-3.5: Spezifitätskontrollen der MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden. In den Spuren 1+2 sowie 3+4 wurde jeweils Probenmaterial eines Patienten aufgetragen, der zuvor als sicher positiv gewertet wurde („MS“, Positivkontrolle). In der Spur 5 wurde das Liquor-/Serumpaar einer Negativkontrolle („OND“) aufgetragen.

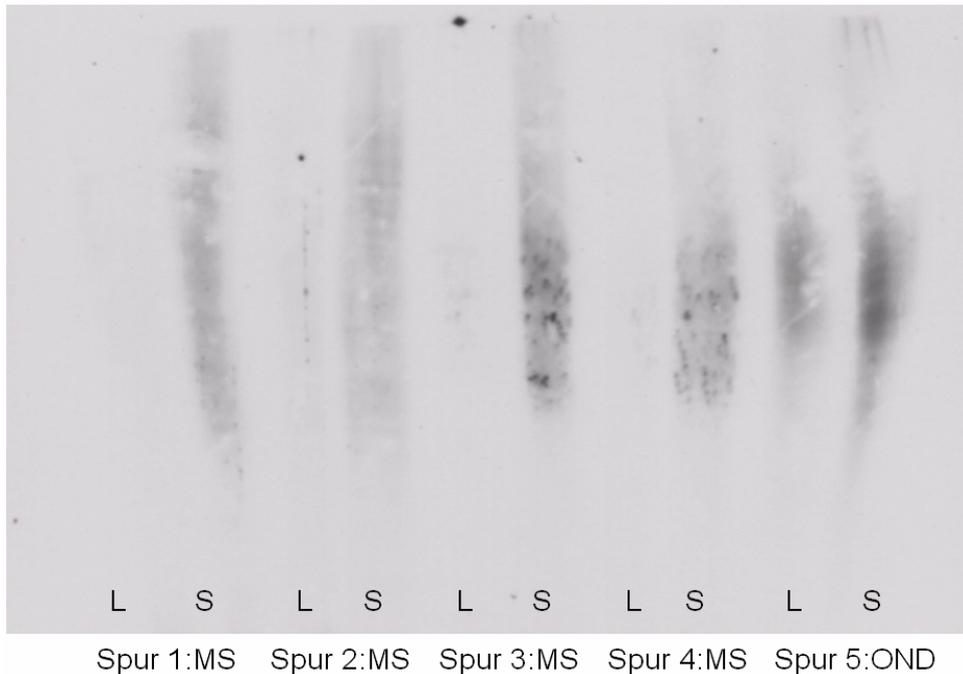


Abbildung 3.3 a): Spezifitätskontrolle Masern: Unbeschichtete NC-Folie.
Es resultiert eine schwache Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster.

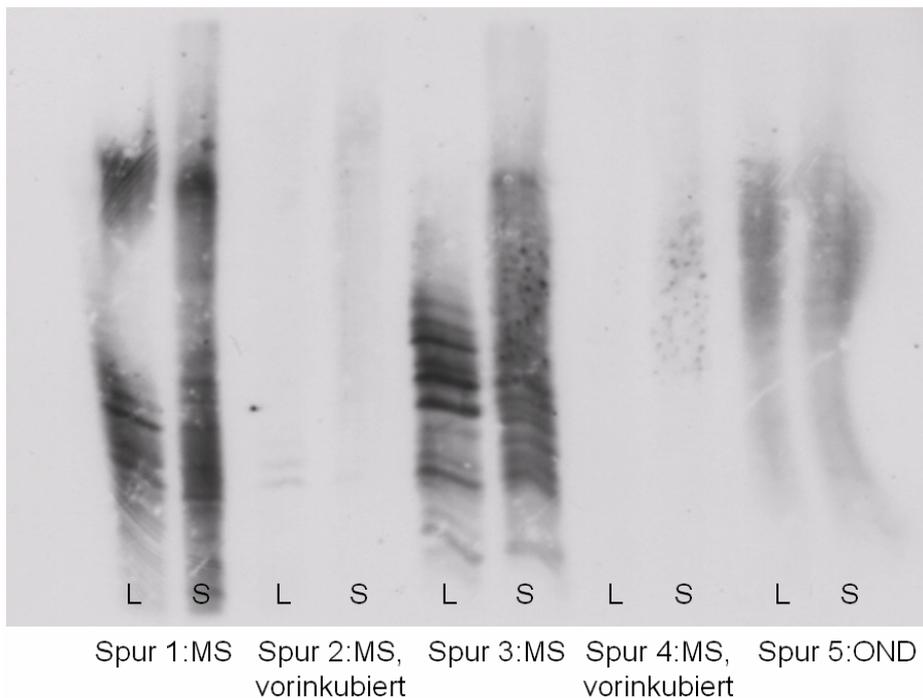


Abbildung 3.3 b): Spezifitätskontrolle Masern: Vorinkubierte Proben in den Spuren 2 und 4 aufgetragen. In diesen Spuren sind keine Bandenmuster erkennbar. Dagegen stellen sich die nicht vorinkubierten Proben derselben Patienten in den Spuren links daneben mit einem kräftigen, im Liquor überwiegenden Bandenmuster dar. Schwache Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster der Negativkontrolle in Spur 5.

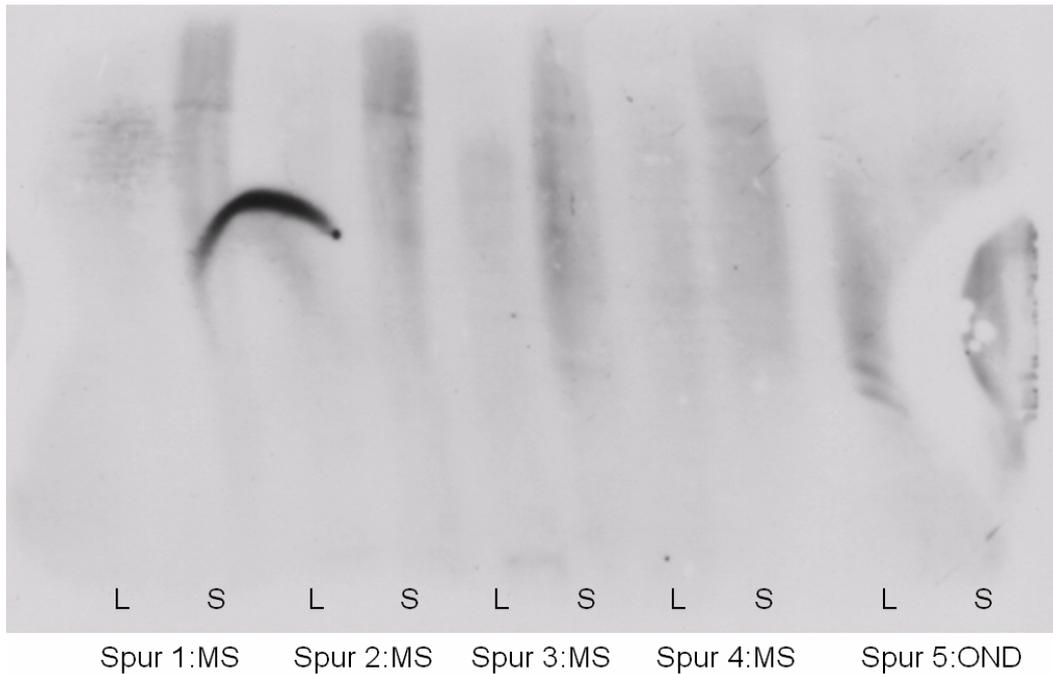


Abbildung 3.4 a): Spezifitätskontrolle Röteln: Unbeschichtete NC-Folie.
Es resultiert eine schwache Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster.

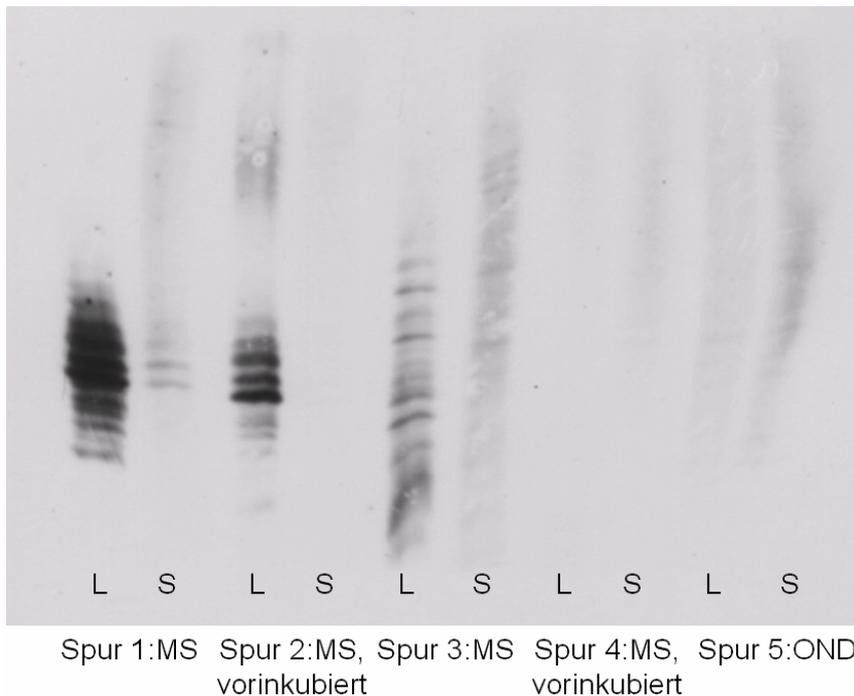


Abbildung 3.4 b): Spezifitätskontrolle Röteln: Vorinkubierte Proben in den Spuren 2 und 4 aufgetragen. In diesen Spuren ist nur ein sehr schwaches oder überhaupt kein Bandenmuster erkennbar. Dagegen stellen sich die nicht vorinkubierten Proben derselben Patienten in den Spuren links daneben mit einem kräftigen, im Liquor überwiegenden Bandenmuster dar. Schwache Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster der Negativkontrolle in Spur 5.

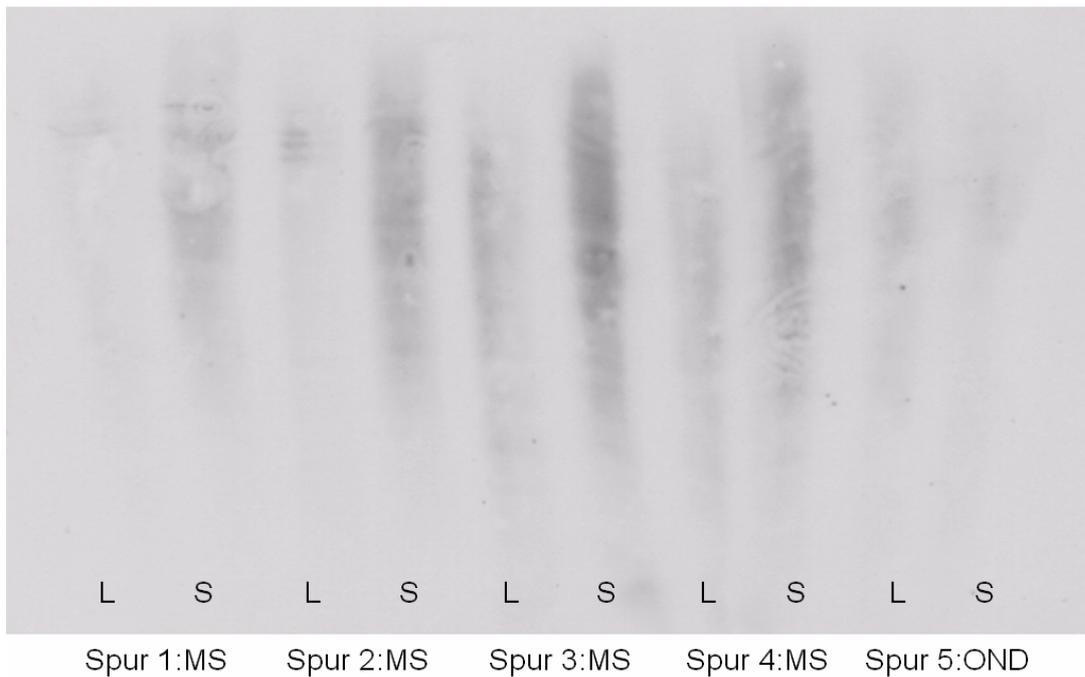


Abbildung. 3.5 a): Spezifitätskontrolle Zoster: Unbeschichtete NC-Folie. Es resultiert eine schwache Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster.

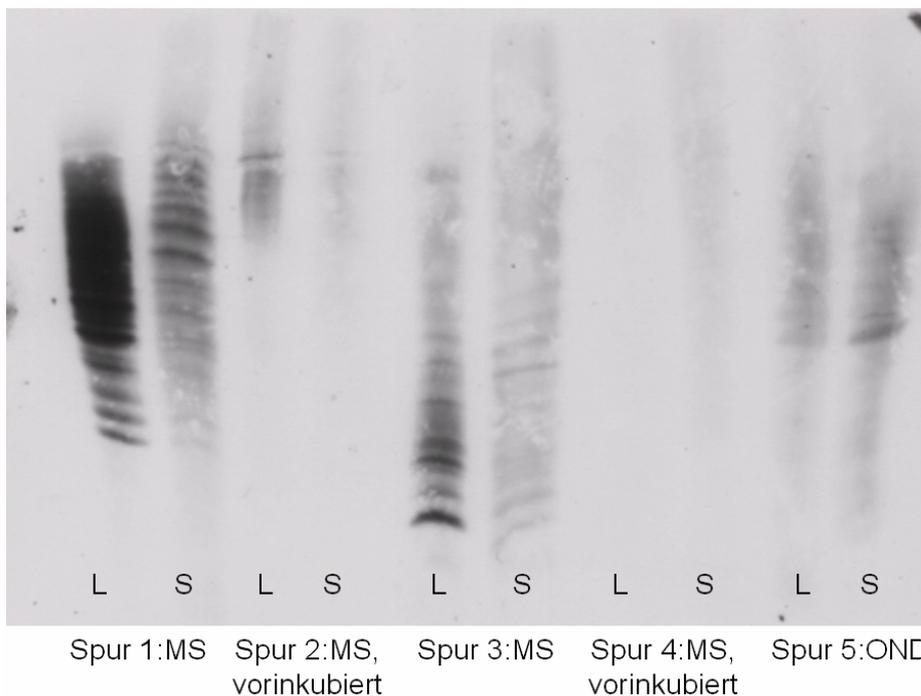


Abbildung 3.5 b): Spezifitätskontrolle Zoster: Vorinkubierte Proben in den Spuren 2 und 4 aufgetragen. In diesen Spuren sind keine Bandenmuster erkennbar. Dagegen stellen sich die nicht vorinkubierten Proben derselben Patienten in den Spuren links daneben mit einem kräftigen, im Liquor überwiegenden Bandenmuster dar. Schwache Zeichnung ohne erkennbares Bandenmuster der Negativkontrolle in Spur 5.

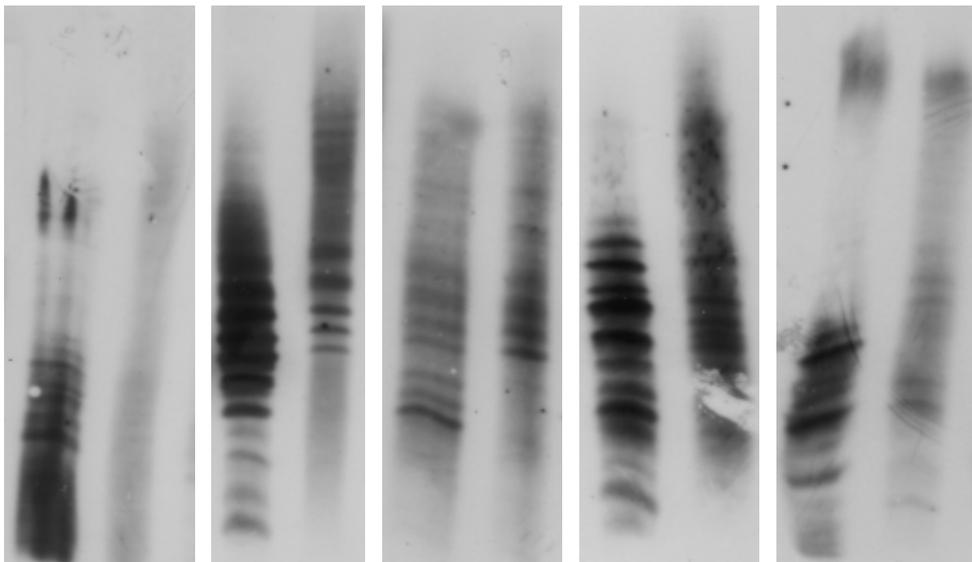
Zu: Kapitel 3.4: Nachweis von MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden

Die Liquorprobe bildet sich in allen Abbildungen links ab, die Serumprobe rechts.

Zu: Kapitel 3.4.1: Positivkontrollen

Zu jedem Antigen sind fünf repräsentative Positivkontrollen (P) abgebildet. Alle abgebildeten Bandenmuster zeigen zusätzliche oder exklusive Banden im Liquor gegenüber dem korrespondierenden Serum oder eine stärkere Intensität der Banden im Liquor. Demnach wird eine intrathekale Synthese von Virus-spezifischen Antikörpern angenommen.

Masern:



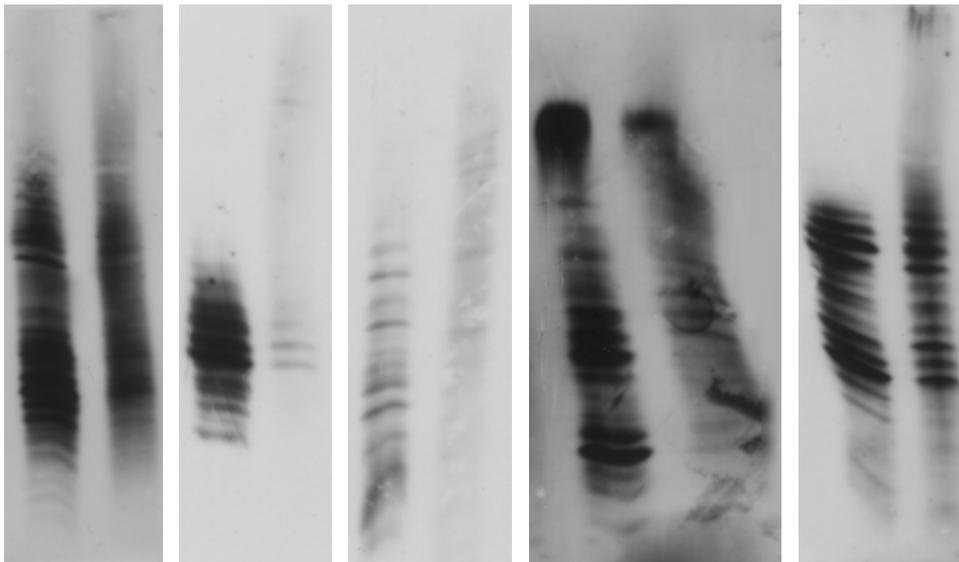
P 7

P 42

P 38

P 56

P 35

Röteln:

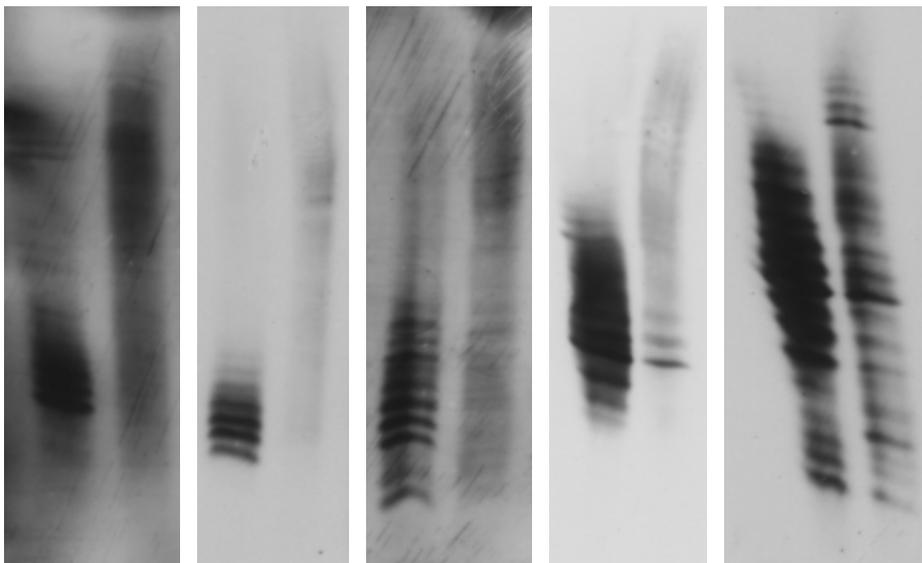
P 19

P 23

P 53

P 57

P 30

Zoster:

P 7

P 51

P 29

P 52

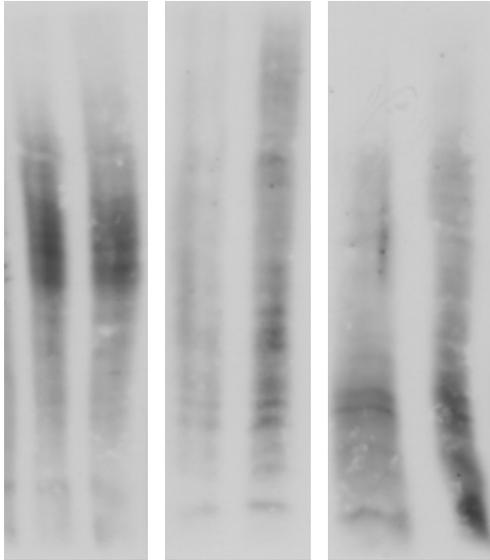
P 35

Zu: Kapitel 3.4.2: Negativkontrollen

Zu jedem Antigen sind drei repräsentative Negativkontrollen (N) abgebildet, zudem ist die als positiv gewertete Negativkontrolle (N 9 bei Zoster) aufgeführt.

Alle Bandenmuster bilden sich nur sehr schwach ab. Bis auf die Negativkontrolle N 9 bei Zoster zeigen sie zudem ein spiegelbildliches Muster in Liquor und Serum. Die Negativkontrolle N 9 wurde als positiv gewertet, da sich im Liquor zwei zusätzliche

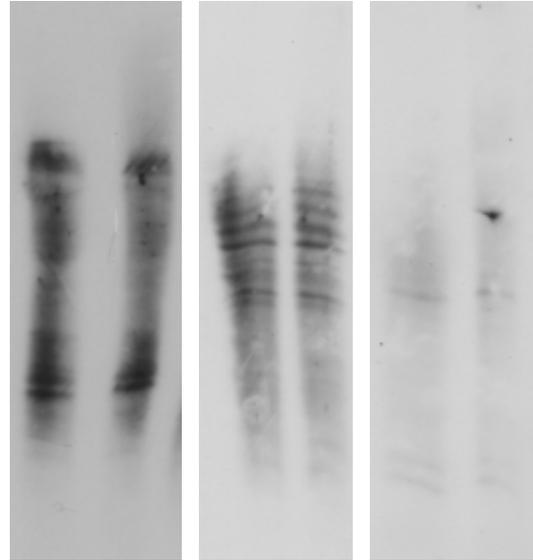
schwache Banden abbilden, die in der korrespondierenden Serumprobe nicht deutlich werden.

Masern:

N 6

N 8

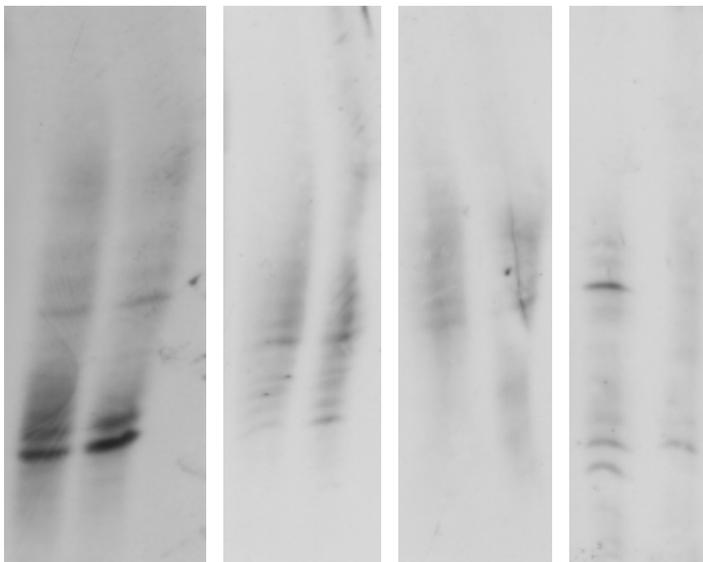
N 9

Röteln:

N 2

N 7

N 10

Zoster:

N 3

N 8

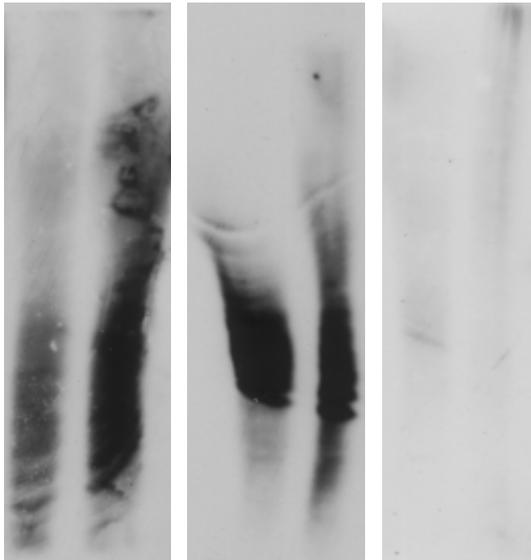
N 11

N 9

Zu: Kapitel 3.4.3: MS-Patienten ohne oligoklonale Banden des Gesamt-IgG

Im Folgenden sind die MRZ-spezifischen oligoklonalen Banden aller Studienpatienten, nach Patienten geordnet, abgebildet.

Patient Nr. 1, Probe a):

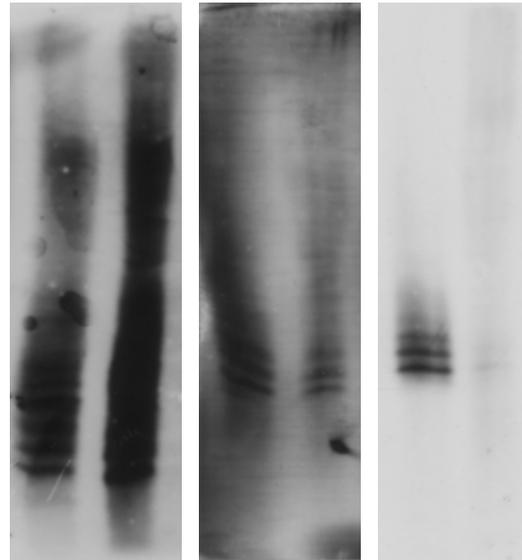


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 1, Probe b):

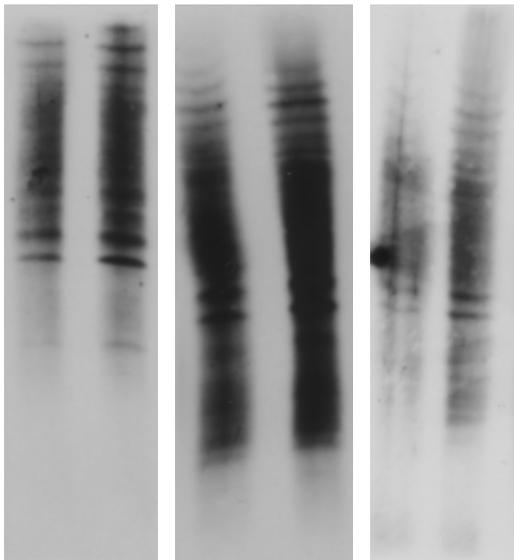


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr.2, Probe a):

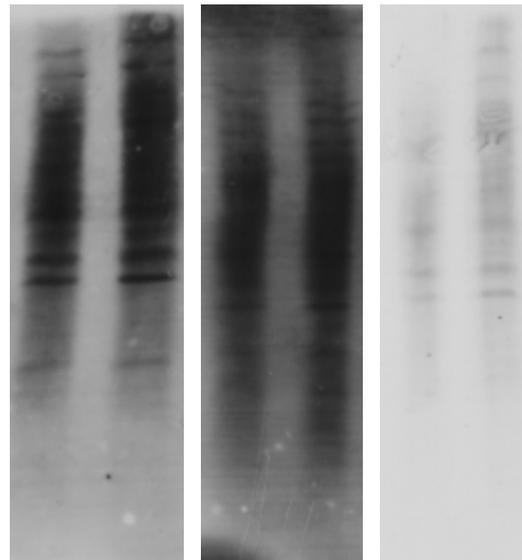


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 2, Probe b):

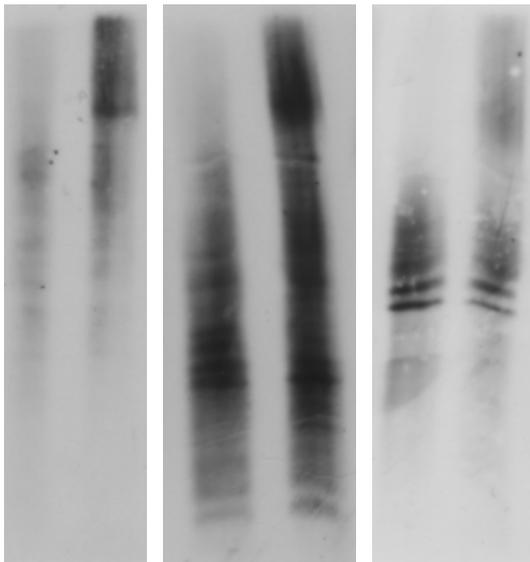


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 3, Probe a):

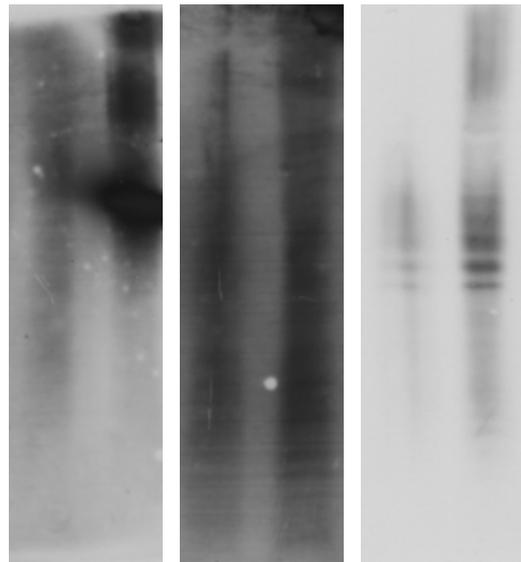


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 3, Probe b):

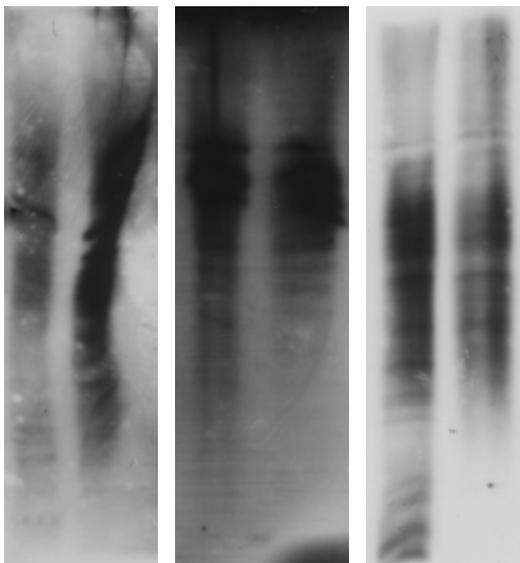


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 4:

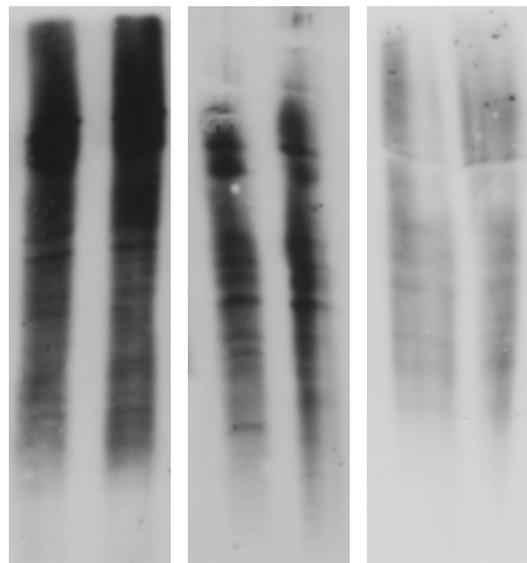


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 5:

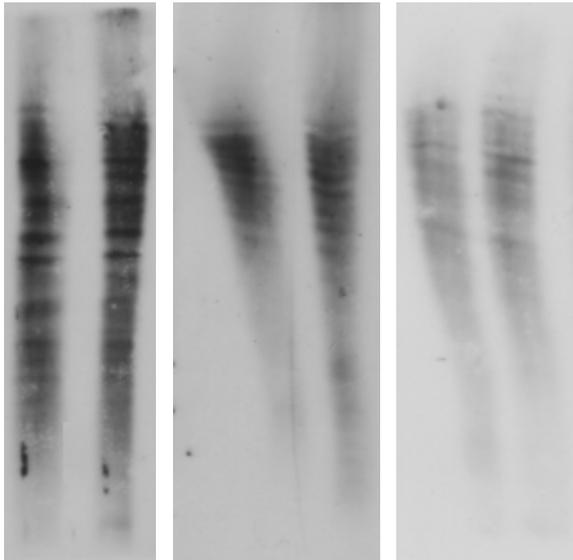


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 6, Probe a):

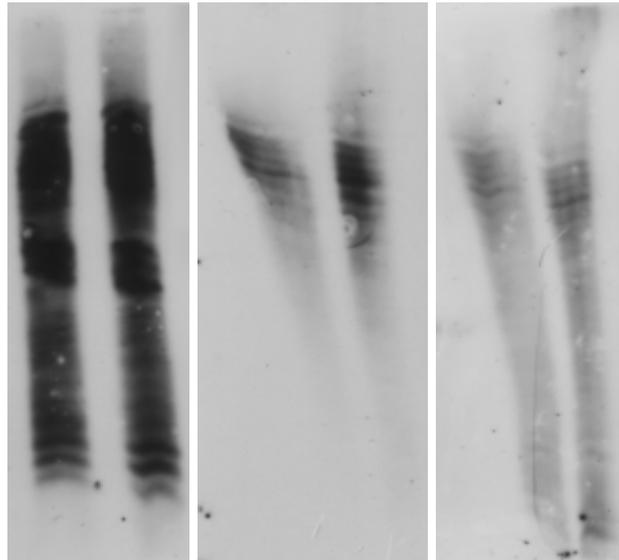


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 6, Probe b):

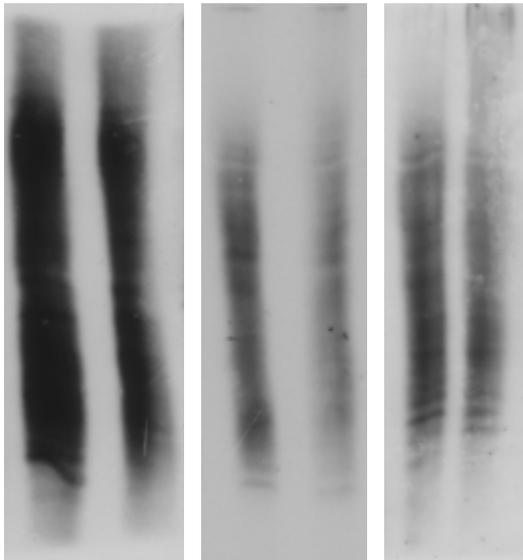


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 7:

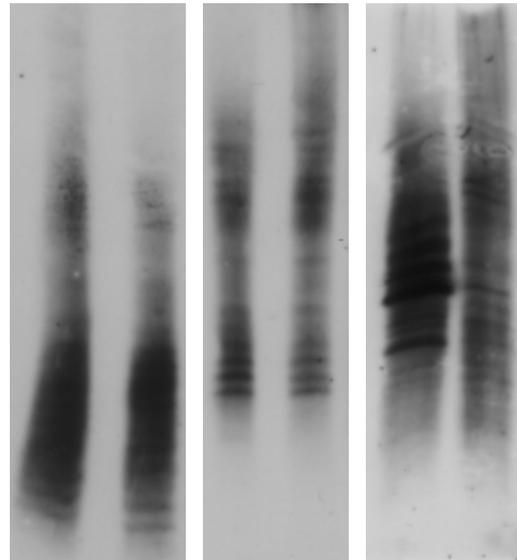


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 8:

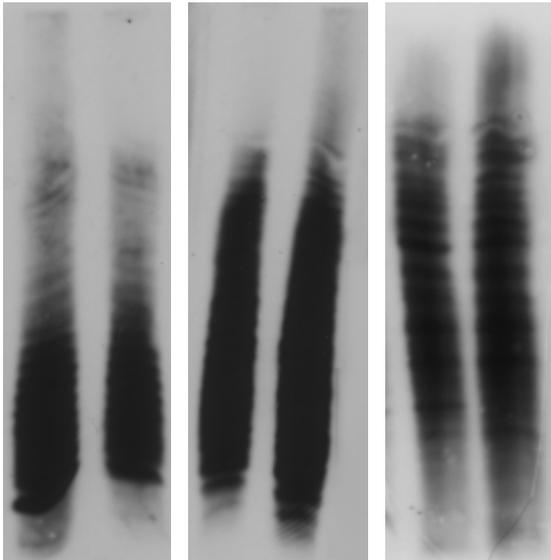


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 9:

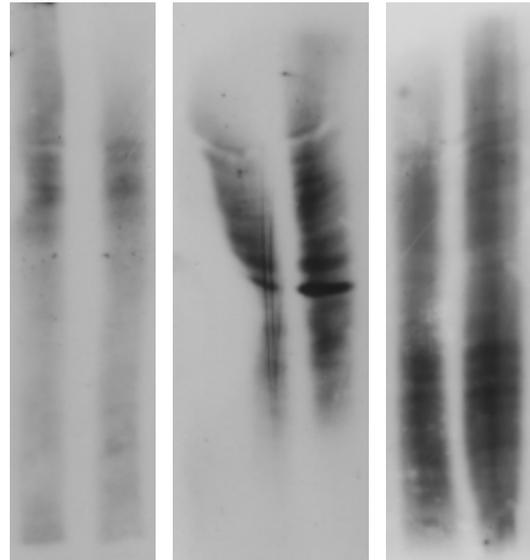


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 10:

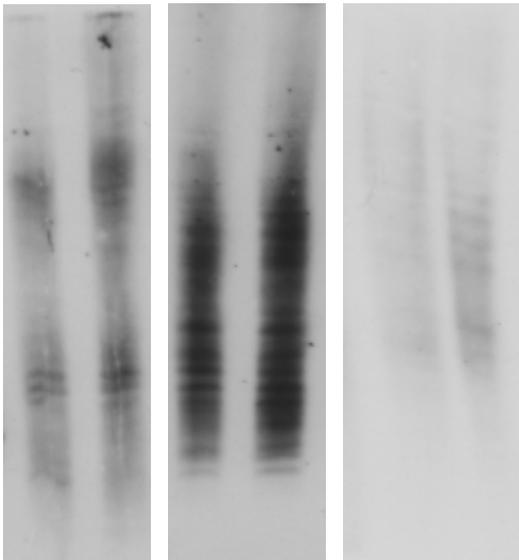


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 11, Probe a):

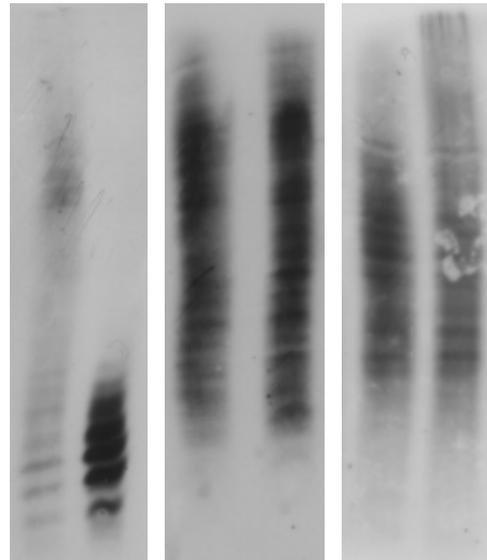


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 11, Probe b):

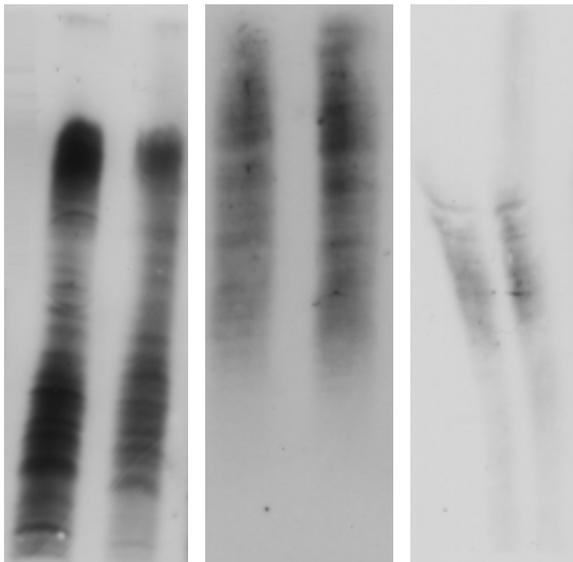


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 12:

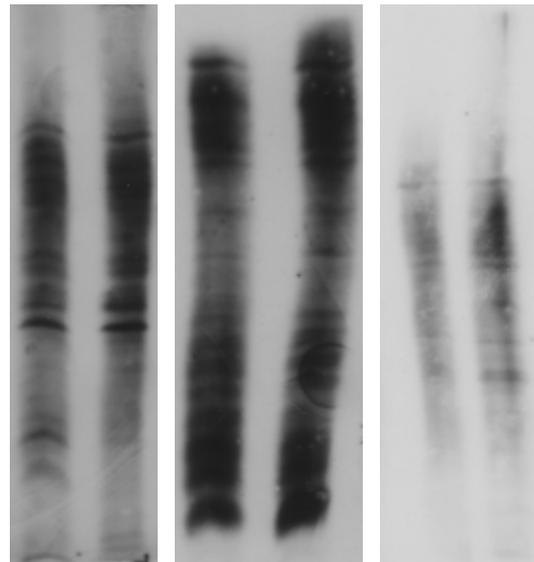


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 13:

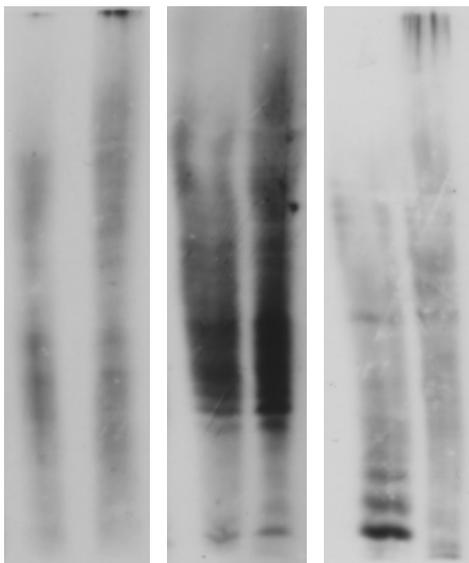


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 14:

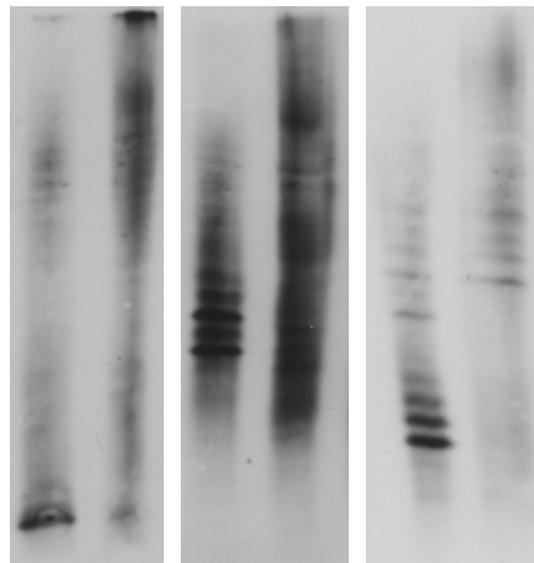


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 15:

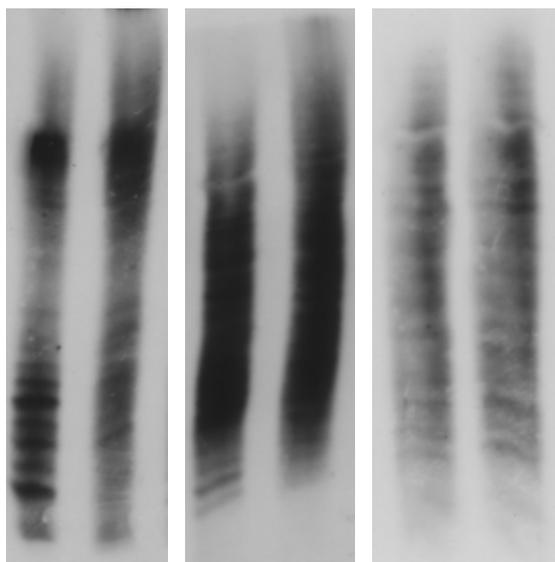


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 16:

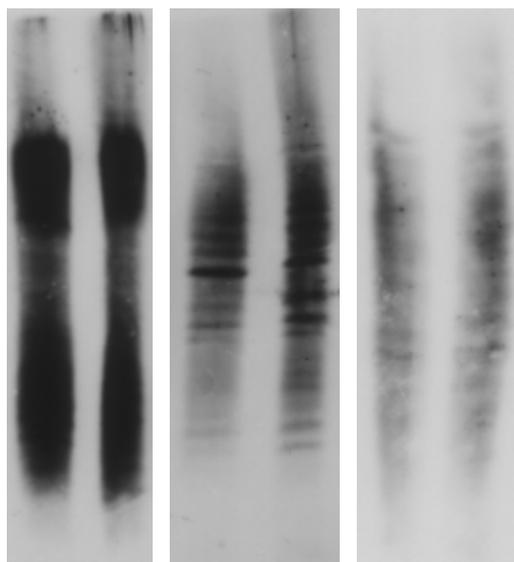


Masern

Röteln

Zoster

Patient Nr. 17:



Masern

Röteln

Zoster